

N° d'ordre : 3085

# THÈSE

présentée à

## L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT, GEOSCIENCES,  
SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT.

par **Benjamin DROGAT**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

### DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : **BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE**

**Ischémie et angiogenèse tumorale : effets des carences en glucose et en acides aminés sur l'expression du VEGF-A par les cellules tumorales et implication de la réponse UPR (« *Unfolded Protein Response* »).**

Soutenue le : 13 décembre 2005

Après avis de :

<b>Mme</b>	Josette Badet, Directeur de recherche INSERM	<b>Rapporteur</b>
<b>M</b>	Jean Plouet, Directeur de recherche CNRS	<b>Rapporteur</b>

Devant la commission d'examen formée de :

<b>M</b>	Jean Rosenbaum, Directeur de recherche INSERM	<b>Président</b>
<b>Mme</b>	Josette Badet, Directeur de recherche INSERM	<b>Rapporteur</b>
<b>M</b>	Jean Plouet, Directeur de recherche CNRS	<b>Rapporteur</b>
<b>M</b>	Eric Chevet, Assistant professor, Université McGill, Montréal	<b>Examineur</b>
<b>M</b>	Andréas Bikfalvi, Professeur, Université Bordeaux 1	<b>Examineur</b>
<b>M</b>	Michel Moenner, Professeur, Université Bordeaux 1	<b>Directeur de thèse</b>

Membre invité :

<b>M</b>	Cyril Petibois, Maître de conférence, Université Bordeaux1
----------	--



## Remerciements

Ce travail a été réalisé sous la direction du Pr. Michel Moenner au sein de l'unité INSERM E113 « Laboratoire des Mécanismes Moléculaires de l'Angiogenèse » dirigée par le Pr. Andréas Bikfalvi.

Monsieur le Pr. M Moenner, je tiens à vous exprimer ma plus profonde gratitude pour m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse, pour votre implication, votre soutien dans ce travail et votre amitié pendant toutes ces années passées ensemble.

Monsieur le Professeur A. Bikfalvi, je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres du jury, Madame Josette Badet et Messieurs Jean Rosenbaum, Jean Plouet, Eric Chevet, Andréas Bikfalvi et Cyril Petibois pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

J'adresse également tous mes remerciements aux membres du laboratoire, ainsi qu'à Eric Chevet et son Labo et Cyril Petibois pour leurs précieux conseils, leur gentillesse et tout ce qu'ils ont apporté à ce travail... Je remercie toutes les personnes qui m'ont permis et avec qui j'ai pu faire de l'enseignement.

Je remercie tout particulièrement mes parents et ma famille pour leur soutien et leur considération.

Je remercie vivement ceux dont la bonne humeur qu'ils transmettent au laboratoire et en dehors ont rendu mon séjour au labo agréable : Renaud pour tous ces bons moments, tu es arrivé trop tard au labo... je serai à ta soutenance... Marion pour les gâteaux coco et surtout pour ton aide précieuse à la fin de cette thèse. Xavier pour ces 20% du temps que tu m'as consacré... ne désespère pas tu me battras au billard, un jour, enfin peut être... Raphael, pour ta participation à ce travail, tes brioches, pour ces quelques parties de billard et Montréal. Fredo, merci pour ces petites pauses, ton aide et ta légendaire bonne humeur !!! Patrick, pour tes conseils, ta gentillesse et pour Montréal. Sophie N, j'aurais aimé plus travailler avec toi. Aline Vayssettes, dont les râleries vont forcément me manquer et à Martine Delbos dont les « 4h » nous manque à tous, pour leur gentillesse et leur aide. Ahlame pour ses éternels problèmes d'ordinateurs !!! Laurent, ne t'emballe pas petit poney !!! Un jour toi aussi tu seras comme le grand chêne... Sophie D, tu es la prochaine... bon courage ! Fred dit « chouchou » et Sylvie, pour ces cafés-chichi et parce que vous avez été là. Christelle, Maylis, Kinga, Kevin et toutes les personnes de passage au labo dont certaines ont partagé ma paillasse : Pascal, Johanna et Marie. Enfin, Zégut, pour toutes ces soirées passées à écrire cette thèse... Et à tous ceux que j'ai omis de citer...

Mais surtout à Nath, pour tout ce que tu m'as apporté...



## SOMMAIRE

<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>5</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>7</b>
<b>PREAMBULE .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
<b>CHAPITRE I : ANGIOGENESE ET ISCHEMIE TUMORALE. ....</b>	<b>13</b>
<b>Partie I : L'angiogenèse physiologique et tumorale .....</b>	<b>13</b>
1. Formation du réseau capillaire .....	13
1.1. Vascularisation embryonnaire.....	13
1.2. L'angiogenèse et l'expansion du réseau primaire .....	14
1.3. Remodelage et maturation du réseau vasculaire .....	14
1.3.1. Remodelage vasculaire.....	14
1.3.2. Stabilisation du réseau vasculaire .....	14
2. L'angiogenèse tumorale .....	15
2.1. Notion de commutation angiogénique .....	15
2.2. Déterminisme génétique.....	17
3. Mécanismes et régulation de la vascularisation des tumeurs.....	19
3.1. L'angiogenèse .....	19
3.1.1. Angiogenèse bourgeonnante .....	19
3.1.2. Angiogenèse par intussusception .....	21
3.2. Les autres mécanismes .....	23
4. Les principaux activateurs de l'angiogenèse tumorale .....	23
<b>Partie II : Le VEGF-A et ses récepteurs .....</b>	<b>27</b>
1. Le VEGF-A .....	27
1.1. Gène du VEGF-A.....	27
1.2. Structure protéique et isoformes .....	27
1.3. Régulation transcriptionnelle .....	31
2. Fonctions biologiques du VEGF-A.....	32
2.1. Activités biologiques.....	32
2.2. Fonctions physiologiques.....	33
2.3. Fonctions pathologiques.....	33
3. Les autres VEGFs.....	35
4. Les récepteurs des VEGFs .....	35
<b>Partie III : L'ischémie tumorale et l'induction du VEGF-A.....</b>	<b>41</b>
1. Ischémie tumorale .....	41
2. Mécanismes de sélection clonale induits par l'ischémie tumorale .....	41
3. Le phénotype glycolytique tumoral : effet Warburg .....	45
4. L'hypoxie .....	46
4.1. Le facteur de transcription HIF-1 .....	47

4.2. Régulation de HIF-1 .....	47
4.2.1. Régulation de HIF-1 dépendante de l'hypoxie .....	47
4.2.2. Régulation de HIF-1 indépendante de l'hypoxie .....	51
4.3. Les facteurs de transcription HIF-2 et HIF-3 .....	51
4.4. Les voies de signalisations dépendantes de HIF .....	53
4.5. Hypoxie, angiogenèse et induction du VEGF-A.....	53
5. La carence en glucose .....	54
5.1. Importance du glucose dans l'ischémie tumorale .....	55
5.2. Voies de signalisation dépendantes de la carence en glucose.....	56
5.3. Carence en glucose et induction du VEGF-A .....	57
6. Les carences en acides aminés .....	58
6.1. Importance des acides aminés dans l'ischémie tumorale.....	58
6.2. Voies de signalisation dépendantes de l'absence d'acides aminés .....	59
6.3. Carence en acides aminés, angiogenèse et induction du VEGF-A .....	60
7. Le stress oxydant.....	60
8. L'acidose tumorale.....	63

## **CHAPITRE II : LE RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE, L'ISCHÉMIE TUMORALE ET LA RÉPONSE UPR.....67**

<b>Partie I : Origine du stress du réticulum endoplasmique.....</b>	<b>68</b>
1. Environnement redox .....	68
2. Influence du calcium .....	69
3. Glycosylation .....	69
4. Machinerie de remodelage protéique .....	69
5. Mécanismes de remodelage et de contrôle de la qualité du repliement protéique...71	
<b>Partie II : la réponse UPR .....</b>	<b>75</b>
1. Structure des transducteurs proximaux de la réponse UPR .....	77
1.1. IRE1 .....	77
1.2. PERK.....	77
1.3. ATF6 .....	77
2. La transduction du signal UPR.....	78
3. Voies de signalisation UPR.....	79
3.1. Régulation de la traduction durant la réponse UPR .....	79
3.2. Régulation transcriptionnelle liée à la réponse UPR.....	83
3.2.1. Voie dépendante d'IRE1/XBP1 .....	83
3.2.2. Voie dépendante d'ATF6.....	85
3.2.3. Voie dépendante de PERK.....	86
3.3. Interactions des différentes voies de la réponse UPR .....	87
4. Apoptose et stress du RE.....	87
<b>Partie III : la réponse UPR et l'ischémie tumorale.....</b>	<b>91</b>
1. Évidences de l'activation de la réponse UPR dans les tumeurs solides.....	91
2. L'ischémie tumorale et la réponse UPR.....	91
2.1. Hypoxie et stress du RE .....	92
2.1.1. Hydroxylation de prolines.....	92
2.1.2. Formation de ponts disulfures .....	92
2.1.3. Augmentation de l'expression des protéines chaperonnes.....	92

2.1.4. Inhibition de la synthèse protéique.....	93
2.1.5. Induction du VEGF-A.....	93
2.2. Carences en glucose et stress du RE .....	93
2.2.1. Carences en glucose et induction de la réponse UPR .....	94
2.2.2. Induction du VEGF-A.....	94
2.3. Carences en acides aminés et stress du RE .....	95
2.4. Stress oxydant et stress du RE.....	96
2.5. pH et stress du RE .....	97
3. Rôle de la réponse UPR dans la progression tumorale .....	99
3.1. Croissance tumorale .....	99
3.2. Dormance tumorale .....	99
3.3. Effets anti-apoptotiques.....	100
3.4. Effets pro-apoptotiques .....	100
4. La réponse UPR et le traitement de tumeurs.....	101
<b>RESULTATS - DISCUSSION .....</b>	<b>105</b>
1. Études <i>in vitro</i> de limitation en nutriments ; utilisation d'un milieu complet sans sérum .....	105
<b>Article n°1 .....</b>	<b>108</b>
2. La voie de signalisation dépendante de IRE1 est indispensable à l'induction du VEGF-A en réponse à l'ischémie tumorale .....	137
<b>Article n°2 .....</b>	<b>139</b>
3. Résultats complémentaires.....	169
3.1. Activité biologique du VEGF <sub>165</sub> de 38 kDa.....	169
3.2. Activité du promoteur du VEGF-A en carence de glucose <i>vs.</i> hypoxie .....	169
3.3. Expression des ARNm des gènes de réponse au stress du RE.....	171
3.4. Implication de l'AMPK dans l'expression du VEGF-A en carence de glucose .....	171
3.5. Effets de l'hypoxie et des carences en glucose ou en acides aminés sur l'expression de l'angiogénine.....	173
4. Statut métabolique cellulaire durant la progression tumorale.....	175
<b>Article n°3 .....</b>	<b>177</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>209</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>215</b>





## LISTE DES ILLUSTRATIONS

<b>FIGURE 1</b> : VASCULOGENESE, ANGIOGENESE ET ARTERIOGENESE.....	<b>12</b>
<b>FIGURE 2</b> : REGULATION MOLECULAIRE DE L' ANGIOGENESE TUMORALE. ....	<b>16</b>
<b>FIGURE 3</b> : LES DIFFERENTS MECANISMES IMPLIQUES DANS LA VASCULARISATION TUMORALE. ....	<b>18</b>
<b>FIGURE 4</b> : PRINCIPALES ETAPES DE L' ANGIOGENESE PAR BOURGEONNEMENT.....	<b>20</b>
<b>FIGURE 5</b> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PROCESSUS D' ANGIOGENESE PAR INTUSSUSCEPTION.....	<b>20</b>
<b>FIGURE 6</b> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES DE COOPTATION VASCULAIRE.....	<b>22</b>
<b>FIGURE 7</b> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES D'IMITATION DE LA VASCULOGENESE.....	<b>22</b>
<b>FIGURE 8</b> : STRUCTURE DES PRINCIPAUX VARIANTS D' EPISSAGE DU VEGF-A CHEZ L' HOMME.....	<b>26</b>
<b>FIGURE 9</b> : RECEPTEURS DES VEGFs ET FONCTIONS BIOLOGIQUES ASSOCIEES.....	<b>28</b>
<b>FIGURE 10</b> : LE PROMOTEUR DU VEGF-A : ELEMENTS DE REPONSE ET FACTEURS DE TRANSCRIPTION.....	<b>30</b>
<b>FIGURE 11</b> : VOIE DE SIGNALISATION ET FONCTIONS BIOLOGIQUES ASSOCIEES AU VEGFR-2.....	<b>36</b>
<b>FIGURE 12</b> : ISCHEMIE TUMORALE ET L' INDUCTION DE L' ANGIOGENESE.....	<b>40</b>
<b>FIGURE 13</b> : MODELE D' INTERACTIONS CELLULES/ENVIRONNEMENT DANS LA CARCINOGENESE.....	<b>42</b>
<b>FIGURE 14</b> : L' ISCHEMIE TUMORALE ET LA PROGRESSION MALIGNE.....	<b>42</b>
<b>FIGURE 15</b> : METABOLISME DU GLUCOSE.....	<b>44</b>
<b>FIGURE 16</b> : LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION HIFs.....	<b>48</b>
<b>FIGURE 17</b> : REGULATION DE HIF1.....	<b>50</b>
<b>FIGURE 18</b> : MECANISMES CONTRIBUANT A L' INDUCTION DE L' ANGIOGENESE PAR LES STRESS OXYDANTS.....	<b>62</b>
<b>FIGURE 19</b> : MODELE D' INVASION TUMORALE INDUITE PAR LE PH.....	<b>64</b>
<b>FIGURE 20</b> : RESUME SCHEMATIQUE DES PRINCIPAUX INDUCTEURS DU STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE.....	<b>66</b>
<b>FIGURE 21</b> : STRUCTURE D' UNE GLYCOSYLATION ET SITE D' ACTION DES ENZYMES CATALYSANT CES MODIFICATIONS AU SEIN DU RE.....	<b>70</b>
<b>FIGURE 22</b> : SCHEMA GENERAL DU SYSTEME DE CONTROLE DE QUALITE ET DE DEGRADATION DES PROTEINES.....	<b>72</b>
<b>FIGURE 23</b> : STRUCTURES PRINCIPALES DES PROTEINES TRANSDUCTRICES DU SIGNAL UPR.....	<b>76</b>
<b>FIGURE 24</b> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES VOIES DE SIGNALISATION UPR DEPENDANTES DE IRE1, ATF6 ET PERK.....	<b>80</b>
<b>FIGURE 25</b> : CINETIQUE D' ACTIVATION DES DIFFERENTES VOIES SIGNALETIQUES DE LA REPONSE UPR.....	<b>82</b>
<b>FIGURE 26</b> : LES DIFFERENTES VOIES DE SIGNALISATION ISSUES DU STRESS DU RE.....	<b>84</b>
<b>FIGURE 27</b> : VOIES DE SIGNALISATION APOPTOTIQUE ENGENDREES PAR LE STRESS DU RE.....	<b>88</b>
<b>FIGURE 28</b> : ELEMENTS SOUS LA DEPENDANCE DE LA REPONSE UPR POUVANT INTERVENIR DANS DIFFERENTES ETAPES POTENTIELLES DU DEVELOPPEMENT TUMORAL.....	<b>98</b>
<b>FIGURE 29</b> : EVOLUTION DU CARYOTYPE DE CELLULES D' EMBRYON DE SOURIS EN CULTURE CELLULAIRE.....	<b>106</b>
<b>FIGURE 30</b> : LE VEGF <sub>165</sub> DE 38 kDa SECRETE PAR DES CELLULES A549/8 SOUMISES A DES CARENCES EN GLUCOSE EST BIOLOGIQUEMENT ACTIF.....	<b>168</b>
<b>FIGURE 31</b> : ETUDE DE L' ACTIVITE DU PROMOTEUR DU GENE DU VEGF-A DANS LES CELLULES A549/8.....	<b>168</b>
<b>FIGURE 32</b> : PROFILS D' EXPRESSION DU GENE VEGF-A ET DES GENES DE LA REPONSE UPR.....	<b>170</b>
<b>FIGURE 33</b> : EFFETS DE L' AICAR ET DU COMPOSE C SUR L' INDUCTION DU VEGF-A.....	<b>172</b>
<b>FIGURE 34</b> : EXPRESSION DE L' ANGIOGENINE SOUS L' EFFET DE CARENCE EN GLUCOSE OU D' HYPOXIE.....	<b>174</b>
<b>TABLEAU 1</b> : LES DIFFERENTS FACTEURS INFLUENÇANT LA TRANSCRIPTION DU VEGF.....	<b>30</b>
<b>TABLEAU 2</b> : LES AUTRES MEMBRES DE LA FAMILLE DES VEGFs.....	<b>34</b>
<b>TABLEAU 3</b> : LES RECEPTEURS DES VEGFs.....	<b>38</b>
<b>TABLEAU 4</b> : QUELQUES GENES CIBLES DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION HIFs.....	<b>52</b>



## ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AMPK</b>	AMP-activated protein kinase
<b>Ang</b>	Angiopoïétine
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ASCT2</b>	Sodium-dependent neutral amino acid transporter type 2
<b>ATF</b>	Activating transcription factor
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BiP</b>	Immunoglobulin heavy chain-binding protein
<b>CE</b>	Cellules endothéliales
<b>CHOP</b>	C/EBP-homologous protein
<b>CML</b>	Cellules musculaires lisses
<b>DN</b>	Dominant négatif
<b>EDEM</b>	ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EPC</b>	Endothelial progenitor cells
<b>ERAD</b>	ER associated degradation
<b>ERK</b>	Extracellular-regulated kinases
<b>ERSE</b>	ER stress response element
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor
<b>FT-IR</b>	Fournier transform infrared
<b>GADD34</b>	Growth arrest- and DNA damage-inducible gene 34
<b>GCN2</b>	General control non-derepressible kinase 2
<b>GLS</b>	Séquence de localisation golgienne
<b>GLUT</b>	Glucose transporter
<b>GRP</b>	Glucose regulated protein
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>GSSG</b>	Glutathion oxydé
<b>HDL</b>	Lipoprotéines de hautes densités.
<b>HIF1</b>	Hypoxia inducible factor-1
<b>HRE</b>	Hypoxia response element
<b>HSPG</b>	Heparan sulfate proteoglycan
<b>Il-8</b>	Interleukine-8
<b>IRE1</b>	Inositol-requiring 1
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal kinase
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>LAT1</b>	L-type amino acid transporter
<b>MAPK</b>	Mitogen activating protein kinase
<b>MMP</b>	Métalloprotéinase de la matrice
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>NADH</b>	Nicotinamide adenine dinucléotide
<b>NF-κB</b>	Nuclear factor Kappa-B
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>Nrf-2</b>	NF-E2 related factor 2
<b>NRP</b>	Neuropiline
<b>nt</b>	Nucléotide
<b>ORP150</b>	Oxygen regulated protein

<b>pb</b>	Paire de base
<b>PCR</b>	Réaction en chaîne de polymérisation
<b>PDGF</b>	Plateled derived growth factor
<b>PERK</b>	Double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase
<b>PFKFB3</b>	6-phosphofructokinase 2/fructose-2,6-bisphosphatase
<b>PHD</b>	prolyl-hydroxylase
<b>PI3K</b>	Phosphatidyl inositol 3 kinase
<b>PIGF</b>	Placenta growth factor
<b>qPCR</b>	Réaction en chaîne de polymérisation quantitative
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>Ref-1</b>	Redox factor-1
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>RTK</b>	Récepteur à activité tyrosine kinase
<b>RT-PCR</b>	Rétro-transcription et réaction en chaîne de polymérisation
<b>S1P</b>	Site-1 protease
<b>S2P</b>	Site-2 protease
<b>SVF</b>	Sérum de veau foetal
<b>TAF</b>	Tumor angiogenic factors
<b>TGF</b>	Transforming growth factor
<b>TRX</b>	Thioredoxine
<b>uPA</b>	Activateur du plasminogène de type urokinase
<b>UPR</b>	Unfolded protein response
<b>UPRE</b>	UPR response element
<b>utr</b>	Untranslated region
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>VEGFR</b>	VEGF receptor
<b>VHL</b>	Von Hippel Lindau
<b>VPF</b>	Vascular permeability factor
<b>XBP1</b>	X-box protein 1

Symboles des acides aminés essentiels :

<b>Arg</b>	Arginine
<b>Gln</b>	Glutamine
<b>His</b>	Histidine
<b>Ile</b>	Isoleucine
<b>Leu</b>	Leucine
<b>Lys</b>	Lysine
<b>Met</b>	Méthionine
<b>Phe</b>	Phénylalanine
<b>Thr</b>	Thréonine
<b>Trp</b>	Tryptophane
<b>Val</b>	Valine

# INTRODUCTION



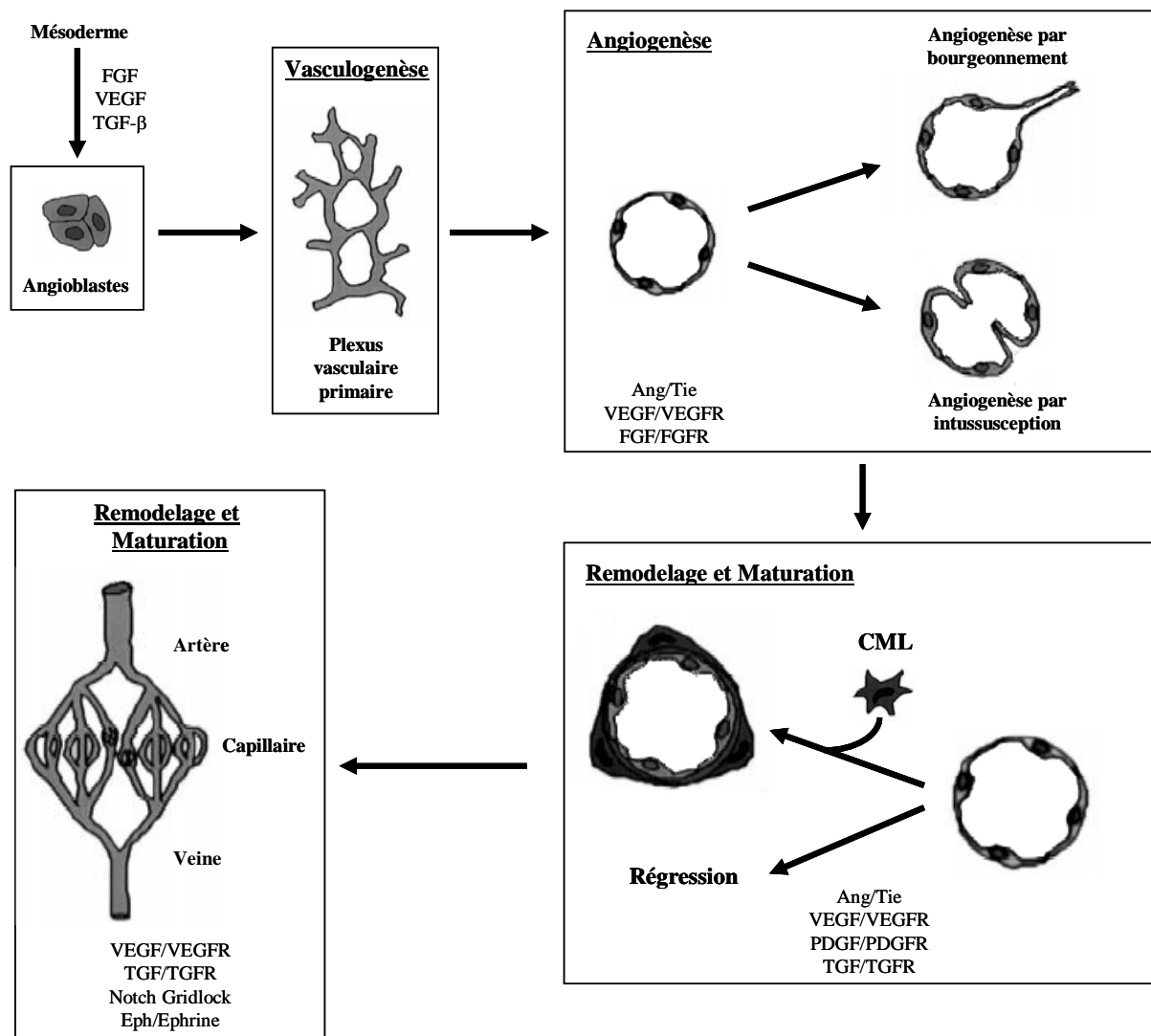
## Préambule

Un apport nutritif constant est nécessaire à la croissance d'une tumeur. Cependant, à partir d'une certaine taille, une ischémie se développe dans les zones avascularisées des tumeurs solides. Cette ischémie déclenche une réponse des tissus tumoraux et notamment l'émission de facteurs angiogéniques induisant la convergence de néo-vaisseaux vers la tumeur, ce qui permet une expansion tumorale sans contraintes nutritives. Plusieurs paramètres physiologiques et nutritifs de l'ischémie peuvent être impliqués dans l'expression du facteur pro-angiogénique VEGF. Parmi ces paramètres, le plus étudié, l'hypoxie, conduit à l'induction de ce facteur par la voie de signalisation cellulaire dépendante du facteur de transcription HIF. Les carences en acides aminés ou en glucose constituent également des stress incontournables liés à l'ischémie. Ces carences induisent, d'une part, l'expression de facteurs angiogéniques et favorisent, d'autre part, l'émergence de clones résistants aux conditions ischémiques. Cependant, les mécanismes d'action de ces stress restent encore peu étudiés au niveau moléculaire.

Différents paramètres constituant l'ischémie tumorale sont également à l'origine d'une réponse cellulaire caractéristique du stress du réticulum endoplasmique appelée UPR (Unfolded Protein Response) pouvant moduler différents aspects du développement tumoral.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier les effets des carences en glucose et en acides aminés sur l'expression du VEGF-A par des cellules tumorales et de rechercher l'implication de la réponse UPR lors de ces carences.

Afin de préciser les différents aspects abordés lors de cette étude, l'introduction de ce manuscrit traite, dans une première partie, de l'angiogenèse et de l'ischémie tumorale, et est consacrée dans une seconde partie à l'importance de la réponse au stress du réticulum endoplasmique dans l'ischémie tumorale. Les différents résultats obtenus lors de ce travail sont présentés sous la forme de trois articles et sont discutés dans une dernière partie « conclusion générale et perspectives ».



**Figure 1 : Vasculogénèse, angiogénèse et artériogénèse.**

Les principaux régulateurs moléculaires des processus de vasculogénèse, d'angiogénèse et d'artériogénèse sont indiqués.

(D'après Conway et al. 2001)



# INTRODUCTION

## Chapitre I : Angiogenèse et Ischémie tumorale.

### Partie I : L'angiogenèse physiologique et tumorale

L'**angiogenèse** est le terme qui définit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Ce phénomène est indispensable au cours de nombreux processus physiologiques tels que le développement embryonnaire, l'implantation du placenta, mais aussi pathologiques tels que la croissance des tumeurs ou le développement des métastases.

#### 1. Formation du réseau capillaire

##### 1.1. Vascularisation embryonnaire

Lors des premières étapes du développement embryonnaire, en absence de réseaux vasculaires, les nutriments et l'oxygène indispensables à la croissance cellulaire parviennent aux tissus par diffusion simple (Noden 1989). Puis, très rapidement, un réseau de vaisseaux sanguins se met en place à travers deux processus : la vasculogenèse et l'angiogenèse.

Le terme de **vasculogenèse** se caractérise généralement par la différenciation, à partir du mésoderme, des hémangioblastes en angioblastes qui vont ensuite former les cellules endothéliales et par la constitution d'un plexus vasculaire primaire (Risau 1997). Ce sont des facteurs de croissance tels que le FGF2 (« fibroblast growth factor-2 »), le VEGF-A (« vascular endothelial growth factor-A ») et le TGF- $\beta$  (« transforming growth factor ») qui induisent l'émergence des hémangioblastes puis des angioblastes (Pardanaud *et al.* 1989) (figure 1).

La vasculogenèse est principalement limitée aux étapes précoces du développement embryonnaire. Cependant, chez l'adulte, on peut observer la formation de nouveaux vaisseaux par un phénomène de vasculogenèse, à partir de progéniteurs endothéliaux ou EPC (« endothelial progenitor cells »). Ces EPC auraient pour origine la moelle osseuse et comporteraient des caractéristiques similaires aux angioblastes embryonnaires (Luttun *et al.* 2002; Rafii *et al.* 2002).

*Le phénomène de vasculogenèse postnatale lié à la croissance vasculaire tumorale sera traité page 23.*

## **1.2. L'angiogenèse et l'expansion du réseau primaire**

La croissance, l'expansion et le remodelage du plexus vasculaire primaire en un réseau vasculaire mature se produisent lors de deux types de processus d'angiogenèse : **bourgeoisement** et **intussusception** (Risau 1997; Carmeliet 2000) (figure 1).

Chez l'adulte, l'angiogenèse est un événement peu fréquent. Elle survient durant le processus de réparation tissulaire ou la cicatrisation et dans l'appareil reproducteur femelle durant les cycles menstruels et la gestation (Ferrara *et al.* 1998; Goede *et al.* 1998; Li *et al.* 2003). L'angiogenèse est également fréquemment observée, chez l'adulte, au cours de pathologies comme les maladies inflammatoires (arthrites rhumatoïdes, psoriasis), les maladies de la rétine (rétinopathie liée au diabète) et le cancer (Folkman 1995; Carmeliet and Jain 2000). *Les mécanismes d'angiogenèse par bourgeoisement et intussusception seront abordés d'un point de vue tumoral pages 19 et 21.*

## **1.3. Remodelage et maturation du réseau vasculaire**

### **1.3.1. Remodelage vasculaire**

Le profil final du réseau vasculaire est déterminé par la croissance, l'extension ou la régression des différents segments qui le composent. On obtient ainsi un réseau continu constitué par la succession de vaisseaux de petits et gros diamètres (Risau 1997). Ce processus de remodelage est dépendant de l'environnement tissulaire (besoins locaux en oxygène et en nutriments, *cf. page 41*) dans lequel les vaisseaux se forment. Par exemple, la suppression du flux sanguin dans les capillaires en excès entraîne leur régression (Resnick and Gimbrone 1995; Meeson *et al.* 1999) (figure 1).

### **1.3.2. Stabilisation du réseau vasculaire**

Les vaisseaux naissants sont stabilisés par deux processus : le recrutement de cellules accessoires ou cellules murales et l'élaboration d'une matrice extracellulaire commune aux cellules endothéliales (CE) et aux cellules accessoires.

Les cellules murales, péricytes et cellules musculaires lisses (CML), participent à la stabilisation vasculaire en inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Darland and D'Amore 2001). Les précurseurs des cellules murales proviennent des tissus mésenchymateux chez l'embryon et de la moelle et du stroma osseux chez l'adulte (Carmeliet 2000).

Les mécanismes de stabilisation des vaisseaux font intervenir plusieurs facteurs (figure 1). Le PDGF-B sécrété par les CE, en réponse à une stimulation par le VEGF-A, induit le recrutement, la prolifération et la migration des cellules murales (Hellstrom *et al.* 2001). L'angiopoïétine 1 (Ang-1) se fixe sur le récepteur tyrosine kinase Tie2 exprimé au niveau des cellules endothéliales et stabilise les interactions entre les cellules murales et les CE (Davis *et al.* 1996). Le TGF- $\beta$ 1 permet la différenciation des cellules murales soit en péricytes, soit en CMLs (Hirschi *et al.* 1998). Les vaisseaux sont stabilisés et doivent alors acquérir une orientation artérielle ou veineuse (figure 1).

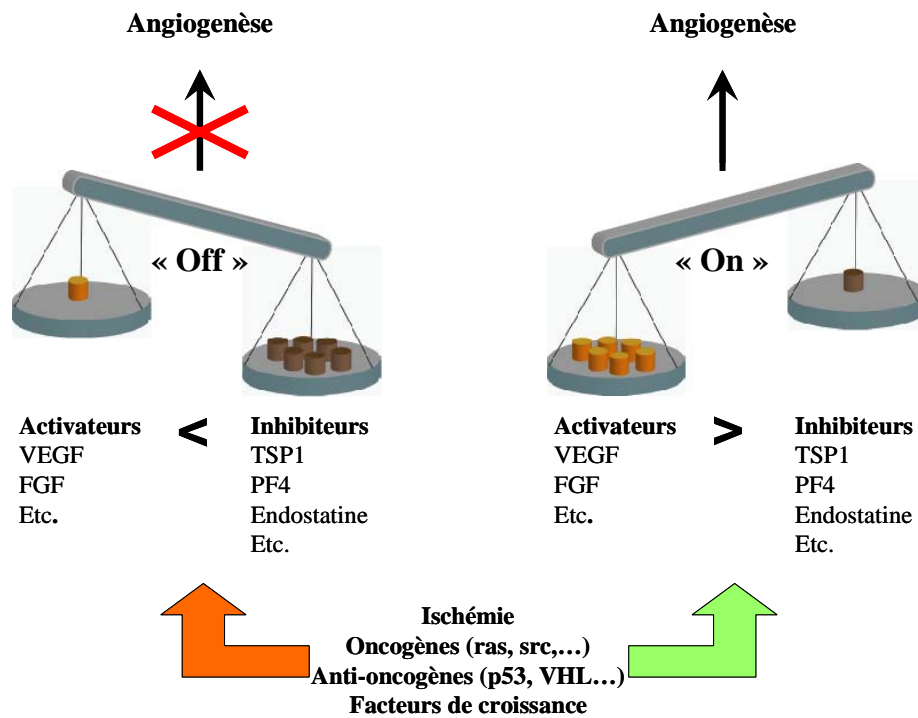
La fixation de Ang-2 sur Tie2 entraîne une déstabilisation des vaisseaux en abolissant les interactions entre CE et cellules murales (Maisonpierre *et al.* 1997). Un vaisseau sans cellules murales a alors deux devenir possibles : en l'absence de facteurs de croissance comme le VEGF-A il a tendance à régresser, en présence de VEGF-A il se maintient et peut être à l'origine du bourgeonnement angiogénique (Holash *et al.* 1999).

## 2. L'angiogenèse tumorale

### 2.1. Notion de commutation angiogénique

En 1945, Algire propose que l'acquisition par les cellules tumorales de la capacité à induire la croissance de nouveaux vaisseaux est une étape significative de la tumorigenèse (algire 1945). En 1971, Folkman émet l'idée que la grande majorité des cellules tumorales doivent initier une angiogenèse tumorale en produisant des substances diffusibles pro-angiogéniques (ou TAFs pour « tumor angiogenic factors ») pour former des tumeurs décelables (Folkman 1971; Folkman 1974). De plus, il émet l'hypothèse qu'en bloquant l'action des substances pro-angiogéniques on peut stopper la croissance tumorale (Folkman and Klagsbrun 1987).

Le cancer est une maladie multi-étapes lors de laquelle des cellules saines se transforment en cellules tumorales suite à des mutations génétiques (Duesberg *et al.* 1999; Hahn and Weinberg 2002; Pelengaris *et al.* 2002). Cependant, la progression et la propagation tumorales nécessitent l'induction d'une angiogenèse appelée « **switch angiogenic** » ou **commutation angiogénique** qui sépare deux phases de ce développement tumoral. Dans la première phase dite pré invasive, une tumeur maligne ne peut dépasser 1 à 2 millimètres de diamètre si elle n'est pas en mesure d'induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins susceptibles de lui apporter l'oxygène et les éléments nutritifs nécessaires



**Figure 2 : Régulation moléculaire de l'angiogenèse tumorale.**

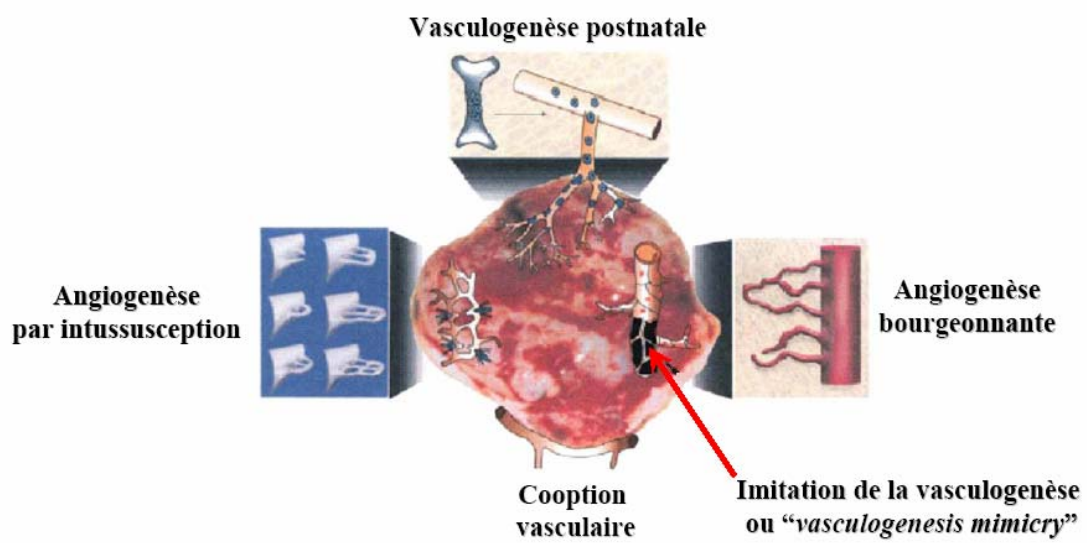
Les conditions ischémiques stimulent la production de facteurs pro-angiogéniques et inhibent celle de facteurs anti-angiogéniques. L'activation d'oncogènes ou l'inactivation d'anti-oncogènes active la production de facteurs pro-angiogéniques et inhibe celle de facteurs anti-angiogéniques. Les facteurs de croissance modifient également l'expression des activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse. Abréviations : TSP1 (thrombospondine 1), PF4 (facteur plaquettaire 4), VHL (facteur Von Hippel Linau)  
(Adapté d'après Bikfalvi 2003)

à sa croissance et d'éliminer ses déchets. Ces masses tumorales oscillent entre prolifération et apoptose. Dans la deuxième phase, une vascularisation massive des tumeurs permet à celles-ci de devenir invasives et métastatiques (Papetti and Herman 2002).

La régulation moléculaire de l'angiogenèse tumorale est à l'image d'une balance comportant sur chacun de ses plateaux les facteurs activateurs ou inhibiteurs de l'angiogenèse (Figure 2). Le switch angiogénique est en position « off » quand l'effet des molécules pro-angiogéniques est contre balancé par les molécules anti-angiogéniques. Inversement, il est activé lorsque l'équilibre est rompu en faveur des facteurs pro-angiogéniques. Un déséquilibre en faveur des facteurs pro-angiogéniques est corrélé avec une augmentation de la densité vasculaire tumorale (Bergers and Benjamin 2003). Cependant dans certaines tumeurs, en particulier les tumeurs du sein, des facteurs pro- et anti-angiogéniques peuvent être augmentés (Fontana *et al.* 2005) et il faut donc prendre en compte le rapport entre les quantités relatives de ces facteurs. Parmi les facteurs induisant cette commutation angiogénique (TAFs), le premier découvert fut le FGF-2 (Shing *et al.* 1984; Klagsbrun *et al.* 1986). D'autres facteurs comme le VEGF-A, le TGF- $\beta$ , l'EGF ou le TNF $\alpha$  ont ensuite été ajoutés à la famille des TAFs (Folkman and Klagsbrun 1987; Leung *et al.* 1989; Plouet *et al.* 1989). Des molécules inhibitrices de l'angiogenèse tumorale ont également été découvertes (Kerbel and Folkman 2002).

## **2.2. Déterminisme génétique**

L'activation d'oncogènes et/ou l'inactivation d'anti-oncogènes entraînent une augmentation de la production de facteurs pro-angiogéniques et/ou une diminution de la production de facteurs anti-angiogéniques par les cellules tumorales (Rak and Yu 2004). Par exemple, l'oncogène Bcl2 (protéine anti-apoptotique) transfecté dans des cellules tumorales induit une augmentation de l'expression du VEGF-A (Fernandez, A. *et al.* 2001). L'activation d'oncogènes comme K-ras et H-ras augmente l'expression du VEGF-A et diminue l'expression de la thrombospondine (TSP-1) (Udagawa *et al.* 2002; Rak and Yu 2004). Le gène suppresseur de tumeur p53 influence indirectement la commutation angiogénique en augmentant l'expression du facteur anti-angiogénique TSP-1 (Dameron *et al.* 1994), en modulant les effets du facteur HIF-1 $\alpha$  (North *et al.* 2005) et en inhibant la transcription du VEGF-A (Zhang, L. *et al.* 2000) et de la protéine FGF-BP (FGF binding-protein) (Sherif *et al.* 2001). Cependant, la protéine p53 est inactivée dans plus de 50% des tumeurs humaines (Hainaut and Hollstein 2000).



**Figure 3 : Les différents mécanismes impliqués dans la vascularisation tumorale.**  
 (Modifié d'après Carmeliet 2000).

En plus de ces modifications génétiques, des stress métaboliques (hypoxie, hypoglycémie, acidification du milieu, etc.) (Hanahan and Weinberg 2000), des stress mécaniques (ou « shear stress ») ou une réponse immune et inflammatoire (suite à l'infiltration de cellules immunes dans la tumeur) (Carmeliet and Jain 2000) peuvent induire une commutation angiogénique. *Les mécanismes d'activation du facteur angiogénique VEGF-A par l'ischémie tumorale sont décrits en détail dans le chapitre I partie III.*

### **3. Mécanismes et régulation de la vascularisation des tumeurs**

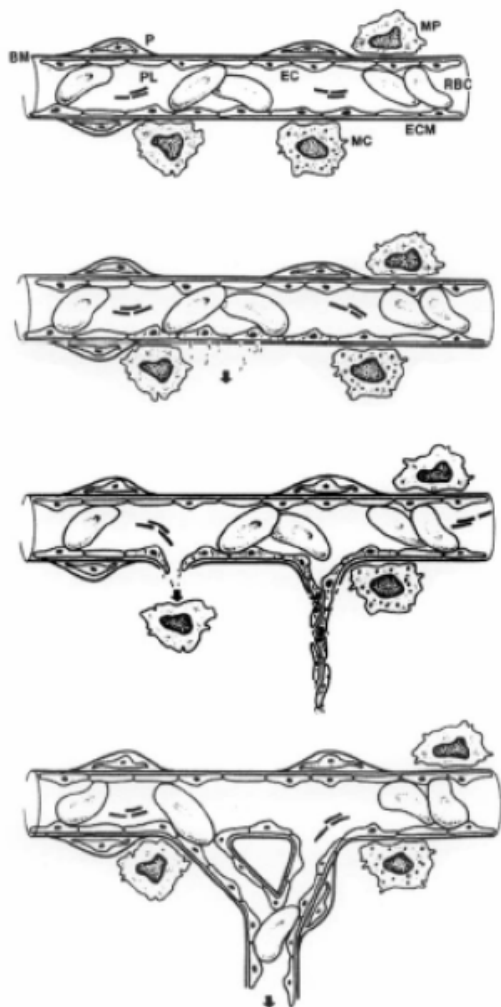
La création d'une lignée transgénique de souris développant spontanément des tumeurs au niveau du pancréas, lignée RIP-Tag (Hanahan 1985), a permis de mieux comprendre les mécanismes d'induction de l'angiogenèse tumorale et de la commutation angiogénique (Hanahan and Folkman 1996). En plus de l'angiogenèse (bourgeonnante et intussusceptive), trois mécanismes permettent à une tumeur d'élaborer ses propres vaisseaux : le processus de co-option vasculaire (« vascular co-option »), l'imitation de la vasculogenèse (« vasculogenic mimicry ») et le recrutement d'EPC (Auguste *et al.* 2005) (figure 3).

#### **3.1. L'angiogenèse**

##### **3.1.1. Angiogenèse bourgeonnante**

L'angiogenèse bourgeonnante se caractérise par plusieurs étapes (figure 4) qui sont sous la dépendance de facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques (Papetti and Herman 2002). Les cellules endothéliales et les cellules tumorales sont les principaux acteurs de ce processus mais d'autres types cellulaires y participent également comme les cellules musculaires lisses, les péricytes, les cellules inflammatoires et les fibroblastes (Fukumura *et al.* 1998; Coussens *et al.* 2000).

La première phase correspond à une perméabilisation vasculaire pendant laquelle le système Ang/Tie contribue au relâchement des interactions entre les cellules endothéliales, la matrice extracellulaire et les péricytes, ce qui sensibilise les cellules endothéliales à l'action du VEGF-A (Maisonpierre *et al.* 1997; Benjamin *et al.* 1998). Sous l'effet du VEGF-A (sécrété par les cellules tumorales) la NO synthase produit du monoxyde d'azote (NO) qui va induire la dilatation des vaisseaux. La perméabilité vasculaire est également augmentée en présence de VEGF-A par une redistribution des molécules intercellulaires de type VE-cadhérine (Kevil *et al.* 1998). De plus, l'extravasation de fibrine induite par le VEGF-A crée



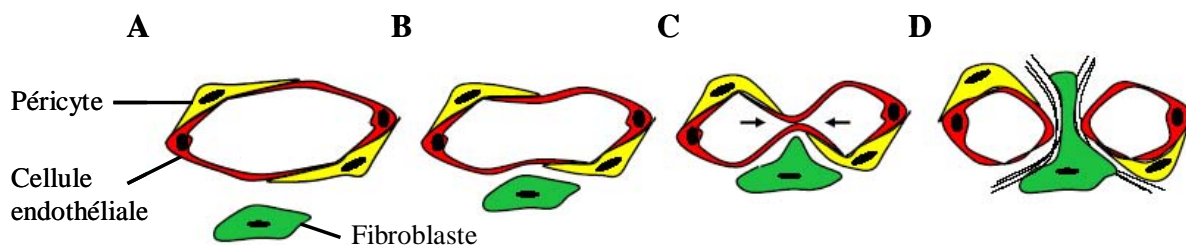
- ❑ Dilatation du vaisseau
- ❑ Activation des ECs
- ❑ Production de protéases
- ❑ Augmentation de la perméabilité
- ❑ Extravasation de protéines plasmatiques

- ❑ Dégradation de la ECM
- ❑ Prolifération et migration des ECs
- ❑ Bourgeonnement

- ❑ Formation d'une lumière vasculaire
- ❑ Recrutement de cellules murales
- ❑ Formation de la BM
- ❑ Etablissement du flux sanguin

**Figure 4 : Principales étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement.**

Abréviations : BM (membrane basale), EC (cellule endothéliale), ECM (matrice extracellulaire), MC (mastocyte), MP (macrophage), P (péricyte), RBC (érythrocyte).  
(D'après Levine et al. 2000)



**Figure 5 : Représentation schématique du processus d'angiogenèse par intussusception.**  
(D'après Djonov et al. 2003)



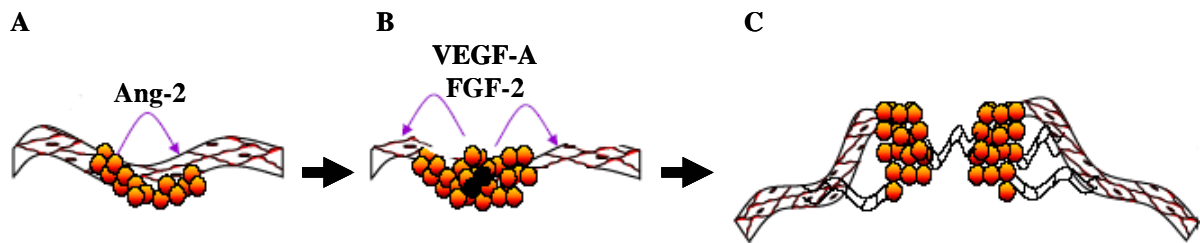
un support temporaire qui favorise la migration, à travers de la paroi vasculaire, des cellules endothéliales activées.

Une étape de dégradation de la matrice extracellulaire et de la membrane basale fait ensuite appel à des héparanases ou une série de protéases comme l'activateur du plasminogène (u-PA « urokinase-plasminogen activator ») ou les métalloprotéinases (MMP « matrix metalloproteinase ») (Chang, C. and Werb 2001; Pepper 2001; Vlodavsky and Friedmann 2001). Ces enzymes permettent de créer un espace de migration pour les cellules endothéliales et de libérer des facteurs de croissance (FGF-2, VEGF-A) séquestrés dans la matrice extracellulaire. Ces derniers induisent ainsi la prolifération, la migration et la chémoattraction des cellules endothéliales (Brooks *et al.* 1996; Stetler-Stevenson 1999; Gerhardt and Betsholtz 2003). Les intégrines  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$  et  $\alpha 5\beta 1$  ainsi que des protéases comme les MMP-2 et -9 sont également fortement impliquées dans l'étape de migration des cellules endothéliales (Brooks *et al.* 1996; Senger *et al.* 1997; Kim, I. *et al.* 2000).

Enfin, lors d'une étape de formation des tubes endothéliaux, les cellules endothéliales s'allongent, forment des cordes de cellules pour ensuite s'assembler en un tube qui entoure un lumen. Le diamètre des tubes vasculaires est régulé par de nombreux facteurs. Le VEGF-A en combinaison avec le facteur Ang-1 permet d'augmenter ce diamètre (Sato *et al.* 1995; Suri *et al.* 1998). Les interactions des cellules endothéliales via les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha v\beta 3$ , avec la matrice extracellulaire sont également impliquées dans la formation de la lumière du tube vasculaire (Drake *et al.* 1995; Bayless *et al.* 2000). Les capillaires néoformés entrent alors dans une phase de stabilisation (*cf. page 14*).

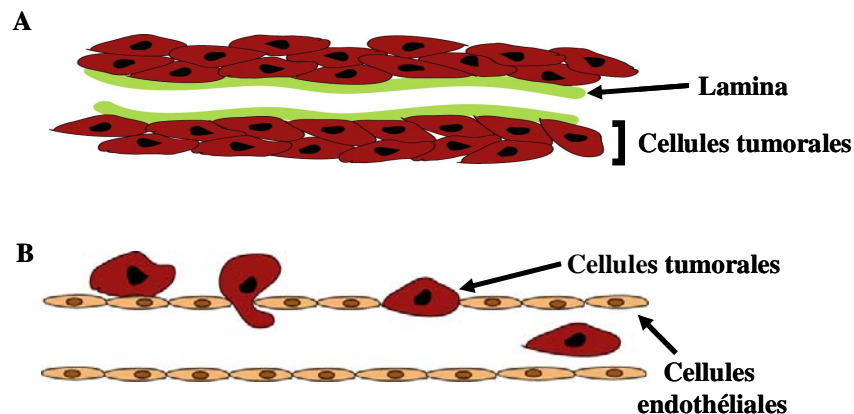
### **3.1.2. Angiogenèse par intussusception**

A la différence de l'angiogenèse bourgeonnante, l'angiogenèse par intussusception ne nécessite pas une prolifération importante des cellules endothéliales mais plutôt un réarrangement des structures préformées. L'intussusception est un processus angiogénique au cours duquel un vaisseau existant peut se scinder en deux vaisseaux par compartimentation. (Burri and Tarek 1990; Patan *et al.* 1996a; Patan *et al.* 1996b). Ce processus est initié par une invagination de la paroi du capillaire à l'intérieur de la lumière et aboutit à la création d'une zone de contact entre les deux parois opposées du capillaire. Ce contact entraîne une réorganisation des jonctions entre les cellules endothéliales et la formation d'une séparation interstitielle qui est rapidement envahie par des péricytes ou des myofibroblastes (figure 5). Ces cellules péri-capillaires vont alors synthétiser une matrice extracellulaire permettant d'augmenter la séparation entre les deux vaisseaux fils (Djonov *et al.* 2003).



**Figure 6 : Représentation schématique des mécanismes de cooption vasculaire.**

(A) La tumeur non angiogénique se développe initialement autour d'un vaisseau sanguin (cooption) et induit la production d'Ang-2. (B) Le vaisseau régresse alors et la tumeur grossit. Des zones ischémiques tumorales apparaissent et induisent la production de facteurs angiogéniques. (C) Ces facteurs induisent un processus d'angiogenèse tumorale.  
(Adapté de Papetti and Herman 2002)



**Figure 7 : Représentation schématique des mécanismes d'imitation de la vasculogénèse.**

(A) Imitation de la vasculogénèse : les vaisseaux composés de cellules tumorales sont délimités par une lamina basale qui remplace les cellules endothéliales. (B) Vaisseau mosaïque : les cellules tumorales en transit vers la lumière vasculaire restent temporairement bloquées dans le mur des capillaires.  
(D'après Auguste et al 2005)

L'intussusception permet également une diversification du diamètre des vaisseaux et de leur angle de branchement, et ainsi une hiérarchisation du réseaux vasculaire (Djonov *et al.* 2003).

Les mécanismes moléculaires qui régulent les phénomènes d'intussusception sont peu connus. Cependant les forces de cisaillement et de distensions (Djonov *et al.* 2003) ainsi que les facteurs PDGF-B (Burri and Djonov 2002), le VEGF-A et Ang-1 (Thurston *et al.* 1999) semblent jouer un rôle important dans ces mécanismes.

Lors de processus pathologiques tels que le cancer, l'angiogenèse physiologique va être mimée afin de subvenir aux besoins métaboliques de la tumeur. Cette angiogenèse tumorale aboutit à une architecture vasculaire immature, plastique, permettant la croissance continue des vaisseaux sanguins et par conséquent le développement tumoral et la propagation de métastases.

### **3.2. Les autres mécanismes**

Il existe des tumeurs se développant dans des organes extrêmement vascularisés n'induisant pas d'angiogenèse pour proliférer. La tumeur subvient alors à ses besoins en oxygène et nutriments en entourant les vaisseaux sanguins préexistants. On parle du phénomène de **vaisseaux co-optés** (Holash *et al.* 1999) (figure 6).

Les cellules tumorales peuvent également former des vaisseaux sanguins tumoraux à la place des cellules endothéliales dans des cancers de la peau et des ovaires (Maniotis *et al.* 1999; Folberg *et al.* 2000). Ce processus appelé **imitation de la vasculogenèse** semble être induit par l'acquisition, par ces cellules tumorales, de caractéristiques phénotypiques de type endothélial (Bittner *et al.* 2000) (figure 7A). Des cellules tumorales peuvent également constituer des vaisseaux en association avec des cellules endothéliales. On parle dans ce cas de « **vaisseaux mosaïques** » (Carmeliet and Jain 2000) (figure 7B)

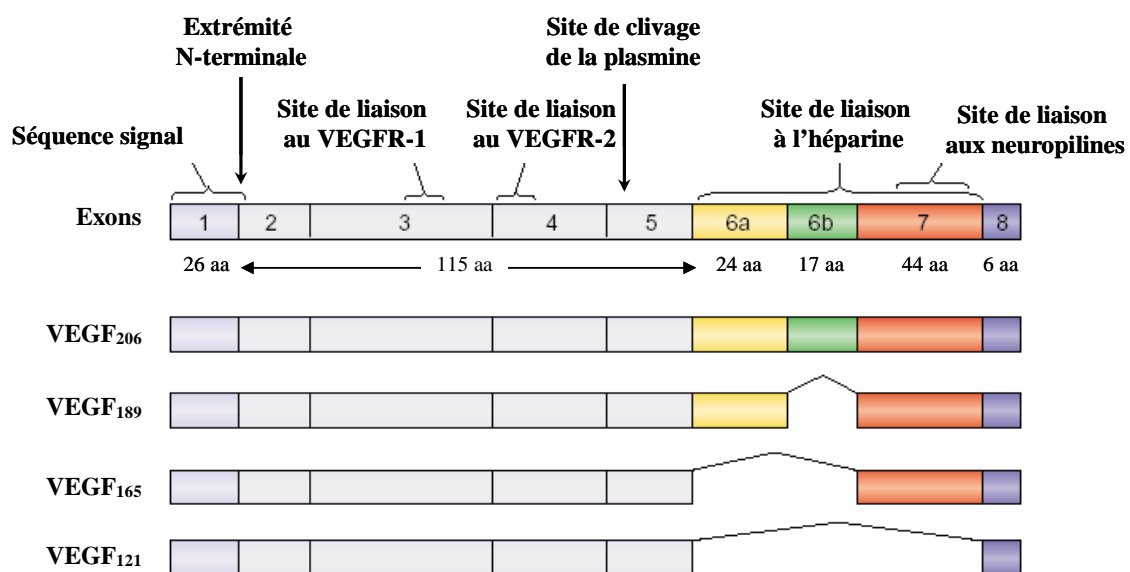
Enfin, des cellules endothéliales progénitrices ou EPC peuvent être mobilisées à partir de la moelle osseuse, être transportées par la circulation sanguine puis être incorporées dans la paroi des vaisseaux tumoraux en formation (Rafii *et al.* 2002).

## **4. Les principaux activateurs de l'angiogenèse tumorale**

Parmi les régulateurs clés de l'angiogenèse figurent le VEGF-A et ses récepteurs (*cf. chapitre I partie II*), les FGFs et leurs récepteurs, les angiopoïétines / Tie2, les métalloprotéases et les activateurs du plasminogène (Carmeliet 2003). Des régulateurs

négatifs endogènes comme la thrombospondine, l'angiostatine, l'endostatine, et le facteur plaquettaire-4 ont également été décrits (Hagedorn and Bikfalvi 2000).





**Figure 8 : Structure des principaux variants d'épissage du VEGF-A chez l'homme.**  
(D'après Cross et al 2003)

## **Partie II : Le VEGF-A et ses récepteurs**

Le VEGF-A constitue une famille de glycoprotéines homodimériques comprenant cinq membres chez les mammifères: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF (« placental growth factor ») et un membre codé par un parapoxvirus: le VEGF-E. Ces facteurs se lient à trois récepteurs différents appelés VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (flk-1 ou KDR) et VEGFR-3 (flt-4). Ils peuvent également se fixer à des co-récepteurs appelés neuropiline-1 (NRP1) et neuropiline-2 (NRP2) et aux héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) dont font partie l'héparine et les héparanes sulfates (Neufeld *et al.* 1999; Cross *et al.* 2003).

Cette partie traitera essentiellement du VEGF-A, considéré comme l'inducteur majeur des angiogenèses physiologique et pathologique.

### **1. Le VEGF-A**

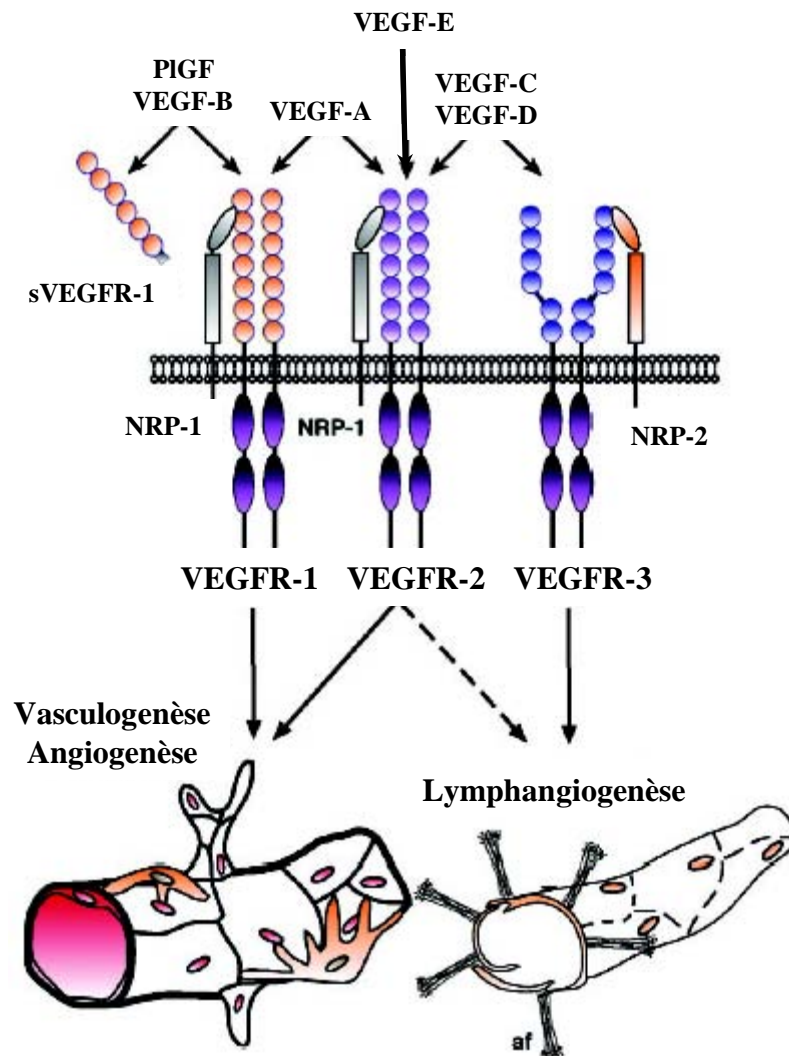
Le VEGF-A a tout d'abord été identifié comme un facteur augmentant la perméabilité vasculaire (VPF pour « vascular permeability factor ») (Senger *et al.* 1983). Par la suite, il a été identifié sous le nom de VEGF-A pour son activité mitogène et pro-angiogénique (Ferrara and Henzel 1989; Plouet *et al.* 1989). Dès lors, ce facteur a fait l'objet de très nombreuses études et un grand nombre d'activités biologiques variées lui ont été attribuées. Ce facteur est considéré comme le médiateur majeur des processus de vasculogénèse et d'angiogénèse lors de nombreuses conditions physiologiques ou pathologiques (Ferrara *et al.* 2003b).

#### **1.1. Gène du VEGF-A**

Le gène humain codant pour le VEGF-A (14 kb) est localisé sur le chromosome 6 et possède 8 exons séparés par 7 introns (Houck *et al.* 1991; Tischer *et al.* 1991). Il est transcrit en un pré-ARNm qui va générer par épissage alternatif des exons 6 (a et b) et 7, plusieurs ARN messagers codant pour différentes isoformes protéiques (figure 8) qui sont toutes sécrétées sous forme d'homodimères.

#### **1.2. Structure protéique et isoformes**

Les monomères de VEGF-A sont associés par des ponts disulfures entre les résidus Cys51 d'une chaîne et Cys61 de l'autre (Potgens *et al.* 1994). Un site potentiel de N-



**Figure 9 : Récepteurs des VEGFs et fonctions biologiques associées.**

Les neuropilines (NRP-1 et NRP-2) désignent les co-récepteurs aux VEGFs. sVEGFR-1 correspond à une forme soluble du VEGFR-1.

(D'après Jussila and Alitalo 2002)

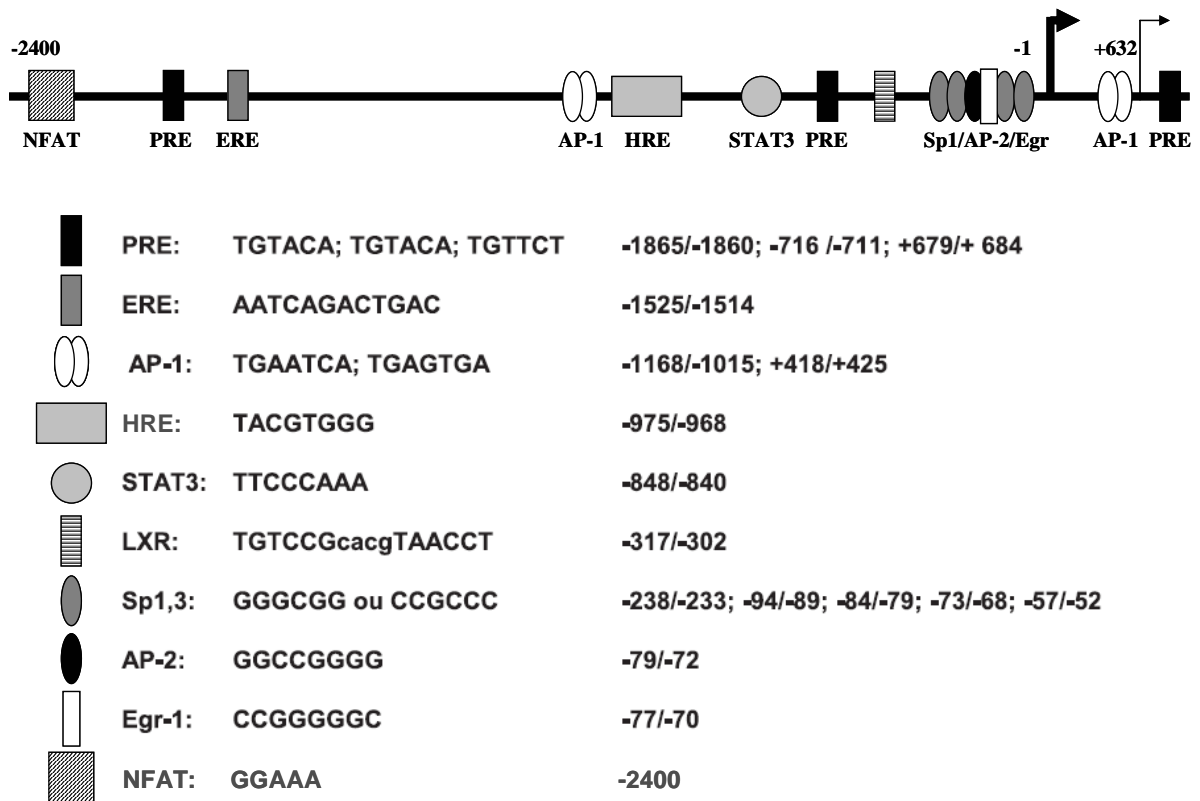


glycosylation au niveau du résidu Asn74 semble être nécessaire pour l'efficacité de la sécrétion des dimères de VEGF-A mais n'intervient pas dans leurs activités biologiques (Peretz *et al.* 1992; Claffey *et al.* 1995). Des études de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier trois résidus acides codés par l'exon 3 (Asp63, Gln64 et Gln67) et trois résidus basiques codés par l'exon 4 (Arg82, Lys84 et His86) comme étant essentiels pour lier le VEGFR-1 et le VEGFR-2, respectivement. Enfin, un domaine de liaison à l'héparine codé par les exons 6 et/ou 7 a été identifié en position C-terminale du VEGF-A.

Il existe sept isoformes du VEGF-A chez l'homme : une isoforme comprenant 121 résidus d'acides aminés notée VEGF<sub>121</sub> et les isoformes VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> et VEGF<sub>206</sub>. La majorité des cellules humaines produisent préférentiellement les formes VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> et VEGF<sub>189</sub> (figure 8). L'isoforme VEGF<sub>183</sub> possède également une large distribution tissulaire. Les isoformes VEGF<sub>145</sub> et VEGF<sub>206</sub> sont spécifiquement exprimées dans les cellules d'origine placentaire mais en proportion très faible par rapport aux autres (Anthony *et al.* 1994; Neufeld *et al.* 1999; Robinson and Stringer 2001).

Les isoformes de VEGF-A diffèrent par la présence ou l'absence des séquences codées par les exons 6 (a et b) et 7. Ces exons codent pour des zones d'affinité pour les HSPG présents à la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire (Tischer *et al.* 1991). L'isoforme VEGF<sub>165</sub> sécrétée sous la forme d'un homodimère de 45 kDa possède une affinité modérée pour l'héparine par la présence de l'exon 7 uniquement (Ferrara and Henzel 1989; Plouet *et al.* 1989). En revanche, le VEGF<sub>121</sub> où les exons 6 et 7 sont absents n'a aucune affinité pour l'héparine. Le VEGF<sub>121</sub> est donc une isoforme entièrement diffusible alors que 50 à 70 % du VEGF<sub>165</sub> reste associé à la cellule ou à la matrice extracellulaire (Houck *et al.* 1992; Park, J. E. *et al.* 1993). La séquence codée par l'exon 6a présente dans le VEGF<sub>145</sub> lui confère une affinité pour l'héparine identique celle du VEGF<sub>165</sub>. Les isoformes VEGF<sub>189</sub> et VEGF<sub>206</sub>, possédant l'exon 7 et au moins un des deux exons 6, restent, une fois sécrétées, totalement liées aux HSPG (Houck *et al.* 1992).

Cette affinité différente des isoformes du VEGF-A pour les HSPG présente deux intérêts. Premièrement, elle permet de constituer un réservoir en facteurs de croissance qui peut être mobilisé par l'action d'héparinases ou d'enzymes protéolytiques spécifiques telles que la plasmine et l'u-PA (Houck *et al.* 1992; Plouet *et al.* 1997). Deuxièmement elle permet la maturation fonctionnelle des isoformes VEGF<sub>189</sub> et VEGF<sub>206</sub>. Ces isoformes non clivées ne peuvent pas stimuler la prolifération des cellules endothéliales du fait de repliements protéiques masquant les régions de fixation au récepteur VEGFR-2. La maturation



**Figure 10 : Le promoteur du VEGF-A : éléments de réponse et facteurs de transcription.** Les deux sites d'initiation de la transcription classique et cryptique, du VEGF ainsi que la position et les séquences des éléments *cis*-régulateurs sont représentés. (D'après Pagès and Pouyssegur 2005)

Facteurs de transcription	HIF-1a, HIF-2a, Ap-1, Ap-2, Sp1, Sp3, STAT3, oestrogène, progestérone, NF-κB
Facteurs influençant les facteurs de transcription	Il-1β, Il-6, TGFα/β, TNFα, EGF, AMPc, Ca <sup>2+</sup> , NO, Insuline/IGF, HGF, JNK, AMPK, p42/44, PKA, PKC, Akt, PI3K, sérum, ischémie, etc.
Gènes	VHL, p53, Bcl2, v-src, ras, c-myc, PTEN, etc.

**Tableau 1 : Les différents facteurs influençant la transcription du VEGF.** (Josko and Mazurek 2004 ; Pagès and Pouyssegur 2005, Loureiro and D'Amore 2005)

enzymatique de ces isoformes par la plasmine ou l'uPA leur permet de fixer le VEGFR-2 et d'exercer ainsi leurs effets mitogènes. De plus, la plasmine est la seule enzyme capable de cliver tous les VEGFs, son site d'action se trouvant sur l'exon 5 commun à tous ces facteurs (figure 8) (Cross *et al.* 2003).

Les VEGF-A lient deux types de récepteurs aux VEGFs, le VEGFR-1 ou Flt-1 et le VEGFR-2 ou Flk-1 ainsi que le co-récepteur neuropiline-1 ou NRP-1 (figure 9).

### **1.3. Régulation transcriptionnelle**

De nombreuses études ont montré que la régulation de l'expression du VEGF-A est principalement transcriptionnelle mais elle se fait également par la stabilisation de ses ARNm (Levy *et al.* 1998; Dibbens *et al.* 1999). La région du promoteur du VEGF-A fait 2,4 kb chez l'Homme (Chang, C. P. *et al.* 2004) et ne contient pas de boîte « TATA » consensus servant à son activation. Le VEGF-A possède également un promoteur cryptique situé dans la région correspondant à la partie 5'-utr de son ARNm. Le deuxième site d'initiation de la transcription est situé en position +632 par rapport au site classique (Akiri *et al.* 1998) et semble être activé indépendamment du promoteur classique (figure 10). Le promoteur du VEGF-A est très conservé entre les espèces et contient de nombreux sites consensus de fixation pour des facteurs de transcription comme Sp1/Sp3, Ap-1, Ap-2, Egr-1 (« early gene response protein »), STAT3 et HIFs ainsi que des sites de fixation des récepteurs d'hormones comme les œstrogènes (ERE), la progestérone (PRE) ou le récepteur X du foie (LRX) (Josko and Mazurek 2004; Pages and Pouyssegur 2005). Cependant, bien que l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B soit nécessaire à l'expression du VEGF-A dans des tumeurs de la prostate ou du sein (Shibata *et al.* 2002; Shukla *et al.* 2004), seul le promoteur du VEGF-A murin possède un site consensus pour ce facteur (Shima *et al.* 1996). Enfin, le facteur de transcription NFAT peut se fixer sur le promoteur du VEGF-A en position -2400 et inhiber son activation dans le myocarde (Chang, C. P. *et al.* 2004).

Plusieurs paramètres de l'ischémie tumorale comme l'hypoxie ou la carence de glucose peuvent également induire la transcription du VEGF-A (Stein *et al.* 1995). De plus, le promoteur de ce gène peut être activé par de nombreux récepteurs à activité tyrosine kinase incluant ceux de l'EGF, de l'insuline ou des FGFs (Pages and Pouyssegur 2005). Des dénominateurs communs entre tous ces signaux sont les voies de signalisation Ras>Raf>Mek>Erk, PKC, PKA et PI3K/Akt. Enfin de nombreux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur peuvent également moduler la transcription du VEGF-A (Josko and Mazurek 2004; Steelman *et al.* 2004; Pages and Pouyssegur 2005) (tableau 1).

## 2. Fonctions biologiques du VEGF-A

### 2.1. Activités biologiques

Le VEGF-A est également connu sous le nom de VPF ou facteur de perméabilité vasculaire. En effet, ce facteur peut accroître la perméabilité des micro-vaisseaux et induire l'extravasation de liquides et de protéines plasmatiques à partir de ces vaisseaux sanguins (Senger *et al.* 1983; Dvorak *et al.* 1995). Le VEGF-A induit également la vasodilatation de capillaires sanguins de manière dose-dépendante par induction de la synthèse endothéliale de NO (Ku *et al.* 1993).

Le VEGF-A a la capacité d'activer la prolifération et la migration de cellules endothéliales dérivées d'artères, de veines et de vaisseaux lymphatiques *in vitro*. En effet, il stimule l'expression endothéliale de protéases telles que la collagénase interstitielle (encore appelée métalloprotéase-1 ou MMP-1), l'u-PA et t-PA (activateur du plasminogène tissulaire) (Pepper *et al.* 1991; Unemori *et al.* 1992) qui libèrent les cellules de leur ancrage et leur permettent ainsi de migrer. Le VEGF-A induit également une forte réponse angiogénique dans un large éventail de modèles *in vivo* (Leung *et al.* 1989; Plouet *et al.* 1989). C'est aussi un inducteur de **lymphangiogenèse**, processus qui permet la synthèse des vaisseaux lymphatiques (Nagy *et al.* 2002). Même si les cellules endothéliales ont été reportées comme étant les premières cibles du VEGF-A, il a également la propriété d'être un facteur mitogène pour des cellules non endothéliales (Matsumoto and Claesson-Welsh 2001).

