

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**ÉTUDE DE L'IMPLICATION DE LA RÉGULATION HYPOXIQUE DE LA
FURINE DANS LA PROGRESSION TUMORALE**

Par

Sébastien Grandmont

Département de pédiatrie, Service d'immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en
vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc)
en immunologie

21 août 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-31396-1
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-31396-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES	VII
RÉSUMÉ	IX
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 LA FURINE, LE PROTOTYPE DE LA FAMILLE DES CONVERTASE DE PROPROTÉINES	1
<i>1.1.1 Les convertases de proprotéines</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2 Structure des PC.....</i>	<i>3</i>
<i>1.1.3 Localisation tissulaire et intracellulaire des convertases.....</i>	<i>6</i>
1.2 LA FURINE	8
<i>1.2.1 Maturation et localisation intracellulaire de la furine</i>	<i>8</i>
<i>1.2.2 Régulation de l'expression de la furine.....</i>	<i>11</i>
<i>1.2.3 Les inhibiteurs de la furine.....</i>	<i>12</i>
1.3 LE CANCER.....	15
<i>1.3.1 Progression tumorale.....</i>	<i>15</i>
<i>1.3.2 Le facteur de transcription HIF-1</i>	<i>21</i>
1.3.2.1 Structure du HIF-1.....	23
1.3.2.2 Régulation et activation du HIF-1.....	26
<i>1.3.3 Le HIF et la progression tumorale.....</i>	<i>31</i>
<i>1.3.4 Rôles physiologiques et pathologiques de la furine</i>	<i>33</i>
<i>1.3.5 La furine et la progression tumorale.....</i>	<i>35</i>
<i>1.3.8 Substrats de la furine impliqués dans la progression tumorale.....</i>	<i>35</i>
1.3.8.1 Les métalloprotéinases	35

1.4 OBJECTIFS ET PERTINENCE DE CETTE RECHERCHE	43
2.0 MATÉRIELS ET MÉTHODES	44
2.1 CULTURES CELLULAIRES ET TRANSFECTIONS	44
2.2 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN	45
2.3 ZYMOGRAPHIE	47
2.4 MODÈLE D'INDUCTION TUMORALE CHEZ LES SOURIS	48
2.5 CONSTRUCTION DES PLASMIDES	50
2.6 CONSTRUCTION PLASMIDIQUE PGL3-6HRE-TK-LUC	50
2.7 CONSTRUCTION DES PLASMIDES PCDNA3.1-3HRE-PDX ET PCDNA3.1-6HRE -PDX.....	52
2.8 ESSAIS LUCIFÉRISE.....	53
2.9 IMMUNOCYTOCHIMIE ET IMMUNOHISTOCHEMIE.....	53
2.10 ESSAIS D'INVASION	55
3.0 RÉSULTATS.....	56
3.1 EXPRESSION DE LA FURINE DANS LES ZONES HYPOXIQUES TUMORALES	56
3.1.1 <i>Détection de l'hypoxie in vitro et in vivo</i>	56
3.1.2 <i>Détection de la furine en immunofluorescence in vitro et in vivo</i>	58
3.2 CONSTRUCTION DES PLASMIDES ENCODANT L'INHIBITEUR DE LA FURINE (PDX), SOUS LE CONTRÔLE D'UN PROMOTEUR RÉGULÉ EN HYPOXIE	63
3.2.1 <i>Construction des amplificateurs 3 et 6HRE</i>	63
3.2.2 <i>Construction des plasmides 3 et 6HRE-PDX</i>	69
3.3 ÉTABLISSEMENT ET CARACTÉRISATION DES MODÈLES CELLULAIRES EXPRIMANT LE PDX.....	69
3.3.1 <i>Caractérisation des cellules exprimant de façon transitoires du PDX</i>	69
3.3.2 <i>Caractérisation des clones exprimant de façon stable le PDX</i>	73
3.3.3 <i>Caractérisation des populations « Pool » cellulaires, exprimant de façon stable le PDX</i>	77
3.3.4 <i>Impact de l'expression hypoxique du PDX sur l'invasion des cellules cancéreuses HT1080</i>	79
3.4 EXPÉRIENCE DE XÉNOGREFFES CHEZ DES SOURIS IMMUNODÉFICIENTES	82

<i>3.4.1 Caractérisation des niveaux de PDX présent à l'intérieur des tumeurs provenant des xénogreffes</i>	85
4.0 DISCUSSION	87
5.0 CONCLUSION	104
6.0 REMERCIEMENTS	106
7.0 BIBLIOGRAPHIE	108

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Représentation schématique des membres de la famille des convertases de proprotéines.
- Figure 2 :** Le mécanisme d'auto-activation de la furine.
- Figure 3 :** Représentation schématique du processus de progression tumorale.
- Figure 4 :** Gènes dont l'activité transcriptionnelle est augmentée par le HIF-1.
- Figure 5 :** Domaines protéiques du HIF-1 α et HIF-1 β .
- Figure 6 :** Régulation du HIF-1 α de façon dépendante de l'oxygène.
- Figure 7 :** Structure et modèle d'activation de la pro-MMP-2 par la MT1-MMP.
- Figure 8 :** Impacts proposés de la régulation hypoxique de la furine dans la progression tumorale.
- Figure 9 :** Détection de l'hypoxie chez les cellules HT1080 cultivées *in vitro*.
- Figure 10 :** Détection des zones hypoxiques tumorales.
- Figure 11 :** Localisation intracellulaire de la furine.
- Figure 12 :** Relocalisation de la furine en hypoxie.
- Figure 13 :** Localisation de la furine dans les zones hypoxiques tumorales.
- Figure 14 :** Analyse fonctionnelle des constructions HRE.
- Figure 15 :** Représentation schématique des vecteurs pGL3-3HRE-TK-Luc et pGL3-6HRE-TK-Luc.
- Figure 16 :** Représentation schématique des constructions plasmidiques 3 et 6HRE-PDX.
- Figure 17 :** Caractérisation de la production d' α 1-AT-PDX en hypoxie.
- Figure 18 :** Caractérisation des clones PDX.

Figure 19 : Caractérisation des populations cellulaires de HT1080 exprimant de façon stable le PDX.

Figure 20 : Effets phénotypiques associés à l'inhibition de la furine chez les HT1080.

Figure 21 : Expérience de progression tumorale *in vivo*.

Figure 22 : Variation de l'expression de PDX dans différentes sections de tumeurs.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification fonctionnelle de précurseurs clivés par la furine.

Tableau II : Efficacité et spécificité de l' α 1-antitrypsine Portland (α 1-PDX) in vitro.

Tableau III : Régulateurs positifs et négatifs du HIF-1 α .

LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES

α_1-AT :	α 1-antitrypsine
α_1-PDX :	α 1-antitrypsine Portland
ADN :	<u>a</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
ADR1 :	ADP ribosylation factor domain protein 1
ARNm :	<u>a</u> cide <u>r</u> ibo <u>n</u> ucléique <u>m</u> essenger
ATP :	<u>a</u> dénosine <u>t</u> ri- <u>p</u> hosphate
bHLH :	<u>b</u> asique <u>h</u> élice- <u>b</u> oucle- <u>h</u> élice
EDTA :	<u>é</u> thylène <u>d</u> iamine- <u>t</u> étra <u>a</u> cétique
FBS :	Sérum de veau fœtal
FIH-1 :	facteur inhibiteur du HIF-1
HAS:	<u>H</u> IF-1 <u>a</u> ncillary <u>s</u> equence
HBS:	<u>h</u> ypoxia- <u>b</u> inding <u>s</u> equence
HIF-1 :	facteur inductible en hypoxie
HRE :	élément de réponse à l'hypoxie
IGF:	<u>i</u> nsulin-like growth <u>f</u> actor
kDa:	kilo Dalton
MEC :	<u>m</u> atrice <u>e</u> xtra <u>c</u> ellulaire
MEM :	<u>m</u> inimal <u>e</u> ssentiel <u>m</u> edium
MMP :	métalloprotéinase de la matrice
MT1-MMP :	<u>m</u> embrane <u>t</u> ype <u>1</u> <u>m</u> atrix <u>m</u> etalloproteinase
NLS:	signal de localisation nucléaire

ODDD:	domaine de dégradation dépendant de l'oxygène
PACE4:	paired basic amino acid cleavage enzyme 4
PAS :	<u>Per</u> / <u>ARNT</u> / <u>Sim</u>
PC :	convertase de pro-protéines
pCMBS :	acide p-chloromercuribenzènesulfonique
PCR :	polymerase chain reaction
PBS :	saline tamponnée au phosphate
PDGF:	platelet-derived growth factor
PHD:	prolyl hydroxylase domain enzyme
PI8:	protéinase inhibitor 8
RER:	reticulum endoplasmique
ROS:	réactifs oxygénés
Scid:	severe combined immunodeficiency
SDS:	sodium dodécyl sulfate
Serpine:	serine proteinase inhibitor
Smad:	similar to mothers against decapentaplegic
SKI-1:	Subtilisine Kexine Isoenzyme 1
TAD :	domaines de transactivation
TGFβ1:	tumor growth factor β1
TGN:	trans-Golgi network
VEGF :	vascular endothelial growth factor
VHL:	suppresseur de tumeur Von Hippel-Lindau

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**ÉTUDE DE L'IMPLICATION DE LA RÉGULATION HYPOXIQUE DE LA
FURINE DANS LA PROGRESSION TUMORALE**

Par

Sébastien Grandmont

Département de pédiatrie, Service d'immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en
vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc)
en immunologie

RÉSUMÉ

Le cancer est une pathologie complexe causée par plusieurs facteurs génétiques et environnementaux. Aux Etats-Unis seulement, près de 1 400 000 cas de cancer seront diagnostiqués en 2006 et plus de 500 000 personnes en mourront. Encore aujourd'hui, plusieurs types de cancer sont incurables et la plupart des traitements existants ne sont malheureusement pas curatifs. Cette maladie est caractérisée par une croissance cellulaire incontrôlée ainsi qu'une dissémination des cellules anormales. La prolifération accrue des cellules cancéreuses mène à l'apparition de régions hypoxiques chez plusieurs tumeurs solides. Un grand nombre de molécules participent aux différents stades de la progression

tumorale et permettent à la tumeur de s'adapter à son microenvironnement. Plusieurs de ces dernières sont synthétisées sous forme de pro-peptides nécessitant un clivage enzymatique ciblé afin d'acquérir leur activité. Il a été démontré que la furine, le prototype de la famille des convertases de proprotéines, joue un rôle important dans la progression tumorale. La furine est surexprimée chez plusieurs types de tumeurs et elle est nécessaire à l'activation de substrats protéiques dont les rôles dans la croissance tumorale ainsi que dans la formation des métastases sont répertoriés. Dernièrement, l'étude des différents promoteurs de la furine a révélé qu'elle pouvait être induite en hypoxie, et ce, via le facteur de transcription HIF-1.

Notre étude avait pour but d'étudier l'implication de la régulation hypoxique de la furine dans le développement du cancer. Nous avons démontré, par immunohistochimie, la présence de régions hypoxiques dans les xénogreffes formées à partir de fibrosarcomes humains ainsi qu'une surexpression de la furine dans ces régions. Afin d'inhiber cette induction dans les régions hypoxiques tumorales, nous avons construit des vecteurs plasmidiques contenant un inhibiteur de la furine, soit l' α 1-AT-PDX, sous le contrôle d'un promoteur inductible en hypoxie. Ces vecteurs possèdent 3 ou 6 répétitions d'une séquence du gène de l'érythropoïétine contenant un site de reconnaissance pour le HIF-1. Nous avons démontré que ces vecteurs augmentent les niveaux de PDX chez les cellules HT1080 cultivées en hypoxie. De plus, nous avons établi que l'augmentation de PDX en hypoxie est principalement due à la présence de HIF-1 dans la cellule. Nous avons aussi observé une diminution de la maturation de la MT1-MMP ainsi que de l'IGF-1R β , deux substrats de la furine.

Dans le but de vérifier la possibilité qu'une inhibition de la furine induite en hypoxie puisse affecter la croissance tumorale, nous avons par la suite transfecté les cellules HT1080 afin d'obtenir une population de cellules exprimant de façon stable les plasmides 3HRE-PDX et 6HRE-PDX. Nous avons démontré que, suite à l'implantation de ces cellules chez des souris immunodéficientes, la croissance des tumeurs exprimant du PDX en hypoxie est diminuée de façon significative. Nous avons également démontré, par immunobuvardage de type Western, la présence de PDX à l'intérieur de ces tumeurs. De plus, des expériences d'immunohistochimie ont révélé que l'expression de PDX était principalement située dans les régions hypoxiques des tumeurs.

La furine est une enzyme ubiquiste, impliquée dans le maintien physiologique des fonctions cellulaires. Nos résultats démontrent pour la première fois la faisabilité d'inhiber de façon ciblée la furine, soit dans les zones hypoxiques de tumeurs. Cette inhibition diminue la maturation de substrats impliqués dans la modification du microenvironnement des tumeurs et par conséquent, diminue la progression tumorale.

Mots clés : furine, hypoxie, HIF-1, cancer, PDX

1. INTRODUCTION

1.1 La furine, le prototype de la famille des convertase de proprotéines

1.1.1 Les convertases de proprotéines

L'activation par clivage endoprotéolytique de protéines sécrétées sous la forme de molécules précurseures est un mécanisme important dans la régulation de plusieurs processus physiologiques et pathologiques. La découverte, il y a maintenant 20 ans, des protéines de la famille des convertases de proprotéines nous a permis de mieux comprendre plusieurs phénomènes tels que le transport intracellulaire de protéines, le développement embryonnaire ainsi que différentes pathogénèses, dont les infections virales et bactériennes ainsi que le cancer.

Les recherches sur les convertases de proprotéines ont débuté avec les études réalisées par Donald Steiner. Ce dernier démontra en 1967 que des peptides hormonaux provenaient d'une pro-hormone de grand poids moléculaire, qui subissait un clivage post-traductionnel suivant un site composé d'un doublet d'acides aminés basiques, ce qui permettait la libération de peptides actifs (Chretien and Li, 1967; Steiner et al., 1967). Cependant, l'implication d'une endoprotéase dans la maturation de molécules précurseures n'a été mise en évidence qu'en 1984, lors de la découverte de l'endoprotéase de levure kexine (kex 2). En effet, le groupe de Julius a démontré, à l'aide de la complémentation génétique de souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* mutantes pour le gène KEX2, que le produit de ce gène était nécessaire à la maturation de deux molécules, soit la toxine tueuse (killer toxin) et le facteur alpha (Julius et al., 1984). Puisqu'il a été démontré que la kex 2 pouvait cliver

certaines protéines de mammifères à des sites dibasiques, dont la pro-albumine (Bathurst et al., 1987) et la pro-hormone neuroendocrine (Thomas et al., 1988), l'hypothèse avait été émise que les cellules de mammifères devaient exprimer une ou des protéines partageant une homologie structurale avec l'enzyme de levure. Ceci était appuyé par les résultats obtenus suite à l'analyse de la séquence en acides aminés de KEX2. Au fait, il a été démontré que son domaine catalytique possédait une similarité avec ceux des protéases bactériennes appartenant à la famille des subtilisines, suggérant ainsi que la structure des protéines ayant une activité similaire à la *kex2* ait été conservée au cours de l'évolution (Mizuno et al., 1988).

Ce n'est pourtant qu'en 1989 que des recherches réalisées à partir de bases de données ont permis d'identifier une protéine homologue à la *kexine* chez les mammifères. Cette enzyme est encodée par le gène *FUR* (*c-fes/fps upstream region*) qui possède un cadre de lecture ouvert adjacent au proto-oncogène *c-fes/fps*, ce qui lui a valu cet acronyme (Fuller et al., 1989). Il fut démontré que le produit de ce gène, la furine, était apte à cliver des facteurs neurotrophiques, des protéines du sérum et des molécules pathogènes, et ce à une séquence composée d'acides aminés basiques. Par la suite, l'utilisation de PCR avec des amorces dégénérées a permis de découvrir 6 autres membres de la famille des convertases de proprotéines (PC). Jusqu'à aujourd'hui, 7 membres de cette famille possédant une activité endoprotéase pouvant cliver en c-terminal d'une paire d'acides aminés basiques, soit la furine (aussi PACE), la PC1 (aussi PC3) (Nakayama et al., 1991; Seidah et al., 1990; Smeekens et al., 1991), la PC2 (Seidah et al., 1990; Smeekens and Steiner, 1990), la PACE4 (Kiefer et al., 1991), la PC4 (Nakayama et al., 1992; Seidah et al., 1992), la PC5 (aussi PC6)

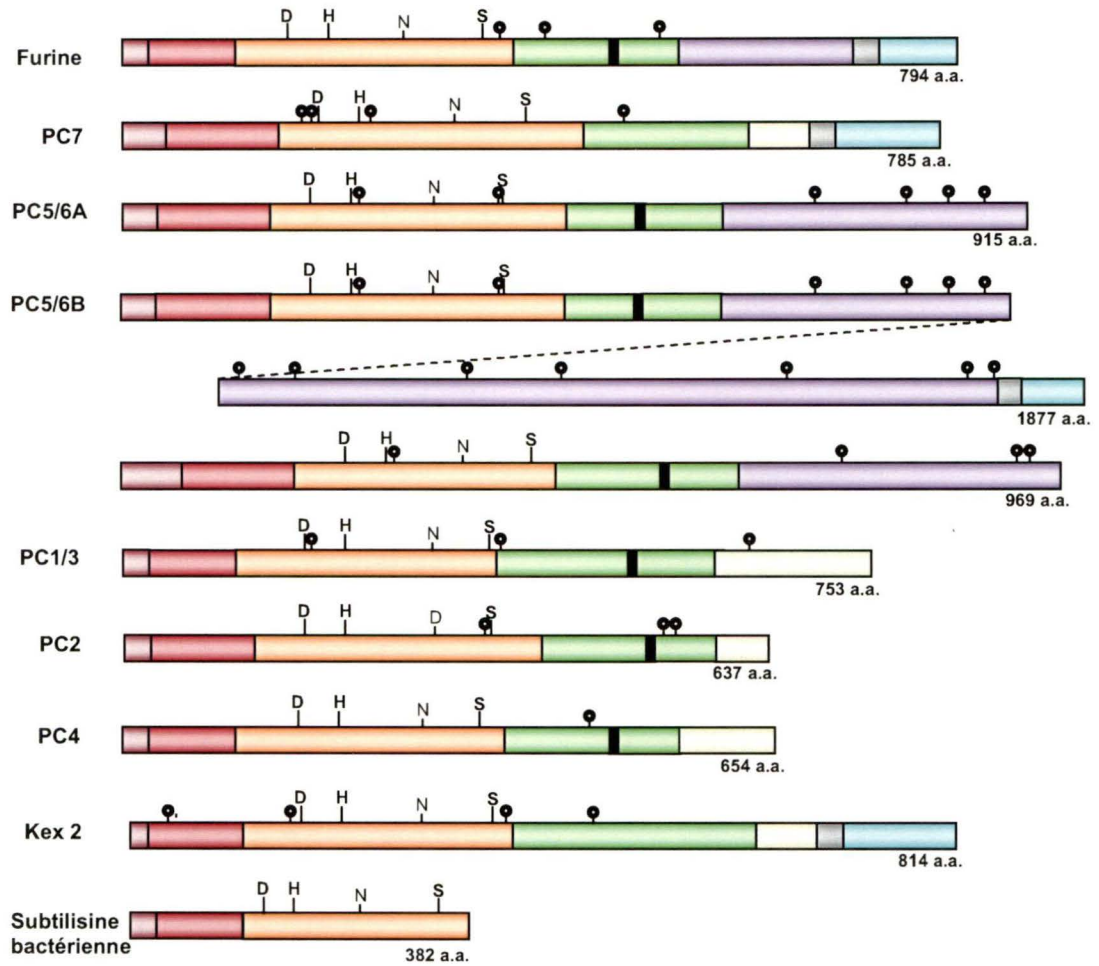
(Lusson et al., 1993; Nakagawa et al., 1993a) et finalement la PC7 (aussi PC8 ou LPC) (Bruzzaniti et al., 1996; Constam et al., 1996; Meerabux et al., 1996; Seidah et al., 1996), ont été répertoriées.

