



Contributions à l'étude de la réponse moléculaire à l'hypoxie : Modélisation mathématique et expérimentations sur cellules FUCCI

Baptiste Bedessem

► **To cite this version:**

Baptiste Bedessem. Contributions à l'étude de la réponse moléculaire à l'hypoxie : Modélisation mathématique et expérimentations sur cellules FUCCI. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. <NNT : 2015GREAS024>. <tel-01318127>

HAL Id: tel-01318127

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01318127>

Submitted on 19 May 2016

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Modèles, méthodes et algorithmes pour le
Biologie, la santé et l'environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Baptiste Bedessem

Thèse dirigée par **Angélique Stéphanou**

préparée au sein du **Laboratoire TIMC-IMAG**
et de **l'École Doctorale pour l'Ingénierie pour la Santé, la
Cognition et l'Environnement**

Contributions à l'étude de la réponse moléculaire à l'hypoxie Modélisation mathématique et expérimentations sur cellules FUCCI

Thèse soutenue publiquement le **23 octobre 2015**
devant le jury composé de :

Mme Carine Michiels Professeure à l'Institut de Recherche pour les
Sciences de la Vie de Namur (Rapporteuse)

Mr Olivier Saut

Directeur de Recherche au CNRS de Bordeaux (Rapporteur)

Mme Annabelle Ballesta

Maître de Conférence des Universités, Université de Warwick
(Examinatrice)

Mr Xavier Ronot

Professeur à l'EPHE (Président du Jury)

Mme Angélique Stéphanou

Chargée de recherche au CNRS de Grenoble, Directrice de thèse



Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Résumé | 7 |
| 1 Introduction | 9 |
| 2 Etat de l'art et motivations | 13 |
| 2.1 Cycle cellulaire | 13 |
| 2.1.1 Généralités : phases et points de contrôle | 13 |
| 2.1.2 Acteurs moléculaires | 14 |
| 2.1.3 Régulation de l'activité des couples cycline/CDK | 16 |
| 2.1.4 Points de contrôle | 17 |
| 2.2 HIF-1 α : rôles et régulation | 18 |
| 2.2.1 Effets de HIF-1 α à l'échelle moléculaire | 18 |
| 2.2.2 Interactions avec le cycle cellulaire | 20 |
| 2.2.3 Liens avec la carcinogenèse | 21 |
| 2.2.4 Régulation de HIF-1 α : aspects biologiques | 21 |
| 2.2.5 Régulation de HIF-1 α : modèles mathématiques | 23 |
| 2.3 Les molécules inductrices de HIF-1 α | 24 |
| 2.4 Les cellules FUCCI : un outil pour explorer la dynamique du cycle cellulaire | 25 |
| 2.4.1 Les outils d'étude du cycle | 25 |
| 2.4.2 Les cellules FUCCI : bases biologiques | 26 |
| 2.4.3 Utilisation des cellules FUCCI | 28 |
| 2.5 Démarche de la thèse | 30 |
| 3 Hypoxie et cycle cellulaire : approche mathématique | 33 |
| 3.1 Introduction | 33 |
| 3.1.1 Modélisation du cycle cellulaire | 33 |
| 3.1.2 Hypoxie et cycle cellulaire | 34 |
| 3.1.3 Le modèle d'Alarcon | 35 |
| 3.2 Un modèle plus complet | 36 |
| 3.2.1 Démarche | 36 |
| 3.2.2 Article : Bedessem B. and Stéphanou A., <i>A mathematical model of HIF-1-mediated response to hypoxia on the G1/S transition</i> , Mathematical Biosciences, 2014, 248 :31-9 | 37 |
| 3.3 Conclusion | 55 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4 | Hypoxie et cycle cellulaire : approche expérimentale | 57 |
| 4.1 | Introduction | 57 |
| 4.1.1 | Cadre de l'étude | 57 |
| 4.1.2 | Méthode | 58 |
| 4.2 | Etude des effet de DFO et CoCl_2 sur le cycle cellulaire | 59 |
| 4.2.1 | Article : B.Bedessem, M-P.Montmasson, M. Hamel, F.Giroud, A.Stéphanou, <i>Effects of the hypoxia-mimetic agents DFO and CoCl_2 on HeLa-FUCCI cells</i> , Journal of Cell Biology and Cell Metabolism, 2015 | 59 |
| 4.2.2 | Conclusion | 72 |
| 4.3 | Récupération après blocage en phase G_2 | 74 |
| 4.4 | Effets de la réoxygénation | 76 |
| 4.5 | Conclusion | 79 |
| 5 | Régulation de HIF-1α | 81 |
| 5.1 | Introduction | 81 |
| 5.1.1 | Compartimentation de HIF-1 α : aspects biologiques | 81 |
| 5.1.2 | Les effets de la réoxygénation | 83 |
| 5.1.3 | Modèles existants pour la régulation de HIF-1 α | 84 |
| 5.2 | Un modèle compartimenté pour la régulation de HIF-1 α | 85 |
| 5.2.1 | Démarche et principaux résultats obtenus | 85 |
| 5.2.2 | Article : Bedessem B. and Stéphanou A., <i>Role of compartmentalization on HIF-1 degradation dynamics during changing oxygen conditions : a computational approach</i> , Plos One, 2014, 9(10) | 86 |
| 5.2.3 | Conclusion | 109 |
| 5.3 | Comment la réoxygénation peut-elle induire l'apoptose? | 110 |
| 5.3.1 | Les interconnexions des voies hypoxiques et apoptotiques : la relation <i>yin-yang</i> | 111 |
| 5.3.2 | Formulation du modèle <i>yin-yang</i> | 112 |
| 5.3.3 | Résultats | 114 |
| 5.4 | Localisation de HIF-1 α et cycle cellulaire | 116 |
| 5.4.1 | Introduction | 116 |
| 5.4.2 | Méthode | 116 |
| 5.4.3 | Résultats | 120 |
| 5.5 | Conclusion | 121 |
| 6 | Conclusion générale | 123 |
| | Bibliographie | 127 |
| A | Acquisition des images en microscopie | 147 |
| B | Traitement des images | 151 |
| C | Protocole d'immunomarquage de HiF-1α | 155 |

- D** Article scientifique : Bedessem B. and Ruphy S., *SMT or TOFT? How the two main theories of carcinogenesis were made (artificially) incompatible*, Acta Biotheoretica, 2015 157

Résumé

Les effets biologiques de l'hypoxie sont très étudiés aujourd'hui, principalement en raison du rôle crucial que jouent les conditions d'oxygénation dans le développement des cancers. Depuis plusieurs années, une littérature foisonnante tente ainsi de décrire les multiples aspects de la réponse moléculaire, cellulaire et physiologique à l'hypoxie. La complexité des voies de signalisation impliquées et la diversité de leurs effets cellulaires rendent la tâche délicate. Cet état de fait se reflète dans la pluralité des méthodes utilisées, depuis les simulations numériques jusqu'aux approches expérimentales. Dans cette thèse, j'ai abordé ce sujet sur la base de deux outils : la modélisation mathématique et une démarche expérimentale utilisant les cellules HeLa-FUCCI. Cette lignée cellulaire récemment développée est en effet un instrument de choix encore peu exploité. Par une construction génétique liant des protéines du cycle cellulaire à un fluorophore, elle rend possible l'étude, en continue, de la dynamique du cycle en microscopie de fluorescence. Nous avons ainsi pu analyser plusieurs aspects de la réponse cellulaire à l'hypoxie, dans un contexte tumoral. Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser mathématiquement les liens tissés entre le cycle cellulaire et les voies de signalisation de l'hypoxie, centrées sur le facteur de transcription HIF-1 α . Ce modèle propose une explication simple à l'arrêt du cycle observé notamment dans les cellules tumorales en conditions hypoxiques. Nous avons ainsi montré que l'induction de chimiorésistance pouvait se concevoir comme une entrée facilitée en quiescence des cellules cancéreuses. Dans le but de valider ces observations, nous avons ensuite cherché à quantifier expérimentalement la dynamique de la prolifération cellulaire en utilisant les cellules HeLa-FUCCI. Comme il est apparu que les fluorophores qu'elles portent sont sensibles au manque d'oxygène, nous avons testé différentes molécules couramment utilisées pour induire HIF-1 α et mimer l'hypoxie (DFO et CoCl₂). De cette étude ont émergé des résultats originaux quant à la dynamique de blocage du cycle des cellules HeLa en présence de chélateurs du fer. Si les conditions hypoxiques ne sont pas favorables à l'utilisation des cellules FUCCI, nous avons pu en revanche montrer qu'elles étaient tout à fait adaptées à l'étude de la dynamique du cycle cellulaire en condition de réoxygénation. De manière intéressante, nous avons alors pu observer un ralentissement significatif de la phase S après retour à la normoxie. Afin d'apporter un éclairage théorique à cette observation, nous avons proposé un modèle mathématique de la dynamique de régulation de HIF-1 α en conditions d'oxygène fluctuantes, basé sur le couple HIF-1 α /pVHL, dont les relations sont pensées dans un cadre compartimenté (noyau/cytoplasme). Ce modèle simple reproduit fidèlement les caractéristiques principales de la réponse cellulaire à l'hypoxie. En outre, en simulant les conséquences d'une réoxygénation brutale, nous avons observé la genèse

de fortes instabilités du niveau intracellulaire de HIF-1 α . Enfin, nous avons mené une étude expérimentale de la compartimentation de HIF-1 α . L'outil FUCCI permet en effet d'observer simultanément l'avancement du cycle (en microscopie de fluorescence), et la localisation intra-cellulaire de HIF-1 α (par immunomarquage). Nous avons pu montrer que la variabilité de la localisation de HIF-1 α n'était pas due à la progression dans le cycle. Elle est donc certainement liée soit à des différences génétiques inter-cellulaire, soit à une stochasticité de la régulation de HIF-1 α .

1

Introduction

Au sein d'un organisme vivant, l'hypoxie peut se définir comme une inadéquation entre les besoins tissulaires, et les apports effectifs en oxygène. La pression d'oxygène limite induisant les voies moléculaire de réponse à hypoxie est ainsi relative au type cellulaire considéré : 15% dans le cerveau, 6% dans le foie et les reins [1]. *In vitro*, il est d'usage d'imposer des pressions en oxygène (P_{O_2}) inférieures à 2% O_2 pour étudier les effets biologiques de l'hypoxie [2]. Les nombreux travaux sur le sujet ont reporté une grande variété de réponses cellulaires au manque d'oxygène. D'une part, des P_{O_2} inférieures à 1% peuvent induire un arrêt du cycle. Ce dernier se manifeste souvent dans la transition G_1/S [3], mais des blocages en phase G_2 ou M ont également été reportés [4]. Lorsque l'hypoxie est extrême (proche de l'anoxie), une induction des voies de l'apoptose dépendantes de p53 a souvent été observée [5–8]. D'autre part, la privation d'oxygène peut également avoir un effet inverse, en promouvant la prolifération cellulaire [9–12].

L'étude des effets biologiques de l'hypoxie est rendue cruciale de part le rôle que joue la privation d'oxygène dans les cancers. En effet, à cause de leur croissance rapide, les tumeurs subissent une hypoxie chronique [3]. Cette dernière est associée à l'émergence de phénotypes agressifs et résistants [13, 14]. Pour certains auteurs, comme Anderson et *al.* (2006) [15], l'hypoxie peut ainsi être vue comme une force sélective favorisant le développement, au sein de la masse tumorale, de marges invasives. De manière générale, l'hypoxie chronique est considérée comme l'un des principaux facteurs d'échec des thérapies anti-cancéreuses [16]. Plusieurs mécanismes, que nous détaillerons dans le chapitre suivant, sont ici à l'œuvre : baisse de la production de radicaux libres en radiothérapie, entrée en quiescence des cellules, sélection de phénotypes résistants... Outre cette privation constitutive d'oxygène, les tissus cancéreux sont soumis à une hypoxie cyclique, due à l'évolution de l'architecture du système vasculaire [17]. La période de ces cycles peut varier de quelques minutes à plusieurs heures ou jours. Des études récentes ont montré que cette hypoxie intermittente favorisait fortement l'émergence et

la sélection de phénotypes tumoraux résistants et invasifs [18, 19]. Plusieurs mécanismes semblent à l'œuvre. D'une part, chaque cycle tend à augmenter la fréquence des mutations cellulaires [20]. D'autre part, la réoxygénation tend à affecter sélectivement plus de 200 gènes [21]. Il faut également noter que ces phénomènes de réoxygénation jouent aussi un rôle important dans les cas d'ischémie. Notamment, la reperfusion brutale suivant une rupture de l'approvisionnement sanguin génère des vagues d'apoptose causant de gros dommages tissulaires [22, 23].

Les implications médicales de ces réponses cellulaires à l'hypoxie ont rendu cruciale la compréhension des voies moléculaires qui les sous-tendent. La découverte de l'agent central de la réponse cellulaire à l'hypoxie, le facteur de transcription HIF-1, remonte au début des années 90. Elle est associée à l'équipe de Gregg L. Semenza. Cette dernière a en effet mis en évidence l'existence d'une séquence génétique présente sur les promoteurs de différents gènes exprimés sous l'effet de l'hypoxie : le HRE (*Hypoxia Responsive Element*) [24]. Ce HRE a ainsi été identifié en aval du gène de l'EPO, une hormone stimulant la prolifération des érythrocytes [25], puis d'enzymes glycolytiques [26, 27]. La structure de la protéine se liant au HRE a été établie dans l'étude de Wang et *al.* (1995) [28]. Il s'agit d'un hétérodimère, que les auteurs nommèrent HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor-1*). Ce dernier est constitué d'une sous-unité α (HIF-1 α), dont la stabilité dépend de la pression en oxygène, et d'une sous-unité β (HIF-1 β), exprimée de manière constitutive [29]. Il se lie à l'ADN *via* un motif hélice-tour-hélice. La sous-unité α contient un domaine responsable de sa dégradation en présence d'oxygène (ODDD : Oxygen-Dependent Degradation Domain) [30]. Bien que cette thèse soit centrée sur le facteur HIF-1, et spécialement sur sa sous-unité α , il convient de noter ici que deux autres protéines peuvent s'associer avec HIF-1 β et médier la réponse cellulaire à l'hypoxie : HIF-2 α et HIF-3 α . HIF-2 α a été identifiée en 1997, indépendamment des travaux de Semenza [31]. Initialement, la protéine est apparue comme exprimée de manière plus restreinte que HIF-1 α . Notamment, sa présence semble limitée aux cellules constitutives des vaisseaux sanguins. Cependant, des observations plus récentes suggèrent un panorama plus complexe des relations entre HIF-1 et HIF-2 α . Ces dernières sont en effet co-exprimées dans un grand nombre de types cellulaires [29]. Une troisième sous-unité α a été décrite, HIF-3 α . [32]. Ses rôles sont moins connus. Il semble que plusieurs isoformes de cette protéine existent, qui peuvent promouvoir ou inhiber l'activités des autres facteurs de transcription HIF [32].

La figure 1.1 donne une représentation en trois dimensions de la protéine HIF-1 α . Cette dernière est intensivement étudiée aujourd'hui, en tant qu'agent clé de la réponse cellulaire à l'hypoxie.

Lorsque la pression en oxygène diminue, son niveau intracellulaire augmente en suivant une loi exponentielle bien caractérisée expérimentalement. La figure 1.2 donne la courbe, tracée par Jiang et *al.* (1996) [33], représentant l'activité génétique de HIF-1 en fonction de l'intensité de l'hypoxie. Les auteurs ont quantifié, *via* une série d'électrophorèses sur gel de polyacrylamide, la quantité de facteur de transcription liée à l'ADN dans des cellules HeLa, dans différentes conditions d'hypoxie. Il apparaît que l'abondance nucléaire de HIF-1 augmente rapidement pour des pressions d'oxygènes inférieures à 1%. Ce comportement, qui a plus tard été qualifié de "switch-like", est

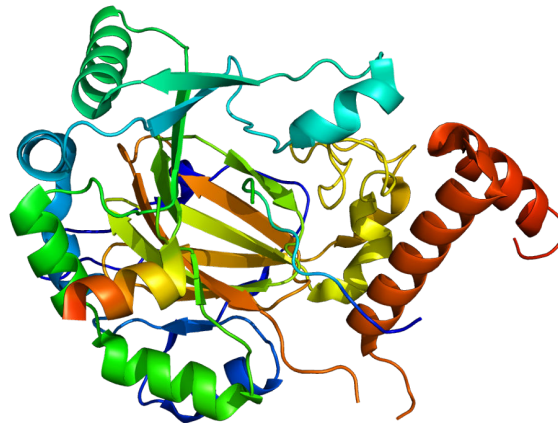


FIGURE 1.1: Structure de la sous-unité α du facteur de transcription HIF-1.

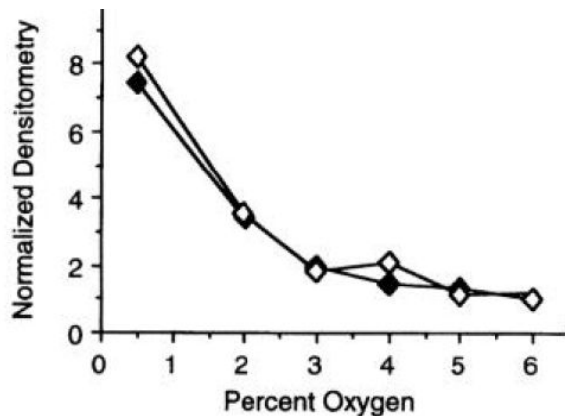


FIGURE 1.2: Abondance protéique de HIF-1 en fonction de la pression en oxygène. Les mesures ont été faites en densitométrie, à partir d'électrophorèse sur gel SDS-Page (Western-Blot). Les losanges noirs correspondent à une expérience réalisée en présence de KCN.

principalement dû à la stabilisation de HIF-1 α en absence d'oxygène [34]. Cette sous-unité peut ensuite se dimériser avec HIF-1 β pour former un facteur de transcription actif.

La connaissance des mécanismes d'action et des voies de régulation de HIF-1, et en particulier de sa sous-unité α , est motivée par le rôle important joué par la protéine dans la tumorigenèse. En effet, elle est sur-exprimée dans la plupart des types de cancer [35–38]. Parallèlement, on constate une forte expression des gènes contrôlés par le facteur de transcription [39]. Deux causes ont été invoquées pour expliquer cette observation [35]. D'une part, comme nous l'avons vu, l'hypoxie chronique à laquelle sont soumises les cellules tumorales induit logiquement une accumulation de HIF-1 α . D'autre part, des mutations génétiques peuvent également induire une dérégulation de sa concentration en normoxie. Par exemple, certains cancers se caractérisent par une perte de fonctionnalité de la protéine pVHL, impliquée dans le système de dégradation oxygène-dépendant de HIF-1 α [40]. De fait, les liens tissés entre HIF-1 et la tumorigenèse sont intensivement étudiés depuis plusieurs années [6, 41, 42]. La protéine HIF-1 α est d'ailleurs devenue une cible pour des traitements anti-cancer novateurs, cherchant notamment à diminuer l'activité de HIF-1 α . [43].

Dans ce cadre, la compréhension fine de la réponse cellulaire à l'hypoxie est

évidemment cruciale. Si de grands progrès ont été faits sur le sujet ces dernières années, la dynamique actuelle des recherches dans ce domaine est à la hauteur de la complexité du problème. De nombreuses questions se posent. Parmi elles, les mécanismes de régulation de HIF-1 α et les relations entre le facteur de transcription et les protéines du cycle cellulaire font l'objet d'études expérimentales, et, de plus en plus, de travaux de modélisation. D'autre part, les effets de la réoxygénation, en lien avec l'hypoxie cyclique à laquelle sont soumises les tumeurs, sont encore peu compris. Enfin, l'utilisation d'inducteurs chimiques de HIF-1 α , notamment les chélateurs du fer, ouvre une voie intéressante du point de vue de la mise en place de traitements anti-cancéreux. L'étude de leurs effets biologiques est là aussi un domaine de recherche très actif. Cette thèse se propose d'apporter quelques contributions à ces questions contemporaines, en couplant modélisation mathématique et expérimentation sur cellules HeLa-FUCCI.

2

Etat de l'art et motivations

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté le cadre général dans lequel s'inscrit cette thèse. Ici, nous désirons brosser un portrait un peu plus détaillé de l'état des connaissances portant sur le contrôle du niveau moléculaire de HIF-1 α et son interaction avec le cycle cellulaire. De cette manière, nous clarifierons les questions ayant motivé la conduite de ce travail, et les démarches adoptées pour y répondre. Après un bref rappel portant sur la biologie de la prolifération cellulaire, notre propos s'attachera à décrire les grands traits de la régulation de HIF-1 α , et son interaction avec les protéines du cycle. Nous préciserons notamment les caractéristiques des modèles mathématiques existants, et les questions qu'ils soulèvent. Nous aborderons ensuite le problème des molécules induisant HIF-1 α , comme DFO ou CoCl₂. Celles-ci sont en effet utilisées de manière très répandue dans le but de mimer les conséquences biologiques de l'hypoxie, bien que la diversité de leurs cibles moléculaires induise une variabilité importante de leurs effets biologiques. Nous nous attarderons enfin sur le modèle expérimental que constitue la lignée HeLa-FUCCI, de manière à mettre en valeur l'intérêt que présente son utilisation pour l'étude de la dynamique de la prolifération.

2.1 Cycle cellulaire

2.1.1 Généralités : phases et points de contrôle

La connaissance des mécanismes moléculaires de la régulation du cycle cellulaire a fait d'immenses progrès depuis une vingtaine d'années. Les premières études ont été menées sur deux espèces de levure : *Saccharomyces Cerevisiae* et *Saccharomyces Pombe*. Elles ont permis d'identifier les principaux agents protéiques contrôlant la prolifération cellulaire. Plus tard, il est apparu que le système de régulation était très conservé entre les espèces, bien que plus complexe chez les eucaryotes pluricellulaires. Ici, nous nous

concentrons sur la régulation du cycle chez l'homme. Avant d'entrer dans le détail de voies complexes de son contrôle, nous rappelons ici quelques généralités. Une cellule en division passe par quatre phases distinctes, nommées G_1 , S, G_2 , et M. Une dernière étape, la cytotélière, assure la séparation des cytoplasmes des deux cellules filles. La figure 2.1 donne une représentation schématique de l'enchaînement des phases du cycle, et de ses points de contrôle. La première phase, dite G_1 , est une phase de croissance. La cellule augmente son volume et synthétise un grand nombre de protéines nécessaires à sa division. Durant la phase S, l'ADN est répliqué, de manière à fournir à chaque cellule fille l'intégralité du patrimoine génétique. La phase G_2 est dédiée à l'achèvement de la croissance, au contrôle de la qualité de la duplication de l'ADN, et à la préparation de la mitose. Cette dernière (phase M) voit l'avènement de deux cellules filles à partir de la cellule initiale. Les chromosomes doubles se répartissent en deux lots (à peu près) identiques, et le cytoplasme se divise (cytotélière). La durée totale du cycle est très variable d'un type cellulaire à l'autre. Pour un fibroblaste humain en culture, les durées typiques sont de 12h pour la phase G_1 , 5h pour la phase S, 4h pour la phase G_2 , et une heure pour la phase M. Dans un organisme, ces valeurs sont évidemment hautement dépendantes de la fonction cellulaire. Les cellules spécialisées (produisant des hormones, conduisant l'influx nerveux...) ne se divisent pas. On dit qu'elles sont en phase *quiescente*, ou G_0 . A l'inverse, les cellules souches chargées de la régénération des tissus se divisent en continue, comme dans l'épithélium intestinal.

Comme le montre la figure 2.1, le cycle cellulaire est jalonné de *points de contrôle*. Ils en régulent la progression, en bloquant à des moments précis l'avancée des cellules jugées inaptes à le poursuivre. Le premier point de contrôle se situe à la transition entre les phases G_1 et S. Il bloque la progression des cellules lorsque leur taille n'est pas suffisante, ou lorsque l'ADN est en mauvais état. De nombreux agents externes peuvent ici intervenir, notamment le manque de facteurs de croissance, un stress nutritionnel, ou encore, comme nous le verrons, l'hypoxie. Le passage de la phase G_2 à M est également contrôlé, afin de garantir la réplification correcte de l'ADN. Enfin, le contrôle du fuseau mitotique permet de bloquer la mitose (phase M) si les conditions d'une séparation correcte des chromatides ne sont pas réunies.

Comment sont régulés ces points de contrôle? Quelles sont les protéines clés intervenant dans la progression du cycle? La figure 2.2 introduit le couple cycline/CDK (CDK=Cycline-Dependent Kinase). Ces complexes protéiques s'accumulent dans la cellule au cours des différentes phases du cycle, et leur activité détermine le passage des points de contrôle. Nous allons maintenant étudier plus en détail la dynamique de régulation de ces agents.

2.1.2 Acteurs moléculaires

Les CDK sont des enzymes de type kinase. Elles activent de multiples cibles par phosphorylation. Par ce biais, elles agissent sur la synthèse et/ou l'activité des protéines nécessaires à la progression du cycle : enzymes de synthèse de l'ADN, fuseau de microtubules, enzymes métaboliques... Pour être actives, les CDK doivent, d'une part, former un complexe avec une cycline donnée, et d'autre part, être phosphorylées sur un résidu thréonine proche de son site actif (Thréonine 160). La phosphorylation sur

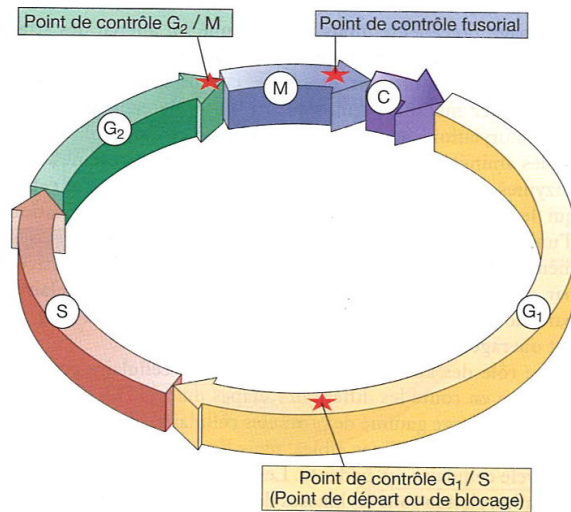


FIGURE 2.1: Représentation schématique des différentes phases du cycle cellulaire (G_1 , S, G_2 , M, et cytotodiérèse) et de ses points de contrôle

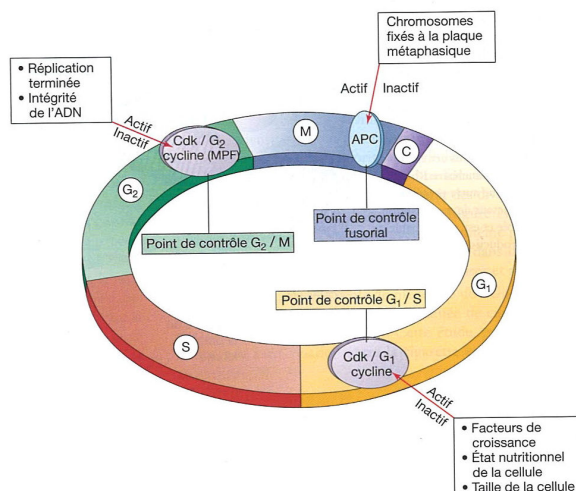


FIGURE 2.2: Points de contrôle du cycle, et principales protéines régulatrices

d'autres résidus entraîne à l'inverse une inhibition de l'activité enzymatique de la CDK. La figure 2.5 schématise un couple cycline/CDK actif. De nombreux types de CDK ont été recensés (11 chez l'homme). De même, il existe au moins une dizaine de cyclines, dont la fonction est, pour plusieurs d'entre elles, inconnue à ce jour. Chaque phase du cycle est caractérisée par l'augmentation de l'activité d'un couple cycline/CDK donné. La figure 2.4 donne l'évolution de cette activité enzymatique au cours du cycle. Le passage des différents points de contrôle requiert une accumulation suffisante de la cycline/CDK correspondante. Cette idée sera reprise et illustrée plus tard dans la thèse, notamment dans l'élaboration de notre modèle de transition G_1/S en hypoxie. Comment est régulée cette activité des complexes cycline/CDK ?

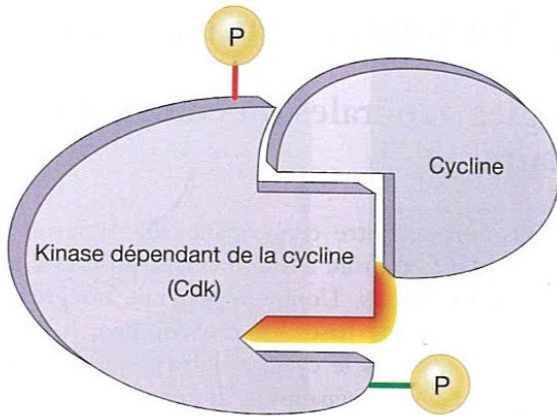


FIGURE 2.3: Complexe cycline/cdk. Pour être actifs, les CDK doivent être liés à une cycline, et porter un groupement phosphate sur une thréonine située à proximité du site actif (thréonine 160, en vert). Une phosphorylation supplémentaire sur une sérine ou une thréonine peut inhiber son activité (en rouge).

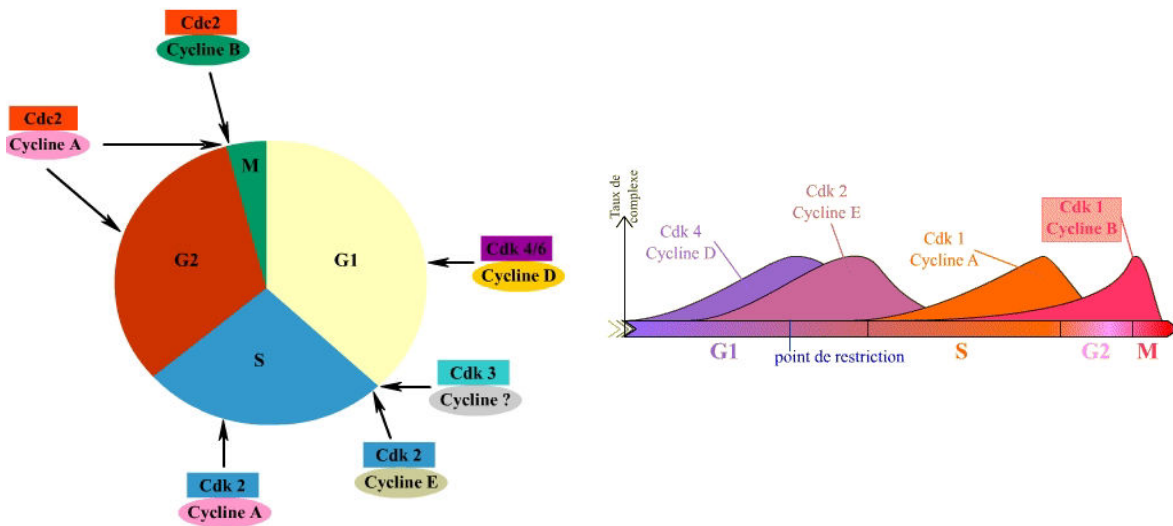


FIGURE 2.4: Rôle des complexes cycline/cdk. La progression dans le cycle est permise par un ensemble de couples cycline/CDK, spécifiques de chaque phase. Notamment, le passage des points de contrôle est possible lorsque l'activité du complexe correspondant est suffisante (à gauche). On peut ainsi représenter schématiquement, comme ci-dessus (à droite), les variations d'activité des différents complexes cycline/cdk au cours du cycle.

2.1.3 Régulation de l'activité des couples cycline/CDK

L'activité des couples cyclines/CDK est régulée par plusieurs mécanismes. Premièrement, l'équilibre phosphorylation/déphosphorylation des CDK modifie leur activité enzymatique. La phosphorylation activatrice (proche du site actif) des CDK est assurée par une protéine nommée CAK (CDK-activating Kinase). D'autres protéines kinases peuvent inhiber l'activité des CDK en les phosphorylant sur un autre site : c'est le cas de la protéine kinase Wee1. A l'inverse, la phosphatase CDC25 (CDC pour Cell Division Cycle) supprime le groupement phosphate inhibiteur et active le complexe cycline/CDK. La figure 2.5 schématise ces différentes interactions. Deuxièmement, un groupe de protéines nommées CDKi (CDK-inhibitors) inactive les complexes cycline/CDK en interagissant avec eux. Deux familles de molécules peuvent jouer ce

rôle. Les protéines CIP/KIP (CDK-Interacting Proteins/Kinase Inhibitory Proteins) se fixent sur les complexes cycline/CDK et inhibent leur activité kinase. C'est le cas notamment des protéines p21, p27, p57. D'autre part, les protéines de la famille INK4, incluant les protéines p14 et p16, empêchent la formation des complexes cycline/CDK. La figure 2.6 représente quelques unes des nombreuses interactions entre les complexes cycline/CDK et leurs inhibiteurs (CKI) et activateurs (CDC25). Enfin, un troisième mécanisme assure la régulation de l'activité des complexes cycline/CDK : la dégradation des cyclines. Une des particularités de ces protéines, et qui leur vaut leur nom, est de voir leur niveau intracellulaire varier au cours du cycle. Ainsi, la cycline D s'accumule en phase G_1 et disparaît en phase S, la cycline E est présente lors de la transition G_1/S , la cycline B entre la phase G_2 et la mitose... Un des mécanismes guidant ces fluctuations est l'adressage des cyclines au protéasome par ubiquitination. Cette modification chimique est assurée par des complexes protéiques comportant notamment des ligases E-3, ajoutant des groupements ubiquitine aux cyclines. Ces complexes sont activés séquentiellement au cours du cycle. Par exemple, le groupement APC (Anaphase Promoting Complex) dégrade les cyclines lors de l'entrée en mitose, et SCF contrôle la transition G_1/S en dégradant notamment la cycline E. La figure 2.7 donne une représentation schématique de ces mécanismes. Cette dégradation séquentielle des cyclines est essentielle à la progression dans le cycle.

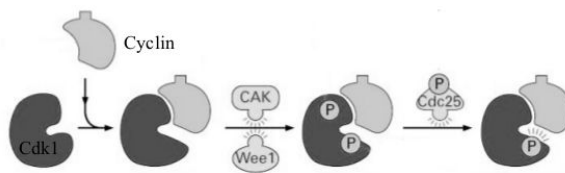


FIGURE 2.5: Dynamique d'activation/inhibition de CDK1 par phosphorylation. La protéine activatrice CAK phosphoryle la CDK sur la threonine 160, ce qui l'active. Des protéines inhibitrices, comme wee1, inhibent l'activité des cdk en phosphorylant les enzymes sur la thréonine 14 ou 15. Ce phosphate peut être retiré par une protéine activatrice, la CDC25.

2.1.4 Points de contrôle

Nous donnerons, dans la suite de ce manuscrit, une description plus complète des événements moléculaires permettant l'entrée en phase S, et de la manière dont certaines contraintes environnementales (en l'occurrence, l'hypoxie) jouent sur ce point de contrôle. Nous nous contenterons donc, pour le moment, et en guise d'exemple, de donner une description rapide du mécanisme moléculaire présidant à la transition G_1/S . Ce dernier est illustré sur la figure 2.8. Un facteur externe, typiquement un facteur de croissance, active le couple cycline D/CDK4. Cette dernière phosphoryle la protéine Rb, ce qui libère le facteur de transcription E2F. Ce dernier stimule ensuite l'expression de nombreuses protéines, dont les enzymes de réplication de l'ADN, et la cycline E. Celle-ci forme un complexe avec la CDK2, et libère à son tour E2F, créant une boucle de rétroaction positive. Lorsque l'activité des cyclines est suffisante, la cellule passe le point de contrôle et rentre irréversiblement en phase S.

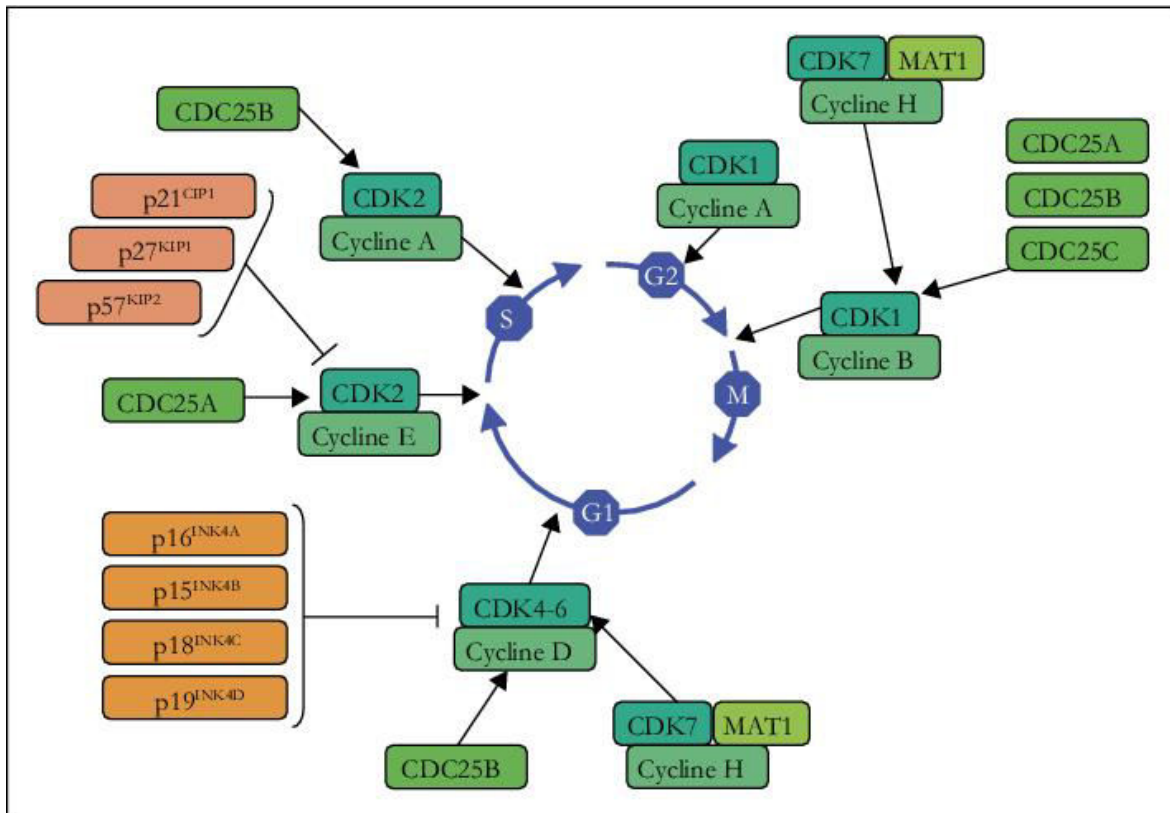


FIGURE 2.6: Représentation schématique des interactions entre quelques agents du cycle cellulaire. Les complexes cycline/CDK permettent la progression dans le cycle. Leur activité est régulée positivement ou négativement par différentes familles de protéines. Les CDC25 (phosphatases) activent les CDK par déphosphorylation. La famille CIP/KIP inhibe les complexes cycline/CDK en s'y liant, et la famille INK empêche leur formation.

Cette transition G_1/S peut être influencée par des facteurs externes, comme, par exemple, la détection de dommages à l'ADN. La protéine p53 peut alors soit initier l'apoptose, soit activer les voies de réparation de l'ADN et arrêter le cycle en phase G_1 . Pour ce faire, elle induit la synthèse de la protéine p21, une CKI inhibant l'activité du complexe cycline E/CDK2. La cellule ne peut alors plus franchir le point de contrôle, et reste bloquée en phase G_1 .

2.2 HIF-1 α : rôles et régulation

2.2.1 Effets de HIF-1 α à l'échelle moléculaire

Le facteur de transcription HIF-1 est un modulateur puissant de l'expression génétique. Il influe sur l'expression d'environ 1% des gènes chez l'homme [2]. Premièrement, HIF-1 conduit un changement métabolique, en favorisant la glycolyse par rapport à la respiration mitochondriale. Pour ce faire, il stimule l'expression de transporteurs du glucose (Glut-1), et des enzymes du métabolisme glycolytique [24, 44]. HIF-1 inhibe également

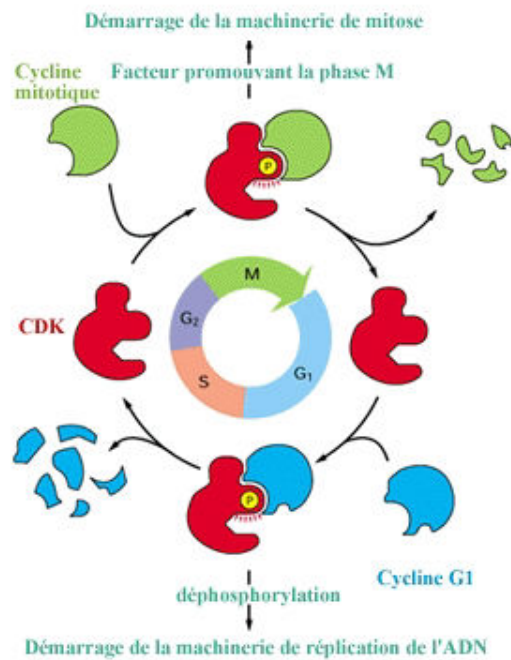


FIGURE 2.7: Mécanisme de régulation du cycle par dégradation des cyclines. Des complexes contenant la ligase E3 ubiquitinent les cyclines au cours du cycle, ce qui induit leur dégradation par le protéasome

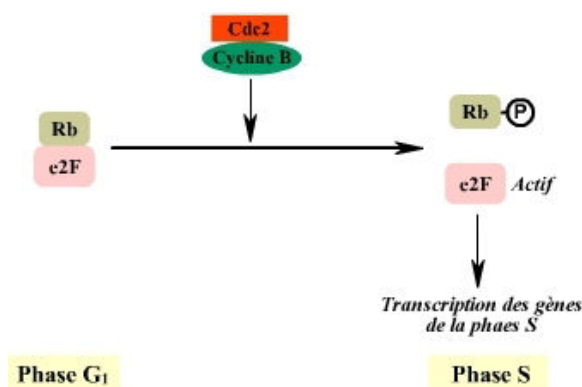


FIGURE 2.8: Représentation schématique des événements moléculaires de la transition G₁/S.

l'activité mitochondriale en induisant la synthèse de la Pyruvate Déshydrogénase Kinase 1 (PDK1) [44]. Deuxièmement, le facteur de transcription HIF-1 stimule la synthèse de divers facteurs angiogéniques, tels que le VEGF [24]. Dans les cellules productrices des globules rouge, il stimule également l'expression de l'EPO, ainsi que de protéines impliquées dans le métabolisme du fer (transferrine) [24]. Enfin, HIF-1 est impliquée dans un réseau complexe de régulation de la prolifération et de l'apoptose. Il semble en effet que la protéine puisse être pro-apoptotique ou anti-apoptotique, selon le type de cellule et les conditions environnementales [45]. La revue de littérature présentée par Sermeus et *al.* (2011) [46] permet de faire le point sur l'ensemble des interactions connues entre HIF-1 et les réseaux liés à l'apoptose. Les auteurs en dressent un bilan qu'ils expriment en terme de balance apoptose/survie (figure 2.9). Lorsque HIF-1 domine, la cellule tend à résister à l'apoptose, voire à proliférer. Lorsque p53 prend le dessus, elle entre en apoptose.

Moléculairement, cet équilibre est alors régulé par un réseau complexe d'interactions, encore mal comprises, impliquant HIF-1 et les voies de l'apoptose : p53 [46],

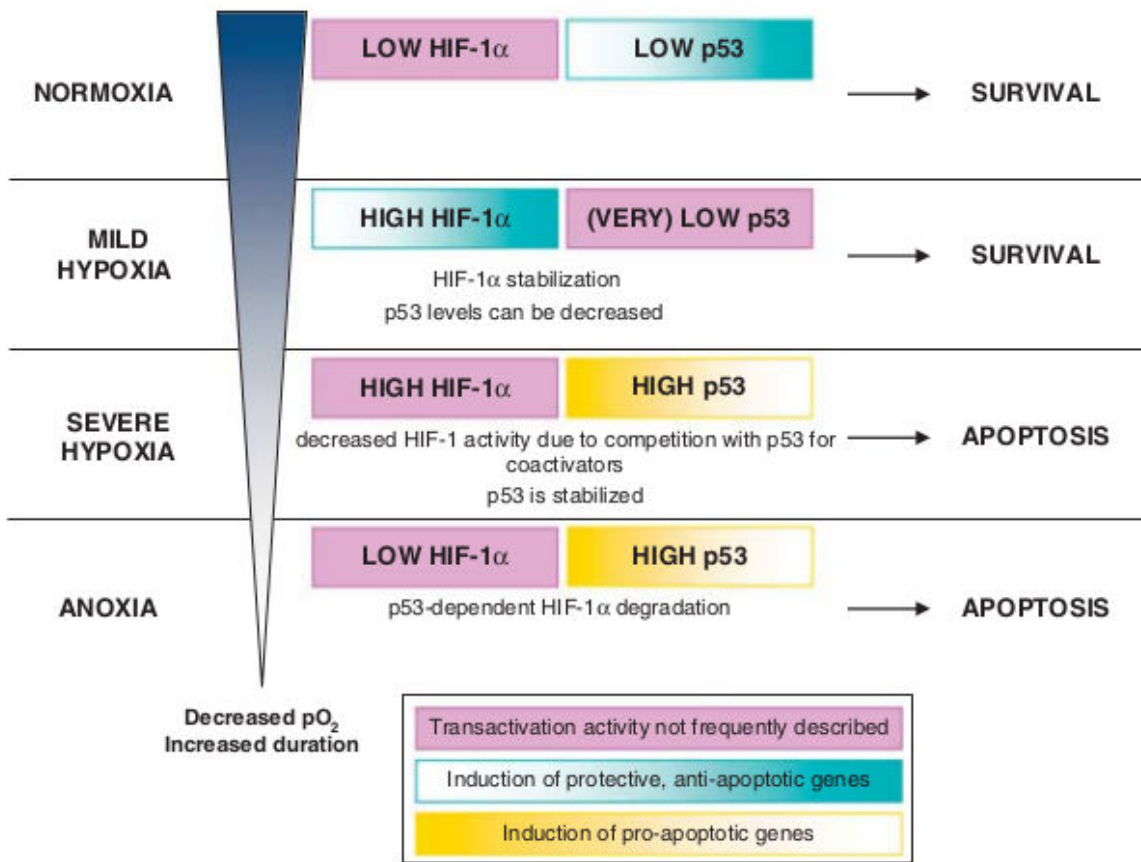


FIGURE 2.9: Equilibre survie/apoptose en fonction de l'intensité de l'épisode hypoxique. La transition entre un phénotype survie/prolifération et un phénotype arrêt du cycle/apoptose dépend, selon ce modèle, de l'équilibre entre p53 et HIF-1 α . Tiré de Sermeus et *al.* [46]

famille Bcl-2 [2] etc.

2.2.2 Interactions avec le cycle cellulaire

Outre l'équilibre survie/apoptose, HIF-1 influe sur l'équilibre prolifération/arrêt du cycle. Comme nous l'avons noté en introduction, la facteur de transcription est en effet connu pour influencer positivement ou négativement sur la dynamique du cycle cellulaire. A l'échelle moléculaire, il apparaît que HIF-1 stimule la synthèse de facteurs de croissance. D'autre part, la protéine interagit de manière complexe avec les protéines du cycle. Elle inhibe notamment la transition G₁/S, *via* une diminution de l'activité de la cycline E [47–49]. Il est possible que cette action sur le cycline E passe par l'activation d'inhibiteurs de cyclines, comme les protéines p21 ou p27 [3, 47, 50]. Alarcon et *al.* (2004) [49] ont mis au point un modèle de la transition G₁/S en hypoxie utilisant ce dernier résultat. Les auteurs utilisent en outre ce modèle afin d'expliquer l'entrée en quiescence facilitée des cellules tumorales sous hypoxie. Or, l'activation de p27 en hypoxie est controversée; en conséquence, son lien avec l'arrêt du cycle en phase G₁ l'est tout autant [6, 51]. Ce modèle de la dynamique du point de contrôle précédant la

phase S n'est donc pas totalement satisfaisant. En revanche, l'action inhibitrice de HIF-1 α sur la cycline D est bien attestée [52, 53]. Un modèle plus satisfaisant et général de l'effet de HIF-1 α sur le cycle cellulaire, et en particulier sur la transition G₁/S devrait donc prendre en compte cette observation expérimentale.

2.2.3 Liens avec la carcinogénèse

La recension des gènes cibles de HIF-1 α donne des indications sur le rôle du facteur de transcription dans la tumorigénèse. Comme nous l'avons noté en introduction, HIF-1 α est sur-exprimé dans la plupart des cancers, soit par l'effet de mutations dérégulant sa dégradation, soit du fait du micro-environnement tumoral. De fait, les protéines induites par HIF-1 α sont présentes en grande quantité dans les cellules tumorales [39]. La revue de littérature réalisée par Kunz et *al.* (2003) [14] recense quelques effets moléculaires de HIF-1 α favorables à la tumorigénèse. Ainsi, l'activation des voies angiogéniques est favorable à la croissance cancéreuse, puisque la néo-vascularisation permet d'augmenter l'apport de nutriments aux cellules. D'autre part, en favorisant le passage d'un métabolisme aérobie à un métabolisme glycolytique, HIF-1 participe à la mise en place des caractéristiques classiques des cellules tumorales. Kunz et *al.* (2003) [14] notent aussi l'influence possible de HIF-1 sur les liens entre les cellules et la matrice extra-cellulaire. Notamment, en diminuant l'expression de E-cadherine, HIF-1 limite la stabilité tissulaire, et favorise donc la prolifération cellulaire. Cette prolifération est aussi favorisée par l'activation de facteurs mitogènes, liés à la famille MAPK. La sur-expression de HIF-1 α dans les tumeurs favorise aussi la synthèse de protéines anti-apoptotiques, comme Bcl-xL [54], ou Mdm2 [55]. D'autres auteurs, comme Alarcon et *al.* (2004) [49], ont également noté que les cellules cancéreuses semblent entrer plus facilement en quiescence sous hypoxie que les cellules saines. Cette entrée en quiescence soustrait les cellules à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques, et limite donc l'efficacité des thérapies [56]. D'autre part, l'hypoxie intermittente est également connue pour favoriser la sélection de phénotypes résistants et invasifs [18, 19]. Notamment, la fréquence des mutations cellulaires augmente avec le nombre de cycles [20]. En outre, plus de 200 gènes sont induits spécifiquement par l'hypoxie cyclique [21].

2.2.4 Régulation de HIF-1 α : aspects biologiques

Induction de HIF-1 α en hypoxie

Comme nous l'avons noté en introduction, HIF-1 α s'accumule de manière significative dans la cellule lorsque la pression d'oxygène dans la cellule passe sous la barre des 1% [33]. La cinétique de cette induction est bien connue. Le niveau de la protéine augmente rapidement, pour atteindre un maximum après un laps de temps variant de 1 à 5 heures selon le tissu considéré [1]. Puis, la concentration cellulaire de HIF-1 α diminue progressivement, jusqu'à rejoindre un niveau d'équilibre [57, 58]. La figure 2.10 donne un exemple de mesure expérimentale de l'évolution de l'abondance de HIF-1 α , réalisée par Kamat et *al.* (2007) [57]. Les auteurs suivent par western blot l'évolution de l'abondance de HIF-1 α dans des cellules MCF-7 soumises à un épisode hypoxique. Une

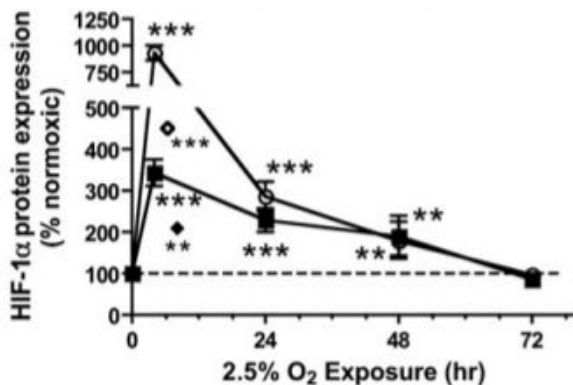


FIGURE 2.10: Cinétique d'accumulation de HIF-1 α lors d'un épisode hypoxique. Les différentes courbes correspondent à des types cellulaires distincts. Tiré de Kamat et *al.* (2007) [57].

fois stabilisé, HIF-1 α se dimérise avec HIF-1 β pour générer un facteur de transcription actif.

Effets moléculaires de la réoxygénation

Les effets de la réoxygénation sur la concentration de HIF-1 α et de ses gènes cibles sont bien étudiés depuis quelques années. Comme nous l'avons souligné en introduction, à l'échelle cellulaire, la réoxygénation est connue pour induire l'apoptose. Wang et al. (2012) [59] ont montré que cette apoptose induite par le retour brutal à la normoxie était due à HIF-1 α . De manière plus générale, l'étude de Martinive et *al.* (2009) [60] démontre que le cycle hypoxie/réoxygénation amplifie l'accumulation de HIF-1 α par rapport à un simple épisode hypoxique. Ce résultat confirme les études par Yuan et al. (2008) [61] et Dewhirst et al. (2007) [62]. L'étude de Conde et *al.* (2012) [23] montre, d'autre part, l'existence d'une instabilité de son abondance cellulaire après la fin d'un épisode hypoxique. Le niveau de la protéine baisse rapidement, puis augmente pour atteindre un niveau maximal 3h plus tard, similaire à celui observé dans une situation d'hypoxie. Ces auteurs ont également mis en évidence la sur-expression de gènes dépendant de HIF-1, codant des protéines telles que le VEGF, l'EPO ou les PHD. De même, Luo et al. (2010) [63] ont démontré que la protéine MICA, dont la synthèse est placée sous le contrôle de HIF-1, est fortement induite par la réoxygénation, suggérant une forte activité du facteur de transcription suite au retour à la normoxie. D'une manière plus générale, il a été mis en évidence que la réoxygénation induisait l'expression de plus de 200 gènes spécifiques [21]. Il existe donc une réponse spécifique du niveau et de l'activité de HIF-1 α à la réoxygénation. Afin de tenter de comprendre ces données expérimentales, il apparaît nécessaire de se pencher sur les mécanismes moléculaires de la régulation de HIF-1 α .

Mécanismes de régulation du niveau de HIF-1 α

Les premiers résultats donnant des indications sur les mécanismes de régulation de HIF-1 α datent de l'étude de Maxwell et *al.* (1999) [64]. Leurs auteurs ont montré qu'en normoxie, HIF-1 α et la protéine pVHL interagissent, et que cette interaction était nécessaire à la dégradation du facteur de transcription par le protéasome. Depuis, la compréhension des mécanismes de régulation de HIF-1 α s'est considérablement affinée.

Cavadas *et al.* (2013) [34] ont récemment dressé un bilan des connaissances sur le réseau moléculaire en jeu. La figure 2.11 en donne une première vue simplifiée. La base de la régulation repose sur l'activité d'enzymes, les PHDs (Prolyl-Hydroxylase Domain). Celles-ci sont activées en présence d'oxygène ; elles hydroxylent alors la protéine HIF-1 α . Cette modification chimique conduit à la formation d'un complexe avec pVHL, ce qui mène à son ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome. En hypoxie, l'action des PHDs est réduite, et HIF-1 α s'accumule dans la cellule. La protéine peut alors s'associer à l'unité β , synthétisée de manière constitutive, pour former le facteur de transcription HIF-1. En outre, il a été montré que l'hydroxylation de HIF-1 α par une autre d'enzyme (FIH : Factor Inhibiting HIF-1) limitait sa liaison au complexe p300/CSB, ce qui inhibe son activité génétique. La figure 2.12 donne un aperçu plus précis des réactions biochimiques en jeu. Elle met ainsi en évidence l'existence de nombreuses rétroactions. Notamment, les gènes codant pour les PHDs sont porteurs d'un HRE (HIF-1 Responsive Element). En conséquence, leur expression est stimulée par HIF-1, ce qui conduit à une rétroaction négative sur le facteur de transcription. Ce schéma présente également le mérite de spatialiser la dynamique de la régulation. Celle-ci affiche en effet une compartimentation noyau/cytoplasme. HIF-1 peut être dégradée dans les deux espaces [65], et transiter de l'un à l'autre [66].

Notons qu'outre cette régulation du niveau de HIF-1 α , l'action du facteur de transcription HIF-1 peut également être modulée en jouant sur la liaison des sous-unités α et β [67], ou sur l'intervention de protéines nécessaires à son activité génétique [34]. D'autre part, HIF-1 α n'est pas la seule protéine capable de s'associer à HIF-1 β . Des protéines de séquence proches, HIF-2 α et HIF-3 α jouent également un rôle dans la réponse cellulaire à l'hypoxie [24, 29]. Cependant, dans cette thèse, nous négligerons ces aspects, et nous concentrerons principalement sur la question du niveau intra-cellulaire de HIF-1 α .

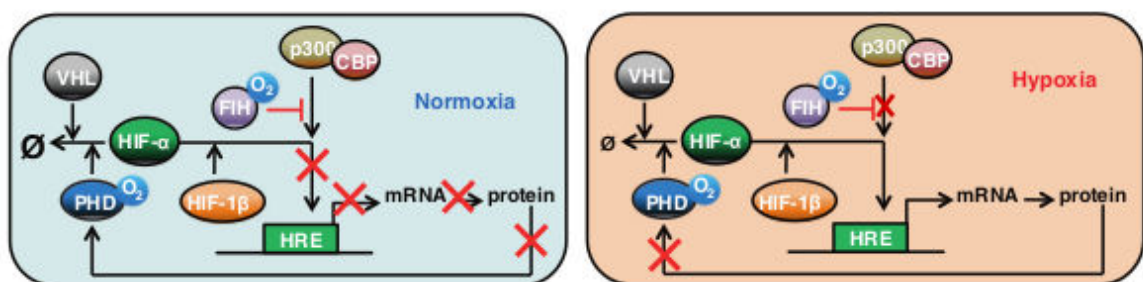


FIGURE 2.11: Représentation schématique de la régulation de HIF-1 α en normoxie (A) et en hypoxie (B). Tiré de Cavadas *et al.* (2013) [34]

2.2.5 Régulation de HIF-1 α : modèles mathématiques

Plusieurs modèles mathématiques décrivant la régulation moléculaire de la concentration et de l'activité de HIF-1 α ont été proposés. Ils cherchent à expliquer les principales caractéristiques de l'accumulation de la protéine dans des conditions d'hypoxie [34]. Les premiers travaux en ce sens ont été réalisés par Kohn *et al.* (2004) [68].