Le VEGF-A agit *in vitro* et *in vivo* comme facteur de survie pour les cellules endothéliales. *In vitro*, il empêche la mort cellulaire par apoptose lors de la privation de sérum dans le milieu de culture (Gerber *et al.* 1998a; Gerber *et al.* 1998b). *In vivo*, on constate que cet effet protecteur est étroitement régulé lors du développement puisqu'une inhibition du VEGF-A entraîne d'importants changements apoptotiques chez la souris nouveau-né alors qu'elle n'a pas d'effet chez la souris adulte (Gerber *et al.* 1999). Cette fonction protectrice du VEGF-A existe aussi pour les cellules endothéliales constituant les vaisseaux sanguins nouvellement formés au sein d'une tumeur alors qu'elle disparaît dans des vaisseaux déjà établis (Yuan *et al.* 1996; Benjamin *et al.* 1999).

Le VEGF-A possède également un rôle d'interleukine et agit sur les cellules dérivées de la moelle osseuse. En effet, il a la capacité d'induire la chémotaxie des monocytes et la formation de granulocytes et de macrophages (Clauss, M. *et al.* 1990; Broxmeyer *et al.* 1995). En retour, les monocytes, les macrophages et certains lymphocytes T induisent des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF-A ou le PDGF ainsi que la MMP-9 et

contribuent ainsi à l'angiogenèse et à la maturation des vaisseaux néo-formés lors de réactions inflammatoires (Freeman *et al.* 1995; Melter *et al.* 2000; Rafii *et al.* 2002). Le VEGF-A induit également une mobilisation rapide et accrue de cellules souches hématopoïétiques, d'EPC et stimule la production de lymphocytes B et de cellules myéloïdes immatures (Hattori *et al.* 2001).

## **2.2. Fonctions physiologiques**

Au niveau du développement embryonnaire, le VEGF-A joue un rôle crucial dans les processus de vasculogénèse et d'angiogenèse embryonnaires (Carmeliet *et al.* 1996; Ferrara *et al.* 1996). Il joue également un rôle important lors de la vie post-natale précoce et plus particulièrement dans le développement d'organes comme le cœur, le rein, le foie, la rétine, le squelette et dans l'ossification endochondrale (Ferrara 2004). Chez l'adulte le VEGF-A est essentiellement associé au phénomène d'angiogenèse ovarienne et de cicatrisation (Carmeliet 2003; Ferrara *et al.* 2003a).

## **2.3. Fonctions pathologiques**

Dans la majorité des tumeurs humaines, un accroissement de la quantité d'ARNm du VEGF-A est observé (Dvorak *et al.* 1995; Ferrara and Davis-Smyth 1997). De même, la quantité de protéines du VEGF-A (sérique, plasmatique, urinaire ou mesurée dans les tumeurs) est globalement augmentée dans de nombreux types de cancers tels que les cancers gastriques ou mammaires (Yoshiji *et al.* 1996), les ostéosarcomes (Kaya *et al.* 2000) et les cancers des reins (Takahashi, A. *et al.* 1994). L'injection, chez des souris *nudes*, de cellules non tumorales CHO (Chinese Hamster ovary) transfectées par des vecteurs d'expression du VEGF<sub>121</sub> ou du VEGF<sub>165</sub> entraîne la formation de tumeurs. *In vitro*, ces cellules transfectées n'acquièrent pourtant pas d'avantage de capacité à proliférer (Ferrara *et al.* 1993). De plus, l'utilisation d'anticorps neutralisant le VEGF-A exerce un effet inhibiteur sur la croissance de nombreuses tumeurs chez la souris et la suppression ciblée du VEGF-A par un système de transgénèse Cre/Lox provoque une inhibition de l'angiogenèse dans une tumeur de type insulinome (Kim, K. J. *et al.* 1993). L'expression du VEGF-A a également été associée au développement de métastases (Kirsch *et al.* 2004; Rini 2005).

L'ischémie se développant au sein des tumeurs est un des facteurs inducteurs de la vascularisation des tumeurs solides et plusieurs études ont montré que le VEGF-A est exprimé dans les régions tumorales hypoxiques (Plate *et al.* 1992; Shweiki *et al.* 1992) et

	VEGF-B	VEGF-C	VEGF-D	VEGF-E	PIGF
Isoformes	Epissage 167aa* 186aa	Protéolyse 31 kDa 29 kDa 21 kDa	Protéolyse 31 kDa 29 kDa 21 kDa	34 à 44kDa	Epissage 131aa 152aa* 219aa
Homologie avec le VEGF-A	45 %	30 %	31 %	25 %	42 %
Récepteurs	VEGFR-1 NRP-1	VEGFR-2 VEGFR-3	VEGFR-2 VEGFR-3	VEGFR-2 NRP-2	VEGFR-1 NRP-1 VEGFR-1/2 (associé au VEGF-A)
Localisation	Myocarde CML Muscle CT	CE** Macrophage Myocarde CT	CE** Macrophage CT	parapoxvirus	Placenta CE Myocarde Cellule inflammatoire CT
Fonctions	Fonction peu connue -faible rôle dans l'angiogenèse tumorale -faible pouvoir mitogène -S'hétérodimérise avec VEGF-A et contrôle sa fixation au VEGFR-2	-Lymphangiogénèse -Survie, migration et prolifération CE -Angiogenèse développementale et tumorale -Métastase -Inflammation	-Lymphangiogénèse -Prolifération CE -Angiogenèse -Métastase	-Angiogenèse -Prolifération et survie CE -permeabilisation vasculaire	-Artériogénèse -Angiogenèse pathologique -Prolifération et migration CE -Extravasation du plasma -S'hétérodimérise avec VEGF-A et potentialise son effet
Références	Tammela <i>et al</i> 2005 Felmeden <i>et al</i> 2003 Jussila and Alitalo 2002	Tammela <i>et al</i> 2005 Felmeden <i>et al</i> 2003 Jussila and Alitalo 2002 Sharinen <i>et al</i> 2004	Tammela <i>et al</i> 2005 Sharinen <i>et al</i> 2004 Felmeden <i>et al</i> 2003 Jussila and Alitalo 2002	Kiba <i>et al</i> 2003 Felmeden <i>et al</i> 2003 Jussila and Alitalo 2002 Meyer <i>et al</i> 1999	Tammela <i>et al</i> 2005 Felmeden <i>et al</i> 2003 Jussila and Alitalo 2002 Cao <i>et al</i> 1997

**Tableau 2 : Les autres membres de la famille des VEGFs.**

Abréviations : CE, cellules endothéliales ; CT, cellules tumorales ; \*liaison aux héparanes sulfates protéoglycanes ; \*\* CE lymphatiques et sanguines.

carencées en glucose (Shweiki *et al.* 1995; Stein *et al.* 1995; Satake *et al.* 1998) (*cf. chapitre I partie III*).

Le VEGF-A est également impliqué dans les processus d'inflammation et d'œdèmes cérébraux ainsi que dans les maladies cardio-vasculaires, oculaires, inflammatoires et les pathologies de l'appareil reproducteur féminin (Aiello *et al.* 1994; Malecaze *et al.* 1994; Detmar *et al.* 1995; Dvorak *et al.* 1995; Kovacs *et al.* 1996; Carmeliet 2003).

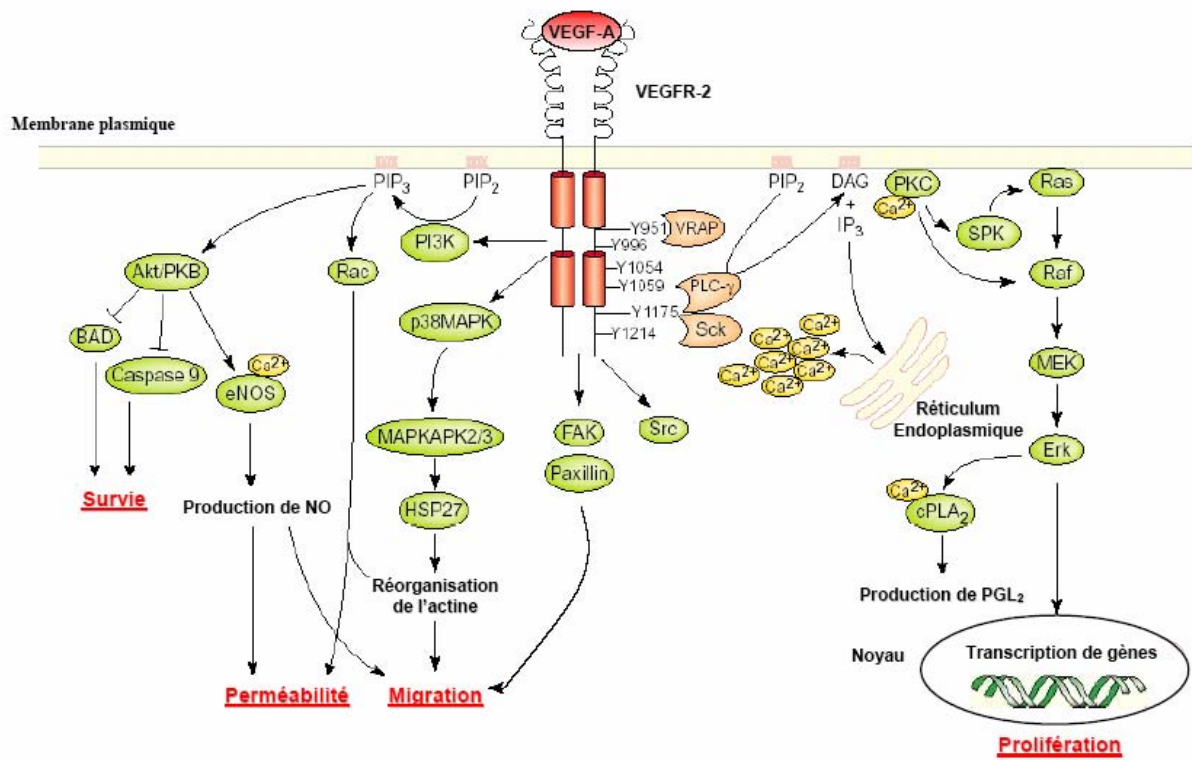
### **3. Les autres VEGFs**

Les autres membres de la famille des VEGFs : PlGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, et VEGF-E, présentent des profils d'expression et des spécificités de fixation aux récepteurs (VEGFR-1 à 3) différents. Ils se distinguent également par leur fonction (Tableau 2). En effet, le PlGF intervient principalement dans l'artériogénèse mais également dans l'angiogénèse pathologique. Les VEGF-C et VEGF-D sont majoritairement des facteurs lymphangiogéniques et interviennent dans le développement du réseau vasculaire sanguin. Le VEGF-E identifié chez le parapoxvirus semble avoir la même activité que le VEGF-A. La fonction du VEGF-B est peu connue mais il pourrait contribuer à l'angiogénèse dans les tissus musculaires (Jussila and Alitalo 2002; Felmeden *et al.* 2003; Tammela *et al.* 2005).

### **4. Les récepteurs des VEGFs**

Les VEGFs lient de manière générale trois récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK): VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 (figure 9) (Cross *et al.* 2003). Ces RTK sont composés d'un domaine extracellulaire formé de sept domaines de type immunoglobuline, une région transmembranaire et un domaine intracellulaire conservé comportant deux domaines d'activité enzymatique tyrosine kinase (Shibuya *et al.* 1990; Matthews *et al.* 1991; Terman *et al.* 1991). La fixation d'un homo ou d'un hétérodimère de VEGFs entraîne successivement une dimérisation homologue ou hétérologue des RTK puis l'activation de leur activité tyrosine kinase intracellulaire. Ces RTK activés phosphorylent de manière croisée des résidus tyrosines de leur domaine intracellulaire qui vont servir de point d'ancrage à des protéines possédant des domaines SH2 (ou domaine d'homologie avec Src). Après phosphorylation, ces protéines activent alors en cascade d'autres effecteurs cellulaires.

Le VEGFR-1 intervient dans la vasculogénèse et dans la régulation négative de la fixation du VEGF-A sur le VEGFR-2 (Claesson-Welsh 2003). Le VEGFR-2 induit les effets physiologiques et pathologiques majeurs du VEGF-A sur les cellules endothéliales en



**Figure 11 : Voie de signalisation et fonctions biologiques associées au VEGFR-2.**

Le VEGFR-2 régule différents processus comme la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales ainsi que la perméabilité des vaisseaux sanguins.

(D'après Cross et al. 2003)



phosphorylant de nombreuses protéines cellulaires. Il contrôle, en effet, la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales ainsi que la perméabilité des vaisseaux sanguins (figure 11) (Cross *et al.* 2003). Le VEGFR-3 qui fixe les VEGF-C et VEGF-D mais pas le VEGF-A, joue un rôle dans le développement du système cardiovasculaire et lymphatique dans l'embryon et dans la régulation de la formation des vaisseaux lymphatiques chez l'adulte (Jussila and Alitalo 2002)

En plus de ces récepteurs, les cellules endothéliales expriment la neuropiline-1 (**NRP1**) et la neuropiline-2 (**NRP2**), récepteurs cellulaires transmembranaires simples, qui agissent comme des co-récepteurs entre les VEGFs et leurs récepteurs (tableau 3).

	<b>VEGFR-1</b> (Flt-1)	<b>VEGFR-2</b> (KDR, flk-1)	<b>VEGFR-3</b> (Flt-4)	<b>Neuropiline</b>
<b>Ligands</b>	VEGF-A VEGF-B PlGF	VEGF-A VEGF-E VEGF-C et VEGF-D mature	VEGF-C VEGF-D Affinité variable suivant le niveau de maturation	NRP-1 : VEGF-A, VEGF-B, PlGF NRP-2 : VEGF-A, VEGF-C, PlGF
<b>Localisation</b>	Placenta CE Angioblastes Cellules progénitrices, hématopoïétiques, ostéoclastes, macrophages, monocytes, cellules de Leydig	Toutes les CE Précurseurs hématopoïétiques et endothéliaux angioblastes	Réseau capillaire embryonnaire Endothélium lymphatique adulte Cellules hématopoïétiques Cellules endothéliales tumorales	NRP-1 : artères NRP-2 : veines et vaisseaux lymphatiques
<b>Fonctions</b>	- Vasculogénèse - Régulation négative de la fixation VEGFA/VEGFR2 - Faiblement mitogène - Hématopoïèse - Métastase	- Survie, migration, prolifération et perméabilisation des CE - Vasculogénèse - Angiogenèse tumorale et développementale - Lymphangiogénèse - Hématopoïèse	- Développement embryonnaire lymphatique et vasculaire - Hématopoïèse - Cicatrisation - Angiogenèse tumorale - Lymphangiogénèse tumorale - Métastase	- Répulsion axone - Angiogenèse tumorale (NRP1/VEGFR-1) - NRP-1 : augmente la fixation VEGF-A/VEGFR-2 - NRP-2 : lymphangiogénèse
<b>Références</b>	Cross <i>et al</i> 2003 Cleasson-Welsh 2003 Jussila and Alitalo 2002			

**Tableau 3 : Les récepteurs des VEGFs.**



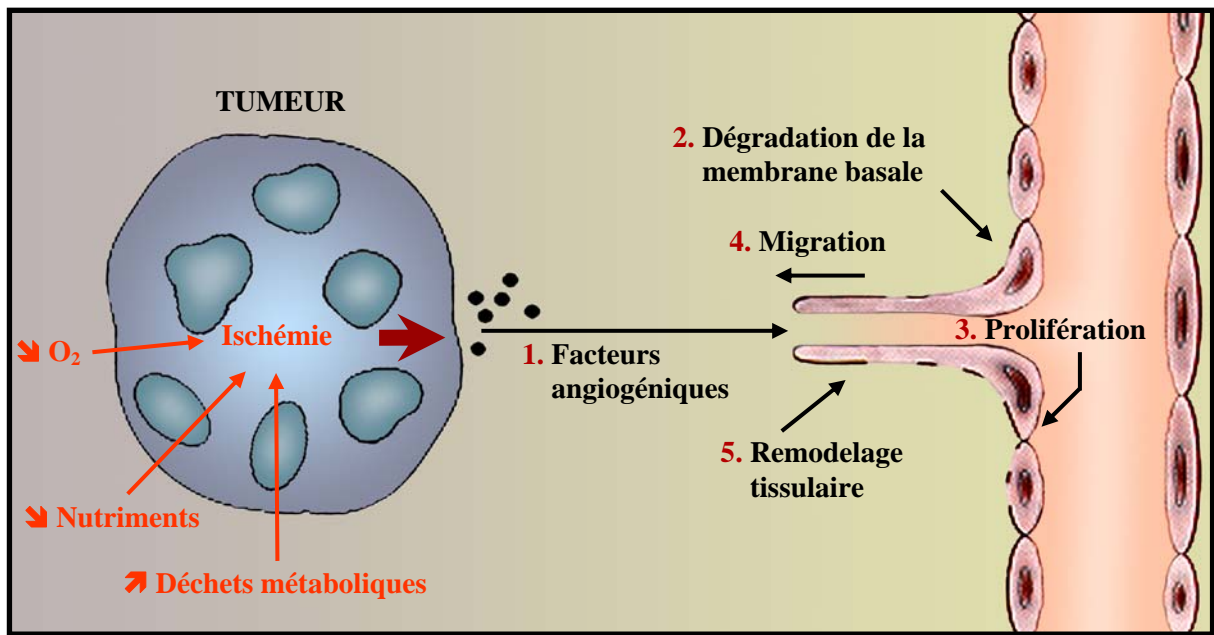


Figure 12 : Ischémie tumorale et l'induction de l'angiogénèse.

## Partie III : L'ischémie tumorale et l'induction du VEGF-A

L'ischémie se définit comme une situation d'irrigation sanguine insuffisante d'un tissu ou d'un organe. Elle peut survenir suite à une baisse du débit cardiaque, une anémie, un accident vasculaire (embolie, athérosclérose) ou au cours du développement (normal ou tumoral) qui provoquent, le plus souvent, une insuffisance ou une absence d'alimentation par le réseau vasculaire. Dans ces conditions, un déséquilibre se crée, au niveau tissulaire, entre l'apport en nutriments et l'élimination des déchets du métabolisme cellulaire. Ainsi, la distribution micro-environnementale de divers métabolites, molécules, ions et gaz, conduit à définir différents paramètres relatifs à l'ischémie comme le **pH**, la pression partielle en oxygène (**pO<sub>2</sub>**) ou la concentration en **nutriments** comme le **glucose**, en vitamines ou en minéraux.

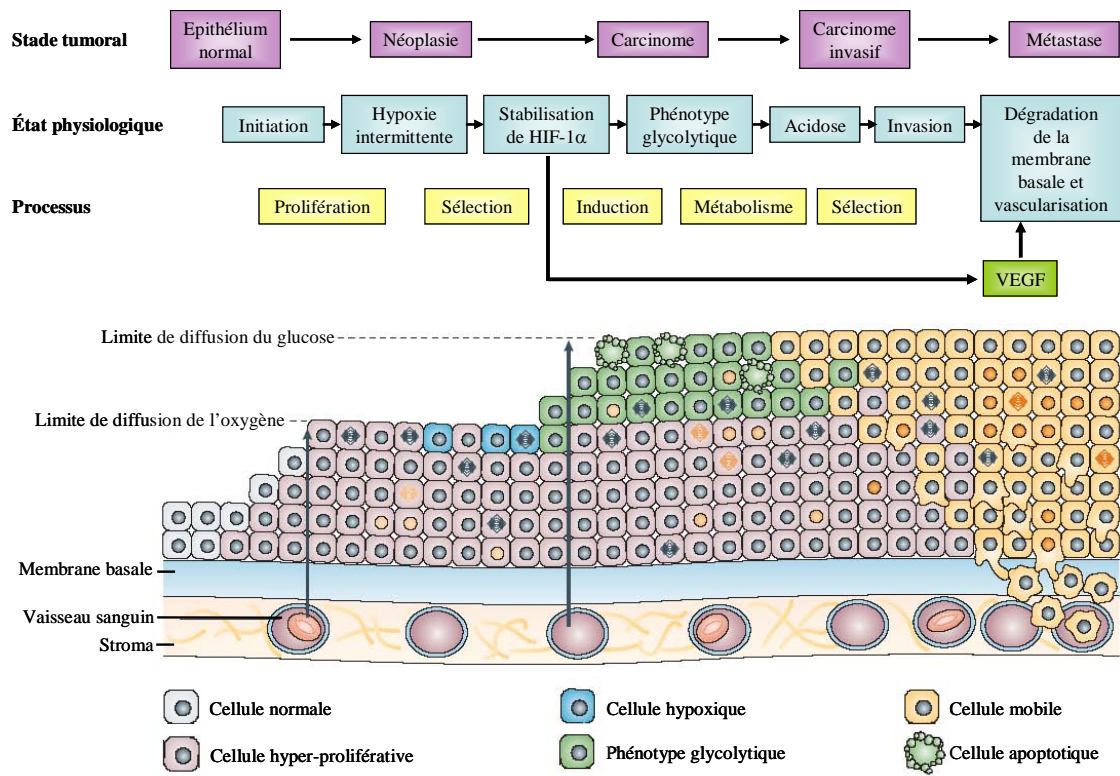
### 1. Ischémie tumorale

La prolifération intensive de cellules transformées conduit rapidement à la formation d'une masse tumorale dont certaines zones se retrouvent à des distances (supérieures à 110  $\mu\text{m}$ ) trop importantes du réseau vasculaire, ce qui entraîne une baisse de la disponibilité locale en oxygène (**hypoxie**) et en nutriments comme le glucose, ainsi qu'une diminution de l'évacuation des déchets issus du métabolisme cellulaire (Folkman 2002). Le tissu tumoral se trouve en état d'ischémie. Les cellules adaptent alors leur métabolisme à ces conditions hostiles et induisent une réponse incluant l'émission de facteurs angiogéniques et la prolifération cellulaire (figure 12). Les adaptations métabolique, génétique et/ou épigénétique aux différents paramètres de l'ischémie tumorale sont des étapes cruciales pour le développement d'un phénotype cellulaire tumoral agressif, envahissant et métastatique.

Le but de cette 3<sup>e</sup> partie est de faire un état des lieux des paramètres de l'ischémie tumorale et de leurs implications dans l'induction de l'angiogenèse et plus particulièrement dans l'induction du VEGF-A.

### 2. Mécanismes de sélection clonale induits par l'ischémie tumorale

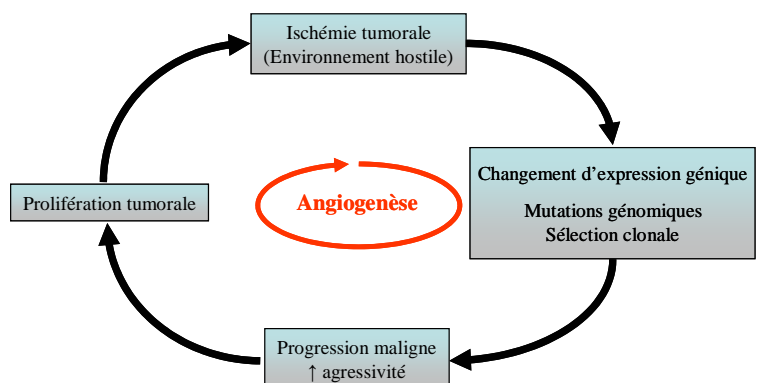
L'hypoxie est la première manifestation de l'ischémie à laquelle les cellules néoplasiques sont confrontées. Différentes études ont en effet prouvé que la pression en oxygène dans un tissu diminue plus rapidement que la concentration en glucose par rapport à la distance des vaisseaux sanguins (Helmlinger *et al.* 1997; Secomb *et al.* 1998) (figure 13).



**Figure 13 : Modèle d'interactions cellules/environnement dans la carcinogénèse.**

Les étapes de la croissance tumorale et de leurs états physiologiques associés sont représentées. Les cellules épithéliales normales deviennent hyper prolifératives après transformation. Elles prolifèrent ensuite jusqu'à atteindre la limite de diffusion de l'oxygène, où elles deviennent hypoxiques et angiogéniques. Elles acquièrent ensuite un phénotype glycolytique, qui permet leur survie ou bien elles deviennent apoptotiques. Les lésions deviennent alors acides, ce qui a pour effet de sélectionner les cellules mobiles et agressives qui vont dégrader la membrane basale et conduire à des métastases. Lors de la progression tumorale, les mutations cellulaires augmentent : les noyaux en orange clair représentent une mutation et en orange plus foncée plusieurs mutations.

(D'après Gatenby and Gillies 2004)



**Figure 14 : L'ischémie tumorale et la progression maligne.**

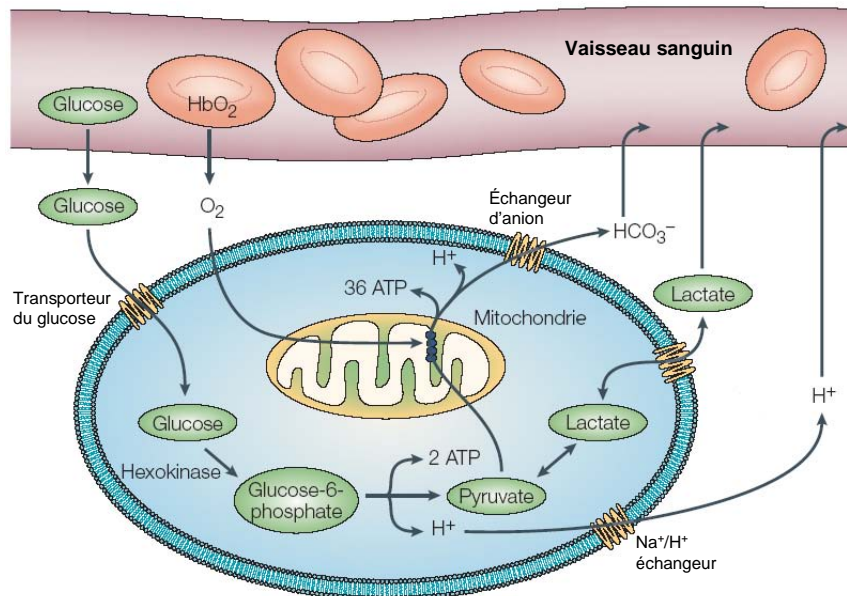
En réponse à cette hypoxie locale, les cellules tumorales vont s'adapter en modulant leur métabolisme énergétique (glycolyse), en induisant l'angiogenèse et en inhibant l'apoptose. L'essentiel de cette adaptation permettant la survie cellulaire est sous la dépendance du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (« hypoxia inducible factor ») (Semenza 2003).

Une hypoxie persistante ou cyclique (figure 14) peut exercer une sélection des cellules tumorales les mieux adaptées qui maintiennent une activation de la glycolyse (Gatenby and Gillies 2004; Vaupel 2004). Les cellules cancéreuses consomment ainsi énormément de glucose pour la production de l'énergie nécessaire à leur multiplication. La prolifération tumorale va également conduire à un manque de glucose auquel les cellules vont devoir s'adapter en augmentant leur capacité à transporter ce métabolite, essentiellement en stimulant la néoglucogenèse et éventuellement en produisant de l'énergie à partir de la dégradation d'acides aminés. Au niveau tissulaire, ces limitations en nutriments vont également induire l'angiogenèse. Une des principales conséquences d'une glycolyse accrue est une acidification du milieu extracellulaire par accumulation de déchets du métabolisme (acide lactique) (Dang and Semenza 1999; Gatenby and Gillies 2004). L'ischémie tumorale peut conduire alors à une sélection clonale de cellules plus résistantes aux conditions environnementales extrêmes. Cette sélection est une étape cruciale du développement de cancers agressifs et envahissants :

- Elle confère aux cellules tumorales un avantage prolifératif puissant au détriment des populations tumorales cellulaires moins adaptées.
- L'acidification de l'environnement de ces cellules facilite l'invasion tumorale par la destruction des cellules normales adjacentes et la promotion de métastases (Gatenby and Gillies 2004) (figure 13).

D'autres facteurs peuvent également influencer la survie des cellules tumorales comme les carences en acides aminés. Ainsi, l'induction de l'angiogenèse et la prolifération cellulaire tumorale intensive vont être associées à un cycle d'événements angiogéniques et ischémiques permettant une sélection constante des cellules tumorales les plus agressives et envahissantes (figure 14).

Cette sélection clonale passe donc par une adaptation du métabolisme énergétique des cellules tumorales qui peut également être activée par l'expression constitutive d'oncogènes ou la perte de suppresseurs de tumeur par mutations somatiques. Ces phénomènes fournissent des avantages pour la survie et la prolifération des cellules transformées dans un environnement ischémique (Dang and Semenza 1999).



### Figure 15 : Métabolisme du glucose.

Le sang afférent livre aux tissus le glucose et l'oxygène qui atteignent les cellules par diffusion. Le glucose pénètre dans les cellules par des transporteurs spécifiques, est converti en glucose-6-phosphate par l'hexokinase, puis en pyruvate, ce qui produit 2 moles d'ATP par mole de glucose dégradé. En présence d'oxygène, la dégradation du pyruvate produit 36 moles d'ATP supplémentaires par mole de glucose dégradé. En absence d'oxygène, le pyruvate est transformé en lactate et exporté de la cellule causant une acidification de l'espace extracellulaire. HbO<sub>2</sub> : hémoglobine oxygénée.

(D'après Gatenby and Gillies 2004)



La privation en glucose ainsi que les stress hypoxiques ou oxydants provoquent l'accumulation de protéines mal conformées dans le réticulum endoplasmique (RE). Il en résulte une réponse cellulaire cytoprotectrice et anti-apoptotique conférant également aux cellules une résistance aux drogues (Kaufman *et al.* 2002; Reddy *et al.* 2003; Ma and Hendershot 2004; Bi *et al.* 2005). De plus, dans différentes lignées de cellules tumorales, l'expression des facteurs angiogéniques VEGF-A et interleukine-8 est induite simultanément avec plusieurs chaperonnes du RE en réponse à l'hypoxie et à la privation de glucose et de glutamine. Ceci suggère un rapport direct entre le stress du RE, les paramètres ischémiques et l'induction de l'angiogénèse (Marjon *et al.* 2004) (*cf. article n°2*). Enfin, la chaperonne ORP150 intervient dans le contrôle de l'angiogénèse tumorale en régulant la maturation et la sécrétion du VEGF-A (Ozawa *et al.* 2001a). *Les différentes réponses aux stress du RE induit par l'ischémie tumorale seront développées en détail dans le chapitre II.*

Ainsi l'ischémie tumorale intervient à plusieurs niveaux dans la sélection des cellules les plus résistantes à des conditions environnementales extrêmes, par une adaptation métabolique et une résistance à l'apoptose permettant une prolifération intensive.

### **3. Le phénotype glycolytique tumoral : effet Warburg**

Une propriété commune à tous les cancers invasifs est une altération du métabolisme du glucose favorisant la **glycolyse**. La glycolyse est la voie catabolique de transformation du glucose en pyruvate puis en acide lactique (déchet).

Dans la plupart des cellules de mammifère, la production d'acide lactique est inhibée par la présence d'oxygène qui oxyde le pyruvate en H<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub> au sein des mitochondries. Cette inhibition est appelée « **effet Pasteur** » (Racker 1974). Cet effet permet un maintien énergétique cellulaire par rapport à la quantité d'oxygène disponible. En effet, le rendement en ATP de la dégradation du glucose à travers la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire (38 moles d'ATP par mole de glucose dégradée) est très supérieur à celui de la glycolyse seule (2 moles d'ATP par mole de glucose dégradée) (figure 15).

Les cellules tumorales ont souvent un fort taux de consommation de glucose et une activité glycolytique très importante, et ce, même en présence d'oxygène. Cette forte activité est essentielle pour répondre aux besoins élevés en métabolites pour la division rapide des cellules. Ce phénomène est connu sous le nom « **d'effet Warburg** » (Warburg 1956; Semenza *et al.* 2001). Il existe une corrélation entre un mauvais pronostic, l'augmentation

de l'agressivité tumorale et l'augmentation de la consommation en glucose des cellules par un effet Warburg (Kunkel *et al.* 2003).

L'effet Warburg résulte de l'activation d'enzymes clefs de la glycolyse comme les hexokinases I et II, la PFKFB3 (6-phosphofruktokinase 2/fructose-2,6-bisphosphatase) mais également les transporteurs du glucose comme GLUT-1 (Atsumi *et al.* 2002; Bos *et al.* 2002; Rivenzon-Segal *et al.* 2003). Cet effet peut être induit constitutivement dans les cellules tumorales par plusieurs mécanismes : des transformations oncogéniques (Bosca *et al.* 1986; Kole *et al.* 1991; Dang *et al.* 1997), une activation constitutive de HIF (Minchenko *et al.* 2002) ou des enzymes de dégradation du glucose (Dang and Semenza 1999) et l'action de cytokines ou de facteurs de croissance (Bauer *et al.* 2004).

Des tumeurs hypoxiques qui ont besoin d'une augmentation de la glycolyse pour survivre sont souvent (He, X. *et al.* 2004; Postovit *et al.* 2004) mais pas toujours (Krtolica and Ludlow 1996) plus invasives et métastatiques que des tumeurs en normoxie. Le phénotype hyper-glycolytique confère donc aux cellules un avantage prolifératif significatif. En effet, l'augmentation de la consommation de glucose permet la production d'ATP et d'intermédiaires de la biosynthèse des acides aminés et des acides nucléiques indispensables à la prolifération intensive des cellules tumorales (Gatenby and Gillies 2004). De plus, la glycolyse accrue de ces cellules leur confère une résistance aux stress oxydants et induit une acidification du milieu extracellulaire (Graeber *et al.* 1996; Spitz *et al.* 2000; Schornack and Gillies 2003).

#### **4. L'hypoxie**

Les zones hypoxiques sont très répandues au sein des tumeurs où la prolifération cellulaire est plus importante que le recrutement de vaisseaux sanguins. L'hypoxie (ou la diminution de la pression partielle en oxygène) est le premier paramètre de l'ischémie tumorale à intervenir et c'est également le plus étudié. La réponse cellulaire à ce stress fait intervenir principalement le facteur de transcription HIF-1 qui active de nombreux gènes importants pour l'adaptation et la survie cellulaire et tissulaire (Semenza 2003; Gatenby and Gillies 2004).

#### **4.1. Le facteur de transcription HIF-1**

Les facteurs de transcription HIFs sont des hétérodimères formés d'une sous-unité nucléaire exprimée de manière constitutive et ubiquitaire, HIF-1 $\beta$ , et d'une sous-unité inductible  $\alpha$ . Il existe trois isoformes  $\alpha$  : HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  et HIF-3 $\alpha$ .

HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  (figure 16A) sont des protéines de 826 et 789 acides aminés, respectivement. Ces deux protéines contiennent une séquence de localisation nucléaire et un domaine bHLH (hélice boucle hélice basique). La région basique de ce domaine est essentielle à la fixation à l'ADN alors que la région HLH est indispensable à la dimérisation de ces facteurs. Un autre point commun à HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  est la présence d'un domaine Per-ARNT-Sim (PAS) caractéristique de la famille des protéines ARNT (« aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator »). HIF-1 $\alpha$  possède un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODD) permettant sa protéolyse en normoxie. HIF-1 $\alpha$  contient également deux domaines de transactivation (TAD) situés dans les parties N- et C-terminales, responsables de l'activité transcriptionnelle de ce facteur. HIF-1 $\beta$  possède un seul domaine TAD en C-terminal qui n'est pas nécessaire à l'activité transcriptionnelle. Ces domaines TAD sont également responsables de la liaison avec des co-activateurs comme p300/CBP et Ref-1 (Dery *et al.* 2005).

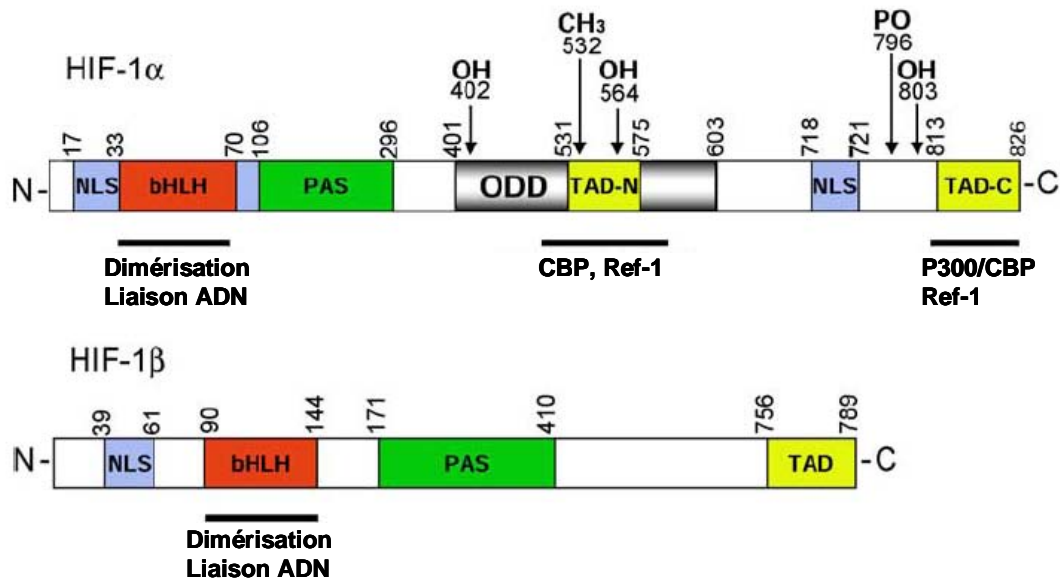
#### **4.2. Régulation de HIF-1**

Le facteur de transcription HIF-1 est situé à un carrefour de différentes voies de signalisation cellulaire. Son activité est régulée par un grand nombre de mécanismes et notamment par des modifications covalentes.

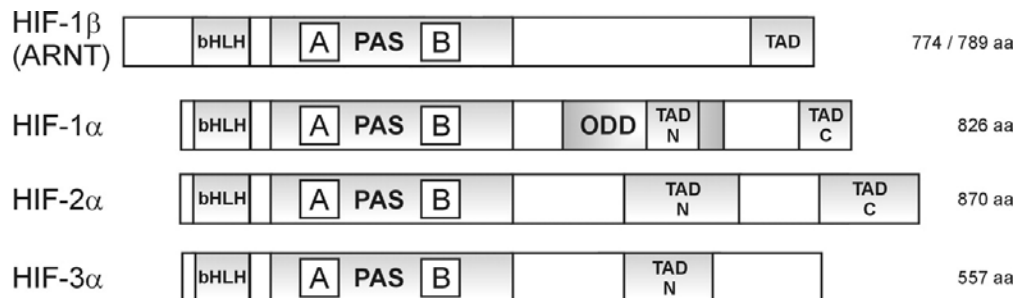
##### **4.2.1. Régulation de HIF-1 dépendante de l'hypoxie**

L'activité des facteurs HIFs est majoritairement régulée au niveau post traductionnel. L'expression du gène de HIF-1 $\alpha$  est constitutive et contrôlée principalement par l'action du facteur de transcription Sp1. D'autres sites de fixation de facteurs de transcription tels qu'Ap-1 et 2, NF-1 et NF- $\kappa$ B sont également présents sur le promoteur du gène de HIF-1 $\alpha$ . La traduction de HIF-1 $\alpha$  est également constitutive. En revanche, cette protéine est extrêmement labile et sa demi vie est de moins de 5 minutes en normoxie. En présence d'oxygène, HIF-1 $\alpha$  est hydroxylée sur les résidus proline 402 et 564 par trois hydroxylases dépendantes de l'oxygène (PHD1 à PHD3) possédant des activités biologiques distinctes (Schofield and Ratcliffe 2004). Une fois hydroxylée, HIF-1 $\alpha$  est reconnue par la protéine suppresseur de tumeur VHL (Von Hippel Lindau) qui est un composant du complexe ubiquitine ligase E3.

**A**



**B**



**Figure 16 : Les facteurs de transcription HIFs.**

(A) Les domaines protéiques de HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  ainsi que leurs sites d'hydroxylation, d'acétylation et de phosphorylation sont indiqués. (B) Structure moléculaire des différentes sous unités HIFs. Abréviations : ODD (domaine de dégradation dépendant de l'oxygène), bHLH (domaine hélice boucle hélice basique), TAD-N et TAD-C (domaines de transactivation N- et C-terminaux), NLS (signal de localisation nucléaire) et PAS (Per-ARNT-Sim).

(D'après Déry *et al*, 2005).

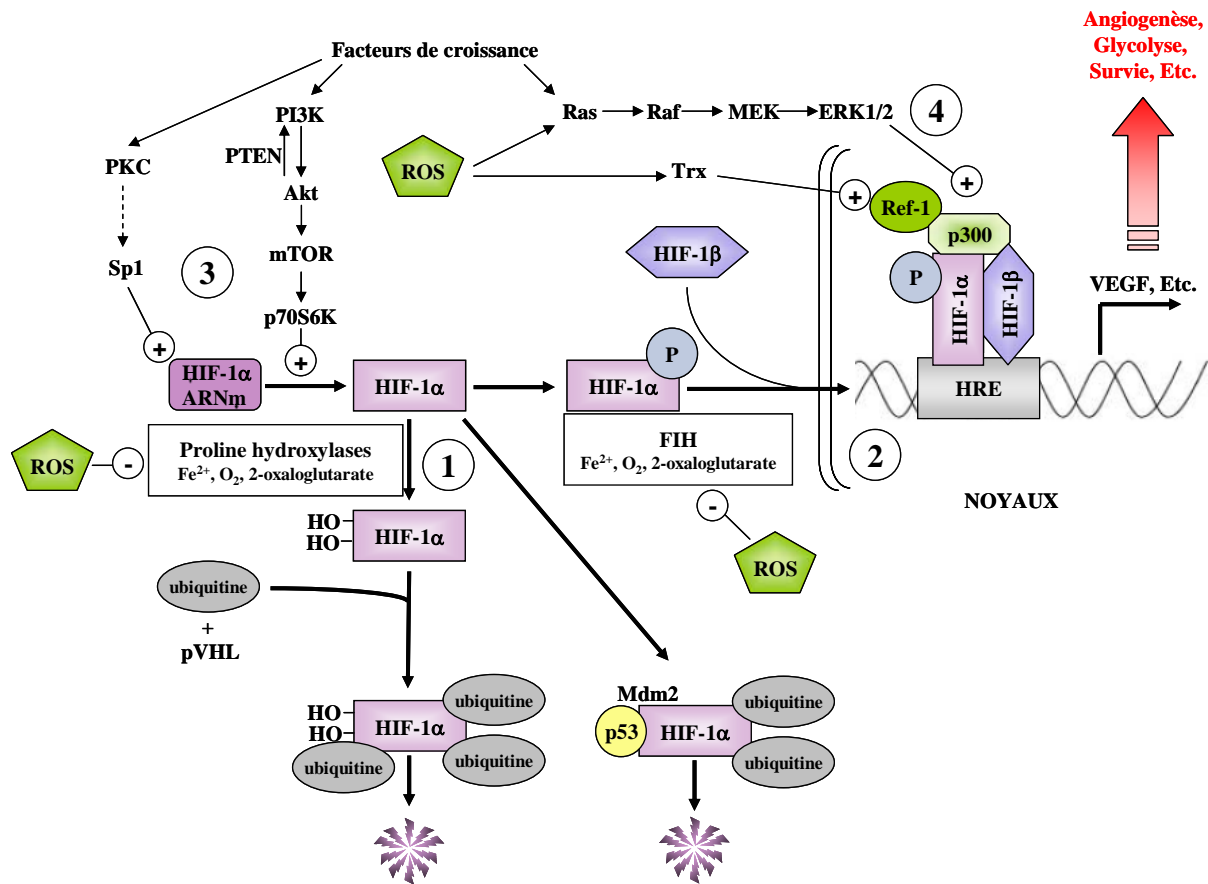
Cette reconnaissance va entraîner l'ubiquitination d'HIF-1 $\alpha$  et son adressage au protéasome pour être dégradée. La présence de fer, de 2-oxaloglutarate et d'oxygène est indispensable à l'activité des PHDs. L'inactivation de la PHD-2 est suffisante à la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ . De plus, les PHD-2 et PHD-3 sont induites en hypoxie sous la dépendance de HIF, ce qui constitue un rétrocontrôle négatif de ce système (Berra *et al.* 2003). En condition de normoxie, l'acétylation de la lysine 532 de HIF-1 $\alpha$  conduit également à sa dégradation après interaction avec la protéine VHL (Jeong *et al.* 2002).

D'autres facteurs protéiques interviennent dans le contrôle de l'activité de HIF-1 en condition de normoxie. Une asparagyl-hydroxylase dont l'activité nécessite également la présence de fer, de 2-oxaloglutarate et d'oxygène, identifiée comme une protéine se fixant à HIF-1 et appelée FIH (« factor inhibiting HIF »), hydroxyle le résidu asparagine 803 de la sous-unité  $\alpha$ , ce qui empêche l'interaction avec le cofacteur p300/CBP et diminue l'activité transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  (Schofield and Ratcliffe 2004).

En condition hypoxique, les différentes hydroxylations de HIF-1 $\alpha$  sont bloquées et son acétylation inhibée, ce qui permet sa stabilisation, son hétérodimérisation avec HIF-1 $\beta$  pour former le facteur de transcription HIF-1 actif. Ce facteur se fixe sur les séquences HRE (« hypoxia response element ») présentes sur les promoteurs des gènes cibles (Semenza 2003). La stabilisation de HIF-1 est détectable pour des teneurs en oxygène inférieures à 5 % et allant jusqu'à l'anoxie. Dans ces conditions, l'activité des PHDs diminue en fonction de la concentration en oxygène qui est un des substrats de ces enzymes. En dessous de 1,5 % d'oxygène, ces enzymes sont inhibées réversiblement par des radicaux libres oxygénés (ROS) de type H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce qui contribue au blocage efficace de leurs activités (Brunelle *et al.* 2005; Guzy *et al.* 2005; Mansfield *et al.* 2005) (figure 17).

Enfin, de nombreuses études ont montré qu'en condition d'hypoxie, l'activité de HIF est augmentée par phosphorylation directe par les MAPK p42/44 (« mitogen activated protein kinase ») (Richard *et al.* 1999) (figure 17). La phosphorylation de la thréonine 796 empêche l'hydroxylation de l'asparagine 803 par la FIH (Lancaster *et al.* 2004). Parallèlement, les MAPK p42/44 peuvent également phosphoryler le co-activateur p300/CBP et augmenter ainsi l'activité de HIF (Sang *et al.* 2003).

En conclusion, l'oxygène, les hydroxylations et phosphorylations de HIF et les ROS régulent les réponses adaptatives allant d'une hypoxie modérée à une hypoxie sévère et pouvant aboutir à la mort cellulaire (Piret *et al.* 2002).



**Figure 17 : Régulation de HIF1.**

Il existe quatre mécanismes qui régulent l'activité de HIF-1 $\alpha$ . 1) Les proline hydroxylases hydroxylient le domaine de dégradation dépendant de l'oxygène de HIF-1 $\alpha$  permettant à la protéine von Hippel-Lindeau (pVHL) d'ubiquitiner et d'adresser HIF-1 $\alpha$  au protéasome pour y être dégradée. La protéine p53 peut lier HIF-1 $\alpha$  et recruter Mdm2 ce qui mène également à son ubiquitination et à sa dégradation. 2) L'activité transactivatrice de HIF-1 est diminuée par hydroxylation d'un résidu asparagine par l'asparagine hydroxylase (FIH) qui diminue l'interaction avec le co-activateur p300/CBP. 3) L'activation d'Akt et de mTOR par la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) augmente la traduction de HIF-1 $\alpha$ . L'activation de la PKC augmente la transcription de HIF-1 $\alpha$  par l'intermédiaire du facteur de transcription Sp-1. 4) La phosphorylation de p300/CBP par la voie de signalisation MAPK augmente la formation de complexes HIF-1/p300/CBP.

L'hypoxie empêche les processus 1 et 2, stimule 3, et n'a aucun effet sur 4. Les radicaux libres (ROS) vont augmenter l'activité de HIF1 en activant la voie de signalisation MAPK, en augmentant l'affinité de HIF pour son co-activateur p300/CBP (via Ref-1) ou en inhibant l'activité des différentes hydroxylases. PTEN est un inhibiteur de la voie induite par la PI3K.

(Adapté d'après Powis and Kirkpatrick 2004)

#### 4.2.2. Régulation de HIF-1 indépendante de l'hypoxie

Des stimulations cellulaires par des facteurs de croissance (Feldser *et al.* 1999; Richard *et al.* 2000), des cytokines (Hellwig-Burgel *et al.* 1999) et des hormones (Richard *et al.* 2000; Gorlach *et al.* 2001) peuvent également conduire à une induction et une activation de HIF-1 $\alpha$ .

Contrairement aux effets observés en hypoxie, l'activation de HIF est le résultat d'une augmentation de sa traduction qui est alors plus importante que sa dégradation. Cette augmentation de la traduction de HIF-1 $\alpha$  est induite par la voie de la kinase PI3 (PI3K) et ses effecteurs, mTOR et p70S6 kinase (figure 17). La phosphorylation de la protéine S6 de l'unité ribosomale 40S par p70S6K augmente la traduction des ARNm contenant une région 5'-oligopyrimidine terminale incluant celle de HIF (Page *et al.* 2002). La voie de signalisation dépendante de la PI3K n'active pas la transcription de HIF-2 $\alpha$  (Blancher *et al.* 2001). L'augmentation de la transcription de HIF-1 $\alpha$  est possible par l'activation des protéines kinases A et C (PKA et PKC) (figure 17) qui stimulent la transcription des gènes Sp1, AP-1 et AP-2 (Tischer *et al.* 1991; Page *et al.* 2002). Les stress oxydants et l'accumulation de radicaux libres modulent, par l'intermédiaire de Ref-1, l'activité des facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2 (Ema *et al.* 1999; Lando *et al.* 2000; Welsh *et al.* 2002) (figure 17).

La dégradation de HIF-1 $\alpha$  peut également être induite indépendamment de la teneur en oxygène. La protéine ubiquitine ligase MDM2 est recrutée par la protéine suppresseur de tumeur p53 après sa fixation sur HIF-1 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  est alors ubiquitinilée par MDM2 puis dégradée au niveau du protéasome (Ravi *et al.* 2000) (figure 17)

#### 4.3. Les facteurs de transcription HIF-2 et HIF-3

Le facteur de transcription HIF-2 $\alpha$  a une forte homologie de séquence avec HIF-1 $\alpha$  et la même organisation générale de ses domaines fonctionnels (figure 16B). HIF-2 est également un facteur de transcription de type bHLH activant les gènes possédant l'élément HRE dans leur promoteur. Il existe des différences de localisation, d'activation et de spécificité entre HIF-1 et HIF-2 :

- La délétion des gènes codant pour HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  a des effets distincts sur le développement embryonnaire (*cf.* § 4.5 page 53) (Ryan *et al.* 1998; Peng, J. *et al.* 2000).
- La localisation cellulaire et l'activité de HIF-2 $\alpha$  sont liées au type cellulaire. Dans des cellules MEF immortalisées, HIF-2 $\alpha$  a une localisation cytoplasmique en normoxie et son activité n'est pas régulée par l'hypoxie ni par les mécanismes d'hydroxylation (Park, S. K. *et*

Angiogenèse	Métabolisme énergétique
VEGF-A	GLUT-1 / GLUT-3
VEGFR-1	Hexokinase I / Hexokinase II
VEGFR-2	Lactate deshydrogénase
	Phosphoglycérate kinase
contrôle vasomoteur	Aldolase
Oxyde nitrique synthase	Phosphofructokinase L
Endothéline I	Pyruvate kinase M
Heme oxygénase I	
	régulation du pH
transport de métaux	Anhydrase carbonique 9
Transferrine	
	survie et prolifération
	p21
érythropoïèse	NIP3
EPO	IGF-2

**Tableau 4 : Quelques gènes cibles des facteurs de transcription HIFs.**



*al.* 2003). HIF-2 $\alpha$ , à l'inverse de HIF-1 $\alpha$ , interagit avec la protéine NEMO («NF- $\kappa$ B essential modulator») et cette interaction induit son activité par recrutement du co-activateur p300/CBP, en normoxie (Bracken *et al.* 2005). HIF-2 $\alpha$ , et non HIF-1 $\alpha$ , s'associe spécifiquement avec le facteur de transcription Ets-1 pour induire l'expression du récepteur VEGFR-2 (Elvert *et al.* 2003). Enfin, Brusselmans *et al.*, suggèrent que d'autres stimuli que l'hypoxie induisent l'activation de HIF-2 $\alpha$  : ce facteur aurait un rôle plus spécifique dans la réponse à la carence en glucose (Brusselmans *et al.* 2001).

- Une étude comparative par microarrays a montré que la surexpression de HIF-1 et/ou HIF-2 dans des cellules HEK induit une augmentation significative de la transcription de 45 gènes dont seulement 21 sont communs à ces deux facteurs (Wang, V. *et al.* 2005).

Peu de chose sont connues sur HIF-3 $\alpha$ . Ce facteur semble avoir une fonction inhibitrice en réponse à l'hypoxie. Cette sous-unité se fixe également à la sous-unité HIF-1 $\beta$  après avoir été induite par l'hypoxie et possède les mêmes domaines fonctionnels que HIF-1 $\alpha$  et HIF-2  $\alpha$  à l'exception du domaine trans-activateur (TAD) (figure 16B) (Semenza 2003; Powis and Kirkpatrick 2004).

#### **4.4. Les voies de signalisations dépendantes de HIF**

Dans des conditions hypoxiques, les facteurs de transcription HIFs sont impliqués dans l'induction de tous les gènes qui possèdent une séquence HRE sur leurs promoteurs. HIF-1 et HIF-2 sont responsables de l'expression de plus de 60 gènes tels que l'érythropoïétine, le VEGF-A et ses récepteurs, GLUT-1, la plupart des enzymes clefs de la glycolyse, ainsi que des gènes intervenant dans la survie, la prolifération cellulaire et l'apoptose (tableau 4) (Semenza 2003).

#### **4.5. Hypoxie, angiogenèse et induction du VEGF-A**

Le système HIF joue un rôle crucial lors de l'angiogenèse. La délétion des gènes codant pour HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  provoque une létalité embryonnaire par une diminution de l'expression du VEGF-A, un défaut de développement du système cardiovasculaire et une réduction de la vascularisation de l'embryon et du sac vitellin (Maltepe *et al.* 1997; Ryan *et al.* 1998; Kotch *et al.* 1999). HIF-2 $\alpha$  joue un rôle critique mais distinct dans le développement. La délétion du gène HIF-2 $\alpha$  chez les souris induit des défauts vasculaires graves dans le sac vitellin et l'embryon qui mènent à une mort embryonnaire. Des vaisseaux

sanguins normaux ont été constitués par vasculogénèse mais ils sont incorrectement fusionnés et non hiérarchisés (Peng, J. *et al.* 2000).

HIF-1 et HIF-2 sont activés dans les régions hypoxiques tumorales. Le rôle de HIF-2 dans la tumorigénèse n'est pas encore clairement établi. Des travaux de Acker *et al* ont montré que HIF-2 intervient dans la promotion de l'angiogénèse mais diminue la croissance tumorale par induction d'une apoptose dans des gliomes de rat (Acker *et al.* 2005). A l'inverse, une étude sur des cellules ES dans lesquelles le gène codant pour HIF-1 $\alpha$  est remplacé par celui de HIF-2 $\alpha$  (« knock-in ») par recombinaison homologue, montre que les tumeurs issues de ces cellules sont plus grosses, prolifératives, micro-vascularisées et expriment plus de VEGF-A comparé aux cellules sauvages. Ces résultats suggèrent donc que HIF-2 est plus efficace que HIF-1 dans la promotion de la croissance tumorale (Covello *et al.* 2005; Raval *et al.* 2005).

En hypoxie, les facteurs de transcription HIFs sont impliqués dans l'induction du VEGF-A. L'hypoxie induit en effet une augmentation forte et rapide des ARNm et des protéines du VEGF-A (Dor *et al.* 2001) mais pas des autres membres de la famille des VEGFs. L'hypoxie augmente également la demi-vie des ARNm du VEGF-A en induisant le facteur de stabilité HuR qui se fixe sur des séquences régulatrices dans les régions 5' et 3' non traduites de l'ARNm et le stabilise (Levy *et al.* 1998; Dibbens *et al.* 1999). En hypoxie, une induction de l'expression des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 (via HIF-2 $\alpha$  principalement) ainsi que de celle de l'angiopoïétine-2, de la MMP-2 et de l'uPAR est également observée (Liu, Y. *et al.* 1995; Forsythe *et al.* 1996; Waltenberger *et al.* 1996; Gerber *et al.* 1997; Levy *et al.* 1998; Elvert *et al.* 2003). De plus, l'adénosine libérée par les cellules hypoxiques en se liant aux récepteurs A2 stimule la voie dépendante de la PKA qui active la production de VEGF-A (Takagi *et al.* 1996).

Sous l'influence de mutations somatiques, une augmentation de l'expression du VEGF-A est observée. La perte des suppresseurs de tumeur p53 ou VHL par mutation ou inhibition constitutive conduit à une surexpression de HIF (Ravi *et al.* 2000; North *et al.* 2005).

## **5. La carence en glucose**

Les limitations en nutriments peuvent intervenir dans l'activation de processus angiogéniques. Parmi ces nutriments, le plus important énergiquement est le glucose. Sa dégradation à travers la glycolyse et la respiration mitochondriale produit de l'énergie sous

forme d'ATP. Le glucose est également un précurseur essentiel pour la production d'acides aminés et de sucres nécessaires à la synthèse des protéines et des acides nucléiques qui permettent la prolifération et l'expansion tissulaire. Enfin, le métabolisme du glucose est associé à la voie métabolique des hexoses monophosphates et à la production du NADPH, puissant réducteur impliqué dans la protection des cellules contre les effets de stress oxydant. Les carences en glucose ont été associées à plusieurs pathologies humaines incluant l'ischémie tissulaire et le cancer (Semenza 2003; Marjon *et al.* 2004).

### **5.1. Importance du glucose dans l'ischémie tumorale**

Dans différents types de tumeurs, une diminution locale de la perfusion sanguine peut provoquer une carence en glucose. Cette carence est donc un paramètre constitutif de l'ischémie tumorale (Vaupel *et al.* 1989; Eskey *et al.* 1993; Walenta *et al.* 2002). Des concentrations très faibles de glucose ont été mesurées dans le milieu interstitiel des tumeurs (de 0,15 à 0,8 g/l) par rapport aux tissus normaux (glycémie normale ~ 1 g/l) (Ettinger *et al.* 2001; Ziegler *et al.* 2001; Helmlinger *et al.* 2002; Walenta *et al.* 2002). De plus, la sévérité de ces carences peut être augmentée par une consommation plus importante de glucose dans les cellules tumorales, du fait des effets Warburg/Pasteur, (*cf. page 45*) (Younes *et al.* 1996; Kunkel *et al.* 2003; Stubbs *et al.* 2003; Gatenby and Gillies 2004). Ces données montrent l'importance clinique du métabolisme du glucose. Enfin, les cellules cancéreuses maintiennent leur phénotype métabolique en culture cellulaire en condition de normoxie ce qui indique que la glycolyse aérobie est augmentée à travers des transformations génétiques ou épigénétiques stables (Gatenby and Gillies 2004). L'altération du métabolisme du glucose dans les tumeurs est donc plus qu'une simple adaptation à l'hypoxie.

Au niveau médical, ce phénotype glycolytique permet la localisation de tumeurs grâce à l'utilisation d'un analogue du glucose, le fluorodésoxyglucose (FDG) marqué à l'aide d'un atome radioactif, le fluor-18, [<sup>18</sup>F]-FDG. Cette molécule s'accumule dans les tissus qui consomment du glucose, soit à l'état physiologique comme dans le cerveau ou les muscles à l'exercice, soit de manière pathologique dans les tissus cancéreux (Maublant *et al.* 1998).

Il existe également un lien entre la carence en glucose et d'autres paramètres de l'ischémie tumorale comme l'absence d'acides aminés, la diminution du pH ou le stress oxydatif. En effet, la résistance cellulaire à cette carence en glucose est dépendante de la consommation d'acides aminés dont la glutamine (Esumi *et al.* 2002). De plus, la limitation en glucose dans les zones tumorales ischémiques induit également un stress oxydatif ainsi

qu'une acidification de l'environnement cellulaire (Spitz *et al.* 2000; Gatenby and Gillies 2004).

## 5.2. Voies de signalisation dépendantes de la carence en glucose

La consommation accrue de glucose en condition ischémique va entraîner une diminution de sa concentration péri-cellulaire, ce qui nécessite différentes adaptations cellulaires. La compétition cellulaire pour cette ressource favorise les cellules qui surexpriment des transporteurs du glucose possédant de hauts  $V_{MAX}$  (par exemple, GLUT1) ou de bas  $K_M$  (par exemple, GLUT3). Cette surexpression des récepteurs a été observée dans des cancers de l'oesophage, du sein et du colon (Younes *et al.* 1997; Grover-McKay *et al.* 1998; Sakashita *et al.* 2001).

La carence de glucose dans des cellules en culture induit l'expression de nombreux gènes de la glycolyse (PGK, PK, etc.) ainsi que des transporteurs du glucose GLUT-2 et GLUT-4 (Vaulont *et al.* 2000). L'induction de ces gènes est due à l'activation de l'AMPK (« AMP-activated protein kinase ») sous la dépendance de l'AMP, métabolite indicateur d'une faible charge énergétique (Hardie 2004). En absence de glucose, l'AMPK contrôle l'expression des facteurs de transcription USF (« upstream stimulatory factor ») et ChREBP (« carbohydrate-response élément binding protein ») (Vaulont *et al.* 2000). Ces facteurs se fixent sur une séquence de réponse au glucose ChoRE (« carbohydrate-response élément ») présente sur le promoteur de gènes d'enzymes de la glycolyse (PGK, GLUT-1, lactate déshydrogénase) qui chevauche la séquence HRE et active leur transcription (Dang *et al.* 1997). HIF peut également induire la transcription de ces gènes en se fixant sur la séquence ChoRE (Kietzmann *et al.* 2002). Cependant ces résultats sont encore discutés. En effet, bien qu'une induction de la PFKFB3 et de GLUT-1 ait été rapportée de manière indépendante de HIF et dépendante de l'AMPK (Yun *et al.* 2005), d'autres auteurs montrent que l'induction de tous ces gènes est inhibée en absence de glucose aussi bien qu'en hypoxie quand le gène HIF-1 $\alpha$  est délété dans des cellules ES de souris (Carmeliet *et al.* 1998; Ryan *et al.* 1998).

L'élément de réponse ChoRE est identique, à une base près, au site de fixation consensus de c-Myc (Dang *et al.* 1997) et on observe que ce facteur de transcription contrôle également l'expression des gènes induits par les carences en glucose (Valera *et al.* 1995; Riu *et al.* 1996; Osthus *et al.* 2000)

### 5.3. Carence en glucose et induction du VEGF-A

Les voies de signalisation activées par les carences en glucose induisant le VEGF-A sont mal connues. Les principaux travaux concernant cette carence au niveau tumoral ont porté sur l'étude de HIF mais d'autres voies de signalisation sont impliquées. Si le pouvoir angiogénique de la carence en glucose est suggéré par l'expression accrue du VEGF-A, les mécanismes de régulation proposés sont très controversés et semblent dépendants du type de cellules et de l'environnement péri-cellulaire.

Les carences en glucose induisent l'expression du gène du VEGF-A dans des cellules normales ou tumorales (Shweiki *et al.* 1995; Stein *et al.* 1995; Ryan *et al.* 1998; Satake *et al.* 1998; Park, S. H. *et al.* 2001). L'augmentation des messagers du VEGF-A en absence de glucose, dans différentes lignées de cellules tumorales, ne semble pas induite par les facteurs HIF-1, comme pour l'hypoxie, (Iyer *et al.* 1998; Kotch *et al.* 1999; Yun *et al.* 2005) mais dépend plutôt de la stabilisation des messagers à travers leur séquence 3'utr (Stein *et al.* 1995; Iida *et al.* 2002; Yun *et al.* 2005) (*cf. article n°2*). D'autres auteurs montrent que dans des cellules murines ES, l'induction du VEGF-A en absence de glucose peut être dépendante de HIF-1 (Maltepe *et al.* 1997; Carmeliet *et al.* 1998; Ryan *et al.* 1998) par une activation de la voie de signalisation dépendante de PI3K (Zhang, L. *et al.* 2003) ou par l'accumulation de radicaux libres (Spitz *et al.* 2000). De plus, Brusselmans *et al.* (2001) suggèrent que d'autres stimuli que l'hypoxie induisent l'activation de HIF-2 $\alpha$  qui aurait un rôle plus spécifique dans la réponse à la carence en glucose. HIF-1 et HIF-2 sont inducteurs de l'angiogenèse et notamment du VEGF-A et du VEGFR-2 en absence de glucose, mais HIF-1 aurait un rôle plus important dans l'induction des enzymes glycolytiques.

D'autres voies de signalisation seraient potentiellement impliquées dans l'activation du VEGF-A sous l'effet de carences en glucose. Lors de ces carences, la voie de signalisation dépendante de l'AMPK aboutit à l'induction et à la stabilisation des ARNm du VEGF-A par l'intermédiaire de la kinase JNK mais d'une façon indépendante de HIF (Yun *et al.* 2005). Cependant, ces mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés. Une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire observée lors de carence en glucose conduit à l'activation de la PKC et également à l'induction du VEGF-A par le facteur de transcription AP-1 (Park, S. H. *et al.* 2001).

Enfin, la privation de glucose active la réponse UPR (« unfolded protein response » *cf. chapitre II*) et le VEGF-A est induit par des agents pharmaceutiques inducteurs du stress du RE tels que la tunicamycine ou la thapsigargine (Abcouwer *et al.* 2002). La protéine de

signalisation proximale de la réponse UPR, IRE1 est indispensable à l'expression du VEGF-A lors de carences en glucose (*cf. Article n°2*).

## **6. Les carences en acides aminés**

Le lien existant entre les carences en acides aminés et l'ischémie tumorale n'a pas été démontré clairement à l'heure actuelle. Ce lien peut s'expliquer, d'une part, par l'origine exogène de ces métabolites ainsi que par leur transport sanguin sur le site d'utilisation et d'autre part, par l'augmentation des besoins des cellules tumorales en nutriments. Les mammifères doivent réguler avec précision la disponibilité en acides aminés en tenant compte du fait qu'ils ne peuvent pas les synthétiser tous et qu'il n'en existe pas de stock important au niveau cellulaire. Huit acides aminés seulement sont décrits comme essentiels chez l'Homme adulte (valine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine et tryptophane), mais les cellules en culture ont besoin de 5 acides aminés supplémentaires (arginine, cystéine, glutamine, histidine et tyrosine) (Eagle 1959). La définition d'un acide aminé essentiel doit donc être considérée dans le contexte du type cellulaire plutôt que de l'organisme entier.

### **6.1. Importance des acides aminés dans l'ischémie tumorale**

Une absence de vascularisation est susceptible de générer une carence locale pour un ou plusieurs acides aminés. Une mobilisation importante de la glutamine des tissus hôtes vers la tumeur en développement a, par exemple, été observée (Medina *et al.* 1992). La glutamine est l'acide aminé le plus abondant dans la circulation et est métabolisée par les tissus tumoraux à des taux beaucoup plus élevés que n'importe quel autre acide aminé (Bobrovnikova-Marjon *et al.* 2004). La glutaminolyse fournit en effet aux cellules des précurseurs métaboliques, de l'énergie et des équivalents réducteurs. La glutamine a également un rôle important dans la régulation de l'équilibre redox cellulaire, l'apoptose et la prolifération tumorale (Mates *et al.* 2002; Mazurek *et al.* 2002). Helmlinger *et al.* (2002) ont montré qu'une glutaminolyse accrue est corrélée avec la surproduction de lactate au niveau tumoral. La glutamine représente une source énergétique palliant une carence en glucose. De plus, une inhibition de la glutaminolyse induit une diminution de la croissance tumorale (Lobo *et al.* 2000).

Les carences en acides aminés induisent l'expression de gènes ayant une implication dans le développement tumoral : proto-oncogènes, facteurs de croissance et gènes impliqués

dans le métabolisme des acides aminés (Campbell *et al.* 2000; Fafournoux *et al.* 2000; Kilberg *et al.* 2005). Enfin, les cellules tumorales sont plus résistantes que les cellules normales aux carences totales en acides aminés et glucose. Ces effets de résistance sont en partie dépendants de la voie de la PI3 kinase (Izuishi *et al.* 2000).

Campbell *et al.*, (2000) rapportent une augmentation de l'expression du transporteur membranaire d'acides aminés LAT1 en absence d'arginine. Cette augmentation n'est pas observée en absence de glutamine ou lors de stress hypoxiques ou anoxiques. Ceci suggère l'existence d'une spécificité moléculaire des acides aminés. L'augmentation de LAT-1 ainsi que de ASCT2 (transporteur majeur de la glutamine dans les cellules de cancer du colon) est associée au phénotype tumoral et à la croissance tumorale et confère à ces cellules un avantage de croissance et de survie, notamment dans les conditions de carences en acides aminés (Campbell *et al.* 2000; Yanagida *et al.* 2001; Kobayashi, H. *et al.* 2005). Les transporteurs des acides aminés des cellules normales et transformées diffèrent par leurs constantes physicochimiques ce qui peut favoriser l'importation des acides aminés par les tumeurs (Bode *et al.* 1995; Kim do *et al.* 2004). L'augmentation de cet import a pour effet d'activer la kinase mTOR qui augmente la synthèse protéique et la croissance tumorale.

## **6.2. Voies de signalisation dépendantes de l'absence d'acides aminés**

Dans les cellules de mammifères, deux voies contrôlent et répondent à la disponibilité en acides aminés en modifiant le taux de synthèse protéique dans des directions opposées. La première voie métabolique contrôlée par mTOR (« mammalian target of rapamycin ») permet la synthèse protéique et la croissance cellulaire si le niveau d'acides aminés est suffisant. Par un mécanisme encore inconnu de détection cellulaire, les acides aminés activent la kinase mTOR puis une cascade de phosphorylations aboutissant à l'activation de la kinase associée au ribosome S6. Cette phosphorylation de la kinase S6 permet de maintenir une traduction importante de protéines ribosomales. Par cette voie, les taux de synthèse protéique et de croissance cellulaire sont maintenus à un niveau cohérent avec la disponibilité nutritive. (Fingar and Blenis 2004; Meijer and Dubbelhuis 2004; Padbury *et al.* 2004). Une étude par microarrays montre que des cellules soumises à une carence en glutamine ou un traitement à la rapamycine présentent des profils d'expression génique comparables (Peng, T. *et al.* 2002) et qu'il existe des régulations croisées entre mTOR, ASCT2 et LAT-1 (Fuchs and Bode 2005).

La deuxième voie de signalisation de réponse à l'absence d'acides aminés (AAR) inhibe la synthèse protéique. L'augmentation de la quantité d'ARNt non chargé entraîne

l'activation de la kinase GCN2 (« general control nonderepressible protein 2 ») (Sood *et al.* 2000; Zhang, P. *et al.* 2002) qui phosphoryle le facteur général d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  inhibant ainsi la synthèse protéique dépendante de la coiffe (Kimball 2002). Cependant, la traduction de certains ARNm est augmentée dans ces circonstances, comme ATF4 (« activating transcription factor 4 ») (Vattem and Wek 2004), le VEGF-A (Stein *et al.* 1998) ou HIF (Lang and Reeder 1993). ATF4 joue un rôle essentiel dans la régulation transcriptionnelle des gènes contenant l'élément de réponse aux acides aminés (AARE) dans leur promoteur comme l'asparagine synthétase (AS) et le transporteur membranaire d'acide aminé cationique (Cat-1) (Kilberg *et al.* 2005). ATF4 contribue à l'augmentation de l'apport en acides aminés suffisant pour la biosynthèse de protéines et de glutathion qui protège les cellules contre les agents oxydants (Harding *et al.* 2003). *La voie de réponse adaptative cellulaire dépendante d'ATF4 sera détaillée dans le chapitre II.*

### **6.3. Carence en acides aminés, angiogenèse et induction du VEGF-A**

Abcouwer *et al.* (2002) ont montré que la privation en glutamine augmente l'expression du VEGF-A dans une lignée de cellules épithéliales rétinienne pigmentées. Cette induction est le résultat d'une augmentation de la transcription et de la stabilisation des ARNm.

Bobrovnikova-Marjon *et al.* (2004) montrent qu'une privation en glutamine *in vitro* active les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1. Cependant la surexpression du VEGF-A est faiblement associée à ces facteurs de transcription.

## **7. Le stress oxydant**

Le stress oxydant représente un paramètre essentiel de l'ischémie et peut contribuer à l'angiogenèse tumorale (Carmeliet and Jain 2000). En effet, ce stress peut induire et modifier le phénotype des cellules tumorales en endommageant l'ADN ou en modulant l'expression de gènes ou l'activité de diverses voies métaboliques (Adler *et al.* 1999; Allen and Tresini 2000).