Bien que ce phénomène soit moins bien étudié, certains produits bioactifs peuvent aussi être produits par protéolyse à un site hydrophobique, plutôt que dibasique. Les efforts déployés pour identifier les enzymes effectuant ces clivages ont permis la découverte de deux autres membres de la famille des PCs, soit la SKI-1/S1P (Subtilisine Kexine Isoenzyme 1) qui clive en n-terminal du site consensus (Arg/Lys) –X- (Hydrophobique)-(Z), où Z est variable, (Seidah et al., 1999) ainsi que la NARC-1 (ou PCSK9) qui clive en C-terminal de la séquence Val-Phe-Ala-Gln (Naureckiene et al., 2003; Seidah et al., 2003). Ces convertases jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme des lipides et dans l'homéostasie du cholestérol (Allard et al., 2005; Elagoz et al., 2002).

1.1.2 Structure des PC

Les 7 membres de la famille des PCs possèdent plusieurs domaines structuraux semblables, tels que le peptide signal, la pro-région, le domaine catalytique, le domaine P ainsi que plusieurs sites de modifications post-traductionnels tel que la glycosylation (figure 1). Tout d'abord, le peptide signal permet aux protéines nouvellement synthétisées de transloquer vers le réticulum endoplasmique et d'entrer dans la voie de sécrétion cellulaire. Comme plusieurs autres protéases, les PCs sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs caractérisés par un pro-segment en N-terminal. Cette région conservée est retirée au cours de la maturation des PCs par un clivage auto-catalytique en C-terminal de la séquence

Figure 1. Représentation schématique des membres de la famille des convertases de proprotéines. Représentation schématique de la furine et des 6 PCs. Représentation de la Kex2 de la levure ainsi que de la subtilisine bactérienne (ne possédant pas de domaine P). PC5/6 possède deux isoformes A et B. Ces derniers sont produits par un clivage alternatif. Les lettres en caractères gras (**D,H,S**) soulignent l'importance de ces résidus à l'intérieur du site actif.



Adapté de Thomas, 2002

Arg-Xaa-Lys/Arg-Arg (Creemers et al., 1993; Goodman and Gorman, 1994; Leduc et al., 1992). À la suite de son clivage, le pro-peptide reste accolé à la protéine par des liens covalents et agit en tant que protéine chaperone afin d'inhibiter l'activité endogène de l'enzyme (Fu et al., 2000; Peters et al., 1998; Shinde and Inouye, 1995). Le mécanisme d'activation de la furine est illustré à la figure 2.

Le domaine partageant la plus grande homologie entre les diverses PC est sans aucun doute le domaine catalytique de type subtilisine. Cette région renferme un Asp, His, Ser ainsi qu'un Asn qui sont des acides aminés caractéristiques des sites catalytiques des protéases de type sérine (Bryan et al., 1986).

Le domaine P, quant à lui, est également un domaine conservé. Ce dernier possède un site de reconnaissance pour les intégrines, soit un domaine formé des acides aminés RGD (sauf RGS pour PC7) (Lipkind et al., 1998). En plus d'être essentiel à la stabilité structurale de l'enzyme (Creemers et al., 1993; Gluschankof and Fuller, 1994; Hatsuzawa et al., 1992b), ce domaine joue un rôle important au niveau de son activité enzymatique, ainsi que dans la spécificité de celle-ci pour ses substrats (Zhou et al., 1998).

Finalement, en c-terminal des convertases de proprotéines, on observe une très grande variabilité de séquence. Tout d'abord, il y a présence d'un domaine transmembranaire chez la furine, la PC5B et la PC7 (Hatsuzawa et al., 1992b; Nakagawa et al., 1993b). Ce motif est adjacent au domaine cytoplasmique qui est important pour la localisation cellulaire de ces convertases. En ce qui concerne la PACE4, la PC5 et la furine, il y a aussi présence d'une

région riche en sérines/thréonine, dont la fonction n'est pas encore connue (Lusson et al., 1993; Nakagawa et al., 1993a; Roebroek et al., 1992).

1.1.3 Localisation tissulaire et intracellulaire des convertases

L'étude détaillée de l'expression tissulaire, de la régulation et des fonctions biologiques des convertases, suggère qu'elles possèdent des fonctions à la fois spécifiques et complémentaires. Bien que des études *in vitro* aient démontré que plus d'une convertase possédaient la capacité de cliver un même substrat, il semblerait que la divergence de leurs localisations intracellulaires et tissulaires diminue les risques de redondance dans leurs activités biologiques (Seidah et al., 1998).

La capacité de la furine à cliver un grand éventail de substrats (tableau 1) est facilitée par son expression tissulaire ubiquiste et sa localisation dans plusieurs compartiments cellulaires. On peut retrouver la furine dans le réseau du trans-Golgi (TGN), les endosomes ainsi qu'à la membrane cellulaire (Seidah et al., 1994; Seidah et al., 1998; Shapiro et al., 1997). La PC7, qui présente une expression large mais non-ubiquiste, est retrouvée dans des structures cellulaires semblables à celle de la furine (Munzer et al., 1997). Pour ce qui est de la PC1/PC3 et la PC2, elles sont localisées plus spécifiquement dans les granules denses de la voie de sécrétion régulée des tissus neuroendocriniens, tels que les îlots pancréatiques et les glandes surrénales (Rouille et al., 1995; Seidah et al., 1994; Seidah et al., 1991; Smeekens et al., 1992). La PACE4 et la PC5 sont des protéases exprimées dans les tissus endocriniens et non-endocriniens. Ces protéinases clivent plusieurs substrats des voies de sécrétions

Tableau I : Classification fonctionnelle de précurseurs clivés par la furine.

Facteurs de croissance/hormones	P6	P5	P4	P3	P2	P1	↓	P1'	P2'
Pro-NGF	Thr	His	Arg	Ser	Lys	Arg		Ser	Ser
Pro-PDGF A	Pro	Ile	Arg	Arg	Lys	Arg		Ser	Ile
Pro-PDGF B	Leu	Ala	Arg	Gly	Arg	Arg		Ser	Leu
Pro-TGFβ1	Ser	Ser	Arg	His	Arg	Arg		Ala	Leu
Pro-VEGF-C	His	Ser	Ile	Ile	Arg	Arg		Ser	Leu
Pro-PTH	Lys	Ser	Val	Lys	Lys	Arg		Ser	Val
Protéines sériques									
Pro-von Willebrand	Ser	His	Arg	Ser	Lys	Arg		Ser	Leu
Pro-albumine	Arg	Gly	Val	Phe	Arg	Arg		Asp	Ala
Pro-facteur IX	Leu	Asn	Arg	Pro	Lys	Arg		Tyr	Asn
Pro-protéine C	Arg	Ser	His	Leu	Lys	Arg		Asp	Thr
Récepteurs de la surface cellulaire									
Pro-récepteur à l'insuline	Pro	Ser	Arg	Lys	Arg	Arg		Ser	Leu
Pro-récepteur à l'IGF-1	Pro	Glu	Arg	Lys	Arg	Arg		Asp	Val
Intégrine α3	Pro	Gln	Arg	Arg	Arg	Arg		Gln	Leu
Intégrine αv	His	Leu	Ile	Thr	Lys	Arg		Asp	Leu
Pro-récepteur HGF	Glu	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg		Ser	Thr
E-cadhérin	Leu	Arg	Arg	Gln	Lys	Arg		Asp	Trp
Protéines de la matrice extracellulaire									
Pro-BMP-1	Arg	Ser	Arg	Ser	Arg	Arg		Ala	Ala
Pro-ADAM-17	Val	His	Arg	Val	Lys	Arg		Arg	Ala
Pro-Fibrilline	Arg	Gly	Arg	Lys	Arg	Arg		Ser	Thr
Pro-MT1-MMP	Asn	Val	Arg	Arg	Lys	Arg		Tyr	Ala
Protéines pathogènes									
Gp-160 du HIV	Val	Gln	Arg	Glu	Lys	Arg		Ala	Val
Gp virus Epstein-Barr	Leu	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg		Asp	Ala
gB du CMV	His	Asn	Arg	Thr	Lys	Arg		Ser	Thr
GP du virus Ébola	Gly	Arg	Arg	Thr	Arg	Arg		Glu	Ala
Virus de la fièvre jaune	Ser	Arg	Arg	Ser	Arg	Arg		Ala	Ile

(Adapté de (Seidah and Chretien, 1999))

constitutives et régulées. Cependant, leur localisation cellulaire n'est pas encore bien définie (De Bie et al., 1996; Seidah and Chretien, 1999; Zheng et al., 1997). Finalement, la PC4 est retrouvée exclusivement dans les cellules germinales des testicules (Nakayama et al., 1992; Seidah et al., 1992). Le reste de ce mémoire portera plus spécifiquement sur le prototype de la famille des convertase de proprotéines, la furine, l'enzyme qui a retenue notre intérêt dans mes travaux de maîtrise.

1.2 La furine

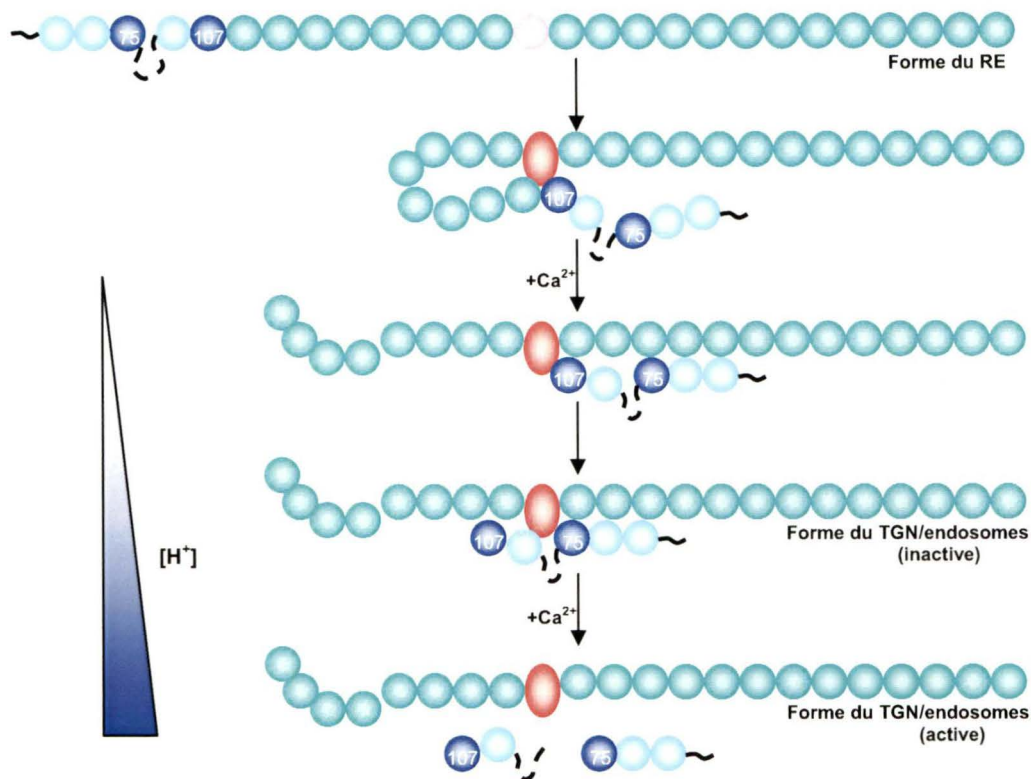
De façon similaire à son homologue de la levure Kex2, la furine est une endoprotéase de type sérine, dépendante du calcium. Cette enzyme est active selon un éventail de pH variant de 5 à 8, ce qui correspond aux pHs mesurés dans les multiples localisations intracellulaires où on peut retrouver la furine (Hatsuzawa et al., 1992a; Molloy et al., 1992).

1.2.1 Maturation et localisation intracellulaire de la furine

Tel que mentionné auparavant, la furine est synthétisée sous la forme de zymogène non-actif. L'enzyme sous forme de précurseur, soit la pro-furine, nécessite un clivage auto-catalytique intra-moléculaire en c-terminal de la séquence Arg-Thr-Lys-Arg¹⁰⁷. Ce clivage s'effectue dans le RER en condition de pH neutre (Creemers et al., 1993; Leduc et al., 1992; Molloy et al., 1994). Il a été démontré que ce clivage est nécessaire à la migration de la furine vers le Golgi (Creemers et al., 1995; Molloy et al., 1994; Takahashi et al., 1995). À la suite de son clivage, le pro-segment demeure lié au site catalytique de la furine et agit en tant qu'inhibiteur intracellulaire. Lorsque ce complexe atteint les organelles du *trans*-Golgi, le pH plus acide favorise une deuxième étape de clivage auto-catalytique à l'intérieur du pro-

domaine au site Arg-Gly-Val-Thr-Lys-Arg⁷⁵, ce qui permet la libération du site catalytique de la furine et donc son activation. Des recherches ont aussi démontré que la furine pouvait subir un clivage en amont de son domaine transmembranaire, ce qui permet son relâchement à l'extérieur de la cellule (voir figure 2) (Vidricaire et al., 1993; Wise et al., 1990).

Tel que mentionné, la furine est présente de façon majoritaire au *trans*-Golgi, mais peut aussi se retrouver dans différents organelles de la voie de sécrétion constitutive. Le transport de la furine est contrôlé par plusieurs motifs situés à l'intérieur des 56 acides aminés qui forment son domaine cytoplasmique (Molloy et al., 1998; Molloy et al., 1994). L'interaction de ces motifs avec la machinerie de sécrétion cellulaire a donné place à 2 boucles de recyclage de la furine, l'une vers le TGN et l'autre entre les endosomes et la surface cellulaire. La furine est maintenue à l'intérieur de ces boucles grâce à la caséine kinase II (CKII), qui phosphoryle des résidus sérine dans le motif acide de la queue cytoplasmique. Toutefois, le transport entre les boucles est régulé via une déphosphorylation effectuée par un isoforme spécifique de la PP2A. Cette phosphatase existe sous la forme d'un hétérotrimère composé d'une sous-unité catalytique ainsi que d'une sous-unité permettant son association avec une protéine régulatrice variable (voir revue; (Mayer-Jaekel and Hemmings, 1994). La spécificité de cette phosphatase pour la furine nécessite l'incorporation de la sous-unité régulatrice de la famille B dans l'hétérotrimère (Molloy et al., 1998; Molloy et al., 1994). Enfin, le transport de la furine à travers la cellule est effectué en étroite collaboration avec le cytosquelette d'actine (Liu et al., 1997a).



Adapté de Thomas, 2002

Figure 2. Le mécanisme d'auto-activation de la furine. Lors de la maturation de la furine, son pro-domaine agit en tant que protéine chaperonne, ce qui permet le changement de conformation du site catalytique de sa forme latente (rond rose) vers sa forme active (ovale rouge). Suite aux modifications effectuées dans le réticulum endoplasmique (RE), il y a excision du pro-peptide par clivage auto-catalytique suivant l'arginine 107. Le pro-peptide reste associé avec le domaine mature et agit en tant qu'inhibiteur lors de son transport dans la voie de sécrétion. Par la suite, le pH acide du réseau du *trans*-Golgi (TGN) permet un clivage à l'arginine 75. Ce clivage est suivi par une dissociation rapide du pro-domaine et de l'activation de la furine.

1.2.2 Régulation de l'expression de la furine

Le gène *fur*, codant pour la protéine furine, est constitué de 2.2 Kb échelonné sur 15 exons (Roebroek et al., 1986). Trois isoformes d'ARNm, différant dans leur région 5' non-codante, permettent la traduction de la furine, dont la séquence protéique finale est identique (Ayoubi et al., 1994). L'utilisation de la technique d'extension par oligonucléotides a permis d'identifier les sites d'initiation de la transcription de ces 3 isoformes. Les régions génomiques situées juste en amont de ces sites d'initiations possèdent une activité caractéristique aux régions promotrices. Ces 3 régions, nommées P1, P1A et P1B, semblent réguler de façon différente l'expression du gène *fur*, et ce en fonction du type cellulaire étudié (Ayoubi et al., 1994).

L'étude de ces 3 promoteurs a permis de les différencier selon les motifs présents dans leur séquence. Le promoteur P1A et P1B ont un contenu riche en GC et possèdent plusieurs sites de liaison pour le facteur de transcription SP1. La présence de ces sites est une caractéristique des promoteurs de type constitutif. De plus, l'absence de sites TATA ou CCAAT dans la région proximale des promoteurs P1A et P1B est une autre caractéristique des promoteurs ayant une activité constitutive. Le promoteur P1, quant à lui, est plutôt de type inductible. Ce promoteur de 3.7 Kb possède des éléments TATA et CAAT dans sa région proximale. De plus, il est transactivable par plusieurs facteurs de transcription dont C/EBP β (Ayoubi et al., 1994).

Nous disposons de peu d'information quant à la régulation de ces promoteurs. Au laboratoire, le Dr Blanchette a démontré l'implication du TGF β 1 en tant qu'inducteur de

l'expression du gène *fur* chez les synoviocytes de rats. Cette augmentation de l'expression de furine serait au cœur d'une boucle d'autorégulation impliquant son substrat, le TGFβ1 (Blanchette et al., 1997). Cette régulation du gène *fur* implique la participation de protéines de la voie des Smads (similar to mothers against decapentaplegic), dont l'hétérodimère Smad2/Smad4 qui agit en partenariat avec FAT-1 ainsi que le complexe Smad3/Smad4 qui interagit avec AP-1 (Blanchette et al., 2001b). De plus, il a été démontré que la voie de p42/p44 des MAP kinases coopère avec la voie des Smads dans la cascade menant à l'activation de la transcription du gène *fur* (Blanchette et al., 2001a). D'autre part, des études du Dre Laprise ont démontré, en 2002, l'implication du facteur GATA-1 dans l'augmentation de l'activité du promoteur P1 lors de la différenciation de cellules mégakariocytaires (Laprise et al., 2002). Plus récemment, le Dre McMahon a démontré au laboratoire l'implication de l'hypoxie dans la régulation de l'expression de la furine (McMahon et al., 2005).