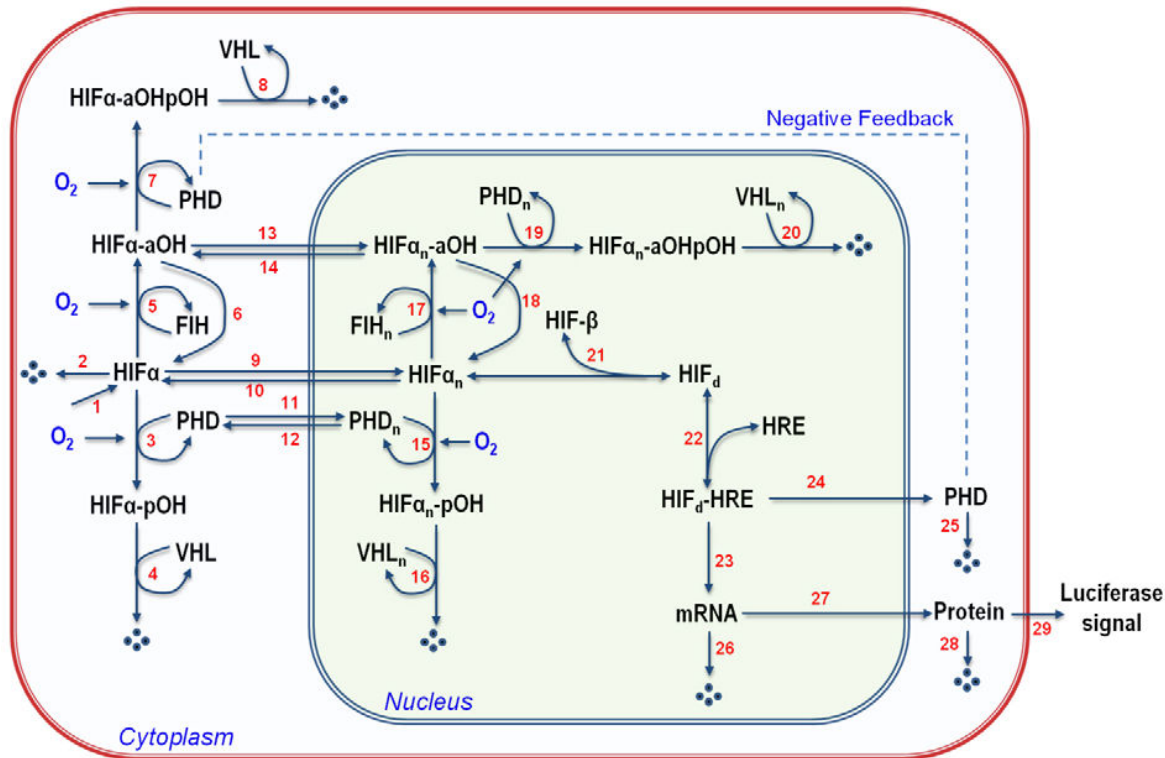


FIGURE 2.12: Biochimie de la régulation de HIF-1 α . Tiré de N'Guyen et *al.* (2013) [67]

Ils se centrent, dans la plupart des cas, sur l'action oxygène-dépendante des PHDs. Différentes boucles de rétroactions sont prises en compte dans ces travaux : synthèse de PHD sous contrôle de HIF-1 [68], inhibition des PHDs par le succinate [69]. Le modèle de N'Guyen et *al.* (2013) inclut en outre l'influence de l'enzyme FIH sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1 [67]. De manière générale, toutes ces démarches considèrent un grand nombre d'acteurs biomoléculaires pour obtenir des résultats biologiquement pertinents. L'identification des interactions moléculaires cruciales pour expliquer les observations expérimentales reste délicate. De fait, certains auteurs, comme Heiner et *al.* (2010) ont réalisé une analyse structurale, dans le but d'identifier les interactions responsables du comportement de type interrupteur (*switch-like*) et d'extraire ainsi le cœur du réseau moléculaire de régulation de HIF-1 α . Un des enjeux de la modélisation mathématique de la régulation de HIF-1 α est donc de mettre en œuvre une approche à la fois simple et satisfaisante du point de vue biologique. Un tel modèle devra en outre prendre en compte la compartimentation noyau/cytoplasme de la dégradation de HIF-1 α . Des études récentes, telle que celle menée par Moroz et *al.* (2009) [58] soulignent en effet l'importance de cette dynamique spatiale dans la régulation de la protéine.

2.3 Les molécules inductrices de HIF-1 α

Plusieurs molécules sont couramment utilisées pour mimer l'hypoxie en induisant l'accumulation de HIF-1 α . Parmi elles, on trouve le chlorure de cobalt (CoCl₂) ou la

desferrioxamine (DFO). Ces molécules sont largement utilisées pour les perturbations qu'elles induisent dans l'activité des protéines dépendantes du fer. Le Co remplace le fer dans son site de fixation, et le DFO est un chélateur du fer. Dans les deux cas, la dégradation de HIF-1 α est inhibée. En effet, l'hydroxylation de HIF-1 α se fait en présence de fer. Si ce dernier n'est pas disponible, HIF-1 α n'est pas ubiquitiné et s'accumule dans la cellule. Ces molécules sont également utilisées pour leurs effets anti-cancer, notamment *via* les blocages du cycle qu'elles induisent [70, 71]. D'une manière générale, si ces agents chimiques provoquent effectivement une augmentation du niveau d'expression intra-cellulaire de HIF-1 α , ils ont également de nombreux autres effets [72]. Notamment, ils sont connus pour induire l'apoptose [73] et l'arrêt du cycle cellulaire *via* des interactions complexes avec ses protéines régulatrices [71].

CoCl₂ et DFO sont certainement les molécules les plus utilisées pour simuler l'hypoxie [74]. En conséquence, leurs effets biologiques sont relativement bien étudiés. Elles promeuvent toutes les deux l'apoptose quand leur concentration est suffisamment haute [73, 75, 76]. Cependant, CoCl₂ semble induire une augmentation de la viabilité pendant les premières 6 à 8 heures de traitement [45, 77]. La prolifération cellulaire en présence de ces agents a été testée en utilisant différentes lignées. Dai et *al.* (2012) [75] ont montré qu'en présence de CoCl₂, la croissance des populations de cellules PC-2 était stimulée pendant 72h. Puis, une inhibition dépendante de la dose se manifeste, accompagnée d'une augmentation de la mort cellulaire. D'une manière plus générale, CoCl₂ et DFO sont connues pour inhiber la prolifération [74]. Cependant, leur influence précise sur le cycle cellulaire apparaît comme très variable. En présence de CoCl₂, plusieurs études reportent un arrêt en phase G₁ [74, 78], ou en phase G₂ [79]. Dans le cas de DFO, un grand nombre d'études concluent à un blocage en phase G₁ ou en phase S, selon la dose et le type cellulaire utilisé [74, 80–82]. Un article récent par Siriwardana et *al.* (2013) [83] a pu précisément différencier un arrêt en G₁ et un arrêt en S. En outre, certains auteurs ont noté l'existence d'un arrêt du cycle en phase G₂ [71, 84]. Clairement, les effets de DFO et de CoCl₂ sur le cycle dépendent donc étroitement de la concentration en agent chimique, du temps d'exposition, et de la lignée cellulaire utilisée. L'étude de leurs effets sur le cycle est loin d'être parfaitement comprise ; or, les propriétés anti-cancer de ces molécules rendent cette compréhension nécessaire pour la mise au point de thérapies novatrices.

2.4 Les cellules FUCCI : un outil pour explorer la dynamique du cycle cellulaire

2.4.1 Les outils d'étude du cycle

Une des techniques les plus classiques d'analyse du cycle cellulaire est offerte par la cytométrie en flux. Cette méthode permet d'étudier plusieurs caractéristiques physiques de cellules isolées entraînées par un flux liquide : taille, granularité, fluorescence. L'utilisation de la cytométrie pour la quantification de la dynamique de prolifération passe par un marquage des cellules permettant de différencier les phases du cycle. Une technique couramment utilisée est le marquage de l'ADN par une molécule se liant spécifiquement

à la double hélice (DAPI, Hoechst, Brdu...). La mesure du niveau de fluorescence permet alors de déterminer la phase du cycle dans laquelle se trouve chaque cellule. En G_0 et G_1 , on en a une quantité q ; en G_2 , $2q$, et en S, entre q et $2q$. En appliquant ce principe à une grande population de cellules, on peut arriver à déterminer la proportion de cellules dans les différentes phases du cycle.

Il est également possible d'analyser la dynamique de prolifération en imagerie biologique, par marquage de protéines caractéristiques d'une phase donnée. Par exemple, un marquage dirigé contre des cyclines permet de visualiser la progression du cycle cellule à cellule. A l'échelle d'une population, la suivie par western blot du contenu protéique (cycline, cdk...) permet d'obtenir des informations sur des modifications globales du cycle cellulaire. Cependant, aucune de ces techniques n'offre la possibilité d'une quantification précise de la dynamique de prolifération *in vivo* ou sur des cellules proliférantes.

2.4.2 Les cellules FUCCI : bases biologiques

Les cellules FUCCI (Fluorescent Ubiquitination-Based Cell Cycle Indicator) constituent une lignée cellulaire récemment créée à partir de cellules HeLa [85]. Ce système tire partie d'un couple de protéines oscillantes, la cdt1 et la geminine, couplées à des fluorophores (Kusabira Orange et Vert Azami). La figure 2.13 montre le réseau de régulation simplifié des protéines cdt1 et geminin. L'inhibition du complexe SCF en phase G_1 conduit à l'accumulation de cdt1. Puis, en phase S et G_2 , celle-ci est progressivement dégradée, et l'inhibition du complexe APC induit l'accumulation de geminine.

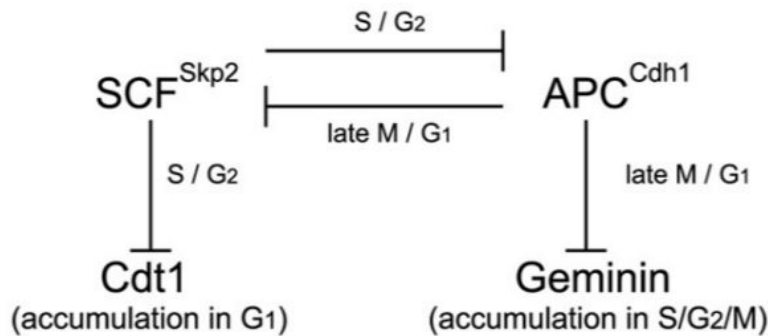


FIGURE 2.13: Schéma de régulation des protéines cdt1 et geminine au cours du cycle. Tiré de Sakaue-Sawano et *al.* (2008) [85]

Ces deux protéines sont donc de bon marqueurs oscillants permettant de discriminer les différentes phases du cycle. Une construction génétique, présentée sur la figure 2.14 permet alors de coupler la cdt1 avec le Kusabira Orange, fluorescent dans le rouge, et la geminine avec le Vert Azami, fluorescent dans le vert.

De ce fait, le cycle peut être suivi par la mesure de la fluorescence des noyaux cellulaires. La figure 2.15 illustre l'évolution parallèle des niveaux protéiques et de la fluorescence nucléaire au cours de la progression dans le cycle.

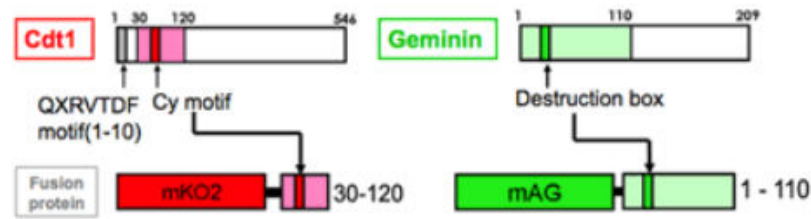


FIGURE 2.14: Construction génétique couplant la *cdt1* et la *geminine* au Kusabira Orange et au Vert Azami.

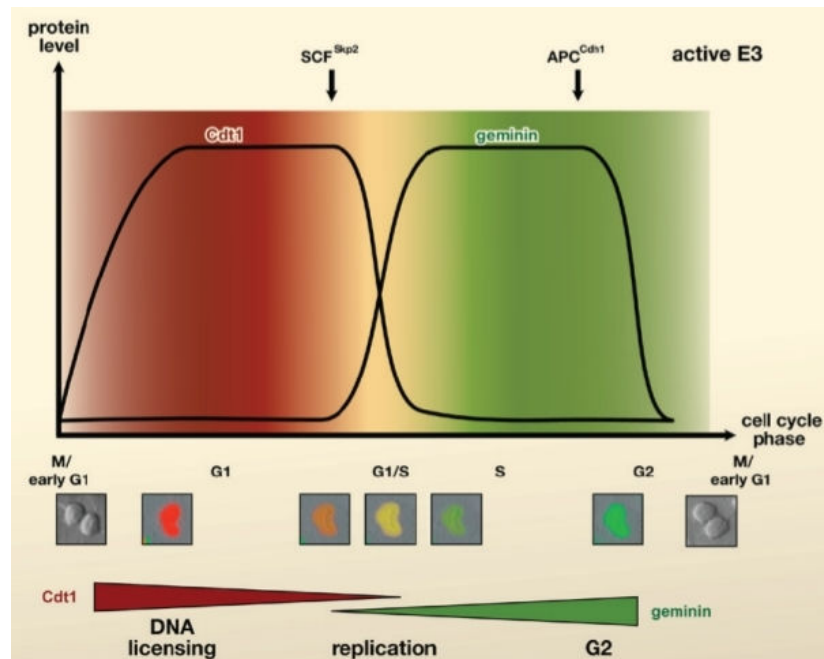


FIGURE 2.15: Evolution parallèle des niveaux protéiques (*cdt1* et *geminine*) et de la fluorescence nucléaire au cours du cycle cellulaire. Tiré de [86]

La figure 2.16 offre une autre représentation du lien entre la fluorescence et le cycle cellulaire : chaque phase est caractérisée par une émission particulière dans deux canaux (rouge et vert). Ainsi, la mesure de la fluorescence de chaque cellule doit permettre d’analyser la progression dans le cycle.

La figure 2.17 montre l’image en microscopie de fluorescence de deux champs d’une culture de cellules HeLa-FUCCI. Elle a été acquise suivant le protocole d’imagerie décrit dans l’annexe A. On distingue clairement les phases G_1 , S, G_2 et M. On note aussi la présence de cellules non-fluorescentes, qui sont en début de phase G_1 , ou non cyclantes. On les nomme, par commodité, G_0 . Le système FUCCI permet donc de quantifier précisément l’avancée dans la phase G_1 , ce que ne permettent pas de faire les méthodes de cytométrie en flux, comme le rappellent Carlier et *al.* (2014) [87].

Une autre spécificité des cellules HeLa-FUCCI est la possibilité d’imager la progression du cycle dans le temps. La figure 2.11 donne à voir l’évolution de la fluorescence dans le temps pour un champs donné. On y observe nettement plusieurs transitions

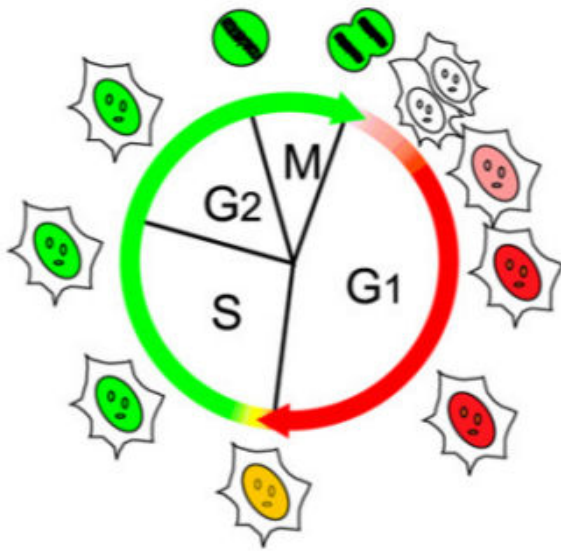


FIGURE 2.16: Fluorescence nucléaire des cellules Fucci et progression dans le cycle. Tiré de [85]

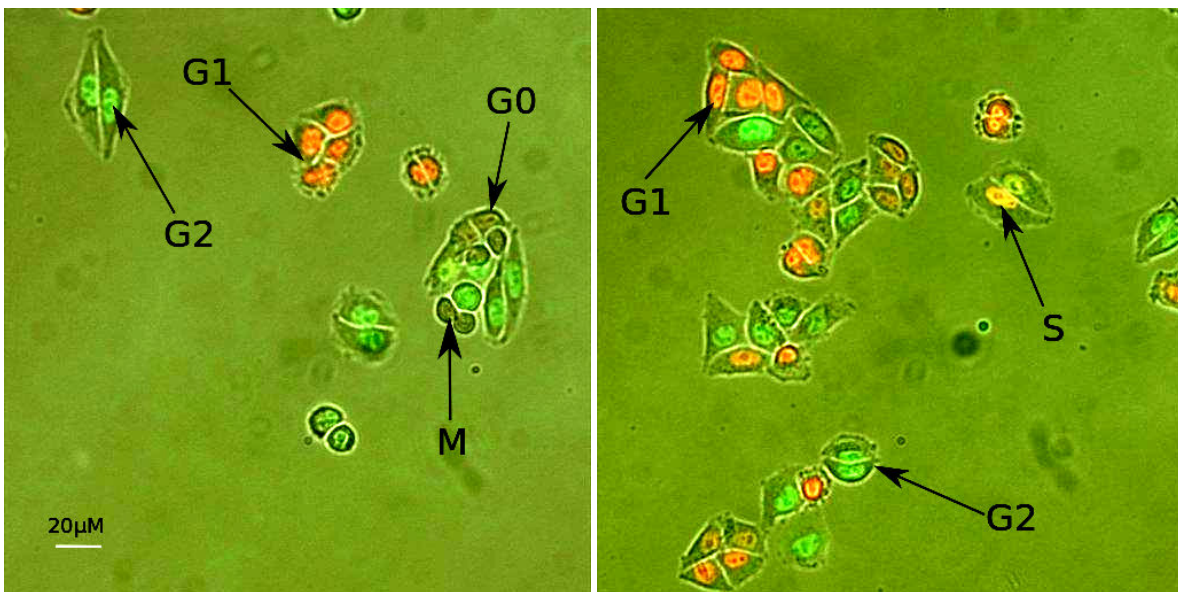


FIGURE 2.17: Imagerie de cellules HeLa-Fucci proliférantes réalisée en microscopie de fluorescence. La mesure de la fluorescence rouge (Texas Red) et verte (Alexa-Fluor 488) permet de différencier les phases du cycle cellulaire

G₁/S, S/G₂, G₂/M et M/G₁.

2.4.3 Utilisation des cellules Fucci

Bien qu'encore peu répandues, les cellules HeLa-Fucci ont été utilisées ces dernières années dans différentes études. Kaida et *al.* (2011) [88] s'appuient sur cette lignée cellulaire pour démontrer l'effet de drogues anti-tumorales sur le cycle cellulaire. Elles ont également été utilisées en biologie cellulaire, dans le cadre d'une étude sur la cycline I menée par Nagano et *al.* (2013) [89]. Le système Fucci a également été transposé sur

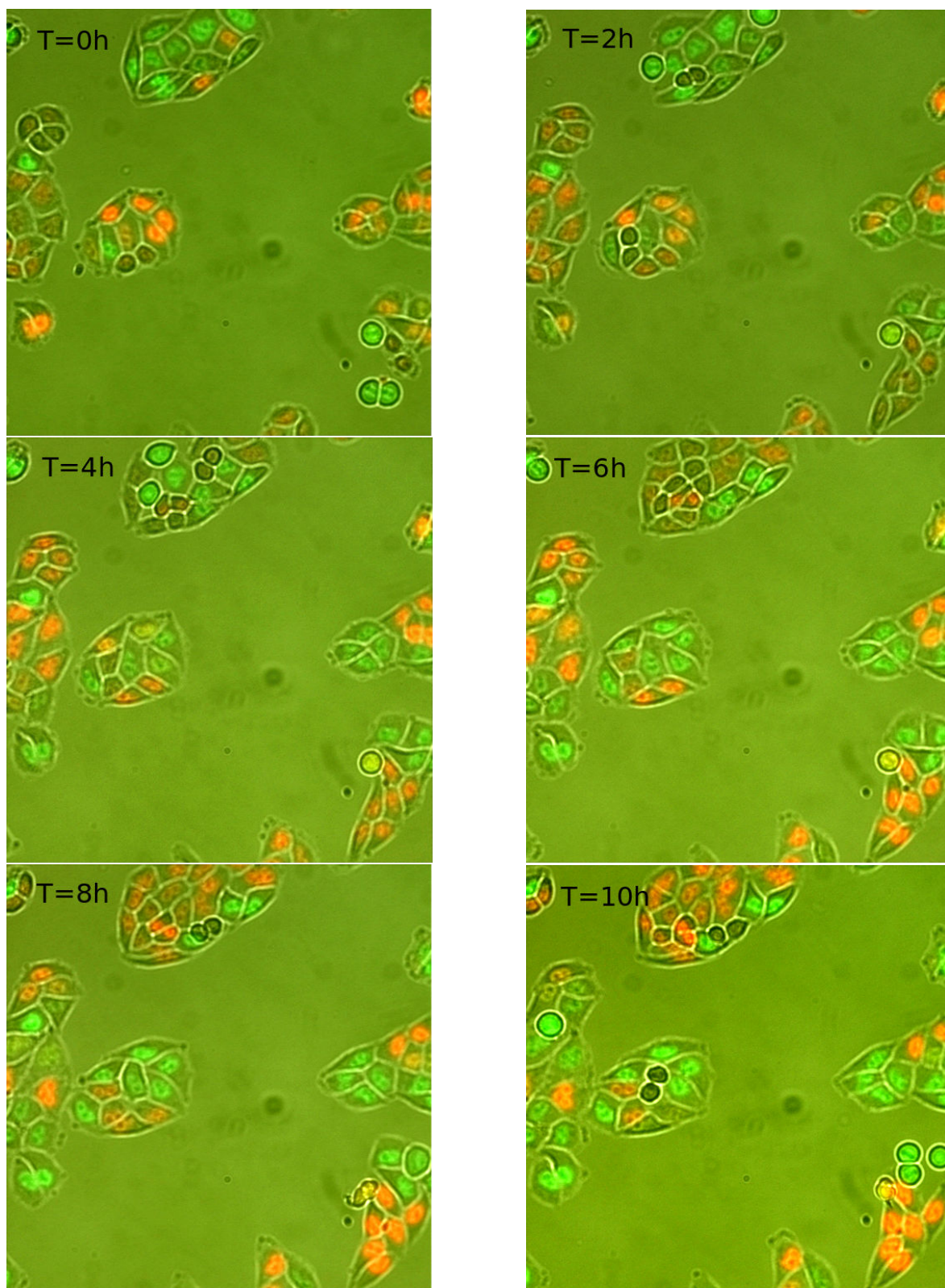


FIGURE 2.18: Evolution de la fluorescence de cellules HeLa-FUCCI au cours du temps, pendant 10h. Cette série d'images a été réalisée en microscopie de fluorescence, selon le protocole décrit dans l'annexe A

d'autres types de cellules. Carlier et *al.* (2014) [87] l'a ainsi mis en place sur des cellules pancréatiques β . Zieke et *al.* (2014) [90] l'ont intégré à différentes lignées cellulaires de drosophiles. Enfin, les cellules FUCCI sont prometteuses en tant qu'outil de quantification *in vivo* de la prolifération. Ainsi, Sugiyama et *al.* (2009) [91] ont pu mettre en place une lignée de zebrafish porteurs du système FUCCI. Cela leur a permis d'analyser la dynamique de prolifération lors du développement embryonnaire.

2.5 Démarche de la thèse

Cette thèse se propose d'apporter quelques contributions à l'étude de la réponse cellulaire à l'hypoxie, en utilisant des outils de modélisation mathématique et les potentialités expérimentales offertes par les cellules FUCCI. Dans un premiers temps, nous nous attacherons à établir un modèle de la transition G_1/S sous hypoxie. L'article que nous avons publié dans *Mathematical Biosciences* [92] servira de base à la présentation de ce travail. L'idée générale ayant guidé notre démarche repose sur une amélioration du modèle proposé par Alarcon et *al.* (2004) [49]. Nous avons notamment cherché à établir une description biologiquement plus adéquate des événements moléculaires à l'œuvre. En effet, comme nous l'avons vu, le travail d'Alarcon et *al.* présente plusieurs défauts conceptuels qui affectent son niveau de généralité et sa pertinence explicative, notamment concernant les spécificités des cellules tumorales face au stress hypoxique. Nous montrerons notamment comment l'inhibition de la cycline D par HIF-1 α permet de proposer un mécanisme pour le blocage du cycle d'une part, mais également pour l'émergence de résistances induites par l'hypoxie dans les cellules tumorales.

Dans un second temps, nous aborderons la question sous un angle expérimental. Le but sera alors de tester l'utilité des cellules FUCCI dans l'étude de la réponse cellulaire à l'hypoxie. Après avoir montré que la sensibilité des fluorophores à la pression d'oxygène rendait délicate l'analyse de la dynamique du cycle, nous avons choisi d'étudier l'effet de molécules chélatrices du fer, couramment utilisées comme inductrices de HIF-1 α , et donc comme molécules mimant l'hypoxie. Les résultats obtenus seront présentés au sein de l'article publié dans *Journal of Cell Biology and Cell Metabolism* [93]. Nous mettons notamment en évidence des effets originaux de $CoCl_2$ et DFO sur le cycle cellulaire des cellules HeLa-FUCCI. D'autre part, si l'étude de l'influence de l'hypoxie sur la dynamique de prolifération est délicate à mener, il est tout à fait possible d'analyser les effets de la réoxygénation. Le suivi de la fluorescence des cellules FUCCI après un cycle hypoxie/normoxie nous a permis de mettre en évidence un ralentissement de la phase S. Ce résultat éclaire les données de la littérature décrivant l'activation des voies de réparation de l'ADN lors d'un retour à la normoxie. Enfin, une révélation immunocytochimique de HIF-1 α , induite par DFO, a donné à voir une grande variabilité de la distribution intra-cellulaire du facteur de transcription. Or, comme nous l'avons noté précédemment, la compartimentation nucléo-cytoplasmique de HIF-1 α joue un rôle important dans sa régulation.

Cette dernière observation expérimentale, ainsi que celles obtenues en conditions de réoxygénation, nous a donc conduit à nous intéresser, dans un troisième temps, aux mécanismes de la régulation moléculaire de HIF-1 α . Cette dernière partie de la thèse

s'organise autour d'un article que nous avons publié dans *Plos One* [94]. Nous avons cherché à établir un modèle décrivant les aspects moléculaires du contrôle du niveau intra-cellulaire de HIF-1 α . Comme nous l'avons vu, les modèles existants utilisent un grand nombre d'acteurs moléculaires et de rétroactions pour parvenir à décrire les principales caractéristiques de la réponse moléculaire à l'hypoxie. Notre travail s'est placé dans une optique de minimisation des interactions, et dans un contexte de compartimentation de HIF-1 α . Notre modèle est ainsi centré sur deux acteurs principaux (pVHL et HIF-1 α), avec une boucle de rétroaction (synthèse de pVHL sous le contrôle de HIF-1 α). Ces deux molécules sont prises dans une navette nucléo-cytoplasmique. Nous montrons que cette description relativement simple explique les données expérimentales classiques concernant l'induction et la dégradation de HIF-1 α . D'autre part, nous avons pu simuler les effets de la réoxygénation, ce qui nous a permis de caractériser une instabilité de l'activité de HIF-1 α intéressante au regard des données expérimentales récentes. Enfin, nous avons complété cette troisième partie par une étude expérimentale de la compartimentation de HIF-1 α . Comme le système Fucci offre la possibilité d'étudier la dynamique du cycle cellule à cellule, en condition de prolifération, nous avons pu coupler les données de fluorescence (rouge et verte) à un marquage immunocytochimique dirigé contre HIF-1 α (révélation à la peroxydase). Par ce protocole, il a été possible d'obtenir, sur un grand nombre de cellules, à la fois les informations concernant le cycle cellulaire et la localisation nucléaire ou cytoplasmique du facteur de transcription. Nous avons ainsi pu rechercher une éventuelle corrélation entre ces deux variables. Il est apparu que la localisation de HIF-1 α n'était que très faiblement corrélée à la progression dans le cycle. Elle est donc certainement liée à une variabilité inter-cellulaire non connue à ce jour.

3

Hypoxie et cycle cellulaire : approche mathématique

3.1 Introduction

3.1.1 Modélisation du cycle cellulaire

Nous avons rappelé, dans l'introduction, quelques données de base concernant la connaissance de la régulation moléculaire du cycle cellulaire. Le nombre important d'acteurs engagés dans ce réseau, et les relations complexes de rétroactions qui les lient en font un domaine de choix pour les approches mathématiques. De fait, la modélisation du cycle cellulaire est un domaine phare de la biologie computationnelle depuis les années 1990. L'élucidation des voies de signalisation moléculaires contrôlant la dynamique de la prolifération ont servi de base à la formulation de nombreux modèles mathématiques. Comme noté dans la revue de Csikasz-Nagy (2009) [95], ces modèles tentent de reconstituer l'évolution temporelle du niveau intracellulaire des protéines du cycle. Pour ce faire, ils utilisent une série plus ou moins exhaustive d'Equations Différentielles Ordinaires décrivant les relations d'activation/inhibition tissées entre les différents acteurs du cycle : cyclines, CDCs, CDKs. L'accent est notamment mis sur la modélisation des transitions irréversibles, telles que la transition entre les phases G_1 et S du cycle. Les travaux de Novak et Tyson font référence sur ce point [96, 97]. La transition G_1/S y est traitée comme un changement brutal (*switch*) des niveaux d'expression d'une cycline et de son inhibiteur : la première dépasse un certain seuil et la seconde passe en dessous d'une concentration critique. La phase G_1 s'achève lorsque cet interrupteur moléculaire se déclenche. Notons ici que dans un souci d'allègement du texte, "cycline" réfère en réalité au complexe cycline/cdk, qui seul possède l'activité enzymatique.

Dans ce cadre, le cœur du cycle cellulaire est alors mû par un mécanisme de "switch"

moléculaire autorisant le passage d'une phase à la suivante [98]. En guise d'illustration, la description mathématique de la transition G₁/S que l'on trouve dans les travaux de Tyson et Novak peut se mettre sous la forme simplifiée suivante (voir Alarcon et *al* (2004) [49]) . Si x est le niveau d'expression de l'inhibiteur de cycline Cdh1/APC, y celle d'une cycline (E ou A), et m la masse de la cellule, on a :

$$\frac{dx}{dt} = \frac{(k_3 + k_4A)(1-x)}{J_3 + 1-x} - \frac{k_5myx}{J_4 + x} \quad (3.1)$$

$$\frac{dy}{dt} = k_1 - (k_2 + k_6x)y \quad (3.2)$$

$$\frac{dm}{dt} = \mu m \left(1 - \frac{m}{m_0}\right) \quad (3.3)$$

Les k_i quantifient des vitesses de réaction chimique, les J_i sont des constantes enzymatiques de type Michaelis-Menten, et A un activateur générique. m est la masse de la cellule, et m_0 sa masse à la fin du cycle. Dans ce cadre, le gain de masse active la progression du cycle. Le modèle complet de la transition G₁/S développé par Tyson et Novak [96] prend en compte d'autres activateurs de la synthèse des cyclines, tels que le facteur de transcription E2F, activé par la cycline D. Durant la progression dans la phase G₁, x diminue et y augmente. Lorsque ces deux variables atteignent des valeurs critiques, le "switch" moléculaire se manifeste par un changement brutal dans les concentrations protéiques, comme schématisé sur la figure 3.2. Cet événement permet le passage de la transition G₁/S.

3.1.2 Hypoxie et cycle cellulaire

L'intégration des facteurs environnementaux influençant la prolifération cellulaire est l'un des défis actuels de la modélisation mathématique du cycle cellulaire [95]. Cependant, peu prennent en compte les paramètres externes, tels que la température, les propriétés mécaniques du substrat, ou encore l'hypoxie. Or, comme nous l'avons vu en introduction, ce dernier facteur est crucial dans diverses conditions pathologiques. Notamment, les cellules tumorales sont soumises à une hypoxie chronique [14, 99]. Cette hypoxie induit des phénotypes plus agressifs, métastatiques et résistants [13, 54]. En particulier, si l'hypoxie tend à entraîner l'apoptose dans les cellules proliférantes saines, les cellules tumorales résistent à l'apoptose [13]. L'un des mécanismes pouvant expliquer ce phénomène est l'entrée dans un état quiescent, au sein duquel la cellule interrompt systématiquement son cycle de division [56, 100]. Cet état quiescent permet également à la cellule cancéreuse d'échapper aux effets de la chimiothérapie [56, 101, 102].

Afin d'appréhender le rôle de l'hypoxie dans la tumorigenèse, il est nécessaire de comprendre les connexions existant entre les voies de signalisation activées par le manque d'oxygène, et les réseaux moléculaires régulant le cycle cellulaire. Notamment, quels sont les mécanismes responsables du ralentissement ou de l'arrêt complet de la dynamique de prolifération ? Comment expliquer les différences observées dans les

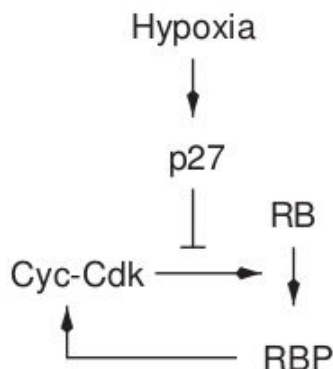


FIGURE 3.1: Représentation schématique du modèle proposé par Alarcon et *al.* (2004) pour la régulation de la transition G_1/S en conditions hypoxiques. Extrait de Alarcon et *al.* (2004), [49].

réponses à l'hypoxie entre les cellules saines et tumorales ? Plusieurs pistes ont été envisagées. Certaines impliquent la voie p53 [46], ou divers inhibiteurs de kinases [51]. Il a également été proposé que l'hypoxie agisse *via* la protéine p27 [3]. Cette hypothèse a servi de base au modèle bâti par Alarcon et *al.* (2004) [49].

3.1.3 Le modèle d'Alarcon

Alarcon et *al.* (2004) [49] ont proposé un modèle simple expliquant pourquoi les cellules cancéreuses peuvent entrer en quiescence en conditions hypoxiques, alors que les cellules saines poursuivent leur cycle. Ce modèle est présenté dans la figure 3.1. Selon leur description, l'hypoxie agit en augmentant l'abondance de la protéine p27. Cette dernière est un agent inhibiteur du cycle cellulaire : elle empêche la phosphorylation de la protéine Rb par le complexe cyclineE/cdk. Cette phosphorylation est nécessaire à la libération du facteur de transcription E2F, qui rétroagit positivement sur la synthèse de la cycline E. Le modèle simplifié proposé par Alarcon et *al* ne prend pas explicitement en compte cette étape, et ne considère que 4 agents : p27, une cycline, Rb (sous forme phosphorylée ou non phosphorylée), et un inhibiteur de la cycline (APC/cdh1). Ce dernier diminue le niveau de cycline/cdk actif, qui inhibe sa synthèse en retour. La phosphorylation de Rb est activée par la cycline/cdk, dont la vitesse de synthèse est augmentée par le Rb phosphorylé. Les équations données par Alarcon et *al.* dans le cas d'une cellule saine s'écrivent de la manière suivante (voir [49]), avec y le niveau d'expression de la cycline, x d'APC/cdh1, u de Rb non-phosphorylé, z de protéine p27 et m la masse de la cellule :

$$\frac{dx}{dt} = \frac{(1 + b_3u)(1 - x)}{J_3 + 1 - x} - \frac{b_4myx}{J_4 + x} \quad (3.4)$$

$$\frac{dy}{dt} = a_4 - (a_1 + a_2x + a_3z)y \quad (3.5)$$

$$\frac{dm}{dt} = \mu m \left(1 - \frac{m}{m_0}\right) \quad (3.6)$$

$$\frac{dz}{dt} = c_1 \left(1 - \frac{m}{m_0}\right) - c_2 \frac{P}{B + P} z \quad (3.7)$$

$$\frac{du}{dt} = d_1 - (d_2 + d_1 y)u \quad (3.8)$$

Les a_i , b_i , c_i , d_i sont des taux de synthèse et de dégradation protéique, P est la pression en oxygène, A et B des constantes. On retrouve, dans ce jeu d'équation, la formulation mathématique du “switch” moléculaire dirigeant la transition G_1/S (Eqs. 3.2-3.3). Alarcon et *al.* y adjoignent un senseur de l'hypoxie (la protéine p27). Cette protéine voit sa concentration augmentée en condition d'hypoxie, ce qui inhibe l'activité du complexe cycline/cdk.

Les auteurs introduisent en outre une différence entre les cellules saines proliférantes et les cellules cancéreuses à travers la dérégulation de l'expression de p27. Dans le cas sain, la concentration de la protéine est mise sous contrôle de la croissance cellulaire : lorsque la masse augmente, sa vitesse de synthèse diminue. Dans le cas tumoral, l'équation 3.7 est changée en :

$$\frac{dz}{dt} = c_1 - c_2 \frac{P}{B + P} z \quad (3.9)$$

En comparant les résultats numériques obtenus avec ces deux modèles (sains et tumoraux), les auteurs établissent une différence fondamentale de comportement. Dans le cas sain, la phase G_1 est allongée sous hypoxie, mais il n'existe pas de valeur de P (pression d'oxygène) pour laquelle le “switch” n'opère pas. Autrement dit, les cellules parviennent toujours à passer la transition G_1/S . En revanche, dans le cas tumoral, quand la pression en oxygène est suffisamment faible, le “switch” devient mathématiquement impossible. La cellule interrompt donc définitivement son cycle. Pour Alarcon et *al.*, ce résultat illustre la capacité des cellules tumorales à entrer en quiescence lorsque l'hypoxie est sévère.

Bien que ces résultats soient intéressants dans le cadre de la compréhension des phénomènes de résistance tumorale, plusieurs défauts conceptuels en rendent la généralisation difficile. Tout d'abord, la dérégulation de la protéine p27 est loin d'être observée dans la majorité des cancers [103, 104]. D'autre part, le lien entre p27 et la réponse à l'hypoxie est elle aussi sujette à controverse. Plus précisément, il n'est pas certain que cette protéine soit nécessaire pour conduire à un arrêt du cycle sous hypoxie [51, 105]. Enfin, un modèle cherchant à décrire de manière pertinente les interconnexions entre les voies de l'hypoxie et le cycle cellulaire doit s'appuyer sur la protéine HIF-1 α , agent clé de la réponse cellulaire à la déplétion d'oxygène.

3.2 Un modèle plus complet

3.2.1 Démarche

Comment modéliser de manière plus générale l'effet de l'hypoxie sur le cycle cellulaire? Le travail d'Alarcon propose un formalisme intéressant, inspiré de modèles mathématiques classiques. Cependant, comme nous l'avons dit, les bases biologiques sur lesquelles il repose ne sont pas consensuelles. Afin de bâtir une approche plus

satisfaisante, il nous a semblé pertinent d'introduire explicitement le facteur de transcription HIF-1 α , molécule clé de la réponse cellulaire à l'hypoxie. La seconde étape est, tout naturellement, d'exploiter les données expérimentales disponibles décrivant ses interactions avec les protéines du cycle cellulaire. L'un des effets moléculaires de HIF-1 α ayant été reporté concerne la synthèse de cycline D. Notamment, Wen et *al.* (2010) ont observé, après 24h à 0,2% d'oxygène, une baisse de 50% du niveau moyen de cycline D dans la population cellulaire étudiée. En inactivant HIF-1 α , ils ont pu rétablir le niveau d'expression normoxique de cycline D. Des preuves indirectes de cette relation d'inhibition ont été également mises à jour. Goda et *al.* (2003) [48, 50] ont ainsi mis en évidence une diminution de la phosphorylation de la protéine Rb. Or, cette étape est nécessaire à la libération du facteur de transcription E2F, ce dernier activant la synthèse de cycline E. Ce résultat est donc cohérent avec les nombreuses observations faisant état d'une inhibition hypoxie-dépendante de la cycline E [47–49]. L'hypothèse d'une régulation négative de la cycline D par HIF-1 α est donc confortée par des arguments convaincants. En conséquence, nous avons choisi de centrer notre modèle sur cette interaction biochimique. La description des effets biologiques de la cycline D est empruntée aux modèles classiques du cycle cellulaire, et notamment aux travaux de Tyson et Novak [97] : phosphorylation de Rb et libération de E2F, qui stimule la synthèse de cycline E. Celle-ci est alors considérée comme équivalente à la cycline générique du modèle d'Alarcon : c'est l'évolution de sa concentration qui dirige l'entrée en phase S. Le niveau de HIF-1 α est régulé par la pression en oxygène selon la loi mise en évidence expérimentalement par Jiang et *al.* (1996) [33] : sa concentration décroît exponentiellement lorsque le taux d'oxygène se rapproche de la normoxie. Le but de ce travail est d'utiliser ces principes simples afin de proposer un mécanisme d'entrée en quiescence en conditions hypoxiques. Plus précisément, à la suite du travail d'Alarcon, il s'agit de mettre en place un modèle plus général permettant d'expliquer un des liens existant entre hypoxie et chimiorésistance dépendante de HIF-1 α . Notre démarche est présentée en détail dans l'article ci-après, publié en 2014 dans *Mathematical Biosciences*.

3.2.2 Article : Bedessem B. and Stéphanou A., *A mathematical model of HIF-1-mediated response to hypoxia on the G1/S transition*, Mathematical Biosciences, 2014, 248 :31-9

Résumé

L'hypoxie est connue pour influencer le cycle cellulaire en augmentant la durée de la phase G₁, ou en induisant un état quiescent (arrêt de la prolifération cellulaire). L'entrée en quiescence permet à la cellule d'échapper à l'apoptose. Il a été suggéré que certaines cellules tumorales aient acquis l'avantage sur les cellules saines d'entrer plus facilement en quiescence quand les conditions environnementales, telles que la pression d'oxygène, ne sont pas favorables [49, 100]. Cette capacité contribue à l'apparition de phénotypes hautement résistants et agressifs [56].

Le facteur HIF-1 α est un acteur clé de la réponse cellulaire à l'hypoxie. Comme les cellules tumorales sont soumises à des conditions d'hypoxie chronique, la protéine est présente en plus grande concentration dans les cellules tumorales que dans les cellules saines. En outre, il a été montré que l'existence de mutations génétiques stabilisant HIF-1 α est caractéristique de plusieurs types de cancer [106]. Finalement, il a été suggéré que le niveau intracellulaire de HIF-1 α puisse être relié à l'agressivité des tumeurs [35, 107–109]. Or, jusqu'à aujourd'hui, les modèles mathématiques décrivant la transition G₁/S sous hypoxie ne le prennent pas en compte.

En conséquence, nous proposons un modèle mathématique de la transition G₁/S en hypoxie, qui intègre explicitement la voie HIF-1 α . Ce modèle reproduit le ralentissement de la phase G₁ en hypoxie modérée, et l'entrée en quiescence en cas d'hypoxie sévère. Nous montrons également que l'inhibition de l'expression de la cycline D par HIF-1 α peut induire la quiescence. Ce résultat offre une explication théorique aux observations expérimentales de Wen et *al.* (2010) [52]. Ainsi, notre modèle confirme que la chimiorésistance peut être liée, pour une part, à la régulation négative de la cycline D par HIF-1 α .

Abstract

Hypoxia is known to influence the cell cycle by increasing the G1 phase duration or by inducing a quiescent state (arrest of cell proliferation). This entry into quiescence is a mean for the cell to escape from hypoxia-induced apoptosis. It is suggested that some cancer cells have gain the advantage over normal cells to easily enter into quiescence when environmental conditions, such as oxygen pressure, are unfavorable [49, 100]. This ability contributes in the appearance of highly resistant and aggressive tumor phenotypes [56].

The HIF-1 α factor is the key actor of the intracellular hypoxia pathway. As tumor cells undergo chronic hypoxic conditions, HIF-1 α is present in higher level in cancer than in normal cells. Besides, it was shown that genetic mutations promoting over-stabilization of HIF-1 α are a feature of various types of cancers [106]. Finally, it is suggested that the intracellular level of HIF-1 α can be related to the aggressiveness of the tumors [35, 107–109]. However, up to now, mathematical models describing the G1/S transition under hypoxia, did not take into account the HIF-1 α factor in the hypoxia pathway.

Therefore, we propose a mathematical model of the G1/S transition under hypoxia, which explicitly integrates the HIF-1 α pathway. The model reproduces the slowing down of G1 phase under moderate hypoxia, and the entry into quiescence of proliferating cells under severe hypoxia. We show how the inhibition of cyclin D by HIF-1 α can induce quiescence; this result provides a theoretical explanation to the experimental observations of Wen et *al.* (2010). Thus, our model confirms that hypoxia-induced chemoresistance can be linked, for a part, to the negative regulation of cyclin D by HIF-1 α .

Introduction

The integration of environmental factors influencing cell proliferation is the actual challenge of cell cycle modeling [95]. Indeed, since the 1990's, many models were developed to describe the evolution of protein levels during the cycle [97, 110–112]. However, few of them take into account external parameters, such as the temperature, the mechanical properties of the substrate, or hypoxia. This last factor is particularly interesting to study. In physiological condition, hypoxia can occur if the blood does not bring enough oxygen to the cells. If hypoxia is too severe or too long, the cell enters into apoptosis [13]. In pathological conditions, cancer cells undergo a chronic hypoxia [14, 99]. This hypoxia induces more aggressive, metastatic and resistant tumors [13, 54]. In particular, if hypoxia can induce apoptosis in normal proliferating cells, tumor cells resist to apoptosis [13]. One mechanism that can explain this resistance is the entry into a quiescent state, where the cell stops its division cycle [56, 100]. This quiescent state is also a mean for the cancer cell to escape from the effects of chemotherapy [56, 101, 102]. Therefore, it participates to the aggressiveness of the tumors.

Alarcon *al.* [49] proposed a simple model explaining why cancer cells can enter into quiescence under hypoxic conditions whereas normal cells follow their cycle. The authors introduce a difference between normal proliferating and cancer cells through the deregulation of the expression of a protein of the cell-cycle (p27) during tumorigenesis. However, this deregulation event is not a general feature of cancer. Indeed, this phenomenon was not observed in the majority of tumor cells [103, 104]. Besides, it is not clear that p27 is necessary to induce hypoxia-induced cell cycle arrest [51, 105].

The HIF-1 α factor is the central protein involved in the intracellular signaling pathway of hypoxia [113]. It is a transcription factor, which enhances the expression of numerous genes. These genes enable the cell to adapt to the environmental conditions (angiogenesis, arrest of aerobic metabolism), or to enter into apoptosis [44, 50].

HIF-1 is an heterodimeric protein, constituted of two sub-units : HIF-1 β , which is constitutively expressed, and HIF-1 α , which is the sensor of hypoxia. Indeed, in order to activate hypoxia genes, HIF-1 α has to be in a reduced form. When the level of oxygen is sufficient, an enzyme called HIF-1 α prolyl-hydroxylase is active and converts HIF-1 α into an hydroxylated form. This oxygenated form of HIF-1 α is rapidly degraded by the proteasom pathway [13, 102, 114].

The ways of actions of HIF-1 α are numerous and complex [2]. A review of the huge molecular biology literature dealing with the effects of HIF-1 α on the cell cycle enables us to retain several types of actions. First, it is clear that HIF-1 α indirectly downregulates cyclin E activity, and this inhibition is the reason why HIF-1 α causes slowing down or arrest of cell cycle [47–49]. The origins of this action on cyclin E activity remain poorly defined [47], even if some potential pathways are known. Notably, the upregulation of cyclins inhibitors, such as p21 and p27, are reported [3, 47, 50]. However, some authors showed that the action of HIF-1 α on p27 is not so clear since the expression of p27 under hypoxia may be independent of HIF-1 α [6, 51].

The second important effect of HIF-1 α is the interrelation between this factor and cyclin D [52, 53]. Wen *et al.* [52] studied the effect of HIF stabilization on cyclin D level. They first found that after 24h at 0.2%, the mean cylin D concentration in the

whole cell population decreases with 50% compared to the normoxic condition. To confirm the implication of HIF-1, its activity was impaired by DN-HIF overexpression, which induces an increase of the cyclin D level. There is also an action of cyclin D on HIF-1 α , due to the activation of the HIF-1 prolyl-hydroxylase activity [53]. Besides, the activation of cyclin D expression by HIF-2 underlines the rivalry in hypoxic tumor growth and progression between HIF-1 and HIF-2. Here, we choose to focus on the influence of cyclin D inhibition by HIF-1 α , in order to show how this simple relationship can generate a serie of interesting results in agreement with data from the literature. Besides, the inhibition of the cyclins by HIF-1 α under hypoxia is very well documented. As we previously said, hypoxia-dependent inhibition of cyclin E is considered as a cause of hypoxia-dependent cell-cycle arrest. Second, the increase of unphosphorylated versus phosphorylated form of the Retinoblastoma protein [48, 50] under hypoxia is also a good evidence for the downregulation of cyclin D by HIF.

The increase of HIF-1 α activity during tumorigenesis is well documented, since it seems to be a very common feature of cancers [24, 35, 42, 115]. As a consequence, this factor became a new therapeutic target [116, 117]. In some cases, its high level is simply due to the chronic hypoxia undergone by the tumor cells. In other cases, genetic mutations induce an over-stabilization of HIF-1. It is the case for the renal clear carcinoma [75]. As a consequence, for the same oxygen pressure, HIF-1 will have a higher level in cancer cells than in normal cells [118].

In a general way, a link was found between the aggressiveness of cancers and HIF-1 α activity. This role of HIF in tumorigenesis is firstly due to the induction of anti-apoptotic and pro-angiogenic genes. Second, it mediates the entrance into quiescence of proliferating cells, which induces a hypoxia-dependent chemoresistance.

The aim of this work is to describe an example of a simple mechanism of HIF-1 α -dependent entrance into quiescence under hypoxia. We make a link between the level of HIF-1 α and the ability of the cell to enter into quiescence under hypoxia. In agreement with the literature, our model assumes the regulation of HIF-1 α stability by the oxygen pressure [114, 119, 120]. We built a mathematical model of the G1/S transition in hypoxic conditions, which explicitly integrates the HIF-1 α pathway. We focused on the relationships between HIF-1 α and the cyclins, in order to propose a simple and biologically accurate mechanism of hypoxia-induced quiescence.

Model

Hypotheses Our model is primary based on the models described in Alarcon et *al.* [49], Tyson and Novak [96], Novak and Tyson [97]. In those papers, the G1/S transition is modeled by a biological switch between a cyclin and an inhibitor complex. They considered that this inhibitor was APC/cdh1. However, this role of APC/cdh1 complex is not well admitted ; classically, the complex addressing cyclin E for degradation is known to be the SCF complex [121]. As a consequence, it is more accurate to consider that the inhibitor of cyclin E is SCF. The switch that we aim to study is represented in Figure 3.2. The G1 phase finishes when this molecular switch occurs. In our model, we differentiate the cyclin E and the cyclin D. Cyclin E is involved in the molecular switch where

it inhibits and is inhibited by the SCF complex. Whereas Novak and Tyson [97] consider that two cyclins drive the G1/S transition (cyclin E and A), we consider here just one cyclin we named cyclin E. The concentration in active SCF complex is controlled by an evolution equation similar to that given by Tyson and Novak [96] for APC/cdh1 complex. Cyclin D phosphorylates the Rb protein, which releases the transcription factor E2F. As Novak and Tyson [97], we supposed that at each time, $E2F_{Rb}$ is in an equilibrium relationship with E2F and Rb because the complexation/decomplexation of phosphorylated Rb and E2F is supposed to be very fast compared to the evolution of the cyclin concentration. Besides, free E2F can be in unphosphorylated (active) form, or in phosphorylated (inactive) form. A dynamic equilibrium ensures the transition from phosphorylated to unphosphorylated form. The total concentration of E2F (free phosphorylated/unphosphorylated, and complexed with Rb) is supposed to be constant, as in [97]. Active E2F factor promotes the synthesis of cyclin E, as assumed for cyclin A by Novak and Tyson [97]. Besides, to take into account the cell growth in the progression through the G1 phase, we assume that the mass increases the cyclin E concentration. This assumption is taken from Alarcon et al. [49] and Novak and Tyson [97]. The oxygen pressure is taken into account with the variable P , which represents the percentage of oxygen among all the other gases in the cell environment. The effect of the oxygen pressure is modeled by the concentration of HIF-1 α . This concentration increases when the oxygen pressure decreases, as well described in the literature [33, 122]. Jiang et al. [33] show that *in vitro* cultured cells submitted to hypoxia exhibit an exponential relationship between HIF-1 level and oxygen pressure [33]. The experimental results from Zhou et al. [122] confirm that an exponential law is a good model for the hypoxia-induced HIF-1 stabilization. These authors also showed that this exponential law strongly depends on the cancer cell line. We will discuss this point later. HIF-1 α decreases the cyclin D activity by inhibiting its synthesis, as observed in experiments [52]. The evolution of cyclin D level during the cycle, the influence of HIF-1 α on its level, and the reaction of Rb phosphorylation are calibrated with data from the literature. We do not take into account the role of the p27 protein, contrary to Alarcon et al. [49]. As we said, the effects of hypoxia on this protein remain unclear; besides, we want to focus on the influence of cyclin D/HIF interactions which promote the entrance into quiescence. Figure 3.3 gives a sketch of the molecular network.

Biological description The variables used in the model are cyclin D (*cycD*), cyclin E (*cycE*), Retinoblastoma protein (in its unphosphorylated form) (*Rb*), HIF-1 α (*H*), SCF complex (*SCF*), the mass of the cell, and the different chemical forms of the E2F transcription factor. E2F exists in phosphorylated and unphosphorylated ($E2F$) form, and free or linked to Rb ($E2F_{Rb}$). Thus, free E2F can be phosphorylated or unphosphorylated. The free and unphosphorylated form ($E2F_A$) is the active form. A chemical equilibrium drives the transition between the phosphorylated and unphosphorylated form of E2F. We named $E2F_{tot}$ the total of all the chemical forms of E2F. As Novak and Tyson [97], we assume this total to be constant. Cyclin D liberates E2F by phosphorylating Rb (that is to say by decreasing $[Rb]$). $E2F_A$ has a crucial role, since it promotes the synthesis of cyclin E. Cell growth is the second factor influencing cyclin E

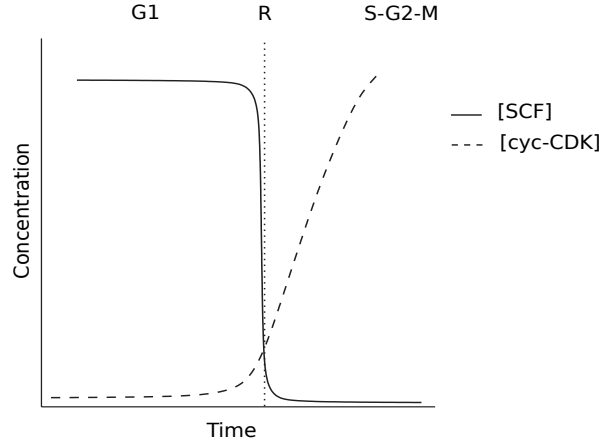


FIGURE 3.2: The biological switch between cyclin E and its inhibitor is necessary to pass through the G1/S restriction point. Schematic diagram showing the evolution of the concentration of SCF and cyc-CDK during the cell cycle. The vertical dotted line represents the restriction point : when the cell achieves the switch, it finishes the cycle. From [49]

synthesis, through the variable m . HIF-1 inhibits cyclin D synthesis. As a consequence, hypoxia induces a decrease of $E2F_A$ maximal level, which decreases the synthesis rate of cyclin E. The core of the model is the molecular switch between cyclin E and its inhibitor (SCF). Following the same idea as Novak and Tyson [97] and Alarcon et al. [49], this switch is driven by the mutual inhibition of SCF and cyclin E.

Mathematical formulation The model can be written with a system of coupled ordinary differential equations (ODEs).

Cyclin D is synthesized with rate a_1 and naturally degraded with rate a_2 . We assume that it is linearly decreasing with $[H]$ [52] :

$$\frac{d[\text{cyc}D]}{dt} = a_1 - a_3[H] - a_2[\text{cyc}D] \quad (3.10)$$

The synthesis of cyclin E is induced by cell growth and $E2F_A$, according to Novak and Tyson [97] and Alarcon et al. [49]. Its degradation is stimulated by the SCF complex :

$$\frac{d[\text{cyc}E]}{dt} = b_1m[E2F_A] - b_2[\text{cyc}E] - b_3[\text{cyc}E][SCF] \quad (3.11)$$

SCF complex obeys the same equation as the APC/cdh1 complex of the previous models [49, 96, 97] :

$$\frac{d[SCF]}{dt} = \frac{e_1(1 - [SCF])}{J_1 + 1 - [SCF]} - e_2 \frac{[SCF][\text{cyc}E]}{J_2 + [SCF]} \quad (3.12)$$

As in Alarcon et al. [49], Rb (unphosphorylated Rb) is synthesized with a d_2 rate, and naturally degraded with a d_3 rate. Cyclin D phosphorylates Rb. As a consequence,

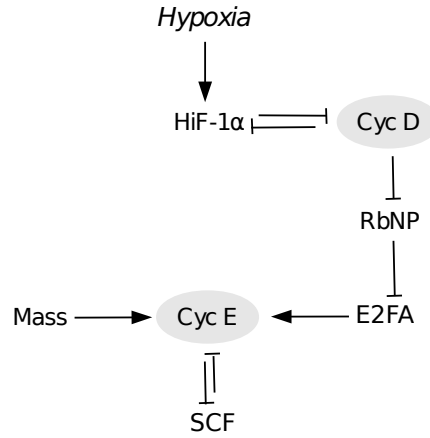


FIGURE 3.3: Model of the G1/S transition in hypoxic conditions : schematic representation of the molecular network considered in our model. We modeled the action of cyclin D, which phosphorylates Rb and liberates E2F. This transcription factor activates the synthesis of cyclin E, which is degraded by SCF complex. HIF-1 α negatively regulates cyclin D synthesis. RbNP=Non-phosphorylated Rb.