Le stress oxydant a plusieurs origines possibles incluant 1) la réduction inachevée de l'oxygène pendant la respiration, 2) l'exposition à une hypoxie puis une réoxygénation, 3) une exposition à des produits chimiques ou composés biologiques, 4) un empoisonnement, 5) une irradiation. Toutes ces conditions produisent des ROS qui sont les médiateurs des effets de ce stress. Les cellules tumorales produisent des quantités élevées de ROS dont le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Szatrowski and Nathan 1991). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut contribuer à la



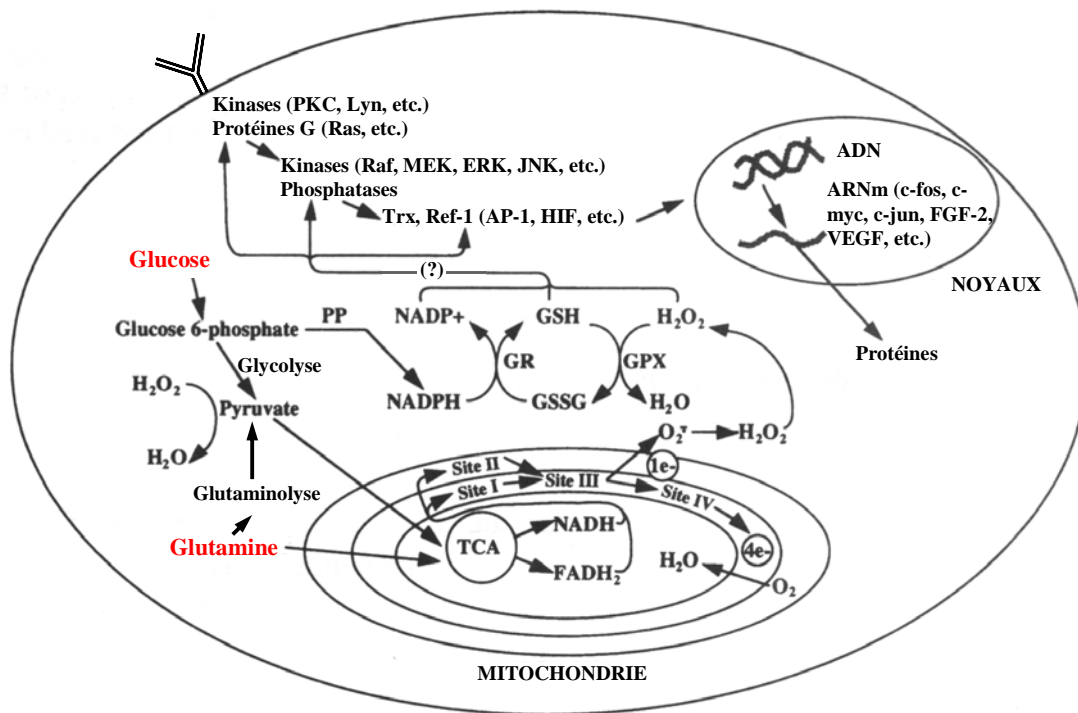
transformation néoplasique et à l'angiogenèse en induisant la prolifération de cellules tumorales et la différenciation de cellules endothéliales (Burdon *et al.* 1990; Yasuda *et al.* 1999; Yeldandi *et al.* 2000).

Le métabolisme du glucose a un rôle dans la détoxification du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cellulaire. Les limitations en glucose induisent un stress oxydant en modifiant les rapports cellulaires de NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> et de glutathion réduit/oxydé (GSH/GSSG) (Spitz *et al.* 2000) (figure 18). De plus, la limitation en glucose compensée par l'utilisation d'acides aminés dans le cycle de Krebs et la limitation en oxygène vont entraîner une respiration incomplète et la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'activité anti-oxydante du glucose s'explique de la manière suivante : sous l'action de l'hexokinase 2, le glucose est transformé en glucose-6-phosphate qui est à l'origine de deux voies métaboliques, la glycolyse qui aboutit à la production de pyruvate et la voie des pentoses phosphates dont l'un des produits est le NADPH (réduit). Le pyruvate a un rôle anti-oxydant et le NADPH sert de réducteur au niveau de la navette GSSG/GSH qui sert elle même à la réduction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O.

Les ROS produits par les NAD(P)H oxydases (NOX) sont impliqués dans la commutation angiogénique dans des tissus non tumoraux (Gorlach *et al.* 2001; Arbiser *et al.* 2002) et probablement dans les tumeurs. Les NOX induisent la prolifération de cellules tumorales par l'intermédiaire du facteur de transcription régulateur du statut redox NF-κB. Ce facteur régule l'expression de différents gènes impliqués dans l'apoptose, la prolifération cellulaire, les métastases et l'angiogenèse (Brar *et al.* 2003). NF-κB est constitutivement exprimé dans de nombreuses tumeurs.

Les effets des ROS sur l'angiogenèse peuvent être également attribués à la surexpression des ARNm et des protéines du VEGF-A (Kuroki *et al.* 1996; Schafer *et al.* 2003). Les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 activés par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reconnaissent des séquences de types GC sur le promoteur du VEGF-A et activent sa transcription. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induit également, via NF-κB, l'expression de l'interleukine 8 (Il-8) qui contribue au phénotype angiogénique par une activité sur les cellules endothéliales (Shono *et al.* 1996).

Les ROS contribuent à bloquer l'activité des PHDs et à stabiliser HIF-1α (Brunelle *et al.* 2005; Guzy *et al.* 2005; Mansfield *et al.* 2005) (figure 17). Cette stabilisation de HIF par les ROS peut également s'effectuer par l'intermédiaire des voies de signalisation Shc-Ras, p38 MAPK, PI3K et p42/44 MAPK (Richard *et al.* 1999; Gorlach *et al.* 2001; Abe and Berk 2002; Schafer *et al.* 2003).



**Figure 18 : Mécanismes contribuant à l'induction de l'angiogénèse par les stress oxydants.**

TCA : cycle de Krebs, PP : voie des pentoses phosphates, GR : glutathione réductase, GPX : glutathione peroxydase, Trx : thioredoxine, (?) : réduction ou oxydation directe ou action de Ref-1 ou de la thioredoxine.

(D'après Spitz *et al*, 2000)

Les stress oxydants vont également intervenir dans l'induction de l'angiogenèse en modulant l'activité de HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  principalement par l'intermédiaire de résidus cystéines sensibles à l'oxydation (figure 18). En raison de la présence d'une cystéine (C25) dans la région bHLH de HIF-2 $\alpha$ , remplacée par une sérine (S28) sur HIF-1 $\alpha$ , ces deux protéines sont soumises à des mécanismes de contrôle redox distincts pour leur fixation à l'ADN (Lando *et al.* 2000). Un autre résidu cystéine conservé dans les domaines d'activation situés en C-terminal de HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  est impliqué dans les interactions avec p300/CBP (Ema *et al.* 1999). L'état d'oxydation de ces cystéines et donc la fixation de HIF-2 à l'ADN et l'activité de HIF-1 et HIF-2 sont régulés par l'activité du facteur redox 1 (Ref-1) (figures 17 & 18). Ref-1 est une protéine nucléaire qui possède deux activités distinctes : une activité réductrice N-terminale agissant sur les cystéines oxydées, et une activité de réparation de l'ADN C-terminale (Xanthoudakis *et al.* 1994). Ref-1 module également l'activité de fixation à l'ADN d'autres facteurs de transcription tels que fos, jun, NF- $\kappa$ B, Myb (Xanthoudakis and Curran 1992) et p53 (Jayaraman *et al.* 1997). Ref-1 intervient également dans l'induction de l'angiogenèse en modulant l'activité des protéines kinases ERK1/2, JNK et PKC et des proto-oncogènes (Raf, Ras et c-Myc) (Spitz *et al.* 2000).

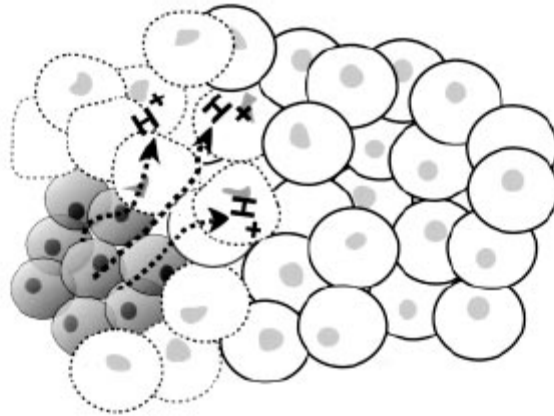
Une autre protéine redox cytoplasmique, la thioredoxine (Trx), induite en hypoxie, active les voies de signalisation dépendantes de HIF par des mécanismes semblables à Ref-1 (Ema *et al.* 1999). La thioredoxine est surexprimée dans plusieurs tumeurs humaines et peut contribuer ainsi à la régulation de l'activité transcriptionnelle des facteurs HIFs, c-Myc ou Ap-1 pour l'expression du VEGF-A et à l'activation de l'angiogenèse tumorale (Ema *et al.* 1999; Spitz *et al.* 2000; Welsh *et al.* 2002).

## **8. L'acidose tumorale**

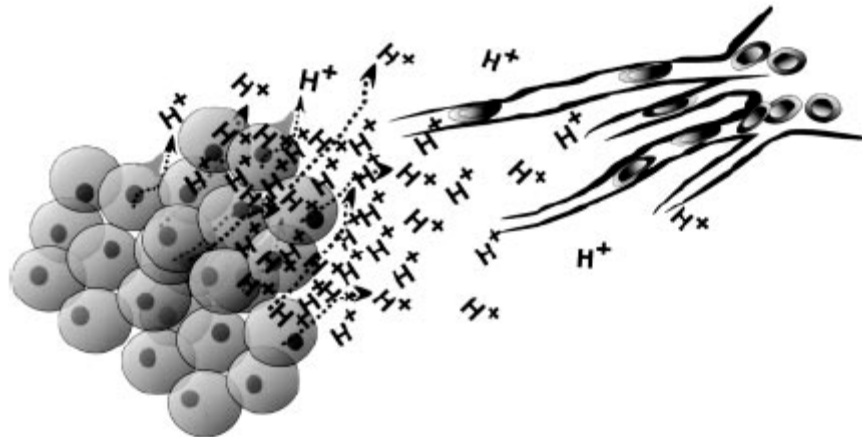
L'acidification de l'environnement tumoral est une conséquence directe du manque de perfusion sanguine et de l'absence de l'évacuation des déchets du métabolisme cellulaire. Cette acidose est impliquée dans l'acquisition d'un phénotype tumoral : elle augmente le taux de mutations (Morita *et al.* 1992) et le pouvoir invasif (Martinez-Zaguilan *et al.* 1996). L'acidose tumorale est une conséquence de l'ischémie et de la croissance tumorale et elle participe à la progression d'une tumeur bénigne en une tumeur maligne et métastatique (Gatenby and Gawlinski 2003; Gatenby and Gillies 2004).

Une augmentation constitutive de la glycolyse aboutit à une forte acidification de l'environnement tumoral qui provient de la surproduction d'acide lactique, de pyruvate, de

**A**



**B**



**Figure 19 : Modèle d'invasion tumorale induite par le pH.**

(A) La diminution du pH dans l'espace extracellulaire tumoral fait suite à l'acquisition d'un métabolisme hyper-glycolytique et provoque l'apparition d'un gradient de concentration en protons allant de la tumeur (cellules foncées) vers les tissus normaux (cellules claires). Cette diminution de pH des zones périphériques tumorales va entraîner la mort des cellules normales. (B) Les cellules tumorales prolifèrent. La diffusion de protons va induire la dégradation de la matrice extracellulaire et l'induction de l'angiogenèse.

(D'après Gatenby and Gawlinski 2003)

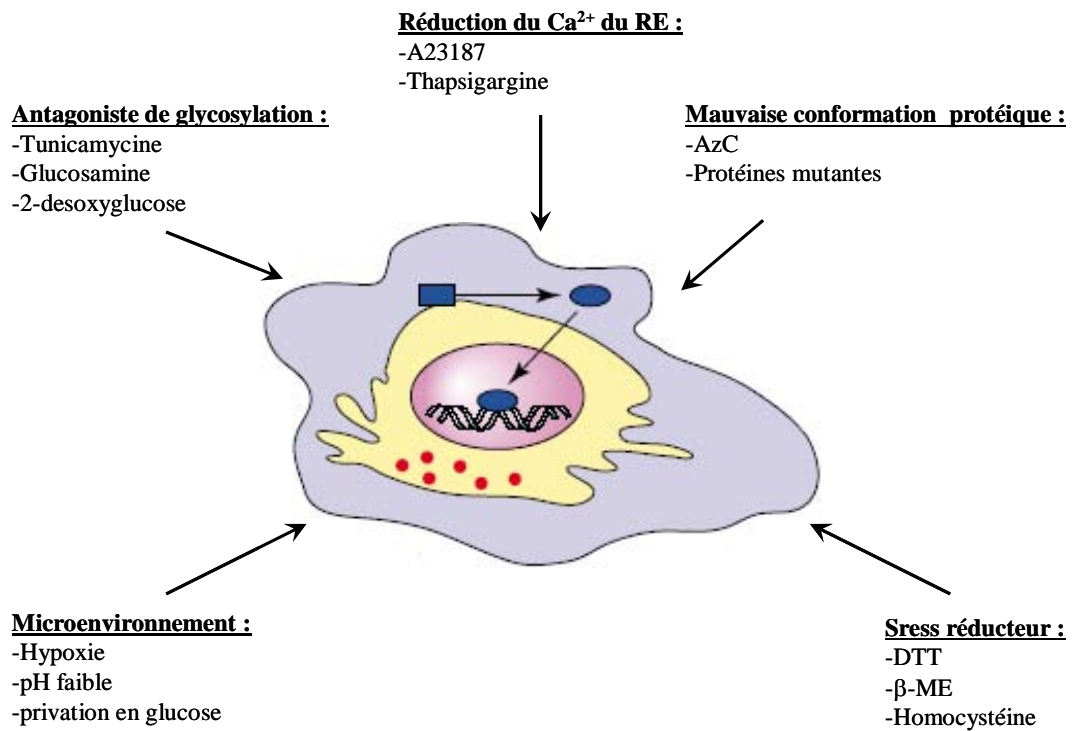
CO<sub>2</sub> et de protons (Gatenby and Gillies 2004). Plusieurs études ont montré que le pH extracellulaire (pHe) de tumeurs humaines et animales est acide et peut atteindre des valeurs allant jusqu'à 6,0 (Fukumura *et al.* 2001; Gatenby and Gawlinski 2003). Le pH intracellulaire (pHi) de cellules tumorales est identique à celui de cellules normales (Griffiths 1991). Le pHi est maintenu par de multiples transporteurs de protons (Ober and Pardee 1987; Lee, A. H. and Tannock 1998), par des échangeurs Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (McLean *et al.* 2000) et des pompes H<sup>+</sup>-ATPases vacuolaires (Martinez-Zaguilan *et al.* 1993) qui sont tous surexprimés dans les cancers (Gottlieb *et al.* 1995).

L'exposition prolongée de cellules normales à un environnement acide conduit à une mort cellulaire par nécrose ou apoptose à travers les voies dépendantes de p53 et de la caspase-3 (Park, H. J. *et al.* 1999; Williams *et al.* 1999). Cependant les cellules tumorales sont relativement résistantes au pHe acide. Cette résistance est en partie due à des mutations de p53 (Hainaut and Hollstein 2000) ou des voies métaboliques menant à l'apoptose. Les cellules tumorales ont une croissance optimale à des pH légèrement acide (pH 6,6 à 6,8) (Casciari *et al.* 1992).

Le phénotype glycolytique tumoral accru et la sécrétion de divers composés acides changent le microenvironnement en réduisant sensiblement le pHe. Les protons produits par la tumeur diffusent et forment un gradient de concentration dans les tissus normaux adjacents. Cette acidification de l'environnement mène à la destruction des tissus sains et de la matrice extracellulaire (Gatenby and Gawlinski 2003). Les cellules tumorales dont la croissance est favorisée dans ces conditions vont alors pouvoir proliférer et envahir l'espace libéré par les cellules normales avec lesquelles elles étaient en concurrence pour l'espace et les nutriments (Gatenby and Gillies 2004) (figure 19).

Différentes études ont montré que l'acidité peut induire l'angiogenèse (D'Arcangelo *et al.* 2000) à travers l'expression de facteurs comme le VEGF-A (Fukumura *et al.* 2001; Shi, Q. *et al.* 2001a) et Il8 (Shi, Q. *et al.* 2001b) mais également à travers la dégradation de la matrice extracellulaire par l'action d'enzymes protéolytiques comme la cathepsine B (Rozhin *et al.* 1994). Un pH acide active les facteurs de transcription Ap-1 et NF-κB, impliqués dans l'expression du VEGF-A et d'Il-8 dans ces conditions (Huang, S. *et al.* 2000; Xu and Fidler 2000; Shi, Q. *et al.* 2001b).

Dans différentes lignées cellulaires tumorales, un pHe acide induit une surexpression du VEGF-A par une voie de signalisation distincte de celle de l'hypoxie et donc indépendante de HIF (Huang, S. *et al.* 2000; Xu and Fidler 2000; Fukumura *et al.* 2001; Shi, Q. *et al.* 2001b).



**Figure 20 : Résumé schématique des principaux inducteurs du stress du réticulum endoplasmique.**

A23187: ionophore Ca<sup>2+</sup> ; Acide azetidino-2-carboxylique (AzC) ; β-mercaptoéthanol (β-ME) et dithiothréitol (DTT).

(D'après Lee, 2001)

## Chapitre II : Le réticulum endoplasmique, l'ischémie tumorale et la réponse UPR

Le réticulum endoplasmique (RE) est le premier compartiment intracellulaire traversé par la voie de sécrétion des protéines. Il est associé à la synthèse et responsable de certaines modifications post-traductionnelles et de l'adressage des protéines sécrétées et des protéines trans-membranaires. A l'intérieur du RE, les protéines sont repliées suivant leurs conformations natives, de plus faible énergie, et subissent une multitude de modifications incluant la glycosylation et la formation de ponts disulfures intra et intermoléculaires (Hubbard and Ivatt 1981; Kornfeld and Kornfeld 1985; Fewell *et al.* 2001). Dans le RE le repliement des protéines a lieu dans une solution protéique dense (estimée à ~100 mg/ml) et complexe qui favorise l'agrégation protéique et rend l'assemblage de sous-unités difficile (Stevens and Argon 1999). Toutes les réactions qui sont directement ou indirectement liées à la bonne conformation des protéines dans le RE nécessitent la présence d'ATP dans la lumière de cet organite (Stevens and Argon 1999; Dimcheff *et al.* 2003). Le RE est également le site de synthèse des stérols et des lipides (Cox *et al.* 1997).

Dans diverses conditions énumérées en figure 20, des protéines de conformations anormales s'accumulent dans le RE, et conduisent à une réponse cellulaire définie comme le **stress du Réticulum Endoplasmique** (Lee, A. S. 2001). Les cellules eucaryotes soumises à ce stress développent la réponse aux protéines mal repliées ou réponse UPR (« **unfolded protein response** ») qui possède deux composantes. La première consiste à activer la transcription de gènes impliqués dans le repliement des protéines et dans l'activation du trafic intracellulaire au sein de la voie sécrétrice et à dégrader plus activement les protéines incorrectement repliées. La seconde composante de la réponse UPR est une répression rapide et intense de la synthèse protéique qui limite l'afflux de nouvelles protéines dans le RE et évite ainsi la surcharge de cet organite (Kaufman *et al.* 2002; Schroder and Kaufman 2005b). Lorsque ces deux composantes ne peuvent remédier à une situation de stress trop intense ou de trop longue durée, la réponse UPR aboutit à l'apoptose (Breckenridge *et al.* 2003).

## Partie I : Origine du stress du réticulum endoplasmique

La lumière du RE contient une concentration importante en calcium (~5 mM contre 0.1  $\mu$ M dans le cytosol), un fort potentiel oxydant et se caractérise par la présence d'une machinerie moléculaire réalisant les N-glycosylations sur les asparagines polypeptidiques (Hwang *et al.* 1992; Orrenius *et al.* 2003). Ces différentes caractéristiques nécessitent la présence de transporteurs d'ions, d'enzymes et de protéines chaperonnes. Des altérations de ces caractéristiques vont être à l'origine de l'accumulation de protéines mal conformées et de l'induction d'un stress du RE.

### 1. Environnement redox

Un événement essentiel conduisant au repliement correct des protéines dans le RE est la formation de ponts disulfures. Les résidus cystéines des protéines synthétisées tendent naturellement à s'oxyder de par le potentiel redox de ce compartiment (Hwang *et al.* 1992). Le RE possède une enzyme qui catalyse la formation des ponts disulfures, la protéine disulfure isomérase (PDI). La PDI permet également la réduction et le réarrangement de ponts disulfures incorrects. En effet, si le pont disulfure formé est illégitime, cette enzymes peut immédiatement se fixer sur (ou ne pas se détacher de) son substrat et modifier la liaison par une réaction d'isomérisation (Wilkinson and Gilbert 2004). La PDI est réduite lors de la formation de ponts disulfures. La protéine ERO1 (« ER oxydation 1 ») permet de réoxyder la PDI, transfère les électrons directement à l'oxygène, par une réaction flavine dépendante, et produit ainsi des ROS (radicaux libres oxygénés) et du glutathion oxydé (GSSG) (Frand and Kaiser 1998; Tu *et al.* 2000). Cette accumulation de ROS et de glutathion oxydé peut constituer une source de stress oxydant.

Le glutathion (tripeptide possédant un groupement thiol) sert de tampon redox dans les cellules eucaryotes et est le premier réducteur cellulaire de ROS (Lu 1999). Il existe sous forme réduite (GSH) ou oxydé (GSSG). Lors de la formation de ponts disulfures, on observe une augmentation de la [GSSG] dans le RE résultant de la réduction de ponts disulfures incorrects des protéines par le GSH et la PDI (Tu *et al.* 2000). Le ratio entre le [GSH] et le [GSSG] est de 3 dans le RE et de 100 dans le cytoplasme (Hwang *et al.* 1992). Le faible rapport [GSH/GSSG] dans le RE explique la formation rapide de ponts disulfures des



protéines tout en maintenant la possibilité de réduire et de réarranger les ponts disulfures incorrects (Tu and Weissman 2004).

Tout stress cellulaire conduisant à déplacer le ratio [GSH/GSSG] ou à altérer la formation de ponts disulfures dans le RE provoque un stress du RE.

## **2. Influence du calcium**

Le RE est le principal site de stockage du calcium (~5 mM contre ~0,1 μM dans le cytosol) (Orrenius *et al.* 2003). La concentration de calcium intra lumenale varie rapidement et fréquemment quand le pool de calcium est utilisé lors de la signalisation cellulaire (Webb and Miller 2003). De plus, la majorité des protéines chaperonnes résidentes du RE sont dépendantes du calcium. Ces variations de concentration affectent donc l'activité de ces protéines (Zhang, J. X. *et al.* 1997) et peuvent être à l'origine d'un stress du RE.

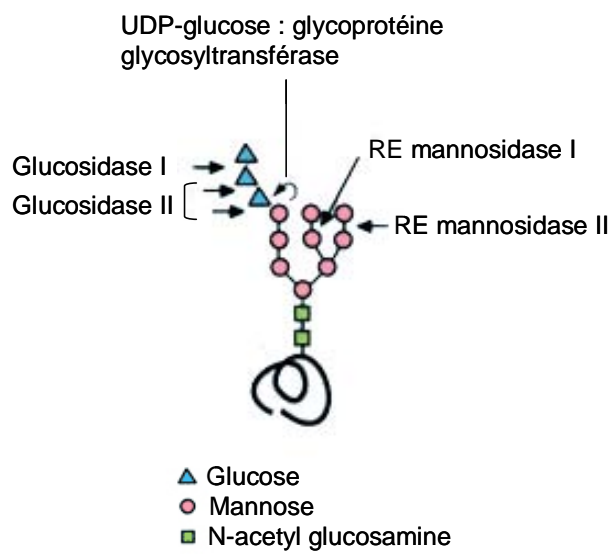
## **3. Glycosylation**

La glycosylation a plusieurs rôles dans le repliement des protéines. Par leur nature hydrophile, les sucres augmentent la solubilité des glycoprotéines. Ils rendent également le processus de translocation vers le cytoplasme irréversible (Wormald and Dwek 1999). Ces oligosaccharides interviennent également dans le bon repliement des protéines sur lesquelles ils sont fixés et empêchent leur agrégation (Stevens and Argon 1999).

La glycosylation est initiée par la fixation d'oligosaccharides sur le groupement NH<sub>2</sub> des chaînes latérales des résidus asparagines accessibles des protéines en cours de synthèse (Hubbard and Ivatt 1981; Kornfeld and Kornfeld 1985) (figure 21). Une succession de digestions enzymatiques des résidus de ces chaînes hydrocarbonées va ensuite permettre un contrôle de la bonne conformation ainsi que l'adressage des glycoprotéines (*cf. page 71* et figures 21 & 22). Une altération de la glycosylation des protéines dans le RE est à l'origine de l'induction d'un stress.

## **4. Machinerie de remodelage protéique**

Les caractéristiques particulières du RE font que la conformation protéique nécessite l'intervention de différentes protéines formant une machinerie de remodelage : les chaperonnes. Les protéines chaperonnes facilitent la bonne conformation protéique. Elles fonctionnent en recouvrant les régions hydrophobes exposées des protéines incomplètement



**Figure 21 : Structure d'une glycosylation et site d'action des enzymes catalysant ces modifications au sein du RE.**

*(D'après Hellenius and Aebi 2001)*

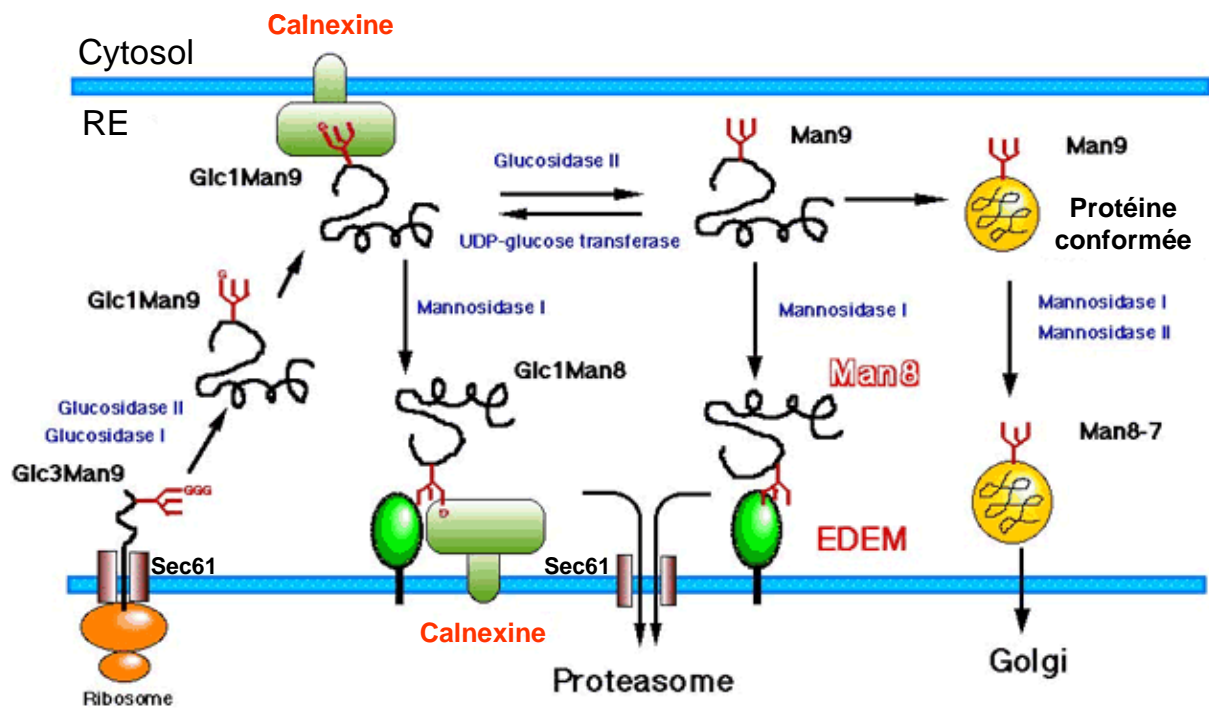
repliées. Ces protéines nécessitent l'hydrolyse d'ATP pour se lier et se libérer des protéines auxquelles elles sont fixées. Les chaperonnes agissent en empêchant l'agrégation des protéines mal conformées et en permettant leur repliement correct (Schroder and Kaufman 2005a). Nous en citerons ici quelques unes appartenant à diverses familles essentielles.

- La protéine chaperonne BiP/GRP78 (« glucose regulated protein 78 ») (BiP), membre le plus important de la famille des HSP70 (« heat shock protein 70 ») intervient exclusivement dans le RE. Elle se fixe aux premiers intermédiaires de conformation d'une grande diversité de protéines grâce à sa capacité de se fixer à de courts peptides formant des feuillettes  $\beta$  (Melnick *et al.* 1994; Gething *et al.* 1995). L'affinité de BiP pour ces peptides est faible (de 1 à 100 mM) ce qui ne défavorise pas les interactions entre les différents feuillettes  $\beta$  et permet au final un repliement structural correct.
- La protéine chaperonne GRP94 est la seule représentante de la famille des HSP90 connue dans le RE. Elle se fixe sur d'autres structures protéiques que celles reconnues par BiP, en particulier sur des intermédiaires de conformation plus tardifs (Melnick *et al.* 1994).
- Le RE possède un type unique de chaperonne aux propriétés de lectines et qui se fixe sur les glycoprotéines. Deux chaperonnes de ce type sont connues : la calréticuline et la calnexine (Hebert *et al.* 1995). Elles se fixent aux protéines en cours de synthèse dès leur translocation dans le RE et après leur glycosylation (Helenius and Aebi 2004). Elles reconnaissent des motifs polysaccharidiques ainsi que certaines séquences protéiques hydrophobes de protéines mal repliées.
- Les chaperonnes de type foldases sont des enzymes qui catalysent les étapes de remodelage protéique. Il en existe différentes sous classes parmi lesquelles, la PDI et des peptidyl isomérases. La PDI, en plus de son activité enzymatique, peut se comporter comme une chaperonne de manière dépendante ou non des ponts disulfures (Noiva 1999).

Les chaperonnes du RE sont capables d'une grande efficacité de remodelage des protéines en fonctionnant de façon synergique. Par exemple, la formation de complexes entre les substrats, BiP et GRP94 ou BiP et la calnexine a été décrite (Melnick *et al.* 1994).

## **5. Mécanismes de remodelage et de contrôle de la qualité du repliement protéique**

Le RE possède une machinerie de contrôle de la qualité des protéines synthétisées qui discrimine les protéines correctement repliées des protéines mal conformées et permet à ces dernières d'acquiescer une conformation ou d'être dégradées. Les voies qui permettent la



**Figure 22 : Schéma général du système de contrôle de qualité et de dégradation des protéines.**

(D'après Hosokawa N et Nagata K, [www.glycoforum.gr.jp](http://www.glycoforum.gr.jp))

destruction des protéines anormales sont appelées ERAD (« ER associated degradation ») (Schroder and Kaufman 2005a). La machinerie cellulaire de contrôle de la qualité protéique comporte deux groupes de protéines : le premier comprend les protéines chaperonnes et le second est représenté par des enzymes de modification des glycanes (figure 21).

La famille des chaperonnes comporte deux classes. D'une part, BiP et la GRP94 se fixent sur les protéines mal conformées (Melnick *et al.* 1994), participent à leur dégradation (Brodsky *et al.* 1999; Molinari and Helenius 2000) et interviennent dans l'activation des voies de transduction du signal UPR (Schroder and Kaufman 2005a). D'autre part, la calnexine et la calréticuline se fixent sur toutes les protéines néo-synthétisées N-glycosylées (Jakob *et al.* 1998) (figure 22) ce qui permet aux protéines non conformées de résider plus longtemps dans le RE et d'être prises en charge par la machinerie de conformation des protéines (Helenius and Aebi 2004). Une succession de réactions enzymatiques de digestion et d'ajout de sucres sur ces chaînes hydrocarbonées permet un contrôle de la conformation de ces protéines (figure 22). Les glycoprotéines correctement repliées sont transportées vers l'appareil de Golgi.

Si la structure correcte de la glycoprotéine ne peut pas être obtenue et maintenue, cette protéine est reconnue par la protéine membranaire EDEM (« ER degradation-enhancing-mannosidase-like protein ») et expulsée vers le cytosol où elle est poly-ubiquitinilée et dégradée par le protéasome (Molinari *et al.* 2003; Oda *et al.* 2003; Spiro 2004). Récemment il a été montré qu'une autre protéine membranaire du RE, HERP (« homocysteine responsive protein ») est impliquée dans l'ERAD. En effet, la présence de deux domaines cytoplasmiques d'ubiquitylation de type 2 dans sa partie N-terminale laisse penser que HERP a un rôle dans la dégradation des protéines et notamment dans le recrutement de la sous unité 26S du protéasome au niveau de la membrane du RE (van Laar *et al.* 2001).

Les ponts disulfures des protéines doivent être préalablement réduits pour faciliter leurs transports vers le cytoplasme à travers le complexe protéique Sec61p (Menetret *et al.* 2000; Fagioli *et al.* 2001). Ainsi, une oxydation excessive du RE ou toute altération des processus de conformation ou de l'ERAD va provoquer l'accumulation de protéines mal conformées et induire un stress du RE.



## Partie II : la réponse UPR

L'accumulation de protéines mal conformées dans le RE peut induire la transduction du signal UPR dont les composants ont d'abord été caractérisés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* au début des années 90. La protéine kinase transmembranaire IRE1 (« inositol requiring 1 ») du RE est essentielle pour l'initiation la signalisation UPR et pour la survie cellulaire lors d'un stress du RE (Cox *et al.* 1993; Mori *et al.* 1993). Il a ensuite été montré que toutes les cellules eucaryotes ont conservé cette propriété de transduction du signal UPR par l'intermédiaire d'IRE1 mais que deux transducteurs supplémentaires permettent de générer une diversité de réponse liée à ce stress : PERK (« double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase ») et le facteur de transcription ATF6 (« activating transcription factor 6 ») (Schroder and Kaufman 2005a).

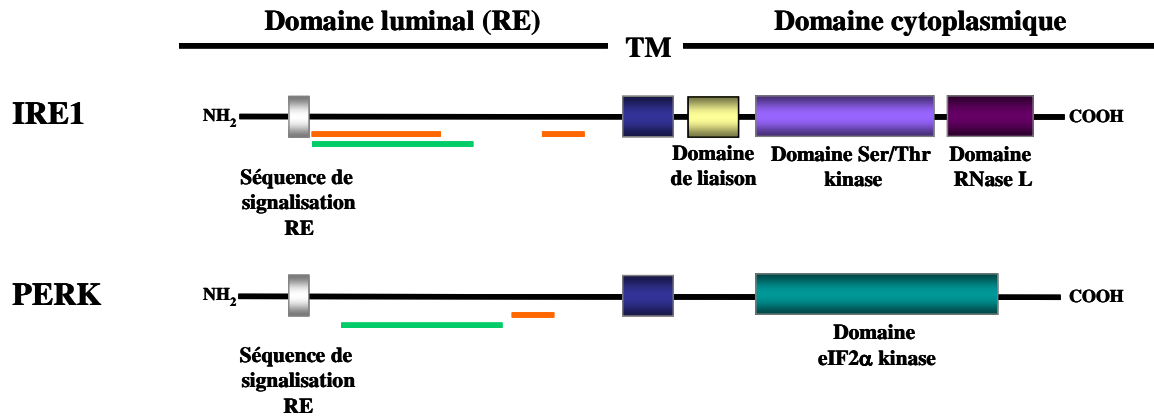
La réponse UPR contrôle la dégradation des protéines du RE (ERAD), le maintien de l'homéostasie du calcium et la biosynthèse des protéines et des lipides (Schroder and Kaufman 2005b). Elle participe également à la régulation de processus physiologiques comme la synthèse de pro-insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques (Scheuner *et al.* 2001), la différenciation des plasmocytes et la production d'immunoglobuline (Iwakoshi *et al.* 2003). La réponse UPR a également un rôle lors du développement embryonnaire. En effet, des embryons de souris déficients pour IRE1 et XBP1 ont un phénotype létal (Reimold *et al.* 1996; Iwakoshi *et al.* 2003). Des mutations de PERK et eIF2 causent des défauts dans les organes de sécrétion incluant des dysfonctionnements du foie, des déficiences endocrines et exocrines pancréatiques ainsi que des défauts dans la structure des os (Scheuner *et al.* 2001; Harding *et al.* 2002; Zhang, P. *et al.* 2002).

Cependant, des altérations des différentes composantes de la réponse UPR sont à l'origine de diverses pathologies incluant l'hémophilie A, le diabète insipide ainsi que certaines maladies neuro-dégénératives (Schroder and Kaufman 2005a). Enfin, l'activation d'une réponse UPR a été observée dans de nombreux cancers (Ma and Hendershot 2004).

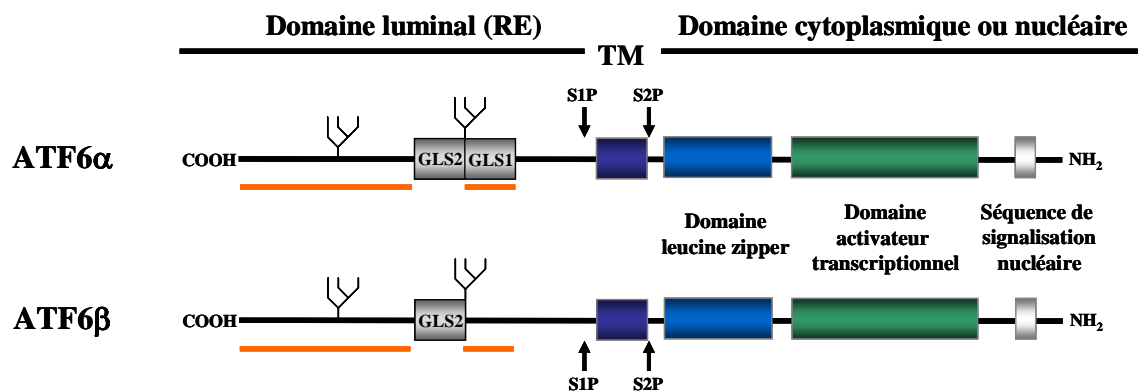
*L'implication de la réponse UPR dans le cancer et dans la résistance à l'ischémie tumorale est développée dans la partie II de ce chapitre.*

Une caractéristique commune aux protéines ATF6, IRE1 et PERK est qu'elles possèdent un ligand soluble, BiP dont la liaison conditionne leur état d'activation.

A



B



**Figure 23 : Structures principales des protéines transductrices du signal UPR.**

La localisation cellulaire des différents domaines ainsi que la présence de domaines transmembranaires (TM) sont indiqués. Les barres oranges représentent les domaines de liaison avec la protéine chaperonne BiP. (A) Protéines membranaires du RE, IRE1 et PERK. Les barres vertes représentent les régions suffisantes pour leur dimérisation et la transduction du signal. (B) Isoformes de la protéine transmembranaire du RE, ATF6α et ATF6β. Les séquences de localisation Golgienne (GLS1 et GLS2) sont représentées. Les flèches noires représentent les sites de coupure protéasiques S1P et S2P (protéase spécifique des sites 1 et 2). (Adapté de Schroder and Kaufman 2005a)



## **1. Structure des transducteurs proximaux de la réponse UPR**

### **1.1. IRE1**

IRE1 est une protéine transmembranaire du RE, de 110 kDa, contenant dans sa partie N-terminale luminale une séquence signal putative de localisation dans le RE, un domaine de dimérisation et un domaine de liaison à la chaperonne BiP. La partie C-terminale cytoplasmique d'IRE1 possède un domaine sérine/thréonine kinase et un domaine endoribonucléasique analogue à la région catalytique de la RNase L (figure 23A). La protéine IRE1 contient également un site de glycosylation luminal n'intervenant pas dans son activité biologique (Liu, C. Y. *et al.* 2000). Chez les mammifères, contrairement à la levure, il existe deux isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  de la protéine IRE1, la forme  $\beta$  étant exclusivement exprimée dans le tissu épithélial intestinal (Tirasophon *et al.* 1998; Wang, X. Z. *et al.* 1998).

### **1.2. PERK**

PERK est une protéine transmembranaire du RE, de 125 kDa, contenant dans sa partie N-terminale luminale une séquence signal putative de localisation dans le RE, un domaine de dimérisation et un domaine de liaison à la chaperonne BiP. Bien que les domaines luminaux de IRE1 et PERK montrent un faible taux d'homologie, des études révèlent qu'ils sont interchangeable et que leurs fonctions ont été conservées au cours de l'évolution (Liu, C. Y. *et al.* 2000). La partie cytoplasmique C-terminale présente un domaine protéine kinase capable de phosphoryler le facteur général d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  (Shi, Y. *et al.* 1999) (figure 23A).

### **1.3. ATF6**

ATF6 est une protéine transmembranaire du RE orientée de manière opposée à IRE1 et PERK. La partie luminale, C-terminale, présente deux séquences de localisation golgienne (GLS) agissant indépendamment du stress du RE (Shen, J. *et al.* 2002) ainsi qu'un domaine de fixation à la protéine BiP. Il n'existe aucune homologie de séquence entre le domaine luminal d'ATF6 et ceux d'IRE1 et PERK. Chez les mammifères, il existe deux isoformes ATF6 $\alpha$  (90 kDa) et ATF6 $\beta$  (110 kDa) (figure 23B) (Haze *et al.* 2001) qui diffèrent notamment par la présence d'une ou de deux séquences GLS, respectivement. La partie N-terminale cytoplasmique de la protéine comprend un domaine d'activation de la transcription et un motif leucine-zipper. ATF6 possède également deux sites sensibles aux protéases S1P et S2P localisés à proximité immédiate du domaine transmembranaire du côté luminal et

cytoplasmique, respectivement. En condition de stress, l'action de S2P permet la libération de la partie cytosolique de 50 kDa agissant ensuite comme facteur de transcription (Haze *et al.* 1999; Ye *et al.* 2000).

## 2. La transduction du signal UPR

Dans la lumière du RE, les protéines incorrectement conformées forment des agrégats et induisent un signal UPR dont la transduction cytoplasmique se réalise par l'activation des protéines PERK, ATF6 et IRE1. L'activation de ce signal multiple nécessite la détection des protéines mal conformées. La chaperonne BiP, ligand des trois protéines de transduction, assure ce signal par un système d'échange à l'équilibre entre les protéines dénaturées et les protéines PERK, ATF6 et IRE1 (Schroder and Kaufman 2005a).

A l'état inactif, les protéines IRE1 et PERK sont associées à BiP au niveau de leurs domaines luminaux (Bertolotti *et al.* 2000; Okamura *et al.* 2000; Liu, C. Y. *et al.* 2003). A la suite d'un stress du RE, la quantité de protéines mal conformées augmente et la fixation compétitive de BiP sur ces protéines induit la dissociation de cette chaperonne de PERK/IRE1 et l'homodimérisation et activation par auto-phosphorylation de ces deux dimères (Bertolotti *et al.* 2000; Okamura *et al.* 2000). Lorsque la quantité de protéines mal conformées diminue dans le RE, BiP se retrouve libre et s'associe alors à nouveau avec PERK/IRE1 en bloquant leurs activités. Cet état d'échange à l'équilibre permet une réponse cellulaire dont l'intensité est adaptée à celle du stress subi.

Dans la protéine IRE1, les domaines de dimérisation et de liaison à BiP se recouvrent (figure 23A) (Liu, C. Y. *et al.* 2003). Ainsi, BiP maintient cette protéine inactive en empêchant son homodimérisation en absence de stress du RE. La protéine PERK possède des domaines de dimérisation et de liaison à BiP distincts (Ma, K. *et al.* 2002) (figure 23A). BiP bloque donc indirectement la dimérisation par encombrement stérique ou en provoquant un changement de conformation de la partie luminale de PERK.

L'activation d'ATF6 est également régulée par la chaperonne BiP (Shen, J. *et al.* 2002). En condition normale, la protéine BiP est associée à ATF6 au niveau des séquences GLS et la séquestre dans le RE. ATF6 est également retenue dans cet organite par interaction entre ses résidus glycosylés et la calréticuline (Hong *et al.* 2004). En condition de stress, la dissociation de BiP des séquences GLS conduit à la translocation d'ATF6 au niveau de

l'appareil de Golgi et à son activation par les protéases S1P et S2P (Chen, X. *et al.* 2002b; Shen, J. *et al.* 2002). Les protéines ATF6 néo-synthétisées en condition de stress du RE sont anormalement glycosylées ce qui empêche leur interaction avec la calréticuline et conduit à leur transfert vers le Golgi. Une protéine ATF6 mutée ne pouvant plus être glycosylée constitue un « meilleur » activateur transcriptionnel que la protéine sauvage (Hong *et al.* 2004), ce qui met en évidence l'intervention du cycle de la calréticuline dans l'activation de ce transducteur du signal UPR. Cependant, la glycosylation présente sur la partie luminale d'IRE1 n'est pas nécessaire à son activation (Liu, C. Y. *et al.* 2000).

L'augmentation de la complexité moléculaire dans le déclenchement de la signalisation UPR entre la levure (IRE1) et les mammifères (IRE1 $\alpha$  et  $\beta$ , ATF6 et PERK) a permis d'affiner et de générer une diversité de réponse liée au stress du RE. De plus, les différences observées dans les mécanismes d'activation d'ATF6, IRE1 et PERK suggèrent qu'il existe des réponses UPR distinctes selon l'état de conformation des protéines du RE et en fonction du stress subi. (Yoshida *et al.* 2003).

### **3. Voies de signalisation UPR**

Les protéines ATF6, IRE1 et PERK contrôlent les deux phases de régulation traductionnelles et transcriptionnelles de l'UPR (Kaufman 1999; Harding *et al.* 2000; Mori 2000) (figures 24 & 25). La première phase est l'atténuation de la traduction protéique par PERK et a pour but de limiter l'ajout de nouvelles protéines à l'intérieur du RE déjà saturé. Dans la deuxième phase, les protéines IRE1 et ATF6 déclenchent l'activation transcriptionnelle de gènes codant pour des chaperonnes et enzymes résidentes du RE ainsi que pour des composants des voies d'exportation et de dégradation protéique. La réponse UPR n'assiste pas seulement la cellule à répondre immédiatement à la présence de protéines mal conformées, mais la prépare également à subir de nouveaux stress du RE en modifiant à long terme ses programmes transcriptionnels (Mengesdorf *et al.* 2001). Enfin, les cellules subissant des dommages trop sévères seront éliminées par apoptose sous l'effet de PERK, IRE1 et ATF6 (*cf page 87*).

#### **3.1. Régulation de la traduction durant la réponse UPR**

Lors d'un stress du RE, la réponse cellulaire par l'activation de la protéine PERK induit une atténuation immédiate de la synthèse protéique par la phosphorylation d'eIF2 sur la

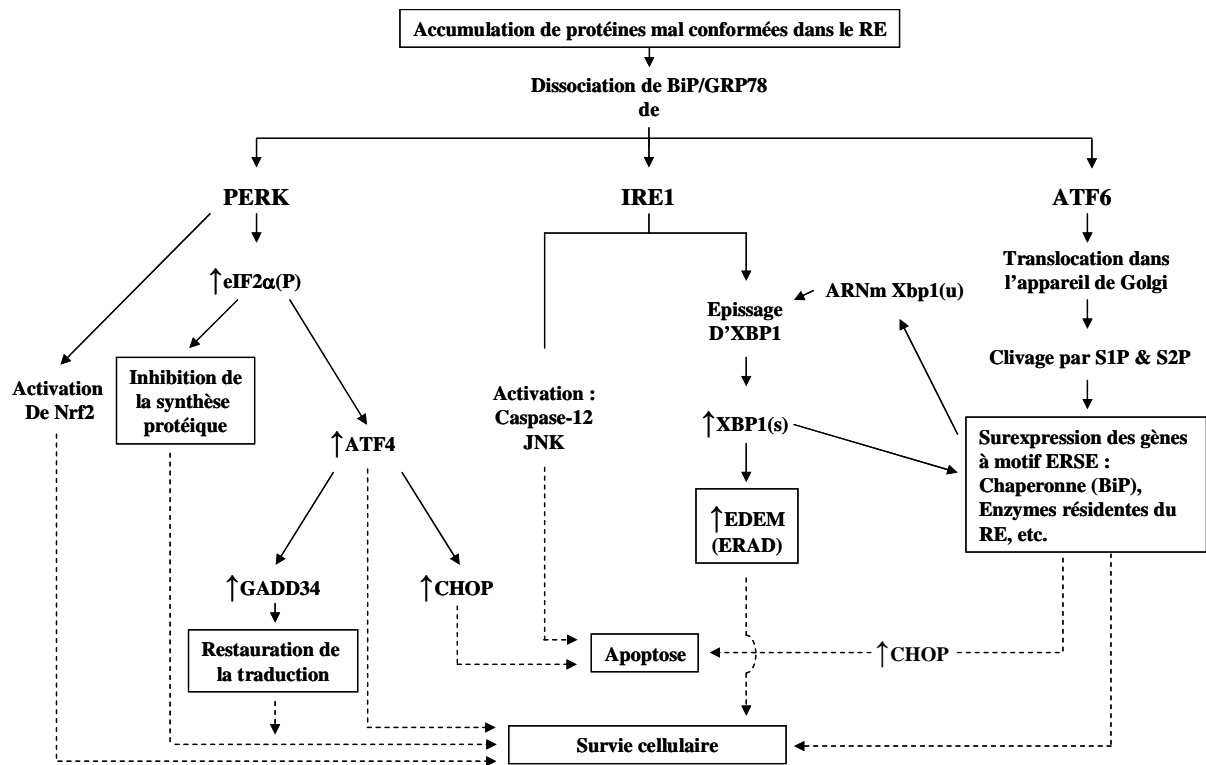


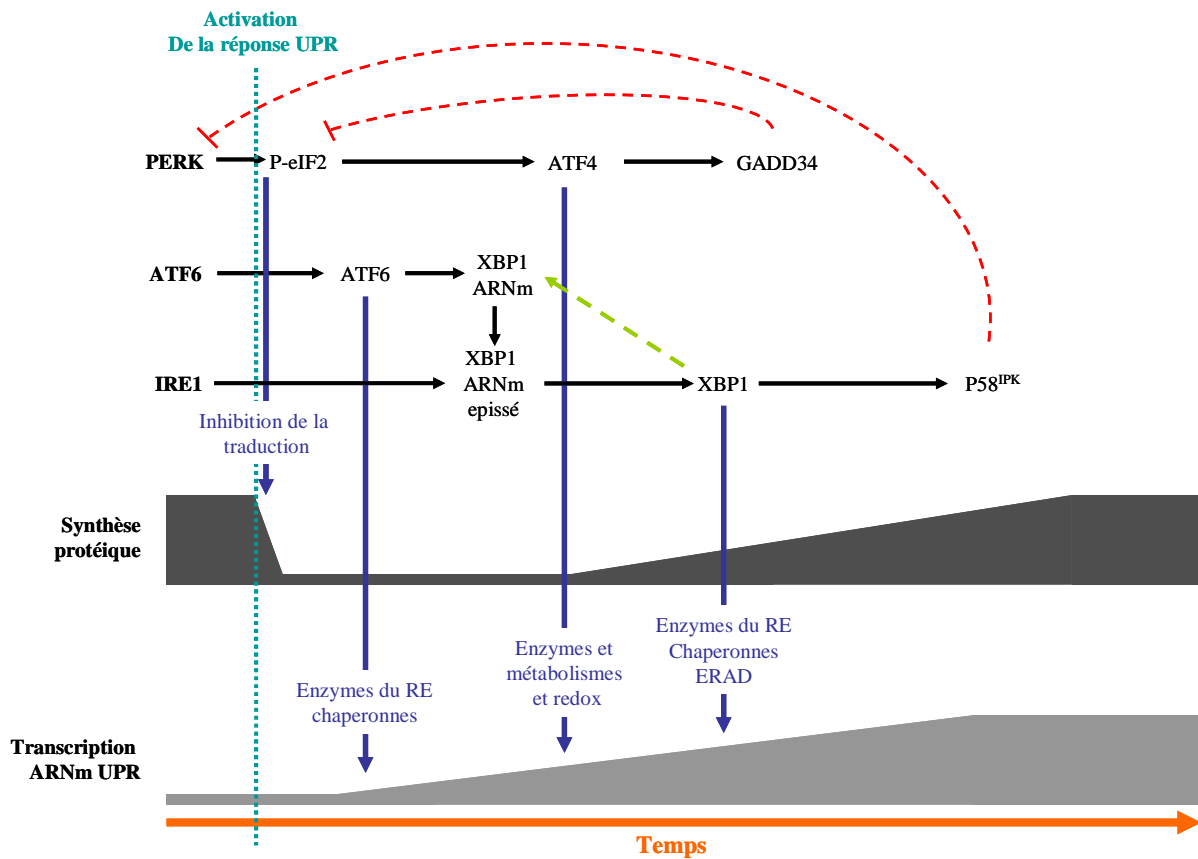
Figure 24 : Représentation schématique des voies de signalisation UPR dépendantes de IRE1, ATF6 et PERK.

sérine 51 de sa sous unité  $\alpha$  (Harding *et al.* 1999; Harding *et al.* 2001; Scheuner *et al.* 2001) (figure 25) et le blocage de son activité. Dans des cellules déficientes pour PERK, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et l'inhibition la synthèse des protéines sont en effet totalement absentes lors d'un stress du RE (Scheuner *et al.* 2001). Ces cellules ou des cellules présentant une mutation de la sérine 51 d'eIF2 $\alpha$  sont très sensibles au stress du RE montrant l'importance de cette voie de régulation sur la survie cellulaire.

L'atténuation globale de la synthèse protéique induit paradoxalement la traduction des ARNm du facteur de transcription ATF4 (Harding *et al.* 2000) (figure 24). Ces ARNm sont exprimés constitutivement et possèdent de petits ORFs dans leur extrémité 5'. Dans des conditions normales, ces uORFs dont la traduction est dépendante de la coiffe, induisent une répression de la traduction des ARNm d'ATF4. Lorsque eIF2 $\alpha$  est phosphorylé, ces uORFs sont non fonctionnels et ATF4 est traduit indépendamment de la coiffe (Hinnebusch 2000).

L'activation du facteur de transcription ATF4 induit l'expression de gènes intervenant dans la biosynthèse des acides aminés, dans la synthèse de glutathion ainsi que dans la résistance au stress oxydatif. Ceci constitue une boucle de contrôle visant à anticiper la perte d'acides aminés à travers la sécrétion protéique et permet l'adaptation et la survie au stress du RE (Scheuner *et al.* 2001) (figure 26). Parmi les gènes cibles d'ATF4 on trouve également CHOP (« C/EBP homologous protein ») (*cf. page 89*), GADD34 (« growth arrest DNA damage 34 ») et ATF3 (Harding *et al.* 2000; Ma, Y. *et al.* 2002; Jiang *et al.* 2004). L'activation d'ATF4 n'est pas suffisante pour induire l'expression de gènes spécifiques de l'UPR et d'autres facteurs induits en condition de stress du RE doivent intervenir et agir avec ATF4 (Harding *et al.* 2000).

La réponse UPR nécessite un système de contrôle permettant d'éviter qu'elle ne devienne hyperactive. Il existe deux boucles de rétrocontrôle de l'inhibition traductionnelle liée à la réponse UPR (figure 25). D'une part, la protéine GADD34 se fixe sur la sous-unité catalytique de la protéine phosphatase 1 (PP1 c) et induit la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Les ARNm de GADD34 sont très faiblement exprimés dans les cellules non stressées mais leur expression est fortement induite lors de stress du RE, grâce à la présence d'uORFs comme chez ATF4. La surexpression de GADD34 bloque à la fois les voies de signalisation traductionnelle et transcriptionnelle induites par PERK/eIF2 $\alpha$  (Schroder and Kaufman 2005a). D'autre part, PERK est inhibé par la fixation sur son domaine kinase de la protéine P58<sup>IPK</sup>, dont l'expression est sous la dépendance d'IRE1 (Yan *et al.* 2002; Lee, A. H. *et al.* 2003b).



**Figure 25 : Cinétique d'activation des différentes voies signalétiques de la réponse UPR.** Ce diagramme simplifié représente l'enchaînement des différentes étapes liées à l'UPR, sans échelle de temps précise, ainsi que les profils hypothétiques de synthèse protéique et de transcription de gènes cibles de l'UPR. Les flèches en pointillés représentent les boucles de contrôle positif (vert) et négatif (rouge).  
(D'après Rutkowski and Kaufman 2004 ; harding et al 2002)

D'autres stress que celui du RE, comme la carence en acides aminés, la présence d'ARN double brin et la déficience en hème, engendrent l'activation de kinases (GCN2, PKR et HRI) phosphorylant eIF2 $\alpha$ , inhibant la synthèse protéique et conduisant également à la traduction d'ATF4 (Fawcett *et al.* 1999; Ron 2002; Rutkowski and Kaufman 2003).

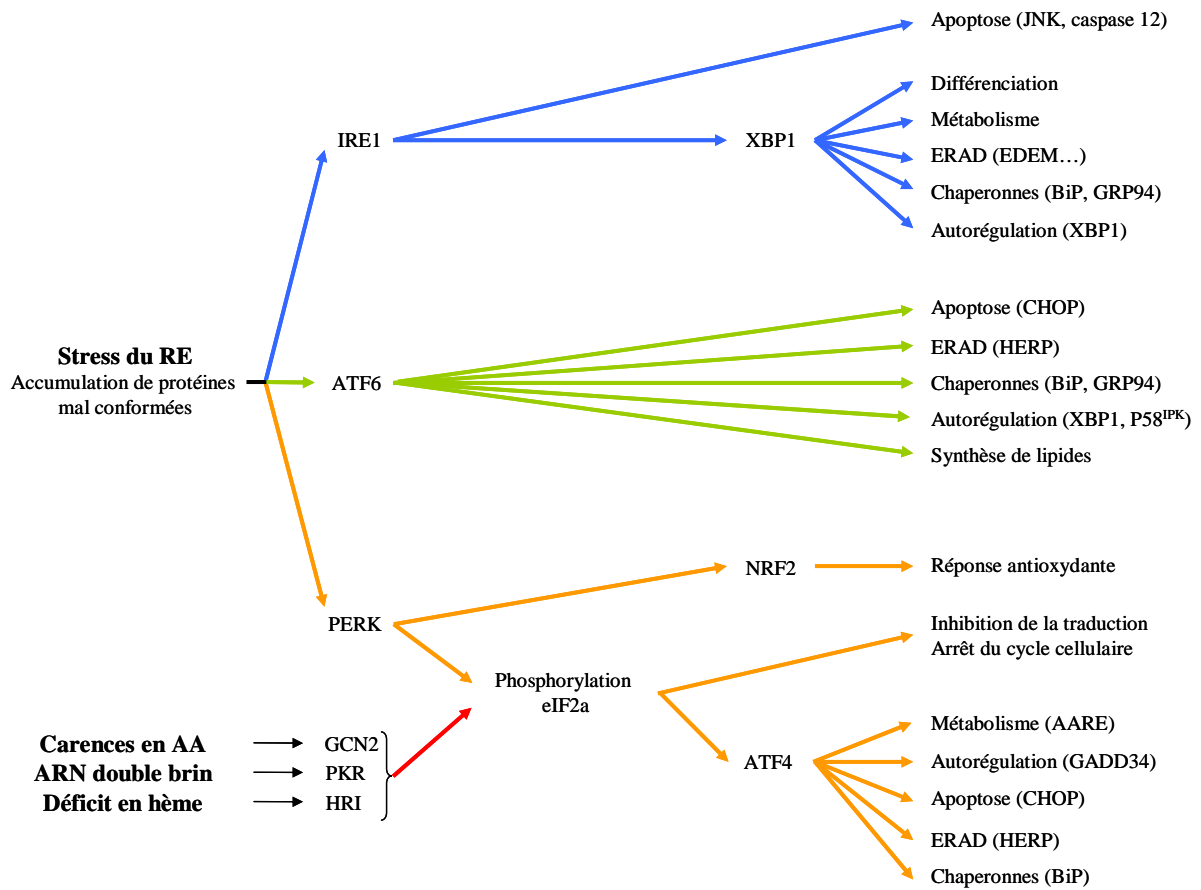
### **3.2. Régulation transcriptionnelle liée à la réponse UPR**

#### **3.2.1. Voie dépendante d'IRE1/XBP1**

La voie de signalisation UPR a pour la première fois été décrite chez la levure *S. cerevisiae*, lorsque Mori *et al.* (1992) ont identifié un élément cis-activateur de 22 pb, appelé élément de réponse UPR, UPRE, dans le promoteur du gène KAR2. Le criblage de mutations interférant avec l'activation du gène rapporteur UPRE::LACZ par un stress du RE, a permis d'identifier le gène IRE1 (Cox *et al.* 1993; Mori *et al.* 1993). Chez les mammifères, les deux homologues de IRE1  $\alpha$  et  $\beta$  sont suffisants pour induire la transcription de gènes rapporteurs sous le contrôle d'éléments de réponse au stress du RE (ERSE-I et ERSE-II). Ces séquences sont présentes sur la plupart des promoteurs des protéines chaperonnes résidentes du RE comme BiP et la PDI. De plus, l'activité endoribonucléasique d'IRE1 est indispensable à l'activation de gènes rapporteurs sous la dépendance d'UPRE (Lee, K. *et al.* 2002).

L'ARNm de XBP1 (« X-box binding protein 1») est le seul substrat connu de l'activité RNase d'IRE1 (Niwa *et al.* 2005). Lors de la réponse UPR, la dimérisation et l'autophosphorylation d'IRE1 ont pour effet d'activer son domaine endoribonucléasique cytoplasmique. Cette activation permet l'épissage non conventionnel de 26 nt de l'intron de l'ARNm de XBP1, générant ainsi un changement de cadre de lecture de la traduction et produisant une protéine codée par un second cadre de lecture (figure 24) (Yoshida *et al.* 2001a; Calfon *et al.* 2002; Lee, K. *et al.* 2002; Shen, J. *et al.* 2002). Chez les mammifères, cet épissage semble avoir lieu dans le noyau et IRE1 serait donc localisée sur la membrane interne nucléaire (Lee, K. *et al.* 2002). La protéine produite à partir de l'ARNm épissé de XBP1 (XBP1-s) contient un domaine leucine zipper dans sa partie C-terminale. XBP1-s est un facteur de transcription de la famille ATF/CREB et contrôle les promoteurs des gènes possédant une séquence CRE (élément de réponse à l'AMPc) (Clauss, I. M. *et al.* 1996), ERSE ou UPRE.

Il n'y a pas de différence de régulation de la traduction des ARNm XBP1-s et XBP1-u (forme non épissée). Il existe une compétition entre XBP1-s et XBP1-u pour leur dimérisation



**Figure 26 : Les différentes voies de signalisation issues du stress du RE.**

Les voies de signalisation de IRE1 (bleu), ATF6 (vert) et PERK (orange) sont présentées de manière non exhaustive.



avec des cofacteurs et XBP1-u peut donc inhiber la transcription induite par XBP1-s. Une dégradation rapide de XBP1-u par le protéasome est cependant observée pour l'activation de la réponse UPR à travers IRE1/XBP1-s (Lee, A. H. *et al.* 2003a). Cependant, dans des cellules HeLa, la dégradation de XBP1-s et XBP1-u répond à une même cinétique (Yoshida *et al.* 2001a).

Le premier gène décrit chez les mammifères comme cible spécifique de la voie IRE1/XBP1 via une séquence UPRE, code pour la protéine EDEM intervenant dans l'ERAD (Yoshida *et al.* 2003) (figure 24). Le promoteur du gène XBP1 contient lui-même une séquence UPRE, ce qui suggère une boucle de rétrocontrôle positif (Yoshida *et al.* 2001a) (figure 25). En effet, la protéine XBP1 peut activer sa propre transcription ce qui permet de maintenir les voies de signalisation de IRE1 après la répression de celles d'ATF6 et PERK.

Chez les mammifères, la protéine adaptatrice Nck-1 contenant un domaine homologue au domaine SH2/SH3 de Src interagit avec IRE1 et atténue la transduction du signal et l'activation de ERK (Nguyen *et al.* 2004). Nck-1 est également impliquée dans l'atténuation des signaux métaboliques issus de PERK et dans la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  à travers son interaction avec eIF2 $\beta$  (Kebache *et al.* 2002; Kebache *et al.* 2004).

### 3.2.2. Voie dépendante d'ATF6

Après la libération de BiP des séquences GLS d'ATF6, cette dernière est adressée dans l'appareil de Golgi et clivée par les protéases S1P et S2P. S1P coupe ATF6 au niveau luminal libérant la partie C-terminale et laissant sa partie N-terminale ancrée dans la membrane. S2P clive ATF6 au niveau transmembranaire libérant ainsi un domaine de 50 kDa correspondant à la partie N-terminale cytoplasmique et portant la fonction facteur de transcription (figure 24) (Haze *et al.* 1999; Ye *et al.* 2000). ATF6 migre alors vers le noyau et se fixe sur l'élément ATF/CRE (Wang, Y. *et al.* 2000) ou sur les éléments ERSE (Yoshida *et al.* 1998; Kokame *et al.* 2001). La fixation d'ATF6 sur ERSE-I nécessite la présence des facteurs CBF ou NF-Y (Yoshida *et al.* 2001b). La phosphorylation d'ATF6 par la protéine kinase de stress p38 permet d'augmenter son activité (Luo and Lee 2002). ATF6 induit la transcription des chaperonnes et enzymes résidentes du RE ainsi que de XBP1 (figure 24). Le facteur de transcription ATF6 se fixe préférentiellement sur les séquences ERSE, alors que XBP1 se fixe aussi bien sur les séquences ERSE qu'UPRE. Ceci suggère que la cellule induit ATF6 et la transcription de gènes cibles à travers la séquence ERSE immédiatement en réponse à un stress du réticulum, et active plus tardivement XBP1 pour la transcription de

gènes cibles non seulement à travers les séquences ERSE mais également à travers les séquences UPRE (figure 25).

### 3.2.3. Voie dépendante de PERK

Environ un tiers des gènes induits par la réponse UPR requièrent la phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  suggérant que la voie de signalisation dépendante de PERK intervient également à un niveau transcriptionnel dans la réponse au stress du RE (Scheuner *et al.* 2001). La traduction préférentielle du facteur de transcription ATF4 (figure 24) à travers la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par PERK aboutit à l'induction des gènes CHOP (*cf. page 89*) (Harding *et al.* 2000; Scheuner *et al.* 2001) et ATF3. L'expression du gène CHOP est bloquée dans des cellules PERK<sup>-/-</sup> ou des cellules dont le facteur eIF2 $\alpha$  n'est pas fonctionnel. La surexpression de ATF4 dans des cellules PERK<sup>-/-</sup> ne suffit pas pour restaurer l'expression de CHOP, ce qui suggère que ATF4 est nécessaire mais non suffisant pour l'induction de ce gène. Une autre cible de la voie PERK/eIF2 $\alpha$  pourrait donc être nécessaire pour réguler l'expression de CHOP (Ma, Y. *et al.* 2002). Cette expression peut également être induite par les facteurs de transcription ATF6 et XBP1 à travers la présence d'une séquence ERSE sur le promoteur de CHOP (Ma, Y. *et al.* 2002). CHOP est phosphorylé par la kinase de stress p38 ce qui a pour effet d'augmenter son activité (Wang, X. Z. and Ron 1996).

ATF3 est un facteur de transcription faiblement exprimé dans des cellules en condition normale et rapidement induit en réponse à divers stress cellulaires. Les transcrits multiples de ce facteur résultent d'un épissage alternatif (Pan *et al.* 2003). Les effets de ces différentes formes peuvent être antagonistes ou synergiques avec ceux d'ATF4. ATF3 induit avec ATF4 l'expression de gènes comme GADD34 ou l'asparagine synthase (AS) en réponse à un stress du RE (Jiang *et al.* 2004). ATF3 a également été décrit comme étant nécessaire à l'induction de CHOP avec ATF4 lors d'une carence d'acides aminés uniquement (Jiang *et al.* 2004).

Le facteur de transcription sensible à l'oxydoréduction NF- $\kappa$ B est également activé par la voie PERK/eIF2 en réponse à un stress du RE (Pahl and Baeuerle 1995; Jiang *et al.* 2003).

En plus de eIF2 $\alpha$ , PERK peut phosphoryler le facteur de transcription Nrf2 (« NF-E2 related factor 2 ») (figures 24 & 26) qui contribue à la transduction des signaux de survie lors d'un stress du RE à travers l'expression de gènes codant pour des protéines intervenant dans le métabolisme de détoxification cellulaire et pour des protéines ayant un rôle dans la réponse adaptative à un stress oxydant (Itoh *et al.* 1999; He, C. H. *et al.* 2001). De plus, Nrf2 inhibe

l'expression de CHOP en absence ou en présence d'un stress du RE (Cullinan and Diehl 2004).

### **3.3. Interactions des différentes voies de la réponse UPR**

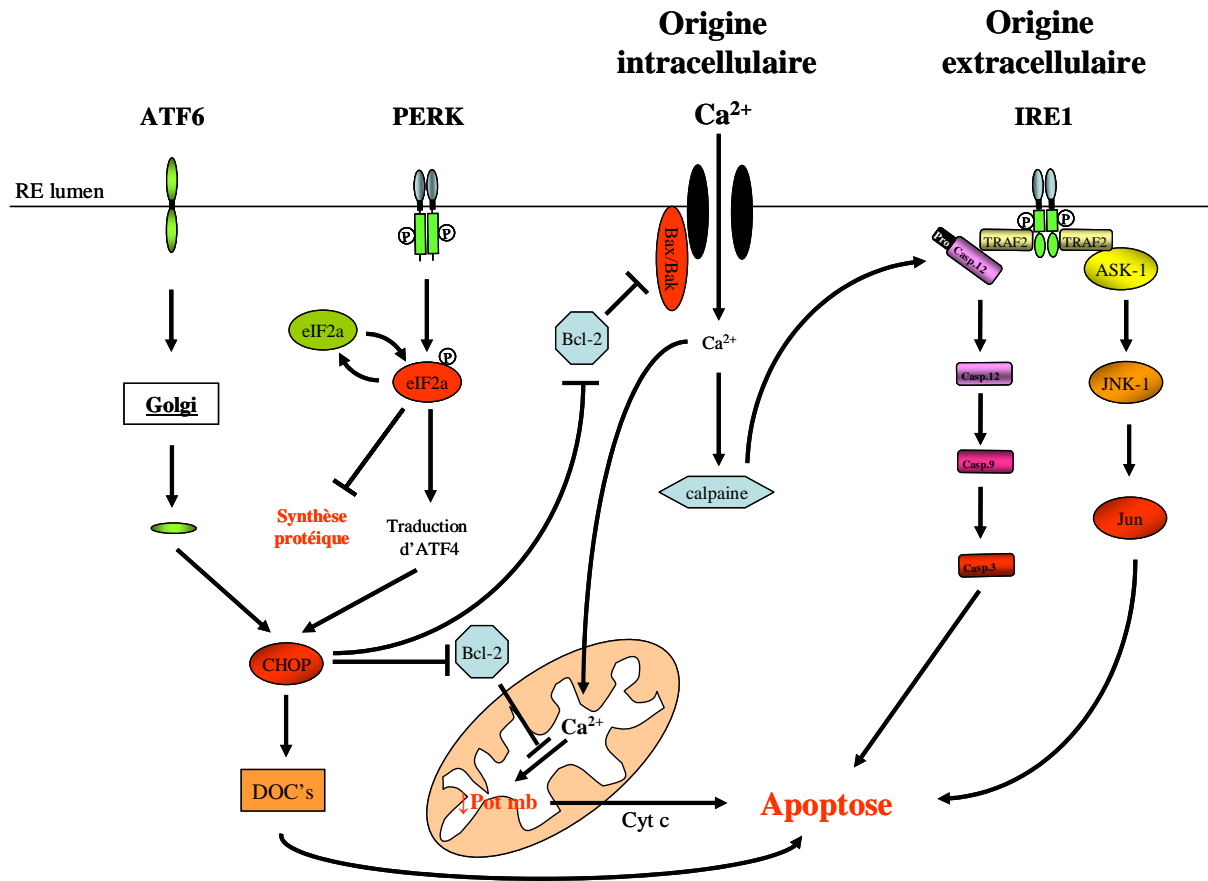
Les senseurs proximaux PERK, IRE1 et ATF6 régulent la production et l'activation de différents facteurs de transcription : XBP1, ATF4, Nrf2 et ATF3. Tous ces facteurs peuvent former des homo ou hétéro dimères avec d'autres facteurs de transcription (Schroder and Kaufman 2005b). Ces dimères peuvent être à la fois des activateurs ou des répresseurs compétitifs des gènes cibles de la réponse UPR.

La réponse du stress du RE chez les mammifères peut se diviser en 2 branches (figure 26). La première, sous le contrôle de ATF6 et IRE1/XBP1 est spécifique du stress du RE. La deuxième, sous la dépendance de PERK est partagée avec d'autres stress cellulaires qui activent des kinases spécifiques d'eIF2 $\alpha$  (Harding *et al.* 2000; Okada *et al.* 2002). Le blocage de la phosphorylation de eIF2 $\alpha$ , durant un stress du RE, inhibe l'induction de CHOP et de XBP1 et diminue la surexpression de BiP (Harding *et al.* 2000; Scheuner *et al.* 2001; Calton *et al.* 2002). Ces données supportent l'existence d'interactions entre les deux branches de l'UPR, dans lesquelles PERK faciliterait l'activation des voies dépendantes d'ATF6 et IRE1/XBP1.

Les gènes cibles de l'UPR peuvent être divisés en trois groupes : le premier inclut les gènes sous la dépendance uniquement de la voie eIF2 $\alpha$ /ATF4 comme GADD34, le deuxième inclut les gènes de la branche spécifique du stress du RE sous la dépendance des voies ATF6 et IRE1 comme XBP1 ou les chaperonnes du RE, et le dernier groupe inclut les gènes induits par les deux branches de réponse au stress du RE comme CHOP ou HERP (figure 26).

## **4. Apoptose et stress du RE**

Expérimentalement, le stress du RE peut être induit par des agents pharmacologiques énumérés en figure 20. Tous ces agents peuvent également induire une apoptose pour des temps d'incubation de 20 à 48 h, en fonction du type cellulaire (Patil and Walter 2001). En effet, les signaux émanant de PERK, IRE1 et ATF6 peuvent être pro apoptotiques lorsque le stress subi est trop fort ou trop long. Le fait que différentes formes de stress du RE induisent des programmes d'apoptose différents (Scorrano *et al.* 2003) suggère que le déclenchement de l'apoptose dépend de la nature des stimuli et du type cellulaire. Des voies de signalisation



**Figure 27 : Voies de signalisation apoptotique engendrées par le stress du RE.**

Abréviations : caspase (casp); potentiel membranaire mitochondrial interne (pot mb); cytochrome c (Cyt c).