1.2.3 Les inhibiteurs de la furine

La furine est une cible de choix pour le développement d'inhibiteurs spécifiques, puisqu'elle est responsable de la maturation de plusieurs substrats impliqués dans différents processus physiologiques et pathologiques. Plusieurs inhibiteurs de la furine sont connus, dont certains sont chimiques, d'autres endogènes ou encore issus de la modification de protéines.

L'une des premières études de purification et de caractérisation de la furine démontrait que l'activité de l'enzyme purifiée est complètement inhibée par l'addition de produits chimiques tel que l'acide éthylènediamine-tétraacétique (EDTA), l'acide p-

chloromercuribenzènesulfonique (pCMBS) ainsi que différents métaux lourds dont le HgCl_2 , ZnCl_2 , et le CuSO_4 (Hatsuzawa et al., 1992a). Parmi les inhibiteurs chimiques de synthèse, on retrouve le décanoyl-Arg-Val-Lys-Arg- CH_2Cl , un inhibiteur capable de former un lien covalent avec la furine grâce à la présence d'un site de reconnaissance minimal de la furine (Garten et al., 1994; Jean et al., 1995). Bien que relativement puissant, ce peptide inhibe également les 6 autres membres de la famille des convertases de proprotéines, ce qui en fait un inhibiteur peu spécifique (Jean et al., 1998).

Certaines protéines cellulaires, dont la serpine (serine proteinase inhibitor) PI8 (protéinase inhibitor 8), sont des inhibiteurs endogènes pour plusieurs protéases. Des études portant sur les serpines ont permis de mettre en évidence la capacité du PI8 à inhiber des protéases humaines tels que la thrombine, la trypsine ainsi que la furine (Dahlen et al., 1998). Cette serpine forme un complexe SDS-stable avec le prototype de la famille des convertase grâce à la présence de deux sites de reconnaissance de la furine (Dahlen et al., 1998). Cependant, la spécificité de cet inhibiteur est plutôt faible, puisqu'il inhibe également d'autres enzymes que la furine.

Tel que mentionné précédemment, il y a clivage du pro-segment lors de la maturation de la furine. Ce dernier demeure fixé à la protéine et inhibe l'activité enzymatique lors de son transport dans la cellule (Fu et al., 2000). Puisque les segments de chacune des PC ne possède que de faible niveau d'homologie (voir figure 1), plusieurs équipes de recherche ont étudié la spécificité ainsi que la capacité d'inhibition de ces pro-domaines sur leur enzyme respective. Les résultats ont démontré que les pro-segements, bien qu'ils soient assez

puissants, ne sont pas hautement spécifiques à leur enzyme parentale (Fugere et al., 2002; Zhong et al., 1999).

Au cours des années 90, le groupe de Thomas a généré un inhibiteur protéique spécifique à la furine, nommé alpha₁-antitrypsine PDX (α₁-PDX). Cette molécule est une version modifiée de la serpine α₁-antitrypsine (α₁-AT) (Anderson et al., 1993; Jean et al., 1998), un inhibiteur physiologique de l'élastase de neutrophiles (Perlmutter and Pierce, 1989). Lors d'études réalisées chez un patient atteint d'hémophilie, une forme mutante de l'α₁-AT endogène a été mise en évidence. Le site de liaison de cette protéine (α₁-antitrypsine Pittsburg) possédait une mutation des acides nucléiques codant pour la méthionine 358, résultant en la production d'une arginine (Ala-Iso-Pro-Met à Ala-Iso-Pro-Arg), ce qui éliminait sa capacité à inhiber l'élastase, mais lui conférait une spécificité pour la thrombine (Owen et al., 1983). Quelques années plus tard, l'équipe du Dr Thomas a modifié l'α₁-antitrypsine Pittsburg par mutagenèse dirigée afin de remplacer l'alanine en P4 par une arginine, ce qui a permis d'intégrer à cette molécule un site consensus de reconnaissance pour la furine (Arg-Iso-Pro-Arg). Cette nouvelle construction porte le nom d'α₁-antitrypsine Portland (α₁-PDX) (Anderson et al., 1993). La substitution limitée des acides aminés de l'α₁-AT a permis à l'α₁-PDX de conserver ses propriétés biochimiques des serpines (Dufour et al., 1998). Cet inhibiteur de la furine est considéré comme un inhibiteur suicide, puisque la liaison de l'α₁-PDX à la furine forme rapidement un complexe SDS-stable irréversible et résistant à la chaleur, ce qui inhibe l'activité enzymatique de la furine et provoque sa protéolyse (Dufour et al., 1998; Jean et al., 1998). Des études de transfection de l'α₁-PDX ont permis de mettre en évidence sa localisation intracellulaire. En fait, bien que

cet inhibiteur circule dans la voie de sécrétion constitutive, il est localisé majoritairement dans le TGN sous une forme de 64 kDa. Toutefois, une forme de 56 kDa a également été observée dans les vésicules de sécrétions (Benjannet et al., 1997). Des études *in vitro* ont démontré une grande efficacité et spécificité de cette serpine pour la furine (tableau 2) (Jean et al., 1998).

1.3 Le Cancer

1.3.1 Progression tumorale

Le cancer est une pathologie très complexe qui touche environ 170 000 personnes par année au Québec et de ce nombre, une personne sur trois y succombera (Société canadienne du cancer, 2005). Aujourd'hui, il existe plus de 100 types différents de cancer et de sous-types de tumeurs qui sont retrouvés chez différents tissus et organes (Hanahan and Weinberg, 2000). Les routes menant une cellule vers son phénotype transformé peuvent être très variées. Il y aurait 6 changements phénotypiques importants caractérisant la croissance cellulaire maligne, soit : l'auto-suffisance dans les signaux de croissance, l'insensibilité aux inhibiteurs de croissance, l'évasion de la mort programmée (apoptose), un potentiel de réplication illimité, l'angiogenèse et la formation de métastases (Hanahan and Weinberg, 2000). Les altérations génétiques causant ces changements s'accumulent tout au long du processus de progression tumorale.

Tableau II : Efficacité et spécificité de l' α 1-antitrypsine Portland (α 1-PDX) in vitro.

<u>Convertases</u>	<u>α1-AT-PDX (Ki, nM)</u>
Furine	0.6
PC6B	2.3
PC3	260
PC2	1000
PACE4	>5000
PC7	>5000
Thrombine	>5000

Adapté de Jean et al., 1998

Premièrement, les cellules normales ont besoin de signaux de croissance pour sortir de leur quiescence et proliférer. Il existe 3 moyens menant à une autonomie de ces signaux, soit une modification des signaux de croissance provenant de la matrice, soit une altération des récepteurs et/ou des médiateurs permettant la détection des signaux, ou encore la modification de la signalisation intracellulaire. La plupart des cellules tumorales acquièrent la capacité de produire leurs propres signaux de croissance. Par exemple, les glioblastomes et les sarcomes produisent du PDGF (platelet-derived growth factor) et du TGF- α , ce qui leur permet de croître indépendamment de l'environnement cellulaire (Fedi, 1997). De plus, les récepteurs de la surface cellulaire qui permettent la transmission du signal à l'intérieur de la cellule sont souvent modifiés. Ces récepteurs de facteurs de croissance sont souvent surexprimés chez les cellules tumorales et permettent une hyperréactivité aux signaux prolifératifs. Certaines altérations structurelles des récepteurs peuvent aussi permettre une activation continue de façon indépendante à la liaison avec leur ligand, tel qu'observé dans le cas du récepteur tronqué de l'EGF (Fedi, 1997). Toutefois, le mécanisme qui permet l'autonomie de croissance cellulaire le plus étudié, est sans aucun doute la modification des médiateurs responsables de la transmission du message à l'intérieur de la cellule. Dans 25 % des cancers humains, la protéine Ras est altérée. Ceci amène une activation continue de la voie de signalisation SOS-Ras-Raf-MAPK qui transmet un message mitogénique à la cellule, et ce, sans stimulation des récepteurs en amont de la cascade (Medema and Bos, 1993).

Dans les tissus sains, plusieurs signaux anti-prolifératifs sont présents et permettent de maintenir la quiescence cellulaire ainsi que l'homéostasie tissulaire. Les cellules tumorales,

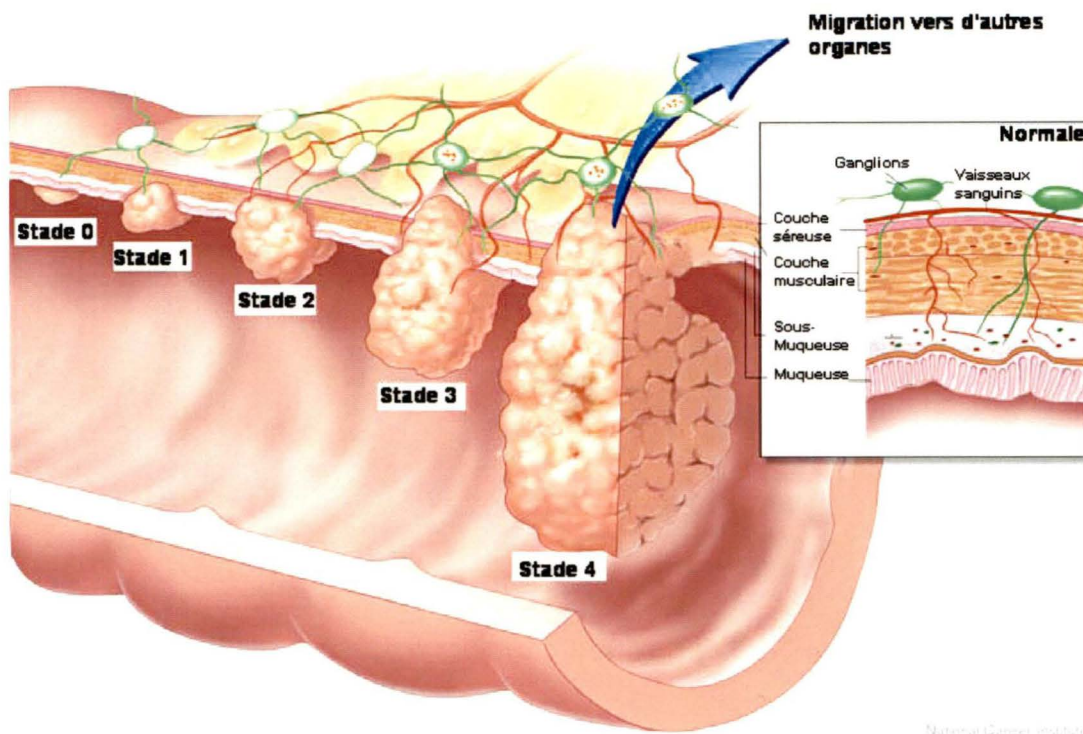
quant à elles, utilisent des récepteurs non fonctionnels ou tronqués afin de perturber la réponse aux signaux extracellulaires qui engendrent la prolifération cellulaire. Ces modifications empêchent les cellules d'atteindre un stade de différenciation post-mitotique, ne permettant pas la réplication cellulaire (Hanahan and Weinberg, 2000).

L'expansion incontrôlée des tumeurs n'est pas seulement régie par le taux de croissance cellulaire, mais aussi par le taux de mortalité. De ce fait, l'apoptose est la plus grande source de mortalité cellulaire d'un tissu. Ce mécanisme de mort programmée est présent chez toutes les cellules. La machinerie apoptotique est constituée de deux classes de composantes, soit les détecteurs et les effecteurs. Chez les cellules cancéreuses, on peut observer des altérations aux deux niveaux. Par exemple, plus de 50% des cancers humains possèdent une mutation du gène encodant la protéine suppresseur de tumeur, p53 (Harris, 1996). Le dérèglement de cette protéine impliquée dans la détection des dommages à l'ADN permet aux cellules cancéreuses de transmettre leurs mutations génétiques aux cellules filles, ce qui favorise la croissance rapide des tumeurs en diminuant le taux d'apoptose (Symonds et al., 1994).

Contrairement aux cellules normales qui se divisent que de 50 à 70 fois, les cellules cancéreuses ont un potentiel de réplication illimité. Cette propriété est due en partie à la surexpression des télomérases, des enzymes qui ont pour fonction de maintenir les extrémités des chromosomes, les télomères, à une longueur normale (Bryan and Cech, 1999; Shay and Bacchetti, 1997). Ainsi, contrairement aux cellules tumorales, les cellules saines perdent une partie des télomères à chaque division jusqu'à ce que cette érosion atteigne la

partie codante des chromosomes, ce qui freine la prolifération. Cette perte d'information génétique explique le nombre limité de divisions possibles chez les cellules saines (Counter et al., 1992).

Malgré toutes ces modifications, les tumeurs ne peuvent croître sans la formation d'un réseau sanguin permettant leur approvisionnement en oxygène et en nutriments. La distance maximale permettant la diffusion de l'oxygène des capillaires sanguins aux cellules, est d'environ 100 μm (Hanahan and Folkman, 1996). La création de ce nouveau système vasculaire (angiogenèse) est rendue possible grâce à la prolifération des cellules endothéliales, qui est initiée par un déséquilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques. L'augmentation des niveaux de médiateurs de l'angiogenèse a plusieurs origines. Ces médiateurs peuvent provenir des cellules tumorales elles-mêmes, des cellules immunitaires qui infiltrent la tumeur ou encore des cellules endothéliales situées dans l'environnement de la tumeur (Hanahan and Folkman, 1996). De plus, le processus de remodelage de la matrice cellulaire, nécessaire à la formation de ces nouveaux vaisseaux, permet la libération de facteurs angiogéniques qui y sont stockés. La dégradation de cette dernière permet, entre autres, la libération de bFGF, un agent hautement angiogénique (Whitelock et al., 1996). Certaines conditions physiologiques, comme le manque d'oxygène (hypoxie), peuvent aussi augmenter la production de médiateurs pro-angiogéniques, et ce via le facteur de transcription HIF-1 (discuté plus loin) (Forsythe et al., 1996). Le nouveau réseau sanguin, en plus de favoriser la croissance des cellules tumorales, participe aussi à leur dissémination dans l'organisme et donc à la formation de métastases. L'établissement de cellules



Adapté du site www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/

Figure 3. Représentation schématique du processus de progression tumorale. Stades 0-1, tumeur primaire formée d'une cellule transformée ayant une autonomie de croissance. Stade 2, angiogenèse et sélection de sous-clones métastatiques ayant des capacités invasives. Stade 3, intravasation du système lymphatique et sanguin. Stade 4, migration des cellules cancéreuses vers des sites distants de la tumeur. Croissance des métastases.

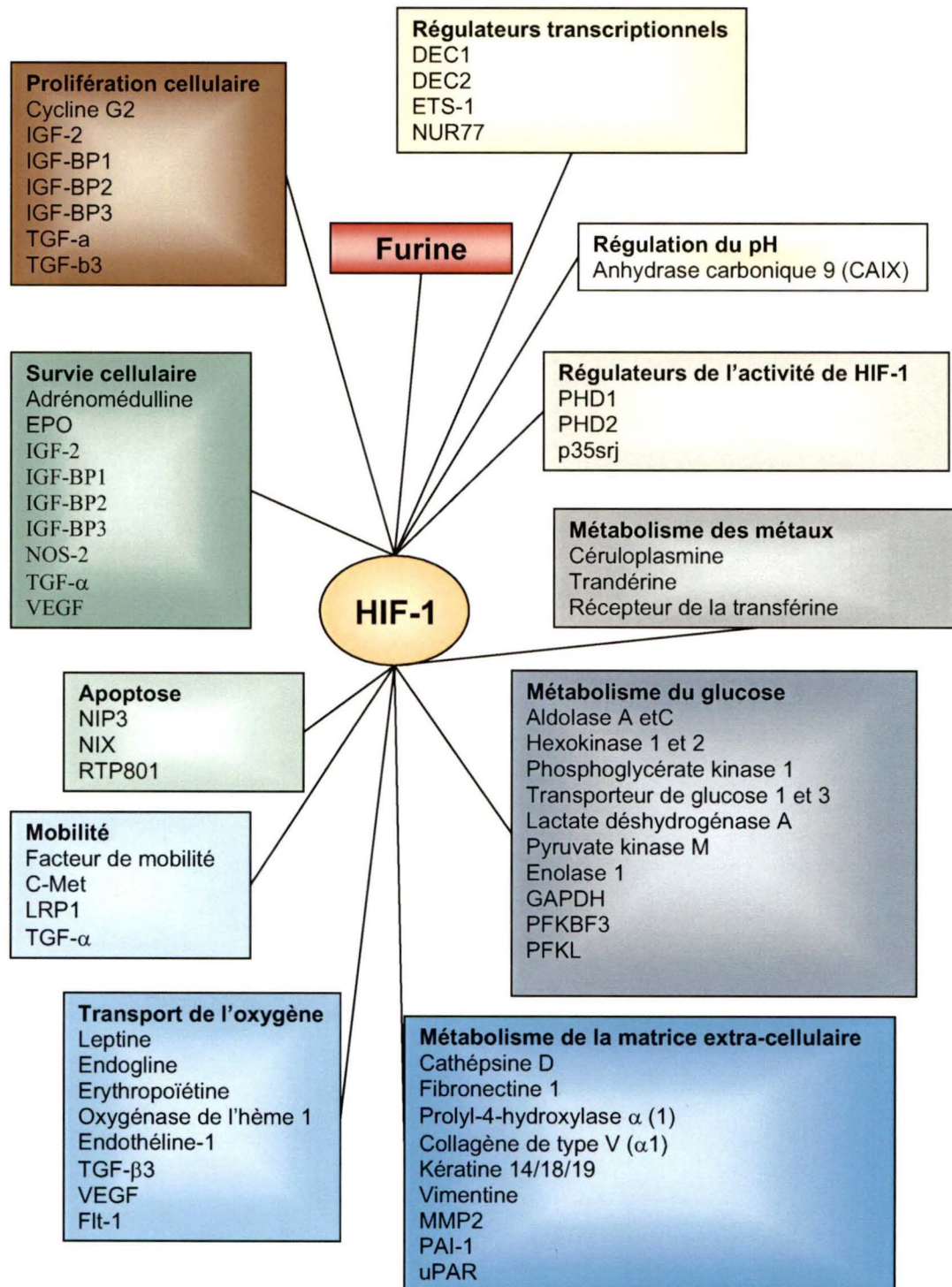
tumorales dans des loci distaux de la tumeur principale est responsable d'environ 90% de la mortalité due au cancer (Sporn, 1996). La migration des cellules tumorales à des sites secondaires est orchestrée par un changement d'expression ou de fonctionnalité de plusieurs protéines telles que les intégrines et les protéases de la matrice extracellulaires (Coussens and Werb, 1996; Giannelli et al., 2002). Les étapes du processus de progression tumorale sont illustrées à la figure 3.

En résumé, à l'image des grandes entreprises, les tumeurs représentent un ensemble judicieux de mutations et de processus d'adaptations qui favorisent leur croissance de façon optimale. Chacun de ces changements nécessite la participation de plusieurs protéines effectrices et régulatrices. C'est donc l'expression et l'activation différentielle de ces dernières, modulées par les changements physiologiques et biologiques, qui permettent d'établir un micro-environnement pro-tumorigénique.