$[Rb]$ decreases :

$$\frac{d[Rb]}{dt} = d_2 - (d_3 + d_1[cycD])[Rb] \quad (3.13)$$

The growth of the cell mass follows the same law as in Alarcon et al. [49], with a growth rate α and a maximal size m_0 :

$$\frac{dm}{dt} = \alpha m \left(1 - \frac{m}{m_0}\right) \quad (3.14)$$

The unphosphorylated form of E2F follows a dynamic equilibrium described by Novak and Tyson [97] :

$$\frac{d[E2F]}{dt} = g_1([E2F]_{tot} - [E2F]) \quad (3.15)$$

The equilibrium relationship between oxygen pressure and HIF-1 α concentration has been derived from experiments [33] :

$$[H] = H_0 e^{\beta_1(1-P)} \quad (3.16)$$

Following Novak and Tyson [97], we assume that at each time, the active E2F is

the fraction of unphosphorylated ($\frac{[E2F]}{[E2F]_{tot}}$) free ($[E2F]_{tot} - [E2F_{Rb}]$) E2F factor :

$$[E2F_A] = \frac{([E2F]_{tot} - [E2F_{Rb}])[E2F]}{[E2F]_{tot}} \quad (3.17)$$

The equilibrium between $E2F_{Rb}$, $E2F$ and Rb is given by the equation from Novak and Tyson [97] :

$$[E2F_{Rb}] = \frac{2[E2F]_{tot}[Rb]}{[E2F]_{tot} + [Rb] + \sqrt{([E2F]_{tot} + [Rb])^2 - 4[E2F]_{tot}[Rb]}} \quad (3.18)$$

As in previous models, the core of the system is the molecular switch between a cyclin and SCF. Mathematically, we consider that the cell passes through the G1 phase when $[cycE] > [cycE]_{threshold}$ and $[SCF] < [SCF]_{threshold}$. We chose $[SCF]_{threshold} = 0.004$ and $[cycE]_{threshold} = 0.15$. When these values are reached, the cell divides.

Inhibition of cyclin D by HIF-1 α

Eq.(3.10) and (3.16) describe the relationship between cyclin D, HIF-1 α and the oxygen pressure P in the cell environment. This model considers the effects of a long term (almost 48h) hypoxia. Thus, the level of HIF is stabilized. $[cycD]$ is synthesized with rate a_1 , and degraded with rate a_2 . Its synthesis is inhibited by HIF-1 α , which concentration depends on oxygen pressure following the expression given in eq. (3.16). The parameter a_3 represents the action of HIF on the synthesis of cyclin D. The parameter β_1 is determined from Jiang et al. [33] (see Appendices A). The variable P stands for the oxygen pressure in the cell environment, expressed as a normalized percentage of all the gases. As suggested by Jiang et al. [33], we consider that the reference pressure ($P=1$) is 6% O₂. All the pressure will be normalized with this reference pressure. The parameters a_1 , a_2 and a_3 are estimated with data coming from Wen et al. [52] and Yang et al. [112] (see Appendix A).

Control of E2F concentration

We denote $[E2F]_{tot}$ the total concentration of E2F, $E2F_{RB}$ the complex E2F/Rb, $E2F$ the unphosphorylated form of E2F and $E2F_A$ the free and unphosphorylated (active) form. We describe the equilibrium between these different variables from Eqs.(3.15),(3.17),(3.18) previously proposed by Novak and Tyson [97]. The first describes the transition, mediated by g_1 , from phosphorylated to unphosphorylated E2F. The others are equilibrium equations modeling the relationship between the different chemical species involving E2F.

Eq.(3.13) describes the evolution of the unphosphorylated Retinoblastoma protein concentration. $[Rb]$ is synthesized with coefficient d_2 , naturally phosphorylated in the cell environment with coefficient d_3 , and phosphorylated by cyclin D with coefficient d_1 .

Molecular switch

Eqs.(3.11),(3.12) describe the biological switch which forms the core of the model for the G1/S transition. Besides, we suppose that the synthesis of cyclins E, represented

by the variable $cycE$ in our model, depends on the mass m and on the transcription factor E2F in its active form ($E2F_A$) [97]. The parameter b_1 regulates the speed of the chemical synthesis. In the other hand, $cycE$ is naturally degraded with coefficient b_2 , and suffers SCF-mediated degradation with coefficient b_3 . The aim is to simulate a switch similar to that obtained in these previous models of G1/S transition. As in Novak and Tyson [97], the dynamics of the inhibitor depends on cyclin E, and on the transition between an active and inactive form. These dependencies are expressed through Michaelis-Menten terms with enzymatic constants J_1 and J_2 respectively. The parameter e_1 promotes the transition from inactive to active form, and e_2 the transition from active to inactive form.

Parameters

The parameters we used are given in Table 3.1. Their values were estimated from previous models [49, 97] and experimental data of molecular biology taken from the literature (see Appendix A). We will show that we can reduce the variability of all the parameters to the variability of e_2 and α , which control the dynamics of the system. These parameters can be easily adjusted to biological data.

Results

We simulated the G1/S transition by solving the system of equations Eqs.(3.10)-(3.18) for different values of P . We used a standard fourth order Runge-Kutta method, implemented in Matlab. The values of the parameters used in our first simulations are given in Table 3.1. We chose the undetermined parameters in order to have a G1 phase duration of about 400 minutes. This duration was chosen based on the work of Novak and Tyson (2004) [97]. The rise of cyclin D and A levels, which was interpreted by Novak and Tyson, and by ourselves, as the signal for the G1/S transition, occurs about 6-7 hours after the beginning of the cycle. The initial conditions we used are given in Table 3.2. The initial values for the concentrations were chosen to have values of the same order of magnitude to that used by Alarcon et al. [49] and Novak [97]. We can notice that the initial concentrations do not influence the final state of the system (see Appendices B). We consider that the cell passes through the G1 phase when $[cycE] > [cycE]_{threshold} = 0.15$ and $[SCF] < [SCF]_{threshold} = 0.04$. These threshold conditions were chosen to capture as precisely as possible the moment of the switch between the cyclin E and the SCF complex. In the rest of the paper, the notation $[X]_\infty$ stands for the value of $[X]$ when the system reaches its steady state.

Hypoxia induces entrance into quiescence Figure 3.4 shows simulations of the G1/S transition under three levels of hypoxia. When P diminishes, the molecular switch occurs with a delay which increases when hypoxia becomes more severe. For a certain value of P (here, 0.01), this switch does not occur any more. As in [49], this inability for the cell to pass through the G1 phase can be interpreted as the entry into the quiescent state. P^* denotes the minimal pressure which enables the cell to pass through the G1 phase. The parameters are given in Table 3.1, and $P^*=0.03$.

| Model's variables | Notations | Initial Value |
|-----------------------|-----------|---------------|
| Masse | m | 5 |
| Cyclin D | $cycD$ | 0.1 |
| Non-phosphorylated Rb | Rb | 1 |
| Cyclin E | $cycE$ | 0.01 |
| SCF complex | SCF | 0.9 |
| Unphosphorylated E2F | $E2F$ | 0.1 |

TABLE 3.1: Initial values taken for the simulations

We also plotted the duration of the G1 phase as a function of P (Figure 3.5). As hypoxia becomes more intense, the G1 phase duration increases, in agreement with the literature [3]. For the lowest value of the pressure, we observe an asymptotic behavior, which finishes by the entrance into quiescence.

In order to mathematically characterize the final state of the cell (quiescent or proliferating), the stationary state solutions of the system, depending on P , are numerically calculated. The details of the calculation are presented in the Appendices B. Figure 3.6 presents the stable stationary states of the system as a function of P . When $P < P^*$, the system exhibits three stable stationary states. With our initial conditions ($[SCF]$ high and $[cycE]$ low), the equilibrium state of the system is reached with $[SCF] > [SCF]_{threshold}$ and $[cycE] < [cycE]_{threshold}$. This situation corresponds to the quiescent state. When $P > P^*$, the system has a unique stationary state. It is characterized by a high level of $cycE$ and a low concentration of SCF , which leads the cell to achieve its cycle.

Influence of parameters variability Previous observations enable us to suppose that the two main features of the cell response to hypoxia are the increased duration of the G1 phase and the capacity to enter into quiescence. The latter can be quantified by the value of P^* (pressure for the bifurcation of the dynamics system). The core of the system is the molecular switch due to SCF and $cycE$ interactions. The variations of P have an influence on these dynamics by changing $[E2F_A]$ and m . Since these two variables determine the synthesis rate of $cycE$, they affect the G1 phase duration and equilibrium values of SCF and $cycE$.

The equilibrium value of m never changes in our model. We call this maximal value of mass m_0 , and we have $m_\infty = m_0$. We can simulate its influence on the dynamics of the system by modifying b_1 , which buffers the variations of m_0 in the production rate of $cycE$. Therefore, we do not consider m_0 as a key parameter for the dynamics of the system. The variations of the growth rate, by modifications of the parameter α , just have an influence on the cell cycle duration.

Final concentrations of the SCF and $cycE$ directly depend on $[E2F_A]_\infty$. We can express $[E2F_A]_\infty$ as a function of $[cycD]_\infty$, d_1 , d_2 (see Appendix B). $[cycD]_\infty$ depends on the parameters of Eq.(1) and (7) (a_1 , a_2 , a_3 , β_1). As a consequence, the variability of all these parameters is totally buffered by the variability of b_1 , which controls the production rate of $cycE$.

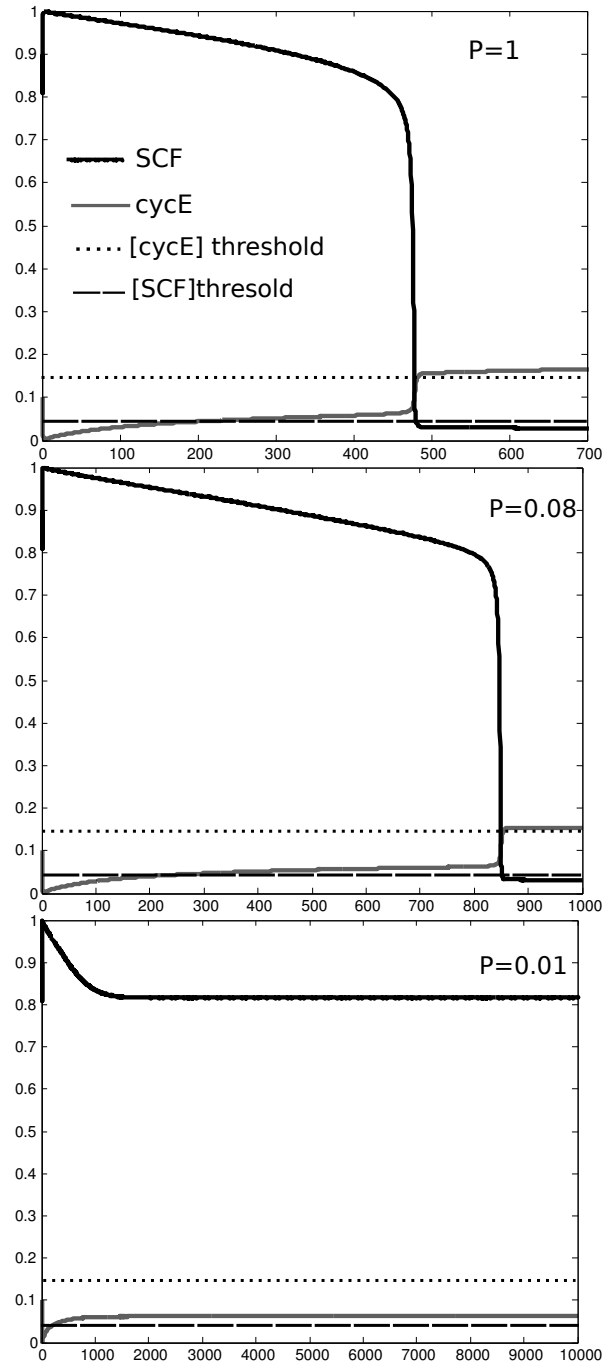


FIGURE 3.4: Evolution of $[SCF]$ (solid black line) and $[cycE]$ (solid grey line). The simulations were made for adimensionalized values of P , with $P=1$ (top), 0.08 (center), 0.01 (bottom). When the molecular switch occurs, the cell passes through the G1 phase. For $P=0.01$, the system does not generate a switch any more. The cell enters into a quiescent state.

| parameter | Value | Reference |
|----------------------|--------|-------------|
| a_1 | 0.51 | [123], [97] |
| a_2 | 1 | [123], [97] |
| a_3H_0 | 0.0085 | [52] |
| β_1 | 2.5 | [33] |
| b_1 | 0.018 | |
| b_2 | 0.5 | [49] |
| b_3 | 1 | [49] |
| J_1 | 0.04 | [49] |
| J_2 | 0.04 | [49] |
| d_1 | 0.2 | [97] |
| d_2 | 0.1 | [49] |
| e_2 | 14 | |
| e_1 | 1 | |
| α | 0.005 | |
| g_1 | 0.016 | [97] |
| $[E2F]_{tot}$ | 1 | |
| $[cycE]_{threshold}$ | 0.15 | [49] |
| $[SCF]_{threshold}$ | 0.004 | [49] |

TABLE 3.2: Parameters used in the model. The parameters we could not estimate are initially determined in order to reach a G1 phase duration of about 400 *min* for proliferative cells in normoxic conditions

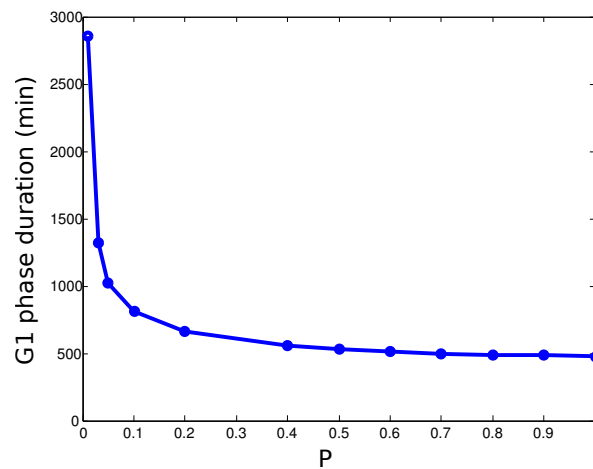


FIGURE 3.5: Influence of hypoxia on the G1 phase duration. Value of the G1 phase duration (in min) given by the model as a function of the parameter P (adimensionalized).

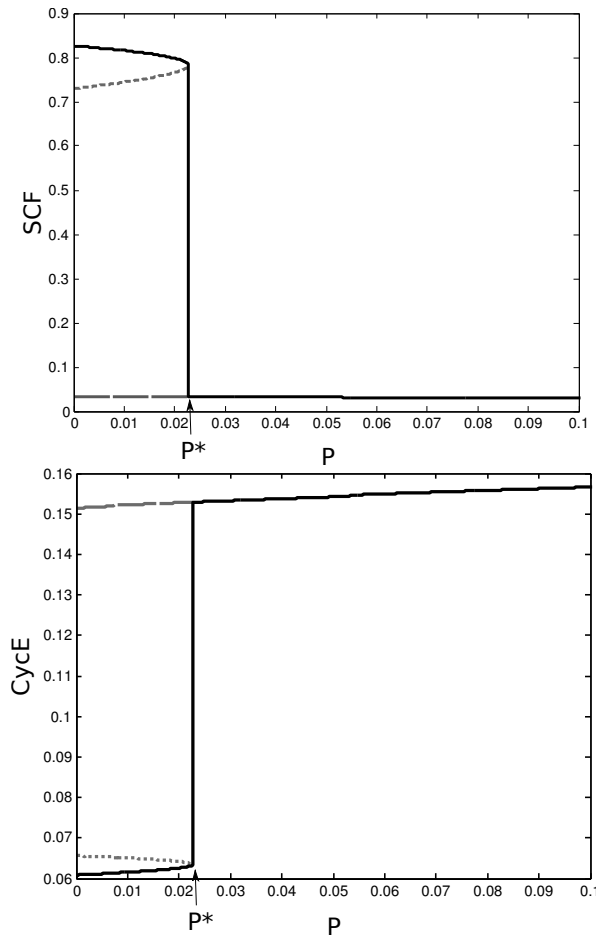


FIGURE 3.6: Influence of P (adimensionalized) on the stable fixed points of the system. $[SCF]_{\infty}$ (top) and $[cycE]_{\infty}$ (bottom) are plotted as functions of P^* . The dark line represent the stationary states reach by the system with the parameters we used. The point where we pass from three to one stable stationary state corresponds to P^* (limit of the quiescent state).

As it ensures the coupling between SCF and $cycE$, the parameter e_2 also controls the dynamics of the molecular switch. If the coupling is weak, it is more difficult for the system to generate a molecular switch. As a consequence, we can also consider the parameter e_2 as a key factor influencing the behavior of the system.

Finally, the whole variability of the adjustment parameters can be simulated by the variability of the parameters e_2 , b_1 and α .

Figure 3.7 shows that the (b_1, e_2) couple determines the value of P^* . When e_2 decreases, the coupling between SCF and $cycE$ becomes weak, and it is necessary to increase the hypoxic level to observe quiescence. As a consequence, P^* decreases. In parallel, when b_1 decreases, the production rate of $cycE$ at the steady state is less important. Therefore, the cell enters more easily into quiescence, and P^* increases. We note that, for a given value of b_1 , the variations of e_2 are sufficient to simulate a large panel of values for P^* . As a consequence, in order to adjust the model to a given value of this limit pressure, we can set b_1 and consider e_2 as an adjustment parameter. Finally,

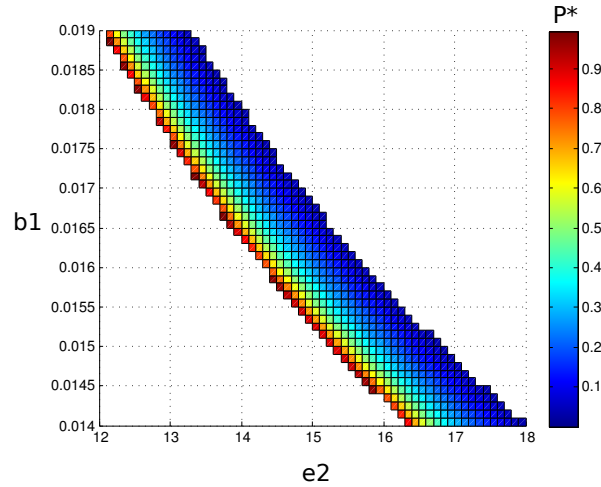


FIGURE 3.7: Influence of b_1 (synthesis rate of *cycE*) and e_2 (coupling between *cycE* and *SCF*) on the value of the bifurcation point P^* . The value of P^* (color scale) is plotted as a function of b_1 and e_2 . The white zones correspond to non physiological values (the cell never or always finishes its cycle).

the parameters controlling the dynamics of the system are e_2 (coupling between cyclin E and SCF) and α (growth rate).

Discussion

This paper proposes a mathematical model of the G1/S transition in hypoxic conditions. Our model was calibrated with data from the literature, and the results from other mathematical models of the G1 phase transition [49, 97]. The core of this model is a molecular switch between a cyclin and an inhibitor (SCF). The passage through the G1 phase is determined by the possibility to realize this switch. If the switch does not occur, we consider that the cell is trapped into a quiescent state. Hypoxia was simulated by introducing HIF-1 α . We modeled the inhibition between cyclin D and HIF-1 α , in agreement with data from the literature [52]. The oxygen pressure determines, in this way, the final concentration of cyclin D during the G1 phase. This level of cyclin D determines the maximum value of the active E2F concentration, which controls the synthesis rate of cyclin E. If this rate is not high enough, the critical concentration for the cyclin E is not reached and the molecular switch cannot occur. The cell enters into a quiescent state. As a consequence, if the oxygen pressure is low, the cyclin D will not reach a sufficient level to ensure the minimal amount of cyclin E the cell needs to achieve the G1 phase. We could define a limit pressure P^* , which is the minimum oxygen pressure whereby the cell can pass through the G1 phase. Mathematically, it corresponds to the bifurcation point of our system.

Thus, this model illustrates a simple mechanism of hypoxia-mediated slowing down of the cell cycle, and entrance into quiescence. It focuses on the influence of the interactions between HIF-1 α and the cyclins on the G1 phase achievement. Notably, we show how the inhibition of cyclin D by HIF-1 α can affect the cell cycle. By inhibiting cyclin D activity, HIF promotes the entrance into quiescence. Thus, it provides a resistance

to apoptosis for the proliferative cells. This result gives an explanation to the results of Wen *et al.* [52], which have shown that the HIF-mediated chemoresistance appearing in tumor cells is linked to the inhibition of the cyclin D. Indeed, they observed that the inhibition of cyclin D expression by siRNA induces an increase of the resistance to chemically-induced apoptosis. They concluded that the negative regulation of the cyclin D induced by HIF can, at least partially, explain the chemoresistance which is associated to cancerous HIF-1 over-stabilization. Thus, our model shows how a certain form of chemoresistance can be associated to HIF-1 in cancer cells. In the case of a similar response to hypoxia between normal and cancer cells (non-mutated hypoxia pathway), the model highlights a possible mechanism for the chronic hypoxia-induced entry into quiescence. In the case of a genetic over-stabilization of HIF-1, which is the case for various type of cancers [75, 106], the increased ability of cancer cells to enter into a quiescent state is well described by our model. Indeed, this case can be modeled by multiplying $[H_0]$ by an $\epsilon > 1$ parameter to artificially increase the HIF-1 level. As a consequence, for a same oxygen pressure, HIF-1 concentration will be more important in cancer cells than in normal cell. Thus, for a given hypoxic condition, a cancer cell can enter into a quiescent (resistant) state whereas the normal cells continue their cycle (more sensitive to apoptosis). Our model thus captures the differential behavior of cancer and normal cell. We can notice that this ϵ parameter could depend on the cell line, since Zhou *et al.* [122] showed that different cancer cell lines does not have the same normoxic level of HIF-1. Compared to the model from Alarcon *et al.* [49], our work describes in a very general way the influence of HIF-1 on hypoxia-induced quiescence of normal and cancer cells. Whereas the previous model was based on an arguable action of hypoxia on p27, we constructed a biologically more accurate system of ODEs. This new model gives a possible explanation to the link between HIF-1, the cyclins and hypoxia-induced chemoresistance. Besides, our model can easily be completed to study the influence of a genetic over-stabilization of HIF-1 by considering an ϵ parameter, which can vary with considered cell line.

The α parameter, which drives the growth speed of the cell, was chosen to obtain a value of 400min for the G1 phase duration. It is important to notice that the results of our model are not influenced by the choice of the normoxic G1 phase duration. As it does not influence the final state of the mathematical system, this α parameter can be modified to adjust the model to various G1 phase durations. It is biologically correct, because the duration of the G1 phase in the absence of an environmental stress is known to be, at least for a part, driven by the growth rate of the cell [111].

Besides, the influence of HIF-1 on the cell metabolism was not taken into account in this model. It is known that the glycolytic switch described by Gatenby and Gillies (2004) [124] is linked to the activity of HIF-1. Notably, it was shown that HIF-1 stimulates the synthesis of glycolytic enzymes, such as Pyruvate Kinase [44]. In parallel, Icreverzi *et al.* [125] observed that cyclin D enhances cell growth through the stimulation of mitobiogenesis. By inhibiting the synthesis of cyclin D, HIF-1 makes the mitobiogenesis to decrease, which promotes the transition to a glycolytic phenotype. This switch allows cancer cells to compensate low aerobic metabolism by an increased glucose consumption. This can be a way for the cell to escape the quiescence state. It could be interesting to add to our model a term describing the energetic production,

and to link cell growth to this available energy.

We also have to notice that our model only study the effect of a given oxygen pressure on a single cell. In the reality of tumor growth, there is a gradient of oxygen which varies in space and time. To study the effects of such a dynamical hypoxic condition, it would be necessary to consider some series of cycles, by resetting the values of the variables to their initial values after the G1/S transition is reached. For each new cycle, the oxygen level can change, and the cell response may also change. Besides, it is possible to extend this model to consider a population of cells, which have interactions with each others. These interactions can be, for instance, through the diffusion of growth factors which stimulate cell proliferation by enhancing the synthesis of cyclin D [119]. We can also consider the differential mechanical interactions between the tumor cells, and between tumor cells and the stroma. These mechanical interactions are known to influence cell division [126]. We can notice here that the kinetics of HIF-1 accumulation is not considered in this model. We study the idealized case of a constant hypoxia, and we consider the effect of the equilibrium value of HIF-1. However, these kinetics were measured ([57, 58]). HIF-1 shows a peak after 6h, and then decreases to stabilize at an equilibrium level after 24-48h. This equilibrium level depends on the intensity of hypoxia, and on the cellular type (normal and cancer cells). If we consider the more complex case of a dynamical hypoxia, it should be necessary to take into account these kinetics of HIF-1 accumulation.

We can notice that the exact relationships between HIF-1 and cyclin D is not totally elucidated. Many reports show that HIF-1 inhibits cyclin D [52, 53] and cyclin E [47–49] leading to cell cycle arrest. However, an other report [127] show that HIF-1 also can stimulate the induction of cyclin D, leading to cell proliferation. In our work, we use the first biological hypothesis, and we show that it can explain the cell cycle arrest phenomenon commonly observed.

Finally, we aim to calibrate the undetermined parameters with experimental data, by measuring the G1 phase duration under hypoxia and the value of P^* . Since we showed that only two parameters (α and e_2) drive the dynamics of the system (G1 phase duration and entrance into a quiescence state), experimental data will enable us to set the value of these parameters for different cell lines. Therefore, this would provide a tool to compare different cancer cell lines on the basis of their ability to enter into a quiescence state. It could be interesting to build a classification of different cancer cells using the values of the parameters of our model. By comparing it with a known classification made on the basis of their resistance and aggressiveness, we could obtain some information about the correlation between the ability to enter into quiescence under hypoxia and the aggressiveness.

Acknowledgements

We are very grateful to Françoise Giroud for her advices which helped us to build and justify the hypotheses of the model.

Appendix

Determination of the parameters

The parameter we did not adjust were taken from [49] and [97] models, or calculated from the molecular biology literature. This first part presents the biological data used to build the model.

HIF-1 α and oxygen pressure In [33] the relationship between $[H]$ (HIF-1 concentration) and P was experimentally determined. The authors have shown that the level of HIF-1 α varies with oxygen pressure in an exponential form, when the oxygen pressure is below 6%. The experimental curve they present was fitted in order to build the dimensionless expression describing the relationship between $[H]$ and P . The normoxia ($P=1$) is reached for an oxygen pressure $P=6\%$.

Hif-1 α and cyclin D dynamic In [123], the level of cyclin D is quantified during the cycle : the protein is multiplied by a factor taken between 2 and 5 during the G1 phase. We adjust the maximum level of cyclin D to reach a concentration five times higher than in the beginning of the G1 phase. We also used the dynamic of the cyclin D evolution during the G1 phase modeled by [97], with a rapid increase of cyclin D concentration (maximum level reached in less than one hour). In [52] experiments were realized to quantify the inverse correlation between HIF-1 α and cyclin D. Their paper shows that after 20 hours of hypoxia (oxygen pressure $P=0.21\%$) in a cell constitutively expressing the cyclin D, its concentration reaches an equilibrium, and is divided by about 2 with respect to normoxia. Considering that our model describes cells that have endured several hours of hypoxia, and that the constitutive expression is equivalent to the induction at the beginning of the G1 phase, the parameter a_3 was adjusted to obtain a maximal value of $[cycD]$ divided by 2 when $P = 0.21\%$.

Phosphorylation of Rb We used the model developed by [97] to adjust the parameters controlling the quantity of phosphorylated Rb : they obtained a phosphorylation of 50% of total Rb after 4 hours of cycle.

Fixed points

X_∞ denotes the steady state concentration of the variable X . By equaling to zero Eqs.(1)-(6), it is possible to calculate the equilibrium values of the variables used in the model. The calculation of $cycD_\infty$, Rb_∞ , $E2F_\infty$, m_∞ is straightforward :

$$\begin{aligned} cycD_\infty &= \frac{a_1 + a_3 H_0 e^{\beta_1(1-P)}}{a_3} \\ Rb_\infty &= \frac{d_2}{d_2 + d_1 cycD_\infty} \\ m_\infty &= m_0 \\ E2F_\infty &= [E2F]_{total} \end{aligned}$$

(3.19)

By equaling to zero Eqs.(2) and (3), we obtain an equation for $cycE_\infty$:

$$cycE_\infty = \frac{b_1 m_0 [E2F]_{tot}}{b_2 + b_3 SCF_\infty}$$

and a third degree equation for SCF_∞ :

$$\begin{aligned} 0 &= -b_3 e_1 cycE_\infty^3 + cycE_\infty^2 (b_3 e_1 - e_1 J_2 b_3 - e_1 b_2 + e_2 b_1 m_0 [E2F]_{tot}) \\ &+ cyc_\infty (e_1 J_2 b_3 - e_1 J_2 b_2 - e_2 J_1 b_1 m_0 [E2F]_{tot} - e_2 b_1 m_0 [E2F]_{tot}) \\ &+ e_1 J_2 b_2 \end{aligned} \quad (3.20)$$

The equation B.2 is solved numerically, for different values of P and of the parameters α , b_1 , e_2 . The resolution gives us the number and the values of the fixed points; we also numerically determined the stability of these fixed points.

3.3 Conclusion

Dans ce premier article, nous avons proposé un modèle mathématique de la transition G1/S en conditions hypoxiques. Notre approche revisite le travail d'Alarcon et *al.* (2004) [49] à la lumière de modèles classiques du cycle cellulaire et de données expérimentales récentes décrivant les effets de HIF-1 α sur les protéines contrôlant la prolifération. Le cœur de notre modèle réside en un «interrupteur moléculaire», impliquant la cycline E et son inhibiteur (SCF). Le passage de la transition G1/S est déterminé par l'activation de cet interrupteur, c'est à dire l'augmentation brutale de l'abondance de la cycline. Si ce basculement ne s'opère pas, la cellule est bloquée en phase de quiescence. L'originalité de notre modèle est l'introduction explicite des liens unissant HIF-1 α aux protéines du cycle cellulaire. Plus précisément, nous avons considéré l'inhibition de la synthèse de cycline D par HIF-1 α , et reproduit par ce biais l'effet de l'hypoxie sur le niveau d'expression de la cycline E. Nous avons ainsi pu proposer un mécanisme possible expliquant l'apparition de chimiorésistances liées à HIF-1 α . En effet, la sur-expression de la protéine dans les cellules tumorales est à l'origine, selon notre modèle, d'une entrée facilitée en quiescence lors d'un épisode hypoxique. Or, la quiescence est connue pour induire une résistance accrue aux attaques cytotoxiques [56], en extrayant les cellules de l'état prolifératif, dans lequel elles sont plus vulnérables. Ainsi, le mécanisme que nous présentons dans ce travail suggère une explication au lien observé, dans la littérature, entre la chimiorésistance et l'inhibition de la cycline D par HIF-1 α [52]. Il décrit également l'existence d'une pression en oxygène seuil P^* en-deçà de laquelle la cellule rentre en quiescence. Dans les cas d'hypoxie modérée, seule la durée de la phase G1 est affectée. De toute évidence, la grande diversité des réponses à l'hypoxie rend délicate la généralisation de ces résultats. Il est donc nécessaire de les comparer à la réalité expérimentale, dans le cas précis des cellules HeLa-FUCCI. L'étude de l'effet de l'hypoxie sur ce modèle cellulaire constitue ainsi la deuxième étape de notre travail.

4

Hypoxie et cycle cellulaire : approche expérimentale

4.1 Introduction

4.1.1 Cadre de l'étude

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié un des liens tissés entre l'hypoxie et le cycle cellulaire, *via* la modélisation de l'interaction de HIF-1 α avec la cycline D. Dans celui-ci, nous allons chercher à caractériser expérimentalement l'influence du manque d'oxygène sur la prolifération, en utilisant les cellules HeLa-FUCCI. Les cellules FUCCI (Fluorescent Ubiquitination-Based Cell Cycle Indicator) constituent une lignée cellulaire récemment créée à partir de cellules HeLa [85]. Comme nous l'avons détaillé en introduction, ce système utilise un couple de protéines oscillatoires, la cdt1 et la geminine, couplées respectivement avec le Kusabira Orange et le vert Azami. En conséquence, les phases G₁, S et G₂ sont marquées avec différentes couleurs. Cette lignée cellulaire permet donc de quantifier la durée de chaque phase de manière non-destructive. Notamment, elle peut être utilisée pour visualiser *in vivo* la progression du cycle [90, 91]. *In vitro*, c'est un outil de choix pour observer les effets sur la dynamique cellulaire de différentes contraintes environnementales, telle que l'hypoxie. Cependant, l'étude de la réponse cellulaire à l'hypoxie en utilisant les cellules FUCCI est rendue compliquée par les effets du manque d'oxygène sur les fluorophores. En effet, comme l'ont montré Kaida *et al.* (2012) [128, 129], le mauvais repliement des marqueurs dans ces conditions éteint la fluorescence et rend donc la quantification de la dynamique du cycle impossible. En revanche, l'utilisation d'inducteurs chimiques de HIF-1 α est envisageable. Comme nous l'avons noté dans le chapitre 2, il existe en effet plusieurs molécules couramment utilisées pour mimer l'hypoxie en induisant l'accumulation de HIF-1 α (CoCl₂, DMOG, DFO). L'action de ces molécules sur le cycle est variable, et

dépend étroitement de la concentration en agent chimique, du temps d'exposition, et de la lignée cellulaire utilisée. Nous avons donc choisi d'étudier l'influence de DFO et CoCl_2 sur les cellules HeLa-FUCCI, afin de tester leur pertinence comme agent mimant l'hypoxie, et d'apporter une contribution à la compréhension de leur action cellulaire et moléculaire. Ce dernier point est d'importance, puisque les chélateurs du fer sont considérés aujourd'hui comme de potentiels agents anti-cancer. Nous nous proposons donc, dans ce chapitre, d'étudier en premier lieu les effets de CoCl_2 et DFO sur la dynamique de prolifération des cellules HeLa-FUCCI. Une première étape est présentée sous la forme d'un article publié dans *The Journal of Cell Biology and Cell Metabolism*. Ces résultats sont complétés par une étude de réversibilité des effets de DFO sur le cycle.

Dans un second temps, nous avons utilisé les cellules FUCCI pour étudier la réponse cellulaire à la réoxygénation. En effet, il a été montré par Kaida et *al.* (2012) [128, 129] que la fluorescence, éteinte par le manque d'oxygène, était récupérable après le retour à la normoxie. Nous avons donc cherché à étudier l'évolution de la dynamique de prolifération lors d'un cycle hypoxie/réoxygénation.

4.1.2 Méthode

Acquisition et traitement des données

Les trois thèmes traités dans ce chapitre (étude des effets de CoCl_2 et de DFO sur le cycle, puis de leur réversibilité, et simulation d'un cycle hypoxie/réoxygénation) reposent sur la quantification de la dynamique de la prolifération en microscopie de fluorescence. Nous avons présenté en introduction les caractéristiques des cellules HeLa-FUCCI. De manière générale, les résultats expérimentaux présentés ici sont issus d'une même méthodologie, mise au point dans le but d'acquérir et de traiter les données de fluorescence des cellules FUCCI. Celle-ci étant présentée en détail en annexe (Annexes A et B), nous nous contentons ici d'en rappeler les grandes lignes. Les cellules sont cultivées dans du DMEM, auquel sont adjoints 10 000 U/ml de streptomycine et 10% de sérum de veau. Le traitement des cellules est réalisé dans des chambres de culture LabTex, permettant une observation directe en microscopie.

Les images de fluorescence sont acquises à l'aide d'un microscope inversé Zeiss Axio Observer.Z1, muni d'une chambre d'incubation adaptée à l'imagerie biologique (régulation de la température et du CO_2), et d'une platine motorisée. Cette dernière permet de réaliser avec précision des expériences en *time-lapse* sur un grand nombre de champs. Un système d'imagerie en fluorescence offre la possibilité d'acquérir le signal en rouge (Texas Red) et en vert (GFP), et de le superposer à l'image obtenue en *bright-field* (transmission). Des images sont ainsi réalisées au cours du temps avec trois canaux, sur environ quarante champs. Sur chacun de ces champs, un protocole de traitement des images (Annexe B) permet de calculer la proportion de cellules en phase G_0 , G_1 , S et G_2 . Un traitement statistique est réalisé sur chaque lamelle, en groupant les champs en quatre échantillons contenant un grand nombre de cellules (200 au minimum). Chaque expérience est ensuite répétée au moins trois fois afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats.

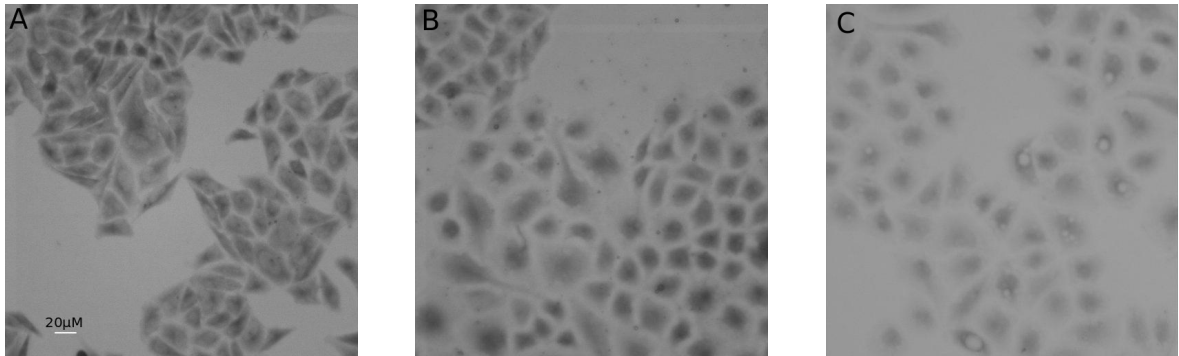


FIGURE 4.1: Induction de HIF-1 α par DFO. La présence du facteur de transcription HIF-1 α est mise en évidence par immunomarquage (révélation à la peroxydase) après 24h de traitement en présence de 250 μM (A), 100 μM (B), ou 0 μM de DFO (C).

Immunomarquage

Nous avons également utilisé un protocole d'immunomarquage indirect de la protéine HIF-1 α . La méthode choisie est une révélation enzymatique à la peroxydase, dont la description complète est donnée dans l'Annexe C. Nous pouvons ainsi repérer la présence intra-cellulaire de la protéine en microscopie à transmission (*bright-field*). La figure 4.1 montre ainsi l'induction de HIF-1 α par DFO. Les zones opaques signalent la présence du facteur de transcription. On constate que l'abondance est relativement faible dans le groupe contrôle, et qu'elle est bien marquée après un traitement de 24h avec 100 et 250 μM de DFO. Cette technique de marquage sera surtout utilisée dans le chapitre suivant.

4.2 Etude des effet de DFO et CoCl_2 sur le cycle cellulaire

4.2.1 Article : B.Bedessem, M-P.Montmasson, M. Hamel, F.Giroud, A.Stéphanou, *Effects of the hypoxia-mimetic agents DFO and CoCl_2 on HeLa-FUCCI cells*, Journal of Cell Biology and Cell Metabolism, 2015

Résumé

Le système FUCCI est un modèle prometteur pour étudier le cycle cellulaire *in vivo* et *in vitro*. En permettant de suivre la progression du cycle en utilisant la microscopie de fluorescence, il peut être utilisé pour visualiser précisément les effets de contraintes extérieures sur la prolifération. Cependant, il a été montré que le manque d'oxygène affecte fortement les fluorophores utilisés dans la lignée HeLa-FUCCI, ce qui limite son utilisation en conditions hypoxiques. Afin d'étudier les effets de l'hypoxie sur la prolifération cellulaire en utilisant cette lignée, il est possible d'utiliser des inducteurs de HIF-1 α , tels que CoCl_2 ou DFO, qui sont souvent utilisés comme agents

hypoxie-mimétiques. Etant donné que ces molécules, inhibant l'utilisation du fer par les protéines qui le nécessitent, sur ont également des propriétés anti-cancer, leurs effets biologiques ont été étudiés dans diverses conditions expérimentales. Une grande variabilité d'action ont été reportées. Dans cette étude, nous investiguons pour la première fois leurs effets sur la prolifération des cellules HeLa-FUCCI. Nous montrons que CoCl_2 a un effet biphasique sur le cycle cellulaire, en promouvant ou en inhibant la progression dans la phase G1. En présence de DFO, nous avons identifié un arrêt en phase G2, suivant un comportement "switch-like". Ces observations sont originales, puisque les chélateurs du fer sont connus principalement pour induire un arrêt lors de la transition G1/S. Ils offrent également des informations sur la possibilité d'étudier l'influence de l'hypoxie sur le cycle cellulaire *via* les cellules FUCCI. Finalement, en considérant les caractéristiques génétiques connues de la lignée HeLa-FUCCI, nous proposons une hypothèse cherchant à expliquer sa réponse particulière aux agents DFO et CoCl_2 . Nous proposons ainsi une action plausible de ces molécules sur la voie MAPK.

Abstract

The FUCCI system is a promising model to study cell cycle *in vivo* and *in vitro*. Because it enables to follow the progression of the cycle using fluorescent microscopy, it can be used to precisely visualize the effects of external stains on proliferation. However, it was reported that the lack of oxygen strongly affects the fluorophores used in the HeLa-FUCCI cell line. As a consequence, it limits its use in hypoxic conditions. To study the effects of hypoxia on cell proliferation by using this cell line, one could use HIF-1 α inducers, such as CoCl_2 and DFO, which are often used as hypoxia-mimetic agents. As these iron-chelators also have anti-cancer properties, their biological effects were studied in various experimental conditions. A great variability of actions were reported. In this study, we investigate for the first time their effect on HeLa-FUCCI cells proliferation dynamics. We find that CoCl_2 has a biphasic effect on cell cycle, by promoting or inhibiting the progression into the G₁-phase. In presence of DFO, we identified an arrest in the G₂-phase, which follows a switch-like behavior. These observations bring original results since iron-chelators are mainly known to induce an arrest at the G₁/S transition. They also provide specific informations about the possibility to use FUCCI cells to study the influence of hypoxia on the cell cycle. Finally, by considering the known genetic characteristics of HeLa cells we propose a hypothesis to explain the particular response of FUCCI cells to DFO and CoCl_2 . The discussion proposes a plausible action of DFO and CoCl_2 on the MAPK pathway.

Background

The FUCCI (Fluorescent Ubiquitination-Based Cell Cycle Indicator) cells is a recently created line of HeLa cells (cervix carcinoma) [85]. This system uses a couple of oscillating cell cycle proteins, cdt1 and geminin, respectively labeled with monomeric Kusabira Orange 2 and monomeric Azami Green. As a consequence, the G₁, S, and G₂/M phases are labeled with different colors. This cell line is useful to quantify the duration of each phase of the cycle, and to determine the percentage of cycling and

non-cycling cells in a non destructive way. Notably, it can be used to visualize *in vivo* the progression of the cycle [90, 91]. *In vitro*, it is a good tool to observe the effects on cell dynamics of various environmental strains, such as hypoxia. The study of the cellular and molecular effects of hypoxia is one of the important challenge of modern biology. Indeed, it is well established that tumor cells undergo chronic hypoxia, due to the limit of oxygen diffusion in the cancer tissue[13, 99]. This chronic hypoxia correlates with an increased resistance to chemotherapy [14, 130]. Notably, hypoxia activates anti-apoptotic pathways [73] and can induce proliferation of cancer cells. Indeed, even though hypoxia is known to induce cell cycle arrest in G_1 phase [3], it was shown that chronic hypoxia can also stimulate proliferation in various cell lines[10–12, 131]. In a general way, it seems that a balance exists between death and survival/proliferating pathways, depending on the duration and severity of the hypoxic event [46]. The complexity of the cellular response to hypoxia is controlled by the HIF-1 α factor, which accumulates when oxygen is lacking [113]. This factor activates signaling pathways which regulate proliferation and death. It was often observed that HIF-1 α accumulates in cancer cells[24, 35]. This accumulation can be due to the physiological chronic hypoxia of cancer cells or genetically determined, for instance by the mutations affecting the von Hippel-Lindau (VHL) gene [132].

However, the study of the effects of hypoxia using HeLa-FUCCI cell line is complex since the lack of oxygen was shown to modify the fluorescence of Kusabira Orange and Azami Green, as shown by Kaida *et al.* (2012) [128, 129]. This artefact makes difficult the use of HeLa-FUCCI cells in real hypoxic conditions. As a consequence, the study of the effect of the hypoxia pathway, notably the stabilization of HIF-1 α , on cell cycle dynamics using this cell line could be done through the use of hypoxia-mimetic chemicals. Indeed, various molecules can be used to mimic hypoxia by inducing HIF-1 α accumulation, such as cobalt chloride (CoCl_2), dimethyloxallylglycine (DMOG), desferrioxamine (DFO). These molecules are also studied for their anti-cancer effect, as iron-chelators [70, 71]. In a general way, they induce HIF-1 α accumulation, but they also have numerous HIF-1 α -independent effects [72]. Notably, they are known to induce apoptosis [73] and cell cycle arrest through complex interactions with regulating proteins [71]. CoCl_2 and DFO are certainly the most commonly used hypoxia-mimetic molecules [74]. As a consequence, their biological effects were relatively well tested over the last years. They both induce apoptosis when their concentration is high enough [73, 75, 76]. However, CoCl_2 seems to promote cell survival during the first 6-8 hours of treatment[45, 77]. Cell proliferation in presence of these agents was assessed using different cell lines. Dai *et al* (2012) [75] have shown that in presence of CoCl_2 , PC-2 cells growth was stimulated during 72h. Then, a dose-dependent inhibition of growth was observed, with an increase of the cell death rate. In a general way, CoCl_2 and DFO are known to inhibit cell proliferation [74]. However, their precise influence on cell cycle is variable. In presence of CoCl_2 , some studies report an arrest in the G_1 phase [74, 78], or in the G_2 phase [79]. In the case of DFO, it is not clear if DFO blocks the cell cycle in G_1 , S, or G_2 phase. Many studies report an arrest on G_1 -phase or in S phase, depending on dose and cell type [74, 80–82]. A recent paper by Siriwardana *et al.* (2013) [83] could precisely differentiate a mid- G_1 -phase arrest and a S-phase arrest. This result suggests that these two types of cell cycle blockage act more or less in

presence of DFO, depending on cell line. In the other hand, some authors also noticed an arrest during the G₂-phase [71, 84]. Clearly, the effects of DFO and CoCl₂ on cell cycle dynamics closely depends on the dose used, the time of exposure, and the cell line studied.

As a consequence, the use of these molecules as HIF-1 α inducers or anti-cancer agents on HeLa-FUCCI cells needs a preliminary study of their biological effects on this cell line. Notably, it is crucial to characterize their effect on cell cycle, using the fluorescent properties of FUCCI cells. It would also bring additional knowledge on the biological response to these anti-cancer molecules. This work thus proposes, for the first time, to investigate the effects of iron-chelator DFO and CoCl₂ on HeLa-FUCCI cells proliferation dynamics. We constructed our study as follows. We first verified that a lack of oxygen generates a fluorescence extinction, even in moderate hypoxia (3% O₂). To evaluate the toxicity of DFO and CoCl₂, we studied their influence on cell death and cell growth of HeLa-FUCCI cells. This first step is necessary to rigorously interpret the fluorescent data. It also provides interesting comparative results of the cellular effects of the two molecules. Then, we studied their actions on the cell cycle dynamics of HeLa-FUCCI cells. We show that this cell line exhibits an original response to iron-chelators DFO and CoCl₂, quite different from observations obtained with other cell lines, mainly showing an arrest at the G₁/S transition [71]. In our experimental conditions, DFO generates a G₂-phase arrest of the cell cycle when its concentration passes a threshold. CoCl₂ acts on cell proliferation following a complex biphasic effect. Depending on dose and time of exposure, it promotes or inhibits the entry into the cycle. By using some known elements of the genetic characteristics of HeLa cells, we propose a molecular mechanism to explain our observations. It gives hypothesis to test the action of DFO and CoCl₂ on the MAPK pathway.

Methods

Culture conditions HeLa cells expressing the FUCCI probes (HeLa-FUCCI) were provided by the RIKEN BRC through the National Bio-Resource Project of MEXT, Japan. Cells were maintained in DMEM (PAA, Piscataway, NJ), with 10 000 U/ml of penicillin-streptomycin and 10% of fetal bovine serum at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. For CoCl₂ and DFO treatments, a 50mM solution of CoCl₂ and a 20mM solution of DFO were prepared by dissolving cobalt chloride (Cobalt(II) Chloride hexahydrate, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) and DFO (Deferoxamine mesylate, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) in ultra-pure water. Defined volumes of these solutions were added to cells previously cultured for 12 hours on one chamber Lab-tek cover-glasses (initial concentration : 1.10^5 cells per mL). All experiments are compared to control groups. Cells in control groups were cultured in the same conditions than the DFO or CoCl₂ groups, but without any chemicals. For the experiments in hypoxia we used a SANYO MCO-5M cell culture incubator which allows one to impose various conditions of oxygen pressure on the cells.

Cell death measurements The number of cells and the level of cell death were determined using Trypan Blue. After treatment with trypsin, 20 μ L of cells in DMEM

were mixed with 20 μL of Trypan Blue (Trypan Blue 0.4%, Invitrogen, Eugene, Oregon). Cell concentration and viability were automatically determined using Invitrogen Countess Automated Cell Counter®. The experiments were performed in quadruplicate cultures. Statistical analysis was performed to compare mortality ratio and cell concentration for the different experimental conditions. We applied Student tests to compare average values.

Fluorescent imaging Fluorescent images were taken using a Z1 Axio Observer inverted fluorescent microscope (ZEISS, Iena, Germany). This microscope is equipped with a EMCCD Camera (Hamamatsu C9100-13) and is piloted with the AxioVision software. For each cover-glass, corresponding to the different experimental conditions, images were taken with three canals (GFP, Texas-Red and Bright Field), in 40-60 fields, representing a total of about 4000 cells after 48h of growth in normoxic conditions and 10000 cells after 96h.

Cell cycle phases definition The definition of the different cell cycle phases was originally presented by Sakaue-Sawano *et al.* (2008) [85]. It was then notably used by Nagano *et al.* (2013) [89]. Figure 4.2A presents the classical definition of the cell cycle phases in the FUCCI system, and figure 4.2B presents a microscopic field where all phases are visible and can be distinguished. Cells with a visible red fluorescence are considered to be in the G_1 phase, green cells are in the G_2 phase, red and green cells in the S phase. Cells in M phase are not fluorescent. Since our study specifically considers the entry into the G_1 phase, we named G_0/G_{1init} the phase of the non-fluorescent cells which are not in the M phase. “G0” stands for the quiescent state and G_{1init} stands for the very beginning (i.e. initiation) of the G_1 phase. Indeed, biologically, these cells can be in a quiescent (G_0) state or in early G_1 phase [85]. The M and G_0/G_{1init} phases were distinguished using a morphological criterion (figure 1). Indeed, cells in M phase present characteristic features (spheric shape, absence of nucleus). This criterion is based on the classical tools used to identify mitosis in cell cultures. This phase is highly recognizable since the cells take a typical morphology, characterized by a spherical shape and the absence of nucleus.

Images processing and statistics To study the influence of CoCl_2 and DFO on the cell cycle, the fluorescent images were processed using ImageJ and Matlab (Mathworks 2012a) to count, in each field, the number of fluorescent cells. An example of the images we used is given on Figure 1.B. We used ImageJ (ImageJ 1.46a) and Matlab (Mathworks 2012a) to analyze these fluorescence data. The images are filtered to eliminate noise, and binarized to isolate the cells. We then create masks that we apply to the original images to extract the red and green fluorescences. If they are superior to the noise, they are taken into account to identify the cell phase. The non-fluorescent cells (M or G_0/G_{1init}) are manually counted. Thus, the percentage P of cells in each phase is obtained for each field of the cover-glass considered. To statistically estimate the mean value of P, we consider in this cover-glass 10 samples of more than 500 cells. In this way, the value of P and its standard deviation is obtained for each experimental conditions.

We statistically compared these values of P by using Student tests. Four independent series of experiments were performed in order to test the reproducibility of the results.

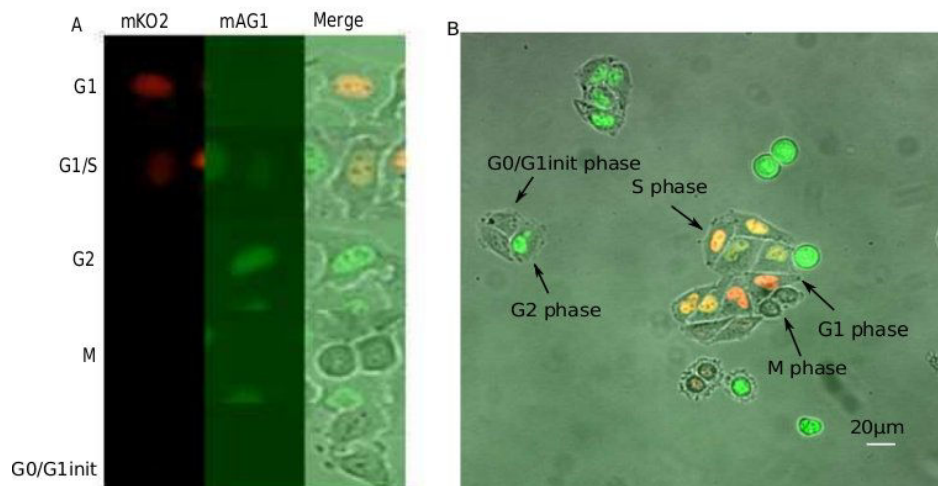


FIGURE 4.2: Fluorescent images of HeLa-Fucci cells. A. Criteria for the classification of FUCCI cells into each cell cycle phase. From the left to the right : red channel, green channel, and merge of red, green and bright-field channels. Red cells are in the G_1 phase, cells with both red and green fluorescence are in the S phase, green cells are in the G_2 phase. Non-fluorescent cells are in M or G_0/G_1 *init* phase. These two phases are differentiated with morphological criteria. B. Example of a microscopic field with FUCCI-cells in different phases of the cycle.

Results

Fluorescence extinction of HeLa-FUCCI cells in hypoxic conditions HeLa-FUCCI cells are known to lose their fluorescence under hypoxia [129]. According to Kaida and Miura (2012) [128], this is due to the expression of proteins containing non-oxidized chromophores. We first submitted HeLa-FUCCI cells to moderate hypoxia to verify if the extinction occurs in such smoother condition. First observations made after an exposure of 48h at 3% O_2 confirm the existence of a phenomenon of fluorescence extinction. The fluorescence is recovered after 3 hours in normoxia. Figure 4.3A shows this effect of hypoxic loss and normoxic recovery of fluorescence in a representative field of a cover-glass cultivated at 3% O_2 and observed along time in normoxic conditions. Following the same methods as Kaida et al. (2012) [129], we quantified this fluorescence recovery of Kusabira Orange 2 and monomeric Azami Green. After 48h at 3% O_2 , the cells were reoxygenated and we followed the time evolution of the maximum fluorescence response for the two fluorescence channels. The results presented were obtained by sampling a cover-glass into forty microscopic fields, with more than fifty cells in each one. Images were taken every twenty minutes for about five hours. The maximum fluorescence was extracted along time in each of these fields, and the average fluorescence calculated. Figure 4.3B shows that the maximum red fluorescence increases for almost 2 hours. Thus, even under moderate hypoxia, the artefact linked

to the fluorescence extinction makes difficult the use of HeLa-FUCCI cells to study cell cycle dynamics under real hypoxia. That is why it is necessary to test the relevance of the hypoxia-mimetic chemicals DFO and CoCl_2 to simulate the effects of a lack of oxygen on cell proliferation.

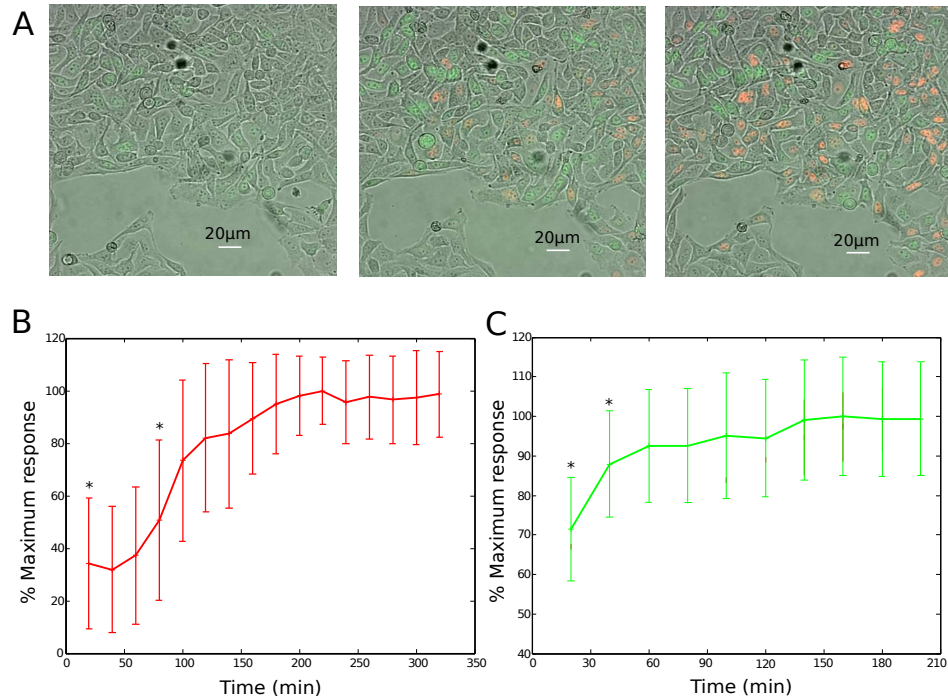


FIGURE 4.3: Fluorescence recovery after reoxygenation of HeLa-FUCCI cells exposed to moderate hypoxia (3% O_2 during 48h). A. Fluorescence imaging of FUCCI cells after 20, 120 and 220 min of reoxygenation (from the left to the right). B. The red and C. the green fluorescence signals after reoxygenation are plotted as functions of time. The values are calculated by considering the average of the 10% most fluorescent pixels of each field, and normalized to the maximal value, as done by Kaida *et al.* (2012) [129]. The statistics are calculated using Student's test, with respect to the fluorescence measured 20min after reoxygenation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Estimation of DFO and CoCl_2 toxicity In order to determine the range of concentrations to be used, we first investigated the toxicity of DFO and CoCl_2 after 48h of treatment for our cell line. For DFO, we found a significant increase of cell death compared to control for a concentration of 1mM, compared to a control cultured in the same conditions but without DFO. In the case CoCl_2 , this threshold concentration is 400 μM (data not shown). Both values are much higher than those reported for other cell lines. For example, the apoptotic ratio is already significant at 200 μM CoCl_2 for PC-2 cells [75] and also for mouse embryonic stem cells where Lee *et al.* (2013) [76] have reported a mortality ratio of 40% after 48h at 150mM CoCl_2 . For DFO, Guo *et al.* (2006) [73] found an effect of a 48h exposure to DFO on cell death for a concentration of 100 μM. As a consequence, it appears that the toxicity of these molecules strongly depends on the cell line. In order to isolate the effects of DFO and CoCl_2 on the cell

cycle from its influence in inducing cell death, we limited the use of these molecules to their non-toxic concentration range. In the rest of the study, we then used concentrations up to $500\mu\text{M}$ for DFO, and up to $200\mu\text{M}$ for CoCl_2 .