(Adapté de Schroder and Kaufman 2005a)

apoptotiques sont activées par divers signaux de type extra et intra cellulaires qui sont ensuite couplés à l'activation des effecteurs caspases (figure 27).

La voie de signalisation d'origine extracellulaire (provenant de la lumière du RE) de l'apoptose est principalement régulée par la protéine IRE1 (figure 27). En réponse à un stress du RE prolongé, IRE1 forme un complexe hétérotrimérique avec TRAF2 (« TNF receptor-associated factor »). Le complexe TRAF2/IRE1 interagit avec la pro-caspase 12 et induit son clivage (Nakagawa and Yuan 2000; Nakagawa *et al.* 2000; Yoneda *et al.* 2001). Suite à son activation au niveau de la membrane du RE, la caspase 12 clive la pro-caspase 9 qui clive à son tour la pro-caspase 3, ce qui aboutit à une apoptose. (Morishima *et al.* 2002). Le complexe TRAF2/IRE1 interagit également avec ASK1 (« apoptosis signal-regulating kinase 1 ») ce qui active JNK (« c-Jun N-terminal kinase 1 ») (Urano 2000) et induit la mort cellulaire par apoptose (Nishitoh *et al.* 2002).

La voie de signalisation d'origine intracellulaire (figure 27) de l'apoptose induite par le RE est contrôlée par la balance entre les protéines pro-apoptotiques de la famille BH3 (comme Bad, Bax et Bak) et anti-apoptotiques de la famille Bcl2 :

- En réponse à un stress du RE prolongé, les protéines Bak et Bax se dimérisent au niveau des canaux calciques de la membrane du RE (Zong *et al.* 2003) et induisent une fuite de calcium vers le cytoplasme. Cette fuite de calcium induit une réponse apoptotique par l'activation de la caspase 12 via la calpaïne (Orrenius *et al.* 2003) et par l'effondrement du potentiel membranaire mitochondrial et la libération de cytochrome c (Filippin *et al.* 2003) (figure 27).
- La surexpression de Bcl2 bloque à la fois la dépolarisation de la membrane interne des mitochondries en réponse à un stress du RE (Boya *et al.* 2002) et la libération de calcium initiée au niveau de la membrane du RE par les protéines Bad et Bax (Breckenridge *et al.* 2003).

La surexpression du facteur de transcription CHOP lors d'un stress provoque l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Gotoh *et al.* 2002) et des cellules déficientes pour CHOP sont partiellement résistantes à une apoptose initiée par un stress du RE (Zinszner *et al.* 1998; McCullough *et al.* 2001). CHOP forme des hétérodimères stables avec les facteurs de transcription de la famille C/EBP et contrôle l'expression de nombreux gènes induits en condition de stress et qui interviennent dans des phénomènes d'apoptose (Zinszner *et al.* 1998). Il active également l'expression d'un certain nombre de gènes appelés DOCs

(« Downstream of CHOP ») en se liant à ATF3 (Chen, B. P. *et al.* 1996) ou au complexe AP-1 (Ubeda *et al.* 1999). Marciniak *et al.* (2004) ont montré que GADD34 et ERO1 $\alpha$  sont des cibles de CHOP et que leur activation peut entraîner l'apoptose en condition de stress (McCullough *et al.* 2001; Yagi *et al.* 2003). La transcription de l'anhydrase carbonique VI qui active l'apoptose à travers l'augmentation de la concentration intracellulaire en protons, fait également partie des gènes de réponse à CHOP (Sok *et al.* 1999). De plus, CHOP peut inhiber la transcription de Bcl2 (McCullough *et al.* 2001) et donc supprimer ses effets anti-apoptotiques.

## **Partie III : la réponse UPR et l'ischémie tumorale**

La transformation maligne cellulaire exige plusieurs changements génétiques qui permettent aux cellules d'ignorer les restrictions de croissance et de neutraliser l'apoptose. Pendant la prolifération de ces cellules, certaines zones tumorales se trouvent en état d'ischémie et répondent alors en induisant une angiogenèse. L'activation d'une réponse UPR a été observée dans de nombreux cancers. Plusieurs études indiquent que cette activation pourrait avoir un rôle crucial dans la croissance tumorale (Ma and Hendershot 2004).

### **1. Évidences de l'activation de la réponse UPR dans les tumeurs solides**

L'activation des facteurs de transcription XBP1, ATF6 ou CHOP et la surexpression des chaperonnes BiP, GRP94 ou ORP150 sont observées dans des carcinomes mammaires, hépatiques, gastriques ou oesophagiens (Fernandez, P. M. *et al.* 2000; Song *et al.* 2001; Chen, X. *et al.* 2002a; Shuda *et al.* 2003) ainsi que dans plusieurs lignées cellulaires tumorales (Gazit *et al.* 1999; Ozawa *et al.* 2001b).

La surexpression de BiP est fréquemment associée à des carcinomes mammaires de haut grade (Fernandez, P. M. *et al.* 2000). De plus, une lignée de fibrosarcome déficiente pour BiP, injectée dans des souris, forme des tumeurs qui régressent rapidement (Jamora *et al.* 1996). Des cellules XBP1<sup>-/-</sup> ne forment pas de tumeurs chez la souris malgré le maintien de la sécrétion de VEGF-A en réponse à l'hypoxie *in vitro* (Romero-Ramirez *et al.* 2004).

L'ensemble de ces données met en évidence le rôle clef de la réponse UPR dans le développement tumoral (*cf. article n°2*).

### **2. L'ischémie tumorale et la réponse UPR**

Les conditions d'ischémie (hypoxie, carences en nutriments, stress oxydant et acidose) contribuent à la néo-vascularisation grâce à l'expression de facteurs angiogéniques comme le VEGF-A. Les différents stress constituant l'ischémie tumorale sont également à l'origine de l'induction d'une réponse UPR et du facteur de transcription ATF4 (Harding *et al.* 2003) pour permettre la survie cellulaire.

## **2.1. Hypoxie et stress du RE**

L'hypoxie provoque une altération de la conformation des protéines dans le RE, notamment par une diminution de la production d'ATP ce qui entraîne une activation de la réponse UPR. (Kaufman *et al.* 2002). Les stress hypoxiques vont affecter différents composants de la machinerie de conformation protéique.

### **2.1.1. Hydroxylation de prolines**

Les collagènes prolyl-4-hydroxylases (P4Hs) participent aux modifications post traductionnelles au sein du RE. Elles ont un rôle central dans la biosynthèse et la conformation des collagènes qui représentent une des plus grandes familles de protéines sécrétées de la matrice extracellulaire (Myllyharju 2003). En condition hypoxique, la transcription du gène de la sous-unité catalytique des P4Hs est induite par HIF-1 à travers une séquence HRE (Takahashi, Y. *et al.* 2000).

### **2.1.2. Formation de ponts disulfures**

La formation des ponts disulfures dans le RE est catalysée par la PDI qui est maintenue dans son état oxydé par ERO1 (*cf. page 68*). L'expression d'ERO1-L $\alpha$  mais pas d'ERO1-L $\beta$  est stimulée *in vivo* et *in vitro* par l'hypoxie (Gess *et al.* 2003) par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF-1 (May *et al.* 2005). La régulation de l'expression d'ERO1-L $\alpha$  par l'oxygène permet de maintenir le taux de PDI constant dans les situations de variation de l'état redox cellulaire induit par des modifications de pression partielle en oxygène (Pagani *et al.* 2000; Harding *et al.* 2003). De plus, l'inhibition de l'expression d'ERO1-L $\alpha$  par siRNA induit une diminution de la sécrétion de VEGF-A suite à une hypoxie (May *et al.* 2005).

### **2.1.3. Augmentation de l'expression des protéines chaperonnes**

Il a récemment été montré que la protéine chaperonne GRP94 (« glucose regulated protein 94 ») est surexprimée dans les cellules endothéliales en réponse à une hypoxie, à travers la fixation du facteur de transcription HIF-1 sur des motifs HRE présents sur le promoteur de cette chaperonne (Paris *et al.* 2005).

La protéine chaperonne ORP150 (« oxygen regulated protein 150 ») est exprimée lors de tumeurs, chez l'Homme, en concordance avec la sécrétion de VEGF-A. *In vitro*, dans des macrophages humains ou des gliomes de rat cultivés en condition d'hypoxie, l'inhibition de l'expression d'ORP150 cause la rétention du VEGF-A dans le RE, alors que la surexpression



d'ORP150 favorise sa sécrétion dans le milieu de culture (Ozawa *et al.* 2001a; Ozawa *et al.* 2001b; Tamatani *et al.* 2001). *In vivo*, les cellules tumorales issues de xénogreffes de gliomes de rat transfectés avec une construction antisens d'ORP150, ont une angiogenèse réduite par rapport aux tumeurs issues de cellules sauvages (Ozawa *et al.* 2001b). Ces résultats démontrent un rôle critique des chaperonnes du RE dans l'angiogenèse tumorale par l'intermédiaire d'un processus de conformation du VEGF-A.

#### **2.1.4. Inhibition de la synthèse protéique**

En réponse à l'hypoxie la phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  par la protéine PERK va entraîner une inhibition de la synthèse protéique (*cf. page 79*). Malgré cette inhibition, les protéines VEGF-A, HIF-1 $\alpha$ , BiP, ATF4 et ATF6 sont toujours synthétisées à travers la présence de séquences IRES ou d'uORF sur leurs parties 5'utr (Blais *et al.* 2004). Des fibroblastes d'embryon de souris déficients pour PERK ont une survie inférieure aux cellules sauvages en condition d'hypoxie prolongée (Koumenis *et al.* 2002). De plus, l'inactivation de la voie de signalisation PERK/eIF2 $\alpha$ , induit une diminution de la survie cellulaire dans le cas d'une hypoxie sévère et les tumeurs issues de ces cellules sont plus petites et présentent un taux d'apoptose plus important dans les zones hypoxiques (Bi *et al.* 2005). Ces résultats indiquent que l'adaptation et la survie cellulaire à une hypoxie exigent l'activation de la voie de signalisation UPR dépendante de PERK.

#### **2.1.5. Induction du VEGF-A**

L'hypoxie est impliquée dans l'induction du VEGF-A et de l'angiogenèse tumorale par l'intermédiaire de la réponse UPR. (Ozawa *et al.* 2001a; Ozawa *et al.* 2001b; Abcouwer *et al.* 2002). Dans trois lignées de cellules tumorales différentes, l'inhibition de IRE1 entraîne une diminution de l'expression du VEGF-A et de HIF-1 en hypoxie et diminue la croissance et l'angiogenèse tumorale *in vivo* (*cf. article n°2*).

### **2.2. Carences en glucose et stress du RE**

Les carences de glucose ont été à l'origine de la caractérisation du stress du RE parce qu'elles perturbent la conformation des protéines synthétisées dans cet organite (Ma and Hendershot 2001; Kaufman *et al.* 2002). En effet, les gènes codant pour les protéines chaperonnes BiP et GRP94 ont été caractérisés du fait de l'induction de leur expression lors de situations de déplétion glucidique (Shiu *et al.* 1977). D'autres chaperonnes comme

ORP150 ou la PDI sont également induites lors de limitations de glucose (Lee, A. S. 1992; Kobayashi, T. and Ohta 2005).

### **2.2.1. Carences en glucose et induction de la réponse UPR**

Le repliement conformationnel des protéines dans le RE nécessite beaucoup d'énergie dont le niveau est réduit lors de carences en glucose. Le transport des protéines vers le RE (Argon *et al.* 1989), leur conformation ou leur dégradation, nécessitent de l'ATP (Dorner *et al.* 1990). En plus de cet aspect énergétique, l'absence de glucose altère les modifications post traductionnelles des protéines par glycosylation (Helenius 1994).

Une diminution de la concentration en glucose extracellulaire entraîne l'induction de gènes cible de l'UPR à travers la signalisation dépendante de PERK (Scheuner *et al.* 2001). De plus, des souris PERK<sup>-/-</sup> présentent des dysfonctionnements pancréatiques et développent des diabètes quelques semaines après leur naissance (Harding *et al.* 2001); des souris possédant une mutation sur la serine 51 du facteur eIF2 $\alpha$  présentent, en plus, d'autres défauts du métabolisme du glucose, notamment un arrêt de la néoglucogenèse au niveau du foie, et meurent d'hypoglycémie rapidement après leur naissance (Scheuner *et al.* 2001). Ces résultats indiquent un rôle crucial de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  dans la signalisation UPR induite par des restrictions en glucose (Scheuner *et al.* 2001).

D'autres liens existent entre la limitation en glucose et la réponse UPR. Des cellules tumorales localisées dans des environnements faiblement vascularisés dans lesquels elles sont soumises à des carences en glucose, induisent également une réponse UPR (Ma and Hendershot 2004). Cette réponse est à l'origine de l'induction par ATF4 de gènes cibles n'ayant pas, à priori, de lien direct avec le métabolisme du glucose, mais étant impliqués dans le métabolisme des acides aminés ou dans la réponse aux stress oxydatifs (Barbosa-Tessmann *et al.* 1999b; Fernandez, J. *et al.* 2002; Harding *et al.* 2003).

L'induction de la transcription de GLUT-1 par de faibles concentrations en glucose, coïncide avec l'induction de BiP et contribue à la survie cellulaire causée par l'absence de glucose (Wertheimer *et al.* 1991).

### **2.2.2. Induction du VEGF-A**

La privation de glucose est également impliquée dans l'induction du VEGF-A et de l'angiogenèse par l'intermédiaire de la réponse UPR (Abcouwer *et al.* 2002). De plus, nous

montrons que des cellules tumorales déficientes pour IRE1 ont un défaut d'expression du VEGF-A en carence de glucose (*cf. article n°2*).

### 2.3. Carences en acides aminés et stress du RE

Les carences en acides aminés ne semblent pas induire pas de stress du RE. Chez les mammifères l'activation de la réponse UPR à travers la voie PERK/eIF2 $\alpha$ -P/ATF4 est couplée à l'induction de gènes intervenant dans l'import et l'assimilation d'acides aminés (Barbosa-Tessmann *et al.* 1999a; Okada *et al.* 2002; Harding *et al.* 2003) ce qui assure et facilite la synthèse de nouvelles protéines permettant la survie cellulaire et évitant une éventuelle absence d'acides aminés. Cette induction intervient de manière indépendante de la carence en acides aminés. En effet, PERK est activé par une accumulation de protéines mal conformées à l'intérieur du RE et non pas par la diminution de la quantité d'acides aminés (Harding *et al.* 2003).

Même si ces carences induisent l'expression de certains gènes activés suite à un stress du RE (Averous *et al.* 2003), les voies de signalisation sont différentes mais font toutefois intervenir des facteurs communs (Jiang *et al.* 2004; Kilberg *et al.* 2005). Dans les deux cas, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  entraîne la traduction d'ATF4 et l'induction de ses gènes cibles ainsi qu'un arrêt de la synthèse protéique (Ma, Y. *et al.* 2002). Cependant, en réponse aux limitations en acides aminés, c'est la kinase GCN2 et non PERK, qui phosphoryle eIF2 $\alpha$  (Bruhat *et al.* 1997; Harding *et al.* 2000; Hinnebusch 2000). GCN2 est activée par l'augmentation des ARNt non chargés, sert à la détection de carences en acides aminés et déclenche la voie métabolique de réponse aux acides aminés (AAR) (Sood *et al.* 2000).

De plus, la réponse à une carence en acides aminés n'induit pas de synthèse de chaperonnes du RE (Barbosa-Tessmann *et al.* 1999b). Cependant, certains auteurs décrivent une faible induction de BiP lors de carences en glutamine (Abcouwer *et al.* 2002; Marjon *et al.* 2004). Cette induction peut être liée au facteur de transcription ATF4 (Luo *et al.* 2003). La glutaminolyse fournit à la cellule des précurseurs métaboliques, de l'énergie et des équivalents réduits. Il est donc possible qu'une carence en glutamine puisse induire indirectement un stress du RE à travers un stress oxydatif ou une diminution d'ATP (Abcouwer *et al.* 2002).

Les relations pouvant exister entre les carences en acides aminés et l'induction du VEGF-A sont peu étudiées. Marjon *et al.* (2004) ont montré que des carences en glutamine

étaient corrélées avec une induction d'ATF4 et du VEGF-A. Cependant si les mécanismes du stress du RE sont responsables de cette induction de VEGF-A, ce n'est probablement pas à travers une réponse UPR. En effet, la carence en glutamine ne provoque qu'une augmentation faible de BiP alors que lors d'une réponse UPR, cette chaperonne est largement induite (Bobrovnikova-Marjon *et al.* 2004) (*cf article n°1*).

#### **2.4. Stress oxydant et stress du RE**

Le RE produit transitoirement des ROS lors de la formation de ponts disulfures, ce qui le rend sensible au stress oxydant et oblige un contrôle de son statut redox (*cf. page 68*). Un stress oxydant entraîne une agrégation protéique qui peut être due à une formation non contrôlée de ponts disulfures ou à l'inactivation de protéines impliquées dans la machinerie de contrôle de la qualité des protéines du RE (Stadtman and Levine 2003).

Ces stress oxydants induisent une réponse UPR principalement par l'activation de la kinase PERK. Des cellules déficientes pour ATF4 présentent une inhibition d'activation des gènes impliqués dans la protection contre le stress oxydatif (Harding *et al.* 2003). ATF4 induit l'expression de gènes de l'import et du métabolisme d'acides aminés à groupement thiol (pour la synthèse de glutathion) ce qui permet de protéger le RE contre les stress oxydants (Lu 1999).

Lors d'un stress oxydant, la réponse UPR à travers ATF4 induit également l'expression de la protéine RIB1 qui contrôle la première étape de biosynthèse de riboflavine (indispensable à l'activité de ERO1), de la PDI et d'Ero1-L $\beta$  (Travers *et al.* 2000; Gess *et al.* 2003). Cependant la surexpression de ERO1 chez la levure induit à la fois une augmentation de ROS (Haynes *et al.* 2004) et une diminution de la GSH (Cuozzo and Kaiser 1999). Une surexpression de ERO1 par la réponse UPR (Travers *et al.* 2000) peut donc augmenter le stress oxydatif en augmentant la production de radicaux libres et en diminuant la capacité du glutathion à réduire les ponts disulfures incorrects (Haynes *et al.* 2004). En effet, il a été montré que des cellules n'ayant plus la possibilité de répondre à un stress du RE survivent à l'accumulation de ROS et peuvent continuer à se propager alors que des cellules sauvages meurent (Haynes *et al.* 2004).

Les voies de signalisation issues de PERK font également intervenir le facteur de transcription Nrf2 pour contrer un stress oxydant (Harding *et al.* 2003; Cullinan and Diehl 2004). Une fois dans le noyau Nrf2 peut s'hétérodimériser avec plusieurs cofacteurs dont ATF4 (He, C. H. *et al.* 2001). Parmi les gènes cibles de ce complexe on retrouve: l'hème oxygénase 1 (HO-1), enzyme qui catalyse la réaction limitante de la dégradation d'hème en

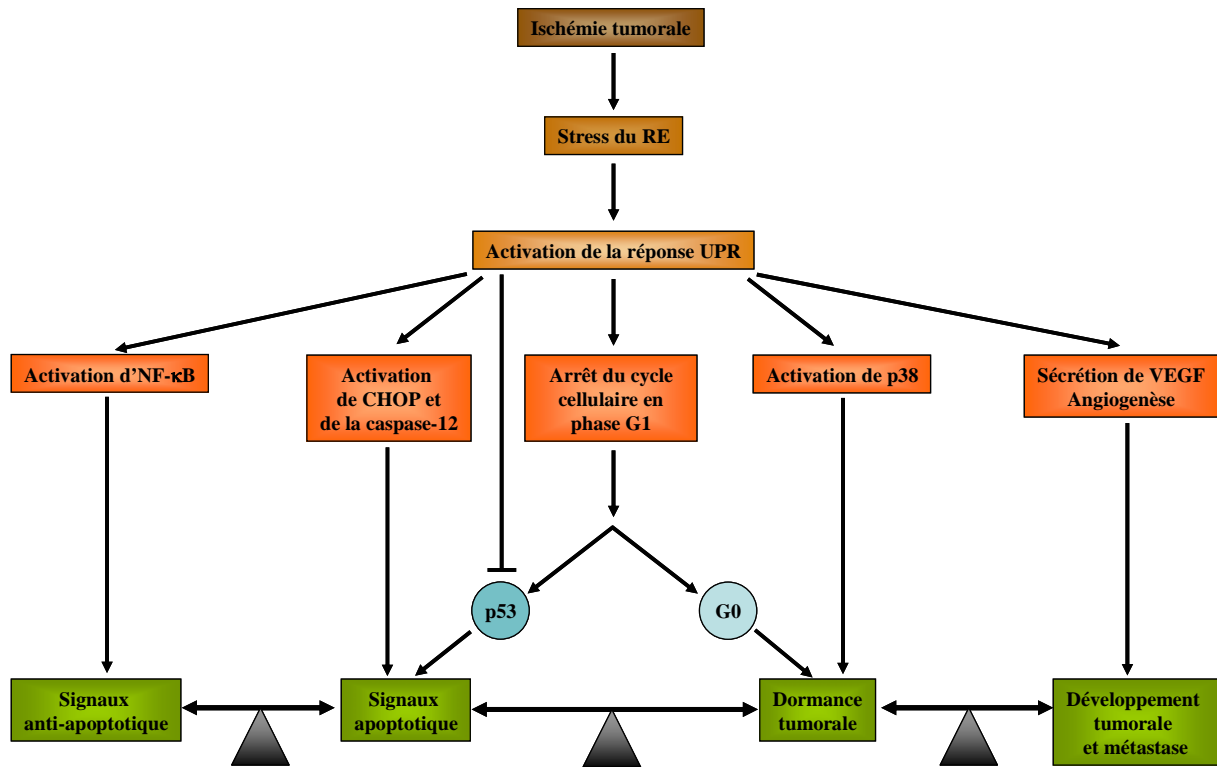
généralant la production de bilirubine (antioxydant) ; la NAD(P)H quinone oxydoréductase (NQO) qui catalyse la réduction de électrons des quinones, évitant ainsi leur participation dans un stress oxydatif ; la gamma-glutamylcystéine synthase, qui catalyse la réaction limitante de la biosynthèse de glutathion ; et la glutathione S-transférase qui conjugue les radicaux libres avec le glutathion (Venugopal and Jaiswal 1996; Wild *et al.* 1999; Huang, H. C. *et al.* 2000; Ishii *et al.* 2000).

Hayashi (2005) suggère que les ROS causent des dommages au niveau du RE et activent les voies métaboliques de mort cellulaire induites par CHOP. La surexpression de CHOP interfère avec la synthèse de glutathion en diminuant la synthèse de Bcl2, générant ainsi une augmentation de ROS et l'induction de l'apoptose (Voehringer 1999; McCullough *et al.* 2001).

L'homocystéine est un intermédiaire essentiel à la synthèse de méthionine et de cystéine. Son groupement thiol hautement réactif peut facilement être oxydé et créer ainsi des radicaux libres susceptibles d'induire des dysfonctionnements cellulaires (Welch and Loscalzo 1998). En plus de ce stress oxydatif, l'homocystéine pourrait former des ponts disulfures illégitimes avec les cystéines des protéines et ainsi perturber la conformation protéique au sein du RE (Lentz and Sadler 1993). De plus, des cellules cultivées avec de l'homocystéine montrent de hauts niveaux d'expression de gènes cibles de l'UPR comme BiP, GRP94, CHOP et HERP (Outinen *et al.* 1999; Werstuck *et al.* 2001; Zhang, C. *et al.* 2001). Enfin, Roybal *et al.* (2004) ont rapporté que l'accumulation d'homocystéine ou de composés contenant un groupement thiol induit l'expression du VEGF-A d'une manière dépendante d'ATF4.

## **2.5. pH et stress du RE**

De nombreuses études ont montré que les pH extracellulaires dans des tumeurs animales ou humaines sont acides. Dans plusieurs types cellulaires, des acidoses peuvent causer des conformations protéiques anormales mises en évidence par l'augmentation de chaperonnes (Massa *et al.* 1996; Narasimhan *et al.* 1996). De plus, pour des pH inférieurs à 6,8 une inhibition de l'activité de canaux  $Ca^{2+}$ /ATPase du RE a été reportée (Wolosker *et al.* 1997). Ces acidoses peuvent donc déclencher un stress du RE et potentiellement une réponse UPR (Kozutsumi *et al.* 1988; Paschen and Frandsen 2001). Il existe plusieurs voies possibles par lesquelles une acidose peut affecter les protéines du RE comme la dénaturation,



**Figure 28 : Eléments sous la dépendance de la réponse UPR pouvant intervenir dans différentes étapes potentielles du développement tumoral.**  
*(D'après Ma and Hendershot 2004).*

l'inhibition ou l'inactivation d'enzymes de la machinerie de conformation protéique et l'inhibition des canaux  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPase (Wolosker *et al.* 1997).

Enfin, il a récemment été démontré que des acidoses allant jusqu'à un pH de 6,0 induisent un stress du RE et l'activation de la pro-caspase 12 dans des astrocytes soumis à une ischémie/reperfusion (Aoyama *et al.* 2005).

### **3. Rôle de la réponse UPR dans la progression tumorale**

#### **3.1. Croissance tumorale**

L'angiogenèse est une étape cruciale du développement tumoral induite principalement par le VEGF-A (*cf. chapitre I*). Des études récentes indiquent que la transcription du VEGF-A est stimulée pendant un stress du RE par une voie dépendante d'ATF4 (Roybal *et al.* 2004). La réponse UPR dépendante d'IRE1 représente un paramètre critique dans la régulation de l'expression du VEGF-A lors du développement tumoral (*cf. article n°2*) (figure 28).

La sécrétion du VEGF-A nouvellement synthétisé est contrôlée par différentes protéines chaperonnes qui sont surexprimées pendant un stress du RE, une hypoxie ou une carence de glucose (Ikeda *et al.* 1997; Ozawa *et al.* 2001a; Ozawa *et al.* 2001b; Kobayashi, T. and Ohta 2005; May *et al.* 2005; Paris *et al.* 2005). La surexpression de ORP150 entraîne une augmentation de la sécrétion du VEGF-A, tandis que son inhibition diminue la sécrétion de ce facteur qui reste alors séquestré dans le RE (Ozawa *et al.* 2001b). Le rôle exact de ORP150 dans la sécrétion du VEGF-A est inconnu mais ce facteur pourrait agir comme chaperonne spécifique. Finalement, comme le VEGF-A est conformé dans le lumen du RE, il est possible que l'augmentation de sa production constitue une surcharge et donc un signal de stress du RE (Ma and Hendershot 2004).

#### **3.2. Dormance tumorale**

Si une tumeur *in situ* n'induit pas d'angiogenèse, ses cellules peuvent entrer en dormance en sortant du cycle cellulaire et échapper ainsi à l'apoptose (figure 28). Bien que les mécanismes qui contrôlent la transition entre la dormance et la croissance tumorale sont très mal connus, des données suggèrent que l'activation de deux familles de MAPK, ERK (« extracellular-regulated kinases ») et p38, peut affecter cette transition (Aguirre-Ghiso *et al.* 2001; Aguirre-Ghiso *et al.* 2003). En effet, une forte activité de ERK par rapport à celle de p38 est corrélée avec une croissance tumorale agressive. A l'inverse, une forte activité de p38

par rapport à celle de ERK induit un état de dormance tumorale corrélé avec l'induction d'une réponse UPR (Ma and Hendershot 2004). L'activation de p38 peut conduire à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle des facteurs ATF6 et CHOP (Wang, X. Z. and Ron 1996; Luo and Lee 2002). La réponse UPR dépendante de PERK induit une inhibition de la synthèse des protéines et notamment de la cycline D1 ce qui provoque un arrêt des cellules en phase G1 (figure 28). Ces résultats suggèrent que le stress du RE tient une place importante dans l'induction de la dormance tumorale.

### **3.3. Effets anti-apoptotiques**

La réponse UPR ou une carence d'acides aminés vont induire la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  ce qui active ATF4 et l'expression de ses gènes cibles comme NF- $\kappa$ B (Harding *et al.* 2000; Jiang *et al.* 2003). Ce facteur de transcription va activer la transcription de protéines anti-apoptotiques et permettre la survie cellulaire (Gotoh *et al.* 2002; Kucharczak *et al.* 2003) (figure 28). De plus, l'inactivation de la voie de signalisation PERK/eIF2 $\alpha$ , induit une diminution de la taille des tumeurs en augmentant leur sensibilité à l'apoptose (Bi *et al.* 2005).

Le stress du RE active la kinase GSK3b (« glycogène synthase kinase-3b ») qui va phosphoryler directement la protéine p53 sur ses sérines 345 et 376 dans le noyau (Qu *et al.* 2004). Ces phosphorylations sont à l'origine d'une localisation cytoplasmique de p53 et empêchent les signaux pro-apoptotiques dépendants de cette protéine. Par conséquent, dans des cellules tumorales ayant maintenu la fonction de p53, l'activation de la réponse UPR diminue potentiellement ses effets pro-apoptotiques et contribue donc à la survie tumorale (figure 28).

### **3.4. Effets pro-apoptotiques**

Bien que la réponse UPR a globalement des effets cyto-protecteurs, un stress du RE prolongé peut activer l'apoptose par des voies dépendantes ou non des mitochondries (Breckenridge *et al.* 2003) (*cf. page 87*). Parmi les effecteurs pro-apoptotiques de la réponse UPR, on retrouve la pro-caspase 12 associée au RE et le facteur de transcription CHOP qui inhibe la transcription de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Nakagawa and Yuan 2000; McCullough *et al.* 2001).

Il semble donc qu'un stress du RE prolongé rend les cellules tumorales plus vulnérables à l'apoptose mais les mécanismes d'adaptations *in vivo* ne sont pas connus.



L'activation des voies cyto-protectrices de la réponse UPR et/ou l'altération des divers processus apoptotiques, comme c'est souvent le cas dans les cellules tumorales, pourraient être suffisantes pour protéger les cellules contre l'apoptose. Malgré l'évidence de leur activation, les composants pro-apoptotiques de la réponse UPR pourraient être inefficaces dans les tumeurs. Les cellules tumorales pourraient alors profiter des effets cyto-protecteurs à long terme de cette réponse sans succomber aux éléments destructifs qui sont habituellement induits par un stress prolongé dans des cellules non tumorales.

Il semble probable que l'environnement tumoral influence, via la réponse UPR, l'orientation des cellules vers les processus de prolifération, d'arrêt de la croissance ou d'apoptose (figure 28). Par conséquent, pendant les premières phases du développement tumoral, le stress du RE pourrait favoriser la croissance tumorale en augmentant l'angiogenèse ou protéger l'hôte en induisant une dormance tumorale. Cet état dormant peut également protéger les cellules tumorales contre l'apoptose induite par l'ischémie et leur permettre de proliférer à nouveau si les conditions environnementales changent (Ma and Hendershot 2004).

#### **4. La réponse UPR et le traitement de tumeurs**

Un éventail d'agents chimiothérapeutiques est utilisé pour contrer le développement des tumeurs solides mais la résistance aux drogues reste un obstacle important de ces traitements. Le traitement de cellules en culture avec des agents inducteurs du stress du RE, les rend résistantes aux agents anti-topoisomérase II (topo II) d'une part et augmente leur sensibilité aux agents de réticulation de l'ADN, comme le cisplatine, d'autre part (Ma and Hendershot 2004). Par conséquent, il semble qu'*in vitro* l'activation de la réponse UPR agisse en synergie avec diverses drogues anticancéreuses ou empêche leur efficacité selon et leur mode d'action.



## RESULTATS - DISCUSSION



## RESULTATS - DISCUSSION

### 1. Études *in vitro* de limitation en nutriments ; utilisation d'un milieu complet sans sérum

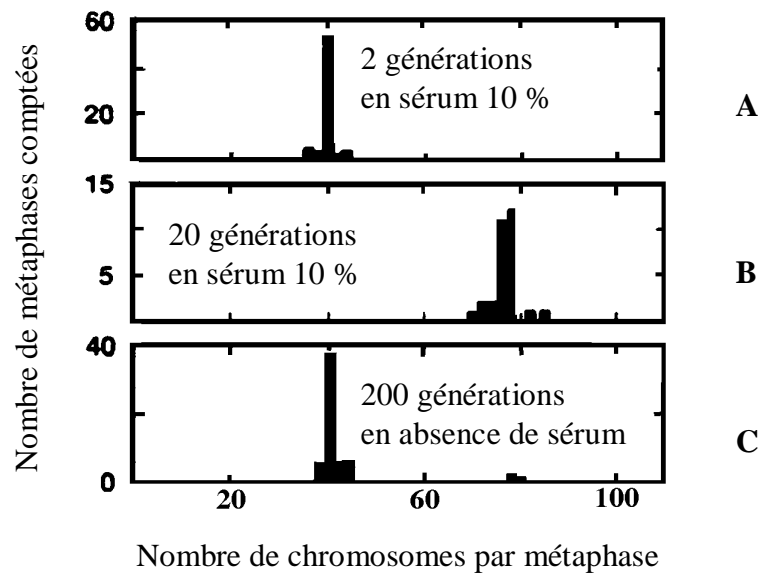
(Article n°1)

L'ischémie se développant dans les zones avascularisées des tumeurs solides induit l'angiogenèse et, de ce fait, contribue significativement à l'expansion tumorale. Les réponses cellulaires et tissulaires à l'ischémie sont la résultante de réponses variées à des stress distincts dont beaucoup ne sont pas définis au niveau moléculaire. Plusieurs paramètres sont potentiellement impliqués. L'un d'entre eux, très étudié, est l'hypoxie (Semenza 2003). La carence en glucose constitue également un facteur vraisemblablement déterminant (Shweiki *et al.* 1995; Abcouwer *et al.* 2002). Enfin, les carences en acides aminés (Abcouwer *et al.* 2002) sont également des paramètres influants associés à l'ischémie.

Les expérimentations portant sur ces différents paramètres de l'ischémie tumorale réalisées en culture cellulaire ont été généralement menées en présence de sérum. Cette présence de sérum gêne considérablement l'approche expérimentale du fait de son hétérogénéité moléculaire et de la mauvaise définition de ses composants. De plus, l'étude de l'ischémie est incompatible avec la présence de sérum. Enfin, le sérum peut induire un signal tissulaire hémorragique et peut être lui même considéré comme un facteur de stress (Houlgatte *et al.* 1989).

La possibilité de réaliser nos expérimentations dans un milieu sans sérum autorise une approche plus rationnelle de l'étude des carences en glucose et en acides aminés. Le choix de la formulation de ce milieu s'est fixé sur le modèle décrit initialement par Loo *et al.* (1987). Ce milieu contient des lipoprotéines de hautes densités (HDL) ainsi que des facteurs de croissance en remplacement du sérum. Dans ces conditions, le potentiel de prolifération de cellules primaires est maintenu pendant un nombre élevé de générations sans étape de crise cellulaire comme observé habituellement en présence de sérum. Les caryotypes cellulaires sont maintenus (figure 29) et les cellules n'acquièrent pas de phénotype transformé (Loo *et al.* 1987).

L'objectif de ce travail a été d'étudier la contribution des carences en glucose et en acides aminés dans la modulation de l'expression du VEGF-A par les cellules de carcinome humain A549/8.



**Figure 29 : Evolution du caryotype de cellules d'embryon de souris en culture cellulaire.** Des cellules d'embryon de souris Swiss sont cultivées pendant plusieurs générations en absence ou en présence de 10 % de sérum. (A) Culture primaire en présence de 10 % sérum (doublement de la population en 25 heures). (B) Culture en présence de 10 % sérum et après l'étape de crise cellulaire (doublement de la population en 23 heures). (C) Culture en milieu sans sérum (doublement de la population en 30 heures). (D'après Loo et al, 1987)

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont présentés dans l'article n°1 : « *In vitro-studies of the cellular response to nutrient deprivations using a serum-free medium: a practical approach of various parameters of tumour ischemia and angiogenesis* ». Les milieux définis ont également été utilisés dans les travaux présentés dans les articles 2 et 3.

Dans ce travail, nous montrons que les cellules A549/8 peuvent être propagées en routine dans ce milieu de culture complet sans sérum. Un besoin incontournable de HDL est observé. Ces molécules se comportent comme des facteurs essentiels de survie. Dans ces conditions, les cellules A549/8 expriment faiblement le VEGF-A par rapport aux mêmes cellules cultivées en présence de sérum. Une explication à cette observation est que le sérum contient des facteurs de croissance qui activent les réponses UPR- et HIF-dépendantes, modulent le comportement cellulaire et induisent le VEGF-A (Barnes and Sato 1980; Sage 1986; Frank *et al.* 1995; Zhu *et al.* 1997). Une augmentation de la sécrétion de ce facteur est observée en hypoxie et en absence de glucose que ce soit en présence ou en absence de sérum. Dans le cas de carences en glutamine, l'expression des messagers du VEGF-A est augmentée de manière très significative. Par contre, l'expression de la protéine diminue. Une mesure de la synthèse protéique par incorporation de leucine- $H^3$  nous a permis d'associer cette diminution du VEGF-A à un arrêt de la traduction. L'absence de glutamine n'induit pas la stabilisation des facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2 et n'induit pas de réponse UPR. L'origine de l'induction des messagers du VEGF-A reste donc encore indéterminée en absence de glutamine. Une étude du statut métabolique des cellules carencées a également été effectuée. En absence de glutamine, un taux de 20 % de cellules apoptotiques est observé alors que ce taux ne dépasse pas les 3 % en hypoxie ou en absence de glucose. Une analyse par spectrométrie infrarouge montre une augmentation de la consommation de glucose et d'acides aminés ainsi qu'une diminution de la production d'acide lactique qui restent plus modérés dans le cas de carence en glutamine que dans le cas de carence en glucose.

En conclusion, nous présentons dans ce travail les conditions expérimentales permettant l'analyse de paramètres métaboliques peu étudiés du stress ischémique. Nous montrons que les carences en glucose et en glutamine induisent au niveau transcriptionnel l'expression du VEGF-A. Ces paramètres de l'ischémie peuvent donc contribuer à la commutation angiogénique indépendamment de l'hypoxie. Les carences en glutamine induisent uniquement la transcription de ce facteur par des mécanismes indépendants de HIF-

1 et de la réponse UPR. Il existe donc plusieurs origines moléculaires de réponse à l'hypoxie et à la carence en glutamine convergeant vers l'induction des messagers du VEGF-A.

Afin de compléter l'étude des effets des carences en glutamine sur l'induction de la transcription du VEGF-A, nous allons prochainement analyser l'implication potentielle de l'AMPK lors de ce stress par une approche comparable à celle utilisée pour la carence en glucose (*cf. page 171*)

### **Article n°1**

(En préparation)



## **ARTICLE n° 1**



## **In vitro-studies of the cellular response to nutrient deprivations using a serum-free medium: a practical approach of various parameters of tumor ischemia and angiogenesis**

Drogat, B.<sup>1</sup>, Bouchecareilh, M.<sup>1</sup>, Petibois, C.<sup>2</sup>, Déléris G.<sup>2</sup>, Bikfalvi A.<sup>1</sup>, and Moenner, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM, Unité E0113; Université Bordeaux 1, Avenue des Facultés, Talence, France; <sup>2</sup> CNRS, UMR 5084; CNAB, Bio-Organic Chemistry Group; Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France.

Correspondence to: M. Moenner, Tel: (33) 540 008 925. Fax: (33) 540 008 705. E-mail: [m.moenner@angio.u-bordeaux1.fr](mailto:m.moenner@angio.u-bordeaux1.fr)

Abbreviations: VEGF-A, Vascular endothelial growth factor; UPR, unfolded protein response

**Running title:** VEGF-A expression under nutrient deprivation.

**Key words:** angiogenesis, human tumor cells, serum-free cell culture, nutrient deprivation

## **Abstract**

Tumor ischemia participates to angiogenesis and to cancer progression by generating various stresses including hypoxia, nutrient deprivations and accumulation of metabolic wastes. The contribution of nutrient deprivation to these processes is still not well understood. In addition, the experimental approach on this question is usually hampered by conventional culture conditions that required serum and therefore do not represent valid ischemic conditions. Using a serum-free medium that allows long-term propagation of different types of cells, we questioned the implication of glutamine and of essential amino-acids deprivations in the metabolic and angiogenic responses of tumor cells. In human lung carcinoma A549/8 cells subjected to glutamine deprivation, VEGF-A was up-regulated at the transcriptional level in a dose-dependent manner. Besides, VEGF-A protein expression was down-regulated in correlation to the global decrease of the total protein synthesis. VEGF-A protein release also decreased in the absence of any of the essential amino-acids. Glutamine deprivation rapidly increases the apoptotic response of the cells, and to a much greater extent than glucose deprivation. The death response paralleled the up-regulation of the growth arrest and DNA damage GADD34 mRNA as well as of the transcription factor GADD153/CHOP mRNA. Besides, VEGF-A mRNA up-regulation was neither associated to HIF-1 $\alpha$  accumulation, nor to the UPR-dependent transcriptional induction of BiP and EDEM encoding genes and to the X-box binding protein-1 (XBP1) mRNA splicing. These results suggested that, unlike hypoxia or hypoglycemia, amino-acids deprivation have no direct effect on the VEGF-driven angiogenic process in various tumors. As compared to the critical effects of hypoxia and of glucose deprivation, the significance of the tumor cell response to amino-acids deprivation in relation to the angiogenesis process remains elusive.

## Introduction

In the early development of solid tumors, cancer cells face to an ischemic environment and consequently triggered adaptive responses that contribute to their survival and to the neoplastic progression and aggressiveness. Hypoxia, nutrient deprivation and accumulation of metabolic waste represent common features of most solid tumors and generate cellular responses leading to the modulation of gene and protein expression patterns (Dang and Semenza 1999; Vaupel and Hockel 2000; Semenza 2003; Rak and Yu 2004). Blockade of the signalling pathways that contribute to cell survival in response to these various metabolic insults is a major prospect of anti-tumor therapy.

Both hypoxia and glucose deprivation activate cellular responses leading to tumor growth advantage. One significant organic response to these homeostatic imbalances is the triggering of the angiogenesis process, leading to tumor vascularisation and ultimately tumor progression (Maltepe, Schmidt et al. 1997; Pugh and Ratcliffe 2003). Up-regulation of VEGF-A, a major contributor of the angiogenic process, is indeed induced under low oxygen pressure as well as in low glucose conditions (Shweiki, Neeman et al. 1995; Forsythe, Jiang et al. 1996; Yun, Lee et al. 2005; Drogat, Auguste et al.). VEGF-A up-regulation may depend on several and partly independent intracellular triggering pathways, which underlines the need of a better understanding of the parameters of ischemia in order to optimize therapeutic strategies.

The effect of other nutrient deprivations on tumor development remains to be better characterized. Glutamine, for example, is the most abundant amino-acid in tissues and biological fluids and represents an important nutrient for tumor cell metabolism and growth (Kovacevic and Morris 1972; Reitzer, Wice et al. 1979; Lazo 1981). In addition to a high glycolytic rate, tumor cells often exhibit high rates of conversion of glutamine to lactate (Tannock and Kopelyan 1986; Marx, Mueller-Klieser et al. 1988; Board, Humm et al. 1990), a metabolic pathway called glutaminolysis. Glutamine consumption by tumor cells lead to energy production and contributes to the redox equilibrium, protein and nucleic acid biosynthesis and cell proliferation (Kovacevic and Morris 1972; Kovacevic, Jerance et al. 1988; Portais, Voisin et al. 1996; Mates, Perez-Gomez et al. 2002). Consistently, inhibiting glutaminolysis decreases tumor growth (Lobo, Ruiz-Bellido et al. 2000), and glutamine analogues have been tested as anticancer agents (Ahluwalia, Grem et al. 1990).

An increase of both glutaminolysis and glycolysis has been reported in numerous tumor cells, and the two catabolisms can compensate each other under nutrient deprivation. Glutaminolysis is thought to represent an energetic alternative to glucose consumption in glucose-deprived environment (Helmlinger, Sckell et al. 2002). In addition, cellular resistance to glucose deprivation is dependent of the consumption of amino-acids including glutamine (Esumi, Izuishi et al. 2002). Correlations between glycolytic flux rate and glutamine consumption were established (Tannock and Kopelyan 1986; Portais, Voisin et al. 1996).

Several lines of evidence suggested that an insufficient supply of glutamine may occur in tumors. Glutamine is present at the 600-800  $\mu\text{M}$  concentration range in blood (Brody 1994; Bouzier, Quesson et al. 1999). Amino-acids deprivations are more likely to occur in tumor environment as tumor cells exhibit a higher requirement in amino-acids (Inoue, Bode et al. 1995) and specifically in glutamine (Hirayama, Suyama et al. 1987; Souba 1993). Experimental data also support the fact that the presence of glutamine in certain types of tumors come from blood circulation, which suggested an angiogenesis-dependent process for glutamine uptake (Bouzier, Quesson et al. 1999).

As a necessary step to study the influence of nutrients depletion on tumor cell behaviour and adaptive response, we report here a study on the influence of glucose and single amino-acid

restriction on VEGF-A expression. The experimental approach has consisted in using a serum-free culture medium in order to limit the uncontrolled influence of endogenous serum components, including growth factors, that act as stress factors and activate the UPR- and HIF- dependent responsive pathways and modulate the cell behaviour (Barnes and Sato 1980; Sage 1986; Houlgatte, Wion et al. 1989; Zhu, Johansen et al. 1997; Richard, Berra et al. 2000). The serum-free medium allowed the continuous proliferation of a number of normal and transformed cells while maintaining their morphological and biological characteristics (Gospodarowicz 1984; Loo, Rawson et al. 1989; Moenner, Hatzi et al. 1997). Using the A549/8 human lung carcinoma cell model, we investigated the potential implication of amino-acids deprivation in the cell response in solid tumors. In these conditions, we showed that amino-acid deprivations mediate distinct effects from those observed under hypoxia and glucose deprivation. Whereas hypoxia and glucose deprivation are both potent inducers of VEGF-A in A549/8 cells, glutamine or single essential amino-acids deprivation do not lead to the up-regulation of the growth factor. Therefore, amino-acids deprivation likely not represents an essential parameter of the angiogenic response to tumor ischemia.

## Materials and Methods

### Materials

Most of the culture media were from Invitrogen. DME medium without glucose (DMEM F405) was from Merck Eurolab. High-density lipoproteins (HDL) were obtained as described (Loo, Fuquay et al. 1987) and purity criteria of each preparation examined as reported (Moenner, Hatzi et al. 1997). EGF, Insulin, holo-transferrin, fatty acid-free bovine serum albumin (f-BSA), fibronectin, tunicamycin, oligo(dT)<sub>15</sub>, L-amino-acids and glucose were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). L-Threonine was from ICN Biomedicals Inc. Goat and rabbit antibodies against human VEGF-A were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Primers for mRNA detection are as follows: HK-2, forward primer 5'-atc cct gag gac atc atg cg-3'; reverse primer 5'- gcc gtc cgg ggt agc aca-3'. PFKFB3 forward primer 5'- ggt gtg cga cga ccc tac-3'; reverse primer 5'-gta cac gat gcg gct ctg-3'. GADD34, forward primer 5'-gtg gaa gca gta aaa gga gca g-3'; reverse primer 5'-cag caa ctc cct ctt cct cg-3'. EDEM, forward primer 5'gct caa ccc cat cca ctg cc-3'; reverse primer 5'-cca gga ggg aac cgg ctc cc-3'. VEGF-A, forward primer 5'-cga aac cat gaa ctt tct gc-3'; reverse primer 5'-cct cag tgg gca cac act cc-3',  $\beta$ -actin, forward primer 5'-cgt acc act ggc atc gtg at-3'; reverse primer 5'-gtg ttg gcg tac agg tct ttg-3', BiP/GRP78, forward primer 5'-cta ctc ctg cgt cgg cgt gt-3'; reverse primer 5'-cga tga gcc gct tgg cgt-3'. CHOP, forward primer 5'-att gac cga atg gtg aat ctg c-3'; reverse primer 5'-agc tga gac ctt tcc ttt tgt cta-3'. XBP1, forward primer 5'-ctg gaa cag caa gtg gta ga-3'; reverse primer 5'-ctc ctc cag gct ggc agg-3'. All primers were obtained from Prologo France. Other compounds were obtained as reported (Moenner, Hatzi et al. 1997; Drogat, Auguste et al. 2005, submitted).

### Cell cultures

The A549/8 human lung carcinoma cell clone was a generous gift from C-J. S. Edgell (The University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC). Cells were grown in a DMEM/F-12 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100 mg/ml of L-glutamine and 100 U/ml penicilline/100  $\mu$ g/ml streptomycine. Cell propagation in serum-free culture media was performed in culture dishes pre-coated with 20  $\mu$ g/ml of fibronectin. The serum-free medium consists of a DMEM/F-12 medium supplemented with 25  $\mu$ g/ml HDL, 5  $\mu$ g/ml insulin, 5  $\mu$ g/ml transferrin, 2 ng/ml EGF, 1 mg/ml f-BSA and 2 mM glutamine. Cells were propagated in a humidified 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. Hypoxia experiments were performed at 3% O<sub>2</sub> in a Heraeus incubator BB-6060 or at 0.1% O<sub>2</sub> in a cell culture chamber connected to a Pro-Ox-P110 controller (BioSpherix, Reyfield, NY). For proliferation assays, cells were inoculated at low density on 24-well plates in the presence or absence of HDL and stimulated with insulin and EGF at different concentrations. Culture media were replaced every two or three days and cells were counted at the end of the experiments using a cell counter (Coulter). All experiments were performed on subconfluent cells.

### Induction of hypoxia and of glucose- or amino-acids-deprivations

Experiments on glucose deprivation was performed as follows: after a 4-day culture in the complete serum-free medium, cells were washed and incubated for 15 min in DMEM F405 at 37°C. They were then incubated for the indicated period of time in the same medium supplemented with HDL, transferring, f-BSA, glutamine and increasing concentrations of glucose. Conditions of glutamine deprivation were obtained using basal DMEM/F-12 medium. For other amino-acids deprivation experiments, a custom made medium was manufactured by Life Technologies (Life Technologies, France). The medium consists of a standard DMEM/F-12 to which any of the following L-amino-acids was lacking: Arg, His,

Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, and Val. The modified culture medium was herein reported as DMEM/F-12<sup>EAA</sup> and was supplemented with various concentrations of amino-acids as required in the experiments.

#### Measure of VEGF-A by ELISA

Subconfluent cells were incubated in 10-cm dishes for 24h in the indicated culture conditions and VEGF-A in conditioned media was measured by using a commercial VEGF-A ELISA kit assay according to the manufacturer's protocol (R&D Systems). Assays were performed in duplicate or triplicate experiments and calibration curves were obtained with human recombinant VEGF-A. Results were obtained from at least two independent cultures and were analysed using the Softmax Pro 4.0 software (Molecular Devices Corporation).

#### Polymerase chain reaction experiments

Confluent cells were lysed in 78-cm<sup>2</sup> culture dishes using the Trizol Reagent kit (Life Technologies) and total cellular RNA extracted. RNA was then quantified with a UV spectrophotometer and reverse-transcribed by using oligo(dT)<sub>15</sub>: 5 µg total RNA was denatured at 65°C for 5 min, then reverse-transcribed in a final volume of 20 µl containing 4 µl First Strand Buffer (5X), 10 mM DTT, 500 µg/ml oligo(dT)<sub>15</sub>, 10 mM each deoxyribonucleoside triphosphate (dNTPs) and 200 U SuperScript II. The reaction was run for 50 min at 42°C and then stopped by heating at 70°C for 15 min. After reverse transcription, 2 µl of template cDNA was subjected to PCR amplification using 5 µM of each primer and 0.4 U of *Taq* DNA polymerase (Life Technologies) in the PCR mixture (50 µl) containing 1x *Taq* buffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM each deoxyribonucleoside triphosphate (dNTPs). After reverse transcription, 1 µl of template cDNA was subjected to PCR amplification according to the manufacturer's protocol. Amplification began with a polymerase-activating step at 95°C for 5 min, then on cycle at 94°C for 30 s, 60°C for 30 sec, and 72°C for 45 sec, with a final extension step of 5 min at 72°C. PCR products were fractionated by electrophoresis in 3 % agarose gel and quantified using KODAK 1D 3.6 software. The cycle number was chosen in the linear part of the curve during the amplification process. The presence of contaminating genomic DNA was not detected in these experiments. Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (q-PCR) analyses were performed in an MX3000p thermocycler (Stratagene) using the SYBRgreen dye (ABgene, Epsom, U.K.) as reported (Drogat, Auguste et al. 2005, submitted). The relative abundance of transcripts was calculated by using  $\beta$ -*actin* transcript quantity as a standard. The q-PCR was performed in tetraplicate on two or three independent cell cultures. Homogeneity of PCR products was controlled by melting point analyses and gel electrophoresis.

#### Analysis of XBP-1 splicing

Amplification of XBP-1 transcripts was made after reverse transcription by using primers flanking the XBP1 mRNA splice site. PCR products were size-fractionated by electrophoresis in 3 % agarose gel and stained with ethidium bromide before observation.

#### Western Blot Analysis

Subconfluent cells in 10 cm<sup>2</sup> dishes -well plates were scraped and lysed at 4°C in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1.5 % CHAPS, protease inhibitors (Sigma P8340), 1 mM sodium desoxycholate, 1 mM sodium fluoride, pH 8.0). Protein content was determined by using the BCA protein assay kit and BSA as standard. Total cell extracts (100 µg of protein) were loaded into each lane and separated on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Prelabeled molecular weight markers were used as migration standards. After migration, proteins were then transferred to a 0.4-µm nitrocellulose membrane (Amersham) and probed with specific antibodies for human VEGF-A (Santa Cruz Biotechnology). Proteins



were detected with a secondary antibody coupled to horse radish peroxidase (HRP, DAKO) for 1 h at room temperature. Peroxidase activity was revealed by using the ECL reagent (Amersham) followed by autoradiography. Quantitative analyses were performed by using KODAK 1D 3.6 software.

#### Protein synthesis determination

A549 cells were grown up to sub-confluence in serum-free or serum-containing media and were subjected to glucose or to glutamine deprivations. Cells were also incubated in normal atmosphere or in 3% hypoxia. Protein synthesis was measured by radiolabeling cultures with  $^3\text{H}$ -leucine (L-Leucine-[3, 4, 5- $^3\text{H}$ (N)], 170 Ci/mmol, Sigma Chemical Co). Subconfluent A549 cells in 96-well dishes were washed once in DMEM/F-12<sup>EAA</sup> and transferred in medium without glucose or glutamine as described above for 30 min at 37°C. Cells were then incubated in the same medium containing  $^3\text{H}$ -leucine (5  $\mu\text{Ci/ml}$ , 170 Ci/mmol) and the indicated concentrations of glucose or glutamine at 37°C. After a 24-h incubation, cells conditioned medium were replaced by TCA 5% for 20 min at 4°C. After five washes in water, cells were solubilized in NaOH 0.1 M and the  $^3\text{H}$ -leucine incorporation was determined in triplicate by liquid scintillation counting (Beckman LS 1801). Total protein amounts were determined by using the BCA protein assay kit and BSA as standard.

#### Apoptosis measurement

Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry using the tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) mitochondrial selective probe. Briefly, A549/8 cells subjected to glucose deprivation or to glutamine deprivation were incubated at the end of the experiment in hepes-buffer saline (HBS) for 45 min at 37°C in the presence of 0.2 mM TMRM (Sigma, France) and 20  $\mu\text{M}$  verapamil (De Giorgi, Lartigue et al. 2000). Cells were then trypsinized and measurement of apoptosis was performed by flow cytometric analysis (Partec GmbH, Münster) using FloMax software (Partec).

#### Fourier-transform infrared (FT-IR) spectrometry

FT-IR spectrometry was performed in cell-conditioned media for glucose, lactate, and amino-acids determinations as reported (Petibois, Rigalleau et al. 1999; Petibois, Melin et al. 2000; Deleris and Petibois 2003). Thirty five microliters of each solution were deposited within the cell limits of a silicon plate bearing 96 sample cells (Bruker, Germany). The plate was subsequently placed for 75 min into a drying vacuum (2 mm Hg) to evaporate water. The plate was finally put into the analysis compartment of a Bruker Tensor 27 spectrometer equipped with an automated sample carrier (HTS-XT, Bruker), a Globar (MIR) source (7 V), a KBr beam splitter and a DTGS/B detector (18-28°C). Beam diameter at the sample location was 6 mm. In all experiments, a 2.0  $\text{cm}^{-1}$  resolution was used and acquisitions were performed using 32 co-added scans in transmittance. Triplicate spectra were averaged before to perform a curve-fitting of the 1800-1480 and 1300-900  $\text{cm}^{-1}$  spectral ranges. The 1800-1480  $\text{cm}^{-1}$  spectral range allowed to determine the  $\delta(\text{NH}_2)$  absorption of free amino-acids, using the band centered at 1587  $\text{cm}^{-1}$  (Deleris and Petibois 2003). The 1300-900  $\text{cm}^{-1}$  spectral range allowed to determine glucose, glutamine, amino-acids and lactic-acid  $\nu(\text{C-O})$  absorptions using the bands centered at 1084, 1633, 1585 and 1127  $\text{cm}^{-1}$ , respectively (Petibois, Melin et al. 2000). Amino-acids absorptivity was estimated from pure product amino-acids spectra (average of the 21 amino-acids FT-IR spectra from 10 g/L solutions). Glucose and lactic-acid absorptivities were also tested using pure product spectra (5 g/L solution for lactic-acid; 10 g/L solution for glucose). Glucose and amino-acids consumption after 24 hours were

calculated by difference between native and post-culture concentrations within culture media. Lactate production was determined according to its final concentration within culture media.

## Results

### **Serum-free medium allows to propagate human tumor A549/8 cells in culture and to investigate the cellular effect of single nutrient deprivation.**

The serum-free medium contained HDL, insulin, EGF and transferrin, all components for which no significant angiogenic effect was reported *in vivo*. None of these molecules induced VEGF-A up-regulation in A549/8 cells, either alone or in combination with others, as assessed by direct measurement of VEGF-A release in medium using ELISA directed against VEGF-A, or using a gene reporter assay (not shown). Using this medium formulation, the A549/8 cells were consistently propagated for 20 passages (doubling times ~ 20 h), although at a lower rate than in the presence of serum (doubling times ~16 h) (Fig. 1A). The optimal effects of HDL, insulin and EGF were obtained at concentrations above 20 µg/ml, 5 µg/ml, and 2 ng/ml, respectively. HDL did not induce cell proliferation (Fig. 1B), but its presence was an absolute requirement for survival of A549/8 cells (Fig. 1 insert), as cells died after two days in its absence (not shown). Insulin and EGF independently induced cell proliferation, a synergistic effect being obtained with the combination of the two peptides. Holo-transferrin has no apparent short term effect in these experiments, but was nevertheless added in the medium to avoid possible iron depletion in proliferating cells, of which one consequence would be the induction of HIF-1-dependent intracellular responses (Le and Richardson 2002). Using the serum-free culture conditions, we then checked the custom made medium (*i.e.* deprived of essential amino-acids; DMEM/F-12<sup>EAA</sup>) for its ability to obtain reliable nutrient deprivation and to allow cell growth after amino-acids complementation. DMEM/F-12<sup>EAA</sup> was therefore supplemented with each essential amino-acids and compared to the standard DMEM/F-12 medium in its ability to support A549/8 cell growth for three consecutive passages. As shown in Figure 1C, the reconstituted medium has similar ability to grow cells from low density up to confluence than the basal DMEM/F-12 medium. In addition, any single amino-acid deprivation prevents cell growth in a dose dependent-manner (not shown). Thus, experiments based on single nutrient deprivation were achievable without any detectable side effects using these culture conditions.

### **Effect of glutamine deprivation on VEGF-A induction**

Growing cells in serum-free medium provided the opportunity to examine the effect of amino-acid deprivations on VEGF-A expression. For this purpose, we used either the normal DMEM/F-12 medium without glutamine or the modified basal medium DMEM/F-12<sup>EAA</sup> (see methods). As determined by semi-quantitative RT-PCR, decreasing glutamine concentration in the culture medium lead to a neat increase (~ 4-fold) of VEGF-A mRNA in cells after a 24-h incubation either in the presence or in the absence of serum. The two detectable transcripts of VEGF-A (*vegfl21* and *vegfl65*) were equally induced as shown by electrophoresis. A similar inductive effect was obtained on CHOP/GADD153 transcripts in response to the decrease of the glutamine content, except that a 8- to 10-fold amplification factor was obtained in the complete absence of glutamine.

As compared to VEGF-A mRNA expression, the VEGF-A protein release under glutamine deprivation significantly vary according to the culture medium. The basal expression of VEGF-A was much lower in cells grown in serum-free medium than in serum-containing medium (0.3 vs. 1 ng/million cells daily), a result that may be explained by the fact that serum itself induces VEGF-A up-regulation (Brauchle, Funk et al. 1996; Milanini, Vinals et al. 1998). In addition, secretion of VEGF-A decreases when lowering the glutamine content, the growth factor being barely detectable in the complete deprivation of glutamine (Fig. 3A). A significant decrease of total protein synthesis was also observed in these conditions (see below). From low to high concentrations of glutamine, VEGF-A expression level was

consistently higher in cells grown in serum-containing medium than in cells grown in serum-free medium. A dose-dependent effect of glutamine on VEGF-A release was observed in the presence of serum, whereas increasing glutamine from 0.1 up to 2 mM in the absence of serum did not lead to any detectable up-regulation of the growth factor. The effect of glutamine deprivation on VEGF-A protein expression also correlates well with the up-regulation of CHOP mRNA in the two culture conditions (see Fig. 2).

The differences observed in VEGF-A protein expression using cells grown in serum-free or in serum-containing medium under glutamine deprivation were not observed under other stresses conditions including hypoxia or glucose deprivation. As shown in Figure 3B, both hypoxia and glucose deprivation increased VEGF-A expression, the amplification factor of VEGF-A production being higher in cells grown in serum-free medium.

### **Expression of VEGF-A by A549/8 cells subjected to essential amino-acids deprivation**

We then addressed the possibility that essential amino-acids deprivation may induce VEGF-A. Using the modified basal medium DMEM/F-12<sup>EAA</sup> from which only one essential amino-acids was absent, we analyzed the release of VEGF-A in similar conditions as above. Results shown in Table 1 indicated that none of the deprivation led to the up-regulation of the growth factor.

### **Metabolic status of A549/8 cells subjected to nutrient deprivations**

Several parameters of the cellular response to glutamine and to glucose deprivations were analyzed, including the proliferation rate, apoptosis and nutrient consumption. Figure 4A represents the total protein synthesis in cells subjected to different stresses conditions. Values were also reported as a function of the final number of cells. After 24 h of incubation, 40 % vs. 60 % increases in cell numbers were observed in the presence of 0.2 mM and 2 mM glutamine, respectively (not shown). Thus, decreasing the supply of glutamine led to a gradual cell growth arrest. Linear fitting shows a good correlation ( $R=0.87$ ) between protein synthesis and cell number. The consequences of glutamine deprivation were readily detectable below 0.6 mM glutamine. Since the glutamine concentration in human plasma is in the same range of concentration (Brody 1994; Bouzier, Quesson et al. 1999), a limitation of its availability may be expected in tumor avascular tissues. Experiments were also performed under hypoxic conditions and/or in the complete absence of glucose. Under these conditions, protein synthesis inhibition and growth arrest were observed at a much lesser extent. Thus, glutamine deprivation has much more dramatic effects on cell metabolism than glucose deprivation.

Variations of the cell number in these experiments result of two major cellular activities: cell proliferation and apoptosis. In order to get also information on the latter one, we used the TMRM probe distribution as an indicator of the mitochondrial membrane depolarization, an event observed during cell apoptosis (Heiskanen, Bhat et al. 1999). A low apoptotic index (< 3%) was observed in cells after 24 h of incubation under hypoxia, glucose deprivation or under combination of the two stresses (Fig. 4B, upper panel). Measures were also performed with different concentrations of glutamine (Fig. 4B, lower panel). In keeping with results on cell proliferation and protein synthesis, apoptosis was much more elevated under glutamine deprivation than in the absence of glucose or in hypoxic conditions: indeed, 20-25 % of cells were apoptotic under low glutamine (0-0.1 mM) assay conditions.

FT-IR spectrometry was then used to evaluate glucose and amino-acids consumptions as well as lactate production in A549/8 cells that have been subjected to either glucose or glutamine deprivation. Cells in serum-free medium were subjected to nutrient deprivations and conditioned media were then examined by spectral analyses (Fig. 4C). Media obtained under severe glucose deprivation ( $\leq 0.6$  g/l) contained residual amounts of the nutrient after a 24-h

incubation (Fig. 4C, upper panel). Besides, low glucose availability led to the increase of amino-acids consumption. The release of lactate by cells also correlated to the initial available concentration of glucose, and was also detected in low amounts in the complete absence of glucose. This indicates that other metabolic precursors are consumed in these conditions. Similar experiments were performed under glutamine deprivation (Fig. 4C, lower panel). Lowering glutamine availability lead to the increase of both glucose and amino-acids consumption, and also to the decrease of lactate production. This suggests that glutaminolysis significantly contribute to lactate production in these cells. In conclusion, incubating cells with glutamine concentrations below 0.6 mM lead to a number of cellular responses that include the up-regulation of VEGF-A mRNAs, cellular growth arrest, protein synthesis inhibition, and metabolic consumption of amino-acids and glucose.

### **Glutamine deprivation and the UPR signalling pathways**

Glucose deprivation lead to the activation of the UPR-dependent cell signalling in A549/8 cells and also induced VEGF-A expression through HIF-1-independent pathways (Drogat, Auguste et al. 2005, submitted). As glutamine deprivation also induces VEGF-A mRNA up-regulation, its potential effect on HIF-1 $\alpha$  accumulation was therefore analyzed and the expression of the UPR-activated genes *BiP*, *EDEM*, *GADD34* and *CHOP* was determined. A significant decrease of HIF-1 $\alpha$  protein was observed in cells subjected to glutamine deprivation for 4, 8 or 24h, whereas hypoxic conditions induced a consistent accumulation of the transcription factor compared to control conditions (Fig. 5B). The decrease in HIF-1 $\alpha$  content likely depends on the arrest in protein synthesis which is reported above. As shown in Figure 5B, BiP and EDEM transcripts were up-regulated to a small extent only (from 1.5- up to 2-fold increase), which suggests that the IRE-1 and ATF6 trans-membrane proximal sensors of the UPR were not consistently activated in these conditions (Yoshida, Haze et al. 1998; Yoshida, Matsui et al. 2001). More specifically, the slight increase in EDEM transcripts indicated that the IRE1/XBP1-dependent pathway of the UPR signalling was not active, a conclusion that is strengthened by the fact that no significant splicing of XBP1 mRNA occurred in these conditions (Fig. 5C). Besides, GADD34 and GADD153/CHOP mRNAs were highly induced in the absence of glutamine. So far, the expression of GADD34 and CHOP have been associated to the activation of the eIF2 $\alpha$ /ATF4-dependent signaling pathway. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  also lead to the inhibition of protein synthesis, which provide a possible clue to the inhibitory effects observed in A549/8 cells in these conditions.

## Discussion

Ischemia occurs in solid tumors as the consequence of active cancer cell proliferation, leading to the decrease of available oxygen and of various nutrients as well as to the loss of waste removal. Together or separately, these characteristic features of tumor ischemia modulate the cell behaviour and induce stress responses that may direct cells to death by apoptosis or necrosis or, instead, contribute to the aggravation of the tumor phenotype by selecting transformed cell clones that present an increased tolerance to low oxygen conditions or to nutrient starvation (Vaupel, Kallinowski et al. 1989; Dang and Semenza 1999). At the tissue level, hypoxia and glucose deprivation also participate in the development of the angiogenic process to relieve ischemia (Maltepe, Schmidt et al. 1997; Pugh and Ratcliffe 2003), therefore ultimately leading to the unlimited tumor growth.

Glutamine is the most abundant amino acid in tissues and body fluids and represents a major source of carbon and energy in cells. Glutamine can be synthesized by mammal cells and is a non essential amino acid. However, under certain circumstances, especially in cells that exhibit high metabolic rate, its *de novo* synthesis may become insufficient and glutamine is then referred as to a conditional essential amino-acid. This situation is most likely to occur in tumor environment as transformed cells are able to rapidly catabolize glutamine and are considered as avid for this amino-acid (Souba 1993; Medina 2001). Thus, glutamine-limitation is likely to occur at certain stages of tumor development and to influence the metabolic behaviour of tumor cell. Indeed, the glutamine content in xenografted tumors was shown to inversely correlate to the rate of cell proliferation and to be lower in rapidly dividing tumors than in normal tissues (Sebolt and Weber 1984). Under such conditions, blood vessel formation may represent an essential step for the import of exogenous glutamine to tumor tissues (Bouzier, Quesson et al. 1999). Understanding the effects of glutamine deprivation will help to consider tumor adaptation to ischemia. For example, it has been suggested that glycolysis-impaired tumors may use glutamine as an alternative source of energy (Helmlinger, Sckell et al. 2002). The cellular resistance to glucose deprivation is dependent of the consumption of amino acids including glutamine (Esumi, Izuishi et al. 2002). Inhibiting glutaminolysis, the metabolic pathway that produces pyruvate and energy from glutamine, decreases tumor growth (Lobo, Ruiz-Bellido et al. 2000).

Lowering the availability of amino acids lead to a decrease in protein synthesis and to the alteration in mRNA stability and transcription (Marten, Burke et al. 1994; Pain 1994; Aulak, Mishra et al. 1999). We thus aimed to know whether amino-acid deprivation represented an *in vivo* stress that could induced functionally active VEGF-A. We therefore checked for the effects of the deprivation of glutamine and of the essential amino acids Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Thr, Trp, Val, Arg and His, the two later one being essential in the diet of juvenile only. Our results show that in culture, the proliferation rate and protein synthesis of carcinoma cells A549/8 decreases under amino-acid limitation. The effect was significantly observed with glutamine concentration decreasing below 600  $\mu\text{M}$ . As the blood content in glutamine is in the 600-800  $\mu\text{M}$  range (Bouzier, Quesson et al. 1999), a limitation in the supply of this amino acid may occurred in avascular tumor tissues.

A significant increase of VEGF-A mRNA expression was observed in A549/8 cells subjected to glutamine limitation. However, this effect has probably no direct consequence on the VEGF-A mediated angiogenesis process since a detrimental effect of glutamine deprivation on VEGF-A protein expression was observed in parallel in this cell model. Glutamine limitation also lead to apoptosis of A549/8 cells, which is consistent with the effect obtained in other cell types (Petronini, Urbani et al. 1996; Papaconstantinou, Hwang et al. 1998; Mates, Perez-Gomez et al. 2002). VEGF-A mRNA up-regulation in response to glutamine starvation did not resulted of HIF-1 $\alpha$  protein accumulation, as HIF-1 $\alpha$  was not stabilized in such stresses conditions. Rather, the amount of the transcription factor clearly decreases when compared to

control experiments. This effect paralleled the decrease in the total protein synthesis which is observed during glutamine deprivation. A similar result was recently obtained in other cell types subjected to glutamine deprivation in hypoxic conditions, indicating that glutamine deprivation indeed negatively interfere with the HIF-1-dependent response (Kwon, 05, 4694). In addition, glutamine deprivation did not activate the IRE-1 proximal sensor of the UPR, a potent inducer of the up-regulation of VEGF-A expression (Drogat, Auguste et al. 2005, submitted). Indeed, no detection of the spliced form of XBP1 mRNA was observed under these conditions. Besides, EDEM mRNA, whose expression is under the control of XBP1 (Lee, Iwakoshi et al. 2003; Yoshida, Matsui et al. 2003), was not significantly up-regulated. Our studies indicated that nutrient limitations may be consistently studied *in vitro* in the absence of serum. The reported culture conditions allow to optimize the control of metabolic deprivations. We observe that glucose and glutamine deprivations are much more harmful for cell cultured in serum-free medium, compared to cells grown in serum-containing conditions, probably because no alternative or compensatory metabolic pathways are being triggered in the absence of serum components. In addition, we found that VEGF-A mRNA inductions under glucose or glutamine starvations was higher in the serum-free medium. The culture model used in this work is therefore suitable for the analyses of single or combined deprivations.

In conclusion, distinct parameters of ischemia may contribute to VEGF-A induction via partly independent triggering pathways. In addition to the HIF-1-dependent response mediated in hypoxic conditions, A549/8 cells subjected to glucose deprivation undergo an IRE-1 signalling response that also lead to both mRNA and protein VEGF-A induction (Drogat, Auguste et al. 2005, submitted). Finally, glutamine deprivation also activate VEGF-A mRNA accumulation by using alternative activating pathways, although an adverse effect was observed in these condition on protein synthesis. Studies of the cell responses to various stresses under ischemia are of a specific concern for the therapeutic blockade of the angiogenesis process and of the survival cell response.

#### **Acknowledgements :**

We gratefully thank H. Esumi for the gift of phVEGF1 and pSv-nlslacZ plasmids. We are grateful to Drs. De Giorgi and F Ichas for their kind help with apoptosis measurements, and to Z. Ivanovic for help with 0.1 % hypoxia experiments. This work was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, by INSERM and by a grant to M. M. from the Ligue Nationale contre le Cancer, Comité de la Gironde. B.D. was a recipient of the Prix Institut Danone, alimentation et santé 2001.

## LEGEND OF FIGURES

**Figure 1: Long-term propagation of A549/8 cells in serum-free medium.** (A) A549/8 cell-propagation in a basal DMEM/F-12 medium containing 10% FCS (+ FCS) or in the serum-free medium (- FCS) consisting of DMEM/F-12 supplemented with 25 µg/ml HDL, 5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin, 2 ng/ml EGF and 1 mg/ml f-BSA. (B) Effects of HDL, insulin and EGF on the proliferation of A549/8 cells in serum-free medium. Cells were inoculated at 10,000 cells/cm<sup>2</sup> in serum-free medium as above and in the presence or absence of insulin and EGF. After 5 days of culture, cells were trypsinized and counted using a cell counter. The error bars correspond to standard deviations of triplicate analyses. Insert represent the morphology of A549/8 cells grown in serum-free medium with or without HDL. Cells were observed by phase-contrast microscopy after fixation and staining with May-Grünwald-Giemsa.