1.3.2 Le facteur de transcription HIF-1

Lors de sa découverte, le HIF-1 fut identifié comme un hétérodimère composé des sous-unités α et β , pouvant lier directement l'ADN et ainsi induire l'activité d'une région située en 3' du gène de l'érythropoïétine en hypoxie (Semenza, 2002; Wang and Semenza, 1995). Ce facteur de transcription, inductible en condition de faibles concentrations d'oxygène, est une protéine essentielle à l'adaptation des cellules et des tissus à l'hypoxie. Des expériences ont démontré son implication dans la modulation de l'expression génique de plus de 60 gènes (figure 4). Cette liste non exhaustive des gènes cibles nous démontre bien l'importance de

Figure 4. Gènes dont l'activité transcriptionnelle est augmentée par le HIF-1. Plusieurs gènes impliqués dans différents processus cellulaires sont augmentés par le HIF-1. IGF-2, insulin-like growth factor-2; IGF-BP, protéines liant le IGF; TGF- β , transforming growth factor-alpha; TGF- β , transforming growth factor-beta; VEGF, vascular endothelial growth factor; EPO, erythropoietin; NOS-2, nitric oxide synthase-2; LRP-1, LDL-receptor-related protein-1; Flt-1, Récepteur du VEGF; PHD, prolyl-hydroxylase domain enzyme; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-3; PFK-L, phosphofructokinase-L; PAI-1, plasminogen-activator inhibitor-1; uPAR, urokinase plasminogen activator receptor.

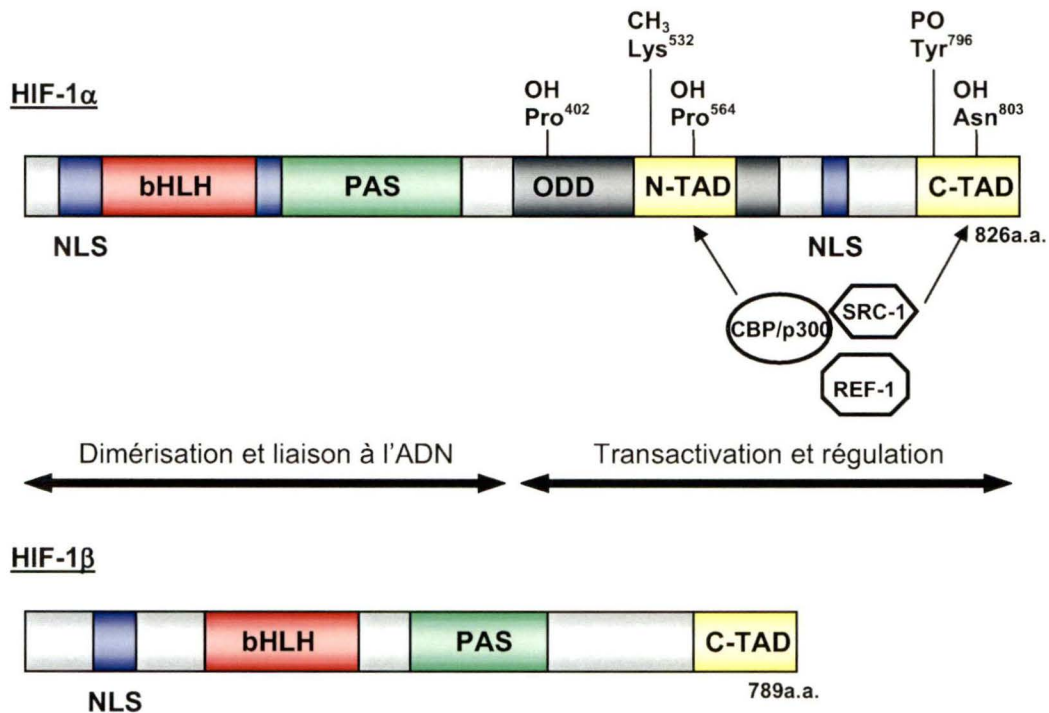


Adapté de Semenza, 2003

ce facteur de transcription dans la modulation de l'expression de facteurs impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'angiogenèse, le métabolisme du glucose ainsi que dans la biologie du cancer (Semenza, 2003). En hypoxie, le HIF-1 lie un motif HRE (Hypoxia-Responsive Element) présent dans l'ADN de promoteurs de gènes cibles. Ce site est caractérisé par la présence d'une séquence consensus RCGTG (où R=A ou G), portant le nom de HBS (Hypoxia-Binding Sequences) (Jiang et al., 1996a). Cependant, des études ont démontré que cette séquence minimale n'était pas suffisante à l'induction maximale de certains gènes en hypoxie. Des travaux ont permis de trouver dans le promoteur de plusieurs de ces gènes un HRE composé d'un HBS et d'un HAS (HIF-1 Ancillary Sequences), une séquence inversée imparfaite du HBS (CACG/AG/T/C), permettant une meilleure induction de l'expression des gènes cibles en hypoxie (Kimura et al., 2001). L'augmentation de l'expression d'un gène par le HIF est un processus qui implique plusieurs niveaux de régulation dont la stabilisation de la sous-unité α , une hétérodimérisation avec la sous-unité β , la translocation nucléaire du complexe HIF-1 ainsi que son interaction avec d'autres protéines de la machinerie de transcription (Berra et al., 2006). Chaque étape de cette régulation du HIF-1 est en lien direct avec sa structure moléculaire primaire.

1.3.2.1 Structure du HIF-1

Tel que mentionné précédemment, ce facteur de transcription est un hétérodimère formé d'une sous-unité α et une β , toutes deux exprimées de façon constitutive. Cependant, l'activité transcriptionnelle du facteur HIF-1 repose sur la présence de la sous-unité α , dont



Adapté de Dery et al., 2005; Bardos et Ashcroft, 2004

Figure 5. Domaines protéiques du HIF-1α et HIF-1β. Illustration des domaines fonctionnels et de liaisons aux co-facteurs des sous-unités du HIF-1. Les sites de phosphorylation (PO), d'acétylation (CH₃) et d'hydroxylation (OH) sont identifiés. bHLH, site basique hélice-boucle-hélice; PAS, Per-ARNT-Sim; ODD, domaine de dégradation dépendant de l'oxygène, TAD-C et TAD-N, domaine de trans-activation en C et N-terminal; NLS, signal de localisation nucléaire.

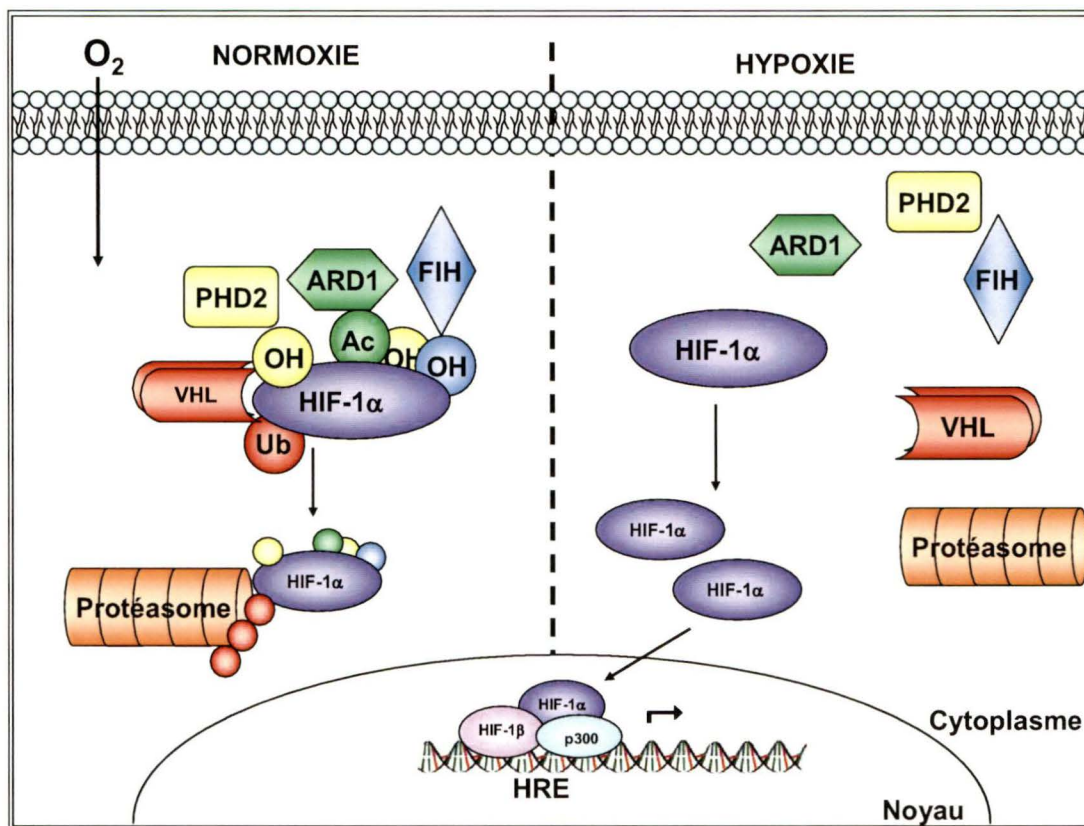
la stabilité est affectée par la concentration en oxygène. L'activité du HIF-1 est étroitement associée à la stabilisation, et donc à la présence du HIF-1 α en hypoxie. Jusqu'à présent, on connaît 3 formes de cette protéine chez l'humain (HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α), qui sont transcrites à partir de différent locus (Schofield and Ratcliffe, 2005; Wang et al., 1995). Le HIF-1 α et β sont respectivement constitués de 826 et 789 acides aminés (Wang and Semenza, 1995). Chacune possède dans leur moitié N-terminale, un domaine basique hélice-boucle-hélice (bHLH) nécessaire à leur liaison à l'ADN ainsi qu'à leur hétérodimérisation. De plus, ces deux protéines possèdent un domaine Per/ARNT/Sim (PAS) qui participe aussi à ces processus d'interactions (Wang et al., 1995).

Le HIF-1 α possède également un domaine riche en Pro-Ser-Thr qui est responsable de sa stabilisation en hypoxie. Ce domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODDD) se situe dans la partie C-terminale de la protéine (Huang et al., 1998). De plus, cette portion de la protéine contient deux domaines de transactivation (TAD). Ces domaines, dont l'un est composé des acides aminés 531-575 (TAD-N) et l'autre des acides aminés 531-575 (TAD-C), sont responsables de la liaison du HIF-1 à différents coactivateurs tels que le CBP/p300, le SRC-1 et le Ref-1/APE (Carrero et al., 2000; Freedman et al., 2002; Gray et al., 2005). Ces domaines sont aussi la cible de plusieurs modifications post-traductionnelles (acétylation, phosphorylation, hydroxylation) qui modifient l'activité et la stabilité du HIF-1 α (Bruick and McKnight, 2001; Jiang et al., 1997; Pugh et al., 1997; Richard et al., 1999). La sous-unité β possède également un domaine TAD, mais ce dernier ne semble pas jouer de rôle important dans l'activité du complexe HIF-1 (voir figure 5) (Jiang et al., 1996a).

1.3.2.2 Régulation et activation du HIF-1

La fluctuation des concentrations d'O₂ dans l'environnement extracellulaire est une modification physiologique importante qui nécessite une adaptation cellulaire. Ces changements environnementaux initient, via différentes voies de signalisation, une série de modifications post-traductionnelles qui régulent la localisation cellulaire, l'interaction protéine-protéine, la stabilité, la liaison à l'ADN et l'activité des facteurs de transcription. Une augmentation exponentielle des niveaux de la sous-unité α du HIF-1 est observée au fur et à mesure que la concentration d'oxygène cellulaire diminue, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Jiang et al., 1996b; Yu et al., 1998). Cependant, en condition normale d'oxygène, cette sous-unité n'est pas détectable (Jewell et al., 2001). La stabilisation du HIF-1 α permet son hétérodimérisation avec le HIF-1 β afin de former un complexe pouvant activer la transcription de gènes cibles. Les bases moléculaires de cette régulation englobent une hydroxylation dépendante de l'oxygène, une ubiquitination et une dégradation par les protéasomes (Semenza, 2002) (Figure 6).

Tout d'abord, en condition normale d'oxygène, on observe une hydroxylation du HIF-1 α pouvant être effectuée chez l'humain par trois prolylhydroxylases identifiées par les acronymes PHD1, PHD2 et PHD3 (prolyl hydroxylase domain enzyme) (Bruick and McKnight, 2001; Epstein et al., 2001). Bien que cette modification post-traductionnelle est bien connue dans la biologie structurale des tissus, particulièrement au niveau de la stabilisation des fibres de collagène, l'hydroxylation du HIF-1 α est le premier exemple de ce processus dans la signalisation cellulaire (Schofield and Ratcliffe, 2005). L'hydroxylation s'effectue au niveau des 2 prolines (Pro⁴⁰² et Pro⁵⁶⁴) situées dans le domaine ODDD du HIF-



Adapté de Dery et al., 2005

Figure 6. Régulation du HIF-1 α de façon dépendante de l'oxygène. En condition normale d'oxygène, le HIF-1 α est hydroxylé (OH) sur les résidus 402, 564 et 803 par la PHD2 ainsi que la FIH, puis reconnu et ubiquitiné par le complexe du Von Hippel Lindau (VHL) et rapidement dégradé par le protéasome. On observe aussi une acétylation (AC) effectuée par l'ARD1, ce qui augmente l'affinité du HIF-1 α pour le VHL. De façon contraire, en hypoxie, l'hydroxylation est inhibée, ce qui permet la stabilisation et l'accumulation du HIF-1 α . Ce dernier transloque au noyau et s'hétérodimérise avec la sous-unité β , où ils recrutent les co-activateurs (p300) et modifient l'expression de gènes cibles en liant la séquence HRE de leurs promoteurs.

1α . Les hydroxylases du HIF-1 font partie de la superfamille des oxygénases dépendante du 2-oxoglutarate et du Fe(II), deux facteurs qui agissent respectivement comme co-substrat et co-facteur (Hausinger, 2004; Schofield and Zhang, 1999). D'autres facteurs peuvent influencer l'activité des PHDs comme l'ascorbate et les réactifs oxygénés (ROS) (Gerald et al., 2004). De plus, l'abondance des PHDs peut être régulée par l'œstrogène, le p53 et même par le HIF-1, créant ainsi une boucle de rétro-activation négative lors de la réoxygénation des cellules (Appelhoff et al., 2004; del Peso et al., 2003; Epstein et al., 2001).

Suite à l'hydroxylation du HIF- 1α , son affinité pour le suppresseur de tumeur Von Hippel-Lindau (VHL) augmente d'au moins trois fois (Schofield and Ratcliffe, 2005). Le VHL fait parti d'un complexe d'ubiquitination (VHL-elongineB-elongineC-Cul-Rbx) qui induit l'ubiquitination et la dégradation subséquente du HIF- 1α par les protéasomes (Huang et al., 1998; Maxwell et al., 1999; Ohh et al., 2000; Pugh et al., 1997). En plus de l'hydroxylation, d'autres modifications post-traductionnelles peuvent affecter la stabilité du HIF- 1α . L'acétylation par l'acétyltransférase ARD1 de la lysine 532 du domaine ODDD augmente grandement la liaison du HIF- 1α au VHL (Jeong et al., 2002).

La régulation du HIF- 1α s'effectue non seulement au niveau de sa dégradation, mais aussi par un mécanisme régulant son interaction avec ses co-facteurs. Cette régulation dépendante de l'oxygène implique une autre étape d'hydroxylation, mais cette fois-ci sur un résidu asparagine du domaine C-TAD (Lando et al., 2002; Mahon et al., 2001). Cette hydroxylation est effectuée par le facteur inhibiteur du HIF-1 (FIH) et inhibe l'interaction du HIF- 1α avec son co-activateur CBP/p300, une histone acétyltransférase (Lando et al., 2002).

L'acétylation des histones modifie la structure de la chromatine et permet une meilleure activité transcriptionnelle des gènes cibles (Carrozza et al., 2003).

En conclusion, l'inhibition de l'hydroxylation en hypoxie des résidus prolines prévient une association entre le HIF-1 α et le VHL. Suite à l'accumulation du HIF-1 α , ce dernier peut transloquer au noyau et dimériser avec la sous-unité β pour ensuite lier la séquence HRE des promoteurs de gènes cibles et ainsi activer leur transcription.

Toutefois, il est maintenant connu que l'expression et l'activation du HIF-1 peuvent être observées en normoxie, en réponse à des facteurs de croissance, des hormones, des cytokines ainsi qu'à l'oxyde nitrique (tableau 3) (Feldser et al., 1999; Laughner et al., 2001; Moeller et al., 2005; Stiehl et al., 2002; Zhou et al., 2004). Cette régulation du HIF-1 α semble être une réponse spécifique au type cellulaire étudié et n'affecte généralement pas son taux de dégradation (Semenza, 2003). L'augmentation de la synthèse d'ARNm et/ou de protéines du HIF-1 α par ces stimuli serait la principale cause de cette régulation positive. Des études ont démontré que ce serait, entre autres, la stimulation des récepteurs tyrosine kinase par ces facteurs non-hypoxiques, entraînant l'activation de la voie PI3K et des MAPK, qui engendre une augmentation de la transcription du HIF-1 α (Fukuda et al., 2002; Fukuda et al., 2003; Zhong et al., 2000). De plus, l'activité du HIF- α peut être modulée par une phosphorylation directe de la protéine par les MAPK p42/p44 (Richard et al., 1999).