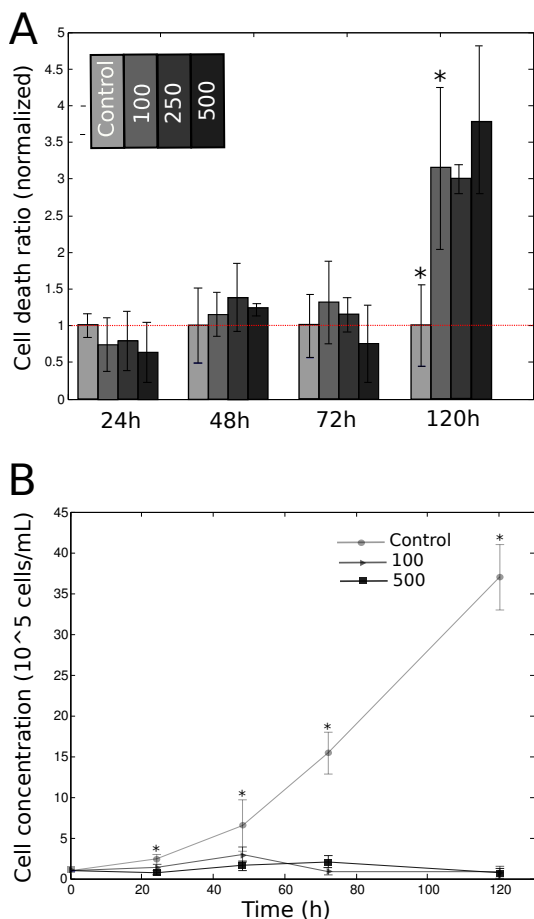


FIGURE 4.4: Effect of DFO on cell growth and mortality. A. Mortality of HeLa-FUCCI cells treated with DFO (100 , 250 and $500\mu\text{M}$) during 24h , 48h , 72h and 120h . The values were normalized, at each time, to the mortality of the control group (red dotted line). B. Growth profile of HeLa-FUCCI cells treated with $100/500\mu\text{M}$ of DFO. Statistics were calculated using Student's test, with respect to the control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

DFO promotes cell death and inhibits cell growth We first measured the mortality (or cell death ratio) for different concentrations of DFO, at 24h , 48h , 72h , and 120h . Figure 4.4.A shows the evolution of mortality after a treatment from 24 to 120h by 0 , 100 , 250 or $500\mu\text{M}$ DFO. We observe that the influence of DFO on cell death is visible after a relatively important delay. Indeed, for the concentrations we used, DFO has no effect before 120h of treatment. Thus, HeLa-FUCCI cells are relatively resistant to long-term toxicity of DFO, since Renton *et al.* (1996) [84] found a toxic effect at $10\mu\text{M}$ DFO after 3 days in glioma cells. We then built the cell growth profile by evaluating the total cell concentration (live and dead cells) in the culture (Fig. 4.4.B). DFO inhibits cell growth, and this effect is not due to cell death. As a consequence, it may be due to its influence on cell cycle dynamics.

Dose and time dependency of CoCl_2 effect on cell death and growth We did the same work with CoCl_2 , for 0 , 100 and $200\mu\text{M}$ (Fig.4.5). The results obtained

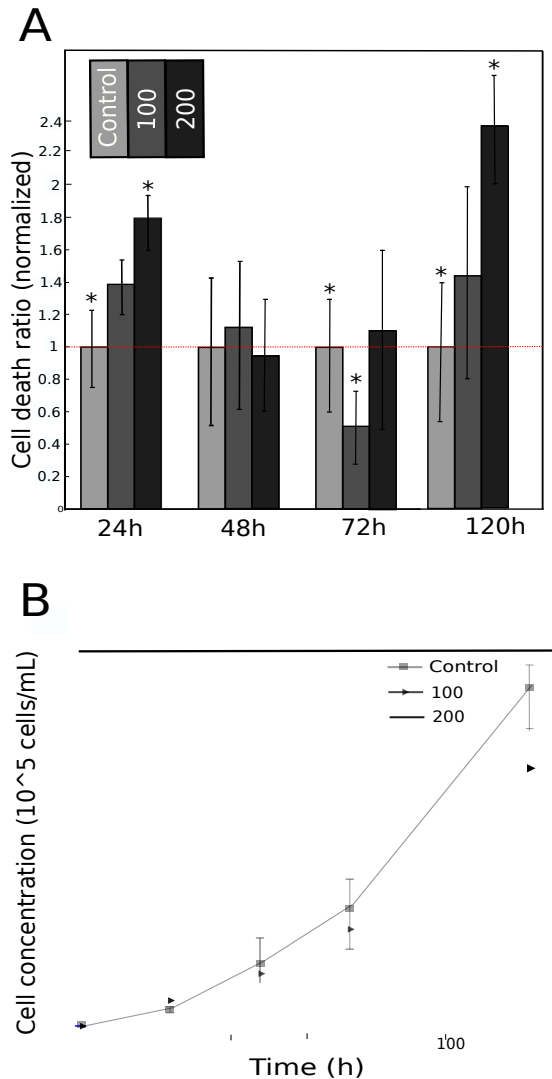


FIGURE 4.5: Effect of CoCl_2 on cell growth and mortality. A. Mortality of HeLa-FUCCI cells treated with CoCl_2 (100, 200 μM) during 24h, 48h, 72h and 120h. The values were normalized, at each time, to the mortality of the control group (red dotted line). B. Growth profile of HeLa-FUCCI cells treated with 100/200 μM CoCl_2 . Statistics were calculated using Student's test, with respect to the control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

exhibit a more complex cellular response. We first observe three steps in the evolution of the cell death ratio. At 24h, CoCl_2 induces cell death (multiplied by 1.8 compared to control for the 200 μM group). After this first response of the cells to the chemical agent, CoCl_2 has a zero (at 48h) or negative effect (at 72h, 100 μM group) on mortality. Then, at 120h, CoCl_2 induces cell death. The action of CoCl_2 is time and dose dependent, with a complex evolution during the treatment. At short and long time-scale, CoCl_2 promotes cell death. At medium time-scale, it does not have any effects, or it reduces cell death. The growth profile shows that at the beginning of the treatment (24h), the cells concentration in the CoCl_2 -treated groups is more important than in the control group (increase of 50% for the 200 μM group compared to control). This observation is statistically significant ($P < 0.05$). Therefore, cell growth is stimulated by CoCl_2 . As mortality is more important at 24h in CoCl_2 -treated group than in control group, this increase of cell concentration is certainly due to a stimulation of cell division. At the opposite, after 48h of treatment, an inhibition of cell growth is observed for the 200 μM

group (decrease of 45% at 72h). This behavior must be due to an inhibition of cell division, up to 120h. After this time, the increase of the dead cells ratio may influence the population growth. The 100 μ M group grows with the same kinetic as the control group.

These results shows that CoCl₂ and DFO have very different influences on cell death and cell growth. DFO rapidly inhibits cell proliferation, and induces cell death after 120h. CoCl₂ acts in a more complex manner. It promotes cell death or survival, and inhibits or promotes cell growth depending on dose and time of exposure. The comparison between mortality and population growth enables to estimate the division rate of the cell. For CoCl₂, at 24h, a reasonable hypothesis is that the proliferation rate is necessarily much higher for the 200 μ M group than for the control group, since the population growth is more rapid whereas the mortality is higher. As a consequence, our results with HeLa-FUCCI cells suggest that the biphasic effect observed in population growth is most probably due to modifications of the cell cycle dynamics. In a similar way, the inhibition of cell growth in the DFO-treated groups is not due to an increase of mortality, but certainly to a blockage of cell cycle progression.

DFO promotes cell cycle arrest in G₂-phase of HeLa-FUCCI cells By using fluorescent microscopy, we first imaged the progression of the cell cycle in control and DFO-treated groups. Figure 4.6 gives a representative example of the observed effects of DFO on cell cycle. Compared to the control group, the cells treated during 24h with a 500 μ M solution of DFO show a very important proportion of green cells. This observation suggests that DFO tends to block the cell cycle during the G₂-phase. In order to test and precise this hypothesis, we evaluated the temporal evolution of the G₂-phase proportion for populations treated with a large range of DFO concentrations, from 10 to 500 μ M. Figure 4.7 presents the results. They were calculated using the statistical method described in the Material and Methods section. We first observe that DFO has an effect on cell cycle for concentrations bigger than 10 μ M. For concentrations from 25 to 500 μ M, the proportion of cells in the G₂-phase is above 80% after 72h. It means that nearly all the cells are blocked in G₂-phase. The kinetics of cell cycle arrest strictly depends in this case on DFO concentration. Thus, the DFO-mediated cell cycle arrest in the G₂ phase appears to be a switch-like phenomenon. At low concentration, there is no effect. When DFO level reaches a threshold, more than 80% of the cells are blocked after 72h. The kinetics of this blockage at the population scale depends on the DFO concentration.

CoCl₂ has a biphasic effect on HeLa-FUCCI cells proliferation dynamics

We then applied the same protocol to characterize the influence of CoCl₂ on the cell cycle dynamics. By using the cell cycle phase definition described in the Material and Methods section, we could measure the ratio of non-cycling cells (G₀/G_{1^{init}} cells). We performed this measurement for control, 100 μ M and 200 μ M groups, after 24h and 72h of treatment (Fig.4.2.1). At 24h, CoCl₂ decreases the ratio of G₀/G_{1^{init}} cells (decrease of 35% for 100 μ M and 30% for 200 μ M compared to control). At 72h, the 100 μ M group

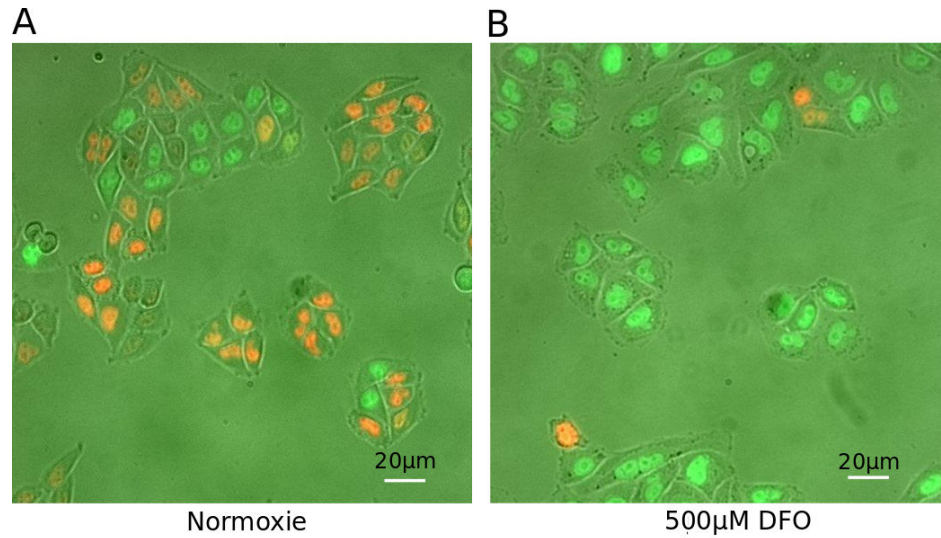


FIGURE 4.6: Visualization of the effects of DFO on cell cycle progression of HeLa-FUCCI cells. A. Example of a representative field of a cover-glass cultivated during 24h in normal conditions (control group). B. Representative field of a cover glass cultivated during 24h with 500µM DFO.

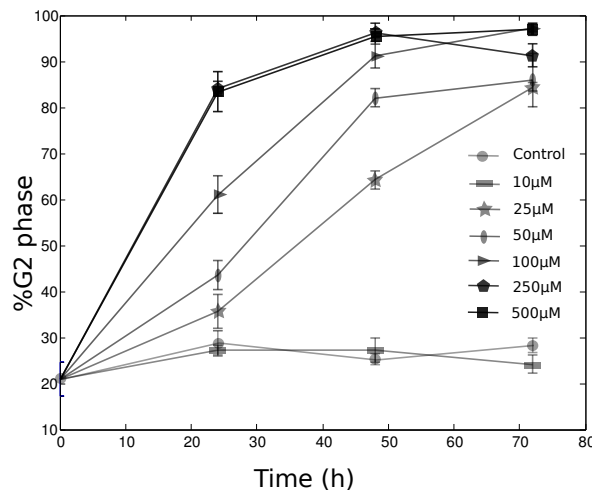


FIGURE 4.7: Time evolution of the percentage of cells in the G₂ phase in cultures submitted to different levels of DFO. The ratio (expressed in %) of HeLa-FUCCI cells in G₂-phase is measured along time, for various concentrations of DFO (from gray to black : control, 10µM, 25µM, 50µM, 100µM, 250µM, 500µM). Statistics were calculated using Student's test, with respect to the control group. *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001.

does not show any significant changes in G_0/G_{1init} ratio compared to the control group. The 200µM group is characterized by an important increase of G_0/G_{1init} ratio compared to control (increase of 150%). Interestingly, there is no significant change in the G_2+M and G_0+G_1 cells percentage (data not shown). The reproducibility of these results was tested with four independent series of experiments. These observations thus suggest that CoCl_2 influences the transition between G_0/G_{1init} and G_1 phase, that is to say the entry into the cycle. We conclude that the HIF-1 α inducer CoCl_2 modulates the ability of the cells to begin their cycle. Interestingly, this influence of CoCl_2 is biphasic, and determined by time and dose. After 24h of treatment, CoCl_2 strongly promotes entry into the cycle. At 72h, this effect vanishes for the 100µM group, and is reversed for the 200µM group. CoCl_2 becomes an inhibitor of the entry into the cell cycle.

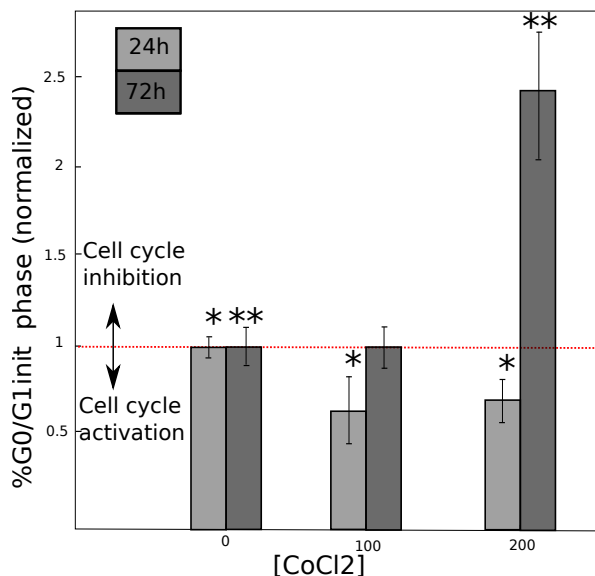


FIGURE 4.8: Effect of CoCl_2 on the entry into the cell cycle. The ratio of HeLa-FUCCI cells which have stopped cycling (G_0/G_{1init} cells) is measured after a 24h or 72h treatment with 100 or 200 μM CoCl_2 , and normalized to the normoxic value (horizontal red dotted line). The statistics were calculated using Student's test, with respect to the control group (without CoCl_2). * $P < 0.001$, ** $P < 0.0005$.

Discussion

In this work, we tested for the first time, on HeLa-FUCCI cells, the effect on cell death, cell growth and cell cycle of two widely used hypoxia-mimetic molecules (DFO and CoCl_2). Our principal result concerns the characterization of the cell cycle dynamics using fluorescent microscopy. We found that CoCl_2 has a biphasic effect on this cell line. It first promotes the progression into the G_0/G_1 phase, and inhibits it in a second time. DFO was found to induce a cell cycle arrest in G_2 phase, following a switch-like behavior. When its concentration reach a threshold ($10\mu\text{M}$), more than 80% of the cells stops in this phase with a kinetics depending on DFO concentration. This observation leads to various types of conclusions. First, it provides interesting informations about the use of hypoxia-mimetic agents on FUCCI cells. We notably found that the effects of the molecule used are different from the known cellular response of hypoxia, which tends to promote cell cycle arrest in G_1 phase [3, 48, 51]. We note here that the use of HeLa-Fucci cells allowed us to distinguish the G_0 from a G_{1init} phase, which would not have been possible with other techniques such as flow cytometry. We could thus precisely quantify the effects of CoCl_2 on the entry into the cycle. From our work, it appears that DFO and CoCl_2 certainly have a large range of biological effects on HeLa-FUCCI cells which hides the consequences of HIF-1 α induction. This conclusion shows strong obstacles to the use of HeLa-FUCCI cells to study the effect of hypoxia on the cell cycle. However, as we have shown that the fluorescence recovers after about 2-3 hours in normoxia, this cell line can be a good tool to study the influence of reoxygenation on cell cycle dynamics. The tools we developed in this study could be used towards this interesting perspective.

Second, the cellular response to Fe-depletion has been intensely studied over this last years [71]. In this framework, the results we obtained with the HeLa-FUCCI cell line are surprising. Whereas these two molecules were often shown to promote cell cycle arrest in G_1 or S phase, they act differently in HeLa-FUCCI cell line. The biphasic effect of CoCl_2 on cell growth was reported in the study by Dai *et al.* (2012) [75], but the

authors did not explain this observation by precisely studying the cell cycle dynamics. As the FUCCI cells allow us to follow the G_0/G_1 progression (non-colored to red cells), we could observe the biphasic effect of CoCl_2 on the entry into the cycle. Moreover, the G_2 -phase arrest in presence of DFO was rarely observed [71]. How can we explain the particular features of the response of HeLa-FUCCI to iron-chelators DFO and CoCl_2 ? In their review, Yu et al. (2007) [71] note that one of the principal actor of the G_1/S arrest in presence of these molecules is the p53 protein, which inhibits the cyclins D and E. Yet, HeLa cells are known to have low p53 activity [133–135]. This could explain the absence of a G_1 -phase arrest. This idea is confirmed by the fact that cell lines exhibiting a G_1 -phase arrest in presence of DFO or CoCl_2 seem to present a wild-type p53 activity : hMSC [74], UCC-2 [78], T-Lymphocytes [80]. Interestingly, the study by Brodie et al. (1993) [81] quantified the proliferation of two cell lines in presence of DFO. The SKN-SH cell line (neuroblastoma) is very sensitive to G_1 phase arrest. It has a non-mutated p53 activity, as suggested by the results of Kim et al. (2002) [136]. On the contrary, the T98G cell line (glioblastoma) is not sensitive to G_1 phase arrest, and it presents a low p53 activity [137]. The low p53 activity of HeLa cells is also coherent with the high resistance to apoptosis we observed in this study. If p53 cannot explain the cell response to DFO and CoCl_2 , which pathway could be involved?

The MAPK signaling cascade is strongly activated by iron-chelators [71]. More specifically, it was shown that DFO and CoCl_2 activate this pathway [79, 138–140]. Besides, it is functional in the HeLa cell line [141, 142]. The enzymes of the MAPK family, notably p38, ERK and MEK have numerous effects on the cell cycle. First, they are known to inhibit the G_2/M transition, and to promote G_2 -phase arrest of the cell cycle [143]. Second, it was shown that they have an effect on G_0/G_1 progression. On the one hand, ERK1/2 can inhibit the progression into the G_0/G_1 phase by promoting the synthesis of Mirk/Dyrk1B [144]. On the second hand, it was recently shown that in HeLa cells, ERK1/2 promotes proliferation by activating the progression into the G_1 phase [145]. Thus, ERK can have two opposite effects on cell proliferation. It provides a promising approach to explain the biphasic response to CoCl_2 we observed with HeLa-FUCCI cells. Interestingly, a biphasic effect related to MAPK activation by Cd and Hg was observed by Hao et al. (2009) [146]. As a consequence, our hypothesis that the response of HeLa-FUCCI cells to CoCl_2 treatment is due to the activation of the MAPK pathway may be relevant. Following this view, in presence of CoCl_2 , proteins activating cell proliferation are primarily synthesized. The work of Bai et al. (2015) [145] suggests that the p-c-fos protein could be involved in this step. Then, Mirk/Dyrk1B gene is expressed, and the progression into the G_0/G_1 phase is slowed down. As our experiments show that the biphasic time-response to CoCl_2 is coupled to a biphasic dose-response, we can suggest that the differential activation of the Mirk and p-c-fos pathways could also depend on the concentration of the chemical. However, in this framework, it remains difficult to understand why DFO and CoCl_2 have different actions on the cell cycle dynamics. It may depend on the type of enzymes activated by each of these agents. DFO would activate the MAPK-mediated G_2 -phase arrest, and CoCl_2 the biphasic action of MAPK on the G_0/G_1 progression. The complexity of the MAPK pathway and the huge number of its targets do not allow to propose a more precise hypothesis. In all cases, the idea of a predominance of the MAPK pathway,

because of the inactivity of p53 activity, is an interesting hypothesis. It could be tested with molecular biology protocols. There would be many approaches to test. That is why we chose to limit our work to this first investigation at the cellular scale. For instance, it would be interesting to observe the effects of chemical inhibitions of the MAPK signaling cascade, as made in previous studies [143, 145]. If the hypothesis is verified, HeLa-FUCCI cells would be a good tool to precisely study the poorly known impact of iron-chelators agents on the MAPK pathway.

4.2.2 Conclusion

Dans ce deuxième article, nous avons utilisé les cellules HeLa-FUCCI pour tester les effets sur la prolifération de deux molécules largement utilisées pour mimer l'hypoxie (DFO et CoCl_2). Il est apparu tout d'abord que CoCl_2 avait un effet biphasique sur cette lignée cellulaire : la molécule promeut en un premier temps la progression dans la phase G_1 , avant de l'inhiber. Nous avons également montré que DFO induisait un arrêt en phase G_2 , selon un comportement "switch-like". Lorsque sa concentration dépasse un certain seuil ($10\mu\text{M}$), plus de 80% des cellules arrêtent leur cycle en suivant une cinétique dépendant de la concentration en DFO. Différents types de conclusions peuvent être tirées de ces résultats. En premier lieu, ils fournissent des indications sur la pertinence de l'utilisation de molécules pour mimer l'hypoxie sur la lignée HeLa-FUCCI. Les effets observés s'écartent notablement des réponses connues au stress hypoxique, qui tend à induire un arrêt du cycle en phase G_1 [3, 48, 51]. Il semble donc que DFO et CoCl_2 aient un grand éventail d'effets biologiques, qui masquent les conséquences de l'induction de HIF-1 α . Leur utilisation ne peut donc pas être considérée comme équivalente à une hypoxie réelle. Notons que d'autres molécules inductrices de HIF- α pourraient être utilisées pour étudier les effets de l'hypoxie sur les cellules HeLa-FUCCI. Le DMOG, par exemple, est un inhibiteur compétitif des PHDs [147]. Par ce biais, il stabilise HIF-1 α [148]. Cependant, le DMOG étant un analogue du 2-oxoglutarate, il inhibe également les dioxygénases dépendantes du 2-oxoglutarate [149]. Etant donné, en outre, le phénomène d'extinction de la fluorescence que nous avons observé, il apparaît donc que les cellules FUCCI ne sont pas un matériel aisé à utiliser pour étudier les effets de l'hypoxie sur la dynamique du cycle. Cependant, elles offrent la possibilité de pouvoir suivre le comportement cellulaire lors d'une réoxygénation. Le rétablissement de la fluorescence après 2-3h en normoxie autorise en effet à suivre la dynamique du cycle après un cycle hypoxie/réoxygénation. Nous aborderons ce thème dans le chapitre suivant.

Deuxièmement, notre travail apporte des compléments intéressants à l'étude de l'influence des molécules perturbant l'utilisation cellulaire du fer sur la dynamique du cycle cellulaire. Ce champs d'étude est particulièrement dynamique actuellement, de part les propriétés anti-cancéreuses de ce type de molécules [71]. L'utilisation des cellules HeLa-FUCCI apporte ici une plus-value importante, puisqu'elles nous permettent de suivre précisément la progression de la phase G_1 . Notamment, nous avons pu différencier la phase G_1 proprement dite d'une phase $G_0/G_{1_{init}}$, ce qui n'aurait pas été possible en cytométrie de flux. Nous avons donc pu quantifier finement les effets de

CoCl_2 sur l'entrée dans le cycle. Les résultats que nous avons obtenus avec les cellules HeLa-FUCCI sont surprenants. Alors que ces deux molécules sont connues pour provoquer un arrêt du cycle en phase G_1 ou S, leurs effets sont ici très différents. Tout d'abord, l'effet biphasique de CoCl_2 sur la croissance cellulaire a été mis en évidence par Dai et *al.* (2012) [75], mais les auteurs n'ont pas complété ce résultat par l'étude fine de la dynamique du cycle cellulaire. En suivant finement la progression dans la phase G_1 , nous avons montré que CoCl_2 pouvait promouvoir ou inhiber l'entrée dans le cycle. D'autre part, l'arrêt en phase G_2 en présence de DFO n'a été que très rarement observé [71]. Comment pouvons nous expliquer ces caractéristiques de la réponse des cellules FUCCI aux agents DFO et CoCl_2 ? Dans leur review, Yu et *al.* (2007) notent que l'un des principaux acteurs de l'arrêt en G_1/S en présence de ces molécules est la protéine p53, qui inhibe les cyclines E et D. Or, les cellules FUCCI sont connues pour avoir une activité p53 très faible [133–135]. Cela pourrait donc expliquer l'absence d'arrêt en G_1/S . Cette idée est confirmée par le fait que les lignées cellulaires exhibant ce type de blocage du cycle en présence de DFO ou de CoCl_2 semble présenter une activité p53 normale : hMSD [74], UCC-2, [78], Lymphocytes-T [80]. De manière significative, l'étude de Brodie et *al.* (1993) [81] quantifie la prolifération de deux lignées cellulaires en présence de DFO. Les cellules SKN-SH (neuroblastome) sont très sensibles au blocage en G_1/S ; elles présentent en outre une activité p53 normale [136]. A l'inverse, les cellules T98G (glioblastome) ne sont pas sensibles à l'arrêt en phase G_1 , et sont caractérisées par une faible activité de la protéine p53 [137]. L'idée d'une inhibition de la voie p53 dans les cellules HeLa-FUCCI est confirmée par la forte résistance à l'apoptose que nous avons constatée dans cette étude. Si la protéine p53 ne peut pas expliquer les effets de DFO et CoCl_2 , quelle voie de signalisation est impliquée?

La cascade de signalisation MAPK (MAP Kinases) est fortement activée par les chélateurs du fer [71]. Plus spécifiquement, il a été montré que DFO et CoCl_2 activent cette voie [79, 138–140]. En outre, elle est fonctionnelle dans les cellules HeLa [141, 142]. Les enzymes de la famille MAPK, notamment p38, ERK et MEK ont de nombreux effets sur le cycle cellulaire. Premièrement, elles sont connues pour inhiber la transition G_2/M , et pour promouvoir un arrêt en phase G_2 du cycle cellulaire [143]. Deuxièmement, il a été montré qu'elles ont également un effet sur la progression en phases G_0/G_1 . D'une part, ERK1/2 peut inhiber la progression de la phase G_1 en promouvant la synthèse de Mirk/Dyrk1B [144]. D'autre part, il a été montré récemment que dans les cellules HeLa, ERK1/2 joue sur la prolifération en activant l'entrée dans le cycle. Ainsi, les ERK peuvent avoir deux effets opposés sur la prolifération cellulaire. Cette donnée fournit une approche prometteuse pour comprendre la réponse biphasique des cellules FUCCI au CoCl_2 . De manière intéressante, un tel effet biphasique lié à l'activation de la voie MAPK a été observé par Hao et *al.* (2009) [146]. Notre hypothèse est alors la suivante. En présence de CoCl_2 , les protéines activant le cycle cellulaire sont d'abord synthétisées. Les travaux de Bai et *al.* (2015) [145] suggèrent que la protéine p-c-fos pourrait être impliquée dans cette étape. Puis, le gène Mirk/Dyrk1B est exprimé, et la progression dans la phase G_1 est ralentie. Etant donné que nos expériences montrent que la réponse biphasique au CoCl_2 dépend du temps, mais également de la dose, nous pouvons suggérer que l'activation différentielle des voies Mirk et p-c-fos pourrait

dépendre également de la concentration de la molécule. Cependant, dans ce cadre, il reste difficile de comprendre pourquoi DFO et CoCl_2 ont des effets différents sur la dynamique du cycle cellulaire. Cela pourrait dépendre du type d'enzymes sur lesquelles jouent chacun de ces agents. DFO activerait l'arrêt en G_2 médié par la voie MAPK, et CoCl_2 l'action biphasique des MAPK sur la progression en phase G_1 . La complexité de cette voie de signalisation, et le nombre important de ses cibles empêche de proposer un scénario plus précis. Dans tous les cas, l'idée d'une prédominance de la voie MAPK due à une inactivité de la protéine p53 est une hypothèse intéressante. Nous avons résumé nos conclusions sur la figure 4.9. Il serait nécessaire, bien évidemment, de les tester dans le cadre d'une étude plus poussée de biologie moléculaire. Par exemple, il pourrait être intéressant d'observer les effets d'inhibitions chimiques de la voie de signalisation MAPK. Si notre hypothèse est vérifiée, les cellules HeLa-FUCCI pourrait être un bon outil pour étudier l'impact peu connu des molécules diminuant l'utilisation intra-cellulaire du Fer sur la cascade MAPK.

4.3 Récupération après blocage en phase G_2

Dans l'article précédent, nous avons montré l'existence d'un blocage du cycle en phase G_2 après traitement au DFO. Pour des concentrations supérieures à $10\mu\text{M}$, les cellules HeLa-FUCCI subissent en effet un arrêt progressif en phase G_2 , dont la cinétique dépend de la concentration en agent chimique. Afin de compléter nos résultats, nous avons étudié la réversibilité de l'effet de DFO sur le cycle. Dans quelques publications traitant de la prolifération en présence de chélateurs du fer, cet aspect du problème est abordé. Dans les travaux de Broodie et *al.* (1993) [81], le milieu contenant du DFO ($40\mu\text{M}$) est remplacé par du milieu frais après 48h de traitement. Les auteurs observent un redémarrage du cycle dans le cas de cellules de glioblastome, mais pas dans le cas du neuroblastome. Metzendorf et *al.* (2010) [82] ont quant à eux montré que l'inhibition était réversible après 48h en présence de $10\mu\text{M}$ de DFO. Nous avons choisi de réaliser une étude plus systématique sur les cellules HeLa-FUCCI, afin de détecter d'éventuels seuils d'irréversibilité pour l'action de DFO. Le protocole choisi a été le suivant. Après différents temps d'exposition (24h ou 48h) à $50\mu\text{M}$ ou $250\mu\text{M}$ de DFO, les lames sont rincées plusieurs fois et le milieu remplacé par du milieu frais. La dynamique du cycle est alors suivie et quantifiée en microscopie de fluorescence, en suivant la méthodologie décrite précédemment. La figure 4.10 donne à voir l'évolution de la fluorescence dans un champs représentatif, après 24h de traitement avec $250\mu\text{M}$ de DFO puis changement du milieu. Il apparaît qu'après un certain temps de latence (une vingtaine d'heure), les cellules initialement bloquées en phase G_2 tendent à rentrer en mitose, initiant ainsi le redémarrage du cycle : de nombreuses cellules en phase G_1 et S sont visibles après 30h. Il semble donc qu'après 24h de traitement, le blocage soit réversible même pour une forte dose de DFO. Afin de quantifier cette observation, nous avons calculer l'évolution de la proportion de cellules en phase G_2 au cours du temps après le changement de milieu. Les résultats sont présentés sur la figure 4.11 A. On constate une baisse significative de la quantité de cellules encore bloquées après environ 20h. Après environ 50h, la proportion de cellules en G_2 se stabilise autour de

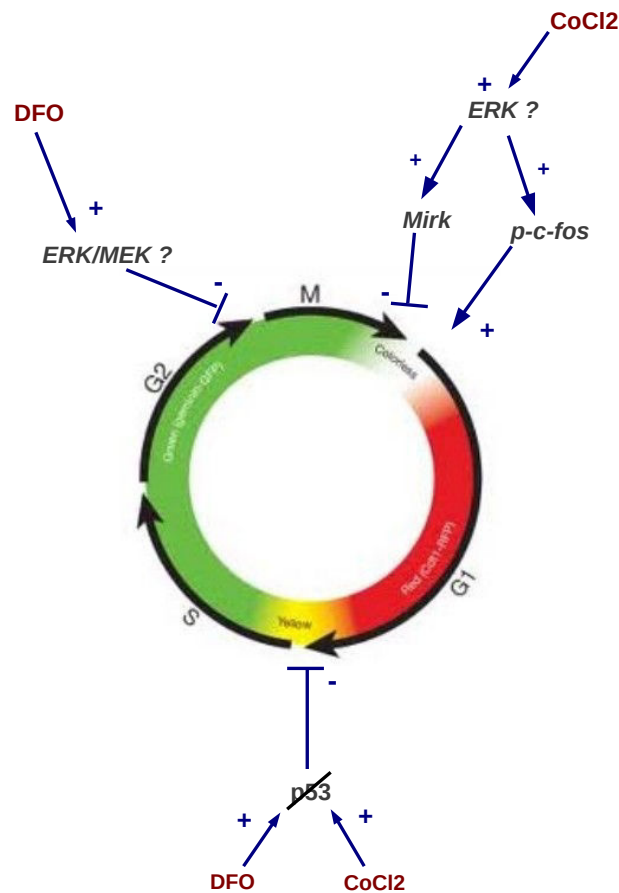


FIGURE 4.9: Modèle schématique des interactions possibles de DFO et CoCl₂ avec la voie MAPK et le cycle cellulaire. Notre hypothèse est la suivante : dans les cellules HeLa-FUCCI, en l'absence de protéine p53 active, la réponse des cellules HeLa-FUCCI à DFO et CoCl₂ passe par la voie MAPK. DFO pourrait induire ainsi un blocage en phase G₂, et CoCl₂ un effet biphasique dose et temps dépendant sur la progression de la phase G₁.

25%. Cette valeur correspond à la valeur contrôle (proportion de cellules en phase G₂ dans une population de cellules HeLa-FUCCI en croissance sans DFO). Nous pouvons en déduire que la récupération de cycle cellulaire est complète après ce délai. La même démarche a été suivie après 48h de traitement avec 250μM et 50μM de DFO. Les résultats sont présentés sur la figure 4.11 B. Pour 250μM, le blocage est irréversible. Après environ 60h, une apoptose massive des cellules a été observée. En revanche, dans le groupe exposé à 50μM, le blocage en phase G₂ est réversible : à partir de 20h environ, la proportion de cellules en phase G₂ diminue jusqu'à atteindre le niveau du groupe contrôle après 60h. Cette série d'expériences montre donc que la réversibilité de l'action de DFO sur le cycle cellulaire dépend du temps d'exposition et de la concentration de la molécule. De manière plus générale, ce résultat est intéressant du point de vue des thérapies anti-cancéreuses. En effet, comme nous l'avons rappelé, les chélateurs du fer

sont largement étudiés actuellement pour leurs vertus anti-tumorales. Ces molécules tendent en effet à promouvoir le blocage du cycle et l'apoptose [71]. Notamment, nous avons ici un exemple d'action synchronisatrice d'un agent chimique : sous l'effet de DFO, les cellules voient leur cycle bloqué en phase G_2 . Lorsque l'agent est extrait du milieu, les cellules relancent leur cycle, ce qui tend à les synchroniser en phase M. Or, la synchronisation des cellules tumorales est une stratégie pouvant être utilisée dans le cadre de thérapies anti-tumorales : elle permet en effet de maximiser l'efficacité de drogues actives sur une phase donnée du cycle. Enfin, nous avons ici un nouvel exemple de l'intérêt des cellules HeLa-FUCCI pour suivre en direct les modifications de la dynamique de prolifération.

4.4 Effets de la réoxygénation

S'il est difficile d'utiliser les cellules HeLa-FUCCI en conditions hypoxiques, elles peuvent être, en revanche, utiles pour étudier la dynamique du cycle lors du retour à la normoxie. En effet, comme nous l'avons montré dans l'étude précédente, la fluorescence est entièrement récupérée 3h après la fin de l'épisode hypoxique. Il est donc possible, moyennant ce temps de latence, de quantifier la prolifération en microscopie de fluorescence. Nous avons donc généré un épisode d'hypoxie/réoxygénation en soumettant les cellules à un traitement de 24h à 0.3% O_2 , avant de les replacer en condition normoxique. Nous avons ensuite suivi la méthodologie habituelle pour quantifier la dynamique du cycle au cours du temps. Les résultats sont présentés sur la figure 4.4. Nous pouvons observer une augmentation significative de la proportion de cellules en phase S par rapport au contrôle (multiplié par 3,5 après 23h de réoxygénation). Si l'on regarde plus précisément cette évolution, on peut mettre en évidence deux phases d'augmentation, suivi d'une diminution de la proportion, relative au contrôle, de cellules en phase S. L'interprétation que nous proposons est la suivante. Après la réoxygénation, les cellules sortant de la phase G_1 sont ralenties en phase S, ce qui explique la première phase de croissance. Les cellules en S et G_2 accomplissent leur cycle, et sont bloquées en phase S au cycle suivant, c'est à dire environ 24h après la réoxygénation. Cela correspond au pic observé entre 20h et 25h. L'entrée en phase G_2 entraîne ensuite la diminution de la proportion de cellules en phase S. Cette hypothèse mérite d'être testée plus rigoureusement, ce que nous n'avons pas pu faire pour le moment. Notamment, il serait nécessaire de suivre la durée du cycle cellule par cellule, et pas seulement de manière statistique. Il faudrait également étudier cette dynamique sur un plus long terme, afin de quantifier la cinétique du retour à la durée normale du cycle. Néanmoins, ce premier résultat, mis au regard des données de la littérature, permet d'ouvrir quelques pistes de réflexion.

L'arrêt ou le ralentissement de la phase S du cycle lors d'épisodes de réoxygénation est en effet connu. Seim et *al.* (2003) [150] l'ont notamment mis en évidence sur des cellules T-47D. Kim et *al.* (2007) [151] ont quant à eux travaillé sur l'effet de la réoxygénation sur le cycle des cellules mononucléaires sanguines périphériques (PBMC). Ils ont mis en évidence une augmentation de la proportion de cellules en phase S, passant de 20% en normoxie et en anoxie à 30% après 3h ou 6h de réoxygénation. Les auteurs ont lié ce résultat à l'activation du point de contrôle S/ G_2 , dépendant de la

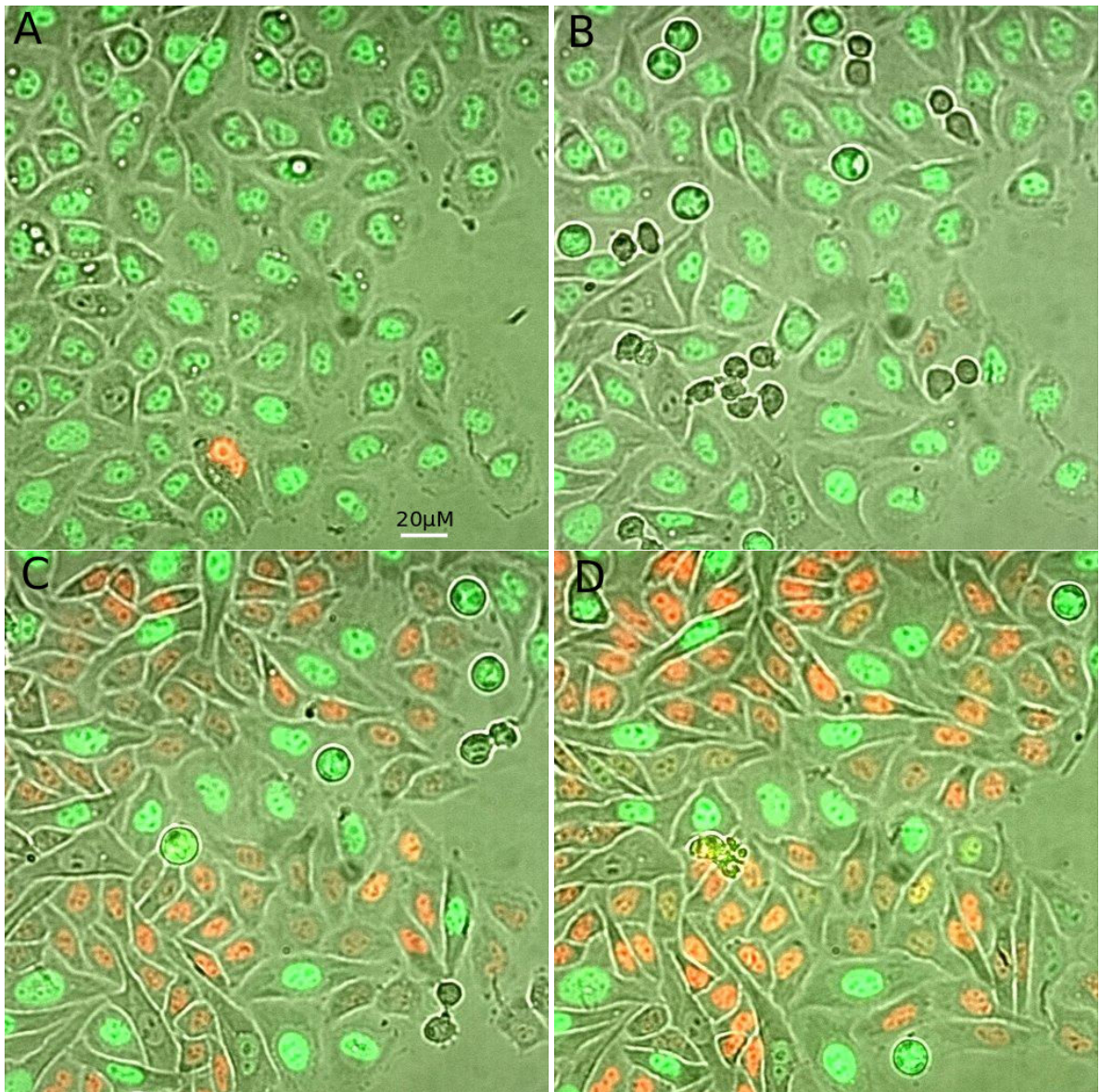


FIGURE 4.10: Reprise du cycle cellulaire après blocage en G_2 sous DFO. Après un traitement de 24h avec $250\mu\text{M}$ de DFO, le milieu de culture est renouvelé, et des images en fluorescence sont prises régulièrement. Les images sont prises dans un champ représentatif, à différents temps après le changement de milieu : 0h (A), 20h (B), 22h (C), et 30h (D).

voie ATM. Cette idée est en accord avec plusieurs travaux de biologie moléculaire, montrant l'induction de protéines liées à la réparation de l'ADN, notamment les voies ATR et chk, ainsi que de p53 [152–154]. Cependant, il apparaît que ces réseaux sont activés tout d'abord en hypoxie, en l'absence de lésions apparentes de l'ADN. Comment dès lors expliquer l'activation de ces voies moléculaire ? L'hypothèse retenue est que la réoxygénation induit un nombre important de lésions génétiques, qu'il convient de réparer afin de garantir la viabilité cellulaire [152, 153]. La cellule est ainsi prémunie contre les dangers d'une accumulation d'anomalies génétiques lors du retour

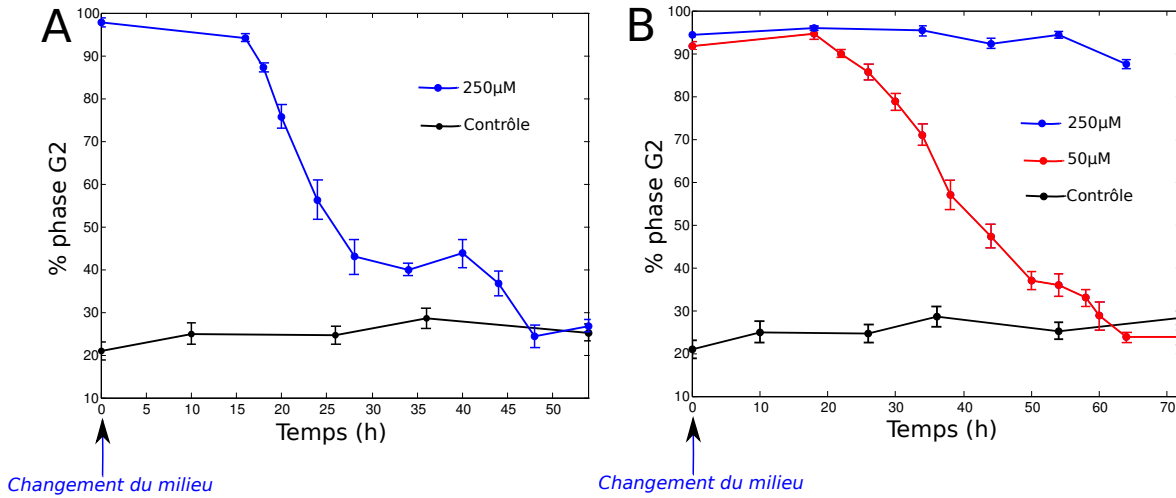


FIGURE 4.11: Evolution de la proportion de cellules en phase G₂ après traitement au DFO pendant 24h (A) et 48h (B). Le contrôle correspond à une population de cellules en croissance sans DFO.

à la normoxie. De fait, la phase S est particulièrement sensible à l'apoptose liée à la réoxygénation : dans ces conditions, l'inhibition des voies de réparation de l'ADN conduit à l'apoptose [153, 154]. Nos résultats sont en cohérence avec ces conclusions. Dans ce cadre, il est en effet permis de supposer que nos observations sont liées à l'induction de dommages génétiques par la réoxygénation : leur réparation génère un ralentissement de la phase S. L'utilisation de cellules FUCCI nous a en outre permis d'étudier ce phénomène en continu pendant 30h, ce qui est une contribution originale. Comme nous l'avons déjà noté, il reste cependant encore beaucoup à faire pour tirer partie au maximum des informations que peuvent fournir les FUCCI sur cette question. Une étude cellule à cellule peut notamment permettre de préciser et de consolider ces premières observations. Elle offrirait en effet la possibilité d'étudier finement la dynamique temporelle du phénomène de blocage/ralentissement.

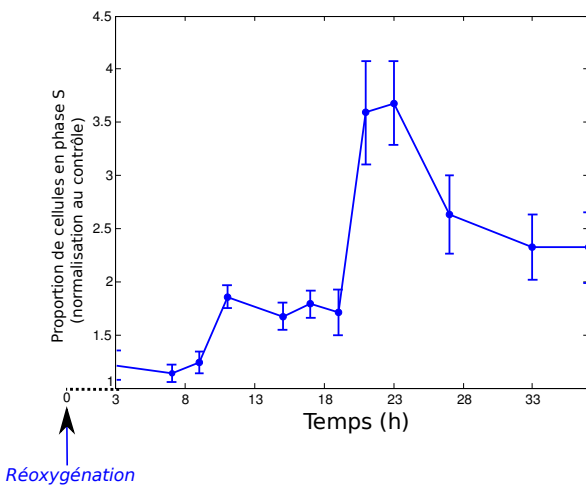


FIGURE 4.12: Evolution du nombre de cellules en phase S lors d'un épisode de réoxygénation. Après un traitement de 24h à 0,3% O₂, les cellules sont replacées en normoxie et l'évolution de la dynamique du cycle suivie au cours du temps. Les résultats sont normalisés par rapport à un groupe contrôle croissant en conditions normoxiques

4.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons cherché à étudier expérimentalement l'influence de l'hypoxie sur le cycle cellulaire, en tirant partie des cellules HeLa-FUCCI. Nous avons tout d'abord montré que la sensibilité des fluorophores à la pression d'oxygène rend difficile l'utilisation de cette lignée cellulaire, même dans des conditions d'hypoxie modérée. Nous avons alors axé notre étude selon deux grandes directions : l'influence de fer DFO et CoCl_2 , utilisés tant comme inducteurs de HIF-1 α que comme molécules anti-cancer, et l'impact de la réoxygénation sur la dynamique du cycle cellulaire. Nous avons ainsi pu montrer l'existence d'un effet biphasique de CoCl_2 sur l'entrée dans le cycle, ainsi que d'un blocage en phase G₂ sous l'effet de DFO. Dans ce dernier cas, la concentration et le temps d'exposition déterminent l'irréversibilité du blocage. Ces résultats nous ont permis de formuler une série d'hypothèses, qui restent à tester, quant aux relations entre l'utilisation intra-cellulaire du fer et la voie MAPK. Dans un deuxième temps, nous avons pu illustrer l'utilisation des cellules HeLa-FUCCI dans l'étude des effets de la réoxygénation. En soumettant une culture cellulaire à un cycle hypoxie/normoxie, nous avons mis en évidence l'existence d'un ralentissement en phase S, probablement lié à l'activation des réseaux de réparation de l'ADN. Cette dynamique reste à préciser, mais elle apporte d'intéressantes pistes de réflexion. Notamment, elle pose la question de la régulation moléculaire de HIF-1 α . En effet, l'étude des conséquences moléculaires de phénomènes de réoxygénation passe par une compréhension fine des dynamiques d'induction et de dégradation de HIF-1 α . Les expériences d'immunomarquage que nous avons pu réaliser confirment la nécessité de se pencher sur les mécanismes d'induction de la protéine. La figure 4.13 présente des images obtenues après immunomarquage indirect de HIF-1 α , suivant la méthodologie évoquée en 4.1.2. On constate très clairement une variabilité dans la localisation de HIF-1 α : la protéine est soit nucléaire, soit cytoplasmique (ou diffuse). Elle apparaît donc comme compartimentée. Or, l'activité du facteur de transcription est déterminée par sa concentration nucléaire. Sa répartition dans la cellule est donc un aspect crucial de son action. Dans le chapitre suivant, nous nous proposons donc de descendre d'un niveau d'échelle, et de chercher à décrire certains aspects de la biologie moléculaire de la réponse à l'hypoxie. Pour cela, nous formaliserons dans un premier temps un modèle de régulation de HIF-1 α prenant en compte son aspect compartimenté. Dans un second temps, nous explorerons expérimentalement la dynamique de cette compartimentation, en lien avec le cycle cellulaire et en s'appuyant sur les possibilités offertes par les cellules FUCCI.

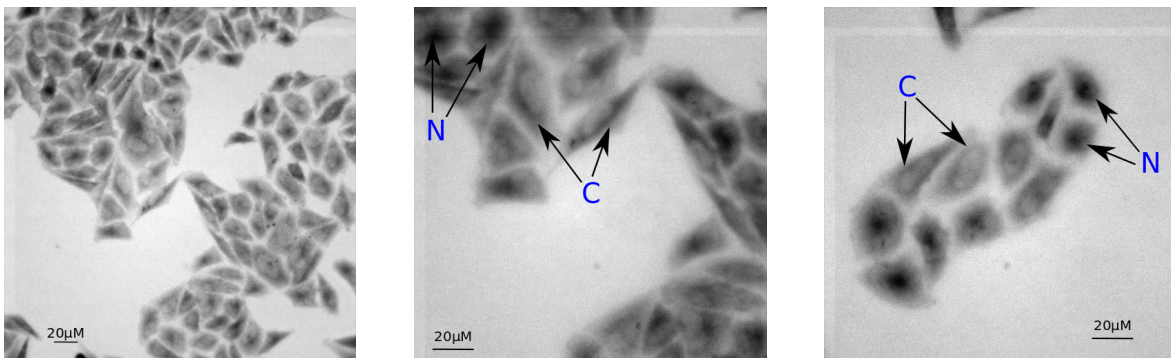


FIGURE 4.13: Localisation sub-cellulaire de HIF-1 α . La protéine HIF-1 α est révélée en immunomarquage (méthode peroxydase) après un traitement de 24h en présence de 250 μ M de DFO. Ci-dessous, trois images réalisées en microscopie optique à différents grossissements. Les zones opaques signalent la présence du facteur de transcription, soit dans le noyau (N), soit dans le cytoplasme (C).

5

Régulation de HIF-1 α

5.1 Introduction

5.1.1 Compartimentation de HIF-1 α : aspects biologiques

Comme nous l'avons décrit précédemment, la cinétique d'accumulation de HIF-1 α en hypoxie est bien connue. Le niveau de la protéine augmente rapidement, pour atteindre un maximum après un laps de temps variant de 1 à 5 heures selon le tissu considéré [1]. Puis, le niveau cellulaire de HIF-1 α diminue progressivement, jusqu'à rejoindre un niveau d'équilibre [57, 58]. Ce niveau d'expression final dépend de l'intensité de l'épisode hypoxique, selon une loi exponentielle caractérisée expérimentalement par Jiang et *al.* (1996) [33]. Ainsi, HIF-1 α s'accumule de manière significative lorsque la pression d'oxygène passe sous un seuil critique, que l'on peut situer approximativement à 1%O₂. Cette accumulation, dite *switch-like*, est considérée comme une caractéristique importante de la réponse cellulaire à l'hypoxie [34].

En normoxie, HIF-1 α est rapidement dégradée par le protéasome. La protéine a alors une demie-vie d'environ 4 min [64]. Plusieurs travaux expérimentaux tendent à montrer que cette dégradation est compartimentée. Il semble dès lors que le scénario suivant puisse être dessiné. En normoxie, le niveau de HIF-1 α est très bas, et lorsqu'elle est détectable, la protéine est majoritairement cytoplasmique. Lors d'un épisode hypoxique, HIF-1 α s'accumule rapidement dans le noyau [155–157], suggérant, comme le note Berchner-Pfannschmidt [158], que la protéine est constitutivement importée dans le noyau après sa synthèse dans le cytoplasme. Or, des études récentes ont montré qu'il existait une dynamique complexe d'import/export de HIF-1 α entre le noyau et le cytoplasme. Cette dynamique est supposée être cruciale pour réguler la dégradation de la protéine [58, 158]. Parallèlement, il a été montré que la protéine pVHL est impliquée dans une navette constitutive entre le noyau et le cytoplasme [159, 160]. L'ensemble de ces données permet alors de formuler le modèle proposé par Groulx et *al.* (2002)

[66]. HIF-1 α est synthétisée et importée dans le noyau de manière constitutive. En normoxie, lorsque le complexe pVHL/HIF-1 α peut se former, la protéine est exportée dans le cytoplasme *via* la navette pVHL. Elle y est alors dégradée par le protéasome. En hypoxie, la faible affinité de HIF-1 α pour pVHL cantonne la protéine dans le noyau, où elle interviendra comme facteur de transcription. La figure 5.1, issue du travail de Groulx et al., illustre ce modèle. Cependant, Zheng et al. ont montré que la dégradation de HIF-1 α pouvait également s'opérer dans le noyau [65]. Plus précisément, les cellules hautement prolifératives sont effectivement caractérisées par une dégradation exclusivement cytoplasmique et une accumulation de HIF-1 α dans le noyau [161]. À l'inverse, dans les cellules différenciées, en état de quiescence, la dégradation a lieu tant dans le cytoplasme que dans le noyau. L'activité protéasomale du noyau jouerait donc un rôle important dans la régulation du niveau de HIF-1 α . Selon le type de cellule considéré, cette dégradation nucléaire est plus ou moins intense. L'existence d'une activité protéasomale dans le noyau est l'hypothèse utilisée par Moroz et al. pour expliquer leurs résultats expérimentaux [58]. Dans leur étude, les auteurs visualisent, *via* le couplage à un fluorophore, l'évolution du niveau HIF-1 α après avoir bloqué la synthèse protéique par du cycloheximide. De cette manière, ils ont pu quantifier la cinétique de dégradation de HIF-1 α en normoxie. D'après leur étude, cette dernière répond à une loi bi-exponentielle, caractérisée par deux temps de demi-vie : $6 \pm 1.1 \text{ min}$ et $217 \pm 53 \text{ min}$. L'hypothèse formulée par les auteurs tient compte de l'existence d'une dégradation nucléaire, responsable de la composante la plus lente de leur loi cinétique ($t_{\frac{1}{2}} = 217 \text{ min}$). La dégradation rapide ($t_{\frac{1}{2}} = 6 \text{ min}$) est alors liée à l'activité protéasomale du cytoplasme.

Cependant, l'importance biologique de cette compartimentation de la dégradation de HIF-1 α est toujours en débat. Le rôle exact de la navette HIF-1 α /pVHL, ainsi que sa variabilité, sont encore mal comprises. La répartition de pVHL diffère en effet selon l'état quiescent ou prolifératif des populations cellulaires. Comme l'ont montré Lee et al. (1996) [159], la protéine est majoritairement présente dans le cytoplasme des cellules non-proliférantes, et dans le noyau des cellules cyclantes. De manière intéressante, cette observation est parfaitement symétrique de celle concernant la dynamique nucléaire ou cytoplasmique de la dégradation de HIF-1 α [65] : dans les cellules quiescentes, la dégradation est surtout cytoplasmique, et se partage entre le noyau et le cytoplasme dans les cellules proliférantes. Il est dès lors tentant d'interpréter ces données en faisant appel à la cinétique d'import/export de pVHL. On peut notamment faire l'hypothèse que les cellules non-proliférantes tendent à exporter plus efficacement pVHL vers le cytoplasme, diminuant ainsi l'accumulation nucléaire de HIF-1 α , et augmentant donc la dégradation cytoplasmique. La vitesse de dégradation étant plus importante dans le cytoplasme que dans le noyau, le niveau de HIF-1 α est ainsi maintenu très faible. À l'inverse, les cellules ayant une haute activité proliférative verraient l'export de pVHL, et donc de HIF-1 α , diminuer, entraînant ainsi une forte accumulation nucléaire. De manière intéressante, les cellules tumorales rentreraient donc dans ce cas de figure, ce qui est cohérent avec la forte accumulation de HIF-1 α observée en normoxie dans les lignées tumorales [35].

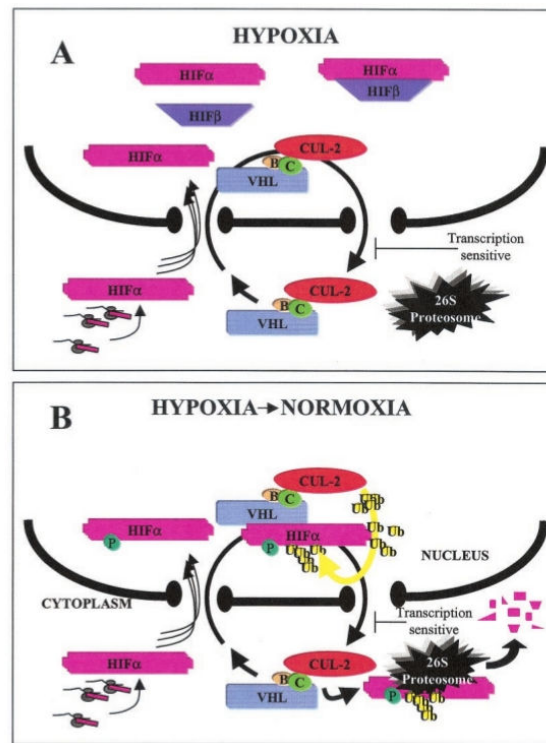


FIGURE 5.1: Modèle proposé par Groulx et *al.* (2002) [66] pour expliquer la dynamique d'import/export de HIF-1 α .