**Figure 2: Effect of glutamine deprivation on VEGF-A mRNA expression in A549/8 cells.** A549/8 cells were incubated for 24 h in serum-containing or in serum-free medium without EGF and insulin and in the presence of various concentrations of glutamine. After a 24-h incubation, expression of VEGF-A, CHOP, and β-actin mRNAs was determined by semi-quantitative RT-PCR. A typical electrophoretic pattern is presented. Quantitative data were obtained from a total of different 3 runs of reverse transcriptase and PCR. Values correspond to the sum of the expression of VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>165</sub> transcripts. Results were normalized using β-actin as standard, one arbitrary unit (AU) corresponding to mRNA expression by cells in normal conditions and in the presence of 10 % FBS.

**Figure 3: Effect of glutamine deprivation on VEGF-A protein release.**

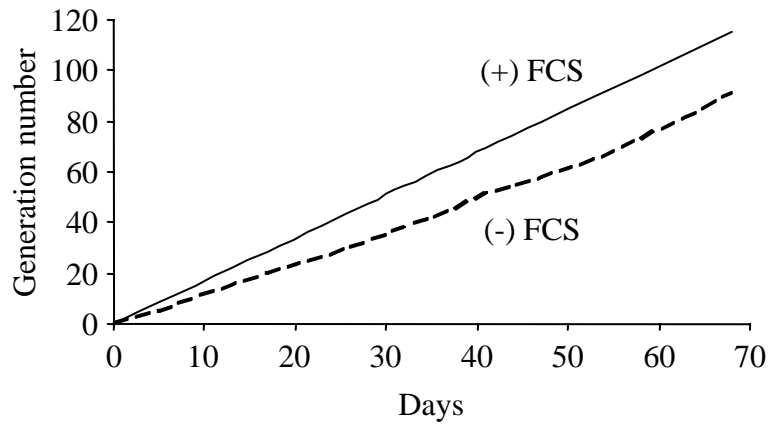
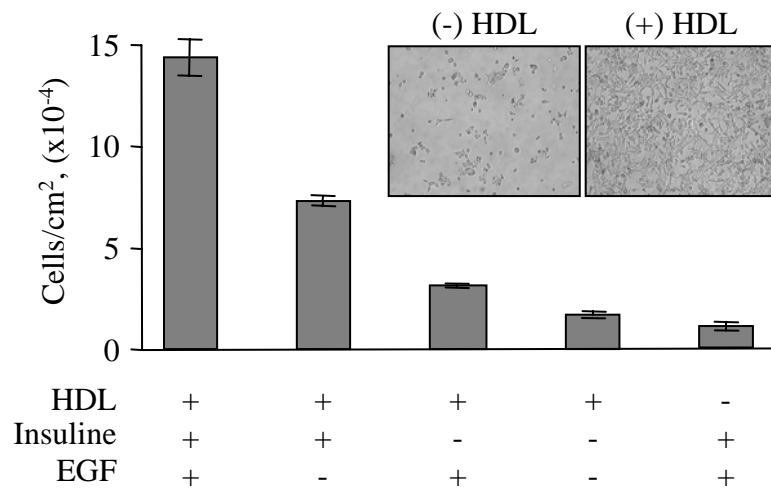
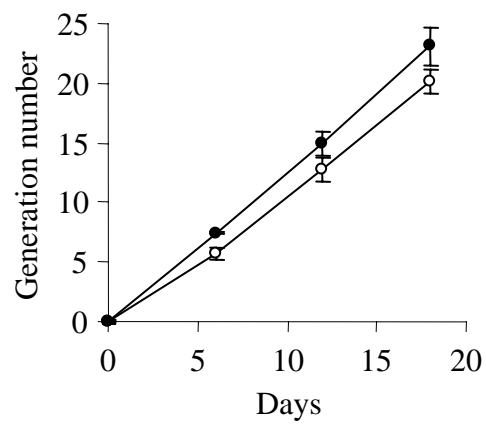
A) A549/8 cells were incubated for 24 h in serum-containing (open bars) or in serum-free (closed bars) medium and in the presence of various concentrations of glutamine. Expression of VEGF-A was determined by ELISA in cell-conditioned media. B) Expression of VEGF-A by A549/8 cells subjected to hypoxia and to glucose deprivation in serum-free and serum-containing media. A549/8 cells were incubated for 24 h in serum-containing (open bars) or in serum-free (closed bars) medium in normoxic condition (Ctrl), under hypoxia (Hx), glucose deprivation (Hg) or hypoxia and glucose deprivation (Hx/Hg). Conditioned media were collected and VEGF-A content was quantified by ELISA. Mean results were obtained from triplicate culture cells. The error bars corresponds to standard deviation for each determination.

**Figure 4: Metabolic status of A549/8 cells subjected to glutamine and to glucose deprivations.** A549/8 cells were incubated for 24 h in serum-free medium without EGF and insulin and in the presence of different concentrations of glucose or glutamine. A) Effect of glutamine deprivation and of different stresses on protein synthesis and on cell growth. Cells were incubated in (96-well plates) in the presence of decreasing amounts of glutamine (2, 0.6, 0.2, 0.1 and 0 mM; values reported in parenthesis), or under hypoxic-, hypoglycaemic or hypoxic/hypoglycaemic condition (Hx/Hg). Protein synthesis was measured by incorporation of <sup>3</sup>H-leucine into TCA-insoluble material. Cells were numerated at the end of the experiment. Error bars correspond to standard deviations of triplicate determinations, B) Apoptosis measurement. Cells were incubated in (24-well plates) for 24 h under the indicated conditions. Cells undergoing mitochondrial depolarization were assimilated to apoptotic cells and were identified in the total cell population by flow cytometry using the TMRM reagent. Upper panel: cells grown in control conditions (CTRL) or subjected either to hypoxia (Hx),

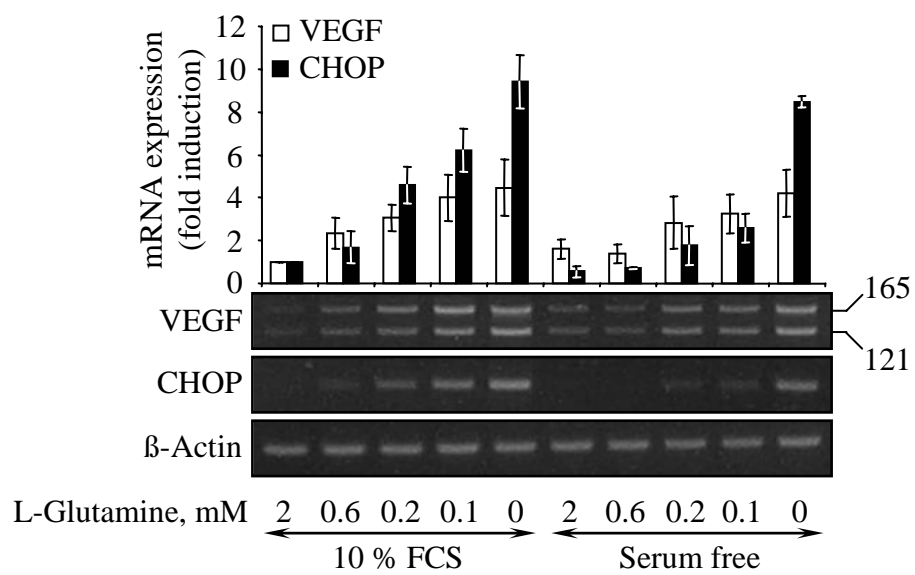


glucose deprivation (Hg) or to hypoxia plus glucose deprivation (Hx/Hg). Lower panel: cells incubated with various concentration of glutamine. Values are the mean value  $\pm$  SD of three determinations. C) FT-IR spectrometric analyses were performed on conditioned media of A549/8 cells incubated for one day in 24-well plates in the presence of various concentrations of glucose (upper panel) or glutamine (lower panel). Amino-acids, lactate and glucose contents were evaluated at the end of the experiment and represented as a function of the initial concentrations of glucose and glutamine in the medium. Analyses were performed in triplicate and FT-IR spectra were averaged. The 1700-1480  $\text{cm}^{-1}$  spectral range was used to determine variation of the absorption of free amino-acids, using the band centered at 1585  $\text{cm}^{-1}$ . The 1300-900  $\text{cm}^{-1}$  spectral range was analyzed to determine glucose and lactic-acid  $\nu(\text{C-O})$  absorptions, using the bands centered at 1084 and 1127  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. The band centered at 1633  $\text{cm}^{-1}$  was used to determine variation of the absorption of glutamine.

**Figure 5: UPR and HIF-1-dependent signalling pathways in A549/8 cells subjected to glutamine deprivation.** A) HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  were not induced in cells submitted to glutamine deprivation. A549/8 cells were incubated in serum-free medium and the presence of the transcription factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  was examined by Western blot analyses after migration on a 8 % PAGE using anti-HIF-1 $\alpha$  and anti-HIF-2 $\alpha$  antibodies. Hundred micrograms of total protein extract were loaded in each well and  $\beta$ -actin (not shown) was used as the internal control. B) The expression of the UPR-induced genes *BiP/GRP78*, *EDEM*, *GADD34* and *CHOP* was comparatively analyzed by real-time quantitative PCR in A549/8 cells incubated 24 h in serum-containing (10% FCS) or serum-free medium and in the presence or absence of glutamine. VEGF-A mRNA expression (sum of intensities of VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>165</sub> mRNAs) was also measured. Logarithmic scale was used to represent the fold-amplification of gene transcripts. Results were normalized using  $\beta$ -actin mRNA detection. The dotted line represents basal values (x1 amplification) of transcripts expression obtained in the presence of 2 mM glutamine (control conditions). Values above bars correspond to the amplification factor. C) XBP-1 mRNA splicing analyzes by RT-PCT. A549/8 cells were exposed for 4 h to hypoxia (Hx), to the presence of 5  $\mu\text{g/ml}$  tunicamycin (TUN) or to glutamine deprivation. PCR analyses and electrophoresis were performed as indicated in material and methods. Xbp1<sup>u</sup> and Xbp1<sup>s</sup> correspond to the unspliced and spliced forms of the transcripts, respectively.

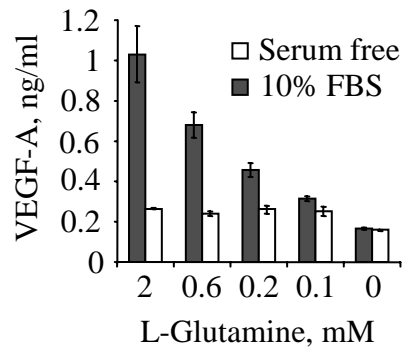
**A****B****C**

Drogat et al., Figure 1

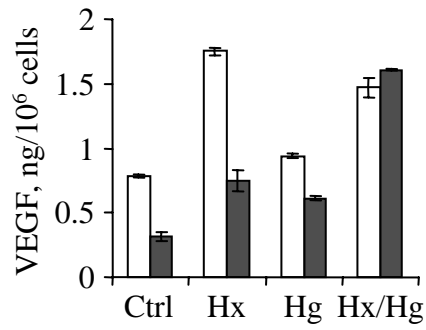


Drogat et al., Figure 2

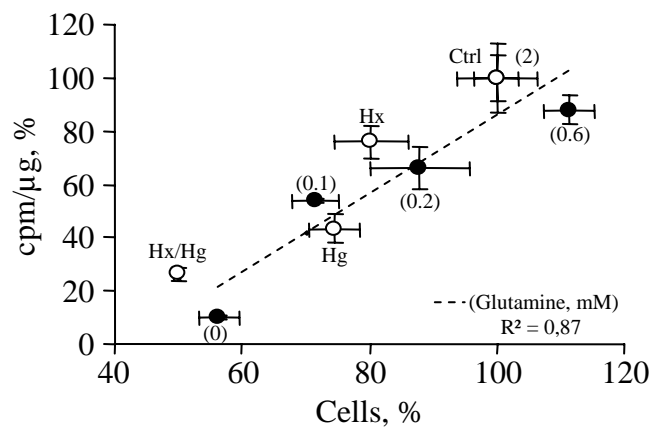
**A**



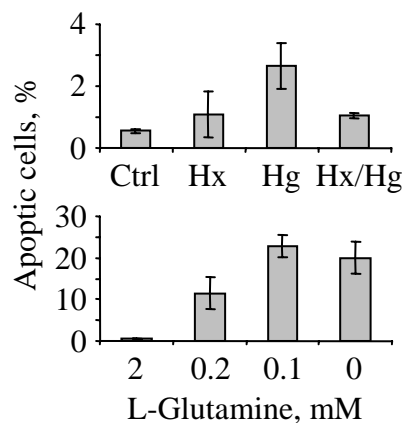
**B**



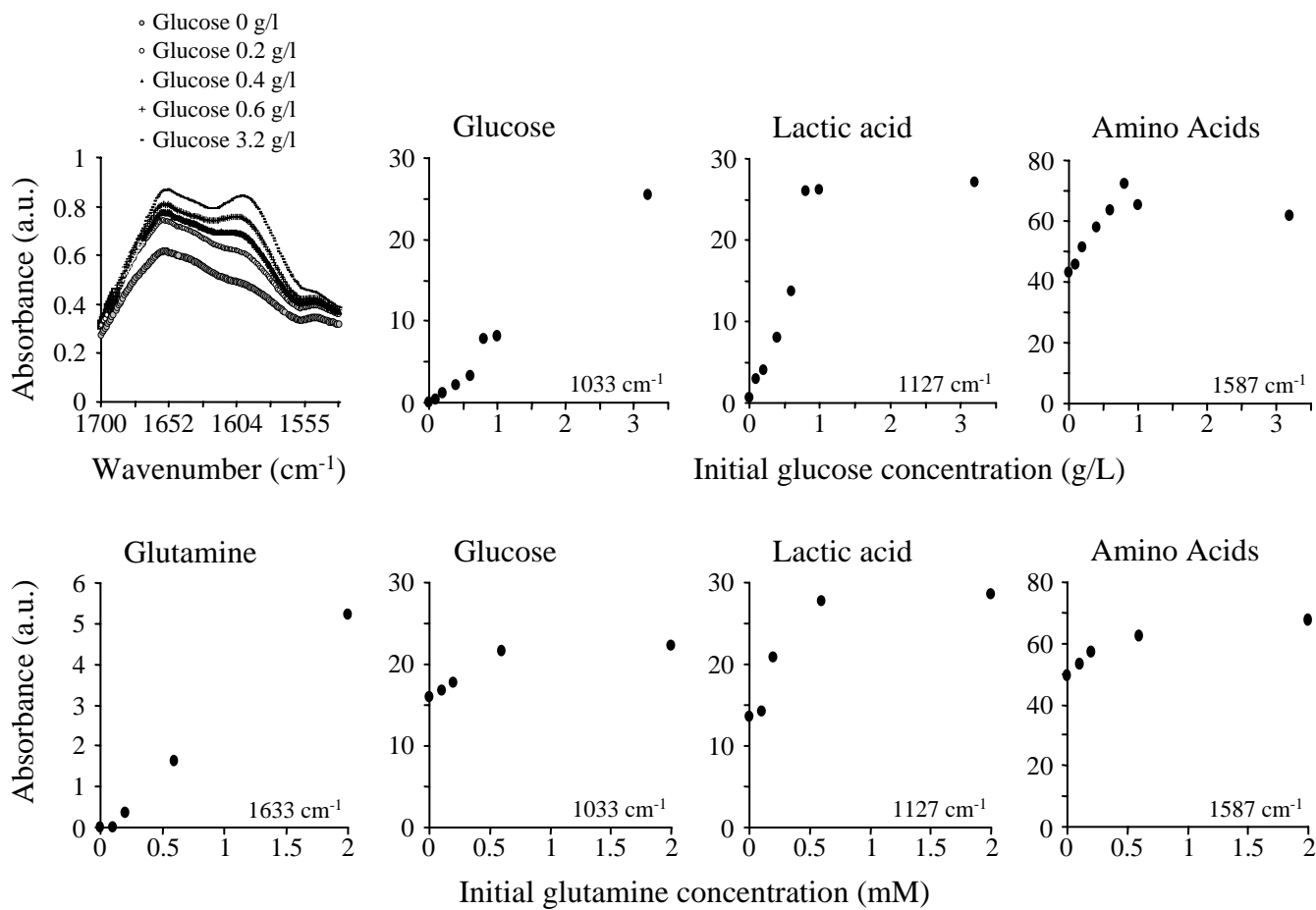
**A** serum free medium



**B**

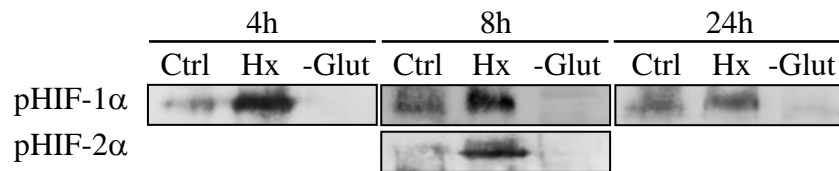


**C**

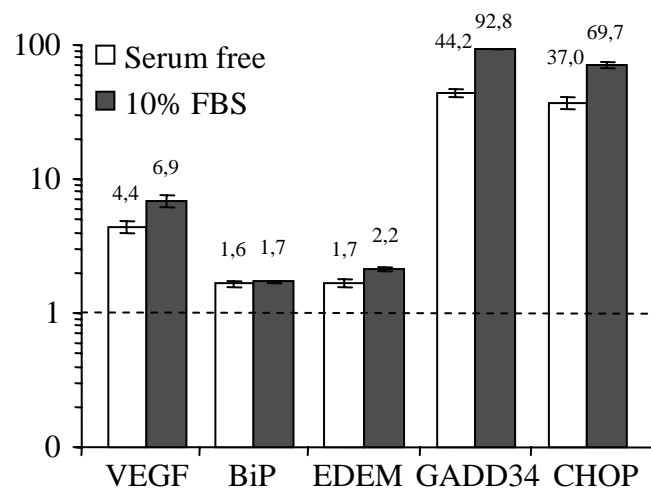


Drogat et al., Figure 4

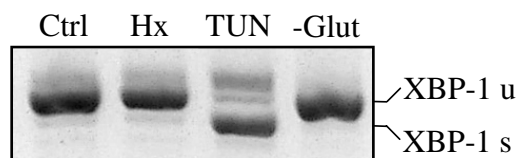
**A**



**B**



**C**



<b>Essential Amino-acid</b>	<b>VEGF-A release (% of the control <math>\pm</math> STD)</b>		
Control	100.0	$\pm$	10.6
Glutamine	76.6	$\pm$	11.8
Arginine	81.6	$\pm$	6.6
Histidine	90.9	$\pm$	15.9
Isoleucine	86.6	$\pm$	18.2
Leucine	80.1	$\pm$	20.9
Lysine	89.8	$\pm$	14.5
Methionine	81.2	$\pm$	8.0
Phenylalanine	79.6	$\pm$	24.3
Threonine	80.6	$\pm$	7.7
Tryptophane	86.1	$\pm$	10.8
Valine	81.4	$\pm$	12.9

**Table 1: Release of VEGF-A by A549/8 cells subjected to single amino-acids depletion in serum-containing medium.** A549/8 cells were grown to confluence in the complete serum-free medium and incubated for 40 h in the same culture medium deprived of a single essential amino-acid. Expression of VEGF-A was then measured in cell-conditioned media by ELISA. The 100 % value corresponds to the value obtained in the presence of every amino-acids (control experiment).

## References

- Ahluwalia, G. S., J. L. Grem, et al. (1990). "Metabolism and action of amino acid analog anti-cancer agents." *Pharmacol Ther.* 46: 243-271.
- Aulak, K. S., R. Mishra, et al. (1999). "Post-transcriptional regulation of the arginine transporter Cat-1 by amino acid availability." *J. Biol. Chem.* 274: 30424-30432.
- Barnes, D. and G. Sato (1980). "Serum-free cell culture : a unifying approach." *Cell* 22: 649-655.
- Board, M., S. Humm, et al. (1990). "Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells." *Biochem J* 265(2): 503-9.
- Bouzier, A. K., B. Quesson, et al. (1999). "[1-(13)C]glucose metabolism in the tumoral and nontumoral cerebral tissue of a glioma-bearing rat." *J Neurochem.* 72: 2445-2455.
- Brauchle, M., J. O. Funk, et al. (1996). "Ultraviolet B and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes." *J. Biol. Chem.* 271: 21793-21797.
- Brody, T. (1994). *Nutritional biochemistry*, Academic Press, Inc.
- Dang, C. V. and G. L. Semenza (1999). "Oncogenic alterations of metabolism." *Trends Biochem Sci* 24(2): 68-72.
- De Giorgi, F., L. Lartigue, et al. (2000). "Electrical coupling and plasticity of the mitochondrial network." *Cell Calcium* 28(5-6): 365-70.
- Deleris, G. and C. Petibois (2003). "Applications of FT-IR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring." *Vib Spectrosc.* 32: 129-136.
- Drogat, B., P. Auguste, et al. (2005, submitted). "IRE1 signaling is essential for ischemia-induced VEGF-A expression and is involved in tumour growth and angiogenesis in vivo."
- Esumi, H., K. Izuishi, et al. (2002). "Hypoxia and nitric oxide treatment confer tolerance to glucose starvation in a 5'-AMP-activated protein kinase-dependent manner." *J Biol Chem.* 277: 32791-32798.
- Forsythe, J. A., B. H. Jiang, et al. (1996). "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1." *Mol Cell Biol* 16(9): 4604-13.
- Gospodarowicz, D. (1984). Preparations and uses of lipoproteins to culture normal diploid and tumor cells under serum-free conditions. *Cell culture methods for molecular and cell biology*. D. W. S. Barnes, D. A.; Sato, G. H. New York, Alan R. Liss, Inc. 1: 69-86.
- Heiskanen, K. M., M. B. Bhat, et al. (1999). "Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells." *J Biol Chem.* 274: 5654-5658.
- Helmlinger, G., A. Sckell, et al. (2002). "Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism." *Clin Cancer Res* 8(4): 1284-91.
- Hirayama, C., K. Suyama, et al. (1987). "Plasma amino acid patterns in hepatocellular carcinoma." *Biochem Med Metab Biol.* 38: 127-133.
- Houlgatte, R., D. Wion, et al. (1989). "Levels of nerve growth factor secreted by rat primary fibroblasts and iris transplants are influenced by serum and glucocorticoids." *Dev. Brain Res.*(47): 171-179.
- Inoue, Y., B. P. Bode, et al. (1995). "Enhanced hepatic amino acid transport in tumor-bearing rats is partially blocked by antibody to tumor necrosis factor." *Cancer Res.* 55: 3525-3530.
- Kovacevic, Z., D. Jerance, et al. (1988). "The role of glutamine oxidation and the purine nucleotide cycle for adaptation of tumour energetics to the transition from the anaerobic to the aerobic state." *Biochem J* 252: 381-386.



- Kovacevic, Z. and H. P. Morris (1972). "The role of glutamine in the oxidative metabolism of malignant cells." *Cancer Res* 32(2): 326-33.
- Lazo, P. A. (1981). "Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumour cells." *Eur J Biochem* 117(1): 19-25.
- Le, N. T. and D. R. Richardson (2002). "The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells." *Biochim Biophys Acta* 1603(1): 31-46.
- Lee, A. H., N. N. Iwakoshi, et al. (2003). "XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response." *Mol Cell Biol* 23(21): 7448-59.
- Lobo, C., M. A. Ruiz-Bellido, et al. (2000). "Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumourigenicity of tumour cells." *Biochem J.* 348: 257-261.
- Loo, D., C. Rawson, et al. (1989). Primary and multipassage culture of mouse embryo cells in serum-containing and serum-free media. Oxford, England, IRL Press.
- Loo, D. T., J. I. Fuquay, et al. (1987). "Extended culture of mouse embryo cells without senescence: inhibition by serum." *Science* 236: 200-202.
- Maltepe, E., J. V. Schmidt, et al. (1997). "Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT." *Nature* 386: 403-407.
- Marten, N. W., E. J. Burke, et al. (1994). "Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells." *FASEB J.* 8: 538-544.
- Marx, E., W. Mueller-Klieser, et al. (1988). "Lactate-induced inhibition of tumor cell proliferation." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 14(5): 947-55.
- Mates, J. M., C. Perez-Gomez, et al. (2002). "Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and proliferation/death." *Int J Biochem C Biol* 34: 439-458.
- Medina, M. A. (2001). "Glutamine and cancer." *J Nutr.* 131: 2539S-2542S.
- Milanini, J., F. Vinals, et al. (1998). "p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts." *J Biol Chem* 273(29): 18165-72.
- Moenner, M., E. Hatzi, et al. (1997). "Secretion of ribonucleases by normal and immortalized cells grown in serum-free culture conditions." *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 33: 553-561.
- Pain, V. M. (1994). "Translational control during amino acid starvation." *Biochimie* 76: 718-728.
- Papaconstantinou, H. T., K. O. Hwang, et al. (1998). "Glutamine deprivation induces apoptosis in intestinal epithelial cells." *Surgery* 124(2): 152-159.
- Petibois, C., A. M. Melin, et al. (2000). *J Lab Clin Med* 135: 210-215.
- Petibois, C., A. M. Melin, et al. (2000). Glucose and lactate concentration determination on single microsamples by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Lab Clin Med.* 135: 210-5.
- Petibois, C., V. Rigalleau, et al. (1999). *Clin Chem* 45: 1530-1535.
- Petronini, P. G., S. Urbani, et al. (1996). "Cell susceptibility to apoptosis by glutamine deprivation and rescue: survival and apoptotic death in cultured lymphoma-leukemia cell lines." *J. Cell Physiol.* 169: 175-185.
- Portais, J. C., P. Voisin, et al. (1996). "Glucose and glutamine metabolism in C6 glioma cells studied by carbon 13 NMR." *Biochimie* 78: 155-164.
- Pugh, C. W. and P. J. Ratcliffe (2003). "Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system." *Nat Med* 9(6): 677-84.
- Rak, J. and J. L. Yu (2004). "Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular "supply" and vascular "demand"." *Semin Cancer Biol* 14(2): 93-104.

- Reitzer, L. J., B. M. Wice, et al. (1979). "Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells." *J Biol Chem* 254(8): 2669-76.
- Richard, D. E., E. Berra, et al. (2000). "Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem* 275(35): 26765-71.
- Sage, H. (1986). "Culture shock. Selective uptake and rapid release of a novel serum protein by endothelial cells in vitro." *J. Biol. Chem.* 261: 7082-7092.
- Sebolt, J. S. and G. Weber (1984). "Negative correlation of L-glutamine concentration with proliferation rate in rat hepatomas." *Life Sci.* 34(3): 301-6.
- Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* 3(10): 721-32.
- Shweiki, D., M. Neeman, et al. (1995). "Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(3): 768-72.
- Souba, W. W. (1993). "Glutamine and cancer." *Ann. Surg.* 218: 715-728.
- Tannock, I. F. and I. Kopelyan (1986). "Influence of glucose concentration on growth and formation of necrosis in spheroids derived from a human bladder cancer cell line." *Cancer Res* 46(6): 3105-10.
- Vaupel, P. and M. Hockel (2000). "Blood supply, oxygenation status and metabolic micromilieu of breast cancers: characterization and therapeutic relevance." *Int J Oncol* 17(5): 869-79.
- Vaupel, P., F. Kallinowski, et al. (1989). "Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review." *Cancer Res* 49(23): 6449-65.
- Yoshida, H., K. Haze, et al. (1998). "Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors." *J Biol Chem* 273(50): 33741-9.
- Yoshida, H., T. Matsui, et al. (2003). "A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response." *Dev Cell* 4(2): 265-71.
- Yoshida, H., T. Matsui, et al. (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." *Cell* 107(7): 881-91.
- Yun, H., M. Lee, et al. (2005). "Glucose deprivation increases mRNA stability of vascular endothelial growth factor through activation of AMP-activated protein kinase in DU145 prostate carcinoma." *J Biol Chem* 280(11): 9963-72.
- Zhu, C., F. E. Johansen, et al. (1997). "Interaction of ATF6 and serum response factor." *Mol Cell Biol* 17(9): 4957-66.





## **2. La voie de signalisation dépendante de IRE1 est indispensable à l'induction du VEGF-A en réponse à l'ischémie tumorale**

(Article n°2)

Les tumeurs solides se développent initialement en absence de vascularisation et sont soumises à divers stress cellulaires constituant autant de paramètres de l'ischémie tumorale. Les cellules tumorales répondent à ces stress en déclenchant des voies de signalisation diverses qui peuvent contribuer à la commutation angiogénique et au développement tumoral. Parmi ces stress, l'hypoxie tissulaire a été le plus étudié. Elle induit diverses réponses cellulaires incluant des adaptations métaboliques et la résistance à l'apoptose ainsi que des réponses tissulaires comme l'angiogenèse tumorale et les métastases (Semenza 2003). Un autre paramètre critique de l'ischémie tumorale, la limitation en glucose, est à l'origine d'événements cellulaires métaboliques variés pouvant avoir des conséquences sur la survie et l'agressivité tumorale (Spitz *et al.* 2000; Kaufman *et al.* 2002; Hardie 2003). L'hypoxie et la carence en glucose sont impliquées dans l'induction de l'expression du facteur angiogénique VEGF-A (Shweiki *et al.* 1995). Cependant si les mécanismes d'induction du VEGF-A en condition d'hypoxie sont bien connus et sont contrôlés par HIF-1 (Semenza 2003), les carences de glucose font intervenir des mécanismes peu connus et pouvant être indépendants de la signalisation dépendante de HIF (Iyer *et al.* 1998; Kotch *et al.* 1999). Ces deux paramètres de l'ischémie tumorale sont également à l'origine d'une réponse cellulaire caractéristique du stress du RE appelée UPR (unfolded protein response) (Kaufman *et al.* 2002) pouvant moduler différents aspects du développement tumoral (Ma and Hendershot 2004).

Les objectifs de ce travail ont d'abord été de mieux caractériser les mécanismes menant à l'induction du VEGF-A en absence de glucose en comparaison avec l'hypoxie. Puis en considérant que ces deux stress induisent le VEGF-A (Abcouwer *et al.* 2002), nous avons étudié l'implication de la signalisation UPR dans l'expression de ce facteur et lors du développement tumoral.

Afin d'inactiver la voie de signalisation cellulaire associée au stress du RE et dépendante d'IRE1, différentes lignées de cellules tumorales ont été transfectées avec un vecteur permettant la surexpression d'un dominant négatif (DN) de cette protéine. Nous avons utilisé deux constructions différentes de dominants négatifs : dans la première, les domaines cytosoliques à activité sérine/thréonine kinase et endoribonucléase ont été remplacés par la protéine adaptatrice Nck1 ; dans la deuxième, une mutation K599A inhibe le

domaine protéine kinase de IRE1. Ces DN conservent la capacité de lier la protéine chaperonne BiP et de se dimériser avec les protéines IRE1 endogènes en bloquant leurs activités.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont présentés dans l'article n°2 : « *IRE1 signaling is essential for ischemia-induced VEGF-A expression and is involved in angiogenesis and tumour growth in vivo.* » et dans les résultats complémentaires présentés page 169.

Dans ce travail nous montrons que les cellules humaines de carcinome pulmonaire A549/8 soumises à des limitations en glucose ou à des conditions d'hypoxie induisent une augmentation des messagers et des protéines du VEGF-A. L'absence de glucose provoque une induction du VEGF-A qui n'est pas corrélée avec l'accumulation des facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2 et qui n'active pas la voie dépendante de HIF-1, contrairement à ce que l'on observe en hypoxie. En carence de glucose, le VEGF-A est sécrété sous une forme déglycosylée et active. Enfin, en réponse à une carence de glucose, mais pas en hypoxie, l'augmentation des ARNm du VEGF-A est corrélée à l'induction de la transcription de gènes sous la dépendance de l'UPR (BiP, CHOP, GADD34, EDEM) ainsi qu'à l'épissage non conventionnel de XBP-1. L'expression d'EDEM et l'épissage d'XBP1 sont des événements spécifiques de la voie de signalisation UPR dépendante de IRE1 (Schroder and Kaufman 2005a).

Dans différentes lignées de cellules tumorales (A549/8, U87 et C6) surexprimant un transgène IRE1-DN, l'expression des messagers du VEGF-A diminue significativement en absence de glucose mais également en condition d'hypoxie. De plus, l'induction du VEGF-A est totalement inhibée en réponse à ces deux stress dans des fibroblastes embryonnaires de souris déficients pour IRE1 (IRE1<sup>-/-</sup>), contrairement à ce qui est observé dans des cellules de type sauvage (IRE1<sup>+/+</sup>).

En utilisant le modèle *in vivo* de la membrane chorion-allantoïdienne de poulet, nous montrons que les tumeurs A549/8 IRE1-DN surexpriment le VEGF-A plus tardivement que les tumeurs A549/8 de type sauvage. La formation de vaisseaux est significativement ralentie dans les tumeurs A549/8 IRE1-DN. Les gènes BiP et CHOP sont activés dans les deux types de tumeurs tandis que ceux dépendants de HIF-1 (PFKFB3 et HK-2) ne sont pas induits. Enfin, des cellules de gliome humain U87 IRE1-DN implantées dans le cerveau de souris « *nude* » forment des tumeurs 2 à 4 fois plus petites que celles provenant de cellules U87 de type sauvage.

Ainsi, nous montrons ici que des stress ischémiques distincts peuvent mener à la surexpression du VEGF-A par des voies en partie distinctes. IRE1 apparaît ici comme un dénominateur commun de l'induction du VEGF-A par la voie de signalisation UPR et celle dépendante de HIF-1.

Nos résultats montrent également que la signalisation UPR représente une réponse métabolique essentielle de l'ischémie tumorale et identifient IRE1 comme une cible thérapeutique potentielle pouvant contrôler l'induction de l'angiogenèse ainsi que le développement des tumeurs solides *in vivo*.

**Article n°2**  
(Soumis)





## **ARTICLE n° 2**



# **IRE1 signaling is essential for ischemia-induced VEGF-A expression and is involved in angiogenesis and tumour growth *in vivo*.**

Drogat B.<sup>1</sup>, Auguste P.<sup>1,2,\*</sup>, Nguyen DT.<sup>2,\*</sup>, Bouchecareilh M.<sup>1</sup>, Pineau R.<sup>1</sup>, Nalbantoglu J.<sup>3</sup>, Chevet E.<sup>2,¶</sup>, Bikfalvi A.<sup>1</sup>, and Moenner M.<sup>1,¶</sup>

<sup>1</sup>Inserm E0113, Université Bordeaux-I, Avenue des Facultés, Talence, France, <sup>2</sup>Organelle Signaling Lab, Depts of Surgery and <sup>3</sup>Neurology and Neurosurgery, McGill University Montreal, Quebec, Canada.

<sup>¶</sup>Correspondence to: M. Moenner, Tel: (33) 540 008 925. Fax: (33) 540 008 705. E-mail: [m.moenner@angio.u-bordeaux1.fr](mailto:m.moenner@angio.u-bordeaux1.fr); E. Chevet Tel: (514) 934-1934 ext 35468. Fax (514) 843-1411. E-mail: [eric.chevet@mcgill.ca](mailto:eric.chevet@mcgill.ca), \* equally contributed to this work

**Running title:** IRE1 signaling in tumour cells

Abbreviations: VEGF, vascular endothelial growth factor; f-BSA, fatty-acid free bovine serum albumin; FBS, fetal bovine serum

**Key words:** angiogenesis, endoplasmic reticulum stress, tumour cells, glucose deprivation, hypoxia

**In solid tumours, cancer cells subjected to ischemic conditions trigger distinct signaling pathways which contribute to the angiogenic switch and tumour development. The hypoxic component of ischemia leads to the well-documented activation of HIF-1-dependent signaling pathways. Alternatively, glucose deprivation, another feature of tumour ischemia, has been shown to induce a set of complex intracellular signaling events known as the Unfolded Protein Response (UPR). In this study, we demonstrate that IRE1 activation and signaling is a common molecular determinant linking hypoxia- and hypoglycemia- dependent responses to the upregulation of VEGF-A in various tumour cell models and in mouse embryonic fibroblasts. Indeed, tumour cells expressing a dominant-negative IRE1 transgene as well as *Ire1 $\alpha$* -null mouse embryonic fibroblasts were unable to trigger VEGF-A upregulation upon either hypoxic conditions or glucose deprivation. Expectedly, these data correlated with a reduction of tumour angiogenesis and growth *in vivo*. Our results demonstrate the essential role played by IRE1 in response to ischemia in tumour cells and identify this protein**

**as a potential therapeutic target to control both the angiogenic switch and tumour development.**

Solid tumours initially develop in the absence of vascularization and are subjected to various growth constraints generated during tumour ischemia. Amongst those, a decrease in oxygen pressure in tissues induces a pleiotropic cellular response which includes metabolic adaptation, apoptosis and angiogenesis, mainly through stabilization and accumulation of the hypoxia-inducing transcription factor HIF-1 $\alpha$  (1). Alternatively, limited glucose supply triggers a complex and diversified primary response including ATP depletion (2), expression of proteins and lipids that exhibit altered profiles of glycosylation (3,4), and release of reactive oxygen species (ROS) (5). These in turn may have different metabolic consequences in the control of cellular redox potential, protein trafficking and more generally in tumour cell survival and aggressiveness (5-7). Both glucose deprivation and hypoxia activate a characteristic stress signaling pathway in the endoplasmic reticulum (ER) named the unfolded protein response (UPR) (7). The significance of the UPR in mammals has

been reported in several physiological and pathophysiological situations (6,8).

The UPR consists of a translational attenuation process and of a transcriptional activation of specific target genes mainly encoding regulatory proteins such as resident molecular chaperones. These events are under the control of three major transmembrane resident types of proteins, namely the PRK-like ER kinase (PERK), the activating transcription factor-6 (ATF-6), and the inositol-requiring enzymes 1 (isoforms IRE1 $\alpha$  and IRE1 $\beta$ ) (8). Upon ER stress, PERK activation leads to the rapid phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 $\alpha$  (9) which in turn leads to translation attenuation. PERK activation has been linked to translation inhibition under hypoxic stress (10). IRE1 proteins possess both intrinsic protein kinase and endoribonuclease activities in their cytosolic domain. Upon ER stress, the RNase splices an unconventional intron in the X-box-binding protein 1 (XBP1) mRNA which leads to a frame shift resulting in the translation of a stable transcription factor involved in the transcription of ER regulatory proteins such as EDEM (11). Recently, XBP1 has been shown to be essential to the survival of transformed cells in response to hypoxia (12).

VEGF-A is a proangiogenic protein essential to vasculogenesis and normal angiogenesis and also a key determinant of tumour neovascularization (13,14). Physiological stresses inflicted to tumours in ischemic conditions such as hypoxia (15,16), nutrient deprivations (16-18), acidosis (19) or the increase of ROS (20) induce VEGF-A expression as part of the tumour response to ischemia and therefore may each contribute to tumor vascularization and development. However, at the moment, it is not clear whether the respective intracellular signaling pathways triggered in response to these stresses share any common metabolic determinants, therefore impeding the research of multivalent therapeutic agents. For example, hypoxia mediates VEGF-A expression

through HIF-1-dependent transcriptional activation (21,22). Besides, VEGF-A upregulation in response to glucose deprivation is HIF-1 independent in several (18,23-25), but not all (26-28) cell models. An increase of the stability of VEGF-A transcripts has been reported under both stresses in tumour cells (16,18,29). Thus far, although the intracellular events leading to VEGF-A up-regulation in response to glucose deprivation remain poorly characterized, a role for the AMP-dependent protein kinase has been suggested (18).

Considering that both hypoxia and glucose deprivation activate the UPR, and since VEGF-A is also a transcriptional target of ER stressors such as tunicamycin or thapsigargin (17), we tested whether the UPR could represent a critical parameter in the regulation of VEGF-A expression in tumour development. Here, we demonstrate that the ER proximal signaling molecule IRE1 is a key regulator of VEGF-A expression upon hypoxia and hypoglycemia in three different tumour cell lines. In addition, we show that IRE1 is involved in tumour growth and angiogenesis *in vivo*. We propose a model in which IRE1 may represent a ubiquitous signaling component of tumour cells growth and plasticity.

## Experimental Procedures

**Reagents** - Culture media were from Invitrogen. DME medium without glucose (DMEM F405) was from Merck Eurolab. High-density lipoproteins (HDL) were obtained as previously described (30). EGF, Insulin, holo-transferrin, fatty acid-free bovine serum albumin (f-BSA), fibronectin and tunicamycin were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Human VEGF<sub>165</sub>-encoding baculovirus was a kind gift of Dr. Jean Plouet (CRCIL-Unité 689, Paris, France). Desmine mouse monoclonal antibodies were from Dako. FITC-SNA-1 was from Vector Laboratories. Goat and rabbit antibodies against human VEGF-A were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. All the primers used in this study

(Supplementary Table 1) were purchased either from Proligo (France) or AlphaDNA (Canada). Oligo(dT)15 was from Invitrogen.

**Cell culture** - A549/8 human lung carcinoma cells were grown in a DMEM/F-12 medium (Gibco-Brl) supplemented with 10% FBS, L-glutamine and antibiotics. U87 and C6 cells were grown in DMEM, 1 g/l glucose supplemented with 10% FBS, L-glutamine and antibiotics. *IRE1 $\alpha$* -null mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and wild-type MEFs were kindly provided R. J. Kaufman (31). A549/8 and U87 cells were stably transfected with pcDNA3/*IRE1 $\alpha$* .Nck-1 (32) and rat C6 glioma were stably transfected with pED *IRE1* K599A (33) using Lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. A549/8 and U87 cells were selected with 1000  $\mu$ g/ml and 450  $\mu$ g/ml G418, respectively and C6 cells with 250  $\mu$ g/ml methothrexate. Three to five independent clones for each cell line were isolated and characterized. Experiments using A549/8 cells and MEFs were carried out in serum-free culture conditions (30). Experiments using U87 cells and C6 cells were carried out in DMEM, 2% FBS. Hypoxia experiments were performed at 3% O<sub>2</sub> in a Heraeus incubator BB-6060 or at 0.1% O<sub>2</sub> in a cell culture chamber connected to a Pro-Ox-P110 controller (BioSpherix, Reyfield, NY). Glucose deprivation experiments were carried out as follow for A549/8 cells: after a 4-day incubation in serum-free medium, cells were washed and incubated for 15 min in DMEM F405 at 37°C. Cells were then incubated for the indicated period of time in DMEM without glucose supplemented with 25  $\mu$ g/ml HDL, 5  $\mu$ g/ml transferrin, 1 mg/ml f-BSA, 2 mM glutamine and increasing concentrations of glucose. Alternatively, U87 and C6 cells were incubated in DMEM without glucose in the presence of 2% FBS for 8 h.

**VEGF-A ELISA** - Subconfluent cells were incubated in 10-cm dishes for 24 h in the indicated culture conditions and VEGF was

measured in conditioned media using a commercial VEGF ELISA kit (R&D Systems). The assays were performed in duplicate or triplicate and calibration curves were obtained with human recombinant VEGF-A. Results were obtained from at least two independent cultures and were analysed using the Softmax Pro4.0 software (Molecular Devices Corporation).

**RT-PCR - analyses** – semi quantitative analyses were carried out as previously described (32). RT-qPCR analyses were performed in an MX3000p thermocycler (Stratagene) using the SYBRgreen dye (ABgene, Epsom, U.K.) methodology. The relative abundance of transcripts was calculated by using  $\beta$ -actin transcript quantity as a standard. RT-qPCR were performed in tetraplicate on RNA from two or three independent cell cultures. Homogeneity of PCR products was controlled by melting point analyses and gel electrophoresis.

**Immunoblot Analyses** – Immunoblot analyses were carried out as previously described (32).

**Chorio-allantoic membrane (CAM) assay** – Fertilized chicken eggs were obtained and treated essentially as previously described (34). Five millions A549/8 cells in 20  $\mu$ l of DMEM were deposited on the surface of the CAM. Tumour progression was then observed daily under a Nikon SMZ stereomicroscope. At days 3, 5 and 7, tumours were removed and mRNAs extracted. Alternatively, tumours were cut into 10- $\mu$ m cryosections and stained with hematoxylin-erythrosin for histological analyses and observation of the tumour vascularization. Pericytes were detected by using mouse antibodies directed against desmin. Fluorescent labelling was analyzed by confocal microscopy (Olympus Fluoview500). Experiments were performed at least in tetraplicate.

**Intracranial injections and tumour size measurements** – these experiments were carried out as previously described (35).

Tumour volume was calculated as in (36) after H&E staining.

## Results

**VEGF-A expression upon hypoxia and glucose deprivation in A549/8 cells** – The expression of VEGF-A mRNA and protein was measured in A549/8 cells subjected to hypoxic conditions, to a complete deprivation in glucose, or to both stresses for 24 hours. As shown in Figure 1A, VEGF-A mRNA was constitutively expressed by these cells and two transcripts encoding the VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>165</sub> protein products were detected. Both hypoxia and hypoglycaemia led to a 1.5 to 2 fold increase in VEGF-A transcripts as determined by RT-PCR. Interestingly, this increase was further enhanced when a combination of both stresses was applied to the cells (2.5 fold; Fig. 1A). Dose-response experiments showed that VEGF-A mRNA increased at glucose concentrations equal or lower than 0.4 g/l (Fig. 1B). The secretion of VEGF-A by A549/8 cells was also assessed by ELISA (Fig. 1C). In normal culture conditions, ~ 0.2 ng VEGF-A were secreted per million cells and per day. Hypoxia or glucose deprivation consistently increased the amount of the growth factor in the medium (~ 2.7-fold *vs.* 2-fold increases in hypoxia and in the absence of glucose, respectively). As observed at the transcriptional level, the effect of glucose deprivation on VEGF-A expression was dose-dependent with maximum secretion observed at concentrations lower than 0.4 g/l (Fig. 1D). The results at the protein level were therefore consistent with those reported at the mRNA level.

At a qualitative level, VEGF<sub>165</sub> secreted by cells subjected to glucose deprivation, but not in hypoxic conditions, presented an altered migration on gel electrophoresis and migrated as a low-molecular weight 38-kDa protein (Fig. 1E). This may correspond to the unglycosylated protein (calculated Mr = 38. kDa), a protease-processed form of the growth factor (37), or to both. To test this,

cells were incubated in the presence of tunicamycin, a N-glycosylation inhibitor. In these conditions, VEGF<sub>165</sub> co-migrated with the 38-kDa VEGF<sub>165</sub> expressed by cells in the absence of glucose. In addition, cells subjected to glucose depletion in the presence of tunicamycin expressed the 38-kDa VEGF<sub>165</sub>, therefore excluding the proteolysis alternative. As expected, these data confirm that in the absence of glucose, VEGF<sub>165</sub> is not glycosylated. To ascertain that the increase of VEGF-A production under glucose deprivation was indeed associated to an increase of its activity, VEGF<sub>165</sub> was purified from conditioned media under glucose-deprived conditions and tested for its ability to induce bovine aortic endothelial cell growth and survival. The 38 kDa VEGF<sub>165</sub> was fully active as assessed using both the MTT metabolic assay and cell counting (data not shown). These results suggest that low glucose concentration in tumours may indeed generate a potent angiogenic stimulus.

**Hypoxia- and/or glucose deprivation-activated signaling pathways in A549/8 cells** – Since VEGF-A mRNA was upregulated upon both hypoxia and glucose deprivation in A549/8 cells, we then investigated the potential signaling pathways involved in this process. The expression of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  was detected by immunoblot only in cells subjected to hypoxia for 6 h (Fig. 2A) but not under glucose-deprived conditions. Furthermore, the expression profile of the genes *GLUT-1*, *HK-2* and *PFKFB3*, whose transcription depends on HIF-1 $\alpha$  (23,38), was also determined (Fig. 2B). Consistent with HIF-1 $\alpha$  protein accumulation, an increase of the three mRNAs was observed in cells subjected to hypoxic conditions (Fig. 2B). GLUT-1 mRNA, but not HK-2 and PFKFB3, was also slightly upregulated under glucose deprivation (Fig. 2B). These data indicate that in A549/8 cells, VEGF-A mRNA accumulation correlated with the stabilization of HIF proteins in hypoxic conditions but not under glucose

deprivation. Finally, VEGF promoter-driven luciferase activity was also measured in cells subjected to the two stress conditions. Results indicated that the VEGF promoter activity was 2 times higher in hypoxic conditions than in control conditions after a 24-h incubation, whereas no increase was observed in A549/8 cells incubated in the absence of glucose (data not shown). Therefore, as reported in other cell types (18,24,39), VEGF-A promoter was not sufficient for the increase of VEGF mRNAs in A549/8 cells subjected to glucose deprivation, thus suggesting an alternative mechanism such as mRNA stabilization (18,39). Together, these results indicate that hypoxia and glucose deprivation may both lead to the upregulation of VEGF-A by using non-redundant signaling pathways.

An alternative mechanism for VEGF-A mRNA upregulation under low glucose may come from the activation of the UPR. Indeed, the absence of glucose is a well documented UPR inducer in various cell models (40) and VEGF-A is a target gene of well known ER stressors (17). Interestingly, the expression of four UPR target genes (*BiP*, *EDEM*, *GADD34* and *CHOP*) was upregulated upon glucose deprivation (Fig. 2C). In addition, although the expression of these genes was not affected upon hypoxia alone, the combination of both stresses led to a further increase in the expression level of *EDEM* and *GADD34* mRNAs suggesting the existence of synergistic signaling pathways. The increased expression of *EDEM* mRNA was further confirmed by the non conventional splicing of *XBP-1* mRNA (Fig. 2D) detected only in the absence of glucose and upon the combination of both stresses. The activation of UPR under glucose deprivation may in addition explain the increased expression of *GLUT-1* mRNA (Fig. 2B) as previously reported (41,42). Therefore, the intracellular responses to hypoxia and to glucose deprivation are apparently well discriminated in A549/8 cells. These results also show that the observed increase in VEGF-A mRNA under

low glucose concentrations correlates with UPR activation, which suggest that the two events may be associated.

**IRE1-mediated expression of VEGF-A mRNA** – In an attempt to demonstrate a direct link between the activation of the UPR and VEGF-A expression upon glucose deprivation, A549/8 cells were transfected with a dominant negative IRE1 construct (IRE1.Nck; (32)). Stably transfected clones (x2) were then assessed for the expression of the transgene by RT-PCR (Fig. 3A, insert) and subjected to hypoxia or glucose deprivation. The expression of VEGF-A mRNA was then monitored (Fig. 3A). Although VEGF-A transcripts were induced upon hypoxia or in the absence of glucose in both wild-type cells and in cells transfected with the empty vector, its expression remained at a near basal level in IRE-DN expressing cells. Thus, VEGF-A mRNA upregulation was inhibited in IRE-DN expressing cells under glucose deprivation and also, surprisingly, under hypoxia. These observations were confirmed at the protein level (Fig. 3B). These data indicate that in A549/8 cells, hypoxia- and glucose deprivation- induced VEGF-A mRNA expression require IRE1 activity. We then sought to extend this observation to other tumour cell types. Human U87 glioblastoma and rat C6 glioma cells were stably transfected with expression plasmids containing either IRE1.Nck or IRE1.K599A (kinase dead), respectively. Stably transfected clones (3 of each) were at first tested for transgene expression by RT-PCR (Fig. 4A and B, inserts). Cells were then subjected to hypoxia or to glucose deprivation and the expression of VEGF-A mRNA was monitored using RT-PCR. As reported for A549/8 cells, the expression of IRE1 DN prevented VEGF-A upregulation under both hypoxia and hypoglycaemia (Fig. 4A and B), therefore suggesting the key role of IRE1 signaling in the mediation of this effect. We also examined the expression of VEGF mRNA in *IRE1 $\alpha$* <sup>(-/-)</sup> MEFs and in

wild-type MEFs. As shown in Figure 4C, VEGF-A mRNA had a higher basal expression level in wild-type cells than in mutant cells. In addition, both hypoxia and glucose deprivation led to a significant upregulation of VEGF transcripts in wild-type MEFs but not in *IRE1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>* MEFs, thus confirming the essential role of IRE1 signaling in the regulation of VEGF-A expression under hypoxia or in the absence of glucose.

**IRE1-dependent expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA** – To evaluate the level of integration of UPR and HIF signaling pathways, we examined the expression levels of HIF-1 $\alpha$  mRNA in Ctrl and IRE1-DN expressing cells subjected to hypoxia. We noticed that HIF-1 $\alpha$  mRNA expression was dramatically decreased in IRE1-DN expressing A549/8 cells under basal conditions compared to wild-type cells or to cells transfected with the empty plasmid (Fig. 5A). In comparison, HIF-1 $\alpha$  mRNA basal levels were not significantly altered in IRE1-DN expressing U87 and C6 gliomas cells (Fig. 5B and C). A different pattern of HIF-1 $\alpha$  mRNA expression was also observed under stress conditions according to the cell type. Indeed, HIF-1 $\alpha$  mRNA level strongly decreased in A549/8 cells subjected to hypoxia or to glucose deprivation, whereas the mRNA expression was upregulated in U87 and C6 cells. Such a discrepancy has already been reported between different cell types and at different incubation times (43-45). However, the observed induction of HIF-1 $\alpha$  mRNA in U87 and C6 glioma cells upon hypoxia was attenuated in IRE1-DN expressing cells compared to control cells (Fig. 5 B and C). These results indicate that IRE1-dependent signaling contributes either directly or indirectly to the expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA and, consequently, may regulate VEGF-A mRNA expression in cells grown in normal conditions or subjected to ischemic conditions. IRE1 $\alpha$  may therefore represent a ubiquitous integrating platform for hypoxia- and/or glucose deprivation-

induced stress pathways in tumour cells as indicated in our 4 cellular models.

**IRE1-dependent angiogenesis and tumour growth *in vivo*** – Since IRE1-DN expressing tumour cells exhibit a significantly reduced expression of VEGF-A under hypoxia and under glucose deprivation, we investigated the potential implication of IRE1 $\alpha$  activity on the development of solid tumours in two *in vivo* systems. First, the chicken CAM model (34) was used to study the angiogenic status of A549/8-derived tumours (Fig. 6 A-D). The rationale was to tentatively favour the nutrient-triggered UPR rather than the hypoxia-dependent response, based on the following arguments: 1) hypoxia was predictably limited in this model because of the limited thickness of tumours and of its direct exposure to the air atmosphere (21 % O<sub>2</sub>), 2) A549/8 cells do not respond to moderate or severe hypoxia by triggering the UPR, and 3) nutrient supply was limited to the CAM side of the tumours. Wild-type A549/8 cells, IRE1-DN cells or cells transfected with the corresponding empty vector were deposited onto the CAM at day 0 and grown up to 7 days (Fig. 6A). Solid tumours were readily observed at day 3 and slowly developed up to day 7. Histological examination of A549/8-tumours did not allow us to conclude about any significant differences in tumour development, except for the neovascularization process (Fig. 6B). A low number of blood vessels was observed in the three tumour types at day 3 with a mean value of ~15 vessels per mm<sup>2</sup>. The presence of pericytes was not detected at this time in tumour tissues (data not shown). The number of vessels then progressively increased at days 5 and 7 for the three types of tumours, with a significantly lower number of vessels being observed in A549/8 IRE1-DN cell-derived tumours compared to control cell-derived tumours (Fig. 6C). These data indicate that IRE1 activity is involved in tumour vascularization. The expression of *VEGF-A*, *BiP*, *CHOP*, *HK-2* and *PFKFB3* genes



transcripts was also assessed by qPCR in IRE1-DN cells-, wt cells- and mock cells-derived tumours. Basal expression of VEGF-A mRNA was observed at day 0 of implantation in all tumours. In control experiments, a slight increase of VEGF-A expression was observed at day 3, reached a ~3-fold maximum amplification at day 5 and then decreased at day 7. Remarkably, in IRE1-DN-derived tumours, VEGF-A upregulation was delayed and was only significantly observable at day 7 (Fig. 6D). Thus, the expression profile of the angiogenic factor correlated with the appearance of blood vessels in tumours. VEGF-A expression profile also corresponded to that of the two UPR-related genes *BiP* and *CHOP*. In addition, HIF-1-dependent *HK-2* and *PFKFB3* mRNAs were present in much lower amounts in IRE1-DN-derived tumours than in control tumours and did not significantly increase during tumour development (Fig 6D), probably due to HIF-1 $\alpha$  mRNA downregulation in these cells compared to control cells (Fig. 4C). Overall, these results suggest that activation of the UPR may be linked *in vivo* to VEGF-A expression.

Although tumour development was not affected by the expression of IRE1-DN in the CAM assay, we postulated that tumour growth may still be affected in IRE1-DN cells in a more *in vivo* context. To test this hypothesis, U87 mock and U87 IRE1.Nck cells (2 clones of each) were injected in duplicate in nude mice brains. Thirty-nine days post-injection, brains were collected and snap frozen. Serial sectioning of these brains was carried out and tumour volumes calculated after H&E staining of the sections (Fig. 6E). Although IRE1.Nck expressing cells did not show any proliferation defect *in vitro* (data not shown), tumours issued from U87 IRE1.Nck clones were 2 to 4 times smaller than tumours issued from mock cells, thus confirming our initial hypothesis.

## Discussion

The regulation of tumour cells responsiveness to their ischemic environment represents a critical step in the understanding of tumour growth and development. Tumour angiogenesis, which is an essential factor for tumour growth, is functionally linked to ischemia and to stress parameters including hypoxia and glucose deprivation (1,6,46). Hypoxia-dependent intracellular signaling cascade mainly involves the activation of HIF-1 transcription factor and is associated to tumour growth via the activation of a number of genes regulating proliferation, angiogenesis and cell survival (1). In particular, the HIF-1-pathway leads to the upregulation of the angiogenic growth factor VEGF-A after the binding of HIF-1 on the VEGF-A promoter HRE sequence (21,22). Glucose deficiency, another stress whose occurrence has been reported in tumours (47-50), also promotes VEGF-A induction in normal and tumour cells in culture (16,39,51-53). In addition, a significant role of glucose deprivation has been linked to tumour angiogenesis. Although it has been suggested to trigger VEGF-A upregulation via HIF-1-related signaling pathways (26-28), evidences for HIF-1-independent pathways have also been reported (18,23-25). Overall, the relationships that may exist between tumour cells response to hypoxia and to glucose deprivation, as well as the cumulative impact of these stresses on tumour growth remain poorly understood.

In eukaryotes, the response to hypoxia and to glucose deprivation has been linked to the ER through the accumulation of misfolded proteins (40). Under those circumstances, the ER activates the UPR signaling network, an adaptive response to metabolic imbalances which confers resistance to life-threatening conditions in cells and tissues. At least two distinct components of the UPR are involved in the response of tumour cells to hypoxia. PERK activation has been identified as a major factor in hypoxia-mediated inhibition of

translation in HeLa cells (10). XBP-1 was also shown to be essential for tumour growth *in vivo* and this effect was independent of the upregulation of VEGF-A and FGF2 (12). An integrated regulatory role of the UPR in tumour development has also been proposed by Ma and Hendershot (6).

In an attempt to assess the role of the UPR in ischemia-mediated tumour growth, we sought to analyze tumour cells responsiveness to hypoxia and/or to glucose deprivation. We have evaluated the impact of UPR activation on the upregulation of the angiogenic growth factor VEGF-A and on tumour growth and vascularization. Our primary target was the proximal ER stress sensor IRE1, the identified activator of XBP-1 transcriptional activity (31). We show that both hypoxia and glucose deprivation mediate VEGF-A upregulation through IRE1 activity in four different cell models. Indeed, A549/8, U87 and C6 tumour cells expressing the IRE1-DN transgene lose their ability to respond to these stresses by increasing VEGF-A expression. In addition, *IRE1 $\alpha$* -null MEFs as compared to wild-type MEFs, were unable to upregulate VEGF-A in low oxygen or low glucose conditions. More specifically, the results obtained in C6 cells suggest that IRE1 kinase activity is sufficient to mediate the observed regulation of VEGF-A mRNA (Fig. 4). IRE1 activity may therefore represent an upstream integrating metabolic signal that could diverge towards the hypoxia-induced HIF and HIF-independent glucose-deprivation mediated cellular responses as proposed in the model presented in Figure 7. Together, these data suggest that IRE1 activity may impact on tumour development. Our results obtained *in vivo* indeed support this hypothesis. For example IRE1-DN (A549/8) cell-derived tumours exhibited a delay in blood vessel appearance in the chick CAM assay. In addition, IRE1-DN glioblastoma cell derived tumours

developed at a slower rate than control cells in mouse brain.

Since most of the growing solid tumours are exposed to ischemic conditions in the first and avascular stage of their expansion, cancer cells are subjected to increased rate of genomic alterations. As a consequence they progressively adapt and develop a higher tolerance to nutrient deprivation and hypoxia than normal cells (54-56). Part of this tolerance is associated to the constitutive or occasional activation of specific signaling pathways in such extreme conditions. The blockade of these rescuing events at key regulatory points therefore represents a perspective for the selective inhibition of tumour growth. Studies aiming to block HIF-dependent pathways have been developed as new approaches for cancer therapy (1). Besides, disruption of the UPR signaling may also provide a target to sensitize tumour cells to ischemic conditions (55). In this context, IRE1 appears as a relevant target that may limit both UPR signaling and HIF-pathways to reduce tumour cells plasticity.

### Acknowledgements

We thank the Chevet lab for critical reading of the manuscript. We also thank Dr Randal J Kaufman (U. Michigan) for IRE1<sup>-/-</sup> MEFs. This work was supported by grants from Ministère de la Recherche et de la Technologie, INSERM to AB, by a grant from the Ligue Nationale contre le Cancer, Comité de la Gironde to MM, by a grant from ARC to AB and EC and by a Canadian Institute for Health Research grant to EC. This work was also supported by an International collaboration grant from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) – INSERM to EC and AB. BD was a recipient from the Prix Institut Danone, alimentation et santé 2001. EC is a FRSQ Junior scholar.

## References

1. Semenza, G. L. (2003) *Nat Rev Cancer* **3**, 721-732
2. Hardie, D. G. (2003) *Endocrinology* **144**, 5179-5183
3. McMahon, R. J., and Frost, S. C. (1995) *J Biol Chem* **270**, 12094-12099
4. Rearick, J. I., Chapman, A., and Kornfeld, S. (1981) *J Biol Chem* **256**, 6255-6261
5. Spitz, D. R. (2000) *Annals NY Acad. Sci* **899**, 349-362
6. Ma, Y., and Hendershot, L. M. (2004) *Nat Rev Cancer* **4**, 966-977.
7. Kaufman, R. J., Scheuner, D., Schroder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C. Y., and Arnold, S. M. (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 411-421
8. Schroder, M., and Kaufman, R. J. (2005) *Mutat Res* **569**, 29-63
9. Harding, H. P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999) *Nature* **397**, 271-274
10. Koumenis, C., Naczki, C., Koritzinsky, M., Rastani, S., Diehl, A., Sonenberg, N., Koromilas, A., and Wouters, B. G. (2002) *Mol Cell Biol* **22**, 7405-7416
11. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001) *Cell* **107**, 881-891
12. Romero-Ramirez, L., Cao, H., Nelson, D., Hammond, E., Lee, A. H., Yoshida, H., Mori, K., Glimcher, L. H., Denko, N. C., Giaccia, A. J., Le, Q. T., and Koong, A. C. (2004) *Cancer Res* **64**, 5943-5947
13. Carmeliet, P. (2003) *Nat Med* **9**, 653-660
14. Ferrara, N., Gerber, H. P., and LeCouter, J. (2003) *Nat Med* **9**, 669-676
15. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992) *Nature* **359**, 843-845.
16. Shweiki, D., Neeman, M., Itin, A., and Keshet, E. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 768-772
17. Abcouwer, S. F., Marjon, P. L., Loper, R. K., and Vander Jagt, D. L. (2002) *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 2791-2798
18. Yun, H., Lee, M., Kim, S. S., and Ha, J. (2005) *J Biol Chem* **280**, 9963-9972
19. Fukumura, D., Xu, L., Chen, Y., Gohongi, T., Seed, B., and Jain, R. K. (2001) *Cancer Res* **61**, 6020-6024.
20. Chandel, N. S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C. E., Simon, M. C., and Schumacker, P. T. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11715-11720
21. Liu, Y., Cox, S. R., Morita, T., and Kourembanas, S. (1995) *Circ Res* **77**, 638-643.
22. Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., and Semenza, G. L. (1996) *Mol Cell Biol* **16**, 4604-4613.
23. 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., and Semenza, G. L. (1998) *Genes Dev* **12**, 149-162.
24. Kotch, L. E., Iyer, N. V., Laughner, E., and Semenza, G. L. (1999) *Dev Biol* **209**, 254-267.
25. Park, S. K., Dadak, A. M., Haase, V. H., Fontana, L., Giaccia, A. J., and Johnson, R. S. (2003) *Mol Cell Biol* **23**, 4959-4971
26. Maltepe, E., Schmidt, J. V., Baunoch, D., Bradfield, C. A., and Simon, M. C. (1997) *Nature* **386**, 403-407.
27. 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., and Keshet, E. (1998) *Nature* **394**, 485-490
28. Ryan, H. E., Lo, J., and Johnson, R. S. (1998) *Embo J* **17**, 3005-3015
29. Ikeda, E., Achen, M. G., Breier, G., and Risau, W. (1995) *J Biol Chem* **270**, 19761-19766
30. Moenner, M., Hatzi, E., and Badet, J. (1997) *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **33**, 553-561.
31. Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., and Kaufman, R. J. (2002) *Genes Dev* **16**, 452-466

32. Nguyen, D. T., Kebache, S., Fazel, A., Wong, H. N., Jenna, S., Emadali, A., Lee, E. H., Bergeron, J. J., Kaufman, R. J., Larose, L., and Chevet, E. (2004) *Mol Biol Cell* **15**, 4248-4260
33. Tirasophon, W., Welihinda, A. A., and Kaufman, R. J. (1998) *Genes Dev* **12**, 1812-1824
34. Hagedorn, M., Javerzat, S., Gilges, D., Meyre, A., de Lafarge, B., Eichmann, A., and Bikfalvi, A. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**, 1643-1648
35. Huang, K. C., Altinoz, M., Wosik, K., Larochelle, N., Koty, Z., Zhu, L., Holland, P. C., and Nalbantoglu, J. (2005) *Int J Cancer* **113**, 738-745
36. Miraux, S., Lemiere, S., Pineau, R., Pluderi, M., Canioni, P., Franconi, J. M., Thiaudiere, E., Bello, L., Bikfalvi, A., and Auguste, P. (2004) *Angiogenesis* **7**, 105-113
37. Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., and Ferrara, N. (1992) *J Biol Chem* **267**, 26031-26037.
38. Minchenko, A., Leshchinsky, I., Opentanova, I., Sang, N., Srinivas, V., Armstead, V., and Caro, J. (2002) *J Biol Chem* **277**, 6183-6187
39. Iida, K., Kawakami, Y., Sone, H., Suzuki, H., Yatoh, S., Isobe, K., Takekoshi, K., and Yamada, N. (2002) *Life Sci* **71**, 1607-1614.
40. Kaufman, R. J. (2002) *J Clin Invest* **110**, 1389-1398
41. Osthus, R. C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L. A., and Dang, C. V. (2000) *J Biol Chem* **275**, 21797-21800
42. Wertheimer, E., Sasson, S., Cerasi, E., and Ben-Neriah, Y. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2525-2529
43. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5510-5514.
44. Minchenko, O. H., Ochiai, A., Opentanova, I. L., Ogura, T., Minchenko, D. O., Caro, J., Komisarenko, S. V., and Esumi, H. (2005) *Biochimie*
45. Sowter, H. M., Raval, R. R., Moore, J. W., Ratcliffe, P. J., and Harris, A. L. (2003) *Cancer Res* **63**, 6130-6134
46. Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2000) *Nature* **407**, 249-257
47. Gullino, P. M. (1975) in *Cancer* (Becker, F., ed) Vol. 3, pp. 327-354, Plenum Press, New York
48. Vaupel, P., Kallinowski, F., and Okunieff, P. (1989) *Cancer Res* **49**, 6449-6465.
49. Ettinger, S. N., Poellmann, C. C., Wisniewski, N. A., Gaskin, A. A., Shoemaker, J. S., Poulson, J. M., Dewhirst, M. W., and Klitzman, B. (2001) *Cancer Res* **61**, 7964-7970
50. Ziegler, A., von Kienlin, M., Decorps, M., and Remy, C. (2001) *Cancer Res* **61**, 5595-5600
51. Stein, I., Neeman, M., Shweiki, D., Itin, A., and Keshet, E. (1995) *Mol Cell Biol* **15**, 5363-5368
52. Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Yang, N., Huang, W., Mohamed-Hadley, A., Yao, W., Benencia, F., and Coukos, G. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 860-868.
53. Satake, S., Kuzuya, M., Miura, H., Asai, T., Ramos, M. A., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., and Iguchi, A. (1998) *Biol. Cell.* **90**, 161-168.
54. Izuishi, K., Kato, K., Ogura, T., Kinoshita, T., and Esumi, H. (2000) *Cancer Res.* **60**, 6201-6207.
55. Park, H. R., Tomida, A., Sato, S., Tsukumo, Y., Yun, J., Yamori, T., Hayakawa, Y., Tsuruo, T., and Shin-ya, K. (2004) *J Natl Cancer Inst* **96**, 1300-1310
56. Lu, J., Kunimoto, S., Yamazaki, Y., Kaminishi, M., and Esumi, H. (2004) *Cancer Sci* **95**, 547-552

## Figure legends

**Figure 1: The effect of hypoxia and glucose deprivation on the expression of VEGF-A by A549/8 cells.** Cells were grown up to sub-confluence in 25-cm<sup>2</sup> culture flasks in serum-free medium. They were then washed and incubated in normoxic (Ctrl, Hg; 21% O<sub>2</sub>) or in hypoxic (Hx, HxHg; 3% O<sub>2</sub>) conditions in the same medium without EGF and insulin, with (Ctrl, Hx) or without (Hg, HxHg) 3.2 g/l glucose. After a 24-h incubation, conditioned media were collected and total mRNA was isolated from cell lysates. **A)** Expression of VEGF-A and  $\beta$ -actin mRNA by cells was measured by semi-quantitative RT-PCR after electrophoresis in a 2% agarose gel. Histogram values represent the sum of the intensities of VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>165</sub> mRNAs and are the mean value  $\pm$  SD of triplicate assays. A representative gel electrophoresis pattern is shown below the histogram. **B)** Expression of VEGF mRNA by cells exposed to various concentrations of glucose, as determined by real-time quantitative RT-PCR (qPCR). Indicated values represent the sum of the expression of VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>165</sub> transcripts. Results were normalized using  $\beta$ -actin and were representative of three independent cultures. **C)** Quantification of VEGF-A proteins accumulation (isoforms VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>165</sub>) by ELISA. **D)** ELISA determination of the effect of glucose concentration on the production of VEGF-A. Mean results were obtained from triplicate culture cells and ELISA were performed in duplicate or triplicate. The error bars corresponds to standard deviation for each determination. **E)** VEGF<sub>165</sub> expressed by A549/8 cells subjected to glucose deprivation was underglycosylated. Cells were incubated for 24 h in the indicated conditions and in the presence or absence of 10  $\mu$ g/ml tunicamycin. VEGF<sub>165</sub> in cell-conditioned media was then concentrated by binding to heparin-Sepharose gel and revealed by Western blot analysis after migration on a 12 % PAGE under non-reducing conditions. Recombinant human VEGF<sub>165</sub> prepared from baculovirus was used as a standard (STD).

**Figure 2: Hypoxia- and/or hypoglycaemia- induced signaling pathways in A549/8 cells -** A549/8 cells were subjected to hypoxia (Hx), hypoglycaemia (Hg) or to both stresses (HxHg) as reported in Figure 1. **A)** Cells were stressed for 6 h and the presence of the transcription factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  was examined by Western blot using anti-HIF-1 $\alpha$  (pHIF-1 $\alpha$ ) and anti-HIF-2 $\alpha$  (pHIF-2 $\alpha$ ) antibodies. One hundred micrograms of total proteins were loaded in each well and  $\beta$ -actin was used as the internal control. Experiment was repeated twice with similar results. **B)** RT-PCR analyses of mRNA expression of GLUT-1, HK-2 and PFKFB3. Cells were stressed for 24 h and mRNA levels were determined. Data represents the mean value  $\pm$  SD of triplicate experiments and are representative of three independent cell cultures. **C)** Quantitative RT-PCR analysis of UPR-dependent gene expression. The ratios of gene expression to  $\beta$ -actin expression were presented as fold induction relative to control conditions. The results are shown as the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments and measures were performed on two or three independent cultures. **D)** XBP-1 mRNA splicing by IRE1 was analyzed by RT-PCR: cells were exposed for 4 h to hypoxia or/and to glucose deprivation (left gel), or exposed for 24 h to decreasing concentrations of glucose (right gel). PCR analyses were performed using primers flanking the XBP1 mRNA splice site. Xbp1<sup>u</sup> and Xbp1<sup>s</sup> correspond to the unspliced and spliced forms of the transcripts, respectively. The PCR products were size-fractionated by electrophoresis in a 3 % agarose gel and stained with ethidium bromide before observation.

**Figure 3: IRE1-dependent induction of VEGF-A in A549/8 cells –** A549/8 cells were stably transfected with empty or DN vectors and individual clones expressing high levels of IRE1 DN were selected. Upon various stresses, VEGF-A expression in DN mutant of IRE1

(A549/8 IRE1 DN) was compared to that observed in cells expressing the empty vector (A549/8 pcDNA3) or in wild type cells (A549/8 wt). **A)** VEGF-A mRNA expression was measured by qPCR. The ratios of VEGF-A expression to  $\beta$ -actin expression were presented as fold induction relative to control conditions in A549/8 wt. The insert represents the expression of IRE1 DN transcript in A549/8 cells as detected by RT-PCR. **B)** Secretion of VEGF-A proteins (isoforms 121 and 165) was quantified by ELISA.