Tableau III : Régulateurs positifs et négatifs du HIF-1 α .**Régulateurs négatifs du HIF - 1 α**

Effecteurs	Fonctions/conséquences	Références
PHD	Hydroxylation du HIF-1 α , qui lie le VHL	Bruick et McKnight, 2001
VHL	Lie le HIF-1 α hydroxylé, ubiquitination et dégradation via le protéasome	Maxwell et al., 1999
FIH-1	Hydroxylation d'un résidu asparagine du HIF-1 α qui prévient l'association à p300	McNeill et al., 2002
ARD-1	Acétylation d'un résidu lysine du HIF-1 α qui augmente la liaison au VHL	Jeong et al., 2002
CITED2/CITED4	Inhibe l'interaction HIF-1 α et p300	Bhattacharyae et al., 1999
HIF-3 α /IPAS	Effet dominant négatif sur les gènes cibles du HIF-1	Makinno et al., 2001; 2002
p53	Interagit avec HIF-1 α et diminue sa stabilité et son activité transcriptionnelle	An et al., 1998
GSK3 β	Phosphoryle le domaine ODDD du HIF-1 α <i>in vitro</i>	Mottet et al., 2003
FOXO4	Une surexpression régule à la baisse le HIF-1 α	Tang et Lasky, 2003
p14 ^{ARF}	Lie le domaine ODDD du HIF-1 α et le séquestre au noyau	Fatylol et Szalay, 2001
PTEN	Surexpression de PTEN régule à la baisse le HIF-1 α	Zhong et al., 2000

Régulateurs positifs du HIF-1 α

Effecteurs	Fonctions/conséquences	Références
Hypoxie	Inhibition de l'hydroxylation du HIF-1 α , dimérisation avec le HIF-1 β et transactivation	Maxwell et al., 1999 Huang et al., 1996
PI3K/AKT	Stabilisation du HIF-1 α par les signaux de facteurs de croissance	Semenza et al. 2002
MAPK	L'inhibition de cette voie entraîne une régulation à la baisse de l'activité transcriptionnelle du HIF-1	Richard et al., 1999
mTOR	L'inhibition prévient la stabilisation et l'activation du HIF-1 α	Hudson et al., 2002
p300	Interaction directe avec le HIF-1 α et nécessaire à l'activation transcriptionnelle du HIF-1	Ébert et Bunn., 1998 Arany et al., 1996
Hsp90	Association directe avec HIF-1 α , et son inhibition régule à la baisse le HIF-1	Minet et al., 1999
NO	La concentration de NO détermine son rôle positif ou négatif	Huang et al., 1999
ROS	Stabilisation du HIF-1 α	Chandel et al., 2000; 1998

Adapté de Bardos et Ashcroft, 2005

1.3.3 Le HIF et la progression tumorale

L'acquisition de plusieurs altérations génétiques, affectant les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs, favorise la sélection clonale de cellules ayant un potentiel de croissance et de survie élevé. Cette grande prolifération est caractérisée par une augmentation de la consommation d'oxygène et de nutriments. Cette surconsommation diminue la quantité d'O₂, la concentration de glucose et rend le pH acide. Tel que mentionné, le HIF-1 est un complexe protéique dont les niveaux sont augmentés par l'hypoxie ainsi que par plusieurs mutations génétiques présentes au niveau des tumeurs. La surexpression du HIF-1 a été observée chez la plupart des tumeurs solides. Cette dernière se situerait de façon particulière au niveau des régions hypoxiques caractéristiques des zones péri-nécrotiques (Maxwell et al., 2001; Zhong et al., 2001). L'expression de ce facteur de transcription permet une réponse adaptative à cet environnement hostile en induisant l'expression de gènes favorisant l'angiogenèse, la glycolyse et la régulation du pH. De plus, l'inhibition du HIF-1 dans des expériences de xénogreffes chez la souris diminue l'angiogenèse et la croissance tumorale, démontrant la contribution du HIF-1 dans la progression tumorale (Yeo et al., 2003).

Dès 1971, Folkman avait proposé que la croissance des tumeurs solides était dépendante de l'angiogenèse (Folkman et al., 1971). Le VEGF, une cible du HIF-1, est un facteur clé de l'angiogenèse. Il induit la prolifération, la mobilité des cellules endothéliales, ainsi que la perméabilité des nouveaux vaisseaux (Forsythe et al., 1996; Liu et al., 1997b; Roberts and Palade, 1997). En plus du VEGF, le HIF-1 participe au processus d'angiogenèse en modulant l'expression du récepteur du VEGF (Flt-1) et de la synthétase de l'oxyde nitrique (Melillo et al., 1995; Tuder et al., 1995).

L'hypoxie intra-tumorale demande une adaptation métabolique des cellules cancéreuses. Celles-ci doivent effectuer une transition de la voie oxydative vers la voie glycolytique. Par ailleurs, on retrouve la séquence HRE dans le promoteur de plusieurs gènes impliqués dans la glycolyse (Semenza, 2000). Des études ont démontrées que l'expression de plus de 13 gènes codant pour des transporteurs de glucose et d'enzymes glycolytiques est diminuée chez des cellules souches d'embryons de souris déficientes pour le HIF-1 α (Iyer et al., 1998). L'augmentation de l'apport de glucose via l'établissement d'un nouveau réseau sanguin, ainsi que l'augmentation des enzymes glycolytiques en hypoxie, favorise la production cellulaire d'ATP par la glycolyse. Ce phénomène permet donc, en absence d'oxygène, de compenser l'arrêt du transport des électrons impliqués dans la respiration mitochondriale (Maxwell, 2005). Cependant, la grande production de lactate résultant de la glycolyse génère un microenvironnement tumoral caractérisé par un pH très acide (Kung et al., 2000). L'homéostasie du pH de la tumeur est assurée par des mécanismes d'extrusion des protons effectués, entre autres, par l'anhydrase carbonique 9 et 12. De façon intéressante, ces dernières ont récemment été identifiées comme une nouvelle classe de protéines pouvant être modulées par le HIF-1 (Ivanov et al., 1998; Wykoff et al., 2000).

Les tumeurs nécessitent un remodelage de la matrice extracellulaire, tout au long des étapes la progression tumorale, afin de permettre aux processus d'angiogenèse et d'invasion cellulaire d'avoir lieu. Ainsi, l'expression des protéines telles que la métalloprotéinase de la matrice de type 2 (MMP-2), le collagène de type V, la fibronectine ainsi que les kératines 14, 18 et 19 est régulée par le HIF-1 en hypoxie (Krishnamachary et al., 2003; Wykoff et al., 2000).

Dernièrement, l'analyse de la séquence des promoteurs du gène *fur* a permis l'identification de plusieurs sites potentiels de liaison pour le facteur de transcription inductible en hypoxie, le HIF-1. Des essais d'activité de promoteurs, utilisant des constructions plasmidiques contenant le gène rapporteur de la luciférase, ont permis de déterminer que le promoteur P1 était celui qui est responsable, de façon majoritaire, de l'induction de la furine en hypoxie et ce, via le facteur HIF-1. (McMahon et al., 2005). Plusieurs des protéines induites par le HIF-1 mentionnées ci-haut, nécessaires à l'adaptation des tumeurs solides à l'hypoxie, sont activées par la furine. L'augmentation des niveaux de furine en hypoxie permet donc la maturation de plusieurs protéines impliquées dans différentes situations physiologiques et pathologiques, telle que la progression tumorale.

1.3.4 Rôles physiologiques et pathologiques de la furine

Depuis sa découverte, il a été démontré que l'activité enzymatique de la furine est responsable de l'activation et de la disponibilité d'un grand nombre de protéines ayant des rôles importants dans plusieurs phénomènes physiologiques et pathologiques. Parmi les substrats de la furine, on retrouve entre autres des molécules telles que des facteurs de croissance, des hormones, des récepteurs de la surface cellulaire ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire. De plus, des protéines provenant d'organismes bactériens telles que certaines toxines ou protéines d'enveloppes virales ont été identifiées en tant que substrats de la furine (tableau 1). La maturation de plusieurs de ces protéines s'effectue grâce à la présence d'un site consensus de reconnaissance optimale de la furine (-Arg-X-Lys/Arg-Arg↓-) où X représente n'importe quel acide aminé (Hosaka et al., 1991). Le site consensus de reconnaissance de la furine a été mis en évidence pour la première fois en 1986 par

l'identification d'une mutation naturelle d'une Arg pour un Gln dans le site de liaison de la furine du facteur IX. Cette mutation provoque une hémophilie induite par une déficience dans le clivage de ce facteur par la furine (Bentley et al., 1986). La furine peut aussi cliver un site de reconnaissance minimal Arg-X-X-Arg↓, cependant avec une moins grande efficacité (Hatsuzawa et al., 1992a; Molloy et al., 1992). La présence de ce site minimal augmente grandement l'éventail de substrats pouvant être clivés par la furine. L'importance physiologique de la furine a aussi été démontrée chez un modèle de souris homozygotes déficientes pour le gène *fur*. Ces souris présentent des défauts de croissance à partir du jour 8-8.5 et meurent au jour 11-12 du développement embryonnaire (Roebroek et al., 1998). Par contre, une étude récente démontre qu'une inhibition ciblée de la furine dans le foie de souris adulte ne serait pas suffisante à la modification morphologique ou fonctionnelle de l'organe (Roebroek et al., 2004). Présentement, puisqu'il y a peu d'études *in vivo* qui démontrent l'implication directe de la furine dans les processus physiologiques, des études supplémentaires seraient nécessaires afin d'élucider son rôle spacio-temporel précis.

En plus de son rôle physiologique, plusieurs études ont démontrées l'implication *in vitro* et *in vivo* de la furine dans des processus pathologiques. Par exemple, il est connu que la furine est impliquée dans l'activation de protéines virales telles que la glycoprotéine 160 (gp160) du HIV-1 ou la glycoprotéine B du cytomégalovirus (Jean et al., 2000; Moulard and Decroly, 2000). De plus, la furine est impliquée dans la pathogénécité bactérienne en activant certaines toxines dont celle de l'anthrax (Gordon et al., 1995).

1.3.5 La furine et la progression tumorale

Depuis quelques années, l'intérêt pour la furine dans le processus de progression tumorale est croissant. Dans les tissus normaux, la furine est détectable à de très faibles niveaux, tandis que chez plusieurs cancers, on observe une surexpression de cette dernière qui est associée avec le niveau d'agressivité des tumeurs (Bassi et al., 2001b; Cheng et al., 1997). En plus d'être associée avec un mauvais pronostic dans certains cancers, l'importance de la surexpression de cette enzyme dans la progression tumorale a aussi été démontrée dans des modèles de xénogreffes chez des souris immunodéficientes scid. Ainsi, l'expression de l'inhibiteur de la furine α 1-antitrypsine PDX, par les cellules tumorales humaine HT29 et SCC9/12/15, diminue l'incidence et la croissance des tumeurs formées chez ces souris (Bassi et al., 2001a; Khatib et al., 2001). Tout porte donc à croire que le rôle de la furine dans le cancer provient de sa capacité à cliver et activer plusieurs substrats impliqués dans ce processus complexe qu'est la progression tumorale.

1.3.8 Substrats de la furine impliqués dans la progression tumorale

1.3.8.1 Les métalloprotéinases

Les métalloprotéinases (MMPs) sont une famille importante de protéinases dépendantes du calcium et du zinc qui dégradent divers éléments de la matrice et activent certaines enzymes. Jusqu'à aujourd'hui, 28 MMPs ont été identifiées, dont 21 chez l'humain (Egeblad and Werb, 2002).

La plupart des MMPs sont synthétisées sous la forme de préproenzymes et sont sécrétées sous la forme de proenzymes. Ces protéines sont maintenues sous leur forme inactive dans

le cytoplasme grâce à l'interaction d'une cystéine de la pro-région avec un ion zinc lié au domaine catalytique (Springman et al., 1990). L'activation de ces MMPs s'effectue par un clivage de la pro-région par une protéase de type sérine ou par une autre métalloprotéinase activée (Nagase and Woessner, 1999). L'activité des MMPs peut être régulée par des inhibiteurs endogènes incluant les TIMPs, l' α 2-macroglobuline et la glycoprotéine membranaire RECK (Baker et al., 2002; Takahashi et al., 1998; Troeberg et al., 2002).

1.3.8.1.1 MT1-MMP

La première métalloprotéinase abordée dans ce mémoire diffère des autres enzymes de cette famille puisqu'elle reste à la membrane plasmique. Il s'agit de la MT1-MMP (Membrane type 1 Matrix Metalloproteinase) ou MMP-14. Elle fait partie d'un sous-groupe de MMPs comportant 6 membres, les MT-MMPs, qui possède un domaine transmembranaire (Takino et al., 1995b). La MT1-MMP possède en C-terminal de son propeptide, une séquence de reconnaissance pour la furine (Arg-Arg-Lys-Arg¹¹¹), permettant à cette dernière de cliver la molécule afin de la rendre active (Yana and Weiss, 2000). Des expériences *in vitro* ont démontré que la furine est responsable de ce clivage, libérant une forme mature et active de 60 KDa (Pei and Weiss, 1996; Sato et al., 1996a). Cependant, certaines études ont démontré que cette activation par la furine n'est pas essentielle à l'activité de la MT1-MMP et que son activation peut donc être effectué de façon indépendante de l'activité furine, et ce en fonction du type cellulaire étudié (Sato et al., 1999). Au niveau structurel, la MT1-MMP possède un peptide signal, un pro-domaine ayant une séquence hautement conservée PRCGXPD qui permet la stabilisation de la protéine précurseure, et un domaine catalytique liant le calcium et le zinc (voir figure 7). De plus, elle possède une région charnière qui relie

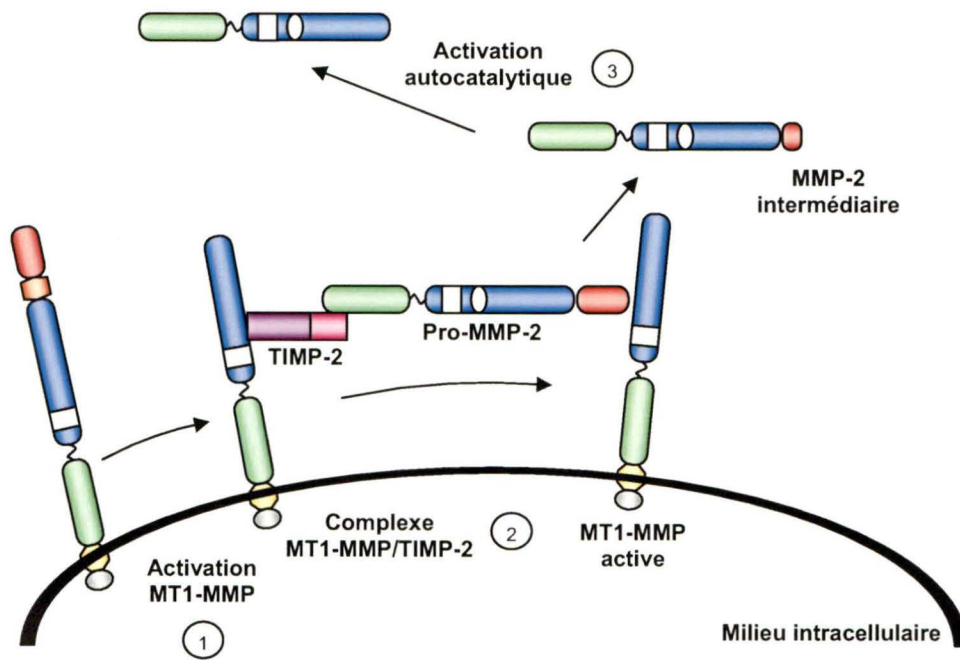
Figure 7. Structure et modèle d'activation de la pro-MMP-2 par la MT1-MMP.

(A) Représentation schématique de la MT1-MMP ainsi que de la MMP-2. Pré, peptide signal; Pro, pro-peptide; Fur, site de reconnaissance pour une sérine protéase de type furine; Zn, site de liaison au zinc; TM, domaine trans-membranaire; Cy, queue cytoplasmique. (B) Modèle d'activation de la pro-MMP-2 par la MT1-MMP. (1) La pro-MT1-MMP peut être activée à l'intérieur de la cellule par la furine ou par la plasmine dans le milieu extracellulaire. (2) TIMP-2, une molécule adaptatrice, forme un pont entre la MT1-MMP et une MMP-2. Par la suite, une MT1-MMP libre et adjacente clive une partie du pro-domaine de la MMP-2 amène la formation d'une structure intermédiaire. (3) Un clivage auto-catalytique de la MMP-2 permet son activation.

MMP-14/ MT1-MMP



MMP-2



Adapté de Sounni et al., 2003

la région hémapexine au domaine catalytique qui influencerait sa spécificité pour ses substrats (Birkedal-Hansen et al., 1993; Woessner, 1991).

Une fois activée, la MT1-MMP peut cliver plusieurs composantes de la matrice extracellulaire (MEC) tels que le collagène de type I, II et III, la fibronectine, la vitronectine, le protéoglycan et la gélatine (d'Ortho et al., 1997; Ohuchi et al., 1997; Pei and Weiss, 1996). De plus, elle peut activer deux autres MMPs, soit la MMP-2 et la MMP-13, par un mécanisme qui sera discuté plus loin (Cowell et al., 1998; Knauper et al., 1996; Sato et al., 1996b). Le type de substrats clivés par cette enzyme lui confère un rôle essentiel dans le remodelage des tissus squelettiques et des tissus conjonctifs extra-squelettiques (Holmbeck et al., 1999).

En plus d'être nécessaire à l'homéostasie des tissus en conditions physiologiques normales, la MT1-MMP est grandement impliquée au niveau des processus de la progression tumorale. La dégradation de la MEC par la MT1-MMP permet la migration de cellules endothéliales, mais aussi une augmentation de la capacité invasive des cellules tumorales, de la formation des métastases et du processus angiogénique (Egeblad and Werb, 2002; McCawley and Matrisian, 2000). De plus, des études de xénogreffes chez la souris ont démontré qu'une inhibition de la furine par l' α 1-AT-PDX, chez les cellules d'adénocarcinomes de colon HT-29, diminuait la capacité invasive des tumeurs formées par ces cellules chez des souris immunodéficientes via une inhibition de la maturation de la MT1-MMP (Khatib et al., 2001).

1.3.8.1.2 MMP-2

La deuxième métalloprotéinase abordée dans ce mémoire est la MMP-2 ou gélatinase A. Cette dernière n'est pas activée de façon directe par la furine, mais plutôt via un clivage réalisé par une autre MMP, soit la MT1-MMP. Cette activation nécessite la participation d'un inhibiteur des métalloprotéinases, le TIMP-2 (Strongin et al., 1995). Tel qu'illustré à la figure 7, cette activation s'effectue au niveau de la membrane plasmique et débute par la liaison de la partie N-terminale du TIMP-2 au site actif de la MT1-MMP. Par la suite, le domaine C-terminal de TIMP-2 lie le domaine hémapexine de la pro-MMP-2. Ce complexe permet le recrutement d'une autre MT1-MMP libre et adjacente qui clivera la pro-MMP-2 entre l'asparagine 37 et la leucine 38 (Itoh et al., 2001; Lehti et al., 2002). À la suite de ce clivage qui génère une forme intermédiaire, l'obtention de la forme active s'effectue par un processus autocatalytique intramoléculaire ou via l'action du système plasminogène/plasmine (Atkinson et al., 1995; Baramova et al., 1997; Sounni et al., 2002). Toutefois, il a aussi été démontré que les MT-MMP-2, 3, 5 et 6 peuvent également activer la pro-MMP-2 (Kolkenbrock et al., 1997; Llano et al., 1999; Takino et al., 1995a; Velasco et al., 2000).

L'implication de la MMP-2 dans la progression tumorale est bien connue. Initialement, la localisation de la MMP-2 à la surface de la membrane plasmique a été démontrée chez des cellules cancéreuses humaines du pancréas (Zucker et al., 1990). Cette dernière peut dégrader une grande variété de composantes de la matrice extracellulaire telles que le collagène de type I, IV, V, VII, XI, le collagène dénaturé, l'élastine, le protéoglycan, la laminine et la fibronectine (Matrisian, 1992; Stetler-Stevenson et al., 1993; Woessner, 1991;

Zucker et al., 1990). La synergie qui existe entre l'expression de la MT1-MMP et l'activation de la MMP-2 est importante pour la migration des cellules tumorales à travers la membrane basale (collagène de type IV) et le stroma (collagène de type I) des vaisseaux sanguins (Seiki and Yana, 2003). L'apport de la relation étroite entre ces 2 MMPs afin de favoriser le remodelage de la MEC est observée chez plusieurs types de tumeurs, incluant celles du poumon (Sato et al., 1994), du système gastrique (Nomura et al., 1995), du colon (Ohtani et al., 1996), du foie (Imamura et al., 1998) et du sein (Ueno et al., 1997). En plus de son importance dans l'expansion tumorale, la dégradation de la MEC est une étape indispensable à l'angiogenèse et à la formation de métastases.