5.1.2 Les effets de la réoxygénation

Si l'hypoxie chronique a des effets bien caractérisés au niveau cellulaire comme au niveau moléculaire, il apparaît depuis quelques années que les phénomènes de cycle hypoxie/réoxygénation ont une importance physiologique certaine. En premier lieu, lors de la tumorigénèse, des cycles hypoxiques de fréquences variables sont responsables de l'émergence de phénotypes agressifs et résistants [17, 18]. L'expression de plus de 200 gènes spécifiquement activés par une hypoxie intermittente a ainsi été caractérisée [21]. D'autre part, les dommages tissulaires causés par la reperfusion brutale suivant une ischémie sont bien connus [22, 23].

De ce fait, les conséquences moléculaires des cycles hypoxie/réoxygénation commencent à être caractérisées *in vitro*. Les études par Martinive et *al.* (2009) [60] démontrent que de tels cycles amplifient l'accumulation de HIF-1 α par rapport à un simple épisode hypoxique. Ce résultat confirme les études par Yuan et *al.* (2008) [61] et Dewhirst et *al.* (2007) [62]. Les effets de la réoxygénation sur l'expression de gènes liés à l'hypoxie ont également été explorés, notamment par Conde et *al.* (2012) [23]. Ces derniers, confirmant les résultats obtenus auparavant par Hsieh et *al.* (2009) [162], ont mis en évidence la sur-expression de gènes dépendant de HIF-1, codant des protéines telles que le VEGF, l'EPO ou les PHD. De même, Luo et *al.* (2010) [63] ont démontré que la protéine MICA, dont la synthèse est placée sous le contrôle de HIF-1, est fortement induite par la réoxygénation, suggérant une forte activité du facteur de transcription

suite au retour à la normoxie. En outre, la réoxygénation est connue pour induire l'apoptose [163, 164]. Wang et *al.* (2012) [59] ont montré que cette apoptose induite par le retour brutal à la normoxie était due à HIF-1 α .

Ainsi, ces observations conduisent à supposer l'existence d'une réponse spécifique du niveau de HIF-1 α à la réoxygénation. L'étude de Conde et *al.* (2012) [23] confirme cette intuition, en montrant l'existence d'une instabilité de son niveau cellulaire après la fin d'un épisode hypoxique. Le niveau de la protéine baisse rapidement, puis augmente pour atteindre un niveau maximal 3h plus tard, similaire à celui observé dans une situation d'hypoxie. Le niveau de HIF-1 α adopte un comportement relativement instable lors d'épisodes de réoxygénation -comportement dont les causes ne sont pas bien connues. Là où l'on attendrait une diminution progressive de sa stabilité, le facteur de transcription voit son activité amplifiée. Notons enfin que le retour brutal à la normoxie a été incriminé comme un facteur pouvant déclencher l'apoptose [59, 163, 164]. Cette donnée ouvre une piste de réflexion intéressante sur les liens unissant les réseaux de régulation liés à l'hypoxie et ceux liés à l'apoptose.

5.1.3 Modèles existants pour la régulation de HIF-1 α

De nombreux modèles mathématiques de la régulation de HIF-1 α ont été développés ces dernières années. Leur but premier est d'expliquer les principales caractéristiques de l'accumulation de cette protéine lors d'un épisode hypoxique [34]. Depuis les travaux fondateurs de Kohn et *al.* (2004) [68], ces modèles cherchent à simuler la réponse moléculaire à l'hypoxie en prenant en compte l'action, dépendant de l'oxygène, des PHD (Prolyl Hydroxylase Domain). Dans de nombreuses études, la dynamique de HIF-1 α est expliquée en considérant des phénomènes de rétroactions, tels que la synthèse des PHD sous contrôle de HIF-1 (Kohn et al (2004) [68]), ou l'inhibition des PHD par le succinate (Qutub et *al.* (2007) [69]). Le modèle élaboré par N'Guyen et *al.* (2013) [67] inclut l'influence de l'enzyme FIH (Factor Inhibiting HIF-1) sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1, et considère la compartimentation noyau/cytoplasme de la protéine. Afin de clarifier et de classer ces nombreux modèles, certains auteurs ont initié une analyse théorique du système d'équations différentielles ordinaires donné par Kohn et *al.* (2004) [68]. Dans ce cadre, Heiner et *al.* (2010) [165] ont réalisé une analyse structurelle, dans le but d'identifier les interactions responsables du comportement *switch-like* et d'extraire ainsi le cœur du réseau moléculaire de régulation de HIF-1 α .

Toutes les démarches citées ici partagent un certain souci d'exhaustivité quant à la modélisation des réactions enzymatiques complexes menant au contrôle de la stabilité de HIF-1 α . De fait, les études biomoléculaires ont mis à jour de nombreuses rétroactions, tissant un réseau de régulation complexe et mal caractérisé. Notamment, il reste très difficile de savoir quelles interactions sont cruciales pour expliquer les données empiriques. En miroir de cette complexité biologique, les travaux précédents considèrent tous un grand nombre d'acteurs biomoléculaires, et plusieurs boucles de rétroactions, pour obtenir des résultats satisfaisants. Récemment, Bagnall et *al.* ont élaboré un modèle plus simple, considérant simplement la rétroaction de HIF-1 α sur les PHDs [166]. Leur but était d'expliquer une instabilité observée expérimentalement dans le niveau d'expression de HIF-1 α . Ce modèle minimaliste, comportant simplement

deux agents, permet de reproduire fidèlement leurs résultats expérimentaux. Cependant, il n'explique pas les pics observés dans le niveau du facteur de transcription en situation de réoxygénation.

5.2 Un modèle compartimenté pour la régulation de HIF-1 α

5.2.1 Démarche et principaux résultats obtenus

Dans cette étude, nous avons décidé de construire un modèle de la régulation simplifiant au maximum la chaîne des réactions enzymatiques menant à la déstabilisation de HIF-1 α en normoxie. Rappelons pour mémoire que lorsque la pression en oxygène est haute, la protéine est hydroxylée par une série d'enzymes spécialisées dont l'activité est elle-même finement régulée. Ces modifications biochimiques augmentent l'affinité de pVHL pour HIF-1 α , ce qui conduit à son adressage vers le protéasome. Dans l'article suivant, nous avons choisi de considérer principalement ces deux acteurs clés. Leur interaction est régulée par une constante de complexation dont la valeur reflète la pression cellulaire en oxygène. Nous utilisons également une unique rétroaction, résidant dans le contrôle de HIF-1 sur la synthèse de pVHL. Cette rétroaction n'a encore jamais été prise en compte dans les modèles précédents, alors même qu'elle est bien étayée expérimentalement [46]. Deux arguments de poids peuvent être apportés à l'appui de cette hypothèse. Tout d'abord, le promoteur du gène codant pour pVHL contient une séquence de fixation pour HIF-1, comme noté par Blagosklonny et *al.* (2001) [167], sur la base de résultats obtenus par Renbaum et *al.* (1996) [168]. La présence de cette HRE (HIF-1 Response Element) a été confirmée par Kahrausen et *al.* (2005) [169]. En outre, ces auteurs ont mis en évidence la liaison directe de HIF-1 sur le promoteur de pVHL. Deuxièmement, Karhausen et *al.* [169] ont démontré que la protéine elle-même, ainsi que l'ARNm correspondant, voient leur niveau augmenter en hypoxie. La rétroaction de HIF-1 sur la synthèse de pVHL est donc une hypothèse pertinente à étudier.

Nous considérons également, dans ce modèle, l'existence de deux compartiments (noyau et cytoplasme), dans lesquels HIF-1 α est dégradée à des vitesses différentes. Une navette assure un flux constitutif de pVHL entre ces deux espaces. D'autre part, l'activité des PHDs est modélisée par un unique paramètre, décrivant l'affinité oxygène-dépendante de pVHL pour HIF-1 α . Conformément aux données biochimiques à disposition, lorsque la pression d'oxygène est importante, l'activité des PHDs l'est aussi, HIF-1 α est hydroxylée et son affinité pour pVHL est haute. A l'inverse, quand l'activité des PHDs est faible (hypoxie), cette affinité décroît. Sur la base de ces hypothèses biologiques, nous avons bâti un modèle mathématique comprenant sept équations différentielles ordinaires. De part la similarité entre les systèmes de régulation pVHL/HIF-1 α et p53/Mdm2 [167], nous avons calqué notre formulation du problème sur celle de Hunziker et *al.* (2010) [170]. Dans chaque compartiment, nous considérons que le système est conduit par la loi d'action de masse qui caractérise la dynamique d'assemblage/désassemblage du complexe HIF-1 α /pVHL. La formation de ce complexe mène, dans chaque compartiment, à la dégradation de HIF-1 α . Afin de prendre en compte

la rétroaction sur la synthèse de pVHL, la vitesse de transcription du gène correspondant est mise sous le contrôle de HIF-1. La navette nucléo-cytoplasmique est décrite par des vitesses d'import/export de pVHL, ce qui assure le couplage entre les deux compartiments.

A l'aide de ce modèle simple, détaillé dans l'article publié dans *Plos one* en 2014 et présenté ci-après, nous parvenons à expliquer la dynamique de dégradation bi-exponentielle de HIF-1 α . Nous reproduisons également la cinétique d'induction du facteur de transcription en hypoxie, ainsi que la caractéristique *switch-like* de son accumulation nucléaire. En outre, en simulant les effets d'un retour brutal à la normoxie, nous parvenons à donner une explication simple à l'augmentation contre-intuitive de la réponse hypoxique après une réoxygénation. Nous montrons ainsi qu'un cycle hypoxie/réoxygénation induit une réponse oscillatoire du niveau de HIF-1 α pouvant expliquer les manifestations cellulaires observées dans des conditions expérimentales ou physiologiques similaires (notamment, l'apoptose massive et l'expression de gènes spécifiques). D'autre part, nous mettons en évidence que cet effet est directement lié à la compartimentation de la dynamique de dégradation de HIF-1 α . Enfin, notre modèle peut être utilisé pour modéliser les effets, sur l'activité du facteur de transcription, de différentes mutations cancéreuses, et pour tester l'efficacité potentielle de plusieurs stratégies thérapeutiques.

5.2.2 Article : Bedessem B. and Stéphanou A., *Role of compartmentalization on HIF-1 degradation dynamics during changing oxygen conditions : a computational approach*, Plos One, 2014, 9(10)

Résumé

HIF-1 α est la protéine centrale régissant la réponse cellulaire à l'hypoxie. Son accumulation dans les cellules tumorales est liée à l'apparition de phénotypes agressifs et chimiorésistants. En conséquence, comprendre les mécanismes de régulation du niveau intra-cellulaire de HIF-1 α est un enjeu majeur en vue de la conception de thérapies anti-cancer innovantes. Dans cet article, nous proposons un modèle du réseau de régulation de cette protéine, impliquant HIF-1 α et son inhibiteur pVHL. A partir de données issues de la littérature, nous avons fait l'hypothèse selon laquelle la dégradation de HIF-1 α se fait dans deux compartiments (le noyau et le cytoplasme). Une navette constitutive assure l'existence d'un flux de protéines entre ces deux espaces. Nous avons en premier lieu montré que ce modèle reproduit correctement les principales caractéristiques de la dynamique de HIF-1 α , incluant le profil de dégradation bi-exponentielle en normoxie, la cinétique d'induction en hypoxie, et son accumulation brutale selon un mécanisme de type tout-ou-rien (*switch-like*). Dans un deuxième temps, nous avons simulé les effets d'un épisode de réoxygénation, et montré qu'un événement de ce type génère une forte instabilité du niveau de HIF-1 α . Le niveau protéique augmente rapidement trois heures après le début de l'événement, et emprunte un comportement oscillatoire. Cet effet disparaît si on ne considère pas la compartimentation de HIF-1 α . Ce résultat peut

expliquer plusieurs observations contre-intuitives concernant la réponse moléculaire et cellulaire à la réoxygénation. Troisièmement, nous avons simulé la dynamique de HIF-1 α dans le cas tumoral. Nous avons considéré différents types de mutations associées à la tumorigenèse, et comparé leurs conséquences sur la dégradation de la protéine. Nous avons ainsi pu tester différentes stratégies thérapeutiques. Nous avons montré qu'une baisse de la concentration nucléaire de HIF-1 α n'est pas forcément associée à une atténuation des instabilités induites par la réoxygénation. Autrement dit, il apparaît que la conception de thérapies anti-HIF-1 α doit prendre en compte ces deux aspects de sa régulation afin de maximiser leur efficacité.

Abstract

HIF-1 α is the central protein driving the cellular response to hypoxia. Its accumulation in cancer cells is linked to the appearance of chemoresistant and aggressive tumor phenotypes. As a consequence, understanding the regulation of HIF-1 α dynamics is a major issue to design new anti-cancer therapies. In this paper, we propose a model of the hypoxia pathway, involving HIF-1 α and its inhibitor pVHL. Based on data from the literature, we made the hypothesis that the regulation of HIF-1 α involves two compartments (nucleus and cytoplasm) and a constitutive shuttle of the pVHL protein between them. We first show that this model captures correctly the main features of HIF-1 α dynamics, including the bi-exponential degradation profile in normoxia, the kinetics of induction in hypoxia, and the switch-like accumulation. Second, we simulated the effects of a hypoxia/reoxygenation event, and show that it generates a strong instability of HIF-1 α . The protein concentration rapidly increases 3 hours after the reoxygenation, and exhibits an oscillating pattern. This effect vanishes if we do not consider compartmentalization of HIF-1 α . This result can explain various counter-intuitive observations about the specific molecular and cellular response to the reoxygenation process. Third, we simulated the HIF-1 α dynamics in the tumor case. We considered different types of mutations associated with tumorigenesis, and we compared their consequences on HIF-1 α dynamics. Then, we tested different therapeutics strategies. We show that a therapeutic decrease of HIF-1 α nuclear level is not always correlated with an attenuation of reoxygenation-induced instabilities. Thus, it appears that the design of anti-HIF-1 α therapies have to take into account these two aspects to maximize their efficiency.

Introduction

The HIF-1 factor is the central protein involved in the intracellular signaling pathway of hypoxia [113]. This transcription factor, which enhances the expression of numerous genes, directs the very complex cellular response to hypoxia. HIF-1 is an heterodimeric protein, constituted of two sub-units : HIF-1 β , which is constitutively expressed, and HIF-1 α . The concentration of HIF-1 α is maintained at low levels in most cells under normoxic conditions. Whereas its synthesis does not depend on oxygen level [171], its degradation is regulated by the hypoxic state of the cell [116]. In normoxia, enzymes called prolyl-hydroxylase (PHD) are active and convert HIF-1 α

into an hydroxylated form. This form of the protein has a great affinity for an ubiquitination complex linked to the pVHL protein [64]. As a consequence, it is rapidly degraded by the proteasom pathway [116]. During a hypoxic event, the PHDs are inactive, and pVHL cannot bind to HIF-1 α , which is not addressed to the proteasom anymore. Therefore, the transcription factor accumulates and drives the synthesis of numerous genes, involved in cell cycle arrest and apoptosis [3], or, on the contrary, in proliferation [12, 131] and survival [46].

It is well known that HIF-1 α accumulates in most of tumor cells [35, 37, 41]. This accumulation is first due to the chronic hypoxia underwent by tumor cells [14, 99]. Second, many mutations can deregulate HIF-1 α level, by impairing the HIF-1 α /pVHL interaction [40, 75, 172], or its genetic expression [173–175]. Because of the anti-apoptotic effects of HIF-1, this overexpression plays a crucial role in tumor growth [13]. Indeed, it was shown that hypoxia generates chemoresistant cells, and then participates to the emergence of very aggressive tumor phenotypes [14, 54]. As a consequence, the understanding of the mechanisms driving the accumulation and degradation of HIF-1 α is crucial to identify new targets for anti-cancer therapies [117].

The features of HIF-1 α accumulation under hypoxia are well known. HIF-1 α rapidly increases after the beginning of a hypoxic event, and reaches a maximum after a certain time depending on the tissue (1h-5h) [1]. Then, it gradually decreases down to an equilibrium level [57, 58]. This equilibrium level depends on the intensity of hypoxia, following an exponential law determined experimentally by Jiang *et al.* (1996) [33]. As a consequence, HIF-1 α begins to significantly accumulate when oxygen pressure passes through a threshold (about 1% O₂). This switch-like accumulation of HIF-1 α is considered as an important feature of the response to hypoxia [34]. If hypoxia is very intense ($P_{O_2} < 0.1\%$) the apoptotic pathways modify the equilibrium value of HIF-1 α and promote apoptosis [46, 71]. In this work, we do not consider the relationships between the hypoxic and apoptotic pathways. At the molecular scale, the pathways regulating HIF-1 α induction and degradation are complex and not perfectly known. The formation of the pVHL/HIF-1 α complex is essential to address the transcription factor to the proteasom [120, 176]. The hydroxylation of a proline residue of a specific domain of HIF-1 α , called the ODD domain, makes possible the formation of the complex [177]. The chemistry of the pVHL/HIF-1 α complex was studied *in vitro*. It was notably shown that during the passage from hypoxia to normoxia, the affinity of pVHL for HIF-1 α is multiplied by at least three orders of magnitude [178, 179].

In normoxia, when protein synthesis is blocked (by the cycloheximide), the degradation of HIF-1 α follows a bi-exponential law experimentally identified by Moroz *et al.* (2009) [58]. The authors showed that in a line of normal cells (NIH3T3), the two half-times of the HIF-1 α degradation law are 6 ± 1.1 min and 217 ± 53 min. They made the hypothesis that the slow clearance of HIF-1 α was due to its nuclear degradation, whereas the rapid one reflected the cytoplasmic degradation of HIF-1 α . This idea is interesting because it contributes to the debate concerning the sub-cellular localization of the protein. A general description is given as follows : in normoxia, HIF-1 α level is

very low and when it is detectable, the protein is mainly cytoplasmic. When hypoxia is important, HIF-1 α rapidly accumulates in the nucleus [155–157]. Recently, some experimental works have shown that there is a dynamics of export/import of HIF-1 from the nucleus to the cytoplasm, which is crucial to regulate its degradation. After its synthesis in the cytoplasm, HIF-1 α is constitutively imported into the nucleus [58, 158]. On the other hand, the pVHL protein is involved in a permanent shuttle between the nucleus and the cytoplasm [159, 160]. In normoxia, as the pVHL/HIF-1 α complex can form, HIF-1 α is exported to the cytoplasm, where it is degraded, as hypothesized by Groulx *et al.* (2002) [66]. The dynamics of the HIF-1 α /pVHL shuttle may be highly variable. Zheng *et al.* (2006) [65] showed that for highly proliferating cells, HIF-1 α exclusively accumulates in the nucleus during hypoxia, and its degradation mainly takes place in the cytoplasm during normoxia. This result suggests that in this type of cells, the export rate is much more important than the import rate. This agrees with the result that pVHL is mainly a cytoplasmic protein [161]. However, in differentiated, non-proliferating cells, HIF-1 α degradation takes place equally in the cytoplasm and in the nucleus [65]. These results are coherent with the observation that pVHL is predominantly in the cytoplasm of confluent (non-proliferating) cells, and in the nucleus of sparse cells [159]. We can thus suppose that the rate of pVHL export is highly variable depending on the cell type or state : high for quiescent/slowly proliferative cells, and low for proliferative cells. Besides, Zheng *et al.* (2006) [65] supposed that the HIF-1 α nuclear degradation observed is due to the activity of a nuclear proteasom. This hypothesis can be linked to that formulated by Moroz *et al.* (2009) [58]. However, it is still in debate, and the importance of the nucleo-cytoplasmic shuttle of HIF-1 α is not well established. Notably, an important question is to understand why HIF-1 α rapidly accumulates in the nucleus (switch-like behavior) when the oxygen pressure passes through a threshold. How can the nuclear/cytoplasmic shuttle explain this typical feature of HIF-1 α dynamics ?

The effects of intermittent hypoxia on HIF-1 α accumulation are well studied. The studies by Martinive *et al.* (2006) [180] and Martinive *et al.* (2009) [60] demonstrate that HIF-1 α accumulates during hypoxia/reoxygenation cycles. This result was confirmed by Yuan *et al.* (2008) [61] and Dewhirst *et al.* (2007) [62]. Besides, the effects of a reoxygenation event on the expression of hypoxia related genes are well known. Various authors reported that reoxygenation stimulates the expression of HIF-1-dependent genes. Conde *et al.* (2012) [23] demonstrate that classical genes related to HIF-1 α activity, such as VEGF, PHD, EPO, are over-expressed during reoxygenation. Hsieh *et al.* (2009) [162] obtained a similar result by using reporter genes. The authors interpreted this result by an increase of HIF-1 activity during reoxygenation. Luo *et al.* (2010) [63] demonstrated that the protein MICA, present in cell overexpressing HIF-1 α , is strongly expressed during reoxygenation. They showed that this expression was linked to HIF-1 α . Reoxygenation is also known to induce apoptosis [163, 164]. Wang *et al.* (2012) [59] showed that this reoxygenation-induced apoptosis was due to HIF-1 α . These observations lead to formulate the hypothesis that there is a specific response of HIF-1 α level or genetic activity during reoxygenation, different from that of normoxia. The study by Conde *et al.* (2012) [23], confirms this idea, by showing an instability

of HIF-1 level during 6 hours after reoxygenation. The level rapidly decreases after 15 min, and increases to reach a maximum at 3h (level close to the hypoxic level). Then, HIF-1 level decreases. The authors bring elements showing that this up-regulation of HIF-1 was maybe due to the AKm/Tor pathway.

Thus, there is clearly a tendency for HIF-1 level and genetic activity to become unstable after reoxygenation. The causes of such a tendency are not perfectly known.

Many models of HIF-1 regulation pathways were developed over these last ten years, to explain the main features of HIF-1 α accumulation during hypoxia [34], or its effects on cell cycle [92]. Since the work by Kohn *et al.* (2004) [68], these models aim to simulate the principal features of HIF-1 response to hypoxia, mainly by taking into account the oxygen-dependent action of the PHDs. In various works, the HIF-1 α dynamics is explained by considering feedback phenomena, such as the HIF-1-dependent synthesis of PHDs (Kohn *et al.* (2004) [68]), or the inhibition of PHDs by succinate (Qutub *et al.* (2007) [69]). The model by NGuyen *et al.* (2013) [67] includes the influence of FIH on transcriptional activity of HIF-1 α , and also includes a compartmentalization aspect. However, it does not consider the pVHL shuttle, and does not study the effects of variations of the export/import dynamics of the PDHs/FIH on HIF-1 α regulation. Yet, it appears that this dynamics is complex and depends on the cell type and on the cell state [181–183]. Some authors have made a theoretical analysis of the system of ODEs initially given by Kohn *et al.* (2004) [68]. Yu *et al.* (2007) [71] made an Extreme Pathway Analysis, and Heiner *et al.* (2010) [165] a structural analysis. The aim of this approach is to identify the major pathways responsible for the switch-like behavior. It is a way to extract the network corresponding to the complex response to hypoxia.

In this study, we decided to consider that a possible core pathway of HIF-1 regulation was its pVHL-dependent degradation, driven by an oxygen-dependent affinity of pVHL for HIF-1, and the HIF-1 α feedback on pVHL synthesis. First, it is well known that HIF-1 α stability is driven by its affinity with pVHL [64]. This affinity varies with PHDs' activity, which depends on the oxygen level, as assumed in the previous models [69]. Second, there is no model taking into account the interesting feedback of HIF-1 α on pVHL mRNA synthesis. The existence of this feedback is well accepted in the literature, as noticed in the recent review by Sermeus *et al.* (2011) [46]. Two main arguments can be used to justify this hypothesis. First, the promotor of the pVHL gene exhibits a putative site for HIF-1 fixation, as noticed by Blagosklonny *et al.* (2001) [167], based on previous results of Renbaum *et al.* (1996) [168]. The presence of this HRE (HIF-1 responsive element) was confirmed by Krausen *et al.* (2005). Besides, the authors show a direct binding of HIF-1 on the pVHL gene promotor. Second, Karhausen *et al.* (2005) demonstrate that pVHL mRNA and pVHL protein are upregulated during hypoxia [169]. This result was not contradicted by more recent studies [46]. As a consequence, we considered that the pVHL-HIF-1 feedback is a relevant hypothesis to study. That is why we consider it, for the first time, in a model of HIF-1 α regulation dynamics.

Our model simulates the HIF-1 α dynamics by taking into account, for the first time, the nucleo-cytoplasmic shuttle. We consider two compartments (nucleus and cytoplasm), where HIF-1 α is degraded at different rates. The action of PHDs is not

considered. However, we consider a parameter describing the oxygen-dependent affinity of pVHL for HIF-1 α . The value of this parameter decreases with oxygen pressure. Thus, it reflects the activity of PHDs, following a well-known model : when the activity is high (normoxia), HIF-1 is hydroxylated and its affinity for pVHL is high. When the activity is low (hypoxia), HIF-1 affinity for pVHL decreases. With this simple model, we can explain the bi-exponential degradation law of HIF-1 α , and confirm the importance of considering two compartments for the degradation. We also well describe the kinetics of HIF-1 α under hypoxia, and its switch-like nuclear accumulation. We can also provide a simple explanation to the counter-intuitive increase of the hypoxic response after reoxygenation. We show that a hypoxia/reoxygenation cycle induces an oscillatory pattern of HIF-1 α level which can explain the specific cellular effects of reoxygenation, notably apoptosis and enhanced expression of hypoxia-regulated genes. This instability is directly linked to the compartmentalization of HIF-1 α degradation dynamics. Finally, our model can be used to model the effects on HIF-1 α levels of different kinds of cancerous mutations, and to test the potential efficiency of different therapeutic strategies.

Model

Biological description On the basis of data from the literature about the dynamics of HIF-1 α degradation and nucleo-cytoplasmic exchanges, we constructed a mathematical model comprising seven ordinary differential equations (ODEs). The variables used in the model are presented in Table 5.1. Because of the similarities between the pVHL/HIF-1 α system and the p53/Mdm2 system [167], we used the same formulation as Hunziker et al. (2010) [170] to write our ODEs system. In each compartment, we consider that the system is driven by the mass-action law which characterizes the pVHL/HIF-1 α complex assembly/disassembly dynamics. The formation of the complex leads, in both compartments, to HIF-1 α degradation. As HIF-1 α is constitutively imported into the nucleus after its synthesis, we hypothesized that it appears in the nucleus, with a synthesis rate belonging to the parameters of the system. The feedback of HIF-1 on pVHL synthesis is modeled by a HIF-1-dependent rate of pVHL mRNA synthesis. We chose the same expression for this dependency as Hunziker et al. (2010) [170]. We then consider, because of the presence of a nuclear-localization signal in pVHL protein, that the protein is constitutively imported into the nucleus after its synthesis [184]. Its accumulation in the cytoplasm is due to the nucleo-cytoplasmic shuttle. This shuttle is described with an import and export rate of pVHL, which ensures the coupling between the cytoplasm and the nucleus dynamics. Figure 5.2 represents the different reactions modeled by the ODEs system. Table 5.2 gives the meanings of each reaction represented in figure 5.2. Table 5.3 gives the link between the parameters and these reactions.

ODEs system We present here the 7 ordinary differential equations used in our model. We consider the following variables that account for the concentrations of the chemical species : h (total HIF-1), h_n (nuclear HIF-1), h_c (cytoplasmic HIF-1), v_n

TABLE 5.1: **Variables of the model**

| Model variable | Associated molecule |
|----------------|---|
| h_c | Cytoplasmic HIF-1 α |
| h_n | Nuclear HIF-1 α |
| v_m | pVHL mRNA |
| v_n | Nuclear pVHL |
| v_c | Cytoplasmic pVHL |
| c_n | Nuclear pVHL/HIF-1 α complex |
| c_c | Cytoplasmic pVHL/HIF-1 α complex |

Biological molecules considered in the model, and their mathematical symbol

TABLE 5.2: **Reactions of the model**

| Number on the figure 1 | Reaction |
|------------------------|--|
| 1 | Synthesis of HIF-1 α |
| 2 | pVHL-independent degradation of HIF-1 α |
| 3 | Release of pVHL by pVHL-dependent and pVHL-independent degradation of HIF-1 α |
| 4 | Formation of the pVHL/HIF-1 α complex |
| 5 | Dissociation of the pVHL/HIF-1 α complex |
| 6 | pVHL natural degradation |
| 7 | Release of HIF-1 α by pVHL degradation |
| 8 | HIF-1-dependent synthesis of pVHL mRNA |
| 9 | pVHL mRNA degradation |
| 10 | Synthesis of pVHL |
| 11 | pVHL-import rate into the nucleus |
| 12 | pVHL-export rate into the cytoplasm |

Meaning of the reactions of the model. The numbers refer to the figure 5.2.

(nuclear pVHL), v_c (cytoplasmic pVHL), v_m (pVHL mRNA), c_n (nuclear (pVHL/HIF-1 α complex), c_c (cytoplasmic pVHL/HIF-1 α complex). The meaning and the value of the parameters are summarized in Tables 5.3 and 5.4. The equations were solved using a Runge-Kutta method, implemented in Matlab.

$$h = h_c + h_n \quad (5.1)$$

This first equation accounts for the total conservation of HIF-1 α which is distributed between the cytoplasm and nucleus of the cell.

TABLE 5.3: **Parameters of the model**

| Parameter | Description | Reactions of the figure 1 |
|------------|--|---------------------------|
| σ | Synthesis rate of HIF-1 | 1 |
| α | pVHL-independent degradation of HIF-1 | 2,3 |
| k_f | pVHL/HIF-1 complex formation rate | 4 |
| k_b | pVHL/HIF-1 complex dissociation rate | 5 |
| γ | Degradation rate of pVHL | 6,7 |
| k_t | Synthesis rate of pVHL mRNA | 8 |
| β | Degradation rate of pVHL mRNA | 9 |
| k_{tl} | Synthesis rate of pVHL protein | 10 |
| δ_n | pVHL-dependent degradation rate of HIF-1 in the nucleus | 3 |
| δ_c | VHL-dependent degradation rate of HIF-1 in the cytoplasm | 3 |
| $A_{c,n}$ | Import rate of pVHL/HIF-1 complex into the nucleus | 11 |
| $A_{n,c}$ | Export rate of pVHL/HIF-1 complex into the cytoplasm | 12 |

Definition of the parameters used in the model. Each parameter quantifies the speed of a reaction represented in figure 5.2.

$$\frac{dh_n}{dt} = \sigma + (k_b + \gamma)c_n - k_f v_n h_n - \alpha h_n \quad (5.2)$$

The nuclear HIF-1 is synthesized with rate σ , spontaneously degraded with rate α , and is engaged into a chemical equilibrium with the pVHL/HIF complex. k_f and k_b are the assembly/disassembly rates of the complex. The degradation of pVHL in the nuclear complex liberates HIF-1 α with rate γ

$$\frac{dh_c}{dt} = (k_b + \gamma)c_c - k_f h_c v_c - \alpha h_c \quad (5.3)$$

Equation similar to that for the nuclear HIF-1, but without the synthesis term. Indeed, HIF-1 α is constitutively imported into the nucleus after its synthesis [58, 158]. We thus consider that it appears in the nucleus, and that its presence in the cytoplasm is due to the nucleo/cytoplasmic shuttle

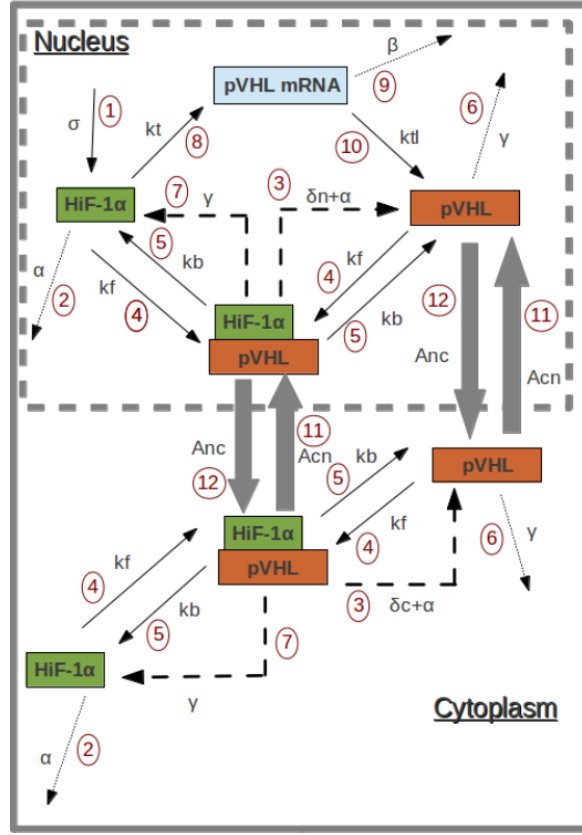


FIGURE 5.2: **Molecular network of HIF-1 α regulation.** Sketch of the molecular network considered in the model.

$$\frac{dv_m}{dt} = k_t h_n^2 - \beta v_m \quad (5.4)$$

Equation for pVHL mRNA. Its synthesis is promoted by HIF-1 with rate k_t , and it is degraded with rate β . We chose the same law as Hunziker et al. (2010) [170] for the Mdm2/p53 system.

$$\frac{dv_n}{dt} = k_{tl} v_m + k_b c_n + (\delta_n + \alpha) c_n + A_{c,n} v_c - k_f v_n h_n - \gamma v_n - A_{n,c} v_n \quad (5.5)$$

Equation for the nuclear pVHL. It is synthesized from mRNA with rate k_{tl} , and naturally degraded with rate γ . It is engaged in a chemical equilibrium with the pVHL/HIF complex. k_f and k_b are the assembly/disassembly rates of the complex. This complex leads to the nuclear proteasomal degradation of HIF-1 with rate δ_n which liberates pVHL. The spontaneous degradation of HIF-1 α also liberates pVHL with rate α .

$$\frac{dv_c}{dt} = k_b c_c + (\delta_c + \alpha) c_c + A_{n,c} v_n - k_f v_c h_c - \gamma v_c - A_{c,n} v_c \quad (5.6)$$

TABLE 5.4: Values of the parameters for normal, slowly proliferating cells

| Parameter | Default value | Range of variations | Reference |
|------------|----------------------|---------------------|------------------------|
| σ | $1000nM.h^{-1}$ | [200 8000] | Moroz et al. (2009) |
| α | $0.27h^{-1}$ | | Moroz et al. (2009) |
| k_f | $1000nM^{-1}.h^{-1}$ | [0 1000] | Moroz et al. (2009) |
| k_b | $7200h^{-1}$ | | Hunziker et al. (2010) |
| γ | $0.8h^{-1}$ | | Yang et al. (2013) |
| k_t | $0.001nM.h^{-1}$ | | Moroz et al. (2009) |
| β | $0.6h^{-1}$ | | Hunziker et al. (2010) |
| k_{tt} | $1.4h^{-1}$ | | Hunziker et al. (2010) |
| δ_n | $1h^{-1}$ | | Moroz et al. (2009) |
| δ_c | $7h^{-1}$ | | Moroz et al. (2009) |
| $A_{c,n}$ | $10h^{-1}$ | | Moroz et al. (2009) |
| $A_{n,c}$ | $1000h^{-1}$ | [10 1000] | Moroz et al. (2009) |

Default values of the parameters, for a normal, non-proliferating cell, and range of variations of the parameters used in the simulations. The default values were fixed using previous models (Hunziker et al. (2010)), or experimental data (Moroz et al. (2009), Yang et al. (2013)).

Equation for the cytoplasmic pVHL. Similar as that for the nuclear pVHL, but without the synthesis term. Indeed, we made the hypothesis that pVHL is constitutively imported into the nucleus after its synthesis. We thus consider that it appears in the nucleus, and that its presence in the cytoplasm is due to the nucleo/cytoplasmic shuttle

$$\frac{dc_n}{dt} = k_f h_n v_n + A_{c,n} c_c - k_b c_n - \delta_n c_n - (\gamma + \alpha) c_n - A_{n,c} c_n \quad (5.7)$$

Equation for the nuclear pVHL/HIF-1 complex. It is assembled with rate k_f , and disassembled with rate k_b . The spontaneous degradations of pVHL and HIF-1 α , and the pVHL-induced HIF-1 degradation decreases its concentration with rates α , γ and δ_n respectively. The nuclear complex is exported to the cytoplasm with rate A_{nc} , and the cytoplasmic complex is imported with rate A_{cn} .

$$\frac{dc_c}{dt} = k_f h_c v_c + A_{n,c} c_n - k_b c_c - \delta_c c_c - (\gamma + \alpha) c_c - A_{c,n} c_c \quad (5.8)$$

Equation for the cytoplasmic complex. Similar as that for nuclear complex.

The method used to solve this system and run the simulations are presented as Supplementary Materials. A first file (A) describes the methods we used to find the stationary state of the system, and to simulate hypoxia or reoxygenation events. The Supplementary Material B gives the Matlab code used to obtain the main results of the paper.

Determination of some parameters The value of the natural degradation rate of HIF-1 α (α) can be determined by using data from Moroz *et al.* (2009) [58]. The authors showed that in ODD-mutant cells, the half-time of HIF-1 α degradation was 160 min (2.7h). Since the ODD-mutant cells cannot form HIF-1 α /complex, this experimental time can easily be used to estimate the value of the α rate. We fix $\alpha=0.27h^{-1}$. We also have a value for the pVHL degradation rate (γ), from Yang *et al.* (2013) [185]. The authors measured a half-life of 3.8 hours for pVHL, which corresponds to a parameter $\gamma=0.2h^{-1}$. The other parameters are not precisely known. To reduce the number of degrees of freedom of the system, we used the analysis of Hunziker *et al.* (2010) [170] on the modeling of the p53/Mdm2 dynamics. The authors fixed the value of the Mdm2 mRNA natural degradation rate β to $0.6h^{-1}$, corresponding to a half-time of about 1 hour. Besides, they noticed that this value was not important to determine the dynamics of the system, and we verified that it was also the case in our model. Thus, we chose to fix $\beta=0.6h^{-1}$. In a similar way, the translation rate k_{tl} of Mdm2 was fixed in order to ensure small values of free p53 at the equilibrium (about 100nM) [170]. As the experimental observations made on HIF-1 α are coherent with this idea (undetectable levels of HIF-1 α in normoxia), we fix $k_{tl}=1.4h^{-1}$. We also verified that its variations do not influence the dynamics of the system. The other parameters (HIF-1 α synthesis rate σ , formation and disassembly of pVHL/HIF-1 α k_f and k_b , pVHL-dependent degradation rates of HIF-1 α δ_c and δ_n , pVHL export and import rates A_{nc} and A_{cn} , HIF-1 α dependent induction rate of pVHL k_t) are the degrees of freedom of our system. As the pVHL/HIF-1 α complex level depends on the k_f/k_b ratio, we can consider that only one of this two parameters drives the dynamics of the system. Thus, we chose to fix k_b (disassembly rate of the pVHL/HIF-1 α complex), and to consider only the variations of k_f (formation rate of the complex, depending on the oxygen level). We chose the default value given by Hunziker *et al.* (2010) for the p53/Mdm2 system : $k_b=7200h^{-1}$. To give a default value to the remaining undetermined parameters, we

then used the bi-exponential HIF-1 degradation law given by Moroz et al. [58].

Results

Simulation of HIF-1 α degradation in normoxia We first consider the experimental situation described by Moroz et al. (2009) [58]. Cycloheximide is added to a culture of NIH3T3 cells (differentiated, slowly proliferating cells) in normoxia in order to block protein synthesis. Then, HIF-1 α concentration is measured along time in order to construct its degradation curve. The authors determined a bi-exponential degradation law for HIF-1 degradation : $[\text{HIF-1}](t) = \frac{[\text{HIF-1}]_0}{2} (e^{-k_1 t} + e^{-k_2 t})$ with $[\text{HIF-1}](t)$ the level of [HIF-1] along time, $[\text{HIF-1}]_0$ its initial level, and k_i a characteristic parameter such as $t_{\frac{1}{2}}^i = \frac{\ln(2)}{k_i}$. Searching for a bi-exponential law of degradation means searching the value of these two parameters. The experimental values of these two half-times are : $6 \pm 1.1 \text{min}$ and $217 \pm 53 \text{min}$. This experimental protocol corresponds, in our model, to the calculation of the stationary state of the system, and then to fix σ (HIF-1 α synthesis rate) and k_{tl} (pVHL mRNA translation rate)=0. We then calculated the degradation curve, that is to say the evolution of total HIF-1 concentration along time. By using a least-square method, we searched for the better bi-exponential law fitting this curve, following the same approach as Moroz et al. (2009) [58]. We made this simulation for σ (HIF-1 α synthesis rate), k_f (complex formation rate), k_t (HIF-1 α induced pVHL synthesis rate), A_{nc} , A_{cn} (pVHL export and import rates), and δ_c , δ_n (cytoplasmic and nuclear pVHL-dependent HIF-1 α degradation rates) varying in biologically relevant ranges. For each set of parameters tested, the bi-exponential law obtained was compared to the experimental data from Moroz et al. (2009) [58]. We could thus identify a set of parameters ensuring a very good fit between theoretical and experimental degradation laws. Figure 5.3 shows the comparison between the simulated and the experimental degradation curves, obtained with the parameters presented in Table 5.4. The default values of the parameters correspond to the values ensuring the best fit. We reproduced the rapid clearance, corresponding to cytoplasmic degradation, and the slow one, corresponding to nuclear degradation. These parameters have a good biological relevance. The synthesis rate of HIF-1 α is the same as the one used by Hunziker et al. (2010) [170] for p53, and the value of the complex formation rate (k_f) is in the range determined for the p53/Mdm2 complex. This agrees with the idea of the symmetry between the p53/Mdm2 and the HIF-1 α /pVHL couple. The values of the pVHL-dependent HIF-1 α nuclear and cytoplasmic degradation rates (δ_n and δ_c) correspond to a bigger proteasomal activity in the cytoplasm than in the nucleus for normal cell, which agrees with experimental data [65]. Finally, the pVHL export rate (A_{nc}) is much bigger than its import rate (A_{cn}), which corresponds to the experimentally observed massive export of pVHL out of the nucleus of non-proliferating cells [159, 161]. We notice that even if we have many undetermined parameters (σ , A_{nc} , A_{cn} , δ_c , δ_n , k_t , k_f), the bi-exponential curve is sufficient to constrain the parameters of the models to realistic values. Indeed, it gives the characteristic times of nuclear and cytoplasmic degradations, which impose the degradation rate in each compartment, the exchanges between them, and the HIF-1 α /pVHL interactions.

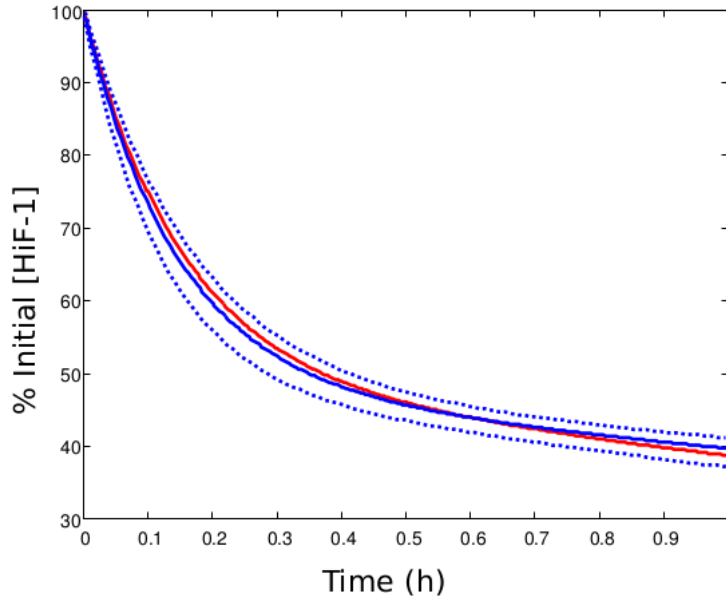


FIGURE 5.3: **Experimental and simulated HIF-1 α degradation curves.** Blue : experimental degradation curve determined by Moroz *et al.* (2009) [58] after the addition of cycloheximide. Solid line : mathematical bi-exponential law determined with experimental data. Dotted lines : uncertainty on the bi-exponential law. Red : simulated degradation curve. The total HIF-1 α level (free and complexed, cytoplasmic and nuclear) is plotted as the percentage of its initial value.

Simulation of HIF-1 α level in hypoxia We then consider a hypoxic event. Hypoxia strongly diminishes the affinity of pVHL for HIF-1 α [64, 178, 179]. This effect can be simulated by decreasing the value of the complex formation rate (k_f). The equilibrium levels of cytoplasmic and nuclear HIF-1 α were calculated with different values of k_f , with $k_{f_{hypoxia}} < k_{f_{normoxia}} = 1000$, in order to simulate the effects of hypoxia on HIF-1 α accumulation. Figure 5.4 shows the nuclear and cytoplasmic level of HIF-1 α for k_f in the range [0.1 100]. We notice that our simulated HIF-1 α accumulation is very similar to the exponential curve determined by Jiang *et al.* (1996) [33]. Our model reproduces well the switch-like accumulation of HIF-1 α when oxygen pressure diminishes. When k_f passes a threshold ($k_f \approx 2$), HIF-1 α accumulates in the nucleus. This value is coherent with data from the literature measuring the affinity of pVHL for HIF-1 α as a function of HIF-1 α hydroxylation. Illingworth *et al.* (2010) [178] and Hon *et al.* (2002) [179] showed that hydroxylation of the ODD-domain multiplied k_f by three orders of magnitude at least. When $k_f > 100$, HIF-1 α is close to its normoxic level (obtained for $k_f = 1000$), and is present in equal concentration in the nucleus and in the cytoplasm. The value of k_f which determines the switch (accumulation of HIF-1 α in the nucleus) is linked to the nucleo-cytoplasmic export rate (A_{nc}) of the pVHL/HIF-1 α complex. As shown in the literature, this export rate is supposed to vary between cells lines, and notably between proliferating and quiescent cells. As we noticed in the introduction, differentiated and slowly proliferating cells can be characterized by high values of

the pVHL-export rate A_{nc} , whereas non-differentiated, proliferating cells export pVHL with a lower rate.

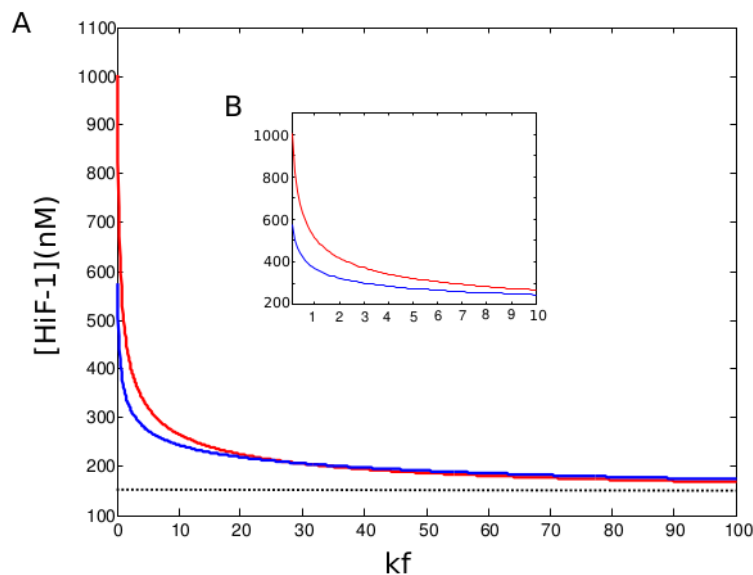


FIGURE 5.4: **Accumulation of HIF-1 α under hypoxia.** Nuclear (red curve) and cytoplasmic (blue curve) equilibrium levels of HIF-1 α are plotted as functions of the pVHL/HIF-1 α complex formation rate (k_f). k_f varies over a [1 100] range (A), and a [0.1 10] range (B).

We aim to study the influence of hypoxia and pVHL export rate (A_{nc}) on HIF-1 α level and localization. We made a map of the total (nuclear and cytoplasmic) HIF-1 α , normalized to its concentration in normoxia for a non-proliferating cell ($k_f=1000$, $A_{nc}=1000$), as a function of k_f and A_{nc} (Figure 5.5 A). We also represented the ratio between nuclear and cytoplasmic HIF-1 α concentrations : $R=[\text{HIF-1}\alpha]_{\text{nucleus}}/[\text{HIF-1}\alpha]_{\text{cytoplasm}}$ (Figure 5.5 B). We can notice that when A_{nc} is close to its default value (1000, case of slowly-proliferating cells), HIF-1 α is homogeneously present in the nucleus and in the cytoplasm during normoxia ($R \approx 1$). When hypoxia is intense ($k_f < 1$), HIF-1 α accumulates in the nucleus ($R > 1$). When A_{nc} is low (proliferating cells), HIF-1 α tends to accumulate in the nucleus even in normoxia.

Simulation of HIF-1 α kinetics under hypoxia We now simulate the kinetics of nuclear HIF-1 α accumulation under hypoxia. To that end, we first fix the system to its equilibrium state in normoxia, determined by the parameters presented in Table 5.4. In that case the HIF-1 α concentration at the equilibrium is 141nM. Then, we run a simulation with a new value of k_f , taking the equilibrium state as the initial condition of the system. This protocol simulates a hypoxic event, because we perturb the system at the equilibrium state by choosing hypoxic values of k_f , such as $k_{f_{\text{normoxia}}} > k_{f_{\text{hypoxia}}}$. Figure 5.6 represents the temporal evolution of nuclear HIF-1 α after the beginning of

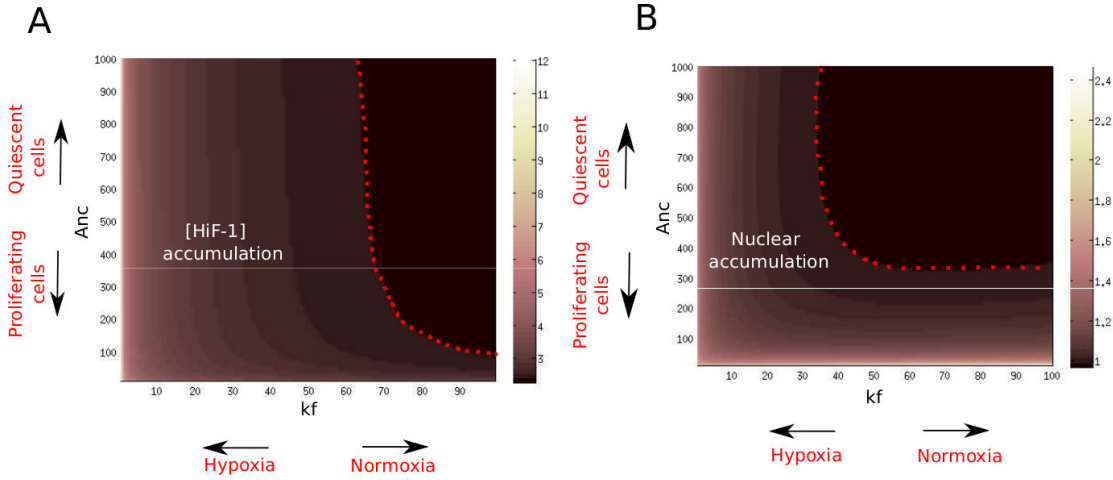


FIGURE 5.5: **HIF-1 α accumulation and localization as a function of hypoxia intensity and pVHL export rate.** A. The total (nuclear+cytoplasmic) HIF-1 α equilibrium level, normalized to its value obtained with the default parameters, is plotted as a function of the pVHL-export rate (A_{nc}) and of the pVHL/HIF-1 α complex formation rate (k_f). To the left of the red dotted line, total HIF-1 α significantly increases with respect to the default value. B. Ratio between nuclear and cytoplasmic HIF-1 α levels as a function of A_{nc} and k_f . To the left of the red dotted line, HIF-1 α accumulates in the nucleus.

three hypoxic events of increasing intensities : $k_{f_{hypoxia}} = 10, 5, 1$. The evolution of HIF-1 α concentration is in agreement with data from the literature, with a rapid increase for about two hours up to a maximum value, and a decrease down to an equilibrium value. When it reaches its maximal value, HIF-1 α concentration is multiplied by 4-8 with respect to its normoxic value, depending on the intensity of hypoxia. This result is coherent with data from the literature [57, 58].

Simulation of the effects of reoxygenation We now test the effect of reoxygenation on HIF-1 α level. To do so, we follow the same approach than in the simulation of hypoxic events. We calculate the stationary state of the system with a hypoxic value of k_f ($k_f < 1000$). Then, we take this hypoxic stationary state as the initial value of the system, and we run the simulation with the normoxic value of k_f ($k_f = 1000$). This situation simulates a reoxygenation event. We plotted the evolution of nuclear HIF-1 α level. Figure 5.7.A shows this temporal evolution during a sequence hypoxia/reoxygenation made for $k_{f_{hypoxia}} = 1$ or 10. We note that reoxygenation leads to a destabilization of HIF-1 α level, which enters an oscillatory mode with a delay depending on hypoxia intensity. The maximal value reached after reoxygenation by the nuclear concentration of HIF-1 α is about 2.5-fold its normoxic value. In the case of a moderate hypoxia ($k_f = 10$), it is more important than the stationary value in hypoxia.

We can notice that the oscillations are exclusively nuclear. The cytoplasmic level of HIF-1 α remains low after reoxygenation (data not shown). Besides, we could show that this reoxygenation-induced instability of nuclear HIF-1 α level is linked to the pVHL import/export dynamics. Figure 5.7.B compares the molecular response to reoxygenation

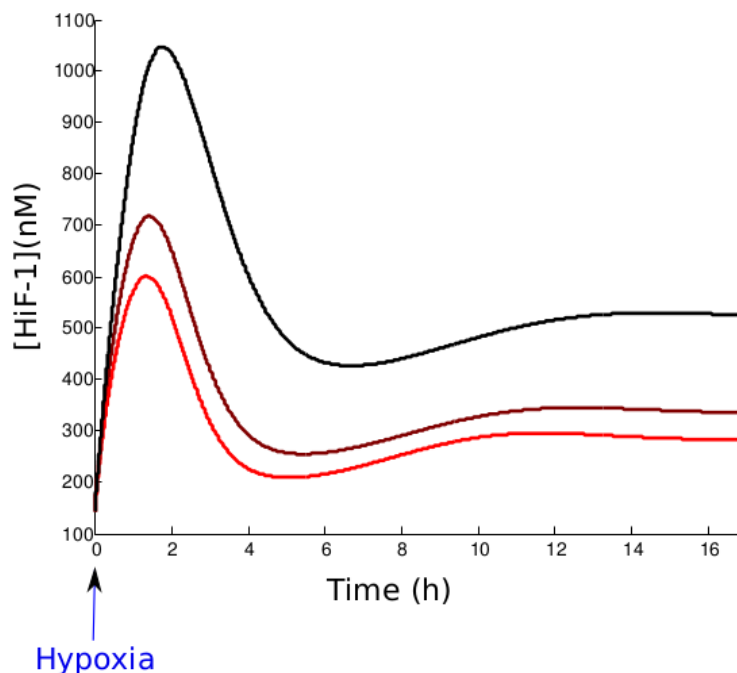


FIGURE 5.6: **Simulation of the temporal evolution of HIF-1 α during a hypoxic event.** From the red curve to the black curve : simulations for increased levels of hypoxia, with $k_{f_{hypoxia}} = 10, 5, 1$.

of our compartmentalized model and of a non-compartmentalized model. To consider a non-compartmentalized model, we imposed $A_{nc} = 0$ and we plotted the temporal evolution of HIF-1 α , normalized to the value for normoxia. The instabilities of the nuclear HIF-1 α level are strongly attenuated in this case. Thus, compartmentalization of HIF-1 α is crucial to generate reoxygenation-induced instabilities.

Simulation of HIF-1 α level in tumor cells Different types of mutations can affect HIF-1 α regulation in cancer cells, leading to its pathological accumulation [118]. Genetic deregulation of HIF-1 α synthesis can promote a 3-8-fold increase of HIF-1 α mRNA level [173–175]. In our model, this corresponds to a 3-8-fold increase of the HIF-1 α synthesis rate (σ). Yoshikawa *et al.* (2006) [174] observed in peritoneal cancers a 3-fold increase of mRNA and a 2-fold increase in VEGF mRNA expression. As VEGF is a target gene of HIF-1, we can consider that an increase of VEGF expression reflects a similar increase in HIF-1 α protein level. Second, pVHL activity can be impaired. It is notably the case in Renal Clear Carcinoma (RCC), known to be due to different types of pVHL mutations [40, 172]. In these types of cancer, HIF-1 level is not due to genetic overexpression, since some authors have found a constant level of HIF-1 mRNA [39, 186]. Wiesener *et al.* (2001) [39] found a 6-7-fold increase of VEGF mRNA in RCC.