**Figure 4: Hypoxia- or hypoglycemia- induced VEGF-A mRNA expression is dependent on IRE1 signaling** – VEGF-A mRNA expression was assessed by RT-PCR in U87 cells (U87 Ctrl) and IRE1 DN cells (U87 IRE1.DN) (**A**), C6 cells (Ctrl) and IRE1 DN cells (C6 IRE1 K599A) (**B**) and in wt and IRE1<sup>-/-</sup> MEFS (**C**) under basal conditions (Ctrl), hypoxia (Hx; 0.1%, 3%, 3% respectively) or in the absence of glucose (Hg). The expression of the DN construct (A, B) or the wt IRE1 (C), is shown as inserts.

**Figure 5: IRE1-dependent expression of HIF1 $\alpha$  mRNA.** Expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA was determined by either qPCR in A549/8, A549/8 (IRE1.Nck) (**A**), or RT-PCR in U87, U87 (IRE1.Nck) (**B**) and C6, C6 (IRE1 K599A) (**C**) cells. Cells were either subjected to hypoxia or glucose deprivation (A549/8) or only to hypoxia (U87 and C6 cells). The ratios of HIF-1 $\alpha$  to  $\beta$ -actin (A549/8) or S16 (U87, C6) mRNA expression are reported as fold induction relative to Ctrl in wild-type cells. The results in A, B and C are shown as the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations.

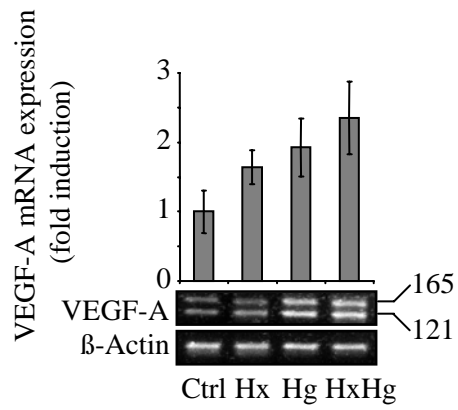
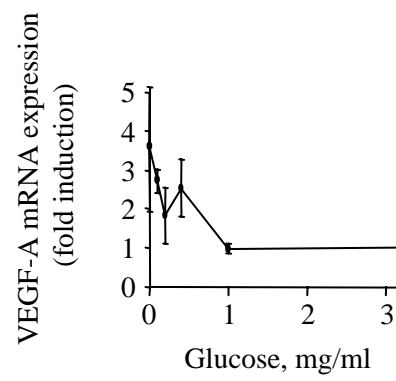
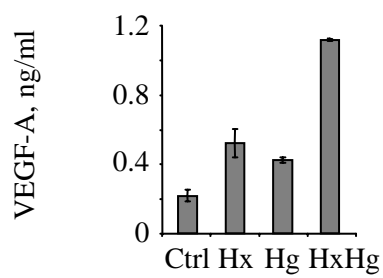
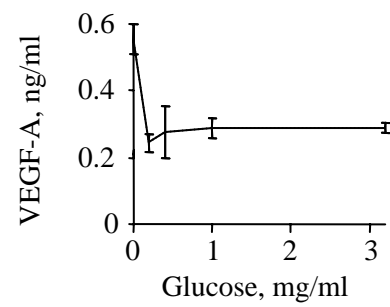
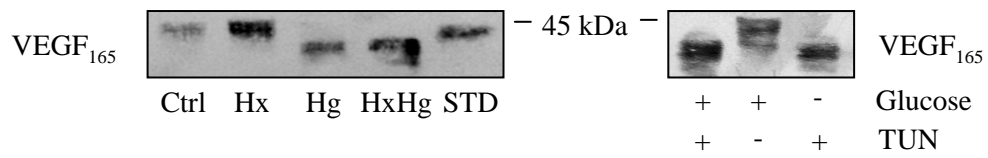
**Figure 6: VEGF-A upregulation and angiogenesis in A549/8 xenograft tumours correlated to the expression of UPR-induced genes.** Wild type A549/8 cells (A549/8 wt) or cells expressing either the IRE1 dominant negative (A549/8 IRE1 DN) or the empty vector (A549/8 pcDNA3) were deposited onto the CAM. Solid tumours were then grown up and removed from the CAM at days 3, 5 or 7. Histological numeration of the blood vessels was realized at each time and qPCR measurement of mRNA expression of the genes *VEGF-A*, *BiP*, *CHOP*, *HK-2* and *PFKFB3* was also performed. **A)** Experimental model of the chicken assay (34) and observation of the A549/8-derived solid tumour after 5 days. **B)** Representative histological views of A549/8-derived tumours at day 5 for the three cell-derived tumours. The presence of nucleated chick erythrocytes, of the blood vessels lining and of the red labelling are indicative of the presence of tumour capillaries and are indicated by arrows. **C)** Quantification of blood vessel density at days 3, 5 and 7 was obtained by counting from 7 to 17 different fields over 3 to 5 different cryosections. The data represents the mean value  $\pm$  SD (\*p value < 0.01, \*\*pvalue < 0.005). Bar = 100  $\mu$ m. SNA-1 lectin coupled to FITC and antibodies against human VEGF-R2 coupled to rhodamine were tentatively used for the detection of blood vessels. However both markers were found to be widely expressed on the surface of A549/8 cells and tissue discrimination was therefore not possible in these conditions. In comparison, other human tumour cells produce specific vessel labelling using similar conditions of treatment. **D)** qPCR analyses of the mRNA expression of the gene *VEGF-A*, of the UPR-dependent genes *BiP* and *CHOP*, and of the HIF-1-dependent genes *HK-2* and *PFK2F $\beta$ 3*. Measures were performed at days 0 (before inoculation onto the CAM), 3, 5 and 7. Three to five tumours were pooled for mRNA extraction and analysis at each stage. Results are represented in fold induction as the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations. **E)** Measure of intra-cerebral tumour volume after injection of Ctrl and IRE1.Nck expressing U87 cells (2 pairs of Ctrl/IRE1DN were used respectively 2B6/2C3 and 2D5/6C5). The data are represented as fold inhibition over Ctrl tumour volume ( $\pm$  difference to the mean). The absence of growth inhibition is represented by the dashed line. The experiments were done twice in duplicate.

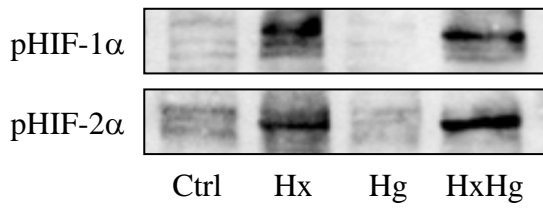
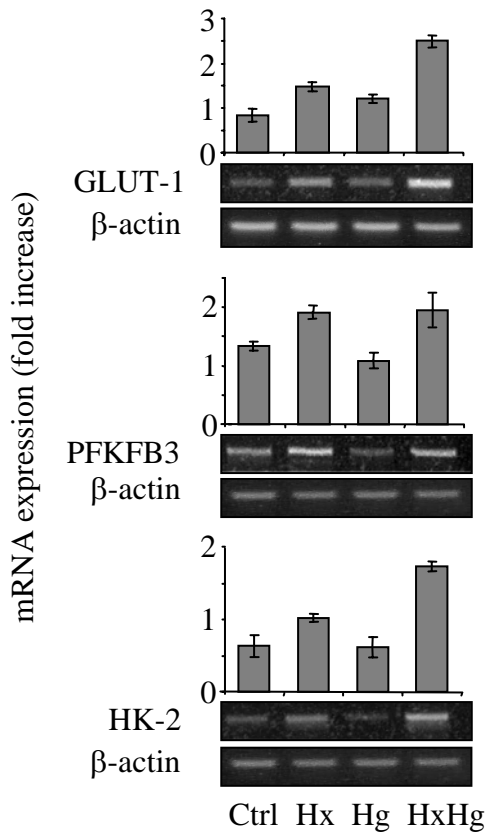
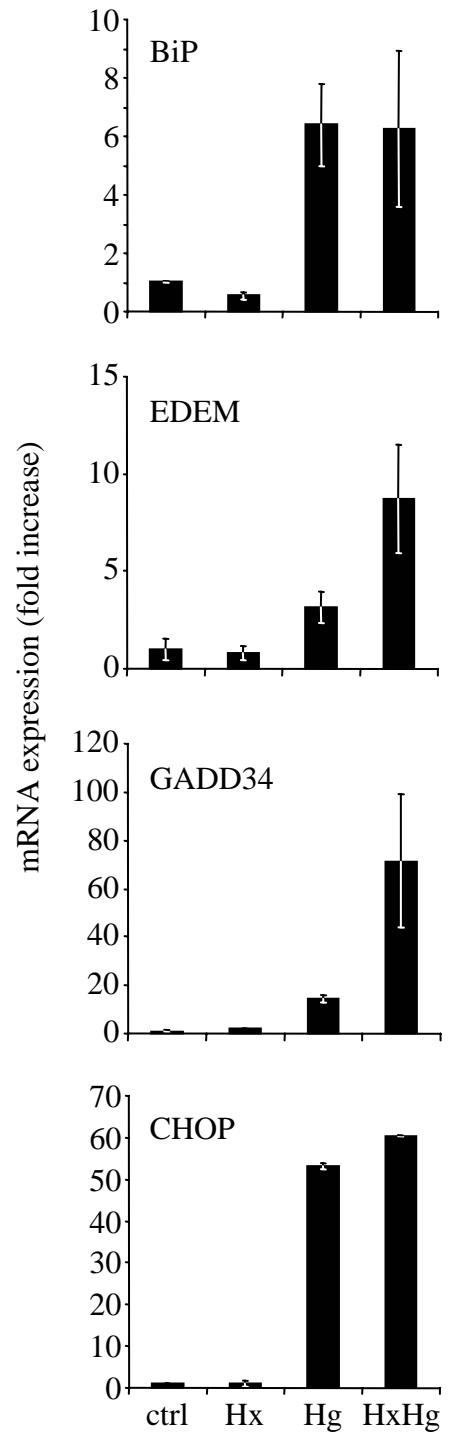
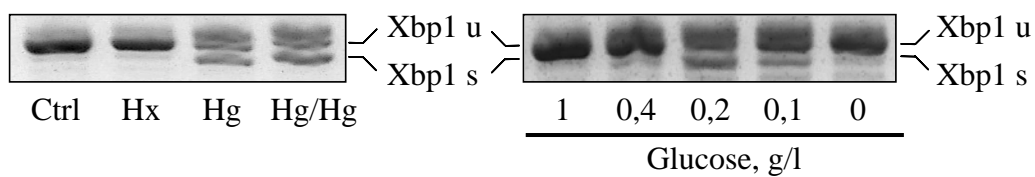
**Figure 7 – A model for the role of IRE1 in hypoxia- or glucose deprivation- induced VEGF-A mRNA and tumour growth** – The red lines show inhibitory pathways, the green lines activating pathways and the blue line indicates a potential effect of IRE1 signaling on HIF1 $\alpha$  mRNA. The thin dashed lines represent pathways described in the literature and the heavy dashed lines potential pathways revealed by this work.

**Table S1 Primers used in our study**

	<b>forward primer</b>	<b>reverse primer</b>
mVEGF-A	5'-gaa gtc cca tga agt gat cca g-3'	5'-tca ccg cct tgg ctt gtc a-3'
mIRE1	5'-cga cca ccg tat ctc agg at-3'	5'-gct cag ggg gta agt gat ga-3'
mS16	5'-tgc tgg tgt gga tat tgc gg-3'	5'-cct tga gat ggg ctt atc gg-3'
hGLUT-1	5'-gct aca aca ctg gag tca tc-3'	5'-gga tca gca tct caa agg ac-3'
hHK-2	5'-atc cct gag gac atc atg cg-3'	5'- gcc gtc cgg ggt agc aca-3'
hHIF-1 $\alpha$	5'-gga gat gtt agc tcc ct-3'	5'- agt ggt ggc agt ggt a-3'
hPFKFB3	5'- ggt gtg cga cga ccc tac-3'	5'-gta cac gat gcg gct ctg-3'
hGADD34	5'-gtg gaa gca gta aaa gga gca g-3'	5'-cag caa ctc cct ctt cct cg-3'
hEDEM	5'gct caa ccc cat cca ctg cc-3'	5'-cca gga ggg aac cgg ctc cc-3'
hVEGF-A	5'-cga aac cat gaa ctt tct gc-3'	5'-cct cag tgg gca cac act cc-3'
h $\beta$ -actin	5'-cgt acc act ggc atc gtg at-3'	5'-gtg ttg gcg tac agg tct ttg-3'
hGRP78	5'-cta ctc ctg cgt cgg cgt gt-3'	5'-cga tga gcc gct tgg cgt-3'
hCHOP	5'-att gac cga atg gtg aat ctg c-3'	5'-agc tga gac ctt tcc ttt tgt cta-3'
hXBP1	5'-ctg gaa cag caa gtg gta ga-3'	5'-ctc ctc cag gct ggc agg-3'
hIRE1 DN	5'-tca tca cct atc ccc tga gc-3'	5'-aga tgc ttt ccg agc act gt-3'

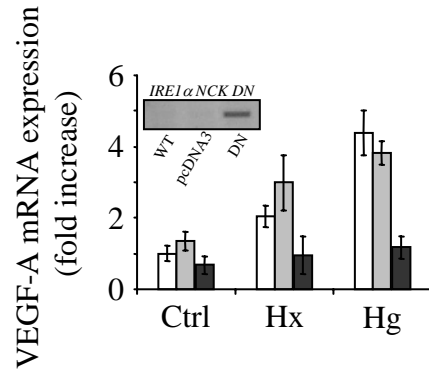


**A****B****C****D****E**

**A****B****C****D**

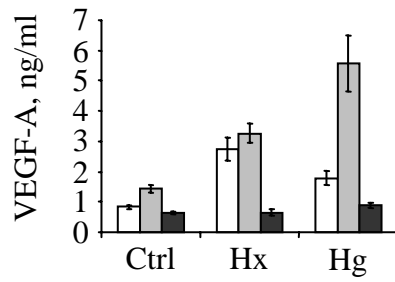
Drogat et al., Figure 2

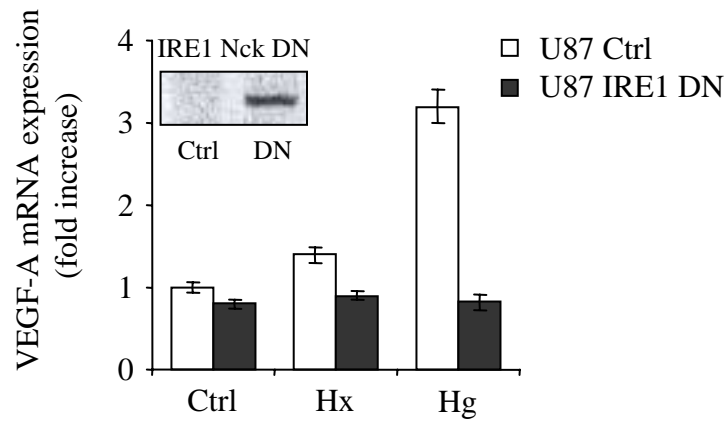
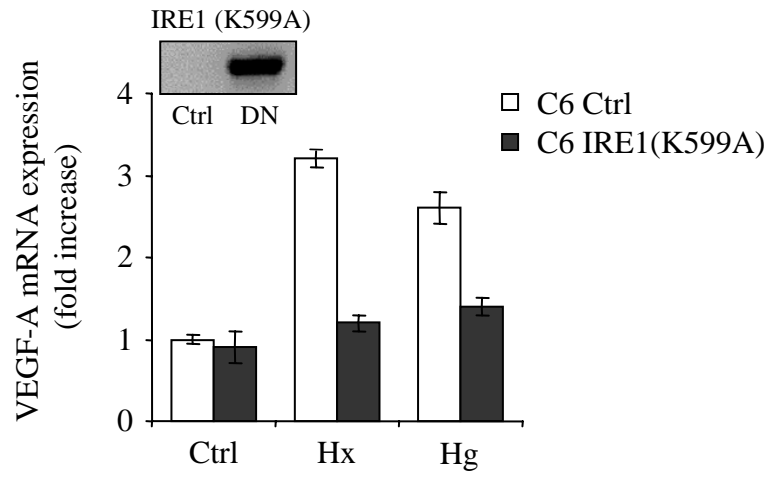
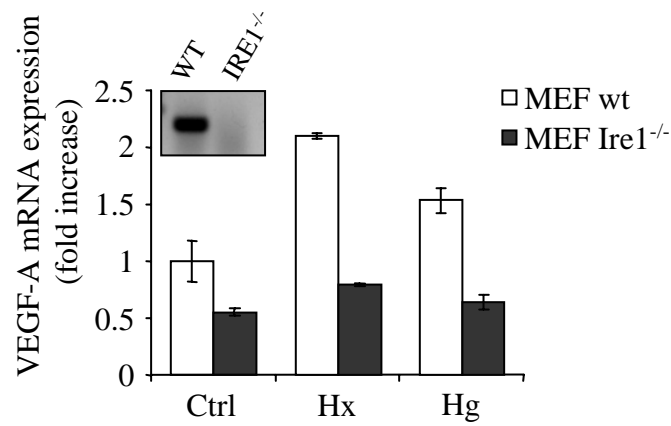
**A**



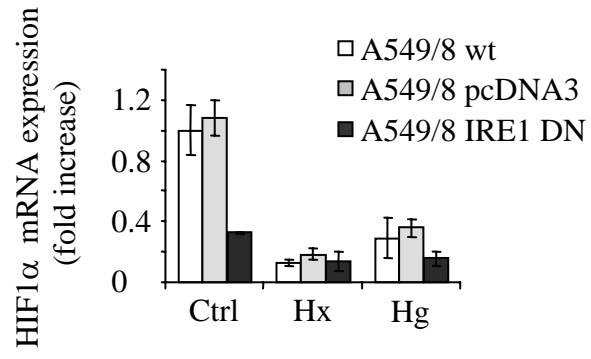
- A549/8 wt
- ▒ A549/8 pcDNA3
- A549/8 IRE1 DN

**B**

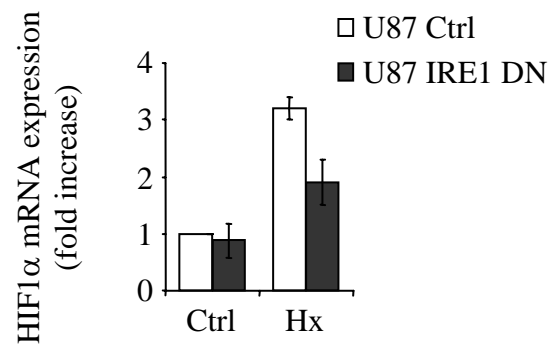


**A****B****C**

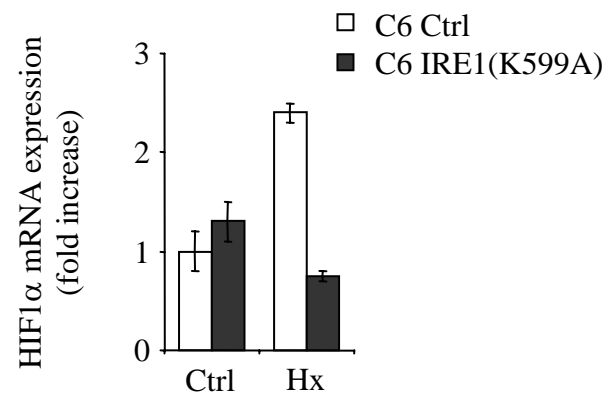
**A**

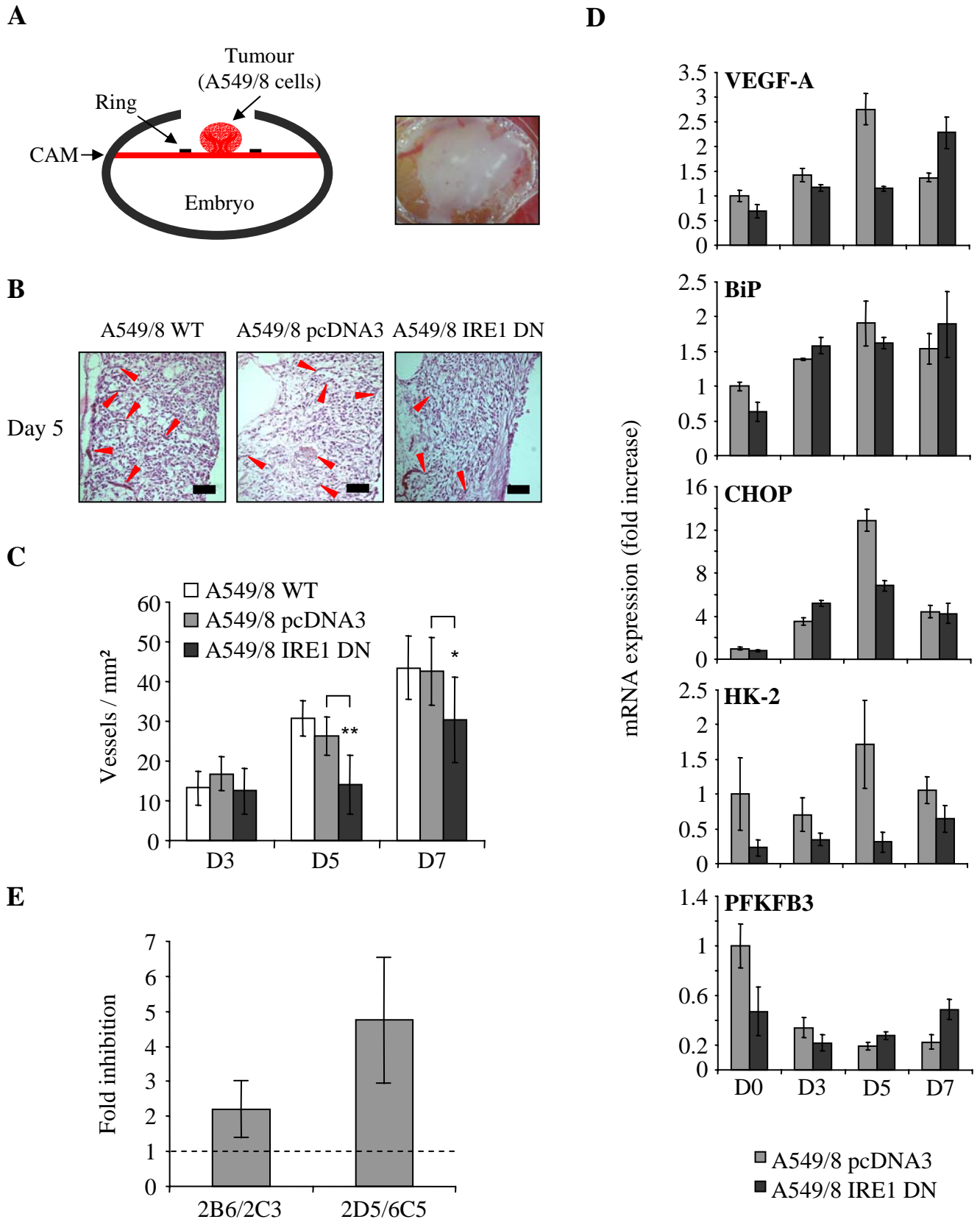


**B**

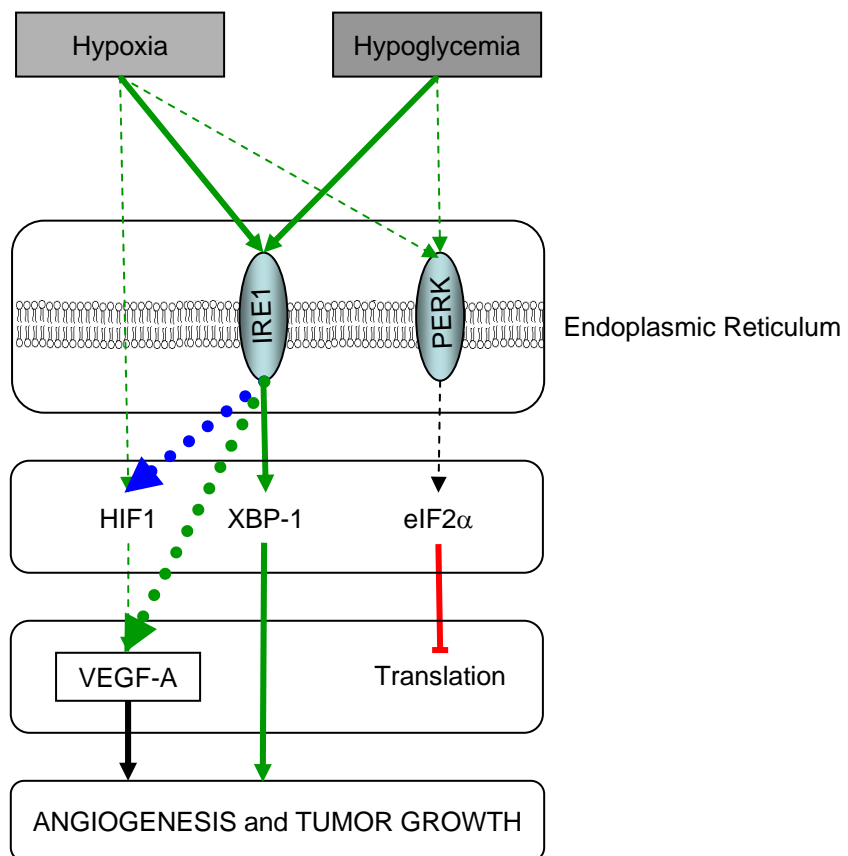


**C**





Drogat et al., Figure 6



Drogat et al., Figure 7

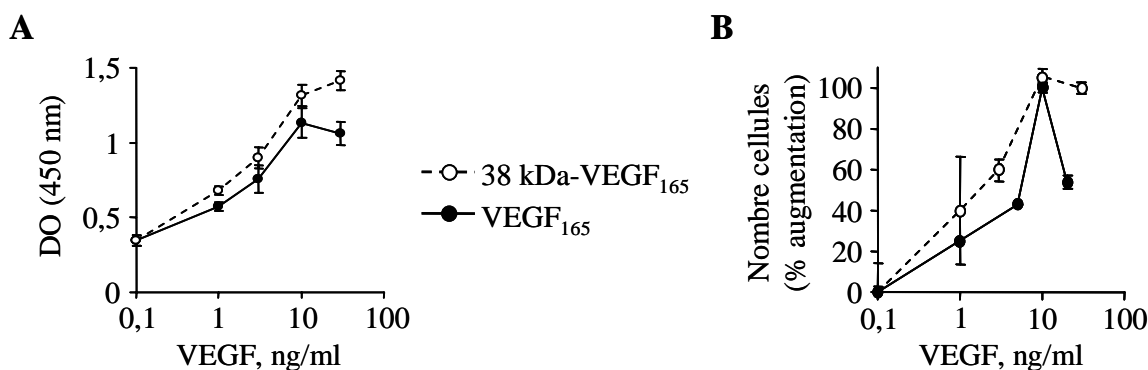






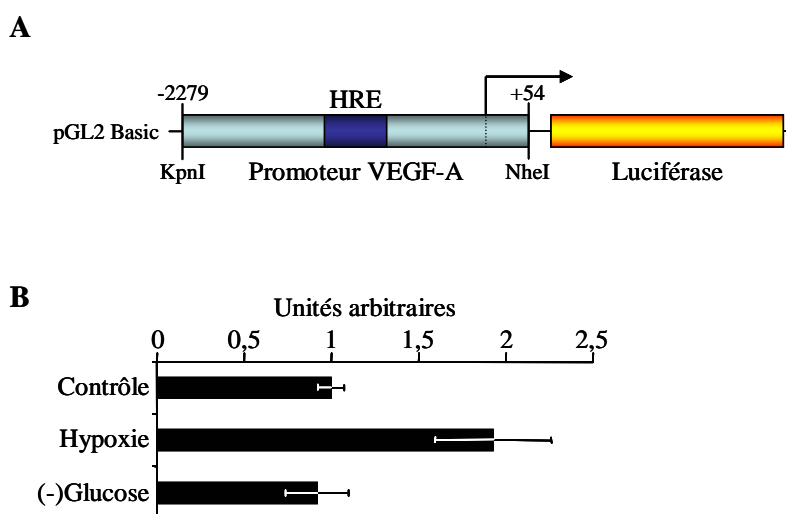






**Figure 30 : Le VEGF<sub>165</sub> de 38 kDa sécrété par des cellules A549/8 soumises à des carences en glucose est biologiquement actif.**

Les cellules A549/8 sont carencées en glucose dans un milieu complet sans sérum pendant 24 heures. Le VEGF<sub>165</sub> sécrété dans le milieu conditionné est purifié sur une colonne « Hi-trap heparin HP column » (Amersham) puis dosé par ELISA. Son activité est déterminée sur des cellules endothéliales BAE. Les cellules sont inoculées à raison de 10000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu DMEM, 1 % SVF et avec différentes quantités de VEGF<sub>165</sub> recombinant humain (●) ou de 38 kDa-VEGF<sub>165</sub> (○). (A) Activité métabolique : après 72 heures d'incubation, l'activité métabolique cellulaire est déterminée par un test WST1. (B) Test de prolifération : un comptage cellulaire est réalisé après 3 jours d'incubation en présence de 38kDa-VEGF<sub>165</sub> et de VEGF recombinant.



**Figure 31 : Etude de l'activité du promoteur du gène du VEGF-A dans les cellules A549/8.**

(A) Représentation schématique de la construction pVEGF-LUC : le gène de la luciférase est placé sous la dépendance du promoteur humain du VEGF (-2279 à +54) contenant l'élément de réponse à l'hypoxie (HRE). (B) Les cellules A549/8 sont co-transfectées transitoirement à la lipofectamine avec le vecteur rapporteur pVEGF-LUC et le vecteur contrôle pSV-βgalactosidase et la détection de l'activité luciférase est réalisée après 24 heures d'incubation en milieu carencé en glucose ou en hypoxie. Tous les résultats sont normalisés avec le vecteur contrôle et exprimés par rapport à l'activité du promoteur du gène du VEGF-A en condition contrôle.

### **3. Résultats complémentaires**

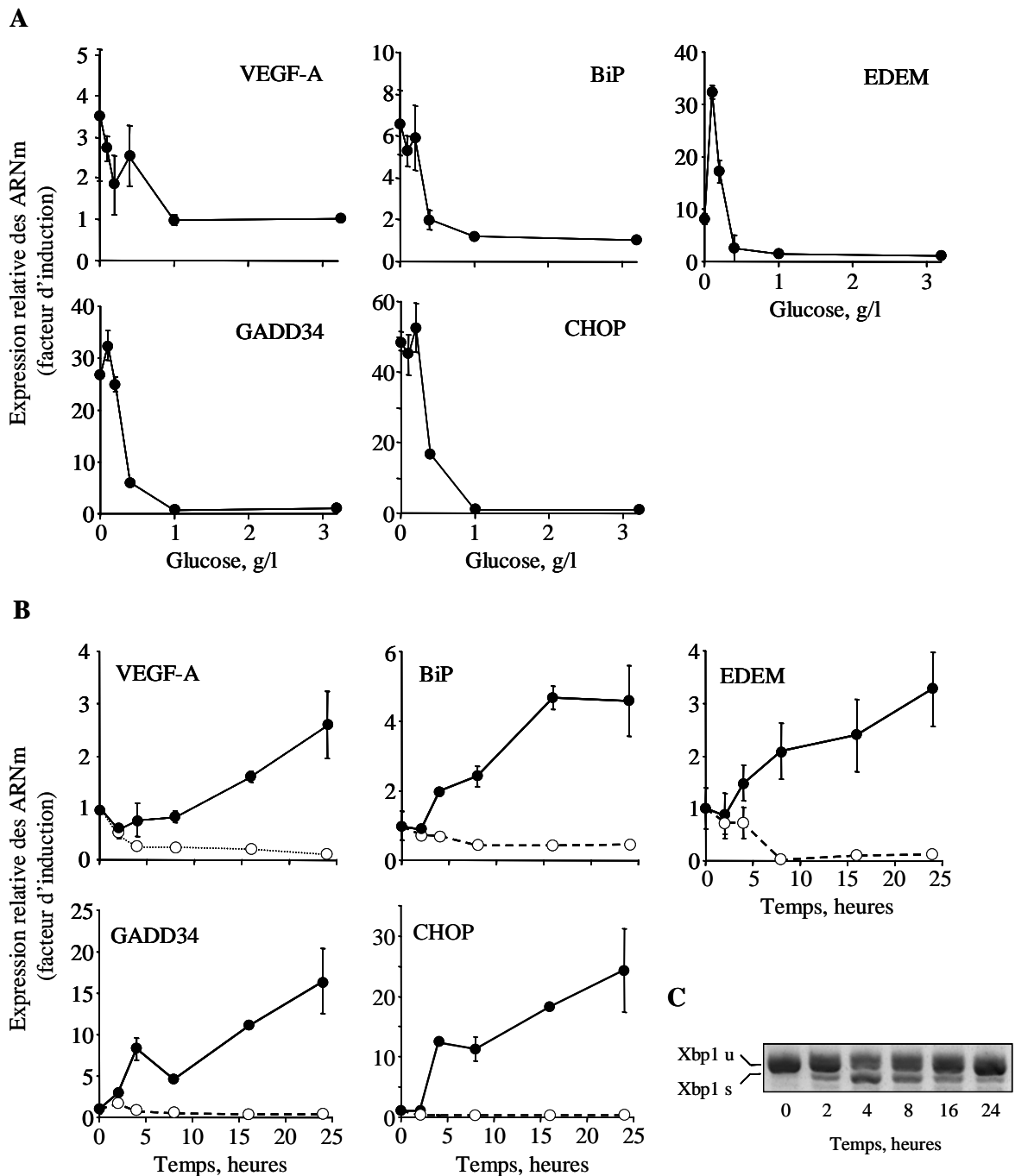
#### **3.1. Activité biologique du VEGF<sub>165</sub> de 38 kDa**

Le VEGF-A est une glycoprotéine homodimérique sécrétée possédant de nombreux ponts disulfures dont l'expression dépend de l'activité de conformation du RE (Ozawa *et al.* 2001a; Ozawa *et al.* 2001b). Il est concevable que le VEGF-A sécrété pendant un stress du RE puisse être anormalement glycosylé et/ou anormalement conformé ou protéolysé (Houck *et al.* 1992) et perde ainsi en partie son activité biologique. Peretz *et al.* (1992) montrent que l'expression de VEGF-A recombinant par des cellules BHK diminue de 10 % quand ces cellules sont traitées à la tunicamycine (inhibiteur des N-glycosylations) mais l'activité mitogène de ce facteur n'est pas affectée. A un niveau qualitatif, le VEGF<sub>165</sub> sécrété par les cellules A549/8 soumises à une carence de glucose, mais pas dans des conditions hypoxiques ou de carences en glutamine (*cf. article n°1*), présente une altération de glycosylation et une masse moléculaire apparente de 38-kDa (*cf. articles n°1 et 2*). Peu d'informations existent sur le repliement du VEGF-A sécrété lors d'un stress du RE engendré par une carence de glucose. May *et al.* (2005) montrent que la formation de ponts disulfures pendant un stress du RE d'origine hypoxique ou hypoglycémique est possible par la surexpression de la protéine ERO1-L $\alpha$  par un mécanisme dépendant de HIF-1. Or, la carence en glucose n'induit pas de stabilisation du facteur de transcription HIF-1 dans les cellules A549/8. En tenant compte des motifs de glycosylation et des ponts disulfures présents dans le VEGF-A, nous avons cherché à vérifier l'activité biologique du VEGF<sub>165</sub> de 38 kDa sécrété par ces cellules en conditions de carences en glucose.

Le VEGF-A sécrété par les cellules A549/8 soumises à une carence en glucose (38kDa-VEGF<sub>165</sub>) a tout d'abord été purifié et sa capacité à induire la croissance et la survie de cellules endothéliales aortiques bovines a été examinée. Ce facteur reste entièrement actif du point de vue métabolique (test WST1, roche) (figure 30A) ou mitogène sur les cellules endothéliales (figure 30B). Ainsi, le VEGF<sub>165</sub> est sécrété sous une forme active, ce qui suggère que les carences en glucose peuvent produire des signaux angiogéniques efficaces au sein des tumeurs.

#### **3.2. Activité du promoteur du VEGF-A en carence de glucose vs. hypoxie**

En conditions hypoxiques, mais pas en absence de glucose, l'augmentation de la transcription des ARNm du VEGF-A par les cellules A549/8 est corrélée avec la stabilisation du facteur de transcription HIF (*cf. article n°2*). Ces résultats ont été confirmés par



**Figure 32 : Profils d'expression du gène VEGF-A et des gènes de la réponse UPR.**

Les cellules A549/8 sont cultivées en milieu complet sans sérum en carence de glucose (●) ou en condition contrôle (○). Les ARNm de ces cellules sont ensuite purifiés et l'expression du gène du VEGF-A et des gènes de la réponse UPR est mesurée par qPCR. Les valeurs obtenues pour chaque gène sont exprimées par rapport à l'expression du gène de la  $\beta$ -actine qui sert ici de standard. Ces valeurs sont présentées en facteur d'induction, la valeur 1 étant définie arbitrairement sur la concentration de glucose 3,2 g/l ou sur le temps 0. (A) Expression du VEGF-A et des gènes de la réponse UPR en fonction de la concentration de glucose pendant 24 heures. (B) Cinétiques d'expression du VEGF-A et des gènes de la réponse UPR en absence ou en présence de glucose. (C) Cinétique d'épissage des ARNm de XBP1 en absence de glucose. L'épissage n'est pas observé en présence de glucose (non montré).

l'utilisation de la technique de gène rapporteur utilisant le vecteur pVEGF-LUC (don du Dr. H. Esumi, Chiba, Japon ; (Kimura *et al.* 2000)) (figure 31A).

L'activité du promoteur du VEGF-A est augmentée d'un facteur 2 dans les cellules A549/8 après une incubation de 24 heures en hypoxie. L'augmentation est détectable après 6 heures et maximale après 14 heures. En comparaison, aucune augmentation n'est observée en absence de glucose (figure 31B) aux mêmes temps (non montré). D'autres études montrent qu'en carence de glucose la séquence 3'utr a un rôle prépondérant dans l'augmentation des transcrits du VEGF-A (Kotch *et al.* 1999; Iida *et al.* 2002; Yun *et al.* 2005).

### **3.3. Expression des ARNm des gènes de réponse au stress du RE**

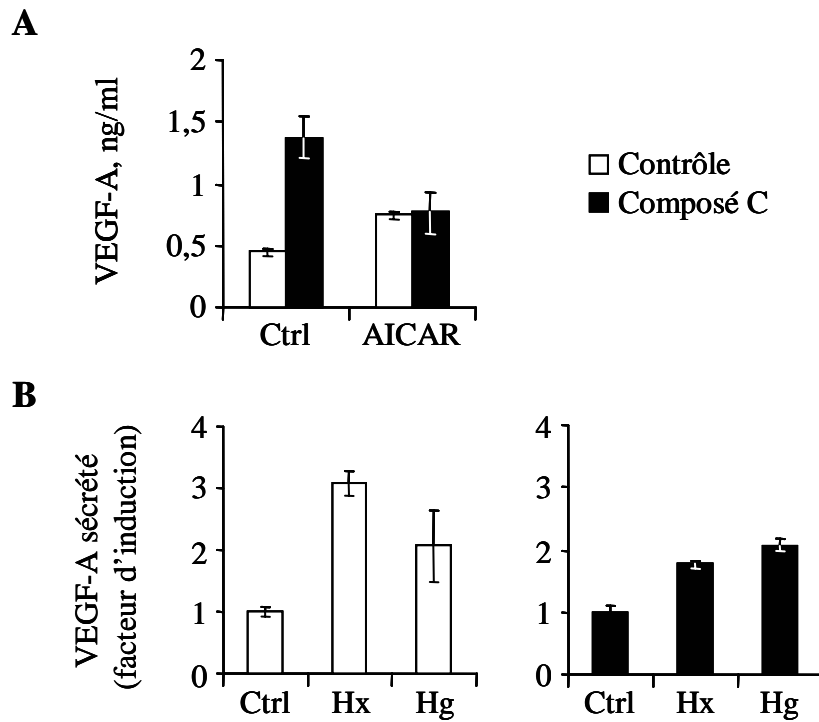
Un mécanisme alternatif de régulation de l'expression des ARNm du VEGF-A en condition de carence en glucose fait intervenir la réponse UPR. Nous montrons que dans les cellules A549/8, l'expression de différents gènes de réponse au stress du RE (BiP, EDEM, GADD34 et CHOP) est augmentée en absence de glucose mais pas en condition d'hypoxie (*cf. article n°2*). Cette augmentation est corrélée avec l'augmentation de l'expression des ARNm du VEGF-A. Nous confirmons ces résultats par des études cinétiques et dose-dépendantes.

L'expression des ARNm des gènes de la réponse UPR, BiP, GADD34, EDEM et CHOP, est augmentée pour des concentrations en glucose inférieures à 0,4 g/l (figure 32A), en corrélation avec l'expression des ARNm du VEGF-A et de l'épissage d'XBP1 (*cf. figure 2D, article n°2*). Une étude cinétique sur 24 heures montre que l'induction est observable après 4 heures pour tous les gènes dépendants de l'UPR, et après 8 heures pour le gène codant pour le VEGF-A (figure 32B). L'expression des ARNm augmente ensuite progressivement jusqu'à 16-24 heures. L'amplitude de l'effet varie selon le gène étudié : elle est d'un facteur 3 à 4 pour les gènes du VEGF-A, BiP et EDEM, et atteint des valeurs proches ou supérieures à 20 pour les gènes GADD34 et CHOP.

L'épissage des ARNm de XBP1 en absence de glucose est observable dès 2 heures de carences, maximal après 4 heures, et diminue ensuite jusqu'à 24 heures (figure 32C).

### **3.4. Implication de l'AMPK dans l'expression du VEGF-A en carence de glucose**

D'autres voies d'induction potentielles du VEGF-A ont été évoquées dans la littérature. Yun *et al* (2005), montrent que les carences de glucose induisent une augmentation des ARNm du VEGF-A, de GLUT1 et de PFKFB3 dans plusieurs lignées de cellules tumorales par l'intermédiaire d'un mécanisme indépendant de HIF-1 et sous le contrôle de la protéine kinase



**Figure 33 : Effets de l'AICAR et du composé C sur l'induction du VEGF-A.**

Les cellules A549/8 sont préalablement traitées (en noir) ou non (en blanc) avec 10  $\mu$ M de composé C pendant 30 minutes puis exposées pendant 24 heures sous les conditions suivantes : contrôle (Ctrl), carence en glucose (Hg), hypoxie (Hx) ou incubation en présence d'AICAR (500  $\mu$ M). Les milieux de culture sont récupérés et le VEGF-A sécrété est mesuré par ELISA. (A) Effets de l'AICAR et du composé C sur l'expression du VEGF-A. (B) Effets du composé C en hypoxie ou en carence de glucose. Les résultats sont normalisés par rapport à la sécrétion de VEGF-A dans les conditions de culture contrôle.



AMP-dépendante (AMPK). Ces auteurs suggèrent que l'induction des ARNm du VEGF-A en absence de glucose est due à l'augmentation de leur stabilité et que l'activité de l'AMPK est nécessaire et suffisante pour cette stabilisation. L'AMPK est considérée au niveau métabolique comme une « jauge à énergie ». Elle est activée par l'AMP, et donc dans des états cellulaires de faible énergie. L'AMPK inactive par phosphorylation des enzymes clés de processus anaboliques qui consomment de l'ATP et active des enzymes permettant la production d'ATP (PFK2). Elle augmente également le transport transmembranaire du glucose et l'oxydation des acides gras (Zhou *et al.* 2001).

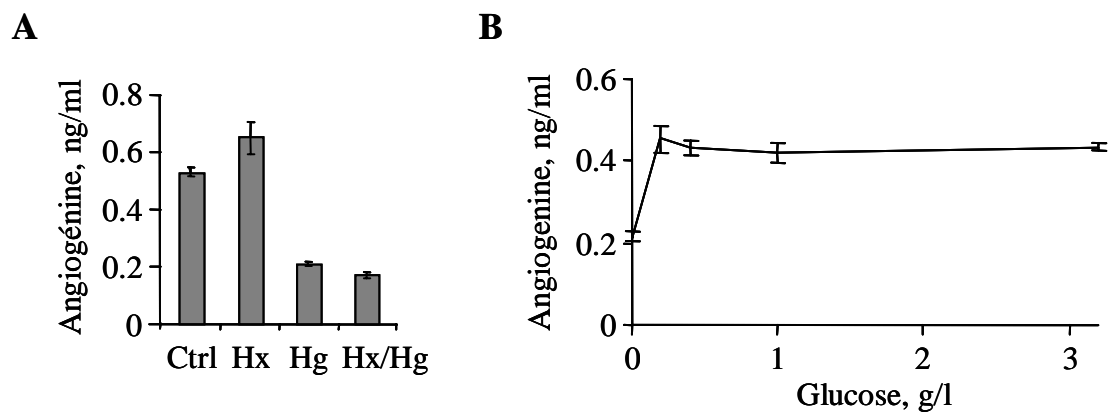
Nous avons donc cherché à évaluer l'implication de l'AMPK dans l'induction du VEGF-A en réponse aux carences en glucose dans notre modèle cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé deux composés agissant de manière opposée : d'une part le 5-amino-4 imidazole carboxamide riboside (AICAR), analogue de l'AMP, activateur de l'AMPK, et agent mimétique de signaux de carence en glucose (Hardie *et al.* 1998) ; et d'autre part le composé C (L-824150, don de Merck & Co, Inc.), agent bloquant de l'AMPK (Zhou *et al.* 2001) et inducteur d'un effet antagoniste à celui de l'AICAR.

Nous avons mesuré la sécrétion du VEGF-A par ELISA sous l'effet d'AICAR et/ou du composé C. Nous montrons que l'AICAR et le composé C induisent indépendamment une augmentation de l'expression du VEGF-A (d'un facteur 1,7 et 3, respectivement). Un traitement avec ces deux agents conduit à la diminution de l'expression du VEGF-A par rapport à la condition contrôle traité uniquement au composé C (figure 33A).

Lors d'une hypoxie de 24 heures, la sécrétion de VEGF-A est augmentée d'un facteur 3 et un prétraitement avec le composé C induit une diminution de 40 % de cette expression (figure 33B). En comparaison, la carence en glucose induit l'augmentation de la sécrétion du VEGF-A d'un facteur 2 avec ou sans traitement par le composé C (figure 33B). Ainsi, nous n'observons pas d'implication de l'activité de l'AMPK en carence de glucose sur les cellules A549/8. Toutefois, l'interprétation de nos résultats reste difficilement exploitable. En effet, nous observons que le composé C a une activité cytotoxique et donc agit vraisemblablement sur d'autres mécanismes métaboliques. Nous n'avons donc pas poursuivi cette étude.

### **3.5. Effets de l'hypoxie et des carences en glucose ou en acides aminés sur l'expression de l'angiogénine**

D'autres polypeptides que le VEGF-A sont susceptibles d'être engagés lors du développement tumoral suite à des stress hypoxiques et éventuellement hypoglycémiques. L'angiogénine est un inducteur puissant de la néovascularisation *in vivo*. Ce facteur est



**Figure 34 : Expression de l'angiogénine sous l'effet de carence en glucose ou d'hypoxie.**

Les cellules A549/8 sub-confluentes sont incubées en milieu complet sans sérum dans différentes conditions : (A) contrôle (Ctrl), d'hypoxie (Hx), de carence en glucose (Hg) ou en hypoxie couplée à une carence de glucose (Hx/Hg) et (B) avec des concentrations croissantes de glucose. Après 24 heures d'incubation, un dosage de l'angiogénine est réalisé par ELISA sur les milieux conditionnés par les cellules. Ces résultats sont à comparer avec ceux obtenus pour le VEGF-A (*figure 1, article n°2*).

considéré comme un marqueur pronostique potentiel du développement tumoral ainsi que comme cible thérapeutique du traitement antitumoral ; sa concentration sérique est augmentée lors du développement de divers cancers et des corrélations sont établies entre son niveau d'expression tissulaire et l'agressivité de plusieurs types de tumeurs. De plus, des inhibiteurs ou antagonistes de l'angiogénine ralentissent ou inhibent la croissance tumorale chez la souris (Pavlov and Badet 2001). L'hypoxie stimule également son expression dans diverses cellules humaines normales et tumorales (Hartmann *et al.* 1999; Koga *et al.* 2000; Pilch *et al.* 2001).

Les effets de l'hypoxie et des carences nutritives sur l'induction de l'angiogénine ont été comparés à ceux sur le VEGF-A. La mesure de l'angiogénine est réalisée par ELISA dans les milieux conditionnés des cellules A549/8 soumises à des conditions d'hypoxie et/ou de carence en glucose.

Nous observons que l'expression du VEGF-A est induite par l'hypoxie et la carence en glucose (pour des concentrations inférieures ou égales à 0,2 g/l de glucose) et un effet cumulatif est observable lorsque l'hypoxie est couplée à une absence de glucose (*cf. article n°2*). En comparaison, l'expression de l'angiogénine est faiblement induite en hypoxie et est réprimée en carence de glucose. De plus, lors d'une carence en glucose couplée à une hypoxie, l'expression de l'angiogénine est également diminuée (figure 34A). L'effet des carences en glucose est observé à des concentrations inférieures ou égales à 0,2 g/l (figure 34B). Une étude de l'expression de l'angiogénine a également été menée sur des cellules carencées pour différents acides aminés (Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val et Gln). Une carence globale ou individuelle de ces acides aminés n'entraîne aucune variation de l'expression de l'angiogénine (non montré).

Il existe donc des modes de régulation distincts de l'induction de ces deux facteurs angiogéniques par des cellules soumises à différents stress ischémiques.

#### **4. Statut métabolique cellulaire durant la progression tumorale**

(*Article n°3*)

Les cellules tumorales prolifèrent initialement en absence de vascularisation dans un environnement où se développent diverses contraintes métaboliques associées à l'ischémie tumorale. Les cellules répondent à ces conditions environnementales hostiles par différents processus et notamment en modifiant leur métabolisme énergétique pour subvenir à leur besoin. La mesure de ces altérations métaboliques a été réalisée par spectrométrie infrarouge (FT-IR, Fourier Transform InfraRed). La spectrométrie FT-IR est une technique analytique

très sensible qui permet une analyse des propriétés structurales et physicochimiques des échantillons biologiques au niveau moléculaire (Petibois *et al.* 2004). Le but de cette étude a été de caractériser par spectrométrie FT-IR le statut chimique micro-environnemental des tissus tumoraux au cours de leur développement.

Nous avons tout d'abord analysé *in vitro* les variations chimiques intervenant au niveau cellulaire durant des carences de glucose et/ou des stress hypoxiques. Deux lignées cellulaires humaines ont été étudiées : les cellules de glioblastome U87 et d'adénocarcinome de poumon A549/8. L'utilisation du milieu de culture sans sérum (*cf. article n°1*) permet d'augmenter la résolution de détection des différents paramètres : la consommation de glucose, la production d'acide lactique et le taux d'acides gras insaturés. Ces paramètres ont ensuite été étudiés *in vivo* sur des tumeurs A549/8 et U87 implantées sur la membrane chorion-allantoïdienne de poulet (CAM).

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article n°3 : « *Chemical mapping of molecular changes during tumor progression by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectrometry and imaging* ». (En préparation)

Les cellules A549/8 soumises à des conditions d'hypoxie et/ou de limitation en glucose sont moins sensibles aux stress oxydants induits dans ces conditions que les cellules U87 comme l'indique un taux plus faible d'acides gras insaturés. La consommation de glucose et la production d'acide lactique sont plus faibles pour les cellules A549/8 que pour les cellules U87 du fait d'une activité métabolique plus faible. Ces deux modèles cellulaires ont ensuite été implantés sur la membrane chorion-allantoïdienne de poulet afin d'étudier les variations métaboliques tissulaires liées à la formation du réseau vasculaire. Pour ces deux lignées tumorales, à des distances supérieures à 150 µm des vaisseaux sanguins, on observe une augmentation de la concentration d'acide lactique et du taux d'acides gras insaturés ainsi qu'une diminution de la concentration de glucose. L'amplitude de ces effets est plus modérée au sein des tumeurs A549/8 que dans les tumeurs U87.

En conclusion, en utilisant la spectrométrie FT-IR, nous détectons des variations biochimiques subtiles liées à des conditions ischémiques au sein de masses tumorales. Cette technique nous a permis la détermination du statut métabolique cellulaire en terme de consommation de glucose et d'acides aminés ainsi que de la production d'acide lactique (*cf.*

*article n°1*). La spectrométrie FT-IR nous a en particulier permis de corrélérer le phénotype hyper-glycolytique des cellules transformées à leur statut prolifératif et agressif.

Ces analyses, très rapides, (de l'ordre d'une vingtaine de minutes) sont, de plus, compatibles avec les investigations anatomo-pathologiques en clinique et constituent ainsi un outil prometteur d'imagerie biomédicale permettant le diagnostic de cancer.

### **Article n°3**

(Soumis)



## **ARTICLE n° 3**





**Classification: Biological sciences**

**Chemical mapping of molecular changes during tumor progression by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectrometry and imaging.**

Cyril Petibois<sup>\*,†</sup>, Benjamin Drogat<sup>‡,§</sup>, Andreas Bikfalvi<sup>‡,§</sup>, Michel Moenner<sup>‡,§</sup>, and Gérard Déléris<sup>\*,†</sup>

\* CNRS UMR 5084, CNAB, Bio-Organic Chemistry Group and <sup>†</sup> Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France; <sup>‡</sup> INSERM EMI 0113 and <sup>§</sup> Université de Bordeaux 1, Av. des Facultés, 33605 Pessac, France.

**Corresponding author:** Dr. Cyril Petibois  
Tel./Fax.: +33 5 57571002  
[cyril.petibois@u-bordeaux2.fr](mailto:cyril.petibois@u-bordeaux2.fr)

**Manuscript information:** 19 text pages, 7 figures.

**Abbreviation footnotes:** a.u.: arbitrary units; CAM: chorioallantoïc membrane; FT-IR: Fourier-transform infrared; Glc: glucose; L-A: lactic-acid.

## Abstract

To validate FT-IR spectrometry for the analysis of metabolic and structural changes in cancer, human lung adenocarcinoma (A549/8) and glioblastoma (U87) cells lines were exposed to increasing glucose concentrations under normoxia or to hypoxia. A549/8 cells exhibited lower sensitivity to oxidative stress than U87 cells as assessed by the lower fatty acyl chain insaturation observed through changes in the  $\nu(\text{CH})$ ,  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ , and  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  IR absorptions. Glucose consumption and lactic-acid production under low glucose or hypoxic condition were higher in U87 cells than in A549/8 cells. A549/8 and U87 cells were then xenografted on the chorioallantoic membrane of chicken egg. Tumor growth was studied by FT-IR imaging after 3, 5, and 7 days of incubation to determine metabolic and structural changes within the tumor mass. In U87 cells, that form highly invasive and angiogenic tumors, hypoxia, hypoglycemia, and lactacidosis appeared after 5 days as determined by FT-IR spectrometry. Severe ischemia and oxidative damages could be detected after 7 days in the middle of tumors that were thicker than 1.5 mm in diameter. On the contrary, poorly angiogenic and proliferating A549/8 tumors exhibited higher resistance to oxidative stress and lower metabolic imbalance under ischemic condition. This indicate that FT-IR imaging is a valid method to determine subtle chemical changes in tumors and may be developed into a useful diagnostic tool for the management of malignant disease.

## Introduction

Many solid tumors such as glioma and lung carcinoma pose challenges for disease management and treatment. For example, malignant glioma has one of the worst prognoses in medicine, with median survival well below 18 months despite technological advances in treatment (1). Besides histopathology used for tumor grading, novel diagnostic tools have been developed such as gene profiling aimed to identify prognostic markers for the outcome of the disease. In addition, knowledge about intracellular metabolic pathways involved in tumor development may also be important and provide additional information for diagnosis and treatment of the disease. (2).

Tumor progression is dependent on oxygen delivery and intracellular glucose metabolism. In tumor cells, low intercellular oxygen tensions ( $pO_2$ ) and a high glycolytic metabolic profile are observed (3). Hypoxia regulates the transcription of various genes involved in malignant growth, invasion and metastasis (4). Tumor hypoxia essentially occurs when the growth of the tumor outstrips the accompanying angiogenesis. Thus, many parts of a developing tumor are hypoxic. Up to 50% to 60% of locally advanced solid tumors may exhibit hypoxic and/or anoxic tissue areas that are heterogeneously distributed within the tumor mass (5).

As a consequence of hypoxia, tumors consume more glucose than normal tissue. Furthermore, glucose uptake is increased in tumors (6). The factors limiting glucose and  $O_2$  uptake are poor blood flow, impaired microcirculation as well as greater diffusion distances between blood vessels and cancer cells (7) and cell dehydration (8). Albeit an increase of glycolysis in solid tumors, ATP production by fermentation to lactic acid is higher in tumors compared to healthy tissue. Tumor tissue produces 11% of ATP from glucose fermentation to lactic-acid while it is only 2-3 % for normal tissues. Indeed, lactic-acid production is increased by several folds (9) while its removal is also reduced as a consequence of impaired surrounding microcirculation. As a consequence, acidic intracellular and extracellular pH is associated with tumor progression and ischemia. Carcinogenesis is also associated with an increase in free radicals that induce the peroxidation of lipids, protein, and DNA and are mutagenic (10). Tumors behave heterogeneously with respect to

their energy metabolism depending on tumor type and the host environment. Thus, determining the metabolic profile may provide additional useful information to determine tumor invasiveness.

Diagnostic methods based on Fourier-transform infrared (FT-IR) spectrometry emerged and developed rapidly during the last decade. In complex systems, such as cells, the overall IR spectrum depends on all cellular constituents including proteins, lipids, and nucleic acids. The IR spectra can be used as signatures if spectral patterns are correlated with biological properties. Despite the possibility of obtaining useful information from IR spectra for different pathologies (11-13), this method is not yet recognized as a diagnostic tool. At present, the main applications of FT-IR spectrometry in biomedicine are in bacteria identification (14), molecular structure determination (15), cancer DNA phenotype recognition (16-18), and molecular concentration determinations (19-21). One advantage of the FT-IR spectrometry approach is that a spectrum representative of the whole organic contents may be recorded from an intact cell within a few seconds. A recent technical advance has been availability of imaging systems able to provide fast FT-IR images of tissues. Only a few minutes are now required to obtain a functional FT-IR image of a 1 mm<sup>2</sup> tissue area. Recently, a very promising study using FT-IR spectroscopy in a mouse model of 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis, evidenced a cancer phenotype well in advance of a palpable tumor (18).

The aim of this study is to provide chemical FT-IR imaging of tumor cells and tissues under distinct *in vitro* and *in vivo* conditions. To assess the analytical potential of this technique, we first analyzed by FT-IR spectrometry two human cell lines known to exhibit different patterns of tumor development, human glioblastoma (U87) and lung adenocarcinoma (A549/8). U87 cell-derived tumors are highly invasive and angiogenic and are widely used as a model form human glioma (22). A549/8 cell-derived tumors are less invasive and angiogenic. We also analyzed the FT-IR spectrometry profile of cells exposed *in vitro* to hypoxia or hypoglycemia. Finally, we compared the profiles of both cell types by FT-IR imaging after grafting on the chick chorioallantoic membrane.

## Experimental Procedures

### Cell cultures

A549 human lung carcinoma (ATCC CCL 185) and U87 human glioma cells (ATCC HTB 14) were maintained in DMEM with glucose, antibiotics, and L-glutamine. Cells were plated and allowed to adhere for 2 to 4 hr. Nonadherent cells were washed off with PBS, and new culture medium was added for 24-hours and containing 0, 0.55, 1.11, 2.22, 3.33, 4.44, 5.55, and 17.76 mMol/L of added glucose. The same experimental conditions were also prepared for hypoxia ( $pO_2 = 3\%$ ). Culture media were then removed to be placed into sterile tubes ( $\sim 1$  mL) and cells ( $\sim 10^6$  cells) were untied and lysed into 300  $\mu$ L sterile water. Cell solutions were then stored within liquid nitrogen until analysis.

### Cell and culture media FT-IR spectra acquisition

All culture media ( $\sim 150$   $\mu$ L of initials and post-culture media) were analyzed by FT-IR spectrometry. Culture media were homogenized with an agitator (*Vortex Reax 2000*, Heidolf) at 1000 g for 10 sec. Then, 35  $\mu$ L of each solution were exactly deposited within the cell limits of a silicon-plate bearing 96 sample cells (Bruker, Germany). The plate was subsequently placed into a drying vacuum (2 mmHg and silica gel) to evaporate water (60 min for 72 deposits). The plate was finally put into the analysis compartment of a Bruker Tensor-27 spectrometer equipped with a HTS-XT auto sampler. The spectrometer used a Globar (MIR) source (7 V), a KBr beam splitter, and a DTGS/B detector (16-28°C). Beam diameter at the sample location was 6 mm and sample cells were 7-mm diameter. In all experiments, a 2.0  $\text{cm}^{-1}$  resolution was used and acquisitions were performed using 32 scans. All analyses were performed in triplicate and FT-IR spectra were averaged, made compatible (3630 X-Y points per spectra to standardize wavenumbers). After return to ambient temperature, cells FT-IR spectra were obtained using the same protocol as for culture media. Glucose and lactic-acid concentrations were also determined enzymatically for all culture media before and after cell culture, as well as on cell solutions.

## **FT-IR spectra deconvolutions**

Spectral deconvolutions were performed using the Levenberg-Marquardt method for all cell and culture media FT-IR spectra. For cells only, the  $\nu(\text{CH})$ ,  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ , and  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  absorbances of fatty acyl chains were determined on the 3100-2800  $\text{cm}^{-1}$  spectral region (23, 24). Using the 1300-900  $\text{cm}^{-1}$  spectral region, spectral deconvolution allowed determination of the  $\nu(\text{C-O})$  absorbance of glucose (1033  $\text{cm}^{-1}$ ), lactic-acid (1127  $\text{cm}^{-1}$ ). Spectral areas (spectrometer arbitrary unit: a.u.) corresponding to IR absorptions revealed by deconvolutions were compared to biochemical assays to determine molecular IR absorptivities (mMol/a.u.) of glucose and lactic-acid from series of pure product spectra. Equations to determine molecular concentrations from FT-IR spectra were obtained using molecular IR absorptivities of the molecules and their IR absorption found from spectral deconvolutions.

## **CAM-assays**

Tumor xenografts were prepared as previously described (25). Thirty-six fertilized chicken eggs (*Gallus gallus*; E.A.R.L. Morizeau, Dangers, France) were incubated at 37°C in a 80% humidified atmosphere. On day 4 of embryonic development, a window was made in the eggshell and then sealed with Durapore tape. On day 10, plastic rings (made from Nunc Thermanox coverslips) were deposited on the CAM for delimitation of tumor cells samples (xenograft). About  $5 \cdot 10^6$  A549/8 or U87 cells were deposited on the CAM, after a soft surface scratching to enhance cell grafting (xenograft-CAM). Three, 5, and 7 days after grafting, xenograft-CAM from 6 chicken eggs for each cellular type (A549 and U87) were removed. The area containing the ring was cut-out for additional analysis. Photos of each xenograft-CAM were taken under a stereomicroscope (Nikon SMZ800) using a digital camera (Nikon Coolpix 950) at days 13, 15, and 17 to verify tumor growth and viability. After removal, xenograft-CAM were placed into sterile tubes and placed into liquid  $\text{N}_2$  before analysis.

### **Xenograft-CAM tissue FT-IR images acquisition**

After return to ambient temperature, xenograft-CAM was laid down flat on cooled glue (polyvinilic alcohol for cryostat, -20°C) to avoid tissue embedding. Gliomas were analyzed without return to ambient temperature. Once the tissue was frozen, additional glue was used to homogenize the sample intended to cryosections (Cryostat 3050-TM, Leica-Microsystems, France). Tissue section of 20 microns in thickness were performed every ~200 microns to analyze tumor mass contents from the top of the tumor up to its contact to CAM. Typically, tumor thickness was ~0.5-2 mm, depending on the incubation time (3, 5, or 7 days). 3 to 7 sections were analyzed, each one interspaced by 200  $\mu\text{m}$ . Tissue section were analyzed by the Spotlight 300 FT-IR imaging system, equipped with a Spectrum One spectrometer (Perkin-Elmer). FT-IR spectra were obtained using 8 scans (4000-700  $\text{cm}^{-1}$ ) and a 4  $\text{cm}^{-1}$  resolution.

### **FT-IR image data treatment**

For all tissue samples analyzed, once the FT-IR image was obtained, an atmospheric correction was performed to remove  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$  absorptions and the resultant FT-IR image was computer saved. Transversal capillary blood vessels were spotted using the visible image. Then, 50 microns squared areas (7\*7 pixels) were selected on the FT-IR image moving from the spotted capillaries up to 300-400 microns in distance. The 49 FT-IR spectra of every selected area were averaged. Deconvolution was then applied on averaged spectra, as described above, for determining glucose, lactic-acid, and fatty acyl chain absorptions.

### **Statistical analyses**

All experiments and spectra acquisitions were performed in triplicate and averaged. Data are presented as mean  $\pm$  SD. Correlations between enzymatic assays and FT-IR data were tested using Pearson's coefficient.

## Results and discussion

### Culture media analysis by FT-IR spectrometry

We first determined glucose and lactic-acid concentrations in culture media using their most characteristic IR absorptions deduced from the deconvolution of spectra of pure solutions for the 1200-900  $\text{cm}^{-1}$  spectral interval. From FT-IR spectra of pure glucose and lactic-acid solutions, used as models for band position and shape determination, the bands centered at 1033 and 1127  $\text{cm}^{-1}$  could be fixed respectively for glucose and lactic-acid IR absorptions (19, 26). Glucose IR absorptivity at 1033  $\text{cm}^{-1}$  was 0.46  $\text{mMol/L/a.u.}$  and that of lactic-acid at 1127  $\text{cm}^{-1}$  was 0.187  $\text{mMol/L/a.u.}$  Glucose concentrations ( $\dot{C}_{\text{glc}}$ ) in the culture media were determined from the FT-IR spectra absorption band area at 1033  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{Glc}_{\text{a.u.}}$ ) and glucose IR absorptivity ( $\text{Glc}_{\text{abs}}$ ):

$$\dot{C}_{\text{glc}} (\text{mMol/L}) = \text{Glc}_{\text{a.u.}} * \text{Glc}_{\text{abs}} \text{ (Equation 1)}$$

Similarly, lactic-acid concentrations ( $\dot{C}_{\text{L-A}}$ ) were determined in culture media from the FT-IR spectra absorption band area at 1127  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{L-A}_{\text{a.u.}}$ ) and lactic-acid IR absorptivity ( $\text{L-A}_{\text{abs}}$ ):

$$\dot{C}_{\text{L-A}} (\text{mMol/L}) = \text{L-A}_{\text{a.u.}} * \text{L-A}_{\text{abs}} \text{ (Equation 2)}$$

Glucose concentrations determined from FT-IR spectra of culture media were found in accordance with glucose levels (0 to 17.76  $\text{mMol/L}$ ) added to culture media ( $r = 0.98$ ;  $P = 0.001$ ). An important characteristic of the deconvolution method using fixed bands at 1033 and 1127  $\text{cm}^{-1}$  was that the 1033  $\text{cm}^{-1}$  absorption band area did not appear for the FT-IR spectrum of the culture medium without glucose and that no 1127  $\text{cm}^{-1}$  absorption band area appeared for FT-IR spectra of culture media without lactic-acid (Figure 1A-1B). This result shows the compliance of using FT-IR spectra deconvolution to determine the absence or presence of the 1033 and 1127  $\text{cm}^{-1}$  IR absorption bands in culture media. Glucose and lactic-acid concentrations determined on culture media, before and after (post-culture media) cell incubation (Figure 1C-1D), were found in accordance with standard assays ( $r = 0.99$ ;  $P = 0.001$  for glucose, and  $r = 0.97$ ;  $P = 0.008$  for lactic-acid).



### Metabolic changes for A549/8 and U87 cells

A549/8 and U87 cells were incubated under hypoxic or normoxic conditions. Both type of cells had higher glucose consumption and lactic-acid production under hypoxia than normoxia ( $P < 0.05$  for both). A higher glucose consumption and lactic-acid production was also observed in U87 cells than in A549/8 cells ( $P < 0.05$ ; Figure 2A-2B). No glucose IR absorption was found in the post-culture media of A549/8 cells with initial glucose concentrations between 0 and 1.11 mMol/L (normoxia and hypoxia). A similar result was obtained for U87 cells, albeit a higher upper limit was observed (up to 2.22 mMol/L glucose culture medium). Thus, glycolysis is higher in U87 cells than in A549/8 cells whatever the glucose concentration added to culture media. These differences between cells are more pronounced under hypoxic conditions.

Cell extracts were also analyzed by FT-IR spectrometry. FT-IR spectra obtained with a water dilution ratio of 1/19 (vol/vol) were used to determine glucose and lactic-acid IR absorptions by deconvolution as shown above for culture media. Cellular glucose and lactic-acid concentrations were then determined using the following equations:

$$\dot{C}_{\text{glc}} \text{ (mMol/L)} = \text{Glc}_{\text{a.u.}} * \text{Glc}_{\text{abs}} * 20 \text{ (Equation 3)}$$

$$\dot{C}_{\text{L-A}} \text{ (mMol/L)} = \text{L-A}_{\text{a.u.}} * \text{L-A}_{\text{abs}} * 20 \text{ (Equation 4)}$$

Enzymatic assays performed on separate cell extracts showed that glucose and lactic-acid concentrations determination was accurate using the method based on FT-IR spectra deconvolution ( $P < 0.05$  for all series of data; Figure 3A-3B). Glucose concentrations deduced from FT-IR spectra of A-549-7 cell extracts were low under low glucose concentration and normoxia (0 to 2.22 mMol/L of glucose) as well as under hypoxia (0 to 3.33 mMol/L of glucose; Figure 3C-3D). Only the 0 mMol/L glucose condition under hypoxia led to a null cellular glucose concentration for A549/8 cells. By contrast, glucose IR absorption was found null in U87 cell extracts, under normoxia or hypoxia, for the 0 to 1.11 mMol/L glucose conditions (Figure 3C-3D). For higher glucose conditions, A549/8 cells extracts had higher glucose and lower lactic-acid concentrations than U87 cells ( $P < 0.05$  for every series of data).

These results indicate that FT-IR spectrometry is a valuable analytical tool for determining concentrations of molecules in fluids and cells, which is also in agreement with previously published data (13, 14). This report is the first to use spectral deconvolution for determining the characteristics IR absorptions of glucose ( $1033\text{ cm}^{-1}$ ) and lactic-acid ( $1127\text{ cm}^{-1}$ ). One advantage of the method is to avoid errors due to overlapping between IR absorption bands at low concentration of the compounds (27). Concentrations determined by this method showed that U87 cells exhibited higher glucose consumption and lactic-acid production than A549/8 cells, which is in agreement with previous studies (28-30).

### **Structural changes for A549/8 and U87 cell fatty acyl chains**

. We next analyzed the changes in  $\nu(\text{CH})$ ,  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ , and  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  IR absorption band intensities, which belong mainly to fatty acyl moieties of phospholipids (31). The changes in the  $\nu(\text{CH})/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  and the  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  IR absorption ratios are indicative of the insaturation level of phospholipids, an indicator of cellular oxidative stress (21, 23). It was previously proposed to analyze these bands directly on the spectrum curve, without any manipulation of IR absorption (32). However, the weak  $\nu(\text{CH})$  absorption band remained difficult to quantify. Instead, we performed the deconvolution of the  $3100\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$  spectral interval to isolate the  $\nu(\text{CH})$ ,  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ , and  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  IR bands of fatty acyl moieties. The weak  $\nu(\text{CH})$  band could be determined for every FT-IR spectrum. It was observed that the intensity of this band increased ( $P = 0.01$ ) for A549/8 cells exposed to low glucose conditions (0 to 5.5 mMol/L of glucose) while a corresponding decrease was observed for the  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  band ( $P = 0.01$ ) and no significant change occurred for the  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  band ( $P = 0.43$ ; Figure 4A-4B). The changes in fatty acyl moieties IR absorptions were found more pronounced under hypoxic conditions ( $P < 0.05$  for every series of data). These results were consistent with an expected higher phospholipids insaturation under low glucose conditions, which was further increased under hypoxia (33). In addition, U87 cells exposed to hypoxia and low glucose presented higher insaturation of fatty acyl moieties than A549/8 cells

(Figure 4C-4D). The higher insaturation level found in U87 cells is a sign of higher phospholipids peroxidation under hypoxic and low glucose conditions. The difference with A549/8 cells may be explained by the fact that human lung epithelial cells are known to be less sensitive to oxidative stress than other cells due to the over-expression of HK-II that protects mitochondria (34). Therefore, spectral deconvolution allows the determination of fatty acyl chain absorption changes. Another important aspect of this approach, combined to the determination of glucose and lactic-acid concentrations, is that some of the major biochemical aspects of tumor development (altered metabolism regulation, oxidative stress effects) could be analyzed from single FT-IR spectra.

### **FT-IR imaging of tumor tissues**

The major aim of this study was to provide a chemical mapping of tumors by applying the methods exposed above on xenografts prepared with A549/8 and U87 cells, which exhibit different angiogenic, metabolic, and biochemical pattern during tumor growth. Tumor cells grown on the chicken chorioallantoic membrane (CAM) exhibit many features of tumor development as it happens in patients (25, 35). Tumor growth of A549/8 and U87 cells deposited on chicken egg CAM was analyzed after 3 to 7 days of incubation (Figure 5). Serial visible image of the tissue section was first acquired to determine the tumor morphology, and angiogenesis. Tumors tissue sections (20 microns in thickness) were then analyzed by FT-IR imaging. The FT-IR images of each area were obtained in transmission mode to collect quantitative FT-IR spectra for every pixel of 6.25 squared microns. For each series of CAM-assays with A549/8 or U87 tumors removed after 3, 5 or 7 days of incubation, 3 to 7 tissue sections covering the thickness of the tumor (~ every 200 microns) were analyzed. Glucose and lactic-acid IR absorptions were measured using the deconvolution of the 1200-900  $\text{cm}^{-1}$  spectral area in the intercapillary space. The deconvolution of the 3100-2800  $\text{cm}^{-1}$  spectral interval was also used for determining fatty acyl chain structure changes with the  $\nu_{\text{as}}(\text{CH})/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  and  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  ratios.