Plusieurs équipes de recherche ont lié l'augmentation de la MMP-2 avec le potentiel métastatique des tumeurs. En fait, la dégradation du collagène de type IV (le substrat principal de la MMP-2), l'une des composantes majeures de la membrane basale des vaisseaux sanguins, favorise la formation de brèches qui permettent l'évasion des cellules cancéreuses de la masse tumorale primaire (Hofmann et al., 1999; Mercier and Ekindjian, 1990).

1.3.8.2 L'IGF-1

La famille des facteurs de croissance qui ressemblent à l'insuline (IGF) possède deux membres, soit l'IGF-I et l'IGF-II. Ces facteurs sont des polypeptides d'environ 70 acides aminés exprimés de façon ubiquistes et possédant une homologie avec l'insuline (Froesch and Zapf, 1985). Ces derniers, quoique similaires à l'insuline, lient des récepteurs qui leur sont spécifiques. Le récepteur de l'IGF-I (IGF-1R) est un hétérotétramère composé de deux

sous-unités α et de deux sous-unités β , liées par des ponts disulfures (Bhaumick et al., 1981; Chernausk et al., 1981; Jacobs et al., 1983; Nissley and Rechler, 1984). Malgré leurs similitudes, les récepteurs de l'insuline et ceux de l'IGF jouent des rôles distincts dans le développement et la biologie cellulaire. L'IGF semble avoir un rôle au niveau de la croissance cellulaire, tandis que l'insuline joue un rôle clé au niveau du métabolisme nutritionnel. Il a été démontré chez un modèle de souris que la déficience en récepteur de l'IGF-1 engendre un retard de croissance important ainsi qu'une mort post-natale rapide, et ce probablement à la suite d'une déficience respiratoire (Liu et al., 1993).

Tel que montré au tableau 1, le pro-récepteur de l'IGF-1 nécessite un clivage endoprotéolytique par une convertase de proprotéines afin d'acquérir sa maturité. La co-expression du IGF-1R et de certaines convertases (PC5A, PC7 et PACE4) chez des adénocarcinomes de colon LOVO (déficiente en furine), a démontré que le récepteur à l'IGF peut être maturé par la furine et la PC5A, deux locataires du TGN. De plus, l'expression du PDX inhibe la maturation de ce récepteur chez les cellules cancéreuses humaines HT-29 (Khatib et al., 2001).

Puisque l'IGF-1 est responsable de certains effets mitogéniques, il était logique de prédire que l'expression de son récepteur serait modulée dans les tumeurs. D'ailleurs, plusieurs cancers, dont celui du poumon, démontrent une augmentation des niveaux d'expression des récepteurs à l'IGF-1 (Macaulay et al., 1988).

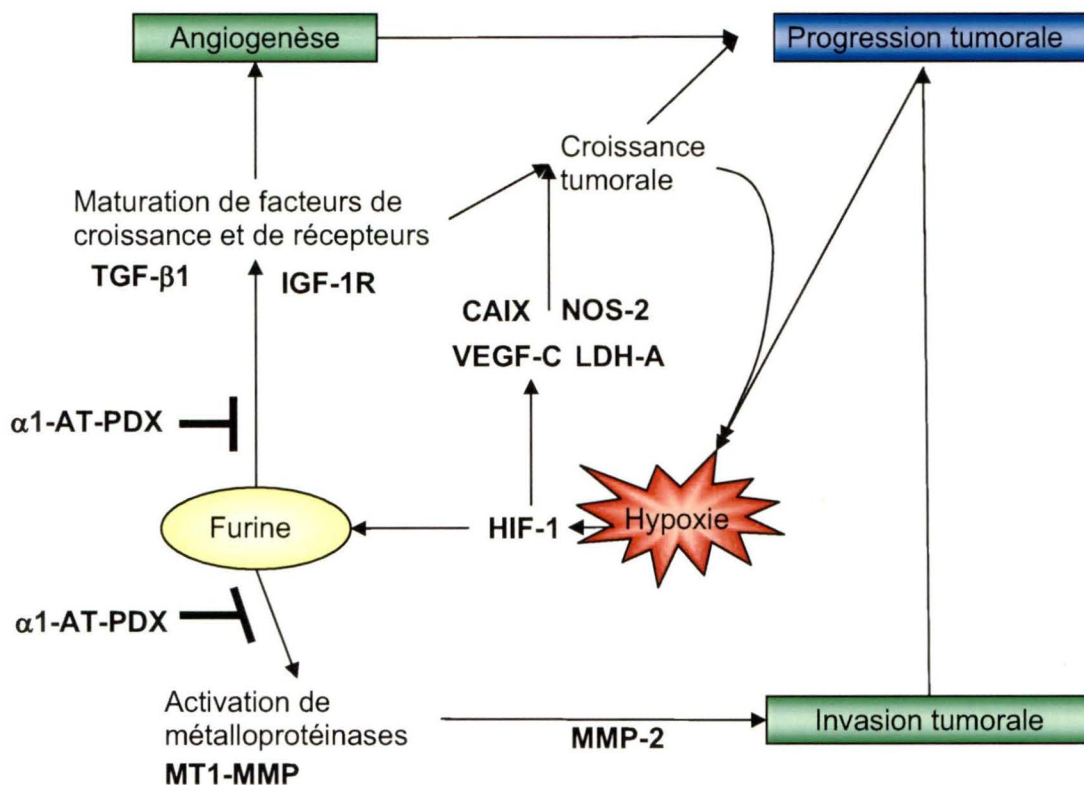


Figure 8. Impacts proposés de la régulation hypoxique de la furine dans la progression tumorale. L'expression de furine en hypoxie est responsable de la maturation d'un éventail large de substrats qui peuvent participer aux différents processus impliqués dans la progression tumorale.

1.4 Objectifs et pertinence de cette recherche

La progression des cancers fait appel à plusieurs protéines ayant des rôles distincts à toutes les étapes de la progression tumorale. La plupart de ces protéines sont synthétisées sous forme de zymogènes, c'est-à-dire de protéines non-actives requérant un clivage afin d'atteindre leur forme active. La furine, une endoprotéase de la famille des convertases de proprotéines, est responsable de la maturation de plusieurs pro-peptides dont l'implication dans la progression tumorale a été démontrée. La surexpression de la furine a été détectée chez plusieurs cancers et a été associée à un mauvais pronostic (Bassi et al., 2001b; Cheng et al., 1997). Plus récemment, le Dre. McMahon a démontré l'implication de l'hypoxie dans la régulation de la furine. De plus, l'inhibition de cette endoprotéase par l' α_1 -AT-PDX inhibe la croissance de tumeurs chez la souris (Khatib et al., 2001). L'objectif de cette recherche consiste donc à vérifier l'implication d'une surexpression de la furine en hypoxie dans la progression tumorale (figure 8). Pour ce faire, nous avons utilisé une construction plasmidique codant pour un inhibiteur de la furine, le PDX, sous le contrôle d'un promoteur minimal inductible en hypoxie par le HIF-1. Nous avons tout d'abord vérifié l'impact de l'inhibition de la furine en hypoxie sur certains substrats impliqués dans les processus de progression tumorale. Par la suite, nous avons regardé les effets produits par l'expression de PDX en hypoxie chez un modèle de xénogreffes chez des souris immunodéficientes. Les tumeurs obtenues ont été analysées afin de vérifier la présence de zones hypoxiques ainsi que de la surexpression de furine dans ces régions.

2.0 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Cultures cellulaires et transfections

Les cellules dérivées de fibrosarcomes humains HT1080 (ATCC, Manassas, VA) et des hépatomes humains HepG2 (ATCC, Manassas, VA) ont été cultivées dans des pétris de 10cm en présence de 5 ml de MEM (Modified Eagle Medium; GIBCO BRL, Burlington, ON, CAN) contenant 10% de sérum foetal bovin (FBS; Hyclone, UT, USA) et 0.04 mg/ml de gentamicine (SABEX 2002 inc, Qc, CAN). Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère normale contenant 5% de CO₂. Les cellules ont été passées à 80% de confluence.

Lors des expériences de transfections transitoires, les cellules ont étéensemencées à raison de 750 000 cellules par pétri de 10 cm (Sarstedt, Qc, CAN). Le jour suivant, les cellules ont été transfectées à l'aide du système de transfection FuGENE 6 (ROCHE, Laval, QC, CAN) selon un ration 1:3 (6 µg d'ADN : 18 µl FuGENE). Le lendemain, les cellules ont été utilisées pour les expériences.

Pour les transfections stables, deux jours après la transfection, les cellules ont été divisées dans 4 gros pétris de 15 cm (Sarstedt, Qc, CAN) et cultivées en présence de 1200 µg/ml ou 800 µg/ml d'antibiotique de sélection G418 (GIBCO BRL, Burlington, ON, CAN). La sélection clonale a été effectuée 7 à 9 jours après l'ajout de l'antibiotique. Les clones ont été cultivés dans les conditions de sélection dans des pétris de volume croissant suivant les niveaux de prolifération cellulaire. Pour l'obtention des populations de cellules stables

(pool), les cellules ont été transfectées de la même manière; aucune sélection clonale n'a été faite et les cellules ont été maintenues dans le milieu de sélection jusqu'à confluence et congelées.

Lors des expériences en hypoxie, les cellules ont étéensemencées à raison de 750 000 cellules par puits de 10 cm (Sarstedt, Qc, CAN). Le jour suivant, trois heures avant l'exposition en hypoxie, les cellules ont été lavées avec du PBS et mises en présence de milieu MEM sans sérum pour éliminer les effets dus aux facteurs de croissance contenus dans le FBS. Par la suite, les cellules ont été incubées pendant différents temps dans une chambre hypoxique à flux continu avec un mélange d'air contenant 5% de CO₂ et 95% d'azote (Praxair, Danbury, CT, USA).

2.2 Immunobuvardage de type Western

Suite à une exposition en hypoxie (environ 1% d'O₂) dans une chambre hermétique, les cellules ont été lavées avec du PBS froid, pour ensuite être récupérées avec 45 µl de tampon de lyse RIPA (150 mM NaCl, 50 mM pH 7.5 Tris-HCL, 1% NP-40, 0.5% Na-Déoxycholate, 0.1% SDS, 5mM EDTA et d'un cocktail d'inhibiteurs de protéines "Mini Complete Protease Inhibitor Cocktail"; ROCHE, Laval, QC, CAN). Les cellules ont été récupérées et incubées 30 minutes à 4°C avec rotation. Par la suite, elles ont été centrifugées à 12 000g pendant 30 minutes à 4°C. Les protéines des surnageants ont été dosées par essai colorimétrique dans une plaque de 96 puits. ("BCATM protein assay kit", PIERCE, Rockford, IL, USA). La lecture colorimétrique des échantillons a été réalisée en utilisant un lecteur de plaque automatique à 550 nm. (Modèle 3550, BIO-RAD, ON, CAN). La concentration en protéine

de chaque échantillon a été calculée en utilisant le logiciel “ Microplate Manager® ” fourni avec l’appareil. Les surnageants ont ensuite été congelés à -20°C pour conservation. Cent µg de protéines ont été mélangés avec un tampon d’échantillon 6X (0.375M Tris-HCl pH 6.8, 12% SDS, 60% glycérol, 0.075% bleu de bromophénol) et migrés sur un gel d’acrylamide de 20 cm de longueur.

Les protéines provenant des lysats cellulaires totaux ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions réductrices et dénaturantes. Le gel concentrateur était composé de 4% de bis-acrylamide (SIGMA) à pH 6,8 tandis que le gel séparateur était de 7.5% de bis-acrylamide à pH 8,8. Les protéines ont été dénaturées dans le tampon d’échantillon et chauffées à 100°C pendant 5 minutes avant d’être chargées sur le gel. La migration a été effectuée à l’aide d’un appareil de migration *PROTEIN II Xi Cell* (BIO-RAD, Mississauga, ON, CAN) à 150 volts dans le tampon d’électrophorèse (0.1% SDS, 25 mM Tris-base, 0.05 M glycine) jusqu’à ce que le front de migration sorte du gel. Par la suite, les protéines ont été transférées dans le tampon de transfert (20% v/v méthanol, 25 mM Tris-base, 0.2 M glycine) sur une membrane PVDF (ROCHE DIAGNOSTICS, QC, CAN) pendant 1 heure et 15 minutes à 80 volts (0.4-0.5A). Après le transfert, les membranes ont été bloquées durant 30 minutes dans une solution contenant 5% de lait en poudre CARNATION® (NESTLÉ, ON, CAN) dans du PBS à pH 7.4. Après le blocage, les membranes ont été incubées à 4°C avec agitation durant 16 heures en présence de la solution de blocage contenant un anticorps IgG de chèvre anti- α_1 -Antitrypsine (1:500; MP Biomedicals Inc., Cappel, Ohio, USA) pour l’ α_1 -AT-PDX, un IgG de lapin anti-MT1-MMP (1:1000; Research Diagnostics Inc., NJ, USA) pour MT1-MMP et un IgG de lapin anti-IGF-

1R β (clone C-20, 1:250; Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) dirigé contre la partie C-terminale de la chaîne β du récepteur à l'IGF-1. Suite à cette incubation, les membranes ont subi 3 lavages successifs de 10 minutes avec agitation dans une solution de PBS-Tween-20® (300 μ l Tween-20® (BIO-RAD) / 500ml de TBS). Les membranes ont ensuite été incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG couplé à la peroxidase (anti-chèvre:1/8000; anti-lapin:1/5000) (AMHERSHAM, ON, CAN), dilué dans la solution de blocage. Suite à une incubation de 2 h à la température de la pièce avec agitation, les membranes ont été lavées tel que mentionné ci-dessus. Les bandes immunoréactives ont été révélées avec le système de révélation ECL (AMHERSHAM, ON, CAN) et exposées sur un film ("Hyperfilm ECL", AMERSHAM, ON, CAN).

Pour les immunobuvardages de type Western des extraits tumoraux, les tumeurs ont été broyées dans du tampon RIPA (200 mg de tissus pour 2 ml de tampon) à l'aide d'un Polytron (Brinkman instruments, ON, CAN) et vortexées à toutes les 5 minutes pendant l'incubation de 30 minutes sur glace. Par la suite, les lysats ont été centrifugés à 12 000g durant 30 minutes à 4°C. Les surnageants ont été dosés pour leur contenu en protéine et le reste du protocole a été appliqué tel que décrit ci-haut.

2.3 Zymographie

Quarante huit heures avant l'expérience, les cellules ont étéensemencées à raison de 80 000 cellules par puits dans une plaque de 24 puits. Vingt quatre heures avant la récolte des surnageants, le milieu des puits a été remplacé par 500 μ l de MEM sans sérum. Seize heures avant la récolte des surnageants, les cellules ont été incubées soit en hypoxie ou en

normoxie. Par la suite, les surnageants ont été récoltés et centrifugés 15 minutes à 12 000g. Quatre-vingts microlitres de surnageant ont été mélangés avec 20 µl de tampon d'échantillon (0.5 M Tris-HCl pH 7.4, 10% SDS, 50% glycérol) et incubé 15 minutes à 37°C. Les protéines provenant des surnageants ont ensuite été séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide de 20 cm en condition non-dénaturante. Les gels concentrateurs et séparateurs étaient composés respectivement de 4% d'acrylamide (SIGMA) à pH 6,8 et 7.5% d'acrylamide à pH 8,8 et contenaient 0.1% de gélatine. La migration a été effectuée à l'aide d'un appareil de migration *PROTEIN II Xi Cell* (BIO-RAD, Mississauga, ON, CAN) à 100 volts dans le tampon d'électrophorèse (0.1% SDS, 25 mM Tris-base, 0.05 M glycine) jusqu'à ce que le marqueur de poids moléculaire sorte du gel. Par la suite, le gel de protéine a subi 2 séries de lavage de 15 minutes dans une solution contenant 2.5% de Triton X-100 (ICN Biomedicals, Germany) dans de l'eau distillée. Le gel a été rincé avec agitation dans de l'eau distillée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de bulles provenant du détergent Triton X-100. Le gel a été incubé avec agitation durant 16 heures à 37°C dans une solution d'activation enzymatique de la gélatinase (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM CaCl₂). Après l'incubation, le gel a été coloré 5 à 10 minutes avec une solution aqueuse de bleu de Coomassie (30% méthanol, 10% acide acétique glacial, 0.5% bleu de Coomassie). Le gel a par la suite été lavé avec agitation dans une solution de décoloration (30% méthanol, 10% acide acétique glacial) jusqu'à ce que les bandes de dégradation protéique soient visibles.

2.4 Modèle d'induction tumorale chez les souris

Les tumeurs ont été induites chez des souris femelles nues CD1 nu/nu âgées entre 28 et 42 jours (Charles River Laboratories, MA, USA). Une semaine avant l'injection des cellules,

l'antibiotique garamycine a été enlevé du milieu de culture des cellules HT1080. Quatre jours avant l'injection, l'antibiotique de sélection G418 a été enlevé du milieu de culture. Le jour de l'injection, les cellules ont été décollées à l'aide d'une solution de trypsine (invitrogen, ON, CAN) et centrifugées à 172 g. Les cellules ont été diluées dans du MEM sans antibiotique pour atteindre une concentration de 2.5×10^6 cellules/100 μ l. Cent microlitres de suspension cellulaire ont par la suite été injectés à l'aide d'une seringue à insuline (1cc Insulin Syringe U-100 29G1/2, Becton Dickinson, NJ, USA) de façon intradermique à 4 endroits sur le dos des souris. Les tumeurs ont été mesurées à intervalles réguliers à l'aide d'un pied à coulisse (« caliper ») électronique (Mitutoyo Corporation, Japan). La longueur et la largeur ont été mesurées et la formule $0.5 \times \text{longueur} \times \text{largeur}^2$ a été appliquée pour déterminer le volume en mm^3 des tumeurs. Les souris ont été sacrifiées lors de l'apparition de zones nécrotiques à la surface de la peau. Afin de détecter les zones pauvres en oxygène, une heure avant le sacrifice des souris, 100 mg/kg de pimonidazole (Hypoxyprobe-1 kit, Chemicon, CA) ont été injectés de façon intraveineuse ou intra-péritonéale. Par la suite, les souris ont été anesthésiées avec une injection intra-péritonéale d'une solution de kétamine/xylazine (87 mg/kg et 13 mg/kg respectivement; Bioniche, ON, CAN) et perfusées par gravité via le ventricule gauche avec une solution de PBS ainsi qu'avec une solution de 4% paraformaldéhyde pour la fixation des tissus. Par la suite, les tumeurs ont été excisées et placées dans une solution de formol 10% durant 24 h. Ces tumeurs ont ensuite été enrobées dans de la paraffine et coupées au service de pathologie du Centre Hospitalier de l'Université de Sherbrooke (CHUS).

2.5 Construction des plasmides

Tous les plasmides utilisés ont été amplifiés dans des bactéries compétentes *E.coli* DH5 α . Suite à la transformation, les bactéries ont étéensemencées sur des pétris de 10 cm de milieu Luria-Bertani (LB) contenant 1.5 % d'agar et 60 μ g/ml d'ampicilline et incubé à 37°C pendant 16 h. Par la suite, une colonie par plasmide a été prélevée et amplifiée dans 150 ml de milieu LB contenant 50 μ g/ml d'ampicilline pendant 16 h avec agitation. Les plasmides ont été purifiés à l'aide d'un système de purification plasmidique (HiSpeed Plasmid Maxi Kit; Quiagen, ON, CAN).