First, we aim to simulate the effects of a genetic deregulation of HIF-1 α expression in the normoxic level of the protein. We calculated the stationary value of the total

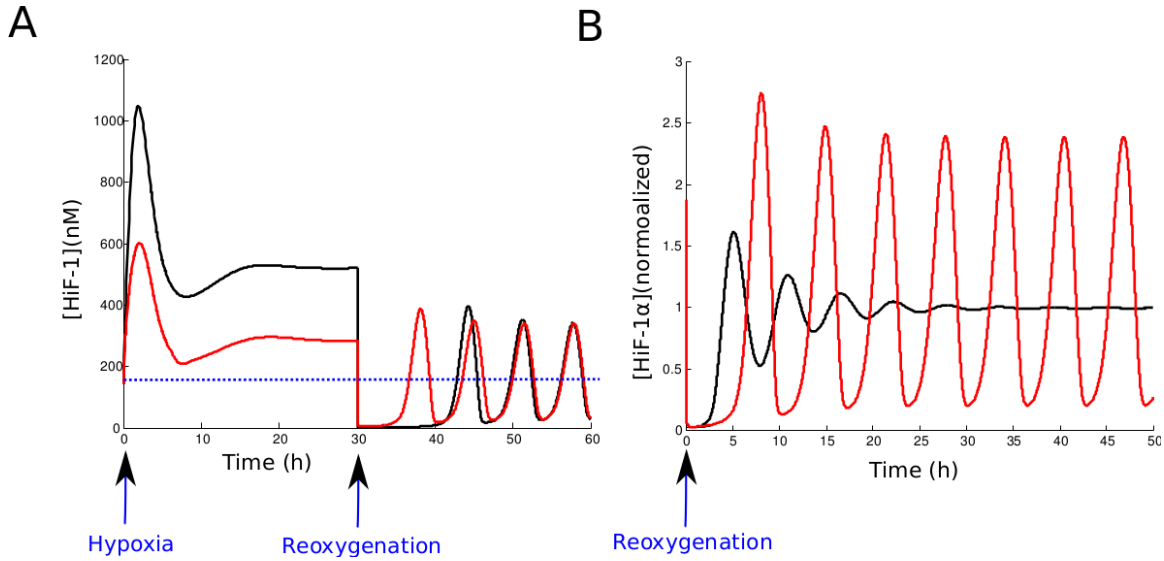


FIGURE 5.7: **Effect of a hypoxia/reoxygenation sequence on nuclear HIF-1 α level.** A. The level of nuclear HIF-1 α is plotted during two 30h hypoxic events of different intensities, followed by reoxygenation. Red : $k_f=10$. Black : $k_f=1$. The dotted blue line corresponds to the HIF-1 α concentration in normoxia. B. Response to reoxygenation in our compartmentalized model (red curve) and in a non-compartmentalized model of HIF-1 α regulation (black curve). The nuclear HIF-1 α was normalized to its value at normoxia

(nuclear and cytoplasmic) HIF-1 α level as a function of the HIF-1 α synthesis rate (σ), and of the pVHL export rate (A_{nc}). We considered this last parameter because it is supposed to vary with cell state. As explained previously, non-proliferative and differentiated cells are supposed to exhibit a high value for A_{nc} , whereas proliferative cells have a low pVHL-export rate. We normalized this value with the level of HIF-1 α calculated for a normal cell, characterized by the default values of Table 5.4. Figure 5.8.A presents the value of this ratio $R=[\text{HIF-1}\alpha]_{cancer}/[\text{HIF-1}\alpha]_{normal}$ as a function of A_{nc} and σ . The increase of HIF-1 α synthesis rate (σ) makes HIF-1 α to accumulate in normoxia compared to the non-mutated case. The calculated increase of HIF-1 α (multiplied by 1-4) is coherent with data from the literature. We could place on the diagram the position of the peritoneal cancer studied by Yoshikawa *et al.* (2006) [174]. The space we delimited corresponds to a 2-fold increase of HIF-1 α protein and a 3-fold increase of HIF-1 α mRNA, corresponding to a 3-fold of σ . We also notice that low values of the pVHL export rate (A_{nc}) enhances the effect of mutations related to the alteration of the HIF-1 α production rate (σ).

We then compare the response to a hypoxia/reoxygenation signal of normal cells, and cells presenting a deregulation of HIF-1 α expression (σ mutated cells). We simulated the effects of a reoxygenation after a hypoxic event, and we plotted (Fig. 5.8.B) the evolution of total HIF-1 α for $\sigma=1000$ (normal cells) and 5000 (tumor cells). We note that the oscillations are amplified in the tumor cells. Indeed, the ratio between the maximal value of the oscillations and the normoxic stationary level of HIF-1 α is

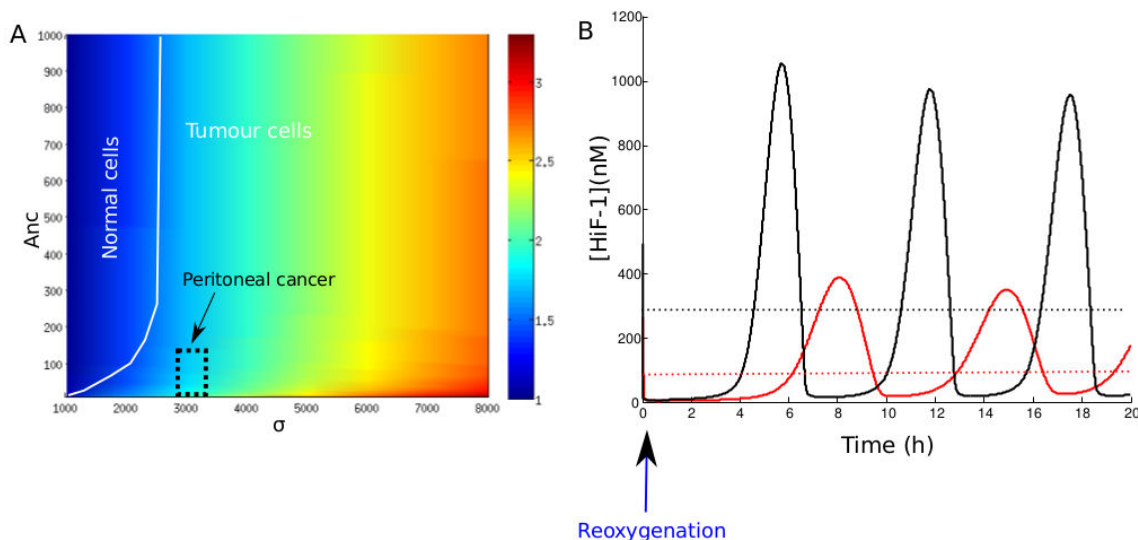


FIGURE 5.8: **Consequences of a pathological overexpression of HIF-1 α .** A. Accumulation of HIF-1 α in σ mutated cells, compared to normal cells. The ratio $[\text{HIF-1}\alpha]_{\text{cancer}}/[\text{HIF-1}\alpha]_{\text{normal}}$ is plotted as a function of σ (HIF-1 α synthesis rate) and A_{nc} (pVHL export rate). The black dotted square indicates the location of the peritoneal cancer studied by Yoshikawa *et al.* (2006) [174], characterized by a 2-fold increase of HIF-1 α protein and a 3-fold increase of HIF-1 α mRNA. B. Effects of reoxygenation on normal cells, and mutated cells. Reoxygenation after hypoxia is simulated, and the evolutions of nuclear HIF-1 α concentration are plotted in the case of normal ($\sigma=1000$, red curve), and σ mutated cells ($\sigma=5000$, black curve). The dotted lines represents the normoxic equilibrium levels in each case.

equal to ≈ 3.2 for tumor cells, and to ≈ 2.5 for normal cells. Thus, our model predicts that mutations of the HIF-1 σ synthesis rate promotes tumorigenesis because it increases the cellular level of HIF-1 α , and because it amplifies the instabilities due to reoxygenation.

Second, we aim to quantify the effects of pVHL mutations on HIF-1 α accumulation. We plotted the value of $R=[\text{HIF-1}\alpha]_{\text{cancer}}/[\text{HIF-1}\alpha]_{\text{normal}}$ as a function of the pVHL/HIF-1 α complex formation rate (k_f), and of the pVHL export rate (A_{nc}). The result was plotted in a (A_{nc}, k_f) diagram (Figure 5.9). We can locate on this diagram the RCC cancer cells studied by Wiesener *et al.* (2001) [39]. These cells present a mutation on pVHL, and a 6-7-fold increase of HIF-1 α genetic activity. Our model leads to the hypothesis that the pVHL/HIF-1 α complex formation rate is divided by about 100 in this type of cancer.

Simulation of the effects of therapies Since it is overexpressed in many cancer, HIF-1 α became a target for anti-cancer therapies [116]. We can use our model to predict the efficiency of different therapeutic strategies. Our model suggests that a therapy which aims to regulate HIF-1 α has to reduce its nuclear normoxic level, but also to attenuate the instabilities induced by reoxygenation. A first therapeutic

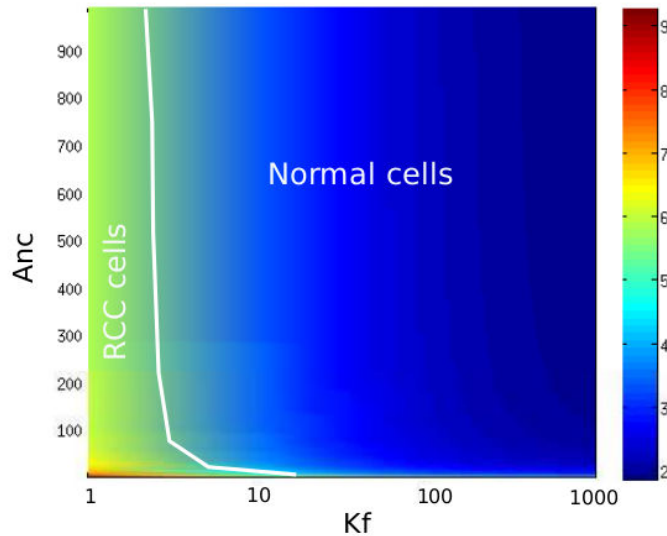


FIGURE 5.9: **Consequences of pVHL mutations.** Accumulation of HIF-1 α in tumor cells with mutated pVHL. The value of $R=[\text{HIF-1}\alpha]_{\text{cancer}}/[\text{HIF-1}\alpha]_{\text{normal}}$ is plotted as a function of k_f (pVHL/HIF-1 α complex formation rate) and A_{nc} (pVHL export rate). The white line limits the space of the RCC cancer cells studied by Wiesener *et al.* (2001) [39].

strategy we can test consists in using siRNA to reduce the synthesis of HIF-1 α [187]. This corresponds to a decrease of the synthesis rate of HIF-1 α from its default value ($\sigma=1000$). We consider a cancer cell presenting mutations of pVHL ($k_f < 1000$), and we calculated the ratio $R=[\text{HIF-1}\alpha]_{\text{cancer}}/[\text{HIF-1}\alpha]_{\text{normal}}$ in the nucleus as a function of A_{nc} (pVHL export rate) and k_f (pVHL/HIF-1 α complexation rate) for $\sigma < 1000$. We chose $\sigma=200$. We consider here the nuclear level because it is responsible for the genetic activity of HIF-1 α . This decrease of the HIF-1 α synthesis rate (σ) simulates the action of the siRNA. Figure 5.10 compares the nuclear HIF-1 α accumulation without therapy and with siRNA therapy. We note that a 5-fold decrease of HIF-1 α expression is efficient to decrease the HIF-1 α level. For instance, the RCC cells localized in the diagram, presenting a 6-7-fold increase of nuclear HIF-1 α level without treatment, and a 2-fold increase after treatment. We then test if the siRNA therapy is able to attenuate the instabilities generated by reoxygenation. Figure 5.11 shows that a decrease of σ attenuates the oscillations. HIF-1 α does not exceed any more the normoxic value for a normal cell.

Then, we test another therapeutic strategy, which consists in promoting the pVHL-dependent degradation of HIF-1 α [188]. We modeled this effect by increasing the pVHL-dependent cytoplasmic and nuclear HIF-1 α degradation rates, δ_c and δ_n . We first compute the effects of this therapy on nuclear HIF-1 α normoxic level for a tumor cell presenting a deregulation of HIF-1 α expression (σ -mutated cells). We considered a 10-fold increase of the pVHL-dependent degradation rates (δ_c and δ_n). Figure 5.12 shows the value of $R=[\text{HIF-1}\alpha]_{\text{cancer}}/[\text{HIF-1}\alpha]_{\text{normal}}$ in the nucleus as a function of σ (HIF-1 α

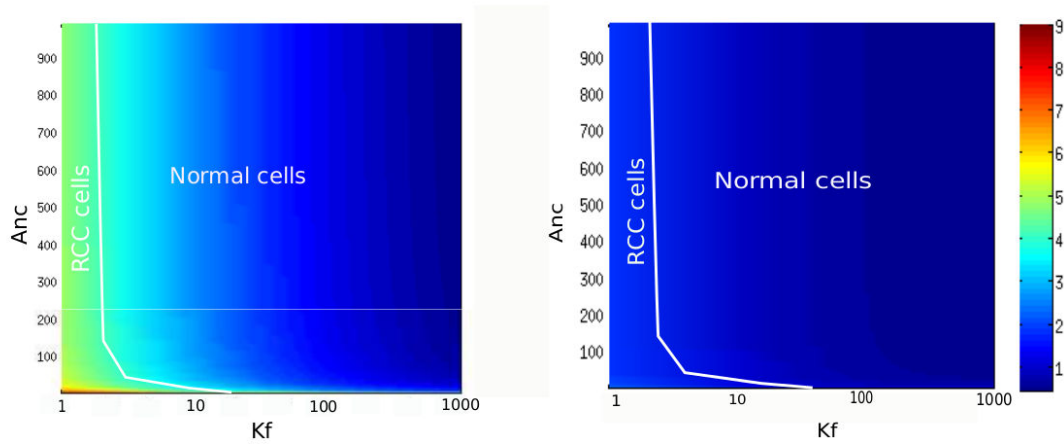


FIGURE 5.10: **Effects of siRNA therapy in pVHL mutated cells.** Nuclear Accumulation of HIF-1 α in the tumor case, without or with therapy. We calculated the value of $R = ([\text{HIF-1}\alpha]_{\text{cancer}} / [\text{HIF-1}\alpha]_{\text{normal}})$ (in the nucleus) as a function of k_f (complexation rate) and A_{nc} (pVHL export rate). A. Without siRNA therapy (HIF-1 α synthesis rate $\sigma=1000$). B. With siRNA therapy ($\sigma=200$).

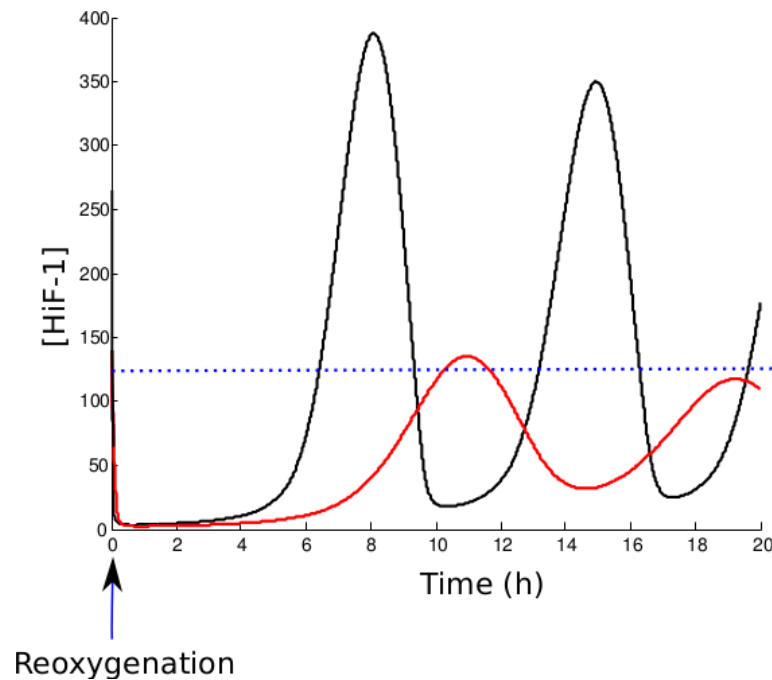


FIGURE 5.11: **Effects of siRNA therapy on HIF-1 α level evolution after reoxygenation.** Reoxygenation after a hypoxic event is simulated for the HIF-1 α synthesis rate $\sigma=1000$ (black curve) and $\sigma=200$ (red curve). The blue dotted line represents the normoxic level for a normal cell.

synthesis rate) and A_{nc} (pVHL export rate). We notice that HIF-1 α level strongly decreases when the treatment is applied in normoxia. For instance, the peritoneal cancer

localized in the diagram presents a 2-fold increase of HIF-1 α level when untreated, and a 1.2-fold increase after treatment. We then test if this therapy attenuated the instabilities due to reoxygenation. Figure 5.13 shows the evolution of HIF-1 α after reoxygenation for a $\sigma_{mutated}$ tumor cell ($\sigma=3000$), with or without treatment. We notice that the oscillations are not significantly attenuated. Even if the pVHL-dependent degradation rate had been multiplied by 10, the amplitude would still exceeds the normoxic level. Thus, our model predicts that this strategy is not efficient to suppress the effects of reoxygenation on HIF-1 α accumulation.

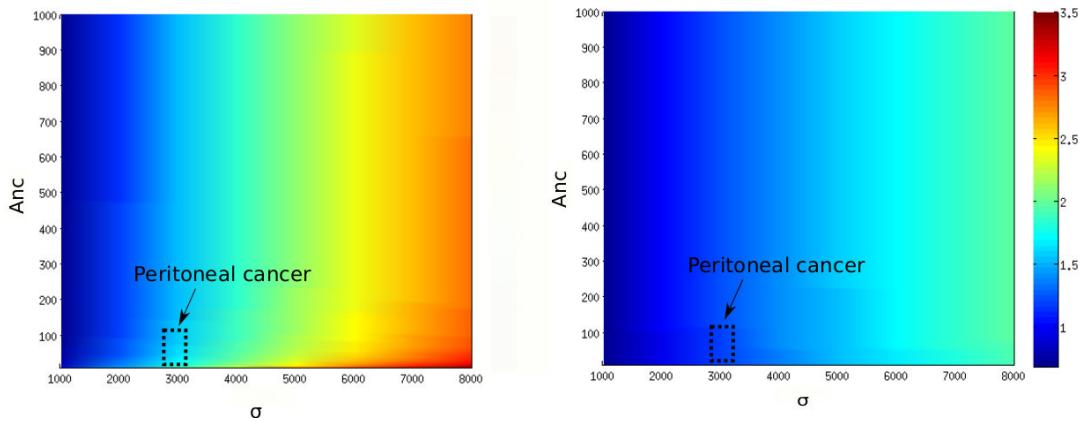


FIGURE 5.12: **Effects of an increased proteasomal activity on nuclear HIF-1 α level of σ -mutated cells.** The value of $R=[\text{HIF-1}\alpha]_{cancer}/[\text{HIF-1}\alpha]_{normal}$ is plotted as a function of A_{nc} (pVHL export rate) and σ (HIF-1 α synthesis rate). Left : non-treated cells. Right : result after a 10-fold increase of pVHL-dependent degradation of cytoplasmic and nuclear HIF-1 α degradation rates (δ_c and δ_n).

Discussion

In this paper, we construct and use a mathematical model of HIF-1 α regulation. We consider, in agreement with the literature, that the protein is present both in the nucleus and in the cytoplasm. One originality of the model is that the protein is degraded in these two compartments in a pVHL-dependent manner. The constitutive pVHL-shuttle ensures the exchanges of HIF-1 α between the cytoplasm and the nucleus. We consider a simple regulatory model, directed by the oxygen-dependent affinity of pVHL for HIF-1 α , and a feedback of HIF-1 α on pVHL synthesis.

This point of view is original and interesting, because it changes the traditional simulation approach of HIF-1 α regulation. Indeed, a current field of research tries to find the core pathways of the complete HIF-1 α regulation network responsible for its observed behavior, notably the switch-like accumulation [165]. To answer this question, the previous models often consider the oxygen-dependent action of PHDs, and some of the numerous feedbacks on the HIF-1 α regulation system, such as the activation of PHDs synthesis by HIF-1 [67], or the product inhibition by succinate [69]. However,

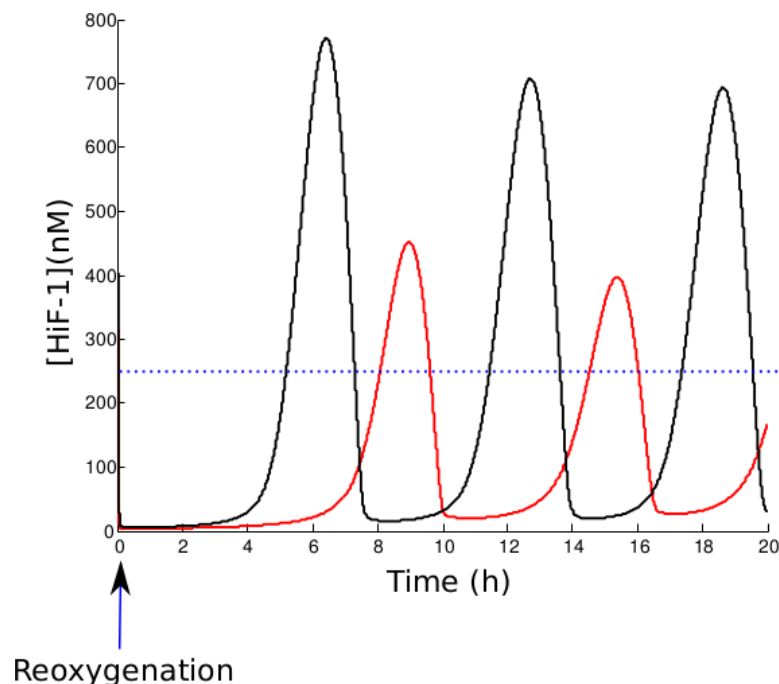


FIGURE 5.13: **Effects of an increased proteasomal activity on HIF-1 α evolution after reoxygenation.** Reoxygenation after a hypoxic event was simulated for non-treated cells (black curve), and with a 10-fold increase of pVHL-dependent HIF-1 α degradation rate σ (red curve). The cell considered is a tumor cell, with a deregulation of HIF-1 α expression ($\sigma=3000$) The blue dotted line represents the normoxic level for this cell.

the feedback on pVHL synthesis was never considered. Here, we aim to show that the simple pVHL/HIF-1 α system, together with a compartmentalization aspect, can explain all essential behavior of HIF-1 α regulation.

First, we show that our model explains well the dynamics of HIF-1 α degradation in normoxia, measured by Moroz *et al.* (2009) [58]. Besides, the dynamics of HIF-1 α accumulation is simulated in agreement with experimental data. Finally, we could quantify the nuclear and cytoplasmic equilibrium accumulation of the protein under hypoxia. We found a switch-like evolution of the cellular level of HIF-1 α , with a strong accumulation when the pVHL-HIF-1 α complex formation rate is decreased by three orders of magnitude, as demonstrated experimentally [178]. Since our model differentiates cytosolic and nuclear HIF-1 α , we could compare the protein level in these two compartments, as a function of hypoxia and of the pVHL export rate. We found that the accumulation of HIF-1 α is nuclear in hypoxia, as known in the literature. In normoxia, cytoplasmic and nuclear levels are low and equivalent. Thus, a threshold value of the complexation rate, k_f^* , determines the beginning of the nuclear accumulation. When $k_f < k_f^*$, HIF-1 α accumulates in the nucleus. Our model predicts that the dynamics of the pVHL shuttle is important to determine the value of k_f^* . Cells with high pVHL-export rate (corresponding, according to the literature, to slowly proliferating cells)

exhibits a lower k_f^* than highly proliferating cells, with a weak pVHL-export rate. This result is consistent with experimental data, showing that quiescent, differentiated cells tend to accumulate HIF-1 α equally in the cytoplasm and the nucleus, whereas highly proliferating cells exhibit a strong nuclear accumulation [65]. Thus, our model confirms that the difference observed between cells in the pVHL export rate [159] can explain the differences in HIF-1 α localization. As a consequence, the bi-compartments model, with a cytoplasmic and nuclear degradation, explains in a satisfactory way various experimental data about HIF-1 α localization, induction, and degradation dynamics.

Second, our model provides interesting results about the molecular responses to reoxygenation. Experimentally, it was observed that reoxygenation causes specific molecular and cellular response. HIF-1 α -dependent apoptosis observed during reoxygenation, and the enhancement of the synthesis of HIF-1 α -related genes show that HIF-1 α activity exhibits an interesting behavior during reoxygenation. The observation of a counter-intuitive increase of HIF-1 α level by Conde *et al.* (2012) [23] confirms this idea. Our model is able to generate a specific response to reoxygenation event which is in agreement with these experimental observations.

During a simulated hypoxic event, HIF-1 α accumulation does not generate instabilities. The protein rapidly reaches an equilibrium level, depending on oxygen pressure in a switch-like manner. On the contrary, brutal reoxygenation generates strong instabilities of the protein level. It decreases suddenly, and after 3 hours, enters into an oscillatory mode, with a large amplitude. The maximal value of HIF-1 α reached after hypoxia/reoxygenation is about 2.5-fold higher than the normoxic level, and can exceed the hypoxic level. We also observed that this reoxygenation-induced instability was specific to our compartmentalized model. If we do not consider exchanges between cytoplasm and nucleus, the oscillations are strongly attenuated. Thus, the presence of HIF-1 α instabilities is directly due to the compartmentalization of its degradation dynamics. This oscillatory behavior is biologically relevant. Indeed, it is well known that the oscillatory pattern of transcription factors promotes the expression of specific genes, which are not activated in the case of a stable level of the protein. Thus, reoxygenation-mediated oscillations of HIF-1 α can explain the synthesis of proteins which are not synthesized during a hypoxic event. Besides, the links existing between HIF-1 and the p53-dependent apoptosis pathways can lead to formulate the following hypothesis [46]. The oscillations of HIF-1 α generate strong oscillations of p53, which is a known death signal [170]. Thus, it could explain the HIF-1-dependent massive apoptosis observed in some cells after reoxygenation [59]. Besides, our model predicts that these oscillations are exclusively nuclear. The cytoplasmic level remains low after reoxygenation. The biological interest of this behavior is clear. Since HIF-1 α is a transcription factor, its activity is concentrated in the nucleus. Thus, the biological effects of the oscillations are maximized. Clearly, more experimental works are needed to test if these oscillations are effectively present after a hypoxia/reoxygenation event. The fact that they were not observed until now can be due to a lack of data, or to the fact that other unidentified biological mechanisms attenuate HIF-1 α instabilities. However, the important conclusion of this paper is that our model of HIF-1 α regulation, based on experimental data, simulates a specific molecular response to hypoxia/reoxygenation

signal. More precisely, we show that our simple HIF-1 α /pVHL system generates strong instabilities of HIF-1 α level following reoxygenation. Thus, it gives a possible factor contributing to the similar tendency experimentally observed on HIF-1 α level and genetic activity.

Finally, we used our model to simulate the effects of known mutations of HIF-1 α pathways in tumor cells. Notably, we could test the influence of mutations impairing pVHL function, and compare this to a case of Renal Cell Carcinoma studied in the literature [39]. Reciprocally, we used the model to quantify the efficiency of different therapeutic strategies, such as siRNA-mediated inhibition of HIF-1 α expression, and promotion of its proteasomal degradation. Clearly, as it is an over-simplified model, it cannot reflect the exact response of the HIF-1 α regulation system to mutations and anti-cancer therapies. However, it provides methods to include these aspects in a ODEs model of HIF-1 α regulation, in a compartmentalized context. For instance, our model enables us to underline that efficient anti-HIF-1 α strategies have to decrease its equilibrium level, but also to attenuate the instabilities generated by reoxygenation. In the future, it would be necessary to plug this pVHL/ HIF-1 α model into a more complete system, including the PHDs and all the feedbacks known in literature, to make our test of therapies more useful.

As a conclusion, we can notice that the principal interest of our model is to find a new core-system of the HIF-1 α regulation network. Our system is based on a oxygen-dependent affinity of pVHL for HIF-1 α , a feedback of HIF-1 α on pVHL mRNA synthesis, and the existence of a nucleo-cytoplasmic pVHL shuttle. We show that this simple model, built on the basis of experimental data, explains all the well known essential behaviors of HIF-1 α regulation. Besides, our model exhibits a specific response to reoxygenation event, which provides a possible factor contributing to experimental observations about HIF-1 α level and genetic activity during reoxygenation. Finally, our model also provides a method to take into account the HIF-1 α /pVHL feedback, and the compartmentalization aspect in a future more complete model.

5.2.3 Conclusion

Dans cet article, nous avons proposé un modèle de régulation du niveau intracellulaire de HIF-1 α . Avec un nombre restreint d'acteurs et de relations biochimiques, nous reproduisons les caractéristiques principales de la réponse moléculaire à l'hypoxie. A l'opposé des travaux précédents, considérant dans leur détail les nombreuses réactions enzymatiques, et les boucles de rétroactions associées, des résultats similaires sont obtenus ici *a minima*. Nous avons pu montrer, ainsi, que la rétroaction de HIF-1 sur la synthèse de pVHL suffisait à expliquer une grande partie des observations expérimentales. D'autre part, notre approche met l'accent sur la compartimentation de la dégradation de HIF-1 α , tout en fournissant un cadre formel permettant de l'appréhender mathématiquement. Cette première série de conclusions est d'importance, car elle ouvre une voie nouvelle dans les travaux de modélisation des réseaux biochimiques liés à l'hypoxie. En outre, ce travail offre un éclairage intéressant sur les

phénomènes moléculaires et cellulaires associés au retour à la normoxie après un épisode hypoxique. Comme nous l'avons décrit précédemment, la réoxygénation entraîne une réponse remarquable, observée *in vitro* et en conditions physiologiques : augmentation de l'activité de HIF-1 α , expression de gènes spécifiques, apoptose. La simulation d'une situation de réoxygénation se solde, dans notre étude, par l'apparition de fortes instabilités du niveau de HIF-1 α . Le niveau de la protéine entre dans un régime oscillant, dont la valeur maximale peut dépasser le niveau atteint en hypoxie. Ce résultat est intéressant, car il fournit une explication possible aux observations expérimentales. L'expression de gènes spécifiques, par exemple, peut être facilement liée au signal oscillant du facteur de transcription HIF-1. Afin d'approfondir nos conclusions, nous avons formulé un modèle préliminaire décrivant les relations biochimiques tissées entre les voies de l'hypoxie et celles de l'apoptose. Nous avons alors pu montrer comment le régime oscillant de HIF-1 était capable de générer un signal du même type pour la protéine p53. Ce type de signal étant connu pour déclencher l'apoptose, nos résultats s'avèrent donc être une explication possible, parmi d'autre, des vagues d'apoptose observées lors de réoxygénations brutales (cas des ischémies). Cependant, cette idée doit être testée expérimentalement. Notamment, il serait intéressant de suivre, avec précision et sur le long terme, l'évolution intra-cellulaire de HIF-1 α et de p53 lors de retours à la normoxie, de manière à tester l'existence d'un tel régime oscillatoire. Notons d'ores et déjà que la grande quantité d'acteurs non pris en compte dans notre modèle de la régulation de HIF-1 α (la voie mTOR notamment) pourront ici jouer un rôle important, complexifiant par là même l'interprétation des données expérimentales. Finalement, l'intérêt principal de ce travail est de présenter le pouvoir explicatif d'un modèle très simple, prenant en compte deux agents principaux (HIF-1 α et pVHL). Nous rendons ainsi compte du comportement, au premier ordre, du système de régulation de HIF-1 α . Les résultats obtenus, s'ils sont à relativiser au vu de la colossale complexité que nous occultons délibérément, trouvent donc leur utilité dans l'analyse d'une stratégie de modélisation jusqu'ici négligée. Par exemple, les démarches de modélisation des liens entre les voies de l'apoptose et celles de l'hypoxie possèdent, avec la relation *yin-yang*, une base de travail intéressante à creuser. Notre étude fournit un premier cadre permettant d'aborder cette question avec des outils relativement simples et efficaces. Dans la section suivante, nous proposons une extension du formalisme présenté dans notre article, incluant les liens unissant les voies de l'hypoxie et celles de l'apoptose au sein d'un modèle *yin-yang* simplifié.

5.3 Comment la réoxygénation peut-elle induire l'apoptose ?

L'article précédent a permis de mettre en évidence le rôle de la compartimentation de HIF-1 α dans la dynamique de sa dégradation d'une part, et d'autre part, dans la génération d'instabilités oscillatoires lors d'épisodes de réoxygénation. Nous avons évoqué, en discussion, l'influence potentielle de ce signal sur l'apoptose. En effet, comme nous l'avons noté, le retour à la normoxie lors d'épisodes hypoxiques tend à déclencher l'entrée en apoptose, dans des conditions expérimentales *in vitro* [164] ou physiologiques

(ischémie). D'autre part, l'intrication étroite des voies de régulation dépendantes de p53 (protéine clé régissant les processus d'apoptose) et celles dépendantes de HIF-1 autorise la formulation de l'hypothèse suivante : les oscillations apparaissant lors d'une remontée du niveau d'oxygène peuvent générer un signal périodique du niveau de p53. Or, ce type de signal est bien connu dans la littérature consacrée à l'apoptose. En imposant un stress génotoxique, Geva-Zatorsky et *al.*(2006) [189] ont, par exemple, généré des oscillations de p53, et de Mdm2, avec un période d'environ 5 heures. De manière générale, un signal oscillant de p53 est un fort promoteur d'apoptose [170, 190]. Nous avons donc cherché à illustrer ce point en proposant un modèle préliminaire des relations biochimiques existant entre HIF-1, p53, et leur régulateur directs (pVHL et Mdm2).

5.3.1 Les interconnexions des voies hypoxiques et apoptotiques : la relation *yin-yang*

Les interactions complexes entre les voies de régulation liées à l'hypoxie, dominées par la protéine HIF-1, et celles liées à l'apoptose, dominées par p53, sont un domaine d'intense recherche depuis plus d'une décennie [46]. Rappelons tout d'abord que les deux protéines sont régulées selon un principe similaire de rétroaction positive sur leur inhibiteur [167]. Cette propriété a d'ailleurs été utilisée pour construire notre modèle de régulation de HIF-1 α [94]. En vertu de ces schémas de régulations, nos deux protéines ont la capacité de s'accumuler rapidement lorsque les signaux de stress dépassent un seuil critique. En outre, il a été observée, lorsque l'hypoxie est sévère ou prolongée, que p53 est induit et provoque l'apoptose [5, 191]. De manière intéressante, cette induction n'est notable qu'en condition d'hypoxie extrême (<0.02% O₂), ou durable (>16h) [191, 192]. Si les conditions sont plus modérées, p53 ne semble pas être induit ; à l'inverse, il peut avoir tendance à décroître [193], mettant en évidence l'existence d'effets contradictoires de l'hypoxie sur l'apoptose en fonction de l'intensité et de la durée de l'épisode [45]. Sermeus et *al.* (2011) [46] ont généralisé cette idée en proposant un modèle de balance entre HIF-1 et p53 [46]. En normoxie, les deux protéines ont un faible niveau d'expression. Lorsque la pression d'oxygène diminue, le niveau de HIF-1 s'élève, ce qui diminue encore le niveau de p53. La cellule entre dans une phase de résistance à l'apoptose. Lorsque l'hypoxie devient sévère, p53 augmente, HIF-1 décroît, et la cellule entre en apoptose. Comment expliquer cette balance à l'échelle moléculaire ? De nombreuses relations d'interactions protéiques ont été mises en évidences entre p53, HIF-1 α , et leurs régulateurs, Mdm2 et pVHL. Afin de formaliser les relations biochimiques mises en évidences expérimentalement, Roe et *al.* (2006) [194] ont proposé un schéma qu'ils ont baptisé équilibre *yin-yang*. Ce modèle a été repris et complété dans les années suivantes [46]. Il présente un réseau complexe d'interactions au sein duquel chaque protéine peut affecter les trois autres. L'ensemble de ces relations protéiques sont représentées sur la figure 5.14, issue du travail de review de Sermeus et *al.* Outre les mécanismes de régulation de HIF-1 α par pVHL et de p53 par Mdm2, les auteurs relèvent un effet négatif de p53 sur HIF-1 α . L'absence de protéine p53 fonctionnelle

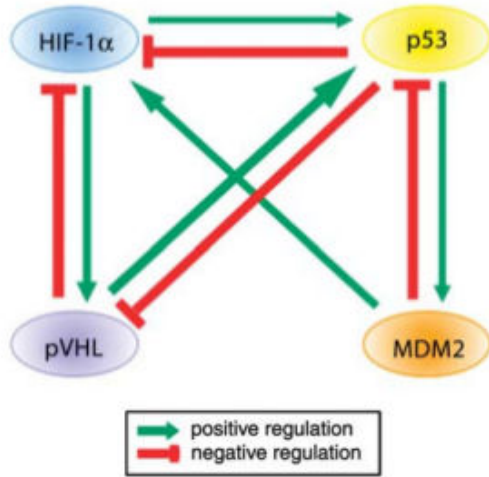


FIGURE 5.14: Représentation schématique des modulations réciproques de HIF-1 α , p53, pVHL et MDM2. D'après [46]

semble en effet promouvoir la stabilité de HIF-1 α [195]. Réciproquement, HIF-1 α semble avoir un effet positif sur p53. Deux mécanismes peuvent être à la source de cette observation. Suzuki et al ont proposé que la déphosphorylation de HIF-1 α durant une hypoxie sévère pouvait engendrer une augmentation du niveau intracellulaire de p53 [196]. D'autre part, l'existence avérée d'interactions biochimiques entre HIF-1 α et MDM2 peut jouer un rôle crucial dans les interactions entre les voies de l'hypoxie et celles de l'apoptose [197, 198]. La formation de complexe, outre un potentiel effet de stabilisation de HIF-1 α , fait baisser le niveau de MDM2 libre, et inhibe ainsi la dégradation de p53. Enfin, des preuves expérimentales accumulées notamment par Roe et al. (2006) [194] tendent à montrer que pVHL régule positivement le niveau de p53 et son activité génétique. Réciproquement, p53 inhibe l'expression de pVHL.

Dans cette partie, nous avons choisi d'illustrer le rôle de la balance *yin-yang* dans la réponse de p53 au signal de réoxygénation. Pour cela, nous avons considéré les deux systèmes de régulation "miroirs" p53/MDM2 et HIF-1 α /pVHL. Nous y avons adjoint la formation de complexes MDM2/HIF-1 α comme exemple des liens biochimiques tissés entre les deux réseaux. Le système étudié est donc relativement simple eu égard à la complexité des interactions biologiques ; il sert avant tout de point de départ à une modélisation plus exhaustive de la balance *yin-yang*.

5.3.2 Formulation du modèle *yin-yang*

Ce modèle se base sur notre travail, présenté précédemment, concernant la régulation de HIF-1 α [94]. Rappelons que nous considérons la dégradation de HIF-1 α comme contrôlée par pVHL, dont l'expression génétique est réciproquement induite par HIF-1 α . La dynamique de ce système est compartimentée, la communication entre le noyau et le cytoplasme étant assurée par une navette constitutive de la protéine pVHL. Nous considérons ici, parallèlement à ce système, un modèle de régulation de p53 similaire à celui utilisé par Hunziker et al. [170]. Les couples HIF-1 α /pVHL et p53/MDM2 présentent les mêmes types d'interactions, à cette exception près que l'on néglige la

compartimentation de p53, sa dynamique spatiale étant complexe et mal connue. On considère donc que p53 et Mdm2 sont exclusivement nucléaires. L'équation de couplage entre les deux systèmes décrit la formation d'un complexe HIF-1 α nucléaire/Mdm2. La formulation mathématique est donnée ci-dessous. Les équations (5.10) à (5.16) sont identiques à celles présentées dans l'article précédent [94]. Les équations (5.17) à (5.20) modélisent la dynamique du système p53/Mdm2. Elles sont exactement similaires aux équations régissant la régulation de HIF-1 α , la compartimentation en moins. Elles décrivent respectivement l'évolution temporelle des niveaux de p53 (p), de l'ARNm codant pour Mdm2 (m_m), de Mdm2 (m), du complexe Mdm2/p53 (c). Enfin, l'équation (5.20) décrit la formation du complexe HIF-1 α /Mdm2 (c_{mh}). Ce complexe, en diminuant le niveau de Mdm2 libre, régule positivement le niveau de p53. En plus des paramètres introduits dans Bedessem et *al.* [94], nous considérons ainsi λ, μ, ν (dégradation chimique de p53, Mdm2, et des ARNm codant pour Mdm2), ρ (vitesse de synthèse de p53), $k_{f,pm}$ (taux de formation du complexe p53/Mdm2), $k_{b,pm}$ (taux de dégradation du complexe p53/Mdm2), $k_{f,mh}$ (taux de formation du complexe HIF-1 α /Mdm2), $k_{b,mh}$ (taux de dégradation du complexe HIF-1 α /Mdm2), $k_{t,m}$ (vitesse de transcription des ARNm codant pour Mdm2), $k_{tl,m}$ (vitesse de traduction de ces ARNm), et δ (vitesse de dégradation de p53 médiée par Mdm2).

$$\frac{dh_n}{dt} = \sigma - \alpha h_n - k_f v_n h_n + (k_b + \gamma) c_n \quad (5.9)$$

$$\frac{dh_c}{dt} = (k_b + \gamma) c_c - k_f h_c v_c - \alpha h_c \quad (5.10)$$

$$\frac{dv_m}{dt} = k_t h_n^2 - \beta v_m \quad (5.11)$$

$$\frac{dv_n}{dt} = k_{tl} v_m - k_f v_n h_n + k_b c_n + (\delta_n + \alpha) c_n - \gamma v_n + A_{c,n} v_c - A_{n,c} v_n \quad (5.12)$$

$$\frac{dv_c}{dt} = k_b c_c - k_f v_c h_c + (\delta_c + \alpha) c_c - \gamma v_c - A_{c,n} v_c + A_{n,c} v_n \quad (5.13)$$

$$\frac{dc_n}{dt} = k_f h_n v_n - k_b c_n - \delta_n c_n - (\gamma + \alpha) c_n - A_{n,c} c_n + A_{c,n} c_c \quad (5.14)$$

$$\frac{dc_c}{dt} = k_f h_c v_c - k_b c_c - \delta_c c_c - (\gamma + \alpha) c_c + A_{n,c} c_n - A_{c,n} c_c \quad (5.15)$$

$$\frac{dp}{dt} = \rho - \lambda p - k_{f,pm} p m + k_{b,pm} c + \mu c \quad (5.16)$$

$$\frac{dm_m}{dt} = k_{t,m} p^2 - \nu m_m \quad (5.17)$$

$$\begin{aligned} \frac{dm}{dt} &= k_{tl,m} m_m - k_{f,pm} p m + (k_{b,pm} + \delta) c \\ &\quad - \mu m - k_{f,mh} [h_n] [m] + k_{b,mh} [c_{mh}] \end{aligned} \quad (5.18)$$

$$\frac{dc}{dt} = k_{f,pm} p m - k_{b,pm} c - \delta c - \mu c \quad (5.19)$$

$$\frac{dc_{mh}}{dt} = k_{f,mh} h_n m - k_{b,mh} c_{mh} - (\mu + \alpha) c_{mh} \quad (5.20)$$

5.3.3 Résultats

Nous avons cherché à illustrer, à l'aide de ce système, les effets des instabilités du niveau de HIF-1 α induites par la réoxygénation sur le niveau de p53. La valeur des paramètres pour le système pVHL/HIF-1 α a été choisie égale aux valeurs par défaut déterminées dans notre travail précédent [94]. Pour le système p53/Mdm2, nous avons utilisé les valeurs par défaut issues du travail de Hunziker et *al.* [170]. Enfin, pour décrire le couplage entre les deux sous-systèmes (équation 5.20), nous avons dû fixer des valeurs pour les taux d'association et de dissociation de HIF-1 α et Mdm2. L'objectif de cette section étant simplement d'illustrer la liaison des voies de régulation de l'hypoxie et de l'apoptose, nous avons fixé des valeurs similaires aux constantes de complexation des systèmes p53/Mdm2 et HIF-1 α /pVHL, soit $k_{f,mh}=1000$ et $k_{b,mh}=7200$. La valeur des paramètres pour le système pVHL/HIF-1 α a été choisie égale aux valeurs par défaut déterminées dans notre travail précédent [94]. Pour le système p53/Mdm2, nous avons utilisé les valeurs par défaut issues du travail de Hunziker et *al.* [170]. Nous supposons également, en première approximation, que la liaison à Mdm2 n'affecte pas le système de régulation de HIF-1 α . Autrement dit, la protéine pVHL peut adresser HIF-1 α au protéasome même si la protéine est liée à Mdm2. Les conditions initiales, c'est à dire l'état des niveaux protéiques avant l'épisode de réoxygénation, sont présentées dans la table 5.5. La méthode décrite dans notre travail précédent a été utilisée pour déterminer l'état d'équilibre pour le système HIF-1 α /pVHL en hypoxie. Afin de fixer des valeurs à l'équilibre pour les nouvelles variables introduites (p, m_m, m, c, c_{mh}), nous avons laissé le système évoluer en imposant des conditions hypoxiques ($k_f=1$) jusqu'à atteindre un état stationnaire. Les valeurs des niveaux protéiques prises par nos variables après stabilisation du système ont alors été utilisées comme conditions initiales. Nous avons ainsi pu simuler un épisode de réoxygénation, en imposant au système la valeur par défaut du paramètre k_f : $k_f=1000$. La figure 5.15 représente l'évolution du niveau de p53 après une réoxygénation brutale (à $t=0$). Le passage de l'hypoxie à la normoxie génère des instabilités du niveau de p53, qui entame une dynamique oscillatoire dix heures après la réoxygénation, avec une période d'environ 5h. Comme nous l'avons noté précédemment, un signal périodique similaire a été observé expérimentalement dans le cas d'un stress génotoxique. Il est connu, dans ce cadre, pour conditionner l'entrée en apoptose. Autrement dit, les oscillations de p53 générées par la réoxygénation sont susceptibles de déclencher la mort cellulaire. Or, comme nous l'avons noté, les phénomènes de réoxygénation sont connus pour promouvoir, dans certaines conditions, l'entrée en apoptose. C'est notamment le cas lors des phénomènes d'ischémie : un retour brutal du flux sanguin dans les zones ischémiques génère des vagues d'apoptose. Ce modèle simple ouvre donc une piste interprétative permettant d'éclairer le lien existant entre le retour à la normoxie et la mort cellulaire. Selon ce modèle, la compartimentation de HIF-1 α entre le noyau et le cytoplasme est à l'origine d'une réponse oscillante de la protéine lors d'un épisode de réoxygénation. Les relations bio-chimiques liant le système de régulation de HIF-1 α à celui de p53 génèrent alors une dynamique du même type que celle observée pour la protéine pro-apoptotique. Ce signal déclenche la mort cellulaire. Avec toutes les réserves liées aux simplifications notables qui le sous-tendent, notre modèle présente donc l'intérêt de fournir une explication biologiquement cohérente à

| Variable | Niveau initial (nM) |
|----------|---------------------|
| h_n | 510 |
| h_c | 262 |
| v_m | 433 |
| v_n | 28 |
| v_c | 2898 |
| c_n | 1.9 |
| c_c | 105 |
| p | 77 |
| m_m | 302 |
| m | 1.7 |
| c | 860 |
| c_{mh} | 90 |

TABLE 5.5: Conditions initiales avant réoxygénation. Ces valeurs correspondent à l'état du système sous une hypoxie caractérisée par $k_f=1$

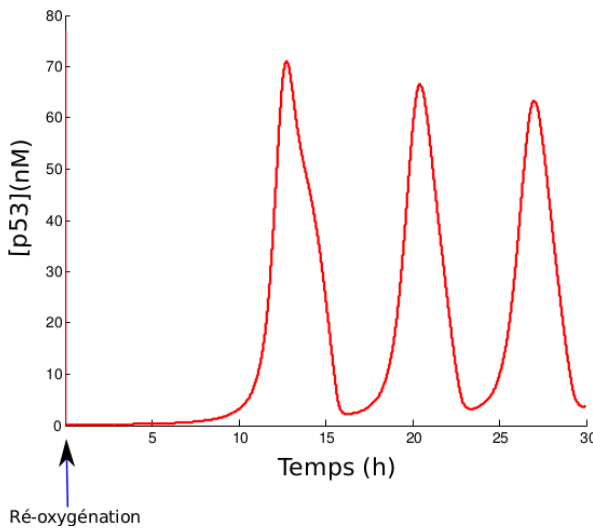


FIGURE 5.15: Simulation de l'évolution du niveau de p53 après un épisode de réoxygénation

de nombreuses observations cliniques et expérimentales. Des perspectives intéressantes s'ouvrent alors afin de tester la validité de cette interprétation. Notamment, il serait pertinent de suivre l'évolution du niveau de p53 lors d'épisodes de réoxygénation, afin de tenter d'imager d'éventuelles oscillations. Au niveau de la modélisation du phénomène, le modèle peut-être grandement amélioré afin de prendre en compte de manière plus satisfaisante la complexité biologique de la situation étudiée. La question de la compartimentation de p53 mériterait par exemple d'être considérée. Les outils que nous avons mis au point pour modéliser le système de régulation de HIF-1 α pourraient alors être étendus au couple pVHL/Mdm2 afin de compléter le modèle *yin-yang*.

5.4 Localisation de HIF-1 α et cycle cellulaire

5.4.1 Introduction

L'article précédent a mis en évidence l'importance de la compartimentation de HIF-1 α dans sa régulation. Notamment, la navette nucléo-cytoplasmique de pVHL pourrait jouer un rôle crucial dans l'accumulation et la dégradation du facteur de transcription. Or, nous avons également rappelé l'existence de données expérimentales mettant en évidence une variabilité de la répartition de pVHL en fonction de la dynamique proliférative des cellules [159]. Rappelons également que la localisation de la dégradation de HIF-1 α semble dépendre en partie de leur état quiescent ou non [65]. La distribution spatiale de la protéine pourrait donc avoir un lien avec le cycle cellulaire. Or, comme nous l'avons noté à la fin du chapitre précédent, la visualisation en immunomarquage de la localisation sub-cellulaire de HIF-1 α fait apparaître une variabilité de sa distribution. La protéine est en effet soit concentrée dans le noyau, soit dans le cytoplasme, soit répartie de manière homogène. Cette observation pose de nombreuses questions. En effet, l'accumulation nucléaire de HIF-1 α est une caractéristique commune à un grand nombre de cancers [35]. La compréhension des mécanismes régulant la répartition du facteur de transcription est donc d'importance. En particulier, il est légitime de se demander si la variabilité observée est liée à la dynamique du cycle (variabilité intra-cellulaire) ou à une différence de comportements entre cellules (variabilité inter-cellulaire). Pour répondre à cette question, il peut être intéressant de chercher une éventuelle corrélation entre la phase du cycle dans laquelle se trouve une cellule donnée, et la localisation de HIF-1 α . Or, les cellules HeLa-FUCCI permettent justement de mener ce genre d'investigations. Ces dernières rendent en effet possible la détermination précise de l'avancement du cycle par la simple observation non-destructive d'une population cellulaire. Cette population pourra ensuite être fixée et soumise à un immunomarquage dirigé contre HIF-1 α , afin de compléter les données de microscopie de fluorescence par la localisation de la protéine.

5.4.2 Méthode

La réussite d'une telle démarche expérimentale passe par la possibilité de collecter à la fois les données de fluorescence et d'immunomarquage sur un grand nombre de cellules. Pour ce faire, nous avons opté pour le protocole suivant. HIF-1 α est induit par DFO (24h à 100 μ M). La fluorescence des cellules HeLa-FUCCI est ensuite imagée sur une vingtaine de champs, dont les positions précises dans la chambre de culture sont enregistrées, selon une méthodologie similaire à celle présentée dans le chapitre précédent. Les cellules sont ensuite fixées, puis un immunomarquage indirect de HIF-1 α est réalisé. Nous avons opté pour une méthode classique de révélation enzymatique à la peroxydase. Le protocole précis est présenté en annexe C. Enfin, les positions initiales dans la chambre de culture sont retrouvées, grâce à la platine motorisée dont est muni le microscope utilisé. Il est donc possible de collecter, en transmission, les données sur la répartition sub-cellulaire de HIF-1 α . La figure 5.16 montre le type de résultat obtenu, sur trois champs. On obtient, parallèlement, la fluorescence permettant de déterminer

l'avancement du cycle, et les informations relatives à la présence de HIF-1 α .

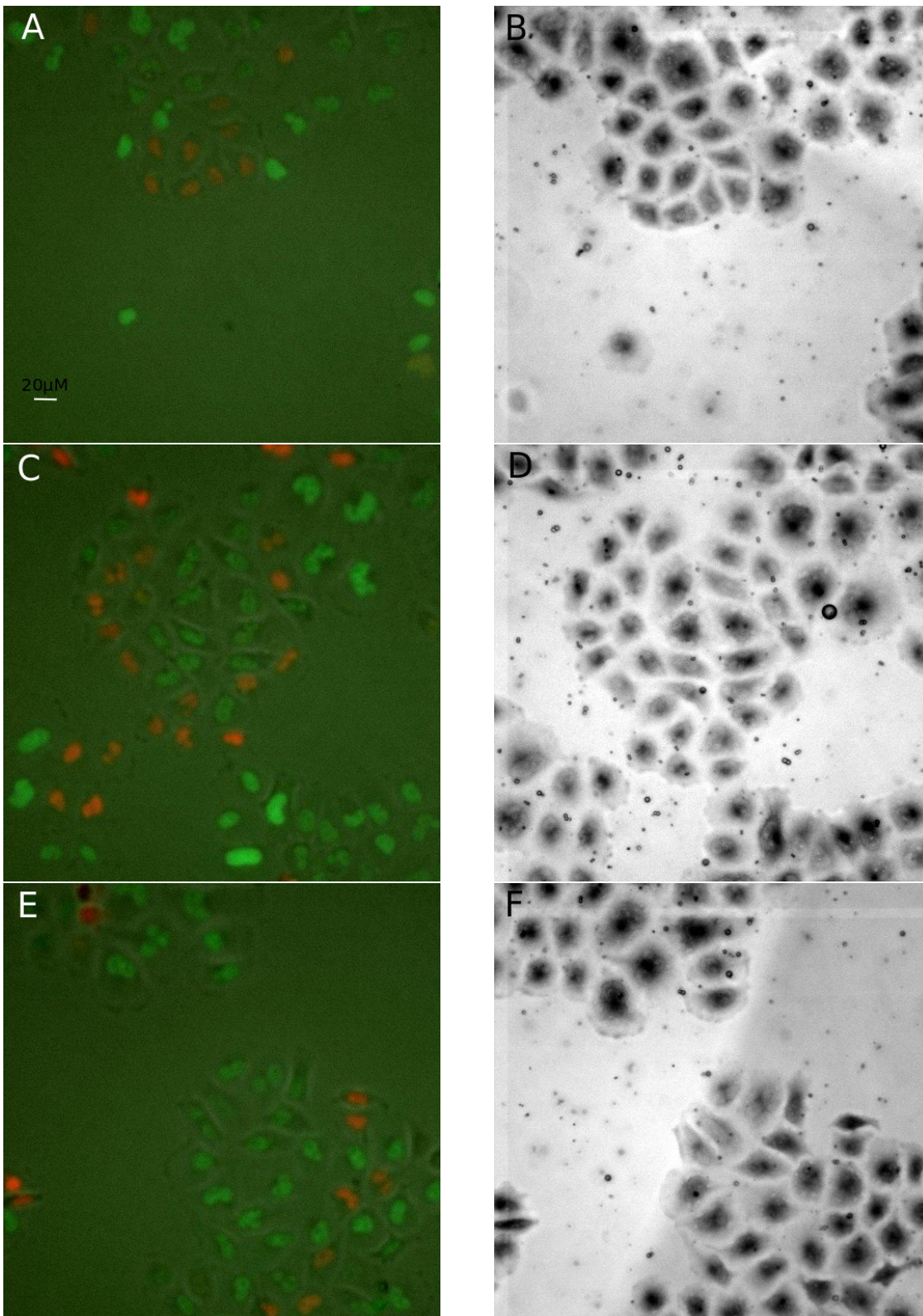


FIGURE 5.16: Imagerie couplée de la localisation sub-cellulaire de HIF-1 α et de la progression du cycle. A, C, E : images prises en microscopie à fluorescence après 24h de traitement par 100 μ M de DFO. B,D,F : champs correspondants après fixation et immunomarquage (méthode peroxydase) de HIF-1 α

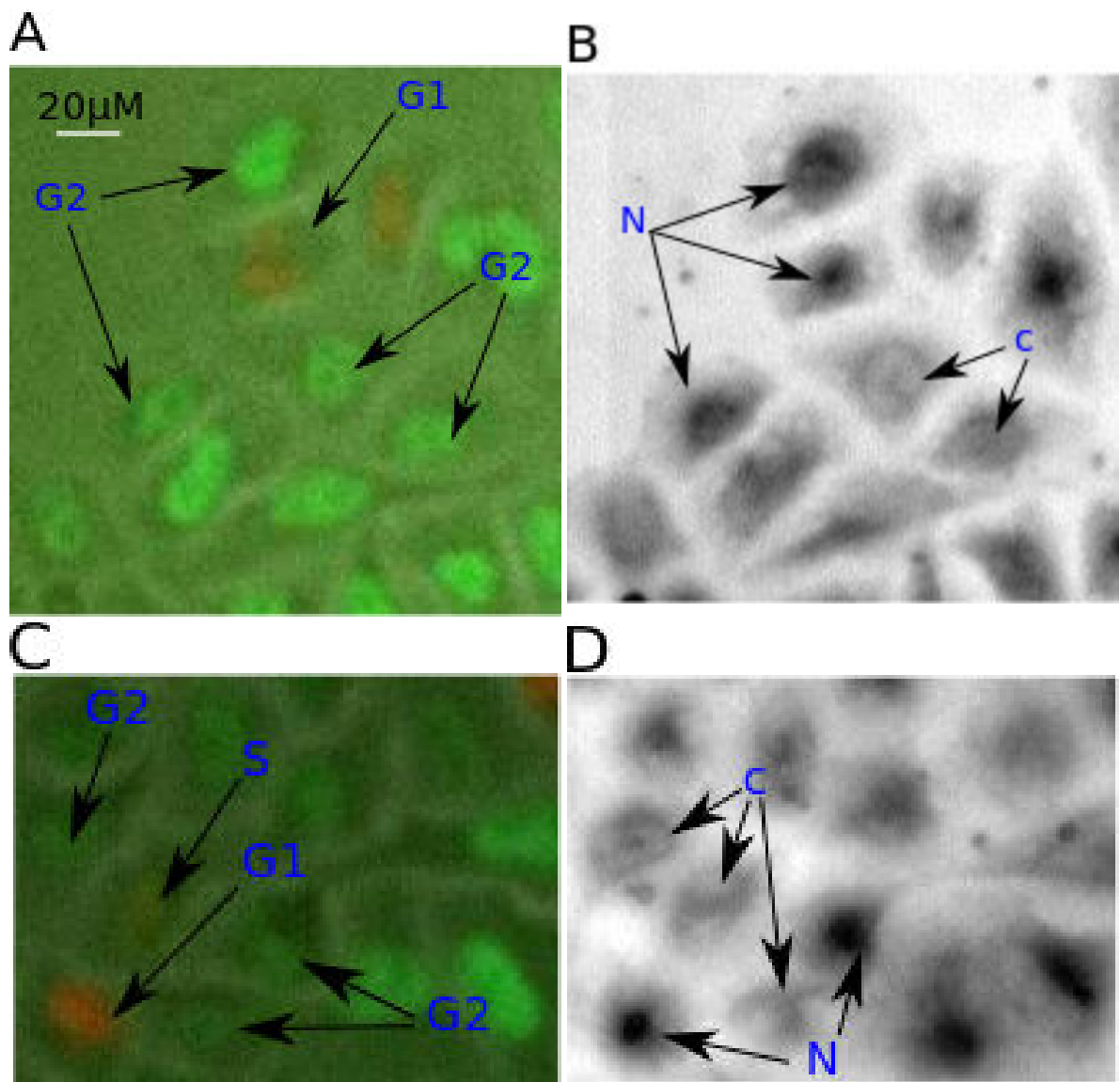


FIGURE 5.17: Méthode d'analyse couplée de la progression du cycle et de la localisation sub-cellulaire de HIF-1 α . Sur un champs donné, on dispose de la donnée de fluorescence (A,C) et du marquage anti-HIF-1 α (B,D). Cela permet de corrélér la phase (G₁,S,G₂) avec la localisation nucléaire (N) ou cytoplasmique/diffuse (C) de HIF-1 α

Ces données sont ensuite traitées en corrélant, cellule à cellule, la phase du cycle et la localisation de la protéine. Un exemple est donné sur la figure 5.17. Il faut noter que l'immunomarquage n'est parfois pas suffisamment précis pour trancher de manière claire sur la répartition de HIF-1 α . Nous nous contentons donc de différencier les cas de nette accumulation nucléaire des cas où la protéine est plus diffuse. Dans ce dernier cas, il peut s'agir soit d'une localisation cytoplasmique, soit d'une induction plus faible. Cette expérience a été menée sur une vingtaine de champs, contenant chacun environ 50 cellules.