### *FT-IR imaging for A549/8 CAM-assays*

For 6 tumors removed from chicken egg 3 days after cell grafting, the mean tumor thickness was ~0.6 mm. It was found that glucose and lactic-acid contents determined on tissue sections did not change significantly, and this was comparable in all areas of the tumor mass analyzed (top, center, and bottom). The glucose absorption range determined from deconvolution of averaged FT-IR spectra was 0.97 – 1.08 a.u. while the lactic-acid absorption range was 1.71 – 2.03 a.u. A mean variation of 11 % was found for glucose absorption within the tumor mass while that of lactic-acid was 19%. This indicates that substrate and oxygen availability from CAM tissue was still sufficient for A549 cells metabolism. Data obtained from the  $\nu=(\text{CH})/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  and  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  ratios were also found comparable at any area of the tumor mass analyzed.

For 6 tumors removed after 5 days of incubation, the mean tumor thickness was ~0.8 mm and only 2 tumors presented a rudimentary vascular network as observed using the visible images of tissue sections before FT-IR imaging analysis. For these 2 tumors, which were also the thicker than 1 mm, glucose absorption between capillaries (distant from 300 microns on average) was found to decrease from  $1.01 \pm 0.21$  to  $0.82 \pm 0.20$  a.u. ( $n = 7$  measurements, mean decrease =  $19 \pm 9$  %), while lactic acid absorption increased from  $1.84 \pm 0.33$  to  $2.42 \pm 0.51$  a.u. (mean increase =  $31 \pm 10$  %;  $P < 0.05$ ). For the remaining 4 tumors without structured vascular network, glucose absorption within the tumor mass ranged from  $0.92 \pm 0.18$  to  $1.05 \pm 0.21$  a.u. (no significant change) while that of lactic-acid ranged from  $1.70 \pm 0.31$  to  $2.18 \pm 0.44$  a.u. (non-linear changes within tissues). It was interesting to see the differences in metabolic adaptation between tumors with or without a significant vascular network. Indeed thicker tumors, with a vascular network, presented a lower glucose and higher lactic-acid content at locations the most distant from blood capillaries than thinner tumors without vascular network. Substrate deficiency at distant locations from blood capillaries is the main biochemical parameter promoting the angiogenic response (6, 36). However, no significant difference was found between tumors for data obtained from the  $\nu=(\text{CH})/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$

and  $v_{as}(CH_2)/v_{as}(CH_3)$  ratios, which were remained comparable to the values found on tumors analyzed after 3 days of incubation.

By contrast, the 6 tumors removed after 7 days of incubation were 1.2-1.5 mm in thickness and presented a structured vascular network for the whole tumor mass with capillaries 100-300 microns distant from each other (Figure 6A). For tissue areas with capillaries distant from <200 microns (n = 21 measurements), glucose absorptions ranged between  $1.09 \pm 0.22$  a.u. close to the capillaries, and to  $0.80 \pm 0.26$  a.u., at ~100 microns from capillaries. Absorption dropped to  $0.61 \pm 0.11$  a.u. for tissue locations distant from capillaries by >200-microns (n = 17). Glucose absorption close to blood capillaries remained comparable to those obtained from the 2 tumors with vascular network analyzed after 5 days of incubation. In parallel, it was found that lactic-acid absorption close to capillaries was  $1.91 \pm 0.61$  a.u.,  $2.44 \pm 1.01$  a.u. at 100 microns, and  $2.91 \pm 0.98$  a.u. at 200 microns. Therefore, there was a significant dependence of cellular metabolic parameters regarding the distance to blood capillaries (Figure 6B-6D). Indeed, a 50% decrease in glucose combined to a 200% increase in lactic-acid contents could be found at the locations the most distant to the blood capillaries in tumors. The metabolic changes within the tumor mass are indicative for tissue ischemia (37). Only slight changes were observed in  $v=(CH)/v_{as}(CH_3)$  and  $v_{as}(CH_2)/v_{as}(CH_3)$  ratios at 200 microns from capillaries. For values obtained in the vicinity of capillaries, the  $v=(CH)/v_{as}(CH_3)$  ratio was found increased by  $9 \pm 4$  % while the  $v_{as}(CH_2)/v_{as}(CH_3)$  ratio decreased correlatively by  $11 \pm 5$  %. These results suggest that tumor ischemia promotes fatty acyl chain peroxidation at this stage of tumor growth.

#### *FT-IR imaging for U87 CAM-assays*

U87 cells grafted on CAM grew rapidly and formed a compact tumor mass (Figure 5). For tumors removed after 3 days of incubation, the mean tumor thickness was ~0.5 mm and no sample presented a structured vascular network. In comparison to A549/8 tumors, there was no significant difference in glucose and lactic-acid absorptions within the tumor mass (n = 40 measurements; glucose absorption range: 0.89 – 1.07 a.u., 19% in variation; lactic-acid absorption range: 1.86 –

2.09 a.u., 12% in variation). Therefore, as for A549/8 cells, no significant variations in glucose and lactic absorptions could be found within the tumor mass. Data obtained from the  $v=(CH)/v_{as}(CH_3)$  and  $v_{as}(CH_2)/v_{as}(CH_3)$  ratios on U87 tumors were also found comparable to that of A549/8 tumors at the same time, and no significant variation could be observed within tumor mass.

The lack of difference between A549/8 and U87 tumors contrasted with the results obtained after 5 and 7 days of incubation. An important vascular network and tumor mass could be observed for U87 tumors after only 5 days of incubation (Figure 7), with a  $\sim 1.1$  mm tumor thickness, in agreement with previous studies (25). Glucose and lactic-acid absorptions at the vicinity of blood capillaries were found similar for the 6 samples analyzed (35 measurements; glucose absorption range: 0.99 – 1.13 a.u., 13% in variation; lactic-acid absorption range: 1.71 – 2.24 a.u., 31% in variation). These values were similar to the values observed for day 3 tumors. However, lactic-acid absorptions presented significantly higher values than for the tumors analyzed after 3 days of incubation ( $P = 0.03$ ). For measurements performed at a distance of  $\sim 200$  microns ( $n = 24$ ) from blood capillaries, glucose absorption decreased to  $0.71 \pm 0.12$  a.u. while that of lactic-acid increased to  $2.96 \pm 0.55$  a.u. Thus, glucose absorption decreased by  $30 \pm 11$  % between blood capillaries while that of lactic acid increased by  $50 \pm 34$  %. This indicates a significant decrease in oxygen and substrate cellular availability, which promotes an increase in glycolysis (Figure 7B). In parallel, changes in fatty acyl moieties absorptions were also observed, with an increase of  $v=(CH)/v_{as}(CH_3)$  ratio by  $15 \pm 6$  % at 200 micron distance and a decrease of  $v_{as}(CH_2)/v_{as}(CH_3)$  ratio by  $11 \pm 9$  %, in comparison to values in vicinity of capillaries.

These metabolic and structural changes were found more pronounced for tumors removed after 7 days of incubation, at a stage where they exhibited an extended vascular network and marked invasion ( $\sim 1.8$  mm in thickness). Glucose absorption close to capillaries remained globally unchanged (41 measurements:  $1.04 \pm 0.27$  a.u.) but that of lactic-acid was found increased by  $5 \pm 4$  % in comparison to 5 days tumors ( $2.14 \pm 0.45$  a.u.). This indicated advanced ischemia within tumors, which was probably due to the increase in tumor mass. This is reinforced by the observation

that glucose absorption at a ~100-microns distance from capillaries decreased to  $0.59 \pm 0.17$  a.u. ( $n = 29$  measurements, decrease in  $44 \pm 13$  %) while, conversely, lactic-acid absorption increased to  $3.01 \pm 1.16$  a.u. (increase in  $41 \pm 27$  %). Lowest glucose absorptions ( $n = 6$  measurements: range 0.24 – 0.33 a.u.) were obtained at ~200 microns from blood capillaries. Highest lactic-acid absorptions ( $n = 6$  measurements; range 3.41 – 3.57 a.u.), were obtained at 140-160 microns from capillaries. Lactic absorptions corresponding to the lowest glucose absorptions at 200 microns ranged between 3.09 and 3.35 a.u. (Figure 7). Fatty acyl chain absorptions at day 7 showed more advanced peroxidation within tumors. At 100- and 200-microns distance from capillaries, the  $\nu_{\text{as}}(\text{CH})/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  ratio increased by  $13 \pm 7$  and  $17 \pm 10$  %, respectively, while the  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  ratio decreased correlatively by  $15 \pm 7$  and  $20 \pm 12$  %. As observed in cell culture, these changes were more pronounced in U87 tumors than in A549/8 tumors. The difference of magnitude in fatty acyl chain peroxidation under ischemic condition between tumor types is possibly due to enhanced protection by the anti-oxidative defense system in A549/8 cells (34).

Taken together, these results indicate that FT-IR imaging is a valuable method for detecting metabolic changes within tumors. Our study has validated this method by using two different tumor cell types known for their distinct invasive and angiogenic potential, and by applying selected specific metabolic constraints or in vivo conditions.

### **FT-IR imaging for a molecular anatomo-pathology**

Various technologies have been developed for cellular and tissue tumor imaging (38), including MRI (39), computed tomography scan (40), ultrasonography (41), bioluminescence (42), fluorescence (43), PET scan (44), multi-dimensional power-doppler imaging (45). In most cases, the use contrast chemicals for discriminating healthy from tumor tissue areas is required. Other limitations are encountered with imaging techniques, such as poor sensitivity (MRI for example) or poor resolution (PET for example).

An imaging technique providing information of the metabolic and structural state of tumor tissue should give accessible interpretative results within a few minutes, i.e., a delay compatible with the continuation of surgical intervention. A major application of such a technique is the extemporaneous diagnosis of small-sized tumors, where the minimum of tissue should be removed. The FT-IR imaging of a tissue section of about 1 mm<sup>2</sup> takes about 5 minutes, with 5 other minutes for a first data treatment and interpretation. Thus, with initial cryosections that takes a few minutes, diagnostic information is available within 15 to 20 minutes, a delay that remains compatible with the surgery continuation (39). FT-IR imaging is therefore a valuable technique that can rapidly generate useful information on specific biochemical pathways as shown in this study for tissue distribution of glucose and lactic-acid within the tumor. Critical information on structural modifications may also be obtained at the same time, as shown for fatty acyl chains (peroxidation level of phospholipids). Thus, FT-IR imaging may be developed into a method for rapid detection of markers for diagnosis and prognosis of malignant disease.

### **Acknowledgements**

The authors are indebted to the Regional Council of Aquitaine, the National Center for Scientific Research (CNRS), the Association de la Recherche sur le Cancer (ARC), and Perkin-Elmer for financial and/or technical supports.



## References

1. Mitchell, P., Ellison, D. W. & Mendelow, A. D. (2005) *Lancet Neurol* **4**, 413-22.
2. Fernandez, D. C., Bhargava, R., Hewitt, S. M. & Levin, I. W. (2005) *Nat Biotechnol* **23**, 469-74.
3. Vaupel, P., Kelleher, D. K. & Thews, O. (1998) *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **42**, 843-8.
4. Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. (2003) *Nature Med* **9**, 677-84.
5. Vaupel, P. & Arnulf, M. (2004) *Transfusion Clinique et Biologique*.
6. Ishii, T., Fujishiro, M., Masuda, M., Okudela, K., Kitamura, H., Teramoto, S. & Matsuse, T. (2004) *Cancer Lett* **213**, 99-109.
7. Herholz, K. & Heiss, W. D. (2004) *Mol Imaging Biol* **6**, 239-69.
8. Zurgil, N., Schiffer, Z., Shafran, Y., Kaufman, M. & Deutsch, M. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 155-63.
9. Stubbs, M., Bashford, C. L. & Griffiths, J. R. (2003) *Curr Mol Med* **3**, 49-59.
10. Zieba, M., Suwalski, M., Kwiatkowska, S., Piasecka, G., Grzelewska-Rzymowska, I., Stolarek, R. & Nowak, D. (2000) *Respir Med* **94**, 800-5.
11. Cohenford, M. A. & Rigas, B. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15327-32.
12. Kneipp, J., Lasch, P., Baldauf, E., Beekes, M. & Naumann, D. (2000) *Biochim Biophys Acta* **1501**, 189-99.
13. Yano, K., Ohoshima, S., Gotou, Y., Kumaido, K., Moriguchi, T. & Katayama, H. (2000) *Anal Biochem* **287**, 218-25.
14. Naumann, D., Helm, D. & Labischinski, H. (1991) *Nature* **351**, 81-2.
15. Fabian, H. & Naumann, D. (2004) *Methods* **34**, 28-40.
16. Malins, D. C., Polissar, N. L. & Gunselman, S. J. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 259-64.
17. Malins, D. C., Polissar, N. L., Schaefer, S., Su, Y. & Vinson, M. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7637-42.
18. Malins, D. C., Anderson, K. M., Gilman, N. K., Green, V. M., Barker, E. A. & Hellstrom, K. E. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10721-5.
19. Petibois, C., Rigalleau, V., Melin, A. M., Perromat, A., Cazorla, G., Gin, H. & Deleris, G. (1999) *Clin Chem* **45**, 1530-5.
20. Petibois, C., Cazorla, G., Cassaigne, A. & Deleris, G. (2001) *Clin Chem* **47**, 730-8.
21. Petibois, C. & Délérís, G. (2005) *Cell Biol Int* **29**, 709-16.
22. Sasajima, T., Miyagawa, T., Oku, T., Gelovani, J. G., Finn, R. & Blasberg, R. (2004) *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **31**, 1244-56.
23. Yano, J. & Sato, K. (1999) *Food Res Int* **32**, 249-59.
24. Chen, H., Mendelsohn, R., Rerek, M. E. & Moore, D. J. (2000) *Biochim Biophys Acta* **1468**, 293-303.
25. Hagedorn, M., Javerzat, S., Gilges, D., Meyre, A., de Lafarge, B., Eichmann, A. & Bikfalvi, A. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1643-8.
26. Petibois, C., Melin, A. M., Perromat, A., Cazorla, G. & Deleris, G. (2000) *J Lab Clin Med* **135**, 210-5.
27. Heise, H. M. & Bittner, A. (1995) *J Mol Struct* **348**, 127-30.
28. Lund, E. L., Hog, A., Olsen, M. W., Hansen, L. T., Engelholm, S. A. & Kristjansen, P. E. (2004) *Int J Cancer* **108**, 833-8.
29. Nanda, D., Vogels, R., Havenga, M., Avezaat, C. J., Bout, A. & Smitt, P. S. (2001) *Cancer Res* **61**, 8743-50.
30. Wang, H., Li, M., Rinehart, J. J. & Zhang, R. (2004) *Clin Cancer Res* **10**, 1633-44.
31. Seppanen-Laakso, T., Laakso, I. & Hiltunen, R. (2002) *Anal Clin Acta* **465**, 39-62.
32. Petibois, C. & Délérís, G. (2005) *Biopolymers* **77**, 345-53.
33. Kolanjiappan, K., Ramachandran, C. R. & Manoharan, S. (2003) *Clin Biochem* **36**, 61-5.

34. Ahmad, A., Ahmad, S., Schneider, B. K., Allen, C. B., Chang, L. Y. & White, C. W. (2002) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**, L573-84.
35. Zilberberg, L., Shinkaruk, S., Lequin, O., Rousseau, B., Hagedorn, M., Costa, F., Caronzolo, D., Balke, M., Cannon, X., Convert, O., Lain, G., Gionnet, K., Goncalves, M., Bayle, M., Bello, L., Chassaing, G., Deleris, G. & Bikfalvi, A. (2003) *J Biol Chem* **278**, 35564-73.
36. Quintero, M., Mackenzie, N. & Brennan, P. A. (2004) *Eur J Surg Oncol* **30**, 465-8.
37. Corbett, R., Laptook, A., Kim, B., Tollefsbol, G., Silmon, S. & Garcia, D. (1999) *Brain Res Dev Brain Res* **113**, 37-46.
38. Luker, G. D. (2002) *Cancer Res* **62**, 2195-8.
39. Miller, J. C. & Thrall, J. H. (2004) *J Am Coll Radiol* **1**, 4-23.
40. Hosten, N., Lemke, A. J., Wiedenmann, B., Bohmig, M. & Rosewicz, S. (2000) *Lancet* **356**, 909-10.
41. Hata, T., Takahashi, H., Watanabe, K., Takahashi, M., Taguchi, K., Itoh, T. & Todo, S. (2004) *J Am Coll Surg* **198**, 190-7.
42. Walenta, S., Schroeder, T. & Mueller-Klieser, W. (2002) *Biomol Engineering* **18**, 249-62.
43. Palasz, Z., Grobelny, A., Pawlik, E., Fraczek, M., Zaleska-Krecicka, M., Klimczak, A. & Krecicki, T. (2003) *Auris Nasus Larynx* **30**, 385-9.
44. Rajendran, J. G., Wilson, D. C., Conrad, E. U., Peterson, L. M., Bruckner, J. D., Rasey, J. S., Chin, L. K., Hofstrand, P. D., Grierson, J. R., Eary, J. F. & Krohn, K. A. (2003) *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **30**, 695-704.
45. Alcazar, J. L. & Castillo, G. (2005) *Am J Obstet Gynecol* **192**, 807-12.

## Figure legends

**Figure 1:** Deconvolution of the 1200-900  $\text{cm}^{-1}$  spectral interval of culture media FT-IR spectra without glucose and lactic-acid (A), with 2.22 mMol/L of glucose only (B), and with 1.01 mMol/L of glucose and 1.23 mMol/L of lactic acid (C). Glucose concentration determined by FT-IR spectrometry according to equation 1 (D). Hashed bars indicate the absence of IR absorption.

**Figure 2:** Post-culture media glucose (A) and lactic-acid (B) concentrations for A549/8 and U87 cells exposed to normoxia or hypoxia.

**Figure 3:** Cell glucose and lactic-acid concentrations for A549/8 and U87 cells exposed to normoxia or hypoxia. A and B: glucose and lactic-acid concentration determined by standard enzymatic assay (control) and FT-IR spectrometry. C and D: cell glucose and lactic-acid concentrations.

**Figure 4:** Fatty acyl moieties IR absorption changes in A549/8 and U87 cells exposed to normoxia or hypoxia. A: Changes in the  $\nu(\text{CH})/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  and  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  ratios for A549/8 cells, and B: idem for U87 cells.  $\nu(\text{CH})/\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$  ratio values are magnified by 10 for presentation.

**Figure 5:** Example of tumor growth for A549/8 and U87 cells on CAM of chicken egg. Levels of angiogenesis, cell proliferation, and tumor formation are only indications.

**Figure 6:** Example of data treatment for a chemical mapping of A549/8 tumor content changes. A: a tissue area presenting blood capillaries distant from 400 microns is selected for FT-IR image acquisition. Tissue areas of 50\*50 microns (7\*7 image pixels) are selected between capillaries for averaging FT-IR spectra (B); Spectra deconvolution for the 1200-900 and 3100-2800  $\text{cm}^{-1}$  spectral intervals allow determination of glucose and lactic-acid absorption change between blood capillaries (C) and fatty acyl moieties structural changes (D).

**Figure 7:** Example of data treatment for a chemical mapping of U87 tumor content changes. 50\*50 microns tissue areas are selected between blood capillaries. Averaged FT-IR spectra corresponding to these tissue areas are treated by deconvolution for determining glucose, lactic-acid, and fatty acyl moieties changes between capillaries. See legend of figure 6 for details.

# Figures

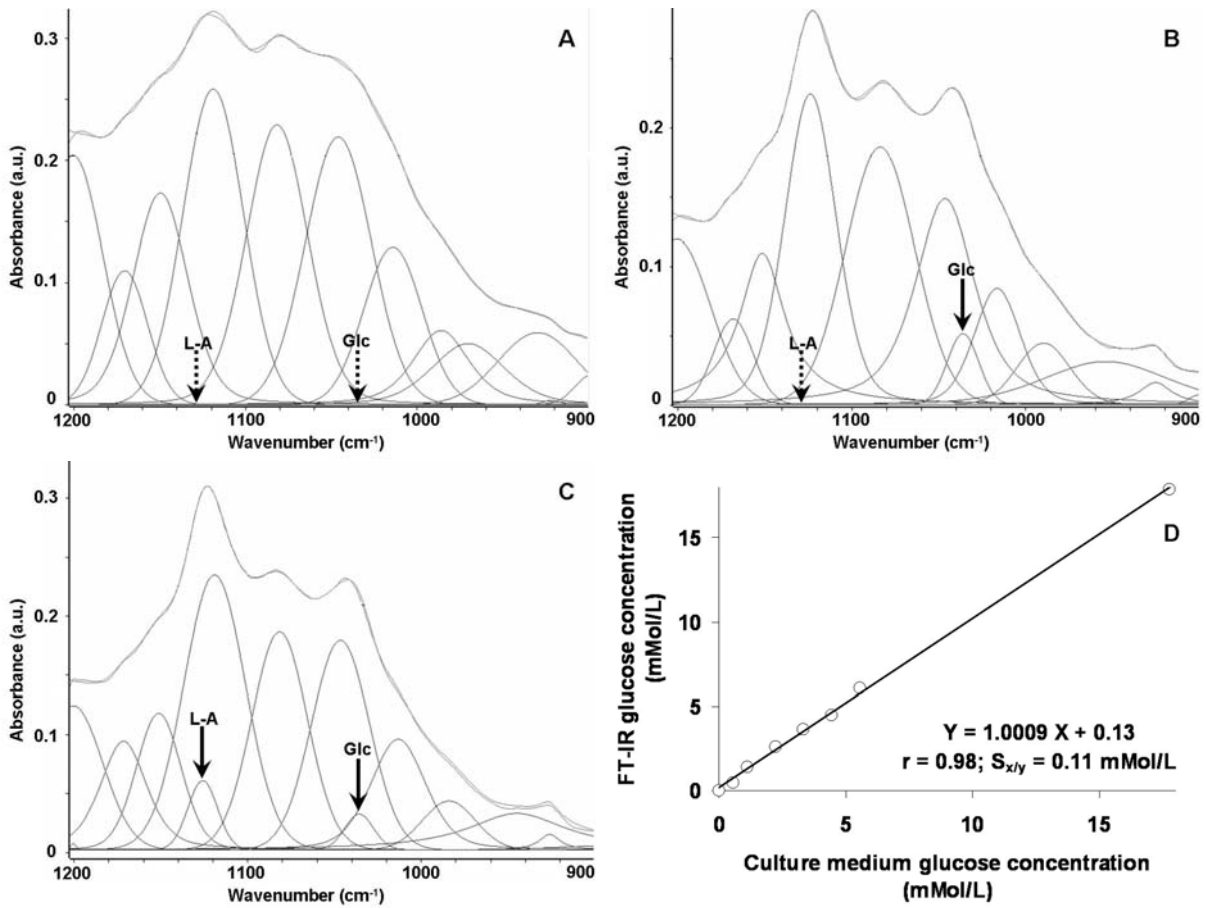


Figure 1

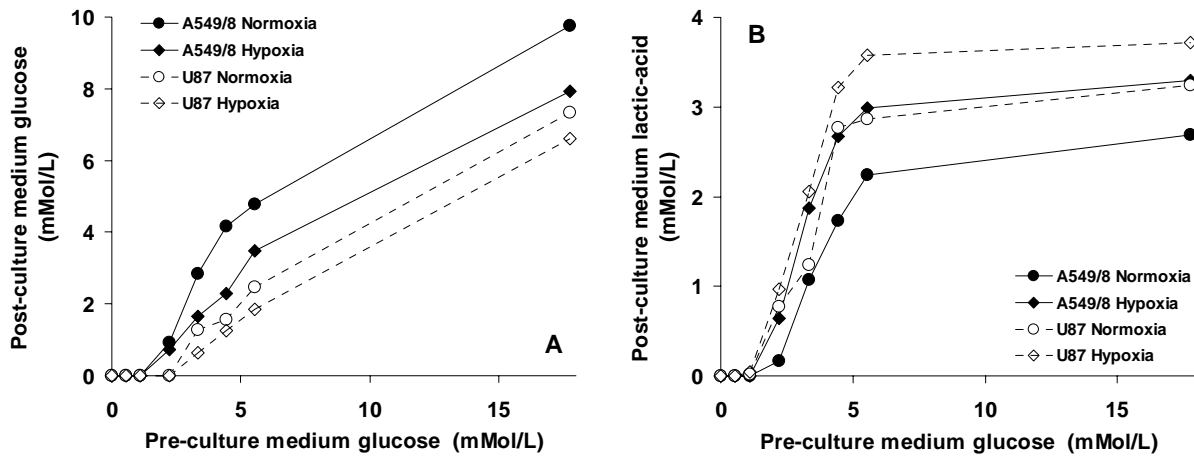


Figure 2

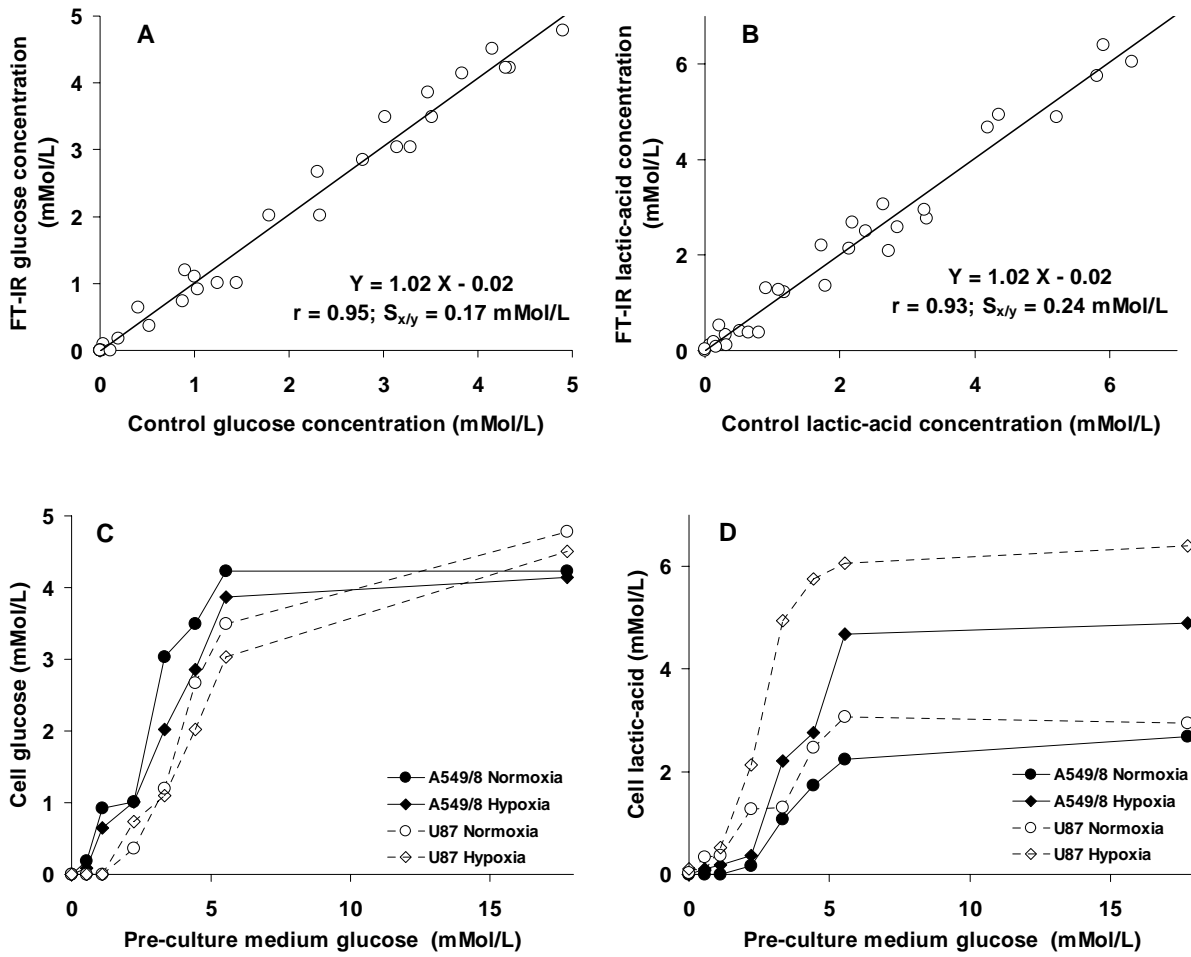


Figure 3

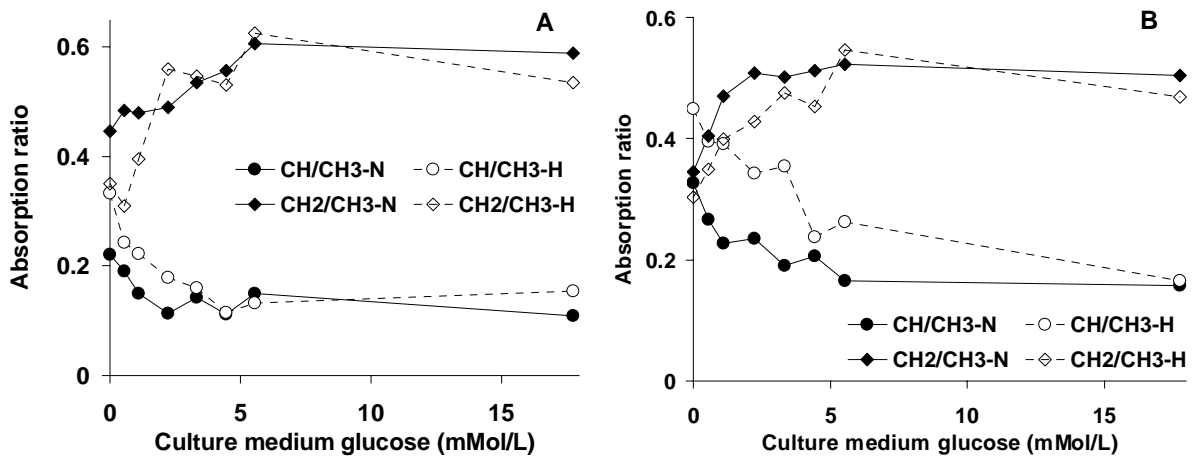


Figure 4

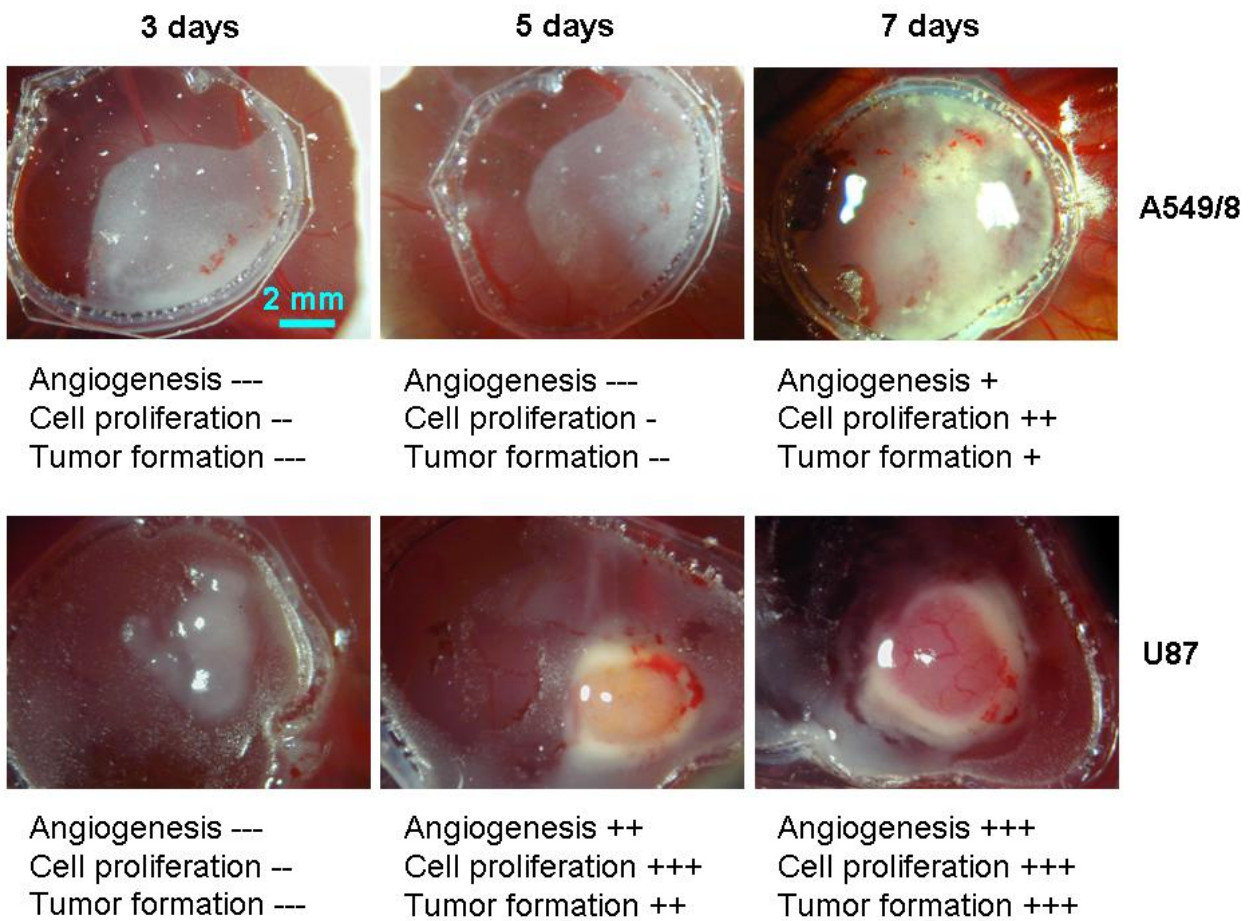


Figure 5



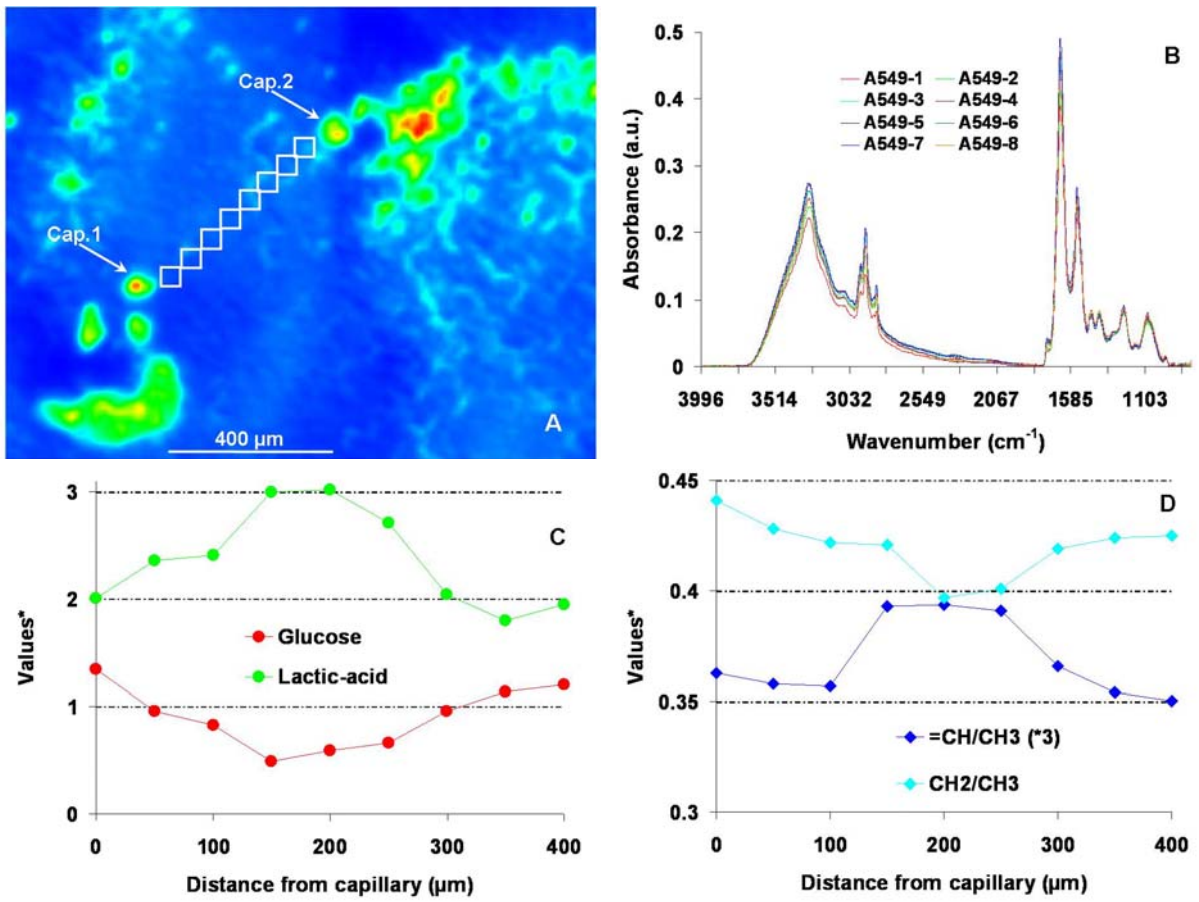


Figure 6

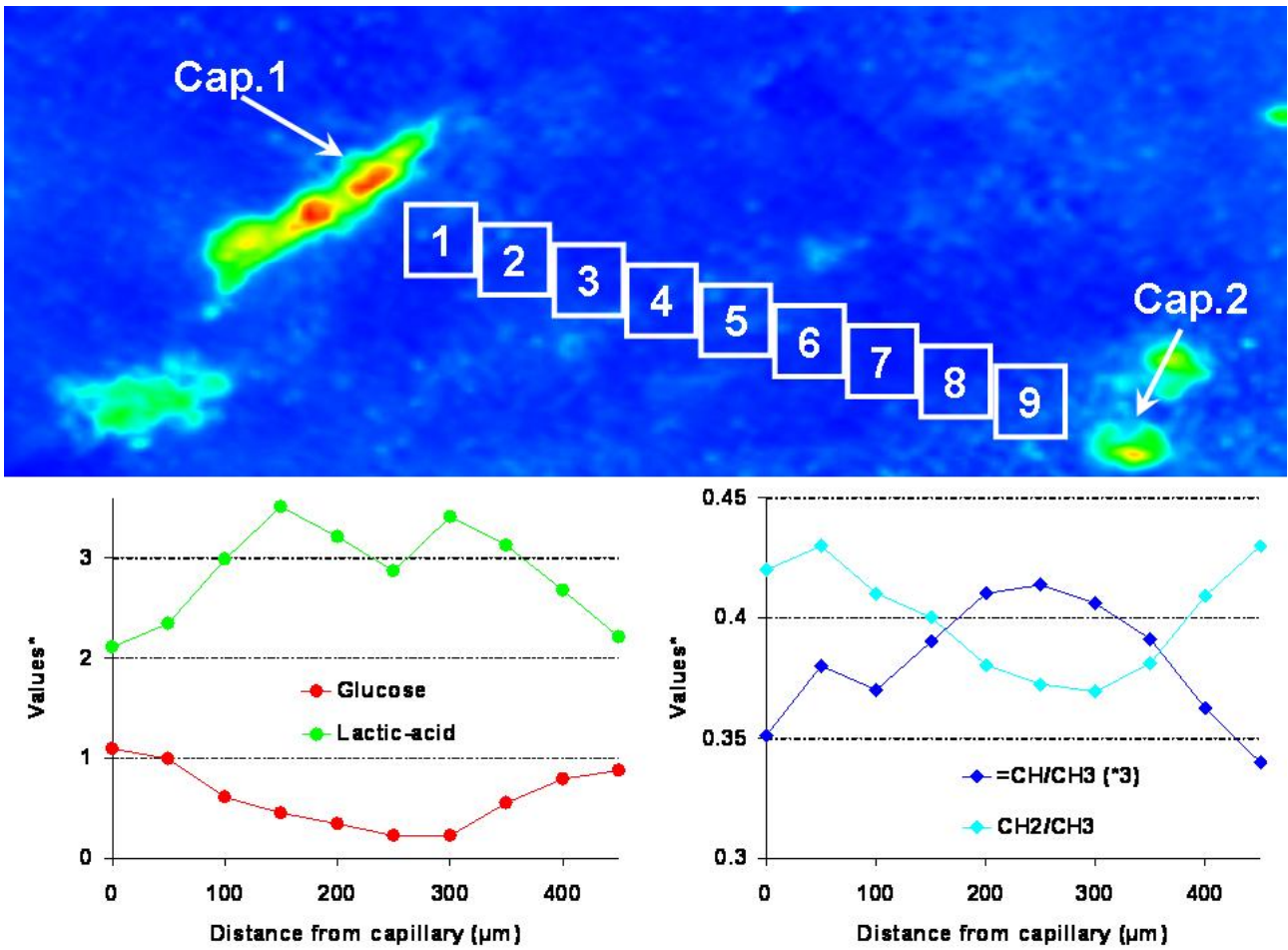


Figure 7

# CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES



## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'ischémie génère au niveau des tumeurs solides divers stress (hypoxie, carences en nutriments, accumulation de déchets métaboliques, etc.) induisant une réponse adaptative permettant la survie cellulaire et un comportement plus agressif. Le paramètre le plus étudié est l'hypoxie, mais les carences en nutriments essentiels (glucose, acides aminés) constituent des stress incontournables modulant également l'activité des cellules transformées et capables de contribuer à la néovasularisation et au développement des tumeurs.

Dans ce travail de thèse, nous présentons des conditions expérimentales *in vitro* permettant l'analyse séparée de stress ischémiques jusqu'alors peu étudiés (carences en glucose et en acides aminés). L'étude de l'implication de ces stress dans l'adaptation métabolique cellulaire et le développement tumoral peut ainsi être abordée, alors qu'elle est difficilement envisageable *in vivo* du fait de leur complexité. De plus, nous avons développé des conditions de culture en absence totale de sérum pour un meilleur contrôle des nutriments utilisés. Le milieu de culture complet sans sérum permet la prolifération, la survie cellulaire, le maintien d'un caryotype normal (Loo *et al.* 1987) et permet aussi de s'affranchir des effets indésirables du sérum. Ce milieu permet également une étude optimisée des adaptations métaboliques survenant en ischémie ainsi qu'une détermination plus précise des sensibilités cellulaires aux différentes carences en nutriments.

Les carences uniques en glucose et de chacun des dix acides aminés essentiels, plus la glutamine ont été appliquées sur des cellules tumorales humaines. Les résultats indiquent que ces nutriments sont tous indispensables à la croissance des cellules A459/8. Ces données valident notre modèle de culture pour l'étude de ces carences. Des mesures métaboliques ont ensuite été réalisées et nous avons confirmé l'existence de compensations énergétiques entre le catabolisme du glucose et celui de la glutamine. Ces carences conduisent également à un arrêt de la prolifération, à l'altération du phénotype cellulaire ainsi qu'à une augmentation progressive de la mortalité. Les carences en glutamine ont des effets plus rapides et plus prononcés que les carences en glucose sur les cellules A549/8.

Nous avons enfin observé qu'en présence ou en absence de sérum le comportement cellulaire est parfois différent, ce qui établit clairement la nécessité de conditions de culture sans sérum pour ce type d'étude. L'utilisation de ce milieu de culture est également envisageable pour l'étude d'autres stress associés à l'ischémie tumorale comme les

limitations en vitamines, en fer et en ions divers ou l'accumulation de déchets du métabolisme cellulaire.

Des études portant sur les relations existant entre ces différents stress (effets cumulatifs, synergiques ou antagonistes) sont également envisageables par cette approche. Enfin, l'analyse *in vitro* plus approfondie des stress ischémiques peut contribuer à la recherche et l'étude d'inhibiteurs métaboliques plus appropriés contre le développement tumoral.

Une approche du rôle de la signalisation UPR a également été réalisée en utilisant la même méthodologie. Une étude comparative des effets respectifs des carences de glucose, d'acides aminés et de l'hypoxie a été développée. Lors d'une hypoxie ou d'une carence en glucose, les lignées de cellules tumorales (A549/8, U87 et C6) induisent la surexpression du VEGF-A au niveau transcriptionnel et traductionnel. L'induction en absence de glucose n'est corrélée ni avec l'accumulation des facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2, ni avec l'activation de la voie dépendante de HIF-1, contrairement à ce que l'on observe en hypoxie. Ces résultats suggèrent que les voies de signalisation menant à l'induction du VEGF-A en absence de glucose sont différentes de celles associées à l'hypoxie. De plus, dans des conditions de carences en glucose, les cellules A549/8 sécrètent le VEGF-A sous une forme anormalement glycosylée et active de 38 kDa. Nous avons donc envisagé la possibilité que les voies de signalisation de la réponse UPR pouvaient être associées à l'expression du VEGF-A, d'autant qu'un rôle primordial des protéines chaperonnes résidentes du RE dans l'expression de ce facteur avait été rapporté (Ozawa *et al.* 2001b; May *et al.* 2005). Nous avons donc mesuré l'expression de gènes cibles de la réponse UPR en réponse à divers stress et montré que l'augmentation des ARNm du VEGF-A est corrélée avec l'induction de la transcription de ces gènes, ainsi qu'avec l'épissage non conventionnel de XBP-1, en absence de glucose uniquement. L'épissage de XBP1 et l'induction d'EDEM sont spécifiques de la voie UPR dépendante de IRE1 (Schroder and Kaufman 2005a). L'utilisation de mutants dominants négatifs IRE1 de plusieurs lignées cellulaires montre que la privation de glucose induit l'expression des ARNm du VEGF-A sous la dépendance d'IRE1. Étonnamment, l'activité de IRE1 est également indispensable à l'induction du VEGF-A en conditions d'hypoxie alors que qu'XBP1 n'est pas épissé dans ces conditions. Ceci suggère un rôle potentiel de la réponse UPR dépendante d'IRE1 sur l'activité de HIF-1. Effectivement, nous montrons que la surexpression de mutants dominants négatifs d'IRE1 inhibe en hypoxie la transcription de ce facteur en corrélation avec l'inhibition de l'expression du VEGF-A. Les voies de signalisation associées à l'activité de IRE1 permettent donc de moduler l'expression

du VEGF-A en réponse à une carence en glucose et à l'hypoxie. De fait, la surexpression de mutants dominants négatifs de IRE1 inhibe également la vascularisation et le développement tumoral *in vivo*.

IRE1 possède deux activités enzymatiques liées à son domaine cytoplasmique et le rôle potentiel de chacune d'entre elle peut être discuté. En effet, deux types mutants dominants négatifs de IRE1 ont été utilisés. Ces mutants inhibent la transduction du signal UPR dépendante d'IRE1 en bloquant simultanément les activités protéine kinase et endoribonucléasique ou uniquement l'activité protéine kinase (mutation K599A). La surexpression de ce dernier (K599A), dans des cellules soumises à une hypoxie ou une carence en glucose suffit à bloquer l'induction du VEGF-A, ce qui suggère que l'activité protéine kinase est essentielle à cet effet. Ces résultats sont en accord avec ceux de Romero-Ramirez *et al* (2004) indiquant que des cellules XBP1<sup>-/-</sup> forment des tumeurs de petites tailles, sans modification de l'expression du VEGF-A par rapport aux cellules sauvages. L'induction du VEGF-A serait donc dépendante de l'activité protéine kinase de IRE1 et non de son activité endoribonucléasique. Des études de substrats de l'activité protéine kinase d'IRE1 devraient permettre de confirmer cette hypothèse.

Du fait de cette activité, la protéine IRE1 constitue une cible thérapeutique potentielle pour l'inhibition de l'angiogenèse induite par le VEGF-A. Plus généralement, il est également important de considérer la réponse UPR dans les stratégies d'inhibition du développement tumoral sachant que l'inhibition des voies de signalisation dépendantes de HIF n'est pas suffisante pour l'arrêt de la croissance tumorale (Carmeliet *et al.* 1998; Tsuzuki *et al.* 2000). Une stratégie envisageable consiste à rechercher dans des banques de composés chimiques des inhibiteurs spécifiques de IRE1 dans une approche comparable à celle menée sur HIF-1 (Rapisarda *et al.* 2002). Le criblage d'une banque de ce type va être entrepris prochainement en collaboration avec l'équipe du Dr E. Chevet (Université McGill, Montréal).

D'autres études impliquent la réponse UPR dans le développement tumoral, et notamment dans la survie et la prolifération cellulaires (Ma and Hendershot 2004). La voie de signalisation PERK/P-eIF2/ATF4 est indispensable à la survie des cellules tumorales en réponse à l'hypoxie (Bi *et al.* 2005). Pour obtenir une meilleure image des voies de transduction et de l'activité de la réponse UPR, une analyse plus complète des trois voies majeures de cette signalisation (PERK, IRE1 et ATF6) est nécessaire. Une approche possible est celle de l'obtention de cellules tumorales dominants négatifs pour chacun ces trois « sensors » proximaux. L'analyse globale protéomique et par microarrays définira leurs implications respectives lors d'une hypoxie ou d'une carence en glucose. Une étude de ce

type a été réalisée chez le ver *Caenorhabditis elegans* (Shen, X. *et al.* 2005) mais les résultats obtenus sur ce modèle ne semblent pas totalement transposables aux cellules de mammifères, en particulier du fait d'une spécialisation moins poussée de chacune des voies. Des études de ce type présentent d'autres avantages en ce qui concerne les applications techniques. Elles peuvent en particulier aboutir à la mise au point de marqueurs histologiques et biochimiques des carences en glucose.

Enfin, en utilisant la même approche expérimentale de culture sans sérum, certains paramètres de la réponse aux carences en glutamine ont également été étudiés. Les cellules A549/8 soumises à cette carence induisent la surexpression du VEGF-A au niveau transcriptionnel uniquement. La mesure de la synthèse protéique par incorporation de leucine- $H^3$  nous a permis d'associer l'absence de la surexpression protéique du VEGF-A à un arrêt de la traduction. L'induction des ARNm du VEGF-A lors de cette carence n'est corrélée ni avec l'induction d'une réponse UPR ni avec la stabilisation des facteurs HIF-1 et HIF-2, ce qui suggère l'existence d'autres voies de signalisation qui restent à définir. L'une d'entre elles pourrait être liée à l'activation de la protéine kinase GCN2 et du facteur de transcription ATF4 (Roybal *et al.* 2004). Une autre possibilité serait associée à la stabilisation des ARNm du VEGF-A (Bobrovnikova-Marjon *et al.* 2004).

La baisse globale de l'expression de ce facteur dans ces conditions de carence remet en question l'implication de ce stress dans l'angiogenèse mais des résultats différents ont été obtenus sur d'autres modèles cellulaires (Abcouwer *et al.* 2002). Ces auteurs observent une augmentation de la sécrétion du VEGF-A lors d'une carence en glutamine. Il est à noter que cette augmentation n'est observable qu'en présence de sérum.

En conclusion, une meilleure connaissance de l'action respective des différents stress composant l'ischémie tumorale et de leurs rôles cumulatifs, synergiques ou antagonistes, reste essentielle pour cibler au mieux les recherches thérapeutiques contre le développement de la néovascularisation tumorale. D'autres applications de l'étude de l'ischémie sont envisageables en particulier dans la compréhension d'autres pathologies incluant l'infarctus, l'attaque cérébrale, et peuvent s'avérer importantes dans le cadre de la transplantation d'organes et le maintien d'organes isolés.



## **BIBLIOGRAPHIE**



## BIBLIOGRAPHIE

- Abcouwer, S. F., P. L. Marjon, R. K. Loper and D. L. Vander Jagt (2002). "Response of VEGF expression to amino acid deprivation and inducers of endoplasmic reticulum stress." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(8): 2791-8.
- Abe, J. and B. C. Berk (2002). "Hypoxia and HIF-1alpha stability: another stress-sensing mechanism for Shc." *Circ Res* 91(1): 4-6.
- Acker, T., A. Diez-Juan, J. Aragonés, M. Tjwa, K. Brusselmans, L. Moons, D. Fukumura, M. P. Moreno-Murciano, J. M. Herbert, A. Burger, J. Riedel, G. Elvert, I. Flamme, P. H. Maxwell, D. Collen, M. Dewerchin, R. K. Jain, K. H. Plate and P. Carmeliet (2005). "Genetic evidence for a tumor suppressor role of HIF-2alpha." *Cancer Cell* 8(2): 131-41.
- Adler, V., Z. Yin, K. D. Tew and Z. Ronai (1999). "Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling." *Oncogene* 18(45): 6104-11.
- Aguirre-Ghiso, J. A., Y. Estrada, D. Liu and L. Ossowski (2003). "ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK)." *Cancer Res* 63(7): 1684-95.
- Aguirre-Ghiso, J. A., D. Liu, A. Mignatti, K. Kovalski and L. Ossowski (2001). "Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo." *Mol Biol Cell* 12(4): 863-79.
- Aiello, L. P., R. L. Avery, P. G. Arrigg, B. A. Keyt, H. D. Jampel, S. T. Shah, L. R. Pasquale, H. Thieme, M. A. Iwamoto, J. E. Park and et al. (1994). "Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders." *N Engl J Med* 331(22): 1480-7.
- Akiri, G., D. Nahari, Y. Finkelstein, S. Y. Le, O. Elroy-Stein and B. Z. Levi (1998). "Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription." *Oncogene* 17(2): 227-36.
- algire, g., chalkley h w, legallais f y and park h d. (1945). "Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. Vascular reactions of mice to wounds and to neoplastic transplants." *J Natl Cancer Inst* 6: 73-85.
- Allen, R. G. and M. Tresini (2000). "Oxidative stress and gene regulation." *Free Radic Biol Med* 28(3): 463-99.
- Anthony, F. W., T. Wheeler, C. L. Elcock, M. Pickett and E. J. Thomas (1994). "Short report: identification of a specific pattern of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human placenta and cultured placental fibroblasts." *Placenta* 15(5): 557-61.
- Aoyama, K., D. M. Burns, S. W. Suh, P. Garnier, Y. Matsumori, H. Shiina and R. A. Swanson (2005). "Acidosis causes endoplasmic reticulum stress and caspase-12-mediated astrocyte death." *J Cereb Blood Flow Metab* 25(3): 358-70.
- Arbiser, J. L., J. Petros, R. Klafater, B. Govindajaran, E. R. McLaughlin, L. F. Brown, C. Cohen, M. Moses, S. Kilroy, R. S. Arnold and J. D. Lambeth (2002). "Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the

- angiogenic switch." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2): 715-20.
- Argon, Y., J. K. Burkhardt, J. M. Leeds and C. Milstein (1989). "Two steps in the intracellular transport of IgD are sensitive to energy depletion." *J. Immunol.* 142: 554-561.
- Atsumi, T., J. Chesney, C. Metz, L. Leng, S. Donnelly, Z. Makita, R. Mitchell and R. Bucala (2002). "High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers." *Cancer Res* 62(20): 5881-7.
- Auguste, P., S. Lemiere, F. Larrieu-Lahargue and A. Bikfalvi (2005). "Molecular mechanisms of tumor vascularization." *Crit Rev Oncol Hematol* 54(1): 53-61.
- Averous, J., A. Bruhat, S. Mordier and P. Fafournoux (2003). "Recent advances in the understanding of amino acid regulation of gene expression." *J Nutr* 133(6 Suppl 1): 2040S-2045S.
- Barbosa-Tessmann, I. P., C. Chen, C. Zhong, S. M. Schuster, H. S. Nick and M. S. Kilberg (1999a). "Activation of the unfolded protein response pathway induces human asparagine synthetase gene expression." *J Biol Chem* 274(44): 31139-44.
- Barbosa-Tessmann, I. P., V. L. Pineda, H. S. Nick, S. M. Schuster and M. S. Kilberg (1999b). "Transcriptional regulation of the human asparagine synthetase gene by carbohydrate availability." *Biochem J* 339 ( Pt 1): 151-8.
- Barnes, D. and G. Sato (1980). "Serum-free cell culture: a unifying approach." *Cell* 22(3): 649-55.
- Bauer, D. E., M. H. Harris, D. R. Plas, J. J. Lum, P. S. Hammerman, J. C. Rathmell, J. L. Riley and C. B. Thompson (2004). "Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand." *Faseb J* 18(11): 1303-5.
- Bayless, K. J., R. Salazar and G. E. Davis (2000). "RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins." *Am J Pathol* 156(5): 1673-83.
- Benjamin, L. E., D. Golijanin, A. Itin, D. Podes and E. Keshet (1999). "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal." *J Clin Invest* 103(2): 159-65.
- Benjamin, L. E., I. Hemo and E. Keshet (1998). "A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF." *Development* 125(9): 1591-8.
- Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." *Nat Rev Cancer* 3(6): 401-10.
- Berra, E., E. Benizri, A. Ginouves, V. Volmat, D. Roux and J. Pouyssegur (2003). "HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia." *Embo J* 22(16): 4082-90.
- Bertolotti, A., Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding and D. Ron (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." *Nat Cell Biol* 2(6): 326-32.
- Bi, M., C. Naczki, M. Koritzinsky, D. Fels, J. Blais, N. Hu, H. Harding, I. Novoa, M. Varia, J. Raleigh, D. Scheuner, R. J. Kaufman, J. Bell, D. Ron, B. G. Wouters and C. Koumenis (2005). "ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth." *Embo J* 24(19): 3470-81.

- Bikfalvi, A. (2003). "[Tumor angiogenesis]." *Bull Cancer* 90(5): 449-58.
- Bittner, M., P. Meltzer, Y. Chen, Y. Jiang, E. Seftor, M. Hendrix, M. Radmacher, R. Simon, Z. Yakhini, A. Ben-Dor, N. Sampas, E. Dougherty, E. Wang, F. Marincola, C. Gooden, J. Lueders, A. Glatfelter, P. Pollock, J. Carpten, E. Gillanders, D. Leja, K. Dietrich, C. Beaudry, M. Berens, D. Alberts and V. Sondak (2000). "Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling." *Nature* 406(6795): 536-40.
- Blais, J. D., V. Filipenko, M. Bi, H. P. Harding, D. Ron, C. Koumenis, B. G. Wouters and J. C. Bell (2004). "Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress." *Mol Cell Biol* 24(17): 7469-82.
- Blancher, C., J. W. Moore, N. Robertson and A. L. Harris (2001). "Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, HIF-2alpha, and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway." *Cancer Res* 61(19): 7349-55.
- Bobrovnikova-Marjon, E. V., P. L. Marjon, O. Barbash, D. L. Vander Jagt and S. F. Abcouwer (2004). "Expression of angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 is highly responsive to ambient glutamine availability: role of nuclear factor-kappaB and activating protein-1." *Cancer Res* 64(14): 4858-69.
- Bode, B. P., D. L. Kaminski, W. W. Souba and A. P. Li (1995). "Glutamine transport in isolated human hepatocytes and transformed liver cells." *Hepatology* 21(2): 511-20.
- Bos, R., J. J. van Der Hoeven, E. van Der Wall, P. van Der Groep, P. J. van Diest, E. F. Comans, U. Joshi, G. L. Semenza, O. S. Hoekstra, A. A. Lammertsma and C. F. Molthoff (2002). "Biologic correlates of (18)fluorodeoxyglucose uptake in human breast cancer measured by positron emission tomography." *J Clin Oncol* 20(2): 379-87.
- Bosca, L., M. Mojena, J. Ghysdael, G. G. Rousseau and L. Hue (1986). "Expression of the v-src or v-fps oncogene increases fructose 2,6-bisphosphate in chick-embryo fibroblasts. Novel mechanism for the stimulation of glycolysis by retroviruses." *Biochem J* 236(2): 595-9.
- Boya, P., I. Cohen, N. Zamzami, H. L. Vieira and G. Kroemer (2002). "Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization." *Cell Death Differ* 9(4): 465-7.
- Bracken, C. P., M. L. Whitelaw and D. J. Peet (2005). "Activity of hypoxia-inducible factor 2alpha is regulated by association with the NF-kappaB essential modulator." *J Biol Chem* 280(14): 14240-51.
- Brar, S. S., T. P. Kennedy, M. Quinn and J. R. Hoidal (2003). "Redox signaling of NF-kappaB by membrane NAD(P)H oxidases in normal and malignant cells." *Protoplasma* 221(1-2): 117-27.
- Breckenridge, D. G., M. Germain, J. P. Mathai, M. Nguyen and G. C. Shore (2003). "Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways." *Oncogene* 22(53): 8608-18.
- Brodsky, J. L., E. D. Werner, M. E. Dubas, J. L. Goeckeler, K. B. Kruse and A. A. McCracken (1999). "The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct." *J Biol Chem* 274(6): 3453-60.
- Brooks, P. C., S. Stromblad, L. C. Sanders, T. L. von Schalscha, R. T. Aimes,

- W. G. Stetler-Stevenson, J. P. Quigley and D. A. Cheresh (1996). "Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3." *Cell* 85(5): 683-93.
- Broxmeyer, H. E., S. Cooper, Z. H. Li, L. Lu, H. Y. Song, B. S. Kwon, R. E. Warren and D. B. Donner (1995). "Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor." *Int J Hematol* 62(4): 203-15.
- Bruhat, A., C. Jousse, X. Z. Wang, D. Ron, M. Ferrara and P. Fafournoux (1997). "Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels." *J Biol Chem* 272(28): 17588-93.
- Brunelle, J. K., E. L. Bell, N. M. Quesada, K. Vercauteren, V. Tiranti, M. Zeviani, R. C. Scarpulla and N. S. Chandel (2005). "Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation." *Cell Metab* 1(6): 409-14.
- Brusselmans, K., F. Bono, P. Maxwell, Y. Dor, M. Dewerchin, D. Collen, J. M. Herbert and P. Carmeliet (2001). "Hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia." *J Biol Chem* 276(42): 39192-6.
- Burdon, R. H., V. Gill and C. Rice-Evans (1990). "Oxidative stress and tumour cell proliferation." *Free Radic Res Commun* 11(1-3): 65-76.
- Burri, P. H. and V. Djonov (2002). "Intussusceptive angiogenesis--the alternative to capillary sprouting." *Mol Aspects Med* 23(6S): S1-27.
- Burri, P. H. and M. R. Tarek (1990). "A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation." *Anat Rec* 228(1): 35-45.
- Calton, M., H. Zeng, F. Urano, J. H. Till, S. R. Hubbard, H. P. Harding, S. G. Clark and D. Ron (2002). "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA." *Nature* 415(6867): 92-6.
- Campbell, W. A., D. E. Sah, M. M. Medina, J. E. Albina, W. B. Coleman and N. L. Thompson (2000). "TA1/LAT-1/CD98 light chain and system L activity, but not 4F2/CD98 heavy chain, respond to arginine availability in rat hepatic cells. Loss Of response in tumor cells." *J Biol Chem* 275(8): 5347-54.
- Cao, Y., W. R. Ji, P. Qi and A. Rosin (1997). "Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing." *Biochem Biophys Res Commun* 235(3): 493-8.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." *Nat Med* 6(4): 389-95.
- Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." *Nat Med* 9(6): 653-60.
- Carmeliet, P., Y. Dor, J. M. Herbert, D. Fukumura, K. Brusselmans, M. Dewerchin, M. Neeman, F. Bono, R. Abramovitch, P. Maxwell, C. J. Koch, P. Ratcliffe, L. Moons, R. K. Jain, D. Collen and E. Keshert (1998). "Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis." *Nature* 394(6692): 485-90.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau and A. Nagy (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." *Nature* 380(6573): 435-9.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." *Nature* 407(6801): 249-57.

- Casciari, J. J., S. V. Sotirchos and R. M. Sutherland (1992). "Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular pH." *J Cell Physiol* 151(2): 386-94.
- Chang, C. and Z. Werb (2001). "The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis." *Trends Cell Biol* 11(11): S37-43.
- Chang, C. P., J. R. Neilson, J. H. Bayle, J. E. Gestwicki, A. Kuo, K. Stankunas, I. A. Graef and G. R. Crabtree (2004). "A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis." *Cell* 118(5): 649-63.
- Chen, B. P., C. D. Wolfgang and T. Hai (1996). "Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10." *Mol Cell Biol* 16(3): 1157-68.
- Chen, X., Y. Ding, C. G. Liu, S. Mikhail and C. S. Yang (2002a). "Overexpression of glucose-regulated protein 94 (Grp94) in esophageal adenocarcinomas of a rat surgical model and humans." *Carcinogenesis* 23(1): 123-30.
- Chen, X., J. Shen and R. Prywes (2002b). "The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi." *J Biol Chem* 277(15): 13045-52.
- Claesson-Welsh, L. (2003). "Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 1): 20-4.
- Claffey, K. P., D. R. Senger and B. M. Spiegelman (1995). "Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF." *Biochim Biophys Acta* 1246(1): 1-9.
- Clauss, I. M., M. Chu, J. L. Zhao and L. H. Glimcher (1996). "The basic domain/leucine zipper protein hXBP-1 preferentially binds to and transactivates CRE-like sequences containing an ACGT core." *Nucleic Acids Res* 24(10): 1855-64.
- Clauss, M., M. Gerlach, H. Gerlach, J. Brett, F. Wang, P. C. Familletti, Y. C. Pan, J. V. Olander, D. T. Connolly and D. Stern (1990). "Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration." *J Exp Med* 172(6): 1535-45.
- Conway, E. M., D. Collen and P. Carmeliet (2001). "Molecular mechanisms of blood vessel growth." *Cardiovasc Res* 49(3): 507-21.
- Coussens, L. M., C. L. Tinkle, D. Hanahan and Z. Werb (2000). "MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis." *Cell* 103(3): 481-90.
- Covello, K. L., M. C. Simon and B. Keith (2005). "Targeted replacement of hypoxia-inducible factor-1alpha by a hypoxia-inducible factor-2alpha knock-in allele promotes tumor growth." *Cancer Res* 65(6): 2277-86.
- Cox, J. S., R. E. Chapman and P. Walter (1997). "The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane." *Mol Biol Cell* 8(9): 1805-14.
- Cox, J. S., C. E. Shamu and P. Walter (1993). "Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase." *Cell* 73(6): 1197-206.
- Cross, M. J., J. Dixelius, T. Matsumoto and L. Claesson-Welsh (2003). "VEGF-receptor signal transduction." *Trends Biochem Sci* 28(9): 488-94.

- Cullinan, S. B. and J. A. Diehl (2004). "PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress." *J Biol Chem* 279(19): 20108-17.
- Cuozzo, J. W. and C. A. Kaiser (1999). "Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation." *Nat Cell Biol* 1(3): 130-5.
- Dameron, K. M., O. V. Volpert, M. A. Tainsky and N. Bouck (1994). "Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1." *Science* 265(5178): 1582-4.
- Dang, C. V., B. C. Lewis, C. Dolde, G. Dang and H. Shim (1997). "Oncogenes in tumor metabolism, tumorigenesis, and apoptosis." *J Bioenerg Biomembr* 29(4): 345-54.
- Dang, C. V. and G. L. Semenza (1999). "Oncogenic alterations of metabolism." *Trends Biochem Sci* 24(2): 68-72.
- D'Arcangelo, D., F. Facchiano, L. M. Barlucchi, G. Melillo, B. Illi, L. Testolin, C. Gaetano and M. C. Capogrossi (2000). "Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression." *Circ Res* 86(3): 312-8.
- Darland, D. C. and P. A. D'Amore (2001). "Cell-cell interactions in vascular development." *Curr Top Dev Biol* 52: 107-49.
- Davis, S., T. H. Aldrich, P. F. Jones, A. Acheson, D. L. Compton, V. Jain, T. E. Ryan, J. Bruno, C. Radziejewski, P. C. Maisonpierre and G. D. Yancopoulos (1996). "Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning." *Cell* 87(7): 1161-9.
- Dery, M. A., M. D. Michaud and D. E. Richard (2005). "Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators." *Int J Biochem Cell Biol* 37(3): 535-40.
- Detmar, M., K. T. Yeo, J. A. Nagy, L. Van de Water, L. F. Brown, B. Berse, B. M. Elicker, S. Ledbetter and H. F. Dvorak (1995). "Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells." *J Invest Dermatol* 105(1): 44-50.
- Dibbens, J. A., D. L. Miller, A. Damert, W. Risau, M. A. Vadas and G. J. Goodall (1999). "Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation of multiple RNA elements." *Mol Biol Cell* 10(4): 907-19.
- Dimcheff, D. E., S. Askovic, A. H. Baker, C. Johnson-Fowler and J. L. Portis (2003). "Endoplasmic reticulum stress is a determinant of retrovirus-induced spongiform neurodegeneration." *J Virol* 77(23): 12617-29.
- Djonov, V., O. Baum and P. H. Burri (2003). "Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis." *Cell Tissue Res* 314(1): 107-17.
- Dor, Y., R. Porat and E. Keshet (2001). "Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis." *Am J Physiol Cell Physiol* 280(6): C1367-74.
- Dorner, A. J., L. C. Wasley and R. J. Kaufman (1990). "Protein dissociation from GRP78 and secretion are blocked by depletion of cellular ATP levels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(19): 7429-32.
- Drake, C. J., D. A. Cheresch and C. D. Little (1995). "An antagonist of integrin alpha v beta 3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization." *J Cell Sci* 108 ( Pt 7): 2655-61.
- Duesberg, P., D. Rasnick, R. Li, L. Winters, C. Rausch and R. Hehlmann (1999). "How aneuploidy may cause cancer and



- genetic instability." *Anticancer Res* 19(6A): 4887-906.
- Dvorak, H. F., L. F. Brown, M. Detmar and A. M. Dvorak (1995). "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis." *Am J Pathol* 146(5): 1029-39.
- Eagle, H. (1959). "Amino acid metabolism in mammalian cell cultures." *Science* 130(3373): 432-7.
- Elvert, G., A. Kappel, R. Heidenreich, U. Englmeier, S. Lanz, T. Acker, M. Rauter, K. Plate, M. Sieweke, G. Breier and I. Flamme (2003). "Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1)." *J Biol Chem* 278(9): 7520-30.
- Ema, M., K. Hirota, J. Mimura, H. Abe, J. Yodoi, K. Sogawa, L. Poellinger and Y. Fujii-Kuriyama (1999). "Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300." *Embo J* 18(7): 1905-14.
- Eskey, C. J., A. P. Koretsky, M. M. Domach and R. K. Jain (1993). "Role of oxygen vs. glucose in energy metabolism in a mammary carcinoma perfused ex vivo: direct measurement by <sup>31</sup>P NMR." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(7): 2646-50.
- Esumi, H., K. Izuishi, K. Kato, K. Hashimoto, Y. Kurashima, A. Kishimoto, T. Ogura and T. Ozawa (2002). "Hypoxia and nitric oxide treatment confer tolerance to glucose starvation in a 5'-AMP-activated protein kinase-dependent manner." *J Biol Chem* 277(36): 32791-8.
- Ettinger, S. N., C. C. Poellmann, N. A. Wisniewski, A. A. Gaskin, J. S. Shoemaker, J. M. Poulson, M. W. Dewhirst and B. Klitzman (2001). "Urea as a recovery marker for quantitative assessment of tumor interstitial solutes with microdialysis." *Cancer Res* 61(21): 7964-70.
- Fafournoux, P., A. Bruhat and C. Jousse (2000). "Amino acid regulation of gene expression." *Biochem J* 351(Pt 1): 1-12.
- Fagioli, C., A. Mezghrani and R. Sitia (2001). "Reduction of interchain disulfide bonds precedes the dislocation of Ig-mu chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol for proteasomal degradation." *J Biol Chem* 276(44): 40962-7.
- Fawcett, T. W., J. L. Martindale, K. Z. Guyton, T. Hai and N. J. Holbrook (1999). "Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response." *Biochem J* 339 ( Pt 1): 135-41.
- Feldser, D., F. Agani, N. V. Iyer, B. Pak, G. Ferreira and G. L. Semenza (1999). "Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2." *Cancer Res* 59(16): 3915-8.
- Felmeden, D. C., A. D. Blann and G. Y. Lip (2003). "Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease." *Eur Heart J* 24(7): 586-603.
- Fernandez, A., T. Udagawa, C. Schwesinger, W. Beecken, E. Achilles-Gerte, T. McDonnell and R. D'Amato (2001). "Angiogenic potential of prostate carcinoma cells overexpressing bcl-2." *J Natl Cancer Inst* 93(3): 208-13.
- Fernandez, J., B. Bode, A. Koromilas, J. A. Diehl, I. Krukovets, M. D. Snider and M. Hatzoglou (2002). "Translation mediated by the

- internal ribosome entry site of the cat-1 mRNA is regulated by glucose availability in a PERK kinase-dependent manner." *J Biol Chem* 277(14): 11780-7.
- Fernandez, P. M., S. O. Tabbara, L. K. Jacobs, F. C. Manning, T. N. Tsangaris, A. M. Schwartz, K. A. Kennedy and S. R. Patierno (2000). "Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions." *Breast Cancer Res Treat* 59(1): 15-26.
- Ferrara, N. (2004). "Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress." *Endocr Rev* 25(4): 581-611.
- Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K. S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K. J. Hillan and M. W. Moore (1996). "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene." *Nature* 380(6573): 439-42.
- Ferrara, N., H. Chen, T. Davis-Smyth, H. P. Gerber, T. N. Nguyen, D. Peers, V. Chisholm, K. J. Hillan and R. H. Schwall (1998). "Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis." *Nat Med* 4(3): 336-40.
- Ferrara, N. and T. Davis-Smyth (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor." *Endocr Rev* 18(1): 4-25.
- Ferrara, N., G. Frantz, J. LeCouter, L. Dillard-Telm, T. Pham, A. Draksharapu, T. Giordano and F. Peale (2003a). "Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries." *Am J Pathol* 162(6): 1881-93.
- Ferrara, N., H. P. Gerber and J. LeCouter (2003b). "The biology of VEGF and its receptors." *Nat Med* 9(6): 669-76.
- Ferrara, N. and W. J. Henzel (1989). "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 161(2): 851-8.
- Ferrara, N., J. Winer, T. Burton, A. Rowland, M. Siegel, H. S. Phillips, T. Terrell, G. A. Keller and A. D. Levinson (1993). "Expression of vascular endothelial growth factor does not promote transformation but confers a growth advantage in vivo to Chinese hamster ovary cells." *J Clin Invest* 91(1): 160-70.
- Fewell, S. W., K. J. Travers, J. S. Weissman and J. L. Brodsky (2001). "The action of molecular chaperones in the early secretory pathway." *Annu Rev Genet* 35: 149-91.
- Filippin, L., P. J. Magalhaes, G. Di Benedetto, M. Colella and T. Pozzan (2003). "Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria." *J Biol Chem* 278(40): 39224-34.
- Fingar, D. C. and J. Blenis (2004). "Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression." *Oncogene* 23(18): 3151-71.
- Folberg, R., M. J. Hendrix and A. J. Maniotis (2000). "Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis." *Am J Pathol* 156(2): 361-81.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." *N Engl J Med* 285(21): 1182-6.
- Folkman, J. (1974). "Proceedings: Tumor angiogenesis factor." *Cancer Res* 34(8): 2109-13.
- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." *Nat Med* 1(1): 27-31.
- Folkman, J. (2002). "Looking for a good endothelial address." *Cancer Cell* 1(2): 113-5.