Toutes les enzymes de restriction utilisées dans les constructions plasmidiques proviennent de NEW ENGLAND BIOLAB (ON, CAN) et ont été utilisées selon le protocole de la compagnie. Les fragments de digestions ont été séparés par migration sur gel d'agarose 1.5% dans du TBE 0.5 X (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA). Les fragments désirés ont ensuite été découpés, extraits du gel et purifiés à l'aide d'un kit de purification (QIAquick Gel extraction Kit; Quiagen, ON, CAN) suivant le protocole de la compagnie. La ligation des différents fragments d'ADN a été réalisée en ajoutant 1U de l'enzyme ligase d'ADN T4 (PROMEGA, Madison, WI, USA) à une solution contenant 500 ng d'ADN total (ratio plasmide:insert de 1:5) et du tampon ligase (1 X final) fourni avec l'enzyme dans un volume final de 10 μ l. La ligation a été effectuée à 25°C pendant 1 h pour les fragments aux extrémités cohésives et à 4°C pendant 16 h pour les fragments aux extrémités franches.

2.6 Construction plasmidique pGL3-6HRE-TK-Luc

Quatre oligonucléotides, encodant les trois répétitions du HRE de l'érythropoïétine ont été

synthétisés (Invitrogen, On, Canada) Les sections soulignées représentent les séquences d'ADN provenant du gène de l'EPO contenant les sites HBS (orange) et HAS (bleu) constituant les motifs HRE.

Oligonucléotide 1

5'-CCGGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACCTCTCGACCTACC
GGCCGTTTCGAAGCCCTACGTGCTGTCTCACAC

Oligonucléotide 2

3'-CGGGATGCACGACAGAGTGTGTCGGACAGACTGGAGAGCTGGATGG
CCGGCAAGCTTCGGGATGCACGACAGAGTGTGTCGGAA

Oligonucléotide 3

5'-AGCCTTCTGATCTCGACCTACCGGCCGTTTCGAAGCCCTACGTGCTGTCTCA
CACAGCCTGTCTGACCTCTCGACCTACCGG

Oligonucléotide 4

3'-GACTAGAGCTGGATGGCCGGCAAGCTTCGGGATGCACGACAGAGTGTGTC
GGACAGACTGGAGAGCTGGATGGCCGGCC

Afin de reconstituer l'ADN double brin contenant les 3 séquences HRE, les oligonucléotides 1 et 2 (insert #1), ainsi que 3 et 4 (insert #2), ont été appariés selon un ratio de 1:1 dans de l'eau contenant 10% de tampon #3 pour enzyme de restriction de NEW ENGLAND BIOLAB (ON, CAN). Les paires d'oligonucléotides ont été chauffées 10 minutes à 94°C dans un appareil à PCR (MJ RESEARCH, ON, CAN) et ont été laissées dans l'appareil

jusqu'à ce que la température atteigne 25°C. Les tubes ont été laissés à température pièce durant 2 heures. Les fragments d'ADN ont été insérés en amont de la séquence 3HRE du plasmide pGL3-3HRE-TK-Luc provenant du Dr. Daren Richard (Université Laval, CAN) disponible dans le laboratoire, préalablement digéré par XmaI.

2.7 Construction des plasmides pCDNA3.1-3HRE-PDX et pCDNA3.1-6HRE -PDX

Les séquences contenant 3 ou 6 répétitions du HRE de l'érythropoïétine ainsi que le promoteur minimal de la thymidine kinase (TK) du plasmide pGL3-basic-3HRE-TK-Luc et du plasmide pGL3-basic-6HRE-TK-Luc, ont été excisées par une double digestion EcoI-CRI-HindIII. Cette séquence a été insérée dans le plasmide pcDNA3.1/*Myc*-HIS (Invitrogen, ON, CAN) dans lequel les nucléotides 209-995 contenant le promoteur CMV, ont préalablement été délétés par une double digestion NruI et HindIII.

Par la suite, le plasmide pBluescript KS(+)/PDX fourni par Jeff Lipps (HEDRAL THERAPEUTICS, Portland, OR, USA) a été digéré par une double digestion EcoRI-XhoI pour extraire l' α 1-AT-PDX. Le fragment obtenu a été inséré dans le plasmide pcDNA3.1/*Myc*-HIS (Invitrogen, ON, CAN) préalablement digéré par EcoRI et XhoI, pour donner le plasmide pcDNA3.1-PDX, dans lequel l' α 1-AT-PDX est orienté de façon anti-sense. La séquence codante du PDX a été extraite de ce nouveau plasmide par une digestion HindIII-XbaI, pour être insérée dans les plasmides pcDNA3.1/*Myc*-HIS-3HRE-TK et pcDNA3.1/*Myc*-HIS-6HRE-TK, digérés par les mêmes enzymes de restrictions.

2.8 Essais luciférase

Les cellules HepG2 ont étéensemencées à raison de 80 000 cellules par puits dans des plaques à 6 puits et ont été transfectées avec les plasmides pGL3-3HRE-TK-Luc et pGL3-6HRE-TK-Luc par la technique de précipitation au CaPO_4 (*Mammalian Cell Transfection Kit*; Speciality Media, NJ, USA). Vingt quatre heures après la transfection, les cellules ont été incubées pendant 16 h en hypoxie ou en normoxie, dans du milieu sans sérum. Les cellules ont par la suite été lysées dans un tampon de lyse à pH 7,8 (25 mM Gly-Gly, 15 mM MgSO_4 , 4 mM EGTA, 1% Triton et 2 mM DTT). Les lysats ont été centrifugés et l'activité luciférase des surnageants a été quantifiée à l'aide du tampon d'activation de la luciférase (25 mM Gly-Gly, 15 mM MgSO_4 , 4 mM EGTA, 15 mM KH_2PO_4 et 5 mM ATP à pH 7,6) et d'un luminomètre (Berthold Technology, Allemagne). Le vecteur pGL2 a été utilisé en tant que contrôle interne de la transfection.

2.9 Immunocytochimie et immunohistochimie

Pour les expériences de marquage *in vitro*, les cellules ont étéensemencées à raison de 60 000 cellules par puits dans une plaque à 6 puits, sur des lamelles préalablement déposées au fond des puits. Le lendemain, les cellules ont été lavées avec du PBS et mises en présence de milieu sans sérum ainsi que de 150 mM de pimonidazole pour les expériences portant sur la détection de l'hypoxie. Les cellules ont été cultivées en normoxie ou en hypoxie pendant 16 h. Les cellules ont été rincées avec du PBS froid et fixées avec une solution 4% de paraformaldéhyde pendant 30 minutes à 4°C. Par la suite, elles ont été perméabilisées avec une solution de saponine 2% pendant 30 minutes et les épitopes non spécifiques ont été bloqués avec une solution composée de 2% d'albumine de sérum bovin

(BSA) et 5% de lait en poudre CARNATION®. Les anticorps primaires dirigés contre la furine (PAI-062), le *trans*-Golgi (TGN 46), le pimonidazole (Hypoxyprobe™-1 MAb1) et le PDX (anti α 1-antitrypsine, Cappel) ont été incubés à une dilution de 1 μ l dans 200 μ l, 1 μ l dans 2500 μ l et 1 μ l dans 50 μ l respectivement dans la solution de blocage pendant 2 h à la température de la pièce. Après avoir lavé les cellules 2 fois durant 10 minutes dans une solution PBS-Tween 0.1%, les cellules ont été incubées 1h à la température de la pièce avec leur anticorps secondaire respectif, soit l'IgG anti-lapin couplé à la rhodamine ou au Cy-2 pour la furine, l'IgG anti-chèvre couplé à la rhodamine pour le *trans*-Golgi ainsi que l'IgG anti-souris couplé à la rhodamine ou au Cy-2 pour le pimonidazole. Finalement, les cellules ont été lavées avec la solution de PBS-Tween et montées sur des lames avec du FluoroGuard (Bio-Rad). L'expression et la localisation des différentes protéines marquées ont été visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence Axioskop 2 (ZEISS, Allemagne).

Pour le marquage des coupes de tumeurs, les tissus ont été déparaffinés par 2 bains successifs de 5 minutes dans du toluène. Par la suite, ils ont été réhydratés par des immersions de 5 minutes dans des bains contenant des solutions de concentrations décroissantes d'éthanol (100%, 90%, 70%, 50%, 0%). Les tissus ont été perméabilisés à l'aide d'une solution de saponine 2% pendant 30 min à 4°C. Par la suite, les antigènes ont été démasqués («antigen retrieval») par une immersion de 10 minutes dans une solution de EDTA à 0.001 M à 100 °C, et laissés 10 autres minutes dans la solution, mais sans source de chaleur. Le blocage et le marquage avec l'anticorps primaire ont été effectués tel que décrit ci-haut.

Pour le marquage utilisant des anticorps secondaires couplés à la peroxydase, les lames ont été préalablement incubées dans une solution de méthanol contenant 3% d'urée juste avant la réhydratation, permettant ainsi d'inhiber l'activité peroxydase endogène des tissus. Le reste du protocole est identique et diffère seulement au niveau du substrat utilisé et de la coloration. Donc, après avoir incubé les coupes en présence des anticorps secondaires couplés à la peroxydase durant 30 minutes à la température de la pièce, les tissus ont été colorés à l'aide d'une solution d'hématoxyline (Sigma, ON, CAN) et incubés durant quelques secondes en présence du substrat de la peroxydase (DAB; Sigma). Finalement, les coupes ont été montées avec du « permount » (Sigma) et visualisées par microscopie.

2.10 Essais d'invasion

Des filtres de polycarbonate ayant des pores de 8 μm (13 mm; Osmonics, MA, USA), ont été enduit avec 100 μl de collagène de type IV (Sigma; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans 0.1% d'acide acétique). Les filtres ont été incubés 1 heure à 37 $^{\circ}\text{C}$ et ont été lavés avec de l'eau stérile et laissés séchés dans des conditions atmosphériques stériles. L'homogénéité du recouvrement de collagène a été vérifiée par une coloration au bleu de Coomassie.

L'essai de migration a été effectué *in vitro* dans des chambres de Boyden à l'aide des filtres décrits ci-haut. Les puits du haut ainsi que les puits du bas des chambres de migration, délimités par les filtres de collagènes, contiennent du milieu MEM (Sigma) et 0.01% de sérum fœtal bovin (FBS; Hyclone, UT, USA). Dans les puits du haut, 8×10^4 cellules ont étéensemencées et incubées durant 16 heures à 37 $^{\circ}\text{C}$ dans une atmosphère normoxique ou hypoxique. Par la suite, les filtres ont été fixés dans une solution de 4% paraformaldéhyde

durant 15 minutes, perméabilisées dans du méthanol durant 10 minutes et coloré dans une solution 1% de cristal violet (25% éthanol) durant 10 minutes. Les cellules qui ont atteint l'envers des filtres ont été dénombrées à l'aide d'un microscope optique (Micromaster, model CK, Fisher Scientific, ON, CAN) à une amplitude de 400X. Dix champs aléatoires par filtre ont été comptés.

3.0 RÉSULTATS

3.1 Expression de la furine dans les zones hypoxiques tumorales

3.1.1 Détection de l'hypoxie *in vitro* et *in vivo*

Afin de déterminer l'implication *in vivo* de l'augmentation de la furine en hypoxie, nous avons tout d'abord vérifié s'il y avait une augmentation de l'expression de la furine dans les régions hypoxiques des tumeurs. Pour ce faire, nous avons besoin d'un système permettant la détection des zones hypoxiques intra-tumorales. Nous avons donc utilisé un marqueur chimique, le pimonidazole (1-[(2-hydroxy-3-piperidiny)propyl]-2-nitorimidazole hydrochloride). Cette molécule bioréductrice, utilisée en clinique, est réduite de façon biochimique et lie les tissus lorsque la pression d'oxygène est plus faible que 10 mm de mercure (Gross et al., 1995; Raleigh et al., 2000). Afin de démontrer l'efficacité de ce produit, les cellules HT1080 ont été cultivées en hypoxie en présence de pimonidazole. Ces cellules, des fibrosarcomes humains isolés en 1948, se répliquent rapidement et sont capables de former des xénogreffes chez les souris immunodéficientes (Rasheed et al., 1974). Ces cellules ont été utilisées à plusieurs reprises dans des expériences portant sur la progression tumorale et seront le principal modèle utilisé pour la suite des expériences

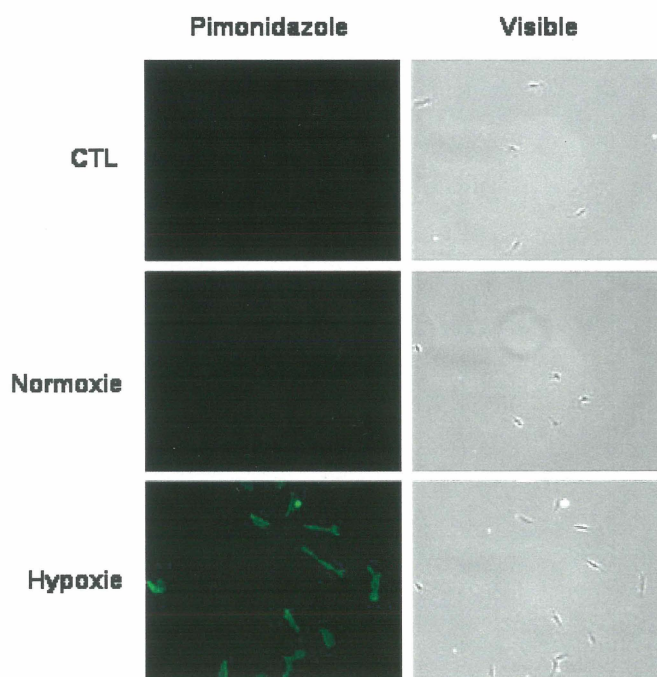


Figure 9. Détection de l'hypoxie chez les cellules HT1080 cultivées *in vitro*. Les cellules HT1080 cultivées sur lames ont été exposées 16 heures en hypoxie ou en normoxie en présence de pimonidazole. Analyse immunocytochimique du marquage utilisant un anticorps spécifique contre la forme réduite du pimonidazole. CTL, cellules exposées 16 heures en hypoxie, révélées seulement à l'aide d'un anticorps secondaire. Colonne de gauche, marquage vert révélant le pimonidazole (40X). Colonne de droite, visible (40x).

(Cowen et al., 2004; Gupta et al., 2001). De plus, les HT1080 possède une mutation dans le codon 61 du gène N-ras, activant de façon endogène la protéine résultante (Bos et al., 1984). Cette mutation participe directement au maintien du phénotype transformé de ces cellules et altère la production de certaines molécules, telles que la fibronectine et les protéoglycans (Chandler and Bourgeois, 1991; Paterson et al., 1987; Timar and Paterson, 1990). Tel que démontré à la figure 9, les cellules qui ont été incubées dans une atmosphère pauvre en oxygène présentent un marquage immunocytochimique mis en évidence grâce à un anticorps spécifique à la forme réduite du pimonidazole. Par ailleurs, ce marquage est absent chez les cellules cultivées en normoxie.

En ce qui attrait à la révélation des zones hypoxiques chez les tumeurs formées chez le modèle de xénogreffes, le marqueur d'hypoxie a été injecté de façon I.P. dans l'animale 1 heure avant son sacrifice afin qu'il puisse circuler dans l'organisme et atteindre les zones pauvres en oxygène. Le marquage immunohistochimique des coupes de tumeurs avec l'anticorps anti-pimonidazole, a mis en évidence la présence de plusieurs régions hypoxiques à l'intérieur des tumeurs (figure 10). Ces régions sont hétérogènes, elles se retrouvent majoritairement près des zones nécrotiques et à distance des vaisseaux sanguins. Ceci est en lien avec le fait que plus on s'éloigne des vaisseaux sanguins, plus l'apport en oxygène diminue, ce qui augmente la réduction du pimonidazole (Rijken et al., 2000).

3.1.2 Détection de la furine en immunofluorescence *in vitro* et *in vivo*

Afin de visualiser la furine au niveau des coupes de tumeurs, nous avons mis au point le marquage de cette dernière chez les cellules HT1080 de type sauvage en culture. Tel que

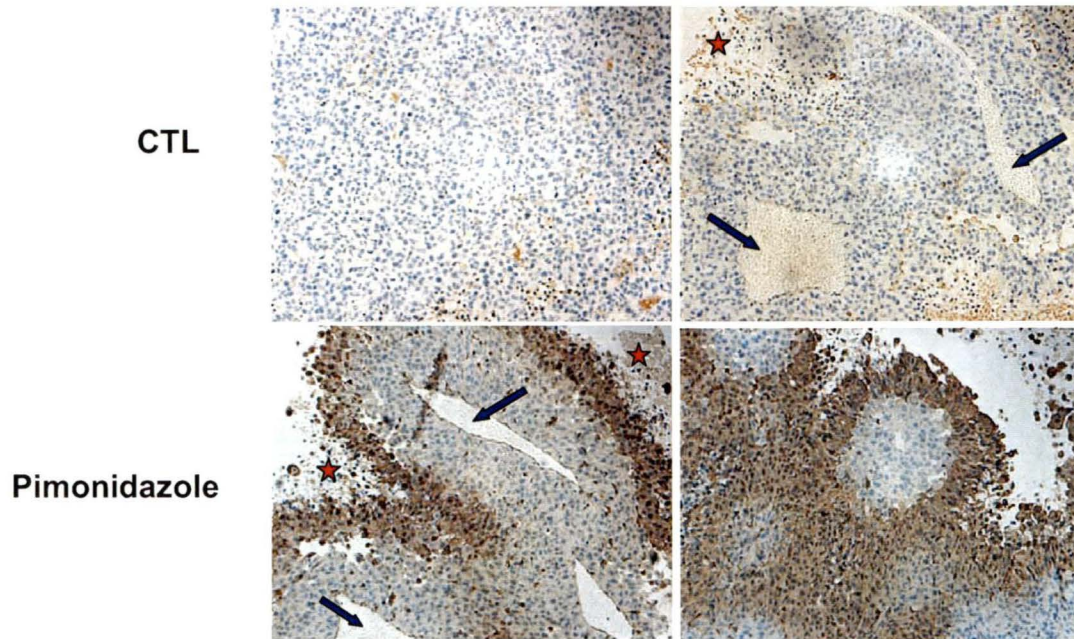


Figure 10. Détection des zones hypoxiques tumorales.