5.4.3 Résultats

Les vingt champs sur lesquels ont été collectées les données de fluorescence et d'immunomarquage ont donc été traités en suivant la démarche décrite précédemment. En groupant ces champs en quatre échantillons contenant un minimum de 200 cellules, nous avons pu établir une statistique de la proportion de cellules de chaque phase présentant un niveau d'expression clairement nucléaire de HIF-1 α . Les résultats sont présentés sur la figure 5.18. Il apparaît que la pourcentage de localisation nucléaire est situé entre 30 et 40 % pour les phases G₁, S et G₂. On observe néanmoins une valeur significativement plus faible en S qu'en G₁ (p-value=0.04), et surtout qu'en G₂ (p-value=0.0001). Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec précaution. En effet, de nombreuses sources d'incertitudes viennent brouiller l'interprétation. Tout d'abord, l'imprécision relative de l'immunomarquage ne permet de ne prendre en compte que les cellules présentant une très claire accumulation nucléaire. D'autre part, il est difficile de différencier les cas où la répartition est cytoplasmique ou diffuse des cas où HIF-1 α est tout simplement peu induit. Il est donc hasardeux de conclure à une relocalisation partielle dans le cytoplasme durant la phase S. La légère (mais significative) différence observée pourrait dans ce cadre s'expliquer plutôt par une diminution de la synthèse de la protéine durant la phase S. De manière générale, la variabilité dans la répartition ou l'induction de HIF-1 α semble être indépendante de la progression du cycle. Il s'agit donc en grande partie d'une variabilité inter-cellules. Celle-ci peut être liée à un grand nombre de paramètres : niveau d'induction aléatoire, mutations génétiques... Dans ce dernier cas, notre travail a montré que des modifications dans le système de transport de pVHL pouvaient influencer sur la répartition de HIF-1 α . Le niveau d'expression du facteur de transcription avant l'induction peut également jouer un rôle. Notre démarche a donc permis de mettre en évidence qu'il existe une variabilité dans la localisation/l'induction de HIF-1 α au sein d'une même population de cellules, qui ne s'explique pas par la seule dynamique du cycle. En outre, de manière plus générale, cette étude met en avant une utilisation originale des cellules HeLa-FUCCI, et démontre leur utilité pour réaliser des études couplées de biologie cellulaire (progression du cycle) et de biologie moléculaire (expression d'une protéine).

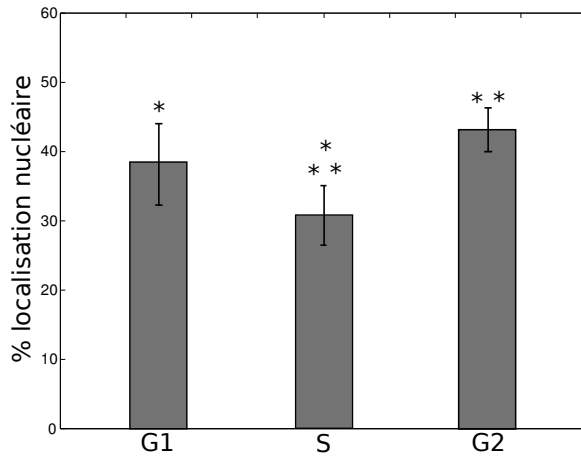


FIGURE 5.18: Phases du cycle et localisation de HIF-1 α . Sur quatre échantillons d'environ 400 cellules, nous avons calculé le pourcentage de cellules de chaque phase présentant clairement une concentration nucléaire de HIF-1 α . *P<0.05, **P<0.001.

5.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié quelques aspects de la régulation intra-cellulaire du niveau de HIF-1 α . En premier lieu, nous avons mis sur pied un modèle simple décrivant les relations entre HIF-1 α et pVHL dans un contexte compartimenté. Ce modèle reproduit les principales caractéristiques connues de la réponse à l'hypoxie (induction et accumulation de HIF-1 α , dynamique de la dégradation) en utilisant uniquement une boucle de rétroaction, et en prenant en compte l'importance de la compartimentation nucléo-cytoplasmique de la régulation. La cinétique de la navette nucléo-cytoplasmique de pVHL est alors un des paramètres clés déterminant le niveau cellulaire de HIF-1 α . Ce résultat ouvre des perspectives intéressantes de vérifications expérimentales : il est notamment possible de travailler sur les protéines connues pour faire partie de ce système d'import/export.

Notre modèle prédit également une réponse spécifique du niveau de HIF-1 α lors d'épisodes de réoxygénation. Au lieu d'être rapidement dégradée, la protéine entre dans un mode instable (oscillations), et voit son niveau s'élever parfois au dessus du niveau d'équilibre hypoxique. Ce résultat, qui demande de plus amples vérifications expérimentales, est encourageant. En effet, il peut être mis en relation avec plusieurs données récentes de la littérature, montrant une augmentation transitoire du niveau de HIF-1 α , ainsi qu'une synthèse de gènes spécifiques jouant un rôle crucial dans la réponse cellulaire à la réoxygénation. Il serait intéressant, afin de bâtir un pont entre notre modèle et nos résultats expérimentaux obtenus sur les cellules FUCCI après un cycle hypoxie/normoxie, de creuser les liens entre cette possible induction de HIF-1 α en réoxygénation et le ralentissement de la phase S par activation des voies de réparation de l'ADN. Cette réponse oscillatoire peut également être reliée à la dynamique d'apoptose connue pour être déclenchée par le retour brutal à la normoxie. Afin de mettre l'accent sur ce point, nous avons étendu notre formalisation aux inter-relations entre les couples HIF-1 α /pVHL et p53/MdM2. Une première analyse de ce modèle plus complexe montre comment la réoxygénation peut induire un comportement oscillatoire du niveau de p53, connu pour être un signal d'apoptose.

Enfin, nous avons mis au point un protocole permettant d'étudier expérimentalement

la dynamique de la compartimentation de HIF-1 α , en relation avec le cycle cellulaire. Nos résultats suggèrent que la variabilité de la localisation de la protéine est en grande partie inter-cellulaire : elle ne dépend pas, ou peu, de la phase du cycle, mais de paramètres internes à chaque cellule. Notre modèle mathématique permet de supposer que différents types de mutations génétiques peuvent expliquer cette variabilité. Celles-ci peuvent affecter la dynamique d'import/export de pVHL, la vitesse de synthèse de HIF-1 α , ou l'affinité du couple pVHL/HIF-1 α . Là encore, cette observation ouvre donc la voie à de nombreuses investigations expérimentales.

6

Conclusion générale

Dans cette thèse, nous avons exploré plusieurs aspects de la réponse cellulaire à l'hypoxie. En utilisant à la fois des outils de modélisation et une approche expérimentale, nous avons pu dégager des résultats originaux, ouvrant plusieurs directions de recherche.

Dans une première partie, nous avons proposé un modèle pour la transition G_1/S sous hypoxie. Ce dernier fournit une explication possible à la mise en quiescence des cellules tumorales lorsque la pression d'oxygène diminue. Nous avons ensuite cherché à tester ces premiers résultats expérimentalement, en utilisant les propriétés des cellules HeLa-FUCCI. Or, la sensibilité des fluorophores au manque d'oxygène rend cette étude délicate. En conséquence, nous avons choisi de centrer notre démarche sur l'effet de chélateurs du fer souvent utilisés, outre leurs effets anti-cancéreux, comme molécules stabilisatrices de HIF-1 α (DFO et $CoCl_2$). Les cellules FUCCI nous ont alors permis de suivre temporellement, en microscopie de fluorescence, les modifications de la dynamique du cycle en présence de ces agents chimiques. Nous avons ainsi mis en évidence, tout d'abord, un effet bi-phasique du chlorure de cobalt sur l'entrée dans le cycle. C'est la possibilité de suivre précisément, grâce aux cellules FUCCI, la progression au sein de la phase G_1 qui a permis d'obtenir ce résultat. D'autre part, nous avons mis en évidence un blocage du cycle en phase G_2 en présence de DFO. La réversibilité de cet arrêt est déterminée à la fois par le temps d'exposition et par la concentration de l'agent chimique. Ces résultats, originaux au vu des études antérieures, pourraient s'expliquer par une action privilégiée des chélateurs du fer sur la voie MAPK dans les cellules HeLa. Cette hypothèse doit être testée par des études approfondies de biologie moléculaire.

Nous avons ensuite utilisé les cellules HeLa-FUCCI afin d'étudier les conséquences d'un retour à la normoxie après un épisode hypoxique. De manière intéressante, nous avons pu observer un ralentissement, sur le long terme, de la phase S, ce qui est cohérent avec les données de la littérature faisant état d'une activation des voies de réparation

de l'ADN lors d'une réoxygénation. En outre, les expériences de marquage immunocytochimique de HIF-1 α que nous avons menées afin de tester l'induction du facteur de transcription par les chélateurs du fer ont révélé une grande variabilité de sa localisation. La protéine est soit clairement concentrée dans le noyau, soit plus diffuse dans la cellule, ou concentrée dans le cytoplasme.

Ces observations posent donc la question de la régulation intra-cellulaire du niveau et de la localisation de HIF-1 α , en hypoxie, en normoxie, et en réoxygénation. Nous avons donc choisi d'éclaircir ces données expérimentales par l'établissement d'un modèle compartimenté des voies moléculaires de contrôle du niveau de HIF-1 α . Le modèle relativement simple que nous avons mis en place permet d'expliquer les caractéristiques majeures de la réponse moléculaires à l'hypoxie. En outre, il montre que la compartimentation de la dégradation de HIF-1 α pourrait avoir un rôle dans les spécificités de la réponse à la réoxygénation. En effet, notre modèle génère de fortes instabilités de la concentration nucléaire du facteur de transcription lors d'un retour à la normoxie. Notamment, après avoir chuté rapidement, elle entre dans un régime oscillatoire qui la conduit à des valeurs pouvant être supérieures à celles atteintes en hypoxie. Cette observation peut être analysée en regard des données expérimentales portant sur les effets biologiques et moléculaires de la réoxygénation : accumulation de HIF-1 α , expression de gènes spécifiques, activation des voies de réparation de l'ADN, apoptose. Ici, les résultats obtenus en modélisation doivent être couplés à un travail expérimental proposant une étude précise de la dynamique du niveau de HIF-1 α et de p53 lors d'un retour brutal à la normoxie.

Enfin, la compartimentation de HIF-1 α a été étudiée expérimentalement. Les cellules HeLa-FUCCI permettent en effet de mener des travaux originaux couplant l'analyse de la progression dans le cycle, et le marquage immunologique d'une protéine donnée. Des études antérieures ont mis en évidence les liens existants entre la prolifération cellulaire et la localisation de pVHL. En vertu des hypothèses biologiques sous-tendant notre modèle mathématique, l'hypothèse d'un lien entre la présence cytoplasmique ou nucléaire de HIF-1 α et la progression dans le cycle apparaît donc comme plausible. En conséquence, nous avons choisi d'observer conjointement les phases du cycle et la localisation intracellulaire de HIF-1 α . Il nous est apparu que la variabilité dans la compartimentation de la protéine ne pouvait que très modestement s'expliquer par la dynamique du cycle cellulaire. Il est donc nécessaire de faire intervenir d'autres hypothèses pour l'expliquer. On peut notamment envisager des différences génétiques inter-cellulaires. Par exemple, le modèle de régulation que nous avons mis en place nous permet de supposer que des mutations dans le système d'import/export de pVHL peuvent affecter la répartition spatiale de HIF-1 α . Cette hypothèse ouvre la voie à de futures travaux expérimentaux. Ceux-ci pourraient apporter de précieux renseignements quant à la dynamique de régulation de HIF-1 α , et à sa modification dans les processus de tumorigenèse.

Notons pour finir qu'outre nos résultats concernant la réponse à l'hypoxie, cette thèse illustre les divers intérêts que présentent les cellules HeLa-FUCCI dans l'étude du cycle cellulaire. Notamment, nous avons montré comment elles permettaient de quantifier l'évolution de la dynamique de prolifération au cours du temps dans différentes conditions : ajout, puis retrait de drogues, réoxygénation. Le système FUCCI offre

également la possibilité de suivre très précisément la progression dans les différentes phases. En particulier, il rend relativement aisée l'analyse de l'entrée dans le cycle (transition G_0/G_1). Enfin, la dernière partie de ce travail présente une méthodologie intéressante permettant de coupler, cellule à cellule, l'analyse de la dynamique du cycle à l'étude de l'expression et de la localisation des protéines. Dans le cas de HIF-1, ce type de démarche a donné de précieuses indications quant à la dynamique de régulation du facteur de transcription.

De manière plus générale, les deux directions de recherche que nous avons suivies (modélisation mathématique et expérimentation sur une lignée cellulaire donnée) témoignent de la multiplicité des types de discours scientifiques que l'on peut construire autour de l'objet "cancer". Chacun de ces types de discours possède ses règles propres ; celles-ci sont élaborées et perpétuées au sein de communautés aux contours clairement définis, qui leur offrent une légitimité épistémologique. La confrontation de ces différents styles de raisonnement avec le monde extérieur met au jour leurs limites respectives. Ainsi, les modèles mathématiques sont-ils, par essence, toujours parcellaires, jamais exhaustifs. Les résultats expérimentaux, quant à eux, sont évidemment tributaires des lignées cellulaires utilisées ; celles-ci ne sont finalement que des objets d'étude générés au sein des laboratoires. Elles aussi, finalement, ne sont que des modèles. Dans les deux cas, le statut épistémique des jugements produits pose question : tout en fournissant un certain type de savoir, ils portent en effet sur eux, de manière plus ou moins ostentatoire, les défauts inhérents aux pratiques scientifiques qui les ont engendrés. Comment, dès lors, penser la multidisciplinarité, c'est à dire la coexistence, ou la coopération, de ces différents types de discours ?

Il est tentant, en un premier temps, de plaider pour une nécessaire intégration des approches : les résultats expérimentaux abreuvant les entrées des modèles mathématiques, et en retour, ces derniers fournissent une certaine forme d'explication aux observations. Les deux styles de raisonnement se justifient ainsi mutuellement, et se félicitent de la légitimité épistémique supplémentaire ainsi acquise. La vocation d'un modèle mathématique sera donc forcément d'être confronté à des observations expérimentales. Cependant, à y regarder de plus près, cette démarche n'est applicable de manière satisfaisante qu'à un nombre restreint de cas : elle n'offre que rarement de meilleures descriptions du monde naturel. A l'inverse, loin de dépasser les défauts individuels des différentes approches, elle les cumule souvent ; de fait, au lieu d'atteindre un plus haut degré de généralité, elle tend à particulariser d'autant plus les énoncés. Un exemple concret permet d'illustrer cette idée. Dans mon modèle de régulation de HIF-1 α , je pars de l'hypothèse, confirmée par des observations, que la cinétique d'induction de la protéine ne comporte pas d'instabilités, alors que la réoxygénation en provoque [93]. J'ai alors construit un modèle permettant de reproduire cette observation. Parallèlement, Bagnall et *al.* [166] ont construit un autre modèle mathématique de la régulation de HIF-1 α , afin d'expliquer des observations exactement inverses : l'induction de HIF-1 α génère des instabilités, et le niveau d'expression de la protéine se contente de baisser régulièrement lors du retour à la normoxie. Le point important est que les deux démarches sont justifiées : les réactions modélisées sont attestées empiriquement, et les phénomènes à expliquer ont bien été observés. Les défauts des deux approches se combinent ici. D'une part, la complexité des réponses cellulaires à l'hypoxie rend

les observations très sensibles aux conditions expérimentales. D'autre part, les modèles mathématiques utilisés ont un degré de liberté suffisant pour s'ajuster à des données contradictoires. Finalement, l'intégration des discours ne nous apprend rien de neuf : elle ne nous permet pas de formaliser des énoncés de plus haut niveau de généralité. Plutôt, elle forme un troisième type d'approche, comportant elle aussi ses limites propres. La vision intégrative de la multidisciplinarité n'offre donc aucune garantie quant à la valeur épistémique du discours qu'elle engendre. En d'autres termes, elle ne permet pas forcément d'identifier des mécanismes explicatifs généraux aux phénomènes complexes. En conséquence, cette forme de multidisciplinarité n'est pas forcément un horizon à atteindre pour la compréhension générale de la carcinogenèse.

Faut-il donc se contenter d'une coexistence des types de discours ? Certains avocats du pluralisme, tels que H. Longino, plaident pour cette description de la multidisciplinarité [199]. L'existence de différentes communautés scientifiques clairement délimitées ne serait alors que la conséquence inévitable de la complexité des objets naturels. La diversité des types de discours doit alors être acceptée comme la meilleure description de la réalité à laquelle nous puissions avoir accès. Rechercher à tout prix l'intégration serait, dans ce cadre, une erreur. Il faudrait alors abandonner toute prétention à la découverte des mécanismes fondamentaux cachés derrière les phénomènes. Ces considérations sont particulièrement adaptées au cas du cancer. En effet, la complexité de cet objet le rend intéressant pour différentes communautés scientifiques, qui ne sont pas nécessairement en communication les unes avec les autres. S'interroger sur le sens et la valeur épistémique de la multidisciplinarité dans ce cadre est donc particulièrement stimulant. En mettant en valeur plusieurs types d'approches possibles, autour du problème de l'hypoxie tumorale, cette thèse participe pleinement à ce questionnement.

Bibliographie

- [1] D. M. Stroka, T. Burkhardt, I. Desbaillets, R. H. Wenger, D. A. Neil, C. Bauer, M. Gassmann, and D. Candinas. *Hif-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia*. FASEB J **15**(13), 2445 (2001). URL <http://dx.doi.org/10.1096/fj.01-0125com>.
- [2] I. Papandreou, A. Powell, A. L. Lim, and N. Denko. *Cellular reaction to hypoxia : sensing and responding to an adverse environment*. Mutat Res **569**(1-2), 87 (2005). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.054>.
- [3] L. B. Gardner, Q. Li, M. S. Park, W. M. Flanagan, G. L. Semenza, and C. V. Dang. *Hypoxia inhibits g1/s transition through regulation of p27 expression*. J Biol Chem **276**(11), 7919 (2001). URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M010189200>.
- [4] R. M. Douglas and G. G. Haddad. *Genetic models in applied physiology : invited review : effect of oxygen deprivation on cell cycle activity : a profile of delay and arrest*. J Appl Physiol (1985) **94**(5), 2068 (2003). URL <http://dx.doi.org/10.1152/japplphysiol.01029.2002>.
- [5] T. G. Graeber, J. F. Peterson, M. Tsai, K. Monica, A. J. Fornace, and A. J. Giaccia. *Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a g1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status*. Mol Cell Biol **14**(9), 6264 (1994).
- [6] P. Carmeliet, 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, E. Keshert, and E. Keshet. *Role of hif-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis*. Nature **394**(6692), 485 (1998). URL <http://dx.doi.org/10.1038/28867>.
- [7] K. J. Banasiak and G. G. Haddad. *Hypoxia-induced apoptosis : effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death*. Brain Res **797**(2), 295 (1998).
- [8] E. M. Hammond, N. C. Denko, M. J. Dorie, R. T. Abraham, and A. J. Giaccia. *Hypoxia links atr and p53 through replication arrest*. Mol Cell Biol **22**(6), 1834 (2002).
- [9] V. Falanga and R. S. Kirsner. *Low oxygen stimulates proliferation of fibroblasts seeded as single cells*. J Cell Physiol **154**(3), 506 (1993).
- [10] J. D. Wohrley, M. G. Frid, E. P. Moiseeva, E. C. Orton, J. K. Belknap, and K. R. Stenmark. *Hypoxia selectively induces proliferation in a specific subpopulation of*

- smooth muscle cells in the bovine neonatal pulmonary arterial media.* J Clin Invest **96**(1), 273 (1995).
- [11] A. Sahai, C. Mei, T. A. Pattison, and R. L. Tannen. *Chronic hypoxia induces proliferation of cultured mesangial cells : role of calcium and protein kinase c.* Am J Physiol **273**(6 Pt 2), F954 (1997).
- [12] G.-Y. Gwak, J.-H. Yoon, K. M. Kim, H.-S. Lee, J. W. Chung, and G. J. Gores. *Hypoxia stimulates proliferation of human hepatoma cells through the induction of hexokinase ii expression.* J Hepatol **42**(3), 358 (2005).
- [13] A. L. Harris. *Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth.* Nat Rev Cancer **2**(1), 38 (2002). URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrc704>.
- [14] M. Kunz and S. M. Ibrahim. *Molecular responses to hypoxia in tumor cells.* Mol Cancer **2**, 23 (2003).
- [15] A. R. A. Anderson, A. M. Weaver, P. T. Cummings, and V. Quaranta. *Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment.* Cell **127**(5), 905 (2006). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.042>.
- [16] S. Rockwell, I. T. Dobrucki, E. Y. Kim, S. T. Marrison, and V. T. Vu. *Hypoxia and radiation therapy : past history, ongoing research, and future promise.* Curr Mol Med **9**(4), 442 (2009).
- [17] M. W. Dewhirst. *Relationships between cycling hypoxia, hif-1, angiogenesis and oxidative stress.* Radiat Res **172**(6), 653 (2009). URL <http://dx.doi.org/10.1667/RR1926.1>.
- [18] L. I. Cardenas-Navia, D. Mace, R. A. Richardson, D. F. Wilson, S. Shan, and M. W. Dewhirst. *The pervasive presence of fluctuating oxygenation in tumors.* Cancer Res **68**(14), 5812 (2008). URL <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6387>.
- [19] Q. Zhang, S.-Y. Wang, A. C. Nottke, J. V. Rocheleau, D. W. Piston, and R. H. Goodman. *Redox sensor ctbp mediates hypoxia-induced tumor cell migration.* Proc Natl Acad Sci U S A **103**(24), 9029 (2006). URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0603269103>.
- [20] T. Y. Reynolds, S. Rockwell, and P. M. Glazer. *Genetic instability induced by the tumor microenvironment.* Cancer Res **56**(24), 5754 (1996).
- [21] N. R. Prabhakar. *Oxygen sensing during intermittent hypoxia : cellular and molecular mechanisms.* J Appl Physiol (1985) **90**(5), 1986 (2001).
- [22] D. L. Carden and D. N. Granger. *Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury.* J Pathol **190**(3), 255 (2000). URL <http://dx.doi.org/3.0.CO;2-6>.
- [23] E. Conde, L. Alegre, I. Blanco-Sanchez, D. Saenz-Morales, E. Aguado-Fraile, B. Ponte, E. Ramos, A. Saiz, C. Jimenez, A. Ordonez, M. Lopez-Cabrera, L. del Peso, M. O. de Landazuri, F. Liano, R. Selgas, J. A. Sanchez-Tomero, and M. L. Garcia-Bermejo. *Hypoxia inducible factor 1-alpha (hif-1 alpha) is induced during reperfusion after renal ischemia and is critical for proximal tubule cell survival.*

- PLoS One **7**(3), e33258 (2012). URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033258>.
- [24] Q. Ke and M. Costa. *Hypoxia-inducible factor-1 (hif-1)*. Mol Pharmacol **70**(5), 1469 (2006). URL <http://dx.doi.org/10.1124/mol.106.027029>.
- [25] G. L. Semenza, M. K. Nejfelt, S. M. Chi, and S. E. Antonarakis. *Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A **88**(13), 5680 (1991).
- [26] G. L. Semenza, P. H. Roth, H. M. Fang, and G. L. Wang. *Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem **269**(38), 23757 (1994).
- [27] G. L. Semenza, B. H. Jiang, S. W. Leung, R. Passantino, J. P. Concordet, P. Maire, and A. Giallongo. *Hypoxia response elements in the aldolase a, enolase 1, and lactate dehydrogenase a gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem **271**(51), 32529 (1996).
- [28] G. L. Wang and G. L. Semenza. *Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem **270**(3), 1230 (1995).
- [29] B. Keith, R. S. Johnson, and M. C. Simon. *Hif1alpha and hif2alpha : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression*. Nat Rev Cancer **12**(1), 9 (2012). URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3183>.
- [30] C. W. Pugh, J. F. O'Rourke, M. Nagao, J. M. Gleadle, and P. J. Ratcliffe. *Activation of hypoxia-inducible factor-1 ; definition of regulatory domains within the alpha subunit*. J Biol Chem **272**(17), 11205 (1997).
- [31] H. Tian, S. L. McKnight, and D. W. Russell. *Endothelial pas domain protein 1 (epas1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells*. Genes Dev **11**(1), 72 (1997).
- [32] Y. Makino, A. Kanopka, W. J. Wilson, H. Tanaka, and L. Poellinger. *Inhibitory pas domain protein (ipas) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus*. J Biol Chem **277**(36), 32405 (2002). URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C200328200>.
- [33] B. H. Jiang, G. L. Semenza, C. Bauer, and H. H. Marti. *Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of o2 tension*. Am J Physiol **271**(4 Pt 1), C1172 (1996).
- [34] M. A. Cavadas, L. K. Nguyen, and A. Cheong. *Hypoxia-inducible factor (hif) network : insights from mathematical models*. Cell Commun Signal **11**(1), 42 (2013). URL <http://dx.doi.org/10.1186/1478-811X-11-42>.
- [35] H. Zhong, A. M. D. Marzo, E. Laughner, M. Lim, D. A. Hilton, D. Zagzag, P. Buechler, W. B. Isaacs, G. L. Semenza, and J. W. Simons. *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases*. Cancer Res **59**(22), 5830 (1999).
- [36] T. Hofer, I. Desbaillets, G. Häpfl, R. H. Wenger, and M. Gassmann. *Characterization of hif-1 alpha overexpressing hela cells and implications for gene therapy*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **133**(4), 475 (2002).

- [37] H. Zhong, F. Agani, A. A. Baccala, E. Laughner, N. Rioseco-Camacho, W. B. Isaacs, J. W. Simons, and G. L. Semenza. *Increased expression of hypoxia inducible factor-1alpha in rat and human prostate cancer*. *Cancer Res* **58**(23), 5280 (1998).
- [38] V. Pansare. *Increased expression of hypoxia-inducible factor 1a in type i and type ii endometrial carcinomas*. *Modern Pathology* (2007).
- [39] M. S. Wiesener, P. M. MÄ¼nchenhagen, I. Berger, N. V. Morgan, J. Roigas, A. Schwiertz, J. S. JÄ¼rgensen, G. Gruber, P. H. Maxwell, S. A. LÄ¼ning, U. Frei, E. R. Maher, H. J. GrÄ¼ne, and K. U. Eckardt. *Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas*. *Cancer Res* **61**(13), 5215 (2001).
- [40] M. Krieg, R. Haas, H. Brauch, T. Acker, I. Flamme, and K. H. Plate. *Up-regulation of hypoxia-inducible factors hif-1alpha and hif-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von hippel-lindau tumor suppressor gene loss of function*. *Oncogene* **19**(48), 5435 (2000). URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1203938>.
- [41] K. L. Talks, H. Turley, K. C. Gatter, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, and A. L. Harris. *The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors hif-1alpha and hif-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages*. *Am J Pathol* **157**(2), 411 (2000).
- [42] E. B. Rankin and A. J. Giaccia. *The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis*. *Cell Death Differ* **15**(4), 678 (2008). URL <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2008.21>.
- [43] G. L. Semenza. *Targeting hif-1 for cancer therapy*. *Nat Rev Cancer* **3**(10), 721 (2003). URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1187>.
- [44] I. Papandreou, R. A. Cairns, L. Fontana, A. L. Lim, and N. C. Denko. *Hif-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption*. *Cell Metab* **3**(3), 187 (2006). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.012>.
- [45] J.-P. Piret, D. Mottet, M. Raes, and C. Michiels. *Is hif-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein?* *Biochem Pharmacol* **64**(5-6), 889 (2002).
- [46] A. Sermeus and C. Michiels. *Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways*. *Cell Death Dis* **2**, e164 (2011).
- [47] S. Hammer, K. K.-W. To, Y.-G. Yoo, M. Koshiji, and L. E. Huang. *Hypoxic suppression of the cell cycle gene cdc25a in tumor cells*. *Cell Cycle* **6**(15), 1919 (2007).
- [48] N. Goda, S. J. Dozier, and R. S. Johnson. *Hif-1 in cell cycle regulation, apoptosis, and tumor progression*. *Antioxid Redox Signal* **5**(4), 467 (2003).
- [49] T. Alarcon, H. M. Byrne, and P. K. Maini. *A mathematical model of the effects of hypoxia on the cell-cycle of normal and cancer cells*. *J Theor Biol* **229**(3), 395 (2004). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.04.016>.

- [50] N. Goda, H. E. Ryan, B. Khadivi, W. McNulty, R. C. Rickert, and R. S. Johnson. *Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia*. Mol Cell Biol **23**(1), 359 (2003).
- [51] A. H. Box and D. J. Demetrick. *Cell cycle kinase inhibitor expression and hypoxia-induced cell cycle arrest in human cancer cell lines*. Carcinogenesis **25**(12), 2325 (2004). URL <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgh274>.
- [52] W. Wen, J. Ding, W. Sun, K. Wu, B. Ning, W. Gong, G. He, S. Huang, X. Ding, P. Yin, L. Chen, Q. Liu, W. Xie, and H. Wang. *Suppression of cyclin d1 by hypoxia-inducible factor-1 via direct mechanism inhibits the proliferation and 5-fluorouracil-induced apoptosis of a549 cells*. Cancer Res **70**(5), 2010 (2010). URL <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4910>.
- [53] C. Frei and B. A. Edgar. *Drosophila cyclin d/cdk4 requires hif-1 prolyl hydroxylase to drive cell growth*. Dev Cell **6**(2), 241 (2004).
- [54] M. A. Hernandez-Luna, L. Rocha-Zavaleta, M. I. Vega, and S. Huerta-Yepez. *Hypoxia inducible factor-1 induces chemoresistance phenotype in non-hodgkin lymphoma cell line via up-regulation of bcl-(xl)*. Leuk Lymphoma **54**, 1048 (2012). URL <http://dx.doi.org/10.3109/10428194.2012.733874>.
- [55] L. Zhang and R. P. Hill. *Hypoxia enhances metastatic efficiency by up-regulating mdm2 in kht cells and increasing resistance to apoptosis*. Cancer Res **64**(12), 4180 (2004). URL <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3038>.
- [56] T. Alarcon and H. J. Jensen. *Quiescence : a mechanism for escaping the effects of drug on cell populations*. J R Soc Interface **8**(54), 99 (2011). URL <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2010.0130>.
- [57] C. D. Kamat, D. E. Green, L. Warnke, J. E. Thorpe, A. Ceriello, and M. A. Ihnat. *Mutant p53 facilitates pro-angiogenic, hyperproliferative phenotype in response to chronic relative hypoxia*. Cancer Lett **249**(2), 209 (2007). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2006.08.017>.
- [58] E. Moroz, S. Carlin, K. Dyomina, S. Burke, H. T. Thaler, R. Blasberg, and I. Serganova. *Real-time imaging of hif-1alpha stabilization and degradation*. PLoS One **4**(4), e5077 (2009). URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005077>.
- [59] X. Wang, S. Ma, and G. Qi. *Effect of hypoxia-inducible factor 1-alpha on hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in primary neonatal rat cardiomyocytes*. Biochem Biophys Res Commun **417**(4), 1227 (2012). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.115>.
- [60] P. Martinive, F. Defresne, E. Quaghebeur, G. Daneau, N. Crockart, V. Gregoire, B. Gallez, C. Dessy, and O. Feron. *Impact of cyclic hypoxia on hif-1alpha regulation in endothelial cells—new insights for anti-tumor treatments*. FEBS J **276**(2), 509 (2009). URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06798.x>.
- [61] G. Yuan, J. Nanduri, S. Khan, G. L. Semenza, and N. R. Prabhakar. *Induction of hif-1alpha expression by intermittent hypoxia : involvement of nadph oxidase, ca2+ signaling, prolyl hydroxylases, and mtor*. J Cell Physiol **217**(3), 674 (2008). URL <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.21537>.

- [62] M. W. Dewhirst. *Intermittent hypoxia furthers the rationale for hypoxia-inducible factor-1 targeting*. *Cancer Res* **67**(3), 854 (2007). URL <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4744>.
- [63] L. Luo, J. Lu, L. Wei, D. Long, J. Y. Guo, J. Shan, F. S. Li, P. Y. Lu, P. Y. Li, and L. Feng. *The role of hif-1 in up-regulating mica expression on human renal proximal tubular epithelial cells during hypoxia/reoxygenation*. *BMC Cell Biol* **11**, 91 (2010). URL <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2121-11-91>.
- [64] P. H. Maxwell, M. S. Wiesener, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. C. Vaux, M. E. Cockman, C. C. Wykoff, C. W. Pugh, E. R. Maher, and P. J. Ratcliffe. *The tumour suppressor protein vhl targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. *Nature* **399**(6733), 271 (1999). URL <http://dx.doi.org/10.1038/20459>.
- [65] X. Zheng, J. L. Ruas, R. Cao, F. A. Salomons, Y. Cao, L. Poellinger, and T. Pereira. *Cell-type-specific regulation of degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha : role of subcellular compartmentalization*. *Mol Cell Biol* **26**(12), 4628 (2006). URL <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.02236-05>.
- [66] I. Groulx and S. Lee. *Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von hippel-lindau tumor suppressor protein*. *Mol Cell Biol* **22**(15), 5319 (2002).
- [67] L. K. Nguyen, M. A. S. Cavadas, C. C. Scholz, S. F. Fitzpatrick, U. Bruning, E. P. Cummins, M. M. Tambuwala, M. C. Manresa, B. N. Kholodenko, C. T. Taylor, and A. Cheong. *A dynamic model of the hypoxia-inducible factor 1alpha (hif-1alpha) network*. *J Cell Sci* **126**(Pt 6), 1454 (2013). URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.119974>.
- [68] K. W. Kohn, J. Riss, O. Aprelikova, J. N. Weinstein, Y. Pommier, and J. C. Barrett. *Properties of switch-like bioregulatory networks studied by simulation of the hypoxia response control system*. *Mol Biol Cell* **15**(7), 3042 (2004). URL <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E03-12-0897>.
- [69] A. A. Qutub and A. S. Popel. *Three autocrine feedback loops determine hif1 alpha expression in chronic hypoxia*. *Biochim Biophys Acta* **1773**(10), 1511 (2007). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.07.004>.
- [70] E. Potuckova, H. Jansova, M. Machacek, A. Vavrova, P. Haskova, L. Tichotova, V. Richardson, D. S. Kalinowski, D. R. Richardson, and T. Simunek. *Quantitative analysis of the anti-proliferative activity of combinations of selected iron-chelating agents and clinically used anti-neoplastic drugs*. *PLoS One* **9**(2), e88754 (2014). URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088754>.
- [71] Y. Yu, Z. Kovacevic, and D. R. Richardson. *Tuning cell cycle regulation with an iron key*. *Cell Cycle* **6**(16), 1982 (2007).
- [72] H. Xiao, Z. Gu, G. Wang, and T. Zhao. *The possible mechanisms underlying the impairment of hif-1 pathway signaling in hyperglycemia and the beneficial effects of certain therapies*. *Int J Med Sci* **10**(10), 1412 (2013).

- [73] M. Guo, L.-P. Song, Y. Jiang, W. Liu, Y. Yu, and G.-Q. Chen. *Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1alpha independent mechanisms*. *Apoptosis* **11**(1), 67 (2006).
- [74] H.-L. Zeng, Q. Zhong, Y.-L. Qin, Q.-Q. Bu, X.-A. Han, H.-T. Jia, and H.-W. Liu. *Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells*. *BMC Cell Biol* **12**, 32 (2011). URL <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2121-12-32>.
- [75] Z.-J. Dai, J. Gao, X.-B. Ma, K. Yan, X.-X. Liu, H.-F. Kang, Z.-Z. Ji, H.-T. Guan, and X.-J. Wang. *Up-regulation of hypoxia inducible factor-1 by cobalt chloride correlates with proliferation and apoptosis in pc-2 cells*. *J Exp Clin Cancer Res* **31**, 28 (2012).
- [76] J.-H. Lee, S.-H. Choi, M.-W. Baek, M.-H. Kim, H.-J. Kim, S.-H. Kim, S.-J. Oh, H.-J. Park, W.-J. Kim, and J.-Y. Jung. *Cocl2 induces apoptosis through the mitochondria- and death receptor-mediated pathway in the mouse embryonic stem cells*. *Mol Cell Biochem* **379**(1-2), 133 (2013).
- [77] T. D. Ardyanto, M. Osaki, N. Tokuyasu, Y. Nagahama, and H. Ito. *Cocl2-induced hif-1alpha expression correlates with proliferation and apoptosis in mkn-1 cells : a possible role for the pi3k/akt pathway*. *Int J Oncol* **29**(3), 549 (2006).
- [78] S. Bae, H.-J. Jeong, H. J. Cha, K. Kim, Y. M. Choi, I.-S. An, H. J. Koh, D. J. Lim, S.-J. Lee, and S. An. *The hypoxia-mimetic agent cobalt chloride induces cell cycle arrest and alters gene expression in u266 multiple myeloma cells*. *Int J Mol Med* **30**(5), 1180 (2012). URL <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2012.1115>.
- [79] A. Triantafyllou, P. Liakos, A. Tsakalof, E. Georgatsou, G. Simos, and S. Bonanou. *Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha (hif-1alpha) in hela cells by an iron-independent, but ros-, pi-3k- and mapk-dependent mechanism*. *Free Radic Res* **40**(8), 847 (2006).
- [80] J. J. Lucas, A. Szepesi, J. Domenico, K. Takase, A. Tordai, N. Terada, and E. W. Gelfand. *Effects of iron-depletion on cell cycle progression in normal human t lymphocytes : selective inhibition of the appearance of the cyclin a-associated component of the p33cdk2 kinase*. *Blood* **86**(6), 2268 (1995).
- [81] C. Brodie, G. Siriwardana, J. Lucas, R. Schleicher, N. Terada, A. Szepesi, E. Gelfand, and P. Seligman. *Neuroblastoma sensitivity to growth inhibition by deferroxamine : evidence for a block in g1 phase of the cell cycle*. *Cancer Res* **53**(17), 3968 (1993).
- [82] C. Metzendorf and M. I. Lind. *The role of iron in the proliferation of drosophila l(2) mbn cells*. *Biochem Biophys Res Commun* **400**(3), 442 (2010). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.08.100>.
- [83] G. Siriwardana and P. A. Seligman. *Two cell cycle blocks caused by iron chelation of neuroblastoma cells : separating cell cycle events associated with each block*. *Physiol Rep* **1**(7), e00176 (2013). URL <http://dx.doi.org/10.1002/phy2.176>.

- [84] F. J. Renton and T. M. Jeitner. *Cell cycle-dependent inhibition of the proliferation of human neural tumor cell lines by iron chelators*. *Biochem Pharmacol* **51**(11), 1553 (1996).
- [85] A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. Miyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai, and A. Miyawaki. *Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression*. *Cell* **132**(3), 487 (2008).
- [86] M. Mechali and M. Lutzmann. *The cell cycle : now live and in color*. *Cell* **132**(3), 341 (2008). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.031>.
- [87] G. Carlier, A. Maugein, C. Cordier, S. Pechberty, M. Garfa-TraorÃ©, P. Martin, R. Scharfmann, and O. Albagli. *Human fucci pancreatic beta cell lines : new tools to study beta cell cycle and terminal differentiation*. *PLoS One* **9**(9), e108202 (2014). URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0108202>.
- [88] A. Kaida, N. Sawai, K. Sakaguchi, and M. Miura. *Fluorescence kinetics in hela cells after treatment with cell cycle arrest inducers visualized with fucci (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator)*. *Cell Biol Int* **35**(4), 359 (2011). URL <http://dx.doi.org/10.1042/CBI20100643>.
- [89] T. Nagano, T. Hashimoto, A. Nakashima, S. ichi Hisanaga, U. Kikkawa, and S. Kamada. *Cyclin i is involved in the regulation of cell cycle progression*. *Cell Cycle* **12**(16), 2617 (2013).
- [90] N. Zielke, J. Korzelius, M. van Straaten, K. Bender, G. F. P. Schuhknecht, D. Dutta, J. Xiang, and B. A. Edgar. *Fly-fucci : A versatile tool for studying cell proliferation in complex tissues*. *Cell Rep* **7**(2), 588 (2014). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.020>.
- [91] M. Sugiyama, A. Sakaue-Sawano, T. Iimura, K. Fukami, T. Kitaguchi, K. Kawakami, H. Okamoto, S. ichi Higashijima, and A. Miyawaki. *Illuminating cell-cycle progression in the developing zebrafish embryo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(49), 20812 (2009).
- [92] B. Bedessem and A. Stephanou. *A mathematical model of hif-1-mediated response to hypoxia on the g1/s transition*. *Math Biosci* **248**, 31 (2014). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.mbs.2013.11.007>.
- [93] B. Bedessem, M.-P. Montmasson, M. Hamel, F. Giroud, and A. Stephanou. *Effects of the hypoxia-mimetic agents dfo and cocl2 on hela-fucci cells*. *Journal of Cell Biology and Cell Metabolism* **2 :1** (2015).
- [94] B. Bedessem and A. Stephanou. *Role of compartmentalization on hif-1alpha degradation dynamics during changing oxygen conditions : A computational approach*. *PLoS One* **9**(10), e110495 (2014). URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0110495>.
- [95] A. Csikasz-Nagy. *Computational systems biology of the cell cycle*. *Brief Bioinform* **10**(4), 424 (2009). URL <http://dx.doi.org/10.1093/bib/bbp005>.
- [96] J. J. Tyson and B. Novak. *Regulation of the eukaryotic cell cycle : molecular antagonism, hysteresis, and irreversible transitions*. *J Theor Biol* **210**(2), 249 (2001). URL <http://dx.doi.org/10.1006/jtbi.2001.2293>.

- [97] B. Novak and J. J. Tyson. *A model for restriction point control of the mammalian cell cycle*. J Theor Biol **230**(4), 563 (2004). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.04.039>.
- [98] J. L. Cherry and F. R. Adler. *How to make a biological switch*. J Theor Biol **203**(2), 117 (2000). URL <http://dx.doi.org/10.1006/jtbi.2000.1068>.
- [99] A.-C. Lesart, B. van der Sanden, L. Hamard, F. Esteve, and A. Stephanou. *On the importance of the submicrovascular network in a computational model of tumour growth*. Microvasc Res **84**(2), 188 (2012). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2012.06.001>.
- [100] J. A. Royds, S. K. Dower, E. E. Qwarnstrom, and C. E. Lewis. *Response of tumour cells to hypoxia : role of p53 and nfkb*. Mol Pathol **51**(2), 55 (1998).
- [101] O. Letonqueze, J. Lee, and S. Vasudevan. *Microrna-mediated posttranscriptional mechanisms of gene expression in proliferating and quiescent cancer cells*. RNA Biol **9**(6), 871 (2012). URL <http://dx.doi.org/10.4161/rna.20806>.
- [102] G. G. Powathil, K. E. Gordon, L. A. Hill, and M. A. J. Chaplain. *Modelling the effects of cell-cycle heterogeneity on the response of a solid tumour to chemotherapy : biological insights from a hybrid multiscale cellular automaton model*. J Theor Biol **308**, 1 (2012). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.05.015>.
- [103] Y. Leshem and O. Halevy. *Phosphorylation of prb is required for hgf-induced muscle cell proliferation and is p27kip1-dependent*. J Cell Physiol **191**(2), 173 (2002). URL <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.10089>.
- [104] C. Park, I. Lee, and W. K. Kang. *Lovastatin-induced e2f-1 modulation and its effect on prostate cancer cell death*. Carcinogenesis **22**(10), 1727 (2001).
- [105] S. L. Green, R. A. Freiberg, and A. J. Giaccia. *p21(cip1) and p27(kip1) regulate cell cycle reentry after hypoxic stress but are not necessary for hypoxia-induced arrest*. Mol Cell Biol **21**(4), 1196 (2001). URL <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.21.4.1196-1206.2001>.
- [106] J. I. Bardos and M. Ashcroft. *Negative and positive regulation of hif-1 : a complex network*. Biochim Biophys Acta **1755**(2), 107 (2005).
- [107] O. Hashimoto, K. Shimizu, S. Semba, S. Chiba, Y. Ku, H. Yokozaki, and Y. Hori. *Hypoxia induces tumor aggressiveness and the expansion of cd133-positive cells in a hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent manner in pancreatic cancer cells*. Pathobiology **78**(4), 181 (2011).
- [108] B. Bao, S. Ali, A. Ahmad, A. S. Azmi, Y. Li, S. Banerjee, D. Kong, S. Sethi, A. Aboukameel, S. B. Padhye, and F. H. Sarkar. *Hypoxia-induced aggressiveness of pancreatic cancer cells is due to increased expression of vegf, il-6 and mir-21, which can be attenuated by cdf treatment*. PLoS One **7**(12), e50165 (2012).
- [109] W.-T. Chen, C.-J. Huang, M.-T. Wu, S.-F. Yang, Y.-C. Su, and C.-Y. Chai. *Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with risk of aggressive behavior and tumor angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor*. Jpn J Clin Oncol **35**(4), 207 (2005).

- [110] A. Csikász-Nagy, D. Battogtokh, K. C. Chen, B. Novák, and J. J. Tyson. *Analysis of a generic model of eukaryotic cell-cycle regulation*. *Biophys J* **90**(12), 4361 (2006). URL <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.081240>.
- [111] M. Barberis, E. Klipp, M. Vanoni, and L. Alberghina. *Cell size at s phase initiation : an emergent property of the g1/s network*. *PLoS Comput Biol* **3**(4), e64 (2007). URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030064>.
- [112] K. Yang, M. Hitomi, and D. W. Stacey. *Variations in cyclin d1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell*. *Cell Div* **1**, 32 (2006). URL <http://dx.doi.org/10.1186/1747-1028-1-32>.
- [113] G. L. Semenza. *Hypoxia-inducible factor 1 (hif-1) pathway*. *Sci STKE* **2007**(407), cm8 (2007).
- [114] S. Salceda and J. Caro. *Hypoxia-inducible factor 1alpha (hif-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes*. *J Biol Chem* **272**(36), 22642 (1997).
- [115] J. M. Brown and W. R. Wilson. *Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment*. *Nat Rev Cancer* **4**(6), 437 (2004).
- [116] G. L. Semenza. *Targeting hif-1 for cancer therapy*. *Nat Rev Cancer* **3**(10), 721 (2003).
- [117] G. L. Semenza. *Hypoxia-inducible factors : mediators of cancer progression and targets for cancer therapy*. *Trends Pharmacol Sci* **33**(4), 207 (2012). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2012.01.005>.
- [118] S. Filippi, P. Latini, M. Frontini, F. Palitti, J.-M. Egly, and L. Proietti-De-Santis. *Csb protein is (a direct target of hif-1 and) a critical mediator of the hypoxic response*. *EMBO J* **27**(19), 2545 (2008). URL <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2008.180>.
- [119] J. T. Winston and W. J. Pledger. *Growth factor regulation of cyclin d1 mrna expression through protein synthesis-dependent and -independent mechanisms*. *Mol Biol Cell* **4**(11), 1133 (1993).
- [120] P. H. Maxwell, C. W. Pugh, and P. J. Ratcliffe. *The pvh1-hif-1 system. a key mediator of oxygen homeostasis*. *Adv Exp Med Biol* **502**, 365 (2001).
- [121] F. van Drogen, O. Sangfelt, A. Malyukova, L. Matskova, E. Yeh, A. R. Means, and S. I. Reed. *Ubiquitylation of cyclin e requires the sequential function of scf complexes containing distinct hcdc4 isoforms*. *Mol Cell* **23**(1), 37 (2006). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.020>.
- [122] W. Zhou, T. L. Dosey, T. Biechele, R. T. Moon, M. S. Horwitz, and H. Ruohola-Baker. *Assessment of hypoxia inducible factor levels in cancer cell lines upon hypoxic induction using a novel reporter construct*. *PLoS One* **6**(11), e27460 (2011). URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027460>.
- [123] D. W. Stacey. *Cyclin d1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells*. *Curr Opin Cell Biol* **15**(2), 158 (2003).

- [124] R. A. Gatenby and R. J. Gillies. *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* Nat Rev Cancer **4**(11), 891 (2004).
- [125] A. Icreverzi, A. F. de la Cruz, W. A. V. Voorhies, and B. A. Edgar. *Drosophila cyclin d/cdk4 regulates mitochondrial biogenesis and aging and sensitizes animals to hypoxic stress.* Cell Cycle **11**(3), 554 (2012). URL <http://dx.doi.org/10.4161/cc.11.3.19062>.
- [126] P. P. Provenzano and P. J. Keely. *Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and rho gtpase signaling.* J Cell Sci **124**(Pt 8), 1195 (2011).
- [127] M. Baba, S. Hirai, H. Yamada-Okabe, K. Hamada, H. Tabuchi, K. Kobayashi, K. Kondo, M. Yoshida, A. Yamashita, T. Kishida, N. Nakaigawa, Y. Nagashima, Y. Kubota, M. Yao, and S. Ohno. *Loss of von hippel-lindau protein causes cell density dependent deregulation of cyclind1 expression through hypoxia-inducible factor.* Oncogene **22**(18), 2728 (2003). URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206373>.
- [128] A. Kaida and M. Miura. *Visualizing the effect of hypoxia on fluorescence kinetics in living hela cells using the fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (fucci).* Exp Cell Res **318**(3), 288 (2012).
- [129] A. Kaida and M. Miura. *Differential dependence on oxygen tension during the maturation process between monomeric kusabira orange 2 and monomeric azami green expressed in hela cells.* Biochem Biophys Res Commun **421**(4), 855 (2012).
- [130] M. A. Hernandez-Luna, L. Rocha-Zavaleta, M. I. Vega, and S. Huerta-Yepe. *Hypoxia inducible factor-1 induces chemoresistance phenotype in non-hodgkin lymphoma cell line via up-regulation of bcl-xl.* Leuk Lymphoma **54**(5), 1048 (2013).
- [131] C. Michiels, F. D. Leener, T. Arnould, M. Dieu, and J. Remacle. *Hypoxia stimulates human endothelial cells to release smooth muscle cell mitogens : role of prostaglandins and bfgf.* Exp Cell Res **213**(1), 43 (1994). URL <http://dx.doi.org/10.1006/excr.1994.1171>.
- [132] R. E. Banks, P. Tirukonda, C. Taylor, N. Hornigold, D. Astuti, D. Cohen, E. R. Maher, A. J. Stanley, P. Harnden, A. Joyce, M. Knowles, and P. J. Selby. *Genetic and epigenetic analysis of von hippel-lindau (vhl) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer.* Cancer Res **66**(4), 2000 (2006).
- [133] E. May, J. R. Jenkins, and P. May. *Endogenous hela p53 proteins are easily detected in hela cells transfected with mouse deletion mutant p53 gene.* Oncogene **6**(8), 1363 (1991).
- [134] Y. Minagawa, J. Kigawa, H. Itamochi, Y. Kanamori, M. Shimada, M. Takahashi, and N. Terakawa. *Cisplatin-resistant hela cells are resistant to apoptosis via p53-dependent and -independent pathways.* Jpn J Cancer Res **90**(12), 1373 (1999).
- [135] R. Koivusalo, E. Krausz, H. Helenius, and S. Hietanen. *Chemotherapy compounds in cervical cancer cells primed by reconstitution of p53 function after short interfering rna-mediated degradation of human papillomavirus 18 e6 mrna : opposite effect of sirna in combination with different drugs.* Mol Pharmacol **68**(2), 372 (2005). URL <http://dx.doi.org/10.1124/mol.105.011189>.

- [136] S. S. Kim, H.-S. Chae, J.-H. Bach, M. W. Lee, K. Y. Kim, W. B. Lee, Y.-M. Jung, J. V. Bonventre, and Y.-H. Suh. *P53 mediates ceramide-induced apoptosis in skn-sh cells*. *Oncogene* **21**(13), 2020 (2002). URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1205037>.
- [137] C.-M. Park, M.-J. Park, H.-J. Kwak, S.-I. Moon, D.-H. Yoo, H.-C. Lee, I.-C. Park, C. H. Rhee, and S.-I. Hong. *Induction of p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin*. *Int J Oncol* **28**(1), 119 (2006).
- [138] C. Gaitanaki, T. Kalpachidou, I.-K. S. Aggeli, P. Papazafiri, and I. Beis. *Cocl2 induces protective events via the p38-mapk signalling pathway and anp in the perfused amphibian heart*. *J Exp Biol* **210**(Pt 13), 2267 (2007). URL <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.003178>.
- [139] T. A. Markel, P. R. Crisostomo, M. Wang, C. M. Herring, T. Lahm, K. K. Meldrum, K. D. Lillemoe, F. J. Rescorla, and D. R. Meldrum. *Iron chelation acutely stimulates fetal human intestinal cell production of il-6 and vegf while decreasing hgf : the roles of p38, erk, and jnk mapk signaling*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**(4), G958 (2007). URL <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00502.2006>.
- [140] S.-K. Lee, H.-J. Jang, H.-J. Lee, J. Lee, B.-H. Jeon, C.-D. Jun, S.-K. Lee, and E.-C. Kim. *p38 and erk map kinase mediates iron chelator-induced apoptosis and -suppressed differentiation of immortalized and malignant human oral keratinocytes*. *Life Sci* **79**(15), 1419 (2006). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2006.04.011>.
- [141] W. wei An, X. feng Gong, M. wei Wang, S. ichi Tashiro, S. Onodera, and T. Ikejima. *Norcantharidin induces apoptosis in hela cells through caspase, mapk, and mitochondrial pathways*. *Acta Pharmacol Sin* **25**(11), 1502 (2004).
- [142] W. Zhong, H. Zhu, F. Sheng, Y. Tian, J. Zhou, Y. Chen, S. Li, and J. Lin. *Activation of the mapk11/12/13/14 (p38 mapk) pathway regulates the transcription of autophagy genes in response to oxidative stress induced by a novel copper complex in hela cells*. *Autophagy* **10**(7), 1285 (2014). URL <http://dx.doi.org/10.4161/auto.28789>.
- [143] P. Astuti, T. Pike, C. Widberg, E. Payne, A. Harding, J. Hancock, and B. Gabrielli. *Mapk pathway activation delays g2/m progression by destabilizing cdc25b*. *J Biol Chem* **284**(49), 33781 (2009). URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.027516>.
- [144] J. Gao, Y. Zhao, Y. Lv, Y. Chen, B. Wei, J. Tian, Z. Yang, F. Kong, J. Pang, J. Liu, and H. Shi. *Mirk/dyrk1b mediates g0/g1 to s phase cell cycle progression and cell survival involving mapk/erk signaling in human cancer cells*. *Cancer Cell Int* **13**(1), 2 (2013). URL <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2867-13-2>.
- [145] L. Bai, R. Mao, J. Wang, L. Ding, S. Jiang, C. Gao, H. Kang, X. Chen, X. Sun, and J. Xu. *Erk1/2 promoted proliferation and inhibited apoptosis of human cervical cancer cells and regulated the expression of c-fos and c-jun proteins*. *Med Oncol* **32**(3), 490 (2015). URL <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-015-0490-5>.

- [146] C. Hao, W. Hao, X. Wei, L. Xing, J. Jiang, and L. Shang. *The role of mapk in the biphasic dose-response phenomenon induced by cadmium and mercury in hek293 cells*. *Toxicol In Vitro* **23**(4), 660 (2009). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.03.005>.
- [147] R. K. Bruick. *Expression of the gene encoding the proapoptotic nip3 protein is induced by hypoxia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16), 9082 (2000).
- [148] S. Nagel, M. Papadakis, R. Chen, L. C. Hoyte, K. J. Brooks, D. Gallichan, N. R. Sibson, C. Pugh, and A. M. Buchan. *Neuroprotection by dimethylglycine following permanent and transient focal cerebral ischemia in rats*. *J Cereb Blood Flow Metab* **31**(1), 132 (2011). URL <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2010.60>.
- [149] Q. Yuan, O. Bleiziffer, A. M. Boos, J. Sun, A. Brandl, J. P. Beier, A. Arkudas, M. Schmitz, U. Kneser, and R. E. Horch. *Phds inhibitor dmog promotes the vascularization process in the av loop by hif-1a up-regulation and the preliminary discussion on its kinetics in rat*. *BMC Biotechnol* **14**, 112 (2014). URL <http://dx.doi.org/10.1186/s12896-014-0112-x>.
- [150] J. Seim, P. Graff, O. Amellem, K. S. Landsverk, T. Stokke, and E. O. Pettersen. *Hypoxia-induced irreversible s-phase arrest involves down-regulation of cyclin a*. *Cell Prolif* **36**(6), 321 (2003).
- [151] B.-M. Kim, J. Y. Choi, Y.-J. Kim, H.-D. Woo, and H. W. Chung. *Reoxygenation following hypoxia activates dna-damage checkpoint signaling pathways that suppress cell-cycle progression in cultured human lymphocytes*. *FEBS Lett* **581**(16), 3005 (2007). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.053>.
- [152] M. Olcina, P. S. Lecane, and E. M. Hammond. *Targeting hypoxic cells through the dna damage response*. *Clin Cancer Res* **16**(23), 5624 (2010). URL <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0286>.
- [153] E. M. Hammond, M. J. Dorie, and A. J. Giaccia. *Inhibition of atr leads to increased sensitivity to hypoxia/reoxygenation*. *Cancer Res* **64**(18), 6556 (2004). URL <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1520>.
- [154] R. A. Freiberg, A. J. Krieg, A. J. Giaccia, and E. M. Hammond. *Checking in on hypoxia/reoxygenation*. *Cell Cycle* **5**(12), 1304 (2006).
- [155] S. Hara, C. Kobayashi, and N. Imura. *Nuclear localization of hypoxia-inducible factor-2alpha in bovine arterial endothelial cells*. *Mol Cell Biol Res Commun* **2**(2), 119 (1999). URL <http://dx.doi.org/10.1006/mcbr.1999.0160>.
- [156] H.-P. Kubis, N. Hanke, R. J. Scheibe, and G. Gros. *Accumulation and nuclear import of hif1 alpha during high and low oxygen concentration in skeletal muscle cells in primary culture*. *Biochim Biophys Acta* **1745**(2), 187 (2005). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.05.007>.
- [157] D. Cao, M. Hou, Y. song Guan, M. Jiang, Y. Yang, and H. feng Gou. *Expression of hif-1alpha and vegf in colorectal cancer : association with clinical outcomes and prognostic implications*. *BMC Cancer* **9**, 432 (2009).