- Folkman, J. and M. Klagsbrun (1987). "Angiogenic factors." *Science* 235(4787): 442-7.
- Fontana, A., S. Filleur, J. Guglielmi, L. Frappart, G. Bruno-Bossio, S. Boissier, F. Cabon and P. Clezardin (2005). "Human breast tumors override the antiangiogenic effect of stromal thrombospondin-1 in vivo." *Int J Cancer* 116(5): 686-91.
- Forsythe, J. A., B. H. Jiang, N. V. Iyer, F. Agani, S. W. Leung, R. D. Koos and G. L. Semenza (1996). "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1." *Mol Cell Biol* 16(9): 4604-13.
- Frand, A. R. and C. A. Kaiser (1998). "The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum." *Mol Cell* 1(2): 161-70.
- Frank, S., G. Hubner, G. Breier, M. T. Longaker, D. G. Greenhalgh and S. Werner (1995). "Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing." *J Biol Chem* 270(21): 12607-13.
- Freeman, M. R., F. X. Schneck, M. L. Gagnon, C. Corless, S. Soker, K. Niknejad, G. E. Peoples and M. Klagsbrun (1995). "Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis." *Cancer Res* 55(18): 4140-5.
- Fuchs, B. C. and B. P. Bode (2005). "Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime?" *Semin Cancer Biol* 15(4): 254-66.
- Fukumura, D., R. Xavier, T. Sugiura, Y. Chen, E. C. Park, N. Lu, M. Selig, G. Nielsen, T. Taksir, R. K. Jain and B. Seed (1998). "Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells." *Cell* 94(6): 715-25.
- Fukumura, D., L. Xu, Y. Chen, T. Gohongi, B. Seed and R. K. Jain (2001). "Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo." *Cancer Res* 61(16): 6020-4.
- Gatenby, R. A. and E. T. Gawlinski (2003). "The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models." *Cancer Res* 63(14): 3847-54.
- Gatenby, R. A. and R. J. Gillies (2004). "Why do cancers have high aerobic glycolysis?" *Nat Rev Cancer* 4(11): 891-9.
- Gazit, G., J. Lu and A. S. Lee (1999). "Deregulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines." *Breast Cancer Res Treat* 54(2): 135-46.
- Gerber, H. P., F. Condorelli, J. Park and N. Ferrara (1997). "Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia." *J Biol Chem* 272(38): 23659-67.
- Gerber, H. P., V. Dixit and N. Ferrara (1998a). "Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells." *J Biol Chem* 273(21): 13313-6.
- Gerber, H. P., K. J. Hillan, A. M. Ryan, J. Kowalski, G. A. Keller, L. Rangell, B. D. Wright, F. Radtke, M. Aguet and N. Ferrara (1999). "VEGF is required for growth and survival in neonatal mice." *Development* 126(6): 1149-59.
- Gerber, H. P., A. McMurtry, J. Kowalski, M. Yan, B. A. Keyt, V. Dixit and N. Ferrara (1998b). "Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-

- 1/KDR activation." *J Biol Chem* 273(46): 30336-43.
- Gerhardt, H. and C. Betsholtz (2003). "Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis." *Cell Tissue Res* 314(1): 15-23.
- Gess, B., K. H. Hofbauer, R. H. Wenger, C. Lohaus, H. E. Meyer and A. Kurtz (2003). "The cellular oxygen tension regulates expression of the endoplasmic oxidoreductase ERO1-L $\alpha$ ." *Eur J Biochem* 270(10): 2228-35.
- Gething, M. J., S. Blond-Elguindi, J. Buchner, A. Fourie, G. Knarr, S. Modrow, L. Nanu, M. Segal and J. Sambrook (1995). "Binding sites for Hsp70 molecular chaperones in natural proteins." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60: 417-28.
- Goede, V., T. Schmidt, S. Kimmina, D. Kozian and H. G. Augustin (1998). "Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis." *Lab Invest* 78(11): 1385-94.
- Gorlach, A., I. Diebold, V. B. Schini-Kerth, U. Berchner-Pfannschmidt, U. Roth, R. P. Brandes, T. Kietzmann and R. Busse (2001). "Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase." *Circ Res* 89(1): 47-54.
- Gotoh, T., S. Oyadomari, K. Mori and M. Mori (2002). "Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP." *J Biol Chem* 277(14): 12343-50.
- Gottlieb, R. A., H. A. Giesing, J. Y. Zhu, R. L. Engler and B. M. Babior (1995). "Cell acidification in apoptosis: granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H(+)-ATPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(13): 5965-8.
- Graeber, T. G., C. Osmanian, T. Jacks, D. E. Housman, C. J. Koch, S. W. Lowe and A. J. Giaccia (1996). "Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours." *Nature* 379(6560): 88-91.
- Griffiths, J. R. (1991). "Are cancer cells acidic?" *Br J Cancer* 64(3): 425-7.
- Grover-McKay, M., S. A. Walsh, E. A. Seftor, P. A. Thomas and M. J. Hendrix (1998). "Role for glucose transporter 1 protein in human breast cancer." *Pathol Oncol Res* 4(2): 115-20.
- Guzy, R. D., B. Hoyos, E. Robin, H. Chen, L. Liu, K. D. Mansfield, M. C. Simon, U. Hammerling and P. T. Schumacker (2005). "Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing." *Cell Metab* 1(6): 401-8.
- Hagedorn, M. and A. Bikfalvi (2000). "Target molecules for anti-angiogenic therapy: from basic research to clinical trials." *Crit Rev Oncol Hematol* 34(2): 89-110.
- Hahn, W. C. and R. A. Weinberg (2002). "Rules for making human tumor cells." *N Engl J Med* 347(20): 1593-603.
- Hainaut, P. and M. Hollstein (2000). "p53 and human cancer: the first ten thousand mutations." *Adv Cancer Res* 77: 81-137.
- Hanahan, D. (1985). "Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes." *Nature* 315(6015): 115-22.
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell* 86(3): 353-64.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.
- Hardie, D. G. (2003). "Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular

- energy status." *Endocrinology* 144(12): 5179-83.
- Hardie, D. G. (2004). "The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream." *J Cell Sci* 117(Pt 23): 5479-87.
- Hardie, D. G., D. Carling and M. Carlson (1998). "The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?" *Annu Rev Biochem* 67: 821-55.
- Harding, H. P., M. Calton, F. Urano, I. Novoa and D. Ron (2002). "Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response." *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 575-99.
- Harding, H. P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira and D. Ron (2000). "Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells." *Mol Cell* 6(5): 1099-108.
- Harding, H. P., H. Zeng, Y. Zhang, R. Jungries, P. Chung, H. Plesken, D. D. Sabatini and D. Ron (2001). "Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*<sup>-/-</sup> mice reveals a role for translational control in secretory cell survival." *Mol Cell* 7(6): 1153-63.
- Harding, H. P., Y. Zhang and D. Ron (1999). "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase." *Nature* 397(6716): 271-4.
- Harding, H. P., Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P. D. Lu, M. Calton, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D. F. Stojdl, J. C. Bell, T. Hettmann, J. M. Leiden and D. Ron (2003). "An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress." *Mol Cell* 11(3): 619-33.
- Hartmann, A., M. Kunz, S. Kostlin, R. Gillitzer, A. Toksoy, E. B. Brocker and C. E. Klein (1999). "Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma." *Cancer Res* 59(7): 1578-83.
- Hattori, K., S. Dias, B. Heissig, N. R. Hackett, D. Lyden, M. Tateno, D. J. Hicklin, Z. Zhu, L. Witte, R. G. Crystal, M. A. Moore and S. Rafii (2001). "Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells." *J Exp Med* 193(9): 1005-14.
- Hayashi, T., A. Saito, S. Okuno, M. Ferrand-Drake, R. L. Dodd and P. H. Chan (2005). "Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons." *J Cereb Blood Flow Metab* 25(1): 41-53.
- Haynes, C. M., E. A. Titus and A. A. Cooper (2004). "Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death." *Mol Cell* 15(5): 767-76.
- Haze, K., T. Okada, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi and K. Mori (2001). "Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response." *Biochem J* 355(Pt 1): 19-28.
- Haze, K., H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura and K. Mori (1999). "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress." *Mol Biol Cell* 10(11): 3787-99.
- He, C. H., P. Gong, B. Hu, D. Stewart, M. E. Choi, A. M. Choi and J. Alam (2001). "Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation." *J Biol Chem* 276(24): 20858-65.
- He, X., P. E. Brenchley, G. C. Jayson, L. Hampson, J. Davies and I. N. Hampson (2004). "Hypoxia

- increases heparanase-dependent tumor cell invasion, which can be inhibited by antiheparanase antibodies." *Cancer Res* 64(11): 3928-33.
- Hebert, D. N., J. F. Simons, J. R. Peterson and A. Helenius (1995). "Calnexin, calreticulin, and Bip/Kar2p in protein folding." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60: 405-15.
- Helenius, A. (1994). "How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum." *Mol. Biol. Cell* 5: 253-265.
- Helenius, A. and M. Aebi (2001). "Intracellular functions of N-linked glycans." *Science* 291(5512): 2364-9.
- Helenius, A. and M. Aebi (2004). "Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum." *Annu Rev Biochem* 73: 1019-49.
- Hellstrom, M., H. Gerhardt, M. Kalen, X. Li, U. Eriksson, H. Wolburg and C. Betsholtz (2001). "Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis." *J Cell Biol* 153(3): 543-53.
- Hellwig-Burgel, T., K. Rutkowski, E. Metzen, J. Fandrey and W. Jelkmann (1999). "Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1." *Blood* 94(5): 1561-7.
- Helmlinger, G., A. Sckell, M. Dellian, N. S. Forbes and R. K. Jain (2002). "Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism." *Clin Cancer Res* 8(4): 1284-91.
- Helmlinger, G., F. Yuan, M. Dellian and R. K. Jain (1997). "Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation." *Nat Med* 3(2): 177-82.
- Hinnebusch, A. (2000). Mechanism and Regulation of Initiator Methionyl-tRNA Binding Ribosomes.
- Hirschi, K. K., S. A. Rohovsky and P. A. D'Amore (1998). "PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate." *J Cell Biol* 141(3): 805-14.
- Holash, J., P. C. Maisonpierre, D. Compton, P. Boland, C. R. Alexander, D. Zagzag, G. D. Yancopoulos and S. J. Wiegand (1999). "Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF." *Science* 284(5422): 1994-8.
- Hong, M., S. Luo, P. Baumeister, J. M. Huang, R. K. Gogia, M. Li and A. S. Lee (2004). "Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response." *J Biol Chem* 279(12): 11354-63.
- Houck, K. A., N. Ferrara, J. Winer, G. Cachianes, B. Li and D. W. Leung (1991). "The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA." *Mol Endocrinol* 5(12): 1806-14.
- Houck, K. A., D. W. Leung, A. M. Rowland, J. Winer and N. Ferrara (1992). "Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms." *J Biol Chem* 267(36): 26031-7.
- Houlgatte, R., D. Wion and P. Brachet (1989). "Levels of nerve growth factor secreted by rat primary fibroblasts and iris transplants are influenced by serum and glucocorticoids." *Brain Res Dev Brain Res* 47(2): 171-9.
- Huang, H. C., T. Nguyen and C. B. Pickett (2000). "Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(23): 12475-80.

- Huang, S., J. B. Robinson, A. Deguzman, C. D. Bucana and I. J. Fidler (2000). "Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8." *Cancer Res* 60(19): 5334-9.
- Hubbard, S. C. and R. J. Ivatt (1981). "Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides." *Annu Rev Biochem* 50: 555-83.
- Hwang, C., A. J. Sinskey and H. F. Lodish (1992). "Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum." *Science* 257(5076): 1496-502.
- Iida, K., Y. Kawakami, H. Sone, H. Suzuki, S. Yatoh, K. Isobe, K. Takekoshi and N. Yamada (2002). "Vascular endothelial growth factor gene expression in a retinal pigmented cell is up-regulated by glucose deprivation through 3' UTR." *Life Sci* 71(14): 1607-14.
- Ikeda, J., S. Kaneda, K. Kuwabara, S. Ogawa, T. Kobayashi, M. Matsumoto, T. Yura and H. Yanagi (1997). "Cloning and expression of cDNA encoding the human 150 kDa oxygen-regulated protein, ORP150." *Biochem Biophys Res Commun* 230(1): 94-9.
- Ishii, T., K. Itoh, S. Takahashi, H. Sato, T. Yanagawa, Y. Katoh, S. Bannai and M. Yamamoto (2000). "Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages." *J Biol Chem* 275(21): 16023-9.
- Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel and M. Yamamoto (1999). "Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain." *Genes Dev* 13(1): 76-86.
- Iwakoshi, N. N., A. H. Lee, P. Vallabhajosyula, K. L. Otipoby, K. Rajewsky and L. H. Glimcher (2003). "Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1." *Nat Immunol* 4(4): 321-9.
- Iyer, N. V., L. E. Kotch, F. Agani, S. W. Leung, E. Laughner, R. H. Wenger, M. Gassmann, J. D. Gearhart, A. M. Lawler, A. Y. Yu and G. L. Semenza (1998). "Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha." *Genes Dev* 12(2): 149-62.
- Izuishi, K., K. Kato, T. Ogura, T. Kinoshita and H. Esumi (2000). "Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy." *Cancer Res* 60(21): 6201-7.
- Jakob, C. A., P. Burda, J. Roth and M. Aebi (1998). "Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure." *J Cell Biol* 142(5): 1223-33.
- Jamora, C., G. Dennert and A. S. Lee (1996). "Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(15): 7690-4.
- Jayaraman, L., K. G. Murthy, C. Zhu, T. Curran, S. Xanthoudakis and C. Prives (1997). "Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53." *Genes Dev* 11(5): 558-70.
- Jeong, J. W., M. K. Bae, M. Y. Ahn, S. H. Kim, T. K. Sohn, M. H. Bae, M. A. Yoo, E. J. Song, K. J. Lee and K. W. Kim (2002). "Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation." *Cell* 111(5): 709-20.
- Jiang, H. Y., S. A. Wek, B. C. McGrath, D. Lu, T. Hai, H. P. Harding, X. Wang, D. Ron, D. R. Cavener and

- R. C. Wek (2004). "Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response." *Mol Cell Biol* 24(3): 1365-77.
- Jiang, H. Y., S. A. Wek, B. C. McGrath, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. R. Cavener and R. C. Wek (2003). "Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses." *Mol Cell Biol* 23(16): 5651-63.
- Josko, J. and M. Mazurek (2004). "Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis." *Med Sci Monit* 10(4): RA89-98.
- Jussila, L. and K. Alitalo (2002). "Vascular growth factors and lymphangiogenesis." *Physiol Rev* 82(3): 673-700.
- Kaufman, R. J. (1999). "Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls." *Genes Dev* 13(10): 1211-33.
- Kaufman, R. J., D. Scheuner, M. Schroder, X. Shen, K. Lee, C. Y. Liu and S. M. Arnold (2002). "The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(6): 411-21.
- Kaya, M., T. Wada, T. Akatsuka, S. Kawaguchi, S. Nagoya, M. Shindoh, F. Higashino, F. Mezawa, F. Okada and S. Ishii (2000). "Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis." *Clin Cancer Res* 6(2): 572-7.
- Kebache, S., E. Cardin, D. T. Nguyen, E. Chevet and L. Larose (2004). "Nck-1 antagonizes the endoplasmic reticulum stress-induced inhibition of translation." *J Biol Chem* 279(10): 9662-71.
- Kebache, S., D. Zuo, E. Chevet and L. Larose (2002). "Modulation of protein translation by Nck-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(8): 5406-11.
- Kerbel, R. and J. Folkman (2002). "Clinical translation of angiogenesis inhibitors." *Nat Rev Cancer* 2(10): 727-39.
- Kevil, C. G., D. K. Payne, E. Mire and J. S. Alexander (1998). "Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins." *J Biol Chem* 273(24): 15099-103.
- Kiba, A., H. Sagara, T. Hara and M. Shibuya (2003). "VEGFR-2-specific ligand VEGF-E induces non-edematous hyper-vascularization in mice." *Biochem Biophys Res Commun* 301(2): 371-7.
- Kietzmann, T., A. Krones-Herzig and K. Jungermann (2002). "Signaling cross-talk between hypoxia and glucose via hypoxia-inducible factor 1 and glucose response elements." *Biochem Pharmacol* 64(5-6): 903-11.
- Kilberg, M. S., Y. X. Pan, H. Chen and V. Leung-Pineda (2005). "NUTRITIONAL CONTROL OF GENE EXPRESSION: How Mammalian Cells Respond to Amino Acid Limitation \*." *Annu Rev Nutr* 25: 59-85.
- Kim do, K., I. J. Kim, S. Hwang, J. H. Kook, M. C. Lee, B. A. Shin, C. S. Bae, J. H. Yoon, S. G. Ahn, S. A. Kim, Y. Kanai, H. Endou and J. K. Kim (2004). "System L-amino acid transporters are differently expressed in rat astrocyte and C6 glioma cells." *Neurosci Res* 50(4): 437-46.
- Kim, I., H. G. Kim, S. O. Moon, S. W. Chae, J. N. So, K. N. Koh, B. C. Ahn and G. Y. Koh (2000). "Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion



- kinase and plasmin secretion." *Circ Res* 86(9): 952-9.
- Kim, K. J., B. Li, J. Winer, M. Armanini, N. Gillett, H. S. Phillips and N. Ferrara (1993). "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo." *Nature* 362(6423): 841-4.
- Kimball, S. R. (2002). "Regulation of global and specific mRNA translation by amino acids." *J Nutr* 132(5): 883-6.
- Kimura, H., A. Weisz, Y. Kurashima, K. Hashimoto, T. Ogura, F. D'Acquisto, R. Addeo, M. Makuuchi and H. Esumi (2000). "Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide." *Blood* 95(1): 189-97.
- Kirsch, M., G. Schackert and P. M. Black (2004). "Metastasis and angiogenesis." *Cancer Treat Res* 117: 285-304.
- Klagsbrun, M., J. Sasse, R. Sullivan and J. A. Smith (1986). "Human tumor cells synthesize an endothelial cell growth factor that is structurally related to basic fibroblast growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(8): 2448-52.
- Kobayashi, H., Y. Ishii and T. Takayama (2005). "Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in esophageal carcinoma." *J Surg Oncol* 90(4): 233-8.
- Kobayashi, T. and Y. Ohta (2005). "150-kD oxygen-regulated protein is an essential factor for insulin release." *Pancreas* 30(4): 299-306.
- Koga, K., Y. Osuga, O. Tsutsumi, M. Momoeda, A. Suenaga, K. Kugu, T. Fujiwara, Y. Takai, T. Yano and Y. Taketani (2000). "Evidence for the presence of angiogenin in human follicular fluid and the up-regulation of its production by human chorionic gonadotropin and hypoxia." *J Clin Endocrinol Metab* 85(9): 3352-5.
- Kokame, K., H. Kato and T. Miyata (2001). "Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response." *J Biol Chem* 276(12): 9199-205.
- Kole, H. K., R. J. Resnick, M. Van Doren and E. Racker (1991). "Regulation of 6-phosphofructo-1-kinase activity in ras-transformed rat-1 fibroblasts." *Arch Biochem Biophys* 286(2): 586-90.
- Kornfeld, R. and S. Kornfeld (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." *Annu Rev Biochem* 54: 631-64.
- Kotch, L. E., N. V. Iyer, E. Laughner and G. L. Semenza (1999). "Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death." *Dev Biol* 209(2): 254-67.
- Koumenis, C., C. Naczki, M. Koritzinsky, S. Rastani, A. Diehl, N. Sonenberg, A. Koromilas and B. G. Wouters (2002). "Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha." *Mol Cell Biol* 22(21): 7405-16.
- Kovacs, Z., K. Ikezaki, K. Samoto, T. Inamura and M. Fukui (1996). "VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct." *Stroke* 27(10): 1865-72; discussion 1872-3.
- Kozutsumi, Y., M. Segal, K. Normington, M. J. Gething and J. Sambrook (1988). "The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins." *Nature* 332(6163): 462-4.
- Krtolica, A. and J. W. Ludlow (1996). "Hypoxia arrests ovarian carcinoma cell cycle progression,

- but invasion is unaffected." *Cancer Res* 56(5): 1168-73.
- Ku, D. D., J. K. Zaleski, S. Liu and T. A. Brock (1993). "Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries." *Am J Physiol* 265(2 Pt 2): H586-92.
- Kucharczak, J., M. J. Simmons, Y. Fan and C. Gelinas (2003). "To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis." *Oncogene* 22(56): 8961-82.
- Kunkel, M., T. E. Reichert, P. Benz, H. A. Lehr, J. H. Jeong, S. Wieand, P. Bartenstein, W. Wagner and T. L. Whiteside (2003). "Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma." *Cancer* 97(4): 1015-24.
- Kuroki, M., E. E. Voest, S. Amano, L. V. Beerepoot, S. Takashima, M. Tolentino, R. Y. Kim, R. M. Rohan, K. A. Colby, K. T. Yeo and A. P. Adamis (1996). "Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo." *J Clin Invest* 98(7): 1667-75.
- Lancaster, D. E., M. A. McDonough and C. J. Schofield (2004). "Factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) and other asparaginyl hydroxylases." *Biochem Soc Trans* 32(Pt 6): 943-5.
- Lando, D., I. Pongratz, L. Poellinger and M. L. Whitelaw (2000). "A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1alpha and the HIF-like factor." *J Biol Chem* 275(7): 4618-27.
- Lang, W. H. and R. H. Reeder (1993). "The REB1 site is an essential component of a terminator for RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 13(1): 649-58.
- Lee, A. H., N. N. Iwakoshi, K. C. Anderson and L. H. Glimcher (2003a). "Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(17): 9946-51.
- Lee, A. H., N. N. Iwakoshi and L. H. Glimcher (2003b). "XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response." *Mol Cell Biol* 23(21): 7448-59.
- Lee, A. H. and I. F. Tannock (1998). "Heterogeneity of intracellular pH and of mechanisms that regulate intracellular pH in populations of cultured cells." *Cancer Res* 58(9): 1901-8.
- Lee, A. S. (1992). "Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family." *Curr Opin Cell Biol* 4: 267-273.
- Lee, A. S. (2001). "The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications." *Trends Biochem Sci* 26(8): 504-10.
- Lee, K., W. Tirasophon, X. Shen, M. Michalak, R. Prywes, T. Okada, H. Yoshida, K. Mori and R. J. Kaufman (2002). "IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response." *Genes Dev* 16(4): 452-66.
- Lentz, S. R. and J. E. Sadler (1993). "Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum." *Blood* 81(3): 683-9.
- Leung, D. W., G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel and N. Ferrara (1989). "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." *Science* 246(4935): 1306-9.
- Levine, H. A., B. D. Sleeman and M. Nilsen-Hamilton (2000). "A mathematical model for the roles of pericytes and macrophages in the

- initiation of angiogenesis. I. The role of protease inhibitors in preventing angiogenesis." *Math Biosci* 168(1): 77-115.
- Levy, N. S., S. Chung, H. Furneaux and A. P. Levy (1998). "Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR." *J Biol Chem* 273(11): 6417-23.
- Li, J., Y. P. Zhang and R. S. Kirsner (2003). "Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix." *Microsc Res Tech* 60(1): 107-14.
- Liu, C. Y., M. Schroder and R. J. Kaufman (2000). "Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 275(32): 24881-5.
- Liu, C. Y., Z. Xu and R. J. Kaufman (2003). "Structure and intermolecular interactions of the luminal dimerization domain of human IRE1 $\alpha$ ." *J Biol Chem* 278(20): 17680-7.
- Liu, Y., S. R. Cox, T. Morita and S. Kourembanas (1995). "Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer." *Circ Res* 77(3): 638-43.
- Lobo, C., M. A. Ruiz-Bellido, J. C. Aledo, J. Marquez, I. Nunez De Castro and F. J. Alonso (2000). "Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumourigenicity of tumour cells." *Biochem J* 348 Pt 2: 257-61.
- Loo, D. T., J. I. Fuquay, C. L. Rawson and D. W. Barnes (1987). "Extended culture of mouse embryo cells without senescence: inhibition by serum." *Science* 236(4798): 200-2.
- Loureiro, R. M. and P. A. D'Amore (2005). "Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in cancer." *Cytokine Growth Factor Rev* 16(1): 77-89.
- Lu, S. C. (1999). "Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies." *Faseb J* 13(10): 1169-83.
- Luo, S., P. Baumeister, S. Yang, S. F. Abcouwer and A. S. Lee (2003). "Induction of Grp78/BiP by translational block: activation of the Grp78 promoter by ATF4 through and upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements." *J Biol Chem* 278(39): 37375-85.
- Luo, S. and A. S. Lee (2002). "Requirement of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway for the induction of the 78 kDa glucose-regulated protein/immunoglobulin heavy-chain binding protein by azetidine stress: activating transcription factor 6 as a target for stress-induced phosphorylation." *Biochem J* 366(Pt 3): 787-95.
- Luttun, A., G. Carmeliet and P. Carmeliet (2002). "Vascular progenitors: from biology to treatment." *Trends Cardiovasc Med* 12(2): 88-96.
- Ma, K., K. M. Vattem and R. C. Wek (2002). "Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress." *J Biol Chem* 277(21): 18728-35.
- Ma, Y., J. W. Brewer, J. A. Diehl and L. M. Hendershot (2002). "Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response." *J Mol Biol* 318(5): 1351-65.
- Ma, Y. and L. M. Hendershot (2001). "The unfolding tale of the unfolded protein response." *Cell* 107(7): 827-30.
- Ma, Y. and L. M. Hendershot (2004). "The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe?" *Nat Rev Cancer* 4(12): 966-77.

- Maisonpierre, P. C., C. Suri, P. F. Jones, S. Bartunkova, S. J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T. H. Aldrich, N. Papadopoulos, T. J. Daly, S. Davis, T. N. Sato and G. D. Yancopoulos (1997). "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis." *Science* 277(5322): 55-60.
- Malecaze, F., S. Clamens, V. Simorre-Pinatel, A. Mathis, P. Chollet, C. Favard, F. Bayard and J. Plouet (1994). "Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy." *Arch Ophthalmol* 112(11): 1476-82.
- Maltepe, E., J. V. Schmidt, D. Baunoch, C. A. Bradfield and M. C. Simon (1997). "Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT." *Nature* 386(6623): 403-7.
- Maniotis, A. J., R. Folberg, A. Hess, E. A. Seftor, L. M. Gardner, J. Pe'er, J. M. Trent, P. S. Meltzer and M. J. Hendrix (1999). "Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry." *Am J Pathol* 155(3): 739-52.
- Mansfield, K. D., R. D. Guzy, Y. Pan, R. M. Young, T. P. Cash, P. T. Schumacker and M. C. Simon (2005). "Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- $\alpha$  activation." *Cell Metab* 1(6): 393-9.
- Marciniak, S. J., C. Y. Yun, S. Oyadomari, I. Novoa, Y. Zhang, R. Jungreis, K. Nagata, H. P. Harding and D. Ron (2004). "CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum." *Genes Dev* 18(24): 3066-77.
- Marjon, P. L., E. V. Bobrovnikova-Marjon and S. F. Abcouwer (2004). "Expression of the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 by human breast carcinomas is responsive to nutrient deprivation and endoplasmic reticulum stress." *Mol Cancer* 3: 4.
- Martinez-Zaguilan, R., R. M. Lynch, G. M. Martinez and R. J. Gillies (1993). "Vacuolar-type H(+)-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells." *Am J Physiol* 265(4 Pt 1): C1015-29.
- Martinez-Zaguilan, R., E. A. Seftor, R. E. Seftor, Y. W. Chu, R. J. Gillies and M. J. Hendrix (1996). "Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells." *Clin Exp Metastasis* 14(2): 176-86.
- Massa, S.M., R. A. Swanson and F. R. Sharp (1996). "The stress gene response in brain." *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8(2): 95-158.
- Mates, J. M., C. Perez-Gomez, I. Nunez de Castro, M. Asenjo and J. Marquez (2002). "Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death." *Int J Biochem Cell Biol* 34(5): 439-58.
- Matsumoto, T. and L. Claesson-Welsh (2001). "VEGF receptor signal transduction." *Sci STKE* 2001(112): RE21.
- Matthews, W., C. T. Jordan, M. Gavin, N. A. Jenkins, N. G. Copeland and I. R. Lemischka (1991). "A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(20): 9026-30.
- Maublant, J., J. P. Vuillez, J. N. Talbot, J. Lumbroso, J. P. Muratet, J. Y. Herry and J. C. Artus (1998). "[Positron emission tomography (PET) and (F-18)-fluorodeoxyglucose in (FDG) in cancerology]." *Bull Cancer* 85(11): 935-50.

- May, D., A. Itin, O. Gal, H. Kalinski, E. Feinstein and E. Keshet (2005). "Ero1-L alpha plays a key role in a HIF-1-mediated pathway to improve disulfide bond formation and VEGF secretion under hypoxia: implication for cancer." *Oncogene* 24(6): 1011-20.
- Mazurek, S., H. Grimm, C. B. Boschek, P. Vaupel and E. Eigenbrodt (2002). "Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome." *Br J Nutr* 87 Suppl 1: S23-9.
- McCullough, K. D., J. L. Martindale, L. O. Klotz, T. Y. Aw and N. J. Holbrook (2001). "Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state." *Mol Cell Biol* 21(4): 1249-59.
- McLean, L. A., J. Roscoe, N. K. Jorgensen, F. A. Gorin and P. M. Cala (2000). "Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes." *Am J Physiol Cell Physiol* 278(4): C676-88.
- Medina, M. A., F. Sanchez-Jimenez, J. Marquez, A. Rodriguez Quesada and I. Nunez de Castro (1992). "Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth." *Mol Cell Biochem* 113(1): 1-15.
- Meeson, A. P., M. Argilla, K. Ko, L. Witte and R. A. Lang (1999). "VEGF deprivation-induced apoptosis is a component of programmed capillary regression." *Development* 126(7): 1407-15.
- Meijer, A. J. and P. F. Dubbelhuis (2004). "Amino acid signalling and the integration of metabolism." *Biochem Biophys Res Commun* 313(2): 397-403.
- Melnick, J., J. L. Dul and Y. Argon (1994). "Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum." *Nature* 370(6488): 373-5.
- Melter, M., M. E. Reinders, M. Sho, S. Pal, C. Geehan, M. D. Denton, D. Mukhopadhyay and D. M. Briscoe (2000). "Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo." *Blood* 96(12): 3801-8.
- Menetret, J. F., A. Neuhof, D. G. Morgan, K. Plath, M. Radermacher, T. A. Rapoport and C. W. Akey (2000). "The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation." *Mol Cell* 6(5): 1219-32.
- Mengesdorf, T., S. Althausen, I. Oberndorfer and W. Paschen (2001). "Response of neurons to an irreversible inhibition of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase: relationship between global protein synthesis and expression and translation of individual genes." *Biochem J* 356(Pt 3): 805-12.
- Meyer, M., M. Clauss, A. Lepple-Wienhues, J. Waltenberger, H. G. Augustin, M. Ziche, C. Lanz, M. Buttner, H. J. Rziha and C. Dehio (1999). "A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases." *Embo J* 18(2): 363-74.
- Minchenko, A., I. Leshchinsky, I. Opentanova, N. Sang, V. Srinivas, V. Armstead and J. Caro (2002). "Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect." *J Biol Chem* 277(8): 6183-7.
- Molinari, M., V. Calanca, C. Galli, P. Lucca and P. Paganetti (2003). "Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle." *Science* 299(5611): 1397-400.

- Molinari, M. and A. Helenius (2000). "Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum." *Science* 288(5464): 331-3.
- Mori, K. (2000). "Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum." *Cell* 101(5): 451-4.
- Mori, K., W. Ma, M. J. Gething and J. Sambrook (1993). "A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus." *Cell* 74(4): 743-56.
- Mori, K., A. Sant, K. Kohno, K. Normington, M. J. Gething and J. F. Sambrook (1992). "A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins." *Embo J* 11(7): 2583-93.
- Morishima, N., K. Nakanishi, H. Takenouchi, T. Shibata and Y. Yasuhiko (2002). "An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12." *J Biol Chem* 277(37): 34287-94.
- Morita, T., T. Nagaki, I. Fukuda and K. Okumura (1992). "Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells." *Mutat Res* 268(2): 297-305.
- Myllyharju, J. (2003). "Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis." *Matrix Biol* 22(1): 15-24.
- Nagy, J. A., E. Vasile, D. Feng, C. Sundberg, L. F. Brown, M. J. Detmar, J. A. Lawitts, L. Benjamin, X. Tan, E. J. Manseau, A. M. Dvorak and H. F. Dvorak (2002). "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis." *J Exp Med* 196(11): 1497-506.
- Nakagawa, T. and J. Yuan (2000). "Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis." *J Cell Biol* 150(4): 887-94.
- Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner and J. Yuan (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." *Nature* 403(6765): 98-103.
- Narasimhan, P., R. A. Swanson, S. M. Sagar and F. R. Sharp (1996). "Astrocyte survival and HSP70 heat shock protein induction following heat shock and acidosis." *Glia* 17(2): 147-59.
- Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch and Z. Poltorak (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." *Faseb J* 13(1): 9-22.
- Nguyen, D. T., S. Kebache, A. Fazel, H. N. Wong, S. Jenna, A. Emadali, E. H. Lee, J. J. Bergeron, R. J. Kaufman, L. Larose and E. Chevet (2004). "Nck-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-1 and regulation of cell survival during endoplasmic reticulum stress." *Mol Biol Cell* 15(9): 4248-60.
- Nishitoh, H., A. Matsuzawa, K. Tobiume, K. Saegusa, K. Takeda, K. Inoue, S. Hori, A. Kakizuka and H. Ichijo (2002). "ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats." *Genes Dev* 16(11): 1345-55.
- Niwa, M., C. K. Patil, J. DeRisi and P. Walter (2005). "Genome-scale approaches for discovering novel nonconventional splicing substrates of the Ire1 nuclease." *Genome Biol* 6(1): R3.
- Noden, D. M. (1989). "Embryonic origins and assembly of blood vessels." *Am Rev Respir Dis* 140(4): 1097-103.
- Noiva, R. (1999). "Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the

- endoplasmic reticulum." *Semin Cell Dev Biol* 10(5): 481-93.
- North, S., M. Moenner and A. Bikfalvi (2005). "Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors." *Cancer Lett* 218(1): 1-14.
- Ober, S. S. and A. B. Pardee (1987). "Intracellular pH is increased after transformation of Chinese hamster embryo fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(9): 2766-70.
- Oda, Y., N. Hosokawa, I. Wada and K. Nagata (2003). "EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin." *Science* 299(5611): 1394-7.
- Okada, T., H. Yoshida, R. Akazawa, M. Negishi and K. Mori (2002). "Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response." *Biochem J* 366(Pt 2): 585-94.
- Okamura, K., Y. Kimata, H. Higashio, A. Tsuru and K. Kohno (2000). "Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast." *Biochem Biophys Res Commun* 279(2): 445-50.
- Orrenius, S., B. Zhivotovsky and P. Nicotera (2003). "Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 552-65.
- Osthus, R. C., H. Shim, S. Kim, Q. Li, R. Reddy, M. Mukherjee, Y. Xu, D. Wonsey, L. A. Lee and C. V. Dang (2000). "Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc." *J Biol Chem* 275(29): 21797-800.
- Outinen, P. A., S. K. Sood, S. I. Pfeifer, S. Pamidi, T. J. Podor, J. Li, J. I. Weitz and R. C. Austin (1999). "Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells." *Blood* 94(3): 959-67.
- Ozawa, K., T. Kondo, O. Hori, Y. Kitao, D. M. Stern, W. Eisenmenger, S. Ogawa and T. Ohshima (2001a). "Expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport." *J Clin Invest* 108(1): 41-50.
- Ozawa, K., Y. Tsukamoto, O. Hori, Y. Kitao, H. Yanagi, D. M. Stern and S. Ogawa (2001b). "Regulation of tumor angiogenesis by oxygen-regulated protein 150, an inducible endoplasmic reticulum chaperone." *Cancer Res* 61(10): 4206-13.
- Padbury, J. F., S. K. Diah, B. McGonnigal, C. Miller, C. Fugere, M. Kuzniar and N. L. Thompson (2004). "Transcriptional regulation of the LAT-1/CD98 light chain." *Biochem Biophys Res Commun* 318(2): 529-34.
- Pagani, M., M. Fabbri, C. Benedetti, A. Fassio, S. Pilati, N. J. Bulleid, A. Cabibbo and R. Sitia (2000). "Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-beta (ERO1-Lbeta), a human gene induced in the course of the unfolded protein response." *J Biol Chem* 275(31): 23685-92.
- Page, E. L., G. A. Robitaille, J. Pouyssegur and D. E. Richard (2002). "Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms." *J Biol Chem* 277(50): 48403-9.
- Pages, G. and J. Pouyssegur (2005). "Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors." *Cardiovasc Res* 65(3): 564-73.
- Pahl, H. L. and P. A. Baeuerle (1995). "A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by

- transcription factor NF-kappa B." *Embo J* 14(11): 2580-8.
- Pan, Y., H. Chen, F. Siu and M. S. Kilberg (2003). "Amino acid deprivation and endoplasmic reticulum stress induce expression of multiple activating transcription factor-3 mRNA species that, when overexpressed in HepG2 cells, modulate transcription by the human asparagine synthetase promoter." *J Biol Chem* 278(40): 38402-12.
- Papetti, M. and I. M. Herman (2002). "Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis." *Am J Physiol Cell Physiol* 282(5): C947-70.
- Pardanaud, L., F. Yassine and F. Dieterlen-Lievre (1989). "Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny." *Development* 105(3): 473-85.
- Paris, S., H. Denis, E. Delaive, M. Dieu, V. Dumont, N. Ninane, M. Raes and C. Michiels (2005). "Up-regulation of 94-kDa glucose-regulated protein by hypoxia-inducible factor-1 in human endothelial cells in response to hypoxia." *FEBS Lett* 579(1): 105-14.
- Park, H. J., J. C. Lyons, T. Ohtsubo and C. W. Song (1999). "Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity." *Br J Cancer* 80(12): 1892-7.
- Park, J. E., G. A. Keller and N. Ferrara (1993). "The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF." *Mol Biol Cell* 4(12): 1317-26.
- Park, S. H., K. W. Kim, Y. S. Lee, J. H. Baek, M. S. Kim, Y. M. Lee, M. S. Lee and Y. J. Kim (2001). "Hypoglycemia-induced VEGF expression is mediated by intracellular Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C signaling pathway in HepG2 human hepatoblastoma cells." *Int J Mol Med* 7(1): 91-6.
- Park, S. K., A. M. Dadak, V. H. Haase, L. Fontana, A. J. Giaccia and R. S. Johnson (2003). "Hypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha): role of cytoplasmic trapping of HIF-2alpha." *Mol Cell Biol* 23(14): 4959-71.
- Paschen, W. and A. Frandsen (2001). "Endoplasmic reticulum dysfunction--a common denominator for cell injury in acute and degenerative diseases of the brain?" *J Neurochem* 79(4): 719-25.
- Patan, S., B. Haenni and P. H. Burri (1996a). "Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM): 1. pillar formation by folding of the capillary wall." *Microvasc Res* 51(1): 80-98.
- Patan, S., L. L. Munn and R. K. Jain (1996b). "Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis." *Microvasc Res* 51(2): 260-72.
- Patil, C. and P. Walter (2001). "Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals." *Curr Opin Cell Biol* 13(3): 349-55.
- Pavlov, N. and J. Badet (2001). "[Angiogenin: involvement in angiogenesis and tumour growth]." *Bull Cancer* 88(8): 725-32.
- Pelengaris, S., M. Khan and G. Evan (2002). "c-MYC: more than just a matter of life and death." *Nat Rev Cancer* 2(10): 764-76.
- Peng, J., L. Zhang, L. Drysdale and G. H. Fong (2000). "The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling." *Proc*



- Natl Acad Sci U S A 97(15): 8386-91.
- Peng, T., T. R. Golub and D. M. Sabatini (2002). "The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation." *Mol Cell Biol* 22(15): 5575-84.
- Pepper, M. S. (2001). "Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(7): 1104-17.
- Pepper, M. S., N. Ferrara, L. Orci and R. Montesano (1991). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 181(2): 902-6.
- Peretz, D., H. Gitay-Goren, M. Safran, N. Kimmel, D. Gospodarowicz and G. Neufeld (1992). "Glycosylation of vascular endothelial growth factor is not required for its mitogenic activity." *Biochem Biophys Res Commun* 182(3): 1340-7.
- Petibois, C., B. Desbat and G. Deleris (2004). "Determination of stress-induced changes in plasma molecular species by two-dimensional correlation Fourier transform infrared spectrometry." *Biopolymers* 73(6): 696-704.
- Pilch, H., K. Schlenger, E. Steiner, P. Brockerhoff, P. Knapstein and P. Vaupel (2001). "Hypoxia-stimulated expression of angiogenic growth factors in cervical cancer cells and cervical cancer-derived fibroblasts." *Int J Gynecol Cancer* 11(2): 137-42.
- Piret, J. P., D. Mottet, M. Raes and C. Michiels (2002). "Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein?" *Biochem Pharmacol* 64(5-6): 889-92.
- Plate, K. H., G. Breier, H. A. Weich and W. Risau (1992). "Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo." *Nature* 359(6398): 845-8.
- Plouet, J., F. Moro, S. Bertagnoli, N. Coldeboeuf, H. Mazarguil, S. Clamens and F. Bayard (1997). "Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect." *J Biol Chem* 272(20): 13390-6.
- Plouet, J., J. Schilling and D. Gospodarowicz (1989). "Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells." *Embo J* 8(12): 3801-6.
- Postovit, L. M., M. A. Adams, G. E. Lash, J. P. Heaton and C. H. Graham (2004). "Nitric oxide-mediated regulation of hypoxia-induced B16F10 melanoma metastasis." *Int J Cancer* 108(1): 47-53.
- Potgens, A. J., N. H. Lubsen, M. C. van Altena, R. Vermeulen, A. Bakker, J. G. Schoenmakers, D. J. Ruiten and R. M. de Waal (1994). "Covalent dimerization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from Cys to Ser mutations." *J Biol Chem* 269(52): 32879-85.
- Powis, G. and L. Kirkpatrick (2004). "Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target." *Mol Cancer Ther* 3(5): 647-54.
- Qu, L., S. Huang, D. Baltzis, A. M. Rivas-Estilla, O. Pluquet, M. Hatzoglou, C. Koumenis, Y. Taya, A. Yoshimura and A. E. Koromilas (2004). "Endoplasmic reticulum stress induces p53 cytoplasmic localization and prevents p53-dependent apoptosis by a pathway involving glycogen synthase kinase-3beta." *Genes Dev* 18(3): 261-77.
- Racker, E. (1974). "History of the Pasteur effect and its pathobiology." *Mol Cell Biochem* 5(1-2): 17-23.
- Rafii, S., D. Lyden, R. Benezra, K. Hattori and B. Heissig (2002). "Vascular

- and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy?" *Nat Rev Cancer* 2(11): 826-35.
- Rak, J. and J. L. Yu (2004). "Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular "supply" and vascular "demand"." *Semin Cancer Biol* 14(2): 93-104.
- Rapisarda, A., B. Uranchimeg, D. A. Scudiero, M. Selby, E. A. Sausville, R. H. Shoemaker and G. Melillo (2002). "Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway." *Cancer Res* 62(15): 4316-24.
- Raval, R. R., K. W. Lau, M. G. Tran, H. M. Sowter, S. J. Mandriota, J. L. Li, C. W. Pugh, P. H. Maxwell, A. L. Harris and P. J. Ratcliffe (2005). "Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma." *Mol Cell Biol* 25(13): 5675-86.
- Ravi, R., B. Mookerjee, Z. M. Bhujwala, C. H. Sutter, D. Artemov, Q. Zeng, L. E. Dillehay, A. Madan, G. L. Semenza and A. Bedi (2000). "Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha." *Genes Dev* 14(1): 34-44.
- Reddy, R. K., C. Mao, P. Baumeister, R. C. Austin, R. J. Kaufman and A. S. Lee (2003). "Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation." *J Biol Chem* 278(23): 20915-24.
- Reimold, A. M., P. D. Ponath, Y. S. Li, R. R. Hardy, C. S. David, J. L. Strominger and L. H. Glimcher (1996). "Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1." *J Exp Med* 183(2): 393-401.
- Resnick, N. and M. A. Gimbrone, Jr. (1995). "Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression." *Faseb J* 9(10): 874-82.
- Richard, D. E., E. Berra, E. Gothie, D. Roux and J. Pouyssegur (1999). "p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1." *J Biol Chem* 274(46): 32631-7.
- Richard, D. E., E. Berra and J. Pouyssegur (2000). "Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem* 275(35): 26765-71.
- Rini, B. I. (2005). "VEGF-targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma." *Oncologist* 10(3): 191-7.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." *Nature* 386(6626): 671-4.
- Riu, E., F. Bosch and A. Valera (1996). "Prevention of diabetic alterations in transgenic mice overexpressing Myc in the liver." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(5): 2198-202.
- Rivenson-Segal, D., S. Boldin-Adamsky, D. Seger, R. Seger and H. Degani (2003). "Glycolysis and glucose transporter 1 as markers of response to hormonal therapy in breast cancer." *Int J Cancer* 107(2): 177-82.
- Robinson, C. J. and S. E. Stringer (2001). "The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors." *J Cell Sci* 114(Pt 5): 853-65.
- Romero-Ramirez, L., H. Cao, D. Nelson, E. Hammond, A. H. Lee, H. Yoshida, K. Mori, L. H. Glimcher, N. C. Denko, A. J. Giaccia, Q. T. Le and A. C. Koong (2004). "XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth." *Cancer Res* 64(17): 5943-7.
- Ron, D. (2002). "Translational control in the endoplasmic reticulum stress

- response." *J Clin Invest* 110(10): 1383-8.
- Roybal, C. N., S. Yang, C. W. Sun, D. Hurtado, D. L. Vander Jagt, T. M. Townes and S. F. Abcouwer (2004). "Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4." *J Biol Chem* 279(15): 14844-52.
- Rozhin, J., M. Sameni, G. Ziegler and B. F. Sloane (1994). "Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells." *Cancer Res* 54(24): 6517-25.
- Rutkowski, D. T. and R. J. Kaufman (2003). "All roads lead to ATF4." *Dev Cell* 4(4): 442-4.
- Rutkowski, D. T. and R. J. Kaufman (2004). "A trip to the ER: coping with stress." *Trends Cell Biol* 14(1): 20-8.
- Ryan, H. E., J. Lo and R. S. Johnson (1998). "HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization." *Embo J* 17(11): 3005-15.
- Sage, H. (1986). "Culture shock. Selective uptake and rapid release of a novel serum protein by endothelial cells in vitro." *J Biol Chem* 261(15): 7082-92.
- Saharinen, P., T. Tammela, M. J. Karkkainen and K. Alitalo (2004). "Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation." *Trends Immunol* 25(7): 387-95.
- Sakashita, M., N. Aoyama, R. Minami, S. Maekawa, K. Kuroda, D. Shirasaka, T. Ichihara, Y. Kuroda, S. Maeda and M. Kasuga (2001). "Glut1 expression in T1 and T2 stage colorectal carcinomas: its relationship to clinicopathological features." *Eur J Cancer* 37(2): 204-9.
- Sang, N., D. P. Stiehl, J. Bohensky, I. Leshchinsky, V. Srinivas and J. Caro (2003). "MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300." *J Biol Chem* 278(16): 14013-9.
- Satake, S., M. Kuzuya, H. Miura, T. Asai, M. A. Ramos, M. Muraguchi, Y. Ohmoto and A. Iguchi (1998). "Up-regulation of vascular endothelial growth factor in response to glucose deprivation." *Biol Cell* 90(2): 161-8.
- Sato, T. N., Y. Tozawa, U. Deutsch, K. Wolburg-Buchholz, Y. Fujiwara, M. Gendron-Maguire, T. Gridley, H. Wolburg, W. Risau and Y. Qin (1995). "Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation." *Nature* 376(6535): 70-4.
- Schafer, G., T. Cramer, G. Suske, W. Kemmner, B. Wiedenmann and M. Hocker (2003). "Oxidative stress regulates vascular endothelial growth factor-A gene transcription through Sp1- and Sp3-dependent activation of two proximal GC-rich promoter elements." *J Biol Chem* 278(10): 8190-8.
- Scheuner, D., B. Song, E. McEwen, C. Liu, R. Laybutt, P. Gillespie, T. Saunders, S. Bonner-Weir and R. J. Kaufman (2001). "Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis." *Mol Cell* 7(6): 1165-76.
- Schofield, C. J. and P. J. Ratcliffe (2004). "Oxygen sensing by HIF hydroxylases." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(5): 343-54.
- Schornack, P. A. and R. J. Gillies (2003). "Contributions of cell metabolism and H<sup>+</sup> diffusion to the acidic pH of tumors." *Neoplasia* 5(2): 135-45.
- Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005a). "ER stress and the unfolded protein response." *Mutat Res* 569(1-2): 29-63.
- Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005b). "The Mammalian Unfolded Protein Response." *Annu Rev Biochem* 74: 739-789.

- Scorrano, L., S. A. Oakes, J. T. Opferman, E. H. Cheng, M. D. Sorcinelli, T. Pozzan and S. J. Korsmeyer (2003). "BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis." *Science* 300(5616): 135-9.
- Secomb, T. W., R. Hsu, R. D. Braun, J. R. Ross, J. F. Gross and M. W. Dewhirst (1998). "Theoretical simulation of oxygen transport to tumors by three-dimensional networks of microvessels." *Adv Exp Med Biol* 454: 629-34.
- Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* 3(10): 721-32.
- Semenza, G. L., D. Artemov, A. Bedi, Z. Bhujwalla, K. Chiles, D. Feldser, E. Laughner, R. Ravi, J. Simons, P. Taghavi and H. Zhong (2001). "'The metabolism of tumours': 70 years later." *Novartis Found Symp* 240: 251-60; discussion 260-4.
- Senger, D. R., K. P. Claffey, J. E. Benes, C. A. Perruzzi, A. P. Sergiou and M. Detmar (1997). "Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25): 13612-7.
- Senger, D. R., S. J. Galli, A. M. Dvorak, C. A. Perruzzi, V. S. Harvey and H. F. Dvorak (1983). "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid." *Science* 219(4587): 983-5.
- Shen, J., X. Chen, L. Hendershot and R. Prywes (2002). "ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals." *Dev Cell* 3(1): 99-111.
- Shen, X., R. E. Ellis, K. Sakaki and R. J. Kaufman (2005). "Genetic Interactions Due to Constitutive and Inducible Gene Regulation Mediated by the Unfolded Protein Response in *C. elegans*." *PLoS Genet* 1(3): e37.
- Sherif, Z. A., S. Nakai, K. F. Pirolo, A. Rait and E. H. Chang (2001). "Downmodulation of bFGF-binding protein expression following restoration of p53 function." *Cancer Gene Ther* 8(10): 771-82.
- Shi, Q., X. Le, B. Wang, J. L. Abbruzzese, Q. Xiong, Y. He and K. Xie (2001a). "Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells." *Oncogene* 20(28): 3751-6.
- Shi, Q., Q. Xiong, X. Le and K. Xie (2001b). "Regulation of interleukin-8 expression by tumor-associated stress factors." *J Interferon Cytokine Res* 21(8): 553-66.
- Shi, Y., J. An, J. Liang, S. E. Hayes, G. E. Sandusky, L. E. Stramm and N. N. Yang (1999). "Characterization of a mutant pancreatic eIF-2alpha kinase, PEK, and co-localization with somatostatin in islet delta cells." *J Biol Chem* 274(9): 5723-30.
- Shibata, A., T. Nagaya, T. Imai, H. Funahashi, A. Nakao and H. Seo (2002). "Inhibition of NF-kappaB activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells." *Breast Cancer Res Treat* 73(3): 237-43.
- Shibuya, M., S. Yamaguchi, A. Yamane, T. Ikeda, A. Tojo, H. Matsushime and M. Sato (1990). "Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family." *Oncogene* 5(4): 519-24.
- Shima, D. T., M. Kuroki, U. Deutsch, Y. S. Ng, A. P. Adamis and P. A. D'Amore (1996). "The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory

- sequences." *J Biol Chem* 271(7): 3877-83.
- Shing, Y., J. Folkman, R. Sullivan, C. Butterfield, J. Murray and M. Klagsbrun (1984). "Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor." *Science* 223(4642): 1296-9.
- Shiu, R. P., J. Pouyssegur and I. Pastan (1977). "Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(9): 3840-4.
- Shono, T., M. Ono, H. Izumi, S. I. Jimi, K. Matsushima, T. Okamoto, K. Kohno and M. Kuwano (1996). "Involvement of the transcription factor NF-kappaB in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress." *Mol Cell Biol* 16(8): 4231-9.
- Shuda, M., N. Kondoh, N. Imazeki, K. Tanaka, T. Okada, K. Mori, A. Hada, M. Arai, T. Wakatsuki, O. Matsubara, N. Yamamoto and M. Yamamoto (2003). "Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis." *J Hepatol* 38(5): 605-14.
- Shukla, S., G. T. MacLennan, P. Fu, J. Patel, S. R. Marengo, M. I. Resnick and S. Gupta (2004). "Nuclear factor-kappaB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression." *Neoplasia* 6(4): 390-400.
- Shweiki, D., A. Itin, D. Soffer and E. Keshet (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." *Nature* 359(6398): 843-5.
- Shweiki, D., M. Neeman, A. Itin and E. Keshet (1995). "Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(3): 768-72.
- Sok, J., X. Z. Wang, N. Batchvarova, M. Kuroda, H. Harding and D. Ron (1999). "CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI." *Mol Cell Biol* 19(1): 495-504.
- Song, M. S., Y. K. Park, J. H. Lee and K. Park (2001). "Induction of glucose-regulated protein 78 by chronic hypoxia in human gastric tumor cells through a protein kinase C-epsilon/ERK/AP-1 signaling cascade." *Cancer Res* 61(22): 8322-30.
- Sood, R., A. C. Porter, D. A. Olsen, D. R. Cavener and R. C. Wek (2000). "A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha." *Genetics* 154(2): 787-801.
- Spiro, R. G. (2004). "Role of N-linked polymannose oligosaccharides in targeting glycoproteins for endoplasmic reticulum-associated degradation." *Cell Mol Life Sci* 61(9): 1025-41.
- Spitz, D. R., J. E. Sim, L. A. Ridnour, S. S. Galoforo and Y. J. Lee (2000). "Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism?" *Ann N Y Acad Sci* 899: 349-62.
- Stadtman, E. R. and R. L. Levine (2003). "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins." *Amino Acids* 25(3-4): 207-18.
- Steelman, L. S., S. C. Pohnert, J. G. Shelton, R. A. Franklin, F. E. Bertrand and J. A. McCubrey (2004). "JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and

- BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis." *Leukemia* 18(2): 189-218.
- Stein, I., A. Itin, P. Einat, R. Skaliter, Z. Grossman and E. Keshet (1998). "Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia." *Mol Cell Biol* 18(6): 3112-9.
- Stein, I., M. Neeman, D. Shweiki, A. Itin and E. Keshet (1995). "Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes." *Mol Cell Biol* 15(10): 5363-8.
- Stetler-Stevenson, W. G. (1999). "Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention." *J Clin Invest* 103(9): 1237-41.
- Stevens, F. J. and Y. Argon (1999). "Protein folding in the ER." *Semin Cell Dev Biol* 10(5): 443-54.
- Stubbs, M., C. L. Bashford and J. R. Griffiths (2003). "Understanding the tumor metabolic phenotype in the genomic era." *Curr Mol Med* 3(1): 49-59.
- Suri, C., J. McClain, G. Thurston, D. M. McDonald, H. Zhou, E. H. Oldmixon, T. N. Sato and G. D. Yancopoulos (1998). "Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1." *Science* 282(5388): 468-71.
- Szatrowski, T. P. and C. F. Nathan (1991). "Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells." *Cancer Res* 51(3): 794-8.
- Takagi, H., G. L. King, G. S. Robinson, N. Ferrara and L. P. Aiello (1996). "Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(11): 2165-76.
- Takahashi, A., H. Sasaki, S. J. Kim, K. Tobisu, T. Kakizoe, T. Tsukamoto, Y. Kumamoto, T. Sugimura and M. Terada (1994). "Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis." *Cancer Res* 54(15): 4233-7.
- Takahashi, Y., S. Takahashi, Y. Shiga, T. Yoshimi and T. Miura (2000). "Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase alpha (I) in cultured cells." *J Biol Chem* 275(19): 14139-46.
- Tamatani, M., T. Matsuyama, A. Yamaguchi, N. Mitsuda, Y. Tsukamoto, M. Taniguchi, Y. H. Che, K. Ozawa, O. Hori, H. Nishimura, A. Yamashita, M. Okabe, H. Yanagi, D. M. Stern, S. Ogawa and M. Tohyama (2001). "ORP150 protects against hypoxia/ischemia-induced neuronal death." *Nat Med* 7(3): 317-23.
- Tammela, T., B. Enholm, K. Alitalo and K. Paavonen (2005). "The biology of vascular endothelial growth factors." *Cardiovasc Res* 65(3): 550-63.
- Terman, B. I., M. E. Carrion, E. Kovacs, B. A. Rasmussen, R. L. Eddy and T. B. Shows (1991). "Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase." *Oncogene* 6(9): 1677-83.
- Thurston, G., C. Suri, K. Smith, J. McClain, T. N. Sato, G. D. Yancopoulos and D. M. McDonald (1999). "Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1." *Science* 286(5449): 2511-4.
- Tirasophon, W., A. A. Welihinda and R. J. Kaufman (1998). "A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells." *Genes Dev* 12(12): 1812-24.
- Tischer, E., R. Mitchell, T. Hartman, M. Silva, D. Gospodarowicz, J. C.

- Fiddes and J. A. Abraham (1991). "The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing." *J Biol Chem* 266(18): 11947-54.
- Travers, K. J., C. K. Patil, L. Wodicka, D. J. Lockhart, J. S. Weissman and P. Walter (2000). "Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation." *Cell* 101(3): 249-58.
- Tsuzuki, Y., D. Fukumura, B. Oosthuysen, C. Koike, P. Carmeliet and R. K. Jain (2000). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ --> hypoxia response element--> VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors." *Cancer Res* 60(22): 6248-52.
- Tu, B. P., S. C. Ho-Schleyer, K. J. Travers and J. S. Weissman (2000). "Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum." *Science* 290(5496): 1571-4.
- Tu, B. P. and J. S. Weissman (2004). "Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences." *J Cell Biol* 164(3): 341-6.
- Ubeda, M., M. Vallejo and J. F. Habener (1999). "CHOP enhancement of gene transcription by interactions with Jun/Fos AP-1 complex proteins." *Mol Cell Biol* 19(11): 7589-99.
- Udagawa, T., A. Fernandez, E. G. Achilles, J. Folkman and R. J. D'Amato (2002). "Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy." *Faseb J* 16(11): 1361-70.
- Unemori, E. N., N. Ferrara, E. A. Bauer and E. P. Amento (1992). "Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells." *J Cell Physiol* 153(3): 557-62.
- Urano, F. (2000). "Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1." *Science* 287: 664-666.
- Valera, A., A. Pujol, X. Gregori, E. Riu, J. Visa and F. Bosch (1995). "Evidence from transgenic mice that myc regulates hepatic glycolysis." *Faseb J* 9(11): 1067-78.
- van Laar, T., A. J. van der Eb and C. Terleth (2001). "Mif1: a missing link between the unfolded protein response pathway and ER-associated protein degradation?" *Curr Protein Pept Sci* 2(2): 169-90.
- Vattem, K. M. and R. C. Wek (2004). "Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(31): 11269-74.
- Vaulont, S., M. Vasseur-Cognet and A. Kahn (2000). "Glucose regulation of gene transcription." *J Biol Chem* 275(41): 31555-8.
- Vaupel, P. (2004). "The role of hypoxia-induced factors in tumor progression." *Oncologist* 9 Suppl 5: 10-7.
- Vaupel, P., F. Kallinowski and P. Okunieff (1989). "Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review." *Cancer Res* 49(23): 6449-65.
- Venugopal, R. and A. K. Jaiswal (1996). "Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14960-5.
- Vlodavsky, I. and Y. Friedmann (2001). "Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and

- angiogenesis." *J Clin Invest* 108(3): 341-7.
- Voehringer, D. W. (1999). "BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity." *Free Radic Biol Med* 27(9-10): 945-50.
- Walenta, S., T. Schroeder and W. Mueller-Klieser (2002). "Metabolic mapping with bioluminescence: basic and clinical relevance." *Biomol Eng* 18(6): 249-62.
- Waltenberger, J., U. Mayr, S. Pentz and V. Hombach (1996). "Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia." *Circulation* 94(7): 1647-54.
- Wang, V., D. A. Davis, M. Haque, L. E. Huang and R. Yarchoan (2005). "Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha in HEK293T cells." *Cancer Res* 65(8): 3299-306.
- Wang, X. Z., H. P. Harding, Y. Zhang, E. M. Jolicoeur, M. Kuroda and D. Ron (1998). "Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses." *Embo J* 17(19): 5708-17.
- Wang, X. Z. and D. Ron (1996). "Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase." *Science* 272(5266): 1347-9.
- Wang, Y., J. Shen, N. Arenzana, W. Tirasophon, R. J. Kaufman and R. Prywes (2000). "Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response." *J Biol Chem* 275(35): 27013-20.
- Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." *Science* 123(3191): 309-14.
- Webb, S. E. and A. L. Miller (2003). "Calcium signalling during embryonic development." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 539-51.
- Welch, G. N. and J. Loscalzo (1998). "Homocysteine and atherothrombosis." *N Engl J Med* 338(15): 1042-50.
- Welsh, S. J., W. T. Bellamy, M. M. Briehl and G. Powis (2002). "The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis." *Cancer Res* 62(17): 5089-95.
- Werstuck, G. H., S. R. Lentz, S. Dayal, G. S. Hossain, S. K. Sood, Y. Y. Shi, J. Zhou, N. Maeda, S. K. Krisans, M. R. Malinow and R. C. Austin (2001). "Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways." *J Clin Invest* 107(10): 1263-73.
- Wertheimer, E., S. Sasson, E. Cerasi and Y. Ben-Neriah (1991). "The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose-regulated protein family of stress-inducible proteins." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88: 2525-2529.
- Wild, A. C., H. R. Moinova and R. T. Mulcahy (1999). "Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2." *J Biol Chem* 274(47): 33627-36.
- Wilkinson, B. and H. F. Gilbert (2004). "Protein disulfide isomerase." *Biochim Biophys Acta* 1699(1-2): 35-44.
- Williams, A. C., T. J. Collard and C. Paraskeva (1999). "An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis." *Oncogene* 18(21): 3199-204.
- Wolosker, H., J. B. Rocha, S. Engelender, R. Panizzutti, J. De Miranda and L. de Meis (1997). "Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoforms: diverse



- responses to acidosis." *Biochem J* 321 ( Pt 2): 545-50.
- Wormald, M. R. and R. A. Dwek (1999). "Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability." *Structure Fold Des* 7(7): R155-60.
- Xanthoudakis, S. and T. Curran (1992). "Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity." *Embo J* 11(2): 653-65.
- Xanthoudakis, S., G. G. Miao and T. Curran (1994). "The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(1): 23-7.
- Xu, L. and I. J. Fidler (2000). "Acidic pH-induced elevation in interleukin 8 expression by human ovarian carcinoma cells." *Cancer Res* 60(16): 4610-6.
- Yagi, A., Y. Hasegawa, H. Xiao, M. Haneda, E. Kojima, A. Nishikimi, T. Hasegawa, K. Shimokata and K. Isobe (2003). "GADD34 induces p53 phosphorylation and p21/WAF1 transcription." *J Cell Biochem* 90(6): 1242-9.
- Yan, W., C. L. Frank, M. J. Korth, B. L. Sopher, I. Novoa, D. Ron and M. G. Katze (2002). "Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25): 15920-5.
- Yanagida, O., Y. Kanai, A. Chairoungdua, D. K. Kim, H. Segawa, T. Nii, S. H. Cha, H. Matsuo, J. Fukushima, Y. Fukasawa, Y. Tani, Y. Taketani, H. Uchino, J. Y. Kim, J. Inatomi, I. Okayasu, K. Miyamoto, E. Takeda, T. Goya and H. Endou (2001). "Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines." *Biochim Biophys Acta* 1514(2): 291-302.
- Yasuda, M., Y. Ohzeki, S. Shimizu, S. Naito, A. Ohtsuru, T. Yamamoto and Y. Kuroiwa (1999). "Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells." *Life Sci* 64(4): 249-58.
- Ye, J., R. B. Rawson, R. Komuro, X. Chen, U. P. Dave, R. Prywes, M. S. Brown and J. L. Goldstein (2000). "ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs." *Mol Cell* 6(6): 1355-64.
- Yeldandi, A. V., M. S. Rao and J. K. Reddy (2000). "Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis." *Mutat Res* 448(2): 159-77.
- Yoneda, T., K. Imaizumi, K. Oono, D. Yui, F. Gomi, T. Katayama and M. Tohyama (2001). "Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress." *J Biol Chem* 276(17): 13935-40.
- Yoshida, H., K. Haze, H. Yanagi, T. Yura and K. Mori (1998). "Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors." *J Biol Chem* 273(50): 33741-9.
- Yoshida, H., T. Matsui, N. Hosokawa, R. J. Kaufman, K. Nagata and K. Mori (2003). "A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response." *Dev Cell* 4(2): 265-71.
- Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada and K. Mori (2001a). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." *Cell* 107(7): 881-91.
- Yoshida, H., T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi and

- K. Mori (2001b). "Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors  $\beta$ alpha and  $\beta$ beta that activates the mammalian unfolded protein response." *Mol Cell Biol* 21(4): 1239-48.
- Yoshiji, H., D. E. Gomez, M. Shibuya and U. P. Thorgeirsson (1996). "Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer." *Cancer Res* 56(9): 2013-6.
- Younes, M., R. W. Brown, M. Stephenson, M. Gondo and P. T. Cagle (1997). "Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival." *Cancer* 80(6): 1046-51.
- Younes, M., L. V. Lechago, J. R. Somoano, M. Mosharaf and J. Lechago (1996). "Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers." *Cancer Res* 56(5): 1164-7.
- Yuan, F., Y. Chen, M. Dellian, N. Safabakhsh, N. Ferrara and R. K. Jain (1996). "Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14765-70.
- Yun, H., M. Lee, S. S. Kim and J. Ha (2005). "Glucose deprivation increases mRNA stability of vascular endothelial growth factor through activation of AMP-activated protein kinase in DU145 prostate carcinoma." *J Biol Chem* 280(11): 9963-72.
- Zhang, C., Y. Cai, M. T. Adachi, S. Oshiro, T. Aso, R. J. Kaufman and S. Kitajima (2001). "Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response." *J Biol Chem* 276(38): 35867-74.
- Zhang, J. X., I. Braakman, K. E. Matlack and A. Helenius (1997). "Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations." *Mol Biol Cell* 8(10): 1943-54.
- Zhang, L., N. Yang, D. Katsaros, W. Huang, J. W. Park, S. Fracchioli, C. Vezzani, I. A. Rigault de la Longrais, W. Yao, S. C. Rubin and G. Coukos (2003). "The oncogene phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha promotes angiogenesis via vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma." *Cancer Res* 63(14): 4225-31.
- Zhang, L., D. Yu, M. Hu, S. Xiong, A. Lang, L. M. Ellis and R. E. Pollock (2000). "Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression." *Cancer Res* 60(13): 3655-61.
- Zhang, P., B. McGrath, S. Li, A. Frank, F. Zambito, J. Reinert, M. Gannon, K. Ma, K. McNaughton and D. R. Cavener (2002). "The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas." *Mol Cell Biol* 22(11): 3864-74.
- Zhou, G., R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. Fenyk-Melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doebber, N. Fujii, N. Musi, M. F. Hirshman, L. J. Goodyear and D. E. Moller (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." *J Clin Invest* 108(8): 1167-74.
- Zhu, C., F. E. Johansen and R. Prywes (1997). "Interaction of ATF6 and serum response factor." *Mol Cell Biol* 17(9): 4957-66.

- Ziegler, A., M. von Kienlin, M. Decorps and C. Remy (2001). "High glycolytic activity in rat glioma demonstrated in vivo by correlation peak <sup>1</sup>H magnetic resonance imaging." *Cancer Res* 61(14): 5595-600.
- Zinszner, H., M. Kuroda, X. Wang, N. Batchvarova, R. T. Lightfoot, H. Remotti, J. L. Stevens and D. Ron (1998). "CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum." *Genes Dev* 12(7): 982-95.
- Zong, W. X., C. Li, G. Hatzivassiliou, T. Lindsten, Q. C. Yu, J. Yuan and C. B. Thompson (2003). "Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis." *J Cell Biol* 162(1): 59-69.



## Résumé

Dans les tumeurs solides, les cellules soumises à des conditions ischémiques induisent des voies de signalisation distinctes contribuant à la commutation angiogénique et au développement tumoral. La composante hypoxique de l'ischémie induit l'expression du VEGF-A par la voie de signalisation dépendante de HIF-1. Par contre, la contribution des carences en glucose ou en glutamine est peu connue. En utilisant un milieu sans sérum, nous montrons que l'activation et la signalisation dépendante d'IRE1 sont des événements liant les réponses dépendantes de l'hypoxie et des carences en glucose à la surexpression du VEGF-A dans divers modèles cellulaires. Des cellules tumorales exprimant un dominant négatif de IRE1 et des cellules MEF IRE1<sup>-/-</sup> n'induisent pas l'expression du VEGF-A en conditions d'hypoxie ou de carences en glucose. Ces stress mènent à l'induction du VEGF-A par des mécanismes en partie distincts. Ces données sont corrélées avec une réduction de l'angiogenèse et de la croissance tumorale *in vivo* et démontrent le rôle essentiel joué par IRE1 en réponse à l'ischémie. En absence de glutamine, les ARNm du VEGF-A sont surexprimés indépendamment de l'accumulation des protéines HIF et de la transcription des gènes dépendants de la réponse UPR. De plus, l'expression protéique du VEGF-A est diminuée en corrélation avec la réduction de la synthèse protéique globale. Ces résultats suggèrent que les carences en glutamine n'ont aucun effet sur le processus angiogénique induit par le VEGF-A dans certaines tumeurs. Nous avons également recherché l'implication des carences en glutamine et en glucose dans les réponses métaboliques des cellules tumorales. Ces stress augmentent rapidement le processus d'apoptose, d'une manière plus importante en absence de glutamine qu'en absence de glucose. La spectrométrie FTIR a permis d'évaluer le statut métabolique des cellules tumorales ischémiques et a corrélié leur phénotype hyper-glycolytique avec leur statut prolifératif et agressif.

**Mots clés :** angiogenèse, UPR (« Unfolded Protein Response »), cellules tumorales, carences en glucose/glutamine, hypoxie, VEGF-A, IRE1, HIF, FTIR, culture cellulaire sans sérum.

### **Tumoral ischemia and angiogenesis : effects of glucose and amino acids deprivations on VEGF-A expression by tumor cells. Implication of the Unfolded Protein Response**

In solid tumors, cells subjected to ischemic conditions trigger distinct signaling pathways which contribute to the angiogenic switch and tumor development. The hypoxic component of ischemia leads to the expression of VEGF-A by the HIF-1-dependent signaling pathways. Alternatively, the contribution of glucose or glutamine deprivation is still not well understood. Using a serum-free medium, we demonstrate that IRE1 activation and signaling is a common molecular determinant linking hypoxia- and hypoglycemia-dependent responses to the upregulation of VEGF-A in various cell models. Indeed, tumor cells expressing a dominant negative IRE1 transgene as well as IRE1<sup>-/-</sup> MEF were unable to trigger VEGF-A upregulation upon either hypoxic or glucose deprivation conditions. We showed that these various cellular stresses lead to the induction of VEGF-A by partly distinct mechanisms. These data correlated with a reduction of tumor angiogenesis and growth *in vivo* and demonstrated the essential role played by IRE1 in response to tumor ischemia. Under glutamine deprivation, VEGF-A mRNA was up-regulated and this effect was neither associated to HIF proteins accumulation nor to the transcriptional induction of UPR-dependent genes. Besides, VEGF-A protein expression was down-regulated in correlation to the global decrease of protein synthesis. These results suggested that amino-acids deprivation has no effect on the VEGF-A-driven angiogenic process in a number of tumors. We then questioned the implication of glucose and glutamine deprivations in the metabolic responses of tumor cells. This stress rapidly increase the apoptotic response of the cells, and to a much greater extent in the absence of glutamine than under glucose deprivation. FTIR spectrometry was used to evaluate the metabolic status of tumor cells and correlated the hyper-glycolytic phenotype with their proliferative and aggressive status.

**Key words:** angiogenesis, UPR (« Unfolded Protein Response »), tumor cells, glucose/glutamine deprivation, hypoxia, VEGF-A, IRE1, HIF, FTIR, serum-free cell culture.