- [158] U. Berchner-Pfannschmidt, S. Frede, C. Wotzlaw, and J. Fandrey. *Imaging of the hypoxia-inducible factor pathway : insights into oxygen sensing*. Eur Respir J **32**(1), 210 (2008). URL <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00013408>.
- [159] S. Lee, D. Y. Chen, J. S. Humphrey, J. R. Gnarr, W. M. Linehan, and R. D. Klausner. *Nuclear/cytoplasmic localization of the von hippel-lindau tumor suppressor gene product is determined by cell density*. Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5), 1770 (1996).
- [160] S. Lee, M. Neumann, R. Stearman, R. Stauber, A. Pause, G. N. Pavlakis, and R. D. Klausner. *Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic trafficking is required for the function of the von hippel-lindau tumor suppressor protein*. Mol Cell Biol **19**(2), 1486 (1999).
- [161] M. Los, G. H. Jansen, W. G. Kaelin, C. J. Lips, G. H. Blijham, and E. E. Voest. *Expression pattern of the von hippel-lindau protein in human tissues*. Lab Invest **75**(2), 231 (1996).
- [162] C.-H. Hsieh, J.-W. Kuo, Y.-J. Lee, C.-W. Chang, J. G. Gelovani, and R.-S. Liu. *Construction of mutant tkgfp for real-time imaging of temporal dynamics of hif-1 signal transduction activity mediated by hypoxia and reoxygenation in tumors in living mice*. J Nucl Med **50**(12), 2049 (2009). URL <http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.108.061234>.
- [163] B. C. Yang, D. S. Zander, and J. L. Mehta. *Hypoxia-reoxygenation-induced apoptosis in cultured adult rat myocytes and the protective effect of platelets and transforming growth factor-beta(1)*. J Pharmacol Exp Ther **291**(2), 733 (1999).
- [164] P. M. Kang, A. Haunstetter, H. Aoki, A. Usheva, and S. Izumo. *Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation*. Circ Res **87**(2), 118 (2000).
- [165] M. Heiner and K. Sriram. *Structural analysis to determine the core of hypoxia response network*. PLoS One **5**(1), e8600 (2010). URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008600>.
- [166] J. Bagnall, J. Leedale, S. E. Taylor, D. G. Spiller, M. R. H. White, K. J. Sharkey, R. N. Bearon, and V. See. *Tight control of hypoxia-inducible factor transient dynamics is essential for cell survival in hypoxia*. J Biol Chem **289**(9), 5549 (2014). URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.500405>.
- [167] M. V. Blagosklonny. *Do vhl and hif-1 mirror p53 and mdm-2? degradation-transactivation loops of oncoproteins and tumor suppressors*. Oncogene **20**(3), 395 (2001). URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204055>.
- [168] P. Renbaum, F. M. Duh, F. Latif, B. Zbar, M. I. Lerman, and I. Kuzmin. *Isolation and characterization of the full-length 3' untranslated region of the human von hippel-lindau tumor suppressor gene*. Hum Genet **98**(6), 666 (1996).
- [169] J. Karhausen, T. Kong, S. Narravula, and S. P. Colgan. *Induction of the von hippel-lindau tumor suppressor gene by late hypoxia limits hif-1 expression*. J Cell Biochem **95**(6), 1264 (2005). URL <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.20489>.

- [170] A. Hunziker, M. H. Jensen, and S. Krishna. *Stress-specific response of the p53-mdm2 feedback loop*. BMC Syst Biol **4**, 94 (2010). URL <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-4-94>.
- [171] P. Kooner, P. K. Maini, and D. J. Gavaghan. *Mathematical modelling of the hif-1 mediated hypoxic response in tumours*. Proceedings of the 2005 International Symposium on Mathematical & Computational Biology BIOMAT 2005 pp. 281–315 (2006).
- [172] M. P. Rechsteiner, A. von Teichman, A. Nowicka, T. Sulser, P. Schraml, and H. Moch. *Vhl gene mutations and their effects on hypoxia inducible factor hif : identification of potential driver and passenger mutations*. Cancer Res **71**(16), 5500 (2011). URL <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0757>.
- [173] K. J. Turner, J. W. Moore, A. Jones, C. F. Taylor, D. Cuthbert-Heavens, C. Han, R. D. Leek, K. C. Gatter, P. H. Maxwell, P. J. Ratcliffe, D. Cranston, and A. L. Harris. *Expression of hypoxia-inducible factors in human renal cancer : relationship to angiogenesis and to the von hippel-lindau gene mutation*. Cancer Res **62**(10), 2957 (2002).
- [174] T. Yoshikawa, A. Tsuburaya, Y. Miyagi, H. Sekiguchi, M. Kimura, H. Cho, and O. Kobayashi. *Up-regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and vegf mrnas in peritoneal dissemination of patients with gastric cancer*. Anticancer Res **26**(5B), 3849 (2006).
- [175] T. Matsuyama, K. Nakanishi, T. Hayashi, Y. Yoshizumi, S. Aiko, Y. Sugiura, T. Tanimoto, M. Uenoyama, Y. Ozeki, and T. Maehara. *Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer Sci **96**(3), 176 (2005). URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00025.x>.
- [176] M. Ivan, K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J. M. Asara, W. S. Lane, and W. G. Kaelin. *Hif1alpha targeted for vhl-mediated destruction by proline hydroxylation : implications for o2 sensing*. Science **292**(5516), 464 (2001). URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.1059817>.
- [177] P. Jaakkola, D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, A. von Kriegsheim, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, and P. J. Ratcliffe. *Targeting of hif-1alpha to the von hippel-lindau ubiquitylation complex by o2-regulated prolyl hydroxylation*. Science **292**(5516), 468 (2001). URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.1059796>.
- [178] C. J. R. Illingworth, C. Loenarz, C. J. Schofield, and C. Domene. *Chemical basis for the selectivity of the von hippel lindau tumor suppressor pvh1 for prolyl-hydroxylated hif-1alpha*. Biochemistry **49**(32), 6936 (2010). URL <http://dx.doi.org/10.1021/bi100358t>.
- [179] W.-C. Hon, M. I. Wilson, K. Harlos, T. D. W. Claridge, C. J. Schofield, C. W. Pugh, P. H. Maxwell, P. J. Ratcliffe, D. I. Stuart, and E. Y. Jones. *Structural basis for the recognition of hydroxyproline in hif-1 alpha by pvh1*. Nature **417**(6892), 975 (2002). URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature00767>.

- [180] P. Martinive, F. Defresne, C. Bouzin, J. Saliez, F. Lair, V. Gregoire, C. Michiels, C. Dessy, and O. Feron. *Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia : implications for anticancer therapies*. *Cancer Res* **66**(24), 11736 (2006). URL <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2056>.
- [181] T. Jokilehto, K. Rantanen, M. Luukkaa, P. Heikkinen, R. Grenman, H. Minn, P. Kronqvist, and P. M. Jaakkola. *Overexpression and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase phd2 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness*. *Clin Cancer Res* **12**(4), 1080 (2006). URL <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2022>.
- [182] E. Y. Tan, L. Campo, C. Han, H. Turley, F. Pezzella, K. C. Gatter, A. L. Harris, and S. B. Fox. *Cytoplasmic location of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor is associated with an enhanced hypoxic response and a shorter survival in invasive breast cancer*. *Breast Cancer Res* **9**(6), R89 (2007). URL <http://dx.doi.org/10.1186/bcr1838>.
- [183] A. Hyseni, P. van der Groep, E. van der Wall, and P. J. van Diest. *Subcellular fih-1 expression patterns in invasive breast cancer in relation to hif-1alpha expression*. *Cell Oncol (Dordr)* **34**(6), 565 (2011). URL <http://dx.doi.org/10.1007/s13402-011-0053-5>.
- [184] K. Mekhail, L. Rivero-Lopez, A. Al-Masri, C. Brandon, M. Khacho, and S. Lee. *Identification of a common subnuclear localization signal*. *Mol Biol Cell* **18**(10), 3966 (2007). URL <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E07-03-0295>.
- [185] C. Yang, K. Huntoon, A. Ksendzovsky, Z. Zhuang, and R. R. Lonser. *Proteostasis modulators prolong missense vhl protein activity and halt tumor progression*. *Cell Rep* **3**(1), 52 (2013). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.12.007>.
- [186] A. Lidgren. *Hypoxia-inducible factor-1 mrna and protein levels in renal cell carcinoma*. *Journal of Cancer Molecules* **4**(5), 153 (2008).
- [187] S. Fujiwara, K. Nakagawa, H. Harada, S. Nagato, K. Furukawa, M. Teraoka, T. Seno, K. Oka, S. Iwata, and T. Ohnishi. *Silencing hypoxia-inducible factor-1alpha inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas*. *Int J Oncol* **30**(4), 793 (2007).
- [188] P. Gao, H. Zhang, R. Dinavahi, F. Li, Y. Xiang, V. Raman, Z. M. Bhujwalla, D. W. Felsher, L. Cheng, J. Pevsner, L. A. Lee, G. L. Semenza, and C. V. Dang. *Hif-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo*. *Cancer Cell* **12**(3), 230 (2007). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2007.08.004>.
- [189] N. Geva-Zatorsky, N. Rosenfeld, S. Itzkovitz, R. Milo, A. Sigal, E. Dekel, T. Yarnitzky, Y. Liron, P. Polak, G. Lahav, and U. Alon. *Oscillations and variability in the p53 system*. *Mol Syst Biol* **2**, 2006.0033 (2006). URL <http://dx.doi.org/10.1038/msb4100068>.
- [190] C. J. Proctor and D. A. Gray. *Explaining oscillations and variability in the p53-mdm2 system*. *BMC Syst Biol* **2**, 75 (2008). URL <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-2-75>.

- [191] E. M. Hammond and A. J. Giaccia. *The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis*. *Biochem Biophys Res Commun* **331**(3), 718 (2005). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.154>.
- [192] T. Schmid, J. Zhou, and B. BrÅ¼ne. *Hif-1 and p53 : communication of transcription factors under hypoxia*. *J Cell Mol Med* **8**(4), 423 (2004).
- [193] B. Chen, M. S. Longtine, Y. Sadosky, and D. M. Nelson. *Hypoxia downregulates p53 but induces apoptosis and enhances expression of bad in cultures of human syncytiotrophoblasts*. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**(5), C968 (2010). URL <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00154.2010>.
- [194] J.-S. Roe and H.-D. Youn. *The positive regulation of p53 by the tumor suppressor vhl*. *Cell Cycle* **5**(18), 2054 (2006).
- [195] R. Ravi, B. Mookerjee, Z. M. Bhujwalla, C. H. Sutter, D. Artemov, Q. Zeng, L. E. Dillehay, A. Madan, G. L. Semenza, and A. Bedi. *Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha*. *Genes Dev* **14**(1), 34 (2000).
- [196] H. Suzuki, A. Tomida, and T. Tsuruo. *Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia*. *Oncogene* **20**(41), 5779 (2001). URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204742>.
- [197] A.-L. Nieminen, S. Qanungo, E. A. Schneider, B.-H. Jiang, and F. H. Agani. *Mdm2 and hif-1alpha interaction in tumor cells during hypoxia*. *J Cell Physiol* **204**(2), 364 (2005). URL <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20406>.
- [198] G. A. LaRusch, M. W. Jackson, J. D. Dunbar, R. S. Warren, D. B. Donner, and L. D. Mayo. *Nutlin3 blocks vascular endothelial growth factor induction by preventing the interaction between hypoxia inducible factor 1alpha and hdm2*. *Cancer Res* **67**(2), 450 (2007). URL <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2710>.
- [199] H. Longino. *Studying Human Behavior. How Scientists Investigate Agression and Sexuality*, (The University of Chicago Press, 2013).
- [200] D. Hanahan and R. A. Weinberg. *The hallmarks of cancer*. *Cell* **100**(1), 57 (2000).
- [201] C. Tomasetti and B. Vogelstein. *Cancer etiology. variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions*. *Science* **347**(6217), 78 (2015). URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.1260825>.
- [202] K. Strebhardt and A. Ullrich. *Paul ehrlich's magic bullet concept : 100 years of progress*. *Nat Rev Cancer* **8**(6), 473 (2008). URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2394>.
- [203] B. A. Chabner and T. G. Roberts. *Timeline : Chemotherapy and the war on cancer*. *Nat Rev Cancer* **5**(1), 65 (2005). URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1529>.
- [204] C. Lengauer, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. *Genetic instabilities in human cancers*. *Nature* **396**(6712), 643 (1998). URL <http://dx.doi.org/10.1038/25292>.

- [205] H. Rajagopalan, M. A. Nowak, B. Vogelstein, and C. Lengauer. *The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer*. Nat Rev Cancer **3**(9), 695 (2003). URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1165>.
- [206] J.-P. Capp. *Nouveau regard sur le cancer* (2012).
- [207] C. Sonnenschein and A.-M. Soto. *The society of cells : cancer and control of cell proliferation*. (1999).
- [208] A. M. Soto and C. Sonnenschein. *Emergentism as a default : cancer as a problem of tissue organization*. J Biosci **30**(1), 103 (2005).
- [209] C. Sonnenschein and A. M. Soto. *Somatic mutation theory of carcinogenesis : why it should be dropped and replaced*. Mol Carcinog **29**(4), 205 (2000).
- [210] A. M. Soto and C. Sonnenschein. *The somatic mutation theory of cancer : growing problems with the paradigm ?* Bioessays **26**(10), 1097 (2004). URL <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20087>.
- [211] A. M. Soto and C. Sonnenschein. *Emergentism by default : A view from the bench*. Synthèse **151**, 361 (2006).
- [212] C. Sonnenschein and A. M. Soto. *Theories of carcinogenesis : an emerging perspective*. Semin Cancer Biol **18**(5), 372 (2008). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.012>.
- [213] D. L. Vaux. *In defense of the somatic mutation theory of cancer*. Bioessays **33**(5), 341 (2011). URL <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201100022>.
- [214] A. M. Soto and C. Sonnenschein. *The tissue organization field theory of cancer : a testable replacement for the somatic mutation theory*. Bioessays **33**(5), 332 (2011). URL <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201100025>.
- [215] C. Sonnenschein and A. M. Soto. *Response to "in defense of the somatic mutation theory of cancer"*. doi : 10.1002/bies.201100022. Bioessays **33**(9), 657 (2011). URL <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201100072>.
- [216] D. Satge. *On somatic mutations and tissue fields in cancer : additional observations challenge the smt*. Bioessays **33**(12), 922 (2011). URL <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201100117>.
- [217] S. G. Baker. *Toft better explains experimental results in cancer research than smt (comment on doi 10.1002/bies.201100025 and doi 10.1002/bies.201100022)*. Bioessays **33**(12), 919 (2011). URL <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201100124>.
- [218] S.-G. Baker. *Recognizing paradigm instability in theories of carcinogenesis*. British Journal of Medicine and Medical Research **4**(5), 1149 (2013).
- [219] S.-G. Baker. *Paradox-driven cancer research*. Disruptive Science and Technology **1**(3), 143 (2012).
- [220] A. M. Soto and C. Sonnenschein. *Paradoxes in carcinogenesis : There is light at the end of that tunnel!* Disrupt Sci Technol **1**(3), 154 (2013). URL <http://dx.doi.org/10.1089/dst.2013.0008>.

- [221] S. Rosenfeld. *Are the somatic mutation and tissue organization field theories of carcinogenesis incompatible?* *Cancer Inform* **12**, 221 (2013). URL <http://dx.doi.org/10.4137/CIN.S13013>.
- [222] C. Sonnenschein, A. M. Soto, A. Rangarajan, and P. Kulkarni. *Competing views on cancer*. *J Biosci* **39**(2), 281 (2014).
- [223] D. Smithers and M. Cantab. *Cancer : an attack on cytologism*. *The Lancet* **279**, 493 (1962).
- [224] J-W.Orr and A-T.Spencer. *Transplantation studies of the role of the stroma in epidermal carcinogenesis, Tissue Interactions in Carcinogenesis* (Academic Press, 1972).
- [225] W. W. Barclay, R. D. Woodruff, M. C. Hall, and S. D. Cramer. *A system for studying epithelial-stromal interactions reveals distinct inductive abilities of stromal cells from benign prostatic hyperplasia and prostate cancer*. *Endocrinology* **146**(1), 13 (2005). URL <http://dx.doi.org/10.1210/en.2004-1123>.
- [226] S. M. McDaniel, K. K. Rumer, S. L. Biroc, R. P. Metz, M. Singh, W. Porter, and P. Schedin. *Remodeling of the mammary microenvironment after lactation promotes breast tumor cell metastasis*. *Am J Pathol* **168**(2), 608 (2006). URL <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2006.050677>.
- [227] M. V. Maffini, A. M. Soto, J. M. Calabro, A. A. Ucci, and C. Sonnenschein. *The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis*. *J Cell Sci* **117**(Pt 8), 1495 (2004). URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.01000>.
- [228] M. H. Barcellos-Hoff and S. A. Ravani. *Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells*. *Cancer Res* **60**(5), 1254 (2000).
- [229] P. J. Stephens, C. D. Greenman, B. Fu, F. Yang, G. R. Bignell, L. J. Mudie, E. D. Pleasance, K. W. Lau, D. Beare, L. A. Stebbings, S. McLaren, M.-L. Lin, D. J. McBride, I. Varela, S. Nik-Zainal, C. Leroy, M. Jia, A. Menzies, A. P. Butler, J. W. Teague, M. A. Quail, J. Burton, H. Swerdlow, N. P. Carter, L. A. Morsberger, C. Iacobuzio-Donahue, G. A. Follows, A. R. Green, A. M. Flanagan, M. R. Stratton, P. A. Futreal, and P. J. Campbell. *Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development*. *Cell* **144**(1), 27 (2011). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.055>.
- [230] C. A. Hudis. *Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice*. *N Engl J Med* **357**(1), 39 (2007). URL <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra043186>.
- [231] J-J.Kupiec. *Ni Dieu ni gènes : pour une autre théorie de l'hérédité* (2000).
- [232] I.Lakatos. *Falsification and the methodology of scientific research programmes*. (Cambridge University Press., 1970).
- [233] T.Kuhn. *The Structure of Scientific Revolutions* (1962).
- [234] J.-A. Marcum. *Cancer : complexity, causation, and systems biology*. *Matière Première* **1**, 171 (2010).

-
- [235] C. M. Nelson and M. J. Bissell. *Modeling dynamic reciprocity : engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation*. *Semin Cancer Biol* **15**(5), 342 (2005). URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.001>.
- [236] S. D. Mitchell. *Integrative pluralism*. *Biology and Philosophy* **17**, 55 (2002).
- [237] S. D. Mitchell. *Why integrative pluralism ?* *E :CO* **6**, 81 (2004).
- [238] J. A. Coffman. *On reductionism, organicism, somatic mutations and cancer*. *Bioessays* **27**(4), 459; author reply 460 (2005). URL <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20216>.



Acquisition des images en microscopie

Matériel

L'acquisition des images s'est faite à l'aide d'un microscope inversé Zeiss Axiovision Z.1, équipé d'une source de lumière HxP 120. Ce type de lampe, basé sur des halogénures métalliques, permet d'exciter des fluorophores sur une bande assez large (environ 40nm). Pour visualiser la fluorescence verte (Azami Green), nous avons utilisé la bande Alexa488, excitée autour de 499nm et émettant autour de 519nm. Pour le Kasubira Orange, la longueur d'onde d'excitation utilisée est celle du Texas Red (589nm, émission autour de 615nm). Enfin, les images en lumière blanche sont faites en transmission (*bright-field*). Le microscope est également muni d'une enceinte d'incubation, avec régulation de la température (37 °) et du CO₂ (5%). Le déplacement sur la lamelle est assuré par un système de platine motorisée, permettant d'enregistrer les positions où les données doivent être acquises en *time-lapse* (acquisition de données automatique à des intervalles de temps fixés par l'utilisateur). Les images sont captées par une caméra Hamamatsu EM-CCD.

Acquisition

Les cellules sont observées directement dans une chambre de culture (Lab-Tek Chambered 1.0 Borosilicate Coverglass System, 1 chamber). En se déplaçant sur la lamelle en lumière naturelle (transmission), on choisit les positions à imager en échantillonnant de manière la plus homogène possible dans l'espace de croissance des cellules. Chaque champ couvre une surface de 395×395μm. Les données sont ensuite acquises, éventuellement en *time-lapse*, avec les trois canaux. La figure A.1 donne, en exemple, l'ensemble des données enregistrées sur une position, pendant 24h d'acquisition, avec une image toutes les 2h.

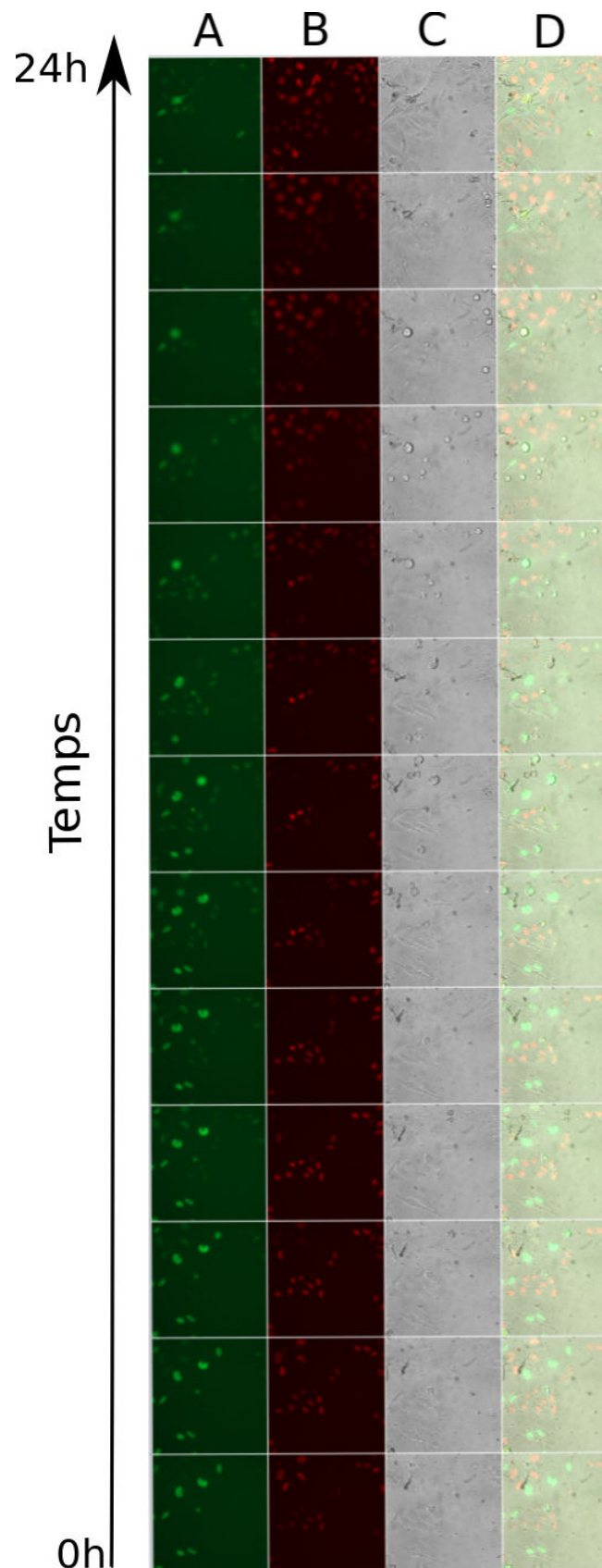


FIGURE A.1: Exemple de données acquises sur une position, pendant 24h avec une image toutes les 2h. Colonne A : fluorescence verte. Colonne B : fluorescence rouge. Colonne C : lumière blanche. Colonne D : superposition.

Les données sont ensuite exportées en TIFF pour être traitées avec Matlab et ImageJ, comme décrit dans l'Annexe B.

B

Traitement des images

Principe

Comme nous l'avons présenté dans l'annexe A, nous obtenons, pour chaque champ traité, trois images, correspondant aux trois canaux utilisés (rouge, vert et *bright-field*). Le but est de calculer, dans chaque champ, la proportion de cellules en phase G_0 , G_1 , S, G_2 et M. Nous avons développé une méthode semi-automatique, permettant de réaliser cette opération pour tous les champs considérés sur une lame donnée. Le principe est classique en traitement d'images : il passe tout d'abord par la création d'un masque de l'image, permettant d'enregistrer les positions des cellules. Puis ce masque est projeté sur les données de fluorescence, et un seuillage de l'intensité de fluorescence permet de trancher quant à la phase du cycle à laquelle elles appartiennent. Ce travail est réalisé sous Matlab (R2012A) et ImageJ (1.46a). Nous détaillons ci-dessous un exemple de la démarche mise au point.

Méthode

Soit le champ présenté sur la figure B.1. La superposition des trois canaux permet, à l'œil, de repérer certaines phases du cycle. Les trois canaux constituant cette image sont présentés sur la figure B.2.

Ces données sont donc acquises pour une quarantaine de champs à chaque expérience. Il s'agit de les traiter de manière à en extraire les données recherchées sur la dynamique du cycle. La première étape du traitement est la superposition des canaux de fluorescence et la binarisation (seuillage des niveaux de gris) de l'image. La figure B.3 illustre ces étapes. Une fois l'image *vert+rouge* créée *via* Matlab, on utilise ImageJ pour appliquer un filtre passe-bande permettant d'éliminer le bruit. Puis, cette nouvelle image est binarisée, en seuillant les valeurs en niveau de gris. Cette étape permet de repérer

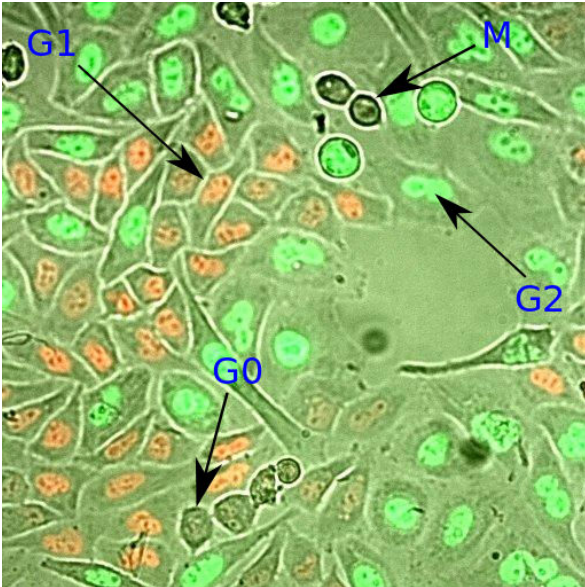


FIGURE B.1: Imagerie de cellules HeLa-FUCCI en microscopie de fluorescence. La superposition des trois canaux (rouge, vert, et *bright-field*) permet de repérer les phases du cycle.

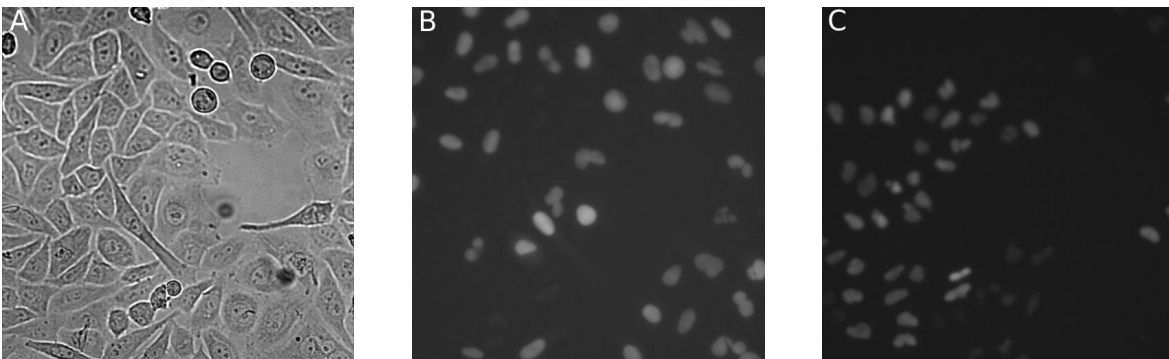


FIGURE B.2: Canaux constitutifs de l'image présentée sur la figure B.1. A=*bright-field*, B=vert (GFP), C=rouge (Texas-Red)

toutes les cellules fluorescentes.

Il s'agit ensuite de réaliser, en utilisant Matlab, un masque de l'image binarisée. La figure B.4 présente le masque finalement obtenu à partir des images initiales. Chaque cellule est repérée par un numéro ; sur la figure, ceux-ci sont codés par des couleurs.

Ce masque permet ensuite, par projection sur les images de microscopie, d'acquérir les valeurs de fluorescence (rouge et verte) pour chaque cellule. Un seuil est fixé au préalable pour chaque canal, sur la base de la présence ou non de fluorescence visible en rouge et en vert. La donnée de fluorescence recueillie ainsi pour chaque cellule permet alors de les classer en S (rouge et vert), G_1 (rouge) et G_2 (vert). Pour les cellules non-fluorescentes (M et G_0), le comptage est fait manuellement. La morphologie des cellules en mitose permet de les repérer facilement. Toutes ces données permettent alors de calculer, sur un ensemble de champs, la proportion de cellules dans chaque phase du cycle.

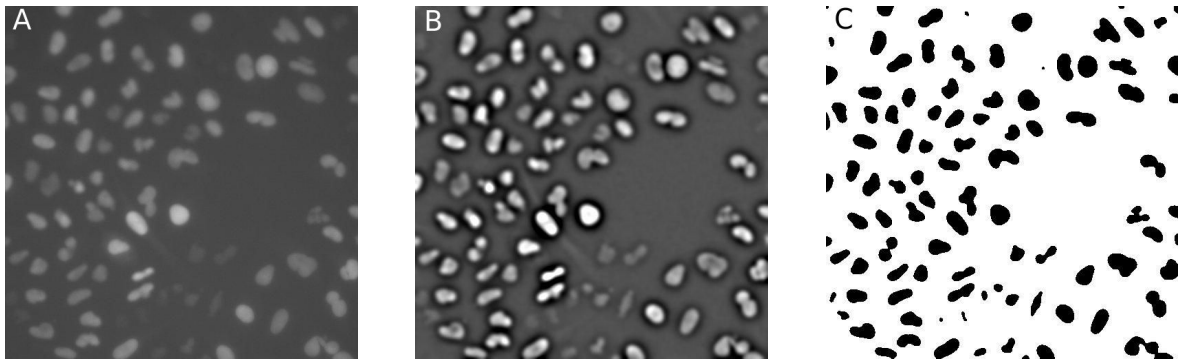


FIGURE B.3: Binarisation de l'image. A : les canaux de fluorescence sont superposés. B : on applique un filtre passe-bande, et C : on seuille l'image

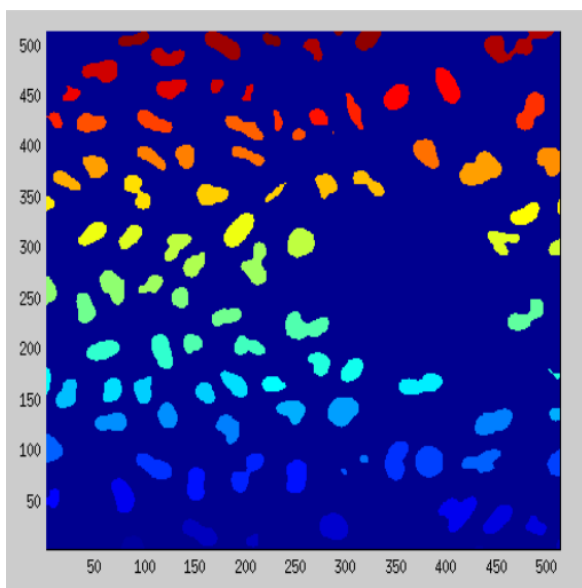
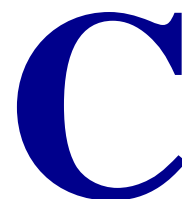


FIGURE B.4: Masque de l'image initiale, réalisé avec Matlab à partir de l'image binarisée. A chaque cellule est attribué un numéro.



Protocole d'immunomarquage de HiF-1 α

Principe

Il s'agit d'un immunomarquage indirect, utilisant un anticorps (Ac) primaire anti-HiF-1 α (Abcam, Réf : ab16066), et un anti-corps secondaire couplé à la peroxydase (GAM-PO, Jackson, Réf : 115-036-062/0817). Ce dernier est révélé par réaction sur un kit de révélation (Sigma-Aldrich) contenant du DAB et du H₂O₂. Le produit de la réaction colore la préparation en brun aux endroits contenant du HiF-1 α .

Protocole

1)Fixation : La fixation est faite dans le paraformaldéhyde pendant 10 min à température ambiante (room temperature, RT). Les lames sont ensuite rincées au PBS 3 \times 5 min.

2)Prétraitements : Les cellules sont mises au contact d'une solution de Triton à 0.3% dans du PBS pendant 30min RT, puis 60min RT dans du sérum de chèvre à 1%.

3)Incubation premier Ac : Le premier anti-corps (anti-HiF-1 α) est dilué au vingtième dans du PBS (0.3% Triton, 1% BSA), et laissé une nuit sur la lame, à 4 ° C. Celle-ci est ensuite rincée 5 \times 5 min au PBS.

4)Blocage de la peroxydase endogène : Une solution de MeOH/H₂O₂ à 0.3% dans du PBS (30min RT) permet de neutraliser la peroxydase endogène. La lame est ensuite rincée 2 \times 5 min RT dans du PBS, et 3 \times 5min dans du PBS + 0.1% T20.

5) Incubation deuxième Ac : Le deuxième Ac (GAM-PO) est dilué au trentième dans de l'eau physiologique (+0.1% T20), et laissé 30min RT en chambre humide au contact des cellules. Les cellules sont ensuite rincées au PBS (+0.1% T20) pendant 3×5min, et au PBS pendant 2×5min.

6) Révélation peroxydase : Elle est réalisée en utilisant le kit de révélation Sigma-Aldrich, 10min à l'obscurité. La lame est rincée à l'eau distillé 5×5min, avant d'être montée dans du XAM mounting medium.

D

Article scientifique : Bedessem B. and
Ruphy S., *SMT or TOFT? How the two
main theories of carcinogenesis were
made (artificially) incompatible*, Acta
Biotheoretica, 2015

Cet article s'inscrit dans le cadre d'un master 2 de philosophie réalisé à l'UPMF en parallèle de cette thèse. Ce master 2 a donné lieu à un travail de recherche mené en collaboration avec le laboratoire Philosophie, Pratiques et Langages de l'UPMF (Grenoble). L'article qui suit a été publié suite à ce travail de recherche.

Abstract

The building of a global model of carcinogenesis is one of modern biology's greatest challenges. The traditional Somatic Mutation Theory (SMT) is now supplemented by a new approach, called the Tissue Organization Field Theory (TOFT). According to TOFT, the original source of cancer is loss of tissue organization rather than genetic mutations. In this paper, we study the argumentative strategy used by the advocates of TOFT to impose their view. In particular, we criticize their claim of incompatibility used to justify the necessity to definitively reject SMT. First, we note that since it is difficult to build a non-ambiguous experimental demonstration of the superiority of TOFT, its partisans add epistemological and metaphysical arguments to the debate. This argumentative strategy allows them to defend the necessity of a paradigm shift, with TOFT superseding SMT. To do so, they introduce a notion of incompatibility,

which they actually use as the Kuhnian notion of incommensurability. To justify this so-called incompatibility between the two theories of cancer, they move the debate to a metaphysical ground by assimilating the controversy to a fundamental opposition between reductionism and organicism. We show here that this argumentative strategy is specious, because it does not demonstrate clearly that TOFT is an organicist theory. Since it shares with SMT its vocabulary, its ontology and its methodology, it appears that a claim of incompatibility based on this metaphysical plan is not fully justified in the present state of the debate. We conclude that it is more cogent to argue that the two theories are compatible, both biologically and metaphysically. We propose to consider that TOFT and SMT describe two distinct and compatible causal pathways to carcinogenesis. This view is coherent with the existence of integrative approaches, and suggests that they have a higher epistemic value than the two theories taken separately.

Introduction

The basis of the Somatic Mutation Theory (SMT) is well known, and summarized in Hanahan and Weinberg's famous review [200]. Cancer is described as a disease caused by genetic mutations, which can be due to inherited predisposition, or to the genotoxic action of carcinogens. Recently, it was also shown that spontaneous mutations occurring during stem cells division can cause carcinogenesis, at least in some tissues [201]. This approach is based on various empirical evidence, and led to therapeutic success [202, 203]. However, voices are rising to point out that SMT does not accurately describe the complex phenomenon of carcinogenesis. First, cancer cells often exhibit large scale genetic perturbations, with a high number of local mutations and chromosomal anomalies [204, 205]. This is contradictory with the classical version of SMT, which considers that tumorigenesis is due to punctual genetic mutations. These observations have led some authors to develop an alternative view of cancer, which have become quite influential in the last ten years [206]. The Tissue Organization Field Theory (TOFT) was popularized by Soto and Sonnenschein in 1999 in their book *The society of cells* [207]. During a first phase, from 2000 to 2010, the advocates of TOFT published a series of articles to present and defend their description of cancer [208–212]. During this period, TOFT was defended mainly by Soto and Sonnenschein. Their central idea is that the original cause of cancer is not genetic mutations, but disruption of tissue cohesion. This disorganization can be due to the chemical alteration of the extra-cellular matrix by carcinogens. In this perspective, the default state of the cell is not *quiescence*, but *proliferation*. As a consequence, the control of cell division vanishes when the surrounded tissues loose their structure. Soto and Sonnenschein describe the differences between the two theories as follows : for SMT, cancer comes from a unique somatic cell which accumulated mutations of genes controlling cell cycle, and quiescence is the default state of the cell ; for TOFT, the first event of carcinogenesis is a loss of tissue organization, and not mutations in a single cell. Through this scientific description, the authors build a first biological opposition between the two approaches : *tissue* is opposed to *genes* and *proliferation* to *quiescence*.

This theory remained relatively marginal during its first ten years. However, it has generated a more intense debate over the past few years, as shown by the recent work of J-P.Capp [206]. This author studies the history of the developments of SMT and TOFT, and proposes an *ontophylogenetic* theory which establishes links between TOFT and the random expression of the genes in a context of tissue disruption. Notably, the year 2011 was marked by an interesting exchange of ideas in the review *Bioessays* [213–217]. From 2011 up to now, the actors of the controversy have been trying to find a way out of the conflict [218–222]. Two radically different orientations have been chosen. A first option favors an integrative approach, which aims at building a comprehensive model of carcinogenesis taking into account all the scales involved in the process of carcinogenesis, from the gene to the tissue [221]. The second option, strongly defended by the advocates of TOFT, postulates that the two theories are incompatible, and that all attempts at conciliation would be an obstacle to scientific progress [219]. To defend this view, they use three levels of argumentation : empirical, epistemological, and metaphysical. In this article, we first analyze how these three levels are articulated. The lack of non ambiguous experimental proofs makes the first level of argumentation insufficient to irrevocably choose one of the two theories. As a consequence, we interpret the use of epistemological and metaphysical arguments as an argumentative strategy of the partisans of TOFT to be heard. More precisely, we show how they build an irreconcilable opposition between the two theories of cancer, leading to the necessity of an exclusive choice of one of them. First, they present SMT as a *regressive* program of research, to defend the need for a *paradigm shift*. We show that this view is based on an ambiguous use of the term *paradigm*, and is justified by metaphysical considerations defending a fundamental *incompatibility* between the two theories. Indeed, the partisans of TOFT assimilate the conflict between the two cancer theories to a fundamental debate between *reductionism* and *holism*. This move allows Soto and Sonnenschein to claim that *explanations of the process of carcinogenesis by these two theories belong to distinct levels of biological complexity and, therefore, are incompatible, as are their philosophical stances (reductionism versus organicism)* [212]. By linking this idea of incompatibility with the need for a paradigm shift, they purport to establish the necessity of definitively giving up SMT and adopting TOFT. Since such a claim of incompatibility has important consequences on our understanding of carcinogenesis, it is crucial to investigate whether it is justified. We show in this paper that the argumentative strategy based on the projection of the controversy on a metaphysical ground is specious and incoherent. It eliminates useful attempts at conciliation with no valid reason. By contrast, the concrete approach aiming at integrating all the scales involved in carcinogenesis seems to be more epistemologically accurate.

SMT or TOFT ? The role of empirical evidence

The articles published by the advocates of TOFT report various experimental evidence. Some of it shows, including through recombination experiments, that a stroma coming from a cancerous tissue is able to generate tumors on a healthy one, or to increase the metastatic potential of tumors cells [223–226]. Other studies investigate the

influence of known carcinogens on stroma organization [227, 228]. They show that the structure of the whole tissue is sensitive to chemical molecules known for producing cancers. For the partisans of TOFT, this series of evidence is sufficient to irrevocably demonstrate the superiority of their approach. However, the adverse faction has also its say. In 2011, Vaux published an article entitled *In Defense of The Somatic Mutation Theory* [213]. In this work, he gives three lines of evidence to support SMT. First, he raises cases of tumors which are clearly known for being due to genetic mutations, such some leukemia and lymphoma. Second, he notices that modifications of SMT were made to include new observations, notably the massive chromosomal rearrangements observed in many tumors [229]. These massive rearrangements are not well described by the classical version of SMT, which mainly considers the role of punctual mutations. Finally, the success of targeted therapies in some types of cancers is used as an argument to defend the validity of SMT. Based on the central assumption of SMT (cancer is due to genetic mutations), this therapeutic strategy tries to modify the activity of the proteins suspected to cause tumorigenesis. Consequently, the success of targeted therapy in some cancers can be considered as a relevant element to prove the validity of the genetic approach of cancer. Besides, as noticed by Soto and Sonnenschein themselves [214], objections were made to conclusions drawn from experiments aiming at confirming TOFT. Notably, the experiments of stroma modifications of Maffini et al. [227] and Barcellos-Hoff/Ravani [228] suggest the possibility of mutations affecting the cells during the protocol. Therefore, a non ambiguous demonstration of the superiority of TOFT is not easy to deliver with the current experimental methods. More importantly, it appears that both theories are supported by strong experimental arguments. For instance, the clear success of some targeted therapies is a important argument to defend SMT : the use of Trastuzumab against breast cancer presenting an overexpression of HER2 receptor is a good example [230]. Reciprocally, the experiments of Barcellos-Hoff and Ravani [228] bring strong arguments in favor of the TOFT approach. By modifying the molecular composition of the mammary gland stroma of mice, they show that it gained a tumorigenic potential : when recombined with non-tumorigenic epithelial cells, it induces carcinogenesis. Inversely, many observations cannot be accounted for by SMT or TOFT, taken separately.

S.Rosenfeld clearly summarizes this situation in a recent paper [221] : *Arguments in favor of both TOFT and SMT are numerous and strong (...). At the same time, a large grey zone of empirical facts and clinical cases exists which poses questions that are difficult to resolve from either of these viewpoints.* As a consequence, it is difficult to find a set of empirical evidence allowing to choose one of the two theories. It is therefore problematic for the advocates of TOFT to impose their new view on empirical grounds. We suggest that this is the reason why the articles defending TOFT often mix three levels of arguments [211, 214, 218] : empirical, epistemological, metaphysical, the two last levels being used to compensate the deficiency of the empirical demonstration. Let us see now how this is done.

Do we need a *paradigm shift* ?

As in other instances in science, the *zeitgeist* has played a significant role in accepting untested claims of the SMT without major objections [214]. Soto and Sonnenschein explain the domination of SMT by the popularity of the genetic approaches for describing biological phenomena. That is why the lack of evidence in favor of SMT was not an obstacle to its adoption of the Somatic Mutation Theory. The criticism of the domination of the *genetic dogma* has been widespread since J-J. Kupiec's work [231]. It is used by Soto and Sonnenschein to describe SMT as a *regressive program of research* [214]. The idea is that to survive, SMT has to add *ad hoc* hypotheses to explain carcinogenesis. Indeed, the existence of facts that the classical versions of SMT cannot describe, such as the massive chromosomal rearrangements observed in tumors, led the defenders of SMT to make new hypothesis. The idea of *early genetic instabilities* is one of these attempts [204, 205]. Soto and Sonnenschein describe these modifications of SMT as a proof of its epistemic inferiority. But this argument is specious since TOFT itself had to evolve to take into account some empirical observations. As noted by Capp (2012) [206], the original version of TOFT gives a negligible role to genetic mutations during cancer progression. Its ontophylogenetic theory, which can be seen as a modified TOFT approach, considers that punctual mutations or chromosomal translocations are important to describe carcinogenesis. However, Soto and Sonnenschein argue that SMT is a *regressive program of research* [214], in Lakatos' sense of the notion [232] : a regressive program of research is characterized by a continual need for locally adjusting the theory to experimental evidence. The advocates of TOFT add to this idea the notion of *paradigm shift* [214, 218], which allows them to affirm the need to abandon SMT in favor of TOFT. The structure of this argument is interesting. To define the word *paradigm*, Soto and Sonnenschein use an expression taken from the famous book by the historian and philosopher Thomas Kuhn, *The Structure of Scientific Revolution (SSR)* [233] : a paradigm is a *universally recognized scientific achievement(s) that for a time provide model problems and solutions to a community of practitioners* [214]. However, the concept of paradigm is multiform. Different meanings can be found in Kuhn's work (in the *SRS* and in his subsequent articles), and the definition given by Soto and Sonnenschein can be considered as rather *moderate*. By using this concept, Soto and Sonnenschein can then introduce the more radical notion of *paradigm shift* [214, 218]. According to Kuhn, scientific revolutions which occurred during the history of science can be described as paradigm shifts. With this notion of paradigm, the advocates of TOFT present their theory as a new approach which has to eliminate SMT. SMT is thus considered as an old paradigm we have to give up in order to promote scientific progress [218]. But this use of the notion does not fit with the explicit definition they give. On a moderate reading of the notion of paradigm, the necessity of giving up SMT does not follow. The argument developed by the partisans of TOFT seems in fact to appeal implicitly to the Kuhnian notion of incommensurability. When two paradigms are incommensurable, it is necessary to *adhere* to one of them, and to definitively abandon the other. The word *paradigm* then refers to a global representation of the world. In that case, indeed, when adopting a paradigm, one has to reject the others. In spite of the fact that the authors do not use explicitly the notion of incommensurability, the

necessity of an exclusive choice is clearly expressed in Soto and Sonnenschein's articles : *it is left to the reader to decide whether one approach to understanding cancer appears more promising than the other* [222]. Even if Soto and Sonnenschein do not speak here of a quasi religious *conversion* that characterizes the shift to a new paradigm in the radical sense of the notion, but only of rational *decision*, they nevertheless appeal to this radical meaning when defending the necessity to supersede SMT by TOFT. Indeed, they promote the adhesion to a *general system of explanation*, which is explicitly assimilated to a metaphysical position : the reader has to choose between *reductionism* and *holism* [212, 222]. By using this metaphysical opposition, they can build the idea of a fundamental *incompatibility* between TOFT and SMT [212]. It is now crucial to analyze the arguments raised to defend this incompatibility.

Are the TOFT and SMT incompatible ?

In one of their recent papers, Soto and Sonnenschein contend that : *according to the philosopher D. C. Dennett, there is no such thing as philosophy-free science ; there is only science whose philosophical baggage is taken on board without examination. Therefore, ignoring the philosophical underpinnings of the postulates adopted by researchers when designing experiments is bound to hinder the interpretation of the data collected. For this reason we address the difference between the cell-based and the tissue-based stances* [214]. Soto and Sonnenschein aim at exhibiting the philosophical, more precisely the metaphysical, choices influencing scientific theorizing. What are, then, the *metaphysical basis* of TOFT and SMT? The partisans of TOFT claim that SMT is *reductionist* [211]. More generally, they consider *molecular biology* as the typical reductionist approach [206]. The concept of *reductionism* is traditionally opposed to *holism* or *organicism* [234]. A reductionist approach aims at *analyzing* the complex systems by looking at their fundamental components. On the opposite, an holistic approach considers that the natural phenomena can be explained only by studying them as *a whole*. As a consequence, it is epistemologically useless to consider the smallest scales to study a given object. In biology, *holism* translates into *organicism*, defined as follows by the philosopher J-A. Marcum : *Organicism (...) is an idea utilizing organic unity or a whole to explain biological processes at the level of higher-order entities and their properties rather than simply invoking their elemental composition* [234]. This definition is interesting since Marcum presents TOFT as an organicist theory. As a consequence, it is a way to investigate the coherence of this claim. Why do the advocates of TOFT use these concepts? For Soto and Sonnenschein, reductionism, applied to biology, supposes that the cell is the unit of the organism, and that all the observations made at the tissue level should find an explanation at the cell level. As anti-reductionists, the partisans of TOFT consider themselves as *organicist* [211]. When combining the definition of organicism given previously and the argument of Soto and Sonnenschein, it follows that the *biological process* to explain is cancer, the *high-order entities* are the tissues, and the *elemental composition* are the cells. Is this assimilation of TOFT to a form of *organicism* cogent? In order to answer this question, it is necessary to carefully

characterize the concept of *reductionism*. J-A. Marcum defines three types of reductionism [234]. *Theoretical reductionism* aims at reducing the terms of a high-level theory to terms belonging to low-level theories. For instance, the biological processes can be described by using concepts borrowed from physics and chemistry. *Ontological reductionism* deals with the description of the elementary components of natural objects or phenomena. Complex phenomena are analyzed by assuming that they are composed of simple elements whose properties explain the general behavior of the system. Applied to biology, ontological reductionism would mean that the observed properties at the organism scale can be explained by the molecular composition of the cells. Finally, *methodological reductionism* is related to the scientific techniques used to decompose the high-order entities into their low-order elements. In light of these definitions, let us see if TOFT can be considered as an anti-reductionist approach. One can first notice that Soto and Sonnenschein's works rigorously use the same vocabulary as the one used in classical molecular biology. TOFT talks about *cells, stroma, genes*. It does not consider new terms that we could not be reduced to words referring to elementary components. In other words, the semantic organization of the biological world is exactly the same. Various examples can be found in the articles published by the advocates of TOFT to illustrate this point. The response to the article of Vaux (2011) [213] published by Baker (2011) [217] explicitly uses a typical reductionist vocabulary, such as *intercellular signals* or *oncogenes*. Thus, as regards *theoretical reductionism*, TOFT cannot be said to be anti-reductionist. Second, the ontology of TOFT is not distinct from the ontology of SMT. The components of the considered biological objects are the same. TOFT gives more importance to tissues, but the tissues are considered as an ensemble of cells, and the cancer remains a cellular disease. An anti-reductionist view would consider the tissue as a whole, without taking into account its cellular/molecular composition. Thus, it does not make sense to argue that TOFT is opposed to reductionism in an ontological reading of the notion. Finally, methodological reductionism is also adopted by the partisans of TOFT. Indeed, they consider the modifications of the *molecular composition* of the stroma when it is exposed to carcinogens. More precisely, the identification of the types of molecules affected is taken into account by Soto and Sonnenschein to build their theory. For instance, they notice in their 2011 article of [214] : *Barcellos-Hoff and Ravani irradiated the mammary gland stroma of mice to affect their extracellular matrix composition, cytokine production and receptors involved in cell-to-cell interactions* [228]. The experimental protocols developed by the partisans of TOFT do consider cells and molecules, hence their methodologically reductionist stance. This rapid analysis shows that if we consider the classical conception of reductionism given by Marcum (2010) [234], assimilating TOFT to an anti-reductionist approach is not legitimate. If we now follow the definition of reductionism given by the partisans of TOFT, we can also conclude that their argumentation is contradictory. As we already said, they judge as *reductionist* all approaches using the cell as the fundamental unit of the organism [214]. But according to TOFT, cancer is still located in individual cells. In particular, one of the theoretical basis of TOFT deals with the default state of the cell (proliferative or quiescent). This means that the advocates of TOFT *need to* consider that the cell is the fundamental unit of the organism. The reason for this is simple : in TOFT as in SMT, cancer is a cellular disease. More generally,

according to TOFT, modifications of the molecular composition of the stroma cause cancer. If we return to a more classical meaning of the concept, this is clearly a reductionist stance. SMT looks into the cell, by considering the structure of the DNA, and TOFT looks outside the cell, by considering the molecular relationships between *each cells* and the stroma. We also have to notice that the partisans of TOFT often accept that genetic mutations have a role in carcinogenesis; they just refuse to consider that mutations are the initiators of the disease [206]. Thus, it is not obvious that TOFT is an organicist theory. By considering current conceptions of this notion, it appears that the assimilation of TOFT to organicism is not sufficiently justified. It is not relevant in the present state of the debate, and therefore it cannot be used to demonstrate the incompatibility between the two theories.

If SMT and TOFT are metaphysically similar, how can we characterize the different representations of cancer they propose? In particular, if they are metaphysically compatible, are TOFT and SMT biologically incompatible? Our suggestion is that, from a biological perspective, the two theories have to be thought as proposing two distinct, and compatible, *causal pathways* which can initiate and promote carcinogenesis. Both mechanisms are experimentally and clinically relevant [221]. When reasoning in term of causal pathways, it is possible to make a case for the compatibility of the two theories, by arguing that both the genes and the stroma can influence carcinogenesis. The actual existence of approaches which conciliate TOFT and SMT is a strong biological argument in support of this view. Indeed, J-A. Marcum notes that the two theories can converge in the frame of *system biology* : *system biology avoids locating causation within a single, hierarchical level, so that the flow of causation is in one direction only -whether bottom-up or top-down. Rather, that approach advocates a flow of causation that is bidirectionally or reciprocal in nature* [234]. The notion of hierarchical levels is not easy to use in our case. Considering TOFT as a theory belonging to a higher organizational level than SMT poses the same types of problems we already discussed about the supposed organicism of TOFT. As a consequence, it is not so obvious that TOFT and SMT belongs to distinct organizational levels. Thus, rather than considering a *cellular* and a *tissular* scale, we prefer to use the notions of *interior* and *exterior* of the cell. The notion of bidirectional causation is then still interesting, since it considers that carcinogenesis can be influenced by molecular events taking place *in* the cell, or *outside* the cell. In the frame of system biology, TOFT and SMT are thus not considered as two irreconcilable approaches. The dynamic reciprocity theory (DRT) of Mina Bisell and coworkers explains how the organization of the stroma has an influence on gene expression and control cell proliferation [235]. The existence of adhesion proteins joining the intracellular environment to the stroma makes possible the building of a bridge between the genetic and tissular approaches. It is then possible to consider causal relationships between the interior and the exterior of the cell. Insofar as TOFT and SMT describe two compatible causal pathways, they can be integrated in a single approach to explain carcinogenesis. And this integration is of a *higher epistemological value* than SMT or TOFT taken separately.

Discussion

The controversy between the two main theories of carcinogenesis (SMT and TOFT) is interesting because it uses three levels of argumentation : experimental, epistemological and metaphysical. We have seen that the experimental data are not sufficient to clearly favor one of the two theories. Each approach can explain some biological facts ; but numerous observations are difficult to resolve from either of these viewpoints. To be competitive, the partisans of TOFT build an argumentative strategy based on a purported *incompatibility* of their theory with SMT. They appeal to this purported incompatibility to justify the need to reject one of the two theories altogether, in the same way than in Kuhn's scheme, the incommensurability of two theories justifies abandoning one in favor of the other. Naturally, the reader is strongly invited to keep TOFT and abandon SMT.

To justify this key incompatibility-argument, the partisans of TOFT assimilate the conflict between the two theories to a metaphysical opposition between *holism* and *reductionism*. We showed that this argument is specious, since, it is not clear that TOFT is an organicist theory. It shares its semantics, its ontology and its methodology with SMT. This remark does not mean that TOFT is strictly reductionist, in all the possible meanings of this concept. It just shows that the assertion that *TOFT is an organicist theory* is not coherent with the conception of reductionism and organicism it is based on. This idea is not only applicable to Soto and Sonnenschein's work, since other authors, as Marcum [234], consider TOFT as an organicist theory without coherent and strong arguments. Yet, as we shown, the assimilation of TOFT to a strict anti-reductionist approach can lead to a non-justified claim that the two theories are not compatible. Thus, if the defenders of TOFT cannot justify more precisely why TOFT can be considered as an organicist theory, it seems more judicious to fully abandon the frame of the reductionism/organicism opposition.

We also claimed that from a biological point of view, the best refutation of Soto and Sonnenschein's view is the actual existence of approaches which conciliate both theories. We finally proposed that SMT and TOFT should be considered as two distinct, and compatible, causal pathways. We insist on the idea of distinct causal pathways that have to be *integrated* in order to build a more accurate and satisfying description of carcinogenesis. This view is closed to the ideas exposed by Sandra D. Mitchell about biological complexity [236, 237]. The author defends the idea of an integration of the different causal pathways describing complex biological objects into a unified explanation. According to Mitchell, the idealized character of biological models make necessary the emergence of *partial* theories, considering only *one* causal pathway. Often, the compatibility of these theories stems from the possibility of a theoretical integration. We have seen that this integration can be achieved in the frame of system biology, which considers the multiple causal relationships linking the cell, the stroma, and the development of cancers. We can notice that such causal relationships make carcinogenesis a strongly non-linear phenomenon. As a consequence, the development of integrative approaches can depend on the ability to build global models of carcinogenesis. Progress in computational modeling in biology favors the development of these approaches. The existence of these new tools for investigating carcinogenesis is a strong argument against

the sterile postulate of incompatibility.

Finally, let us recall that this claim for an integration of TOFT and SMT is not new [221, 234, 238]. However, our original contribution is the theoretical justification showing the lack of relevance of the idea of a fundamental incompatibility between the two theories. Whereas the previous discussions about the possibility of an integration of TOFT and SMT do not question the relevance of the reductionism/organicism opposition in the field of carcinogenesis, we suggest that in the present state of the debate, this frame should be abandoned.