Analyses immunohistochimiques des coupes de tumeurs obtenues au jour 25 après l'injection des populations de HT1080. Marquage immunohistochimique à l'aide d'un anticorps spécifique à la forme réduite du pimonidazole. CTL, coupes tumorales révélées seulement à l'aide d'un anticorps secondaire. Les flèches bleues indiquent les vaisseaux sanguins et les étoiles rouges indiquent les zones nécrotiques.

discuté auparavant, la furine réside principalement au TGN. Nous avons donc vérifié la spécificité du marquage de la furine en utilisant un anticorps contre une protéine résidente du TGN, soit la TGN46. Tel qu'observé à la figure 11A, les résultats d'immunofluorescence nous indiquent que la furine est présente chez les cellules HT1080 et se situe surtout dans la région péri-nucléaire de ces cellules. De plus, son expression colocalise avec le marqueur spécifique du TGN. Ce patron d'expression concorde avec les expériences effectuées par plusieurs groupes de recherche (Cao et al., 2005; Wang et al., 2004).

Nous avons par la suite co-localisé la furine et le TGN dans les coupes de tumeurs enrobées de paraffine. En général, la furine semble colocaliser avec le TGN des cellules qui composent la tumeur. Cependant, il semble y avoir une délocalisation de la furine chez certaines cellules (figure 11C). De façon intéressante, suite à une exposition de 16 heures en hypoxie des cellules HT1080 *in vitro*, on observe une décompartmentation similaire de la furine (figure 12). Celle-ci semble quitter le TGN pour se diriger vers la membrane plasmique.

Suite à ces résultats, démontrant l'expression de furine chez les tumeurs, nous avons voulu mettre en évidence la co-localisation de l'expression de furine ainsi que les régions hypoxiques tumorales. Les résultats d'immunofluorescence nous démontrent que l'expression de furine corrèle avec la détection de la forme réduite du pimonidazole, donc

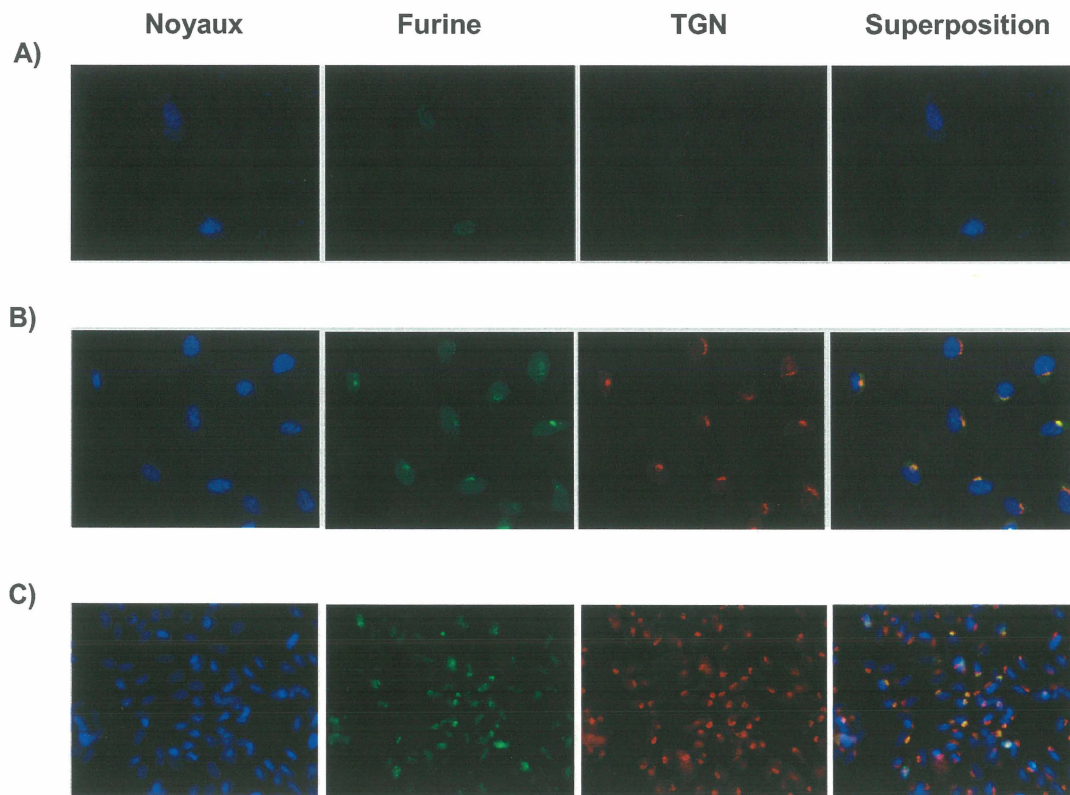
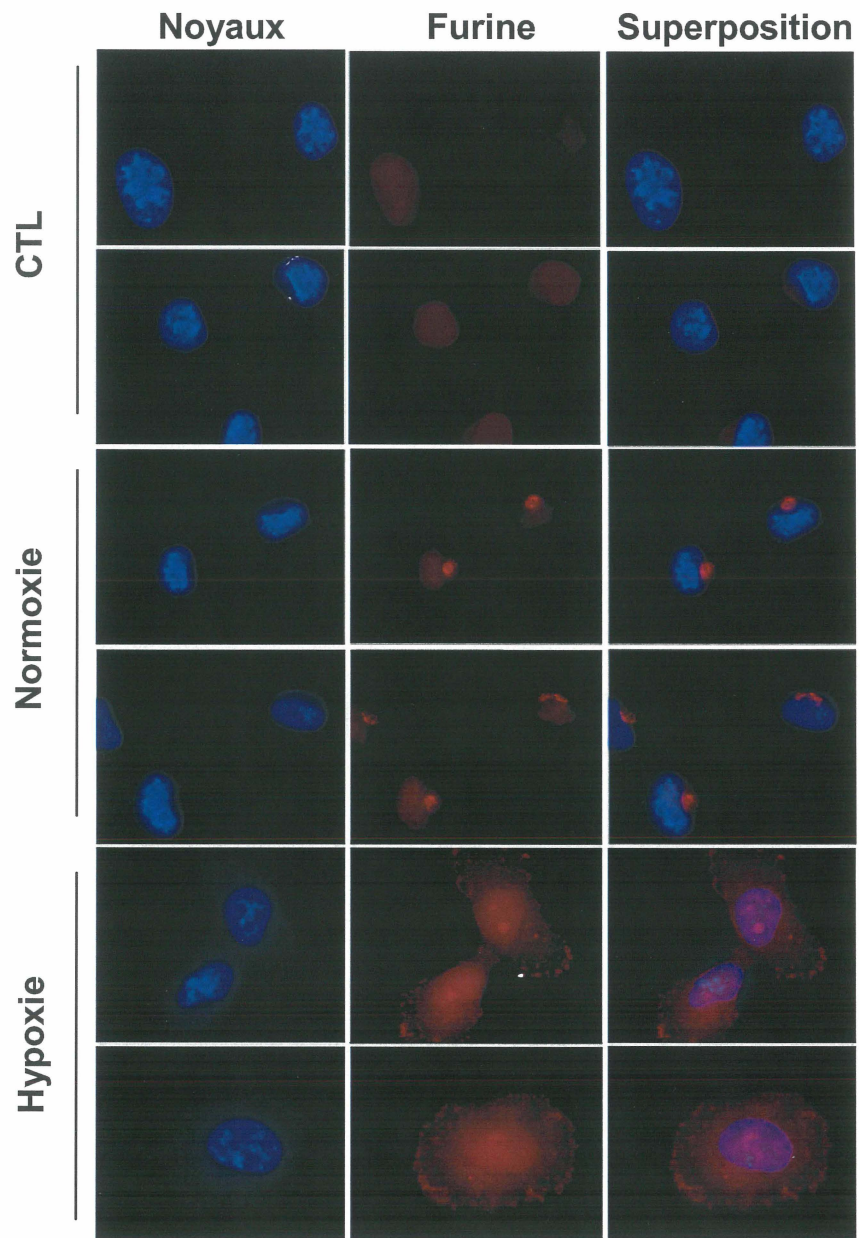


Figure 11. Localisation intracellulaire de la furine. Analyse de l'expression de la furine et de la localisation du réseau du *trans*-Golgi à l'aide d'anticorps spécifiques à la furine (PAI-062, vert) et au TGN (TGN46, rouge). L'ADN présent dans les noyaux cellulaires a été marqué au DAPI (bleu). Les cellules HT1080 cultivées sur lames ont été exposées pendant 16 heures à une atmosphère normoxique. A) Cellules révélées seulement à l'aide d'un anticorps secondaire. B) Cellules révélées à l'aide des anticorps spécifiques à la furine et au TGN. C) Marquage de coupes de tumeurs obtenues 30 jours après l'injection de HT1080 de type sauvages.

Figure 12. Relocalisation de la furine en hypoxie. Analyse de la localisation de la furine à l'aide d'anticorps spécifiques à la furine (PAI-062, rouge). L'ADN présent dans les noyaux cellulaires a été marqué au DAPI (bleu). Les cellules HT1080 ont été cultivées sur lames pendant 16 heures en présence d'une atmosphère hypoxique ou normoxique. Amplification du champ visuel de 1000X.



avec les zones hypoxiques (figure 13). Ces résultats indiquent que la furine est exprimée dans les régions hypoxiques des tumeurs *in vivo*.

Afin de vérifier l'implication de l'expression de furine en hypoxie dans la progression tumorale, nous avons produit et utilisé des constructions plasmidiques nous permettant d'inhiber spécifiquement la furine dans les régions hypoxiques des tumeurs. Pour ce, nous avons utilisé l' α 1-AT PDX (PDX), un inhibiteur de la furine. Certaines équipes ont déjà démontré qu'une expression continue de cet inhibiteur, à l'aide d'un promoteur CMV, peut diminuer la croissance et l'incidence des tumeurs dans des expériences de xénogreffes chez la souris (Bassi et al., 2001a; Khatib et al., 2001).

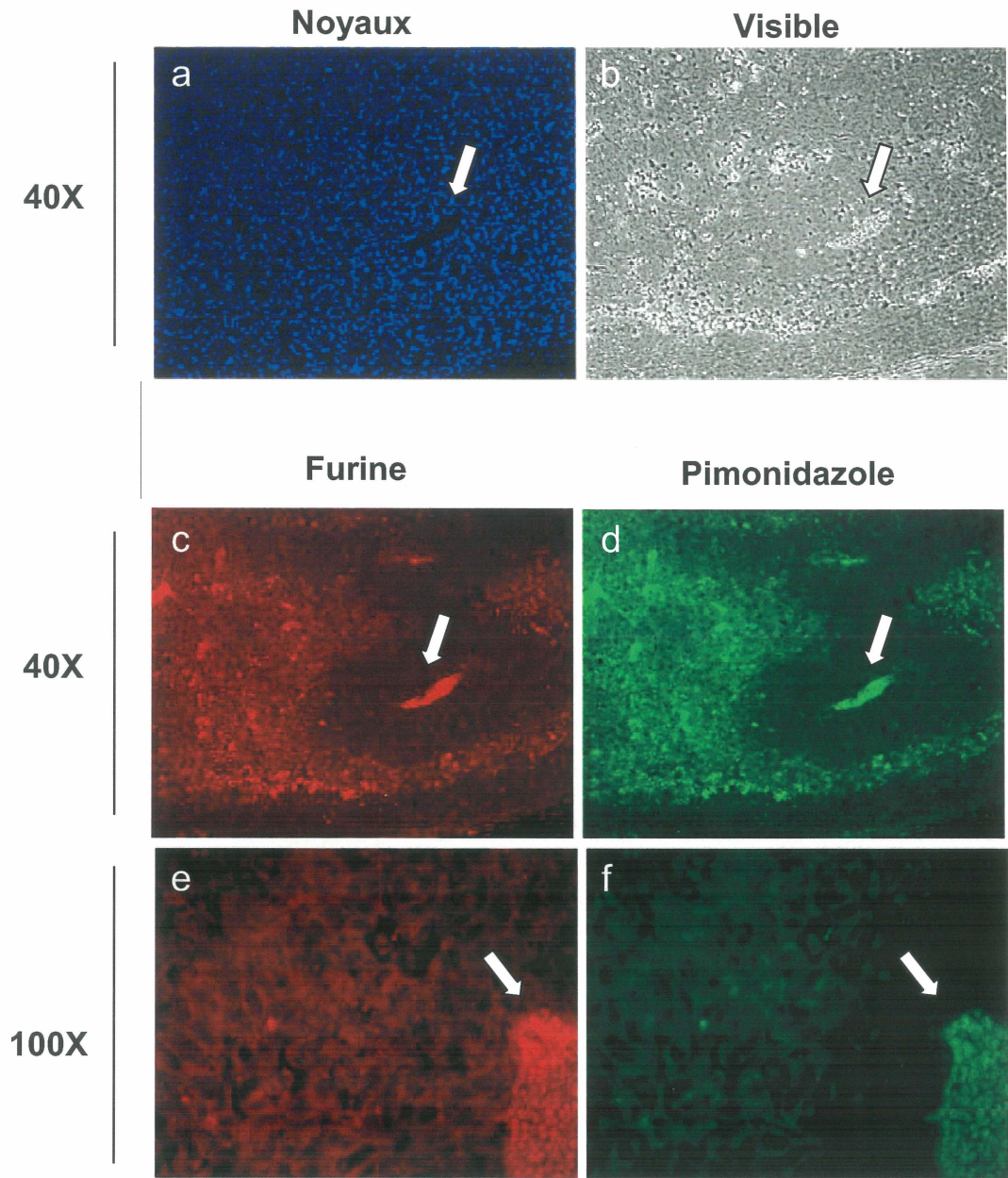
3.2 Construction des plasmides encodant l'inhibiteur de la furine (PDX), sous le contrôle d'un promoteur régulé en hypoxie

3.2.1 Construction des amplificateurs 3 et 6HRE

Depuis quelques années, plusieurs équipes de recherche ont tenté d'exploiter la présence de zones hypoxiques intra-tumorales afin d'inhiber la croissance des tumeurs. Pour ce faire, certains groupes ont utilisé des constructions plasmidiques codant pour des agents chimiothérapeutiques ou pour des protéines virales, dont l'expression est sous le contrôle d'éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) reconnues par le HIF-1. Ces constructions permettent une expression de ces protéines directement à l'intérieur des régions hypoxiques des tumeurs afin d'induire la mort des cellules cancéreuses (Cowen et al., 2004; Patterson et al., 2002; Post and Van Meir, 2003). Nous nous sommes donc inspirés de cette stratégie afin d'exprimer l'inhibiteur de la furine, et ce, en utilisant la séquence HRE provenant de la

Figure 13. Localisation de la furine dans les zones hypoxiques tumorales.

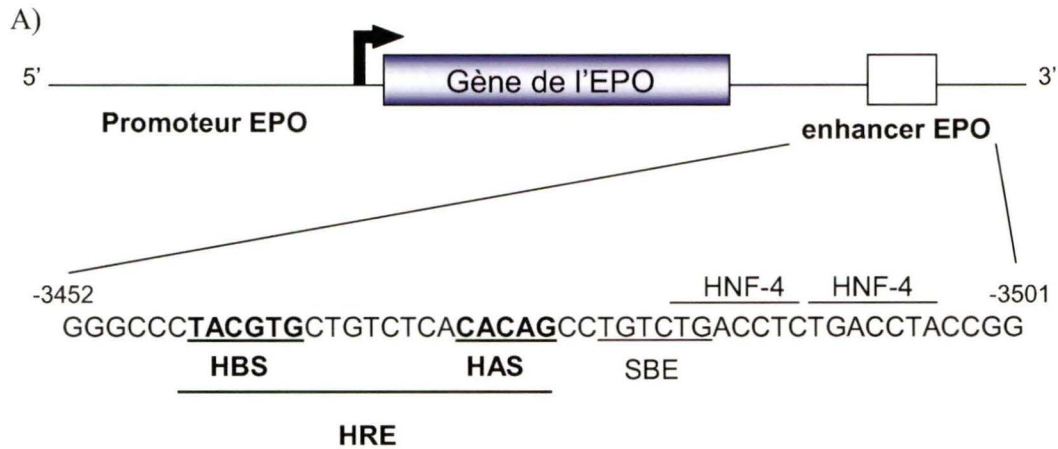
a) Les noyaux des cellules tumorales ont été colorés avec du DAPI. b) Photo du même champ prise dans le visible. Marquage immunohistochimique sur des coupes de tumeurs de 5µm d'épaisseur à l'aide d'un anticorps spécifique à la furine (c et e) et d'un anticorps spécifique à la forme réduite du pimonidazole (d et f). Les photos des figures a) à d) ont été prises sur les mêmes coupes de tumeur. Les flèches indiquent les vaisseaux sanguins, visibles grâce à l'auto-fluorescence des globules rouges.



région 3' du gène de l'érythropoïétine (EPO) (figure 14A). Cette séquence « enhancer », permettant une augmentation de l'activité des promoteurs, a été utilisée avec succès dans plusieurs expériences d'induction de diverses protéines en hypoxie (Ruan et al., 1999; Su et al., 2002).

Afin d'exploiter cette stratégie, nous devions premièrement trouvé les conditions optimales permettant d'exprimer la protéine d'intérêt, soit le PDX, en hypoxie, tout en gardant les niveaux de production en normoxie à leur plus bas. Pour ce faire, nous avons utilisé un plasmide rapporteur disponible dans le laboratoire, soit le pGL3-3HRE-Luc, qui contient un « enhancer » formés de 3 séquences successives d'une région issue du gène de l'EPO contenant un HRE (séquence 3452 à 3501 du gène de l'EPO; Genbank M11319) placé en amont d'un promoteur de la tyrosine kinase (TK) (figure 14B). Ce promoteur minimal TK est nécessaire à la production de luciférase puisqu'il permet à la machinerie de transcription cellulaire de lier la séquence codante. Tel qu'observé à la figure 14C, cette construction permet une augmentation de l'expression de la luciférase en hypoxie, tandis qu'en normoxie, l'expression est beaucoup plus faible. À la lumière de ces observations, nous avons évalué la possibilité qu'une séquence contenant un nombre plus élevé de répétitions HRE puisse augmenter davantage l'activité du promoteur et ainsi engendrer une meilleur production de protéines en hypoxie. Pour ce, des oligonucléotides contenant 3 répétitions de la séquence EPO³⁴⁵²⁻³⁵⁰¹ ont été synthétisés et les séquences insérées en amont des autres sites de reconnaissance du HIF-1 du plasmide pGL3-3HRE-Luc, afin d'obtenir un plasmide contenant 6 répétitions de la séquence EPO³⁴⁵²⁻³⁵⁰¹ (figure 14B).

Figure 14. Analyse fonctionnelle des constructions HRE. A) Segment d'ADN provenant d'un « enhancer » du gène de l'érythropoïétine (EPO³⁴⁵²⁻³⁵⁰¹), possédant un site de liaison au HIF-1 et utilisé dans les constructions plasmidiques possédant des répétitions de HRE. B) Séquences d'ADN des régions promotrices des constructions pGL3-3HRE-TK-Luc ainsi que pGL3-6HRE-TK-Luc, obtenues suite à leur séquençage. Les régions en gras représentent la séquence d'ADN contenant les répétitions de HRE; les fragments soulignés représentent les HBS et HAS constituant les HRE; la séquence en mauve représente le promoteur minimal de la thymidine kinase. C) Activité luciférase des cellules HepG2 transfectées avec les plasmides 3 ou 6HRE-TK-Luc, privées de sérum et stimulées 16 heures en hypoxie (H) ou en normoxie (N). Moyennes des résultats de 3 expériences distinctes, en triplicata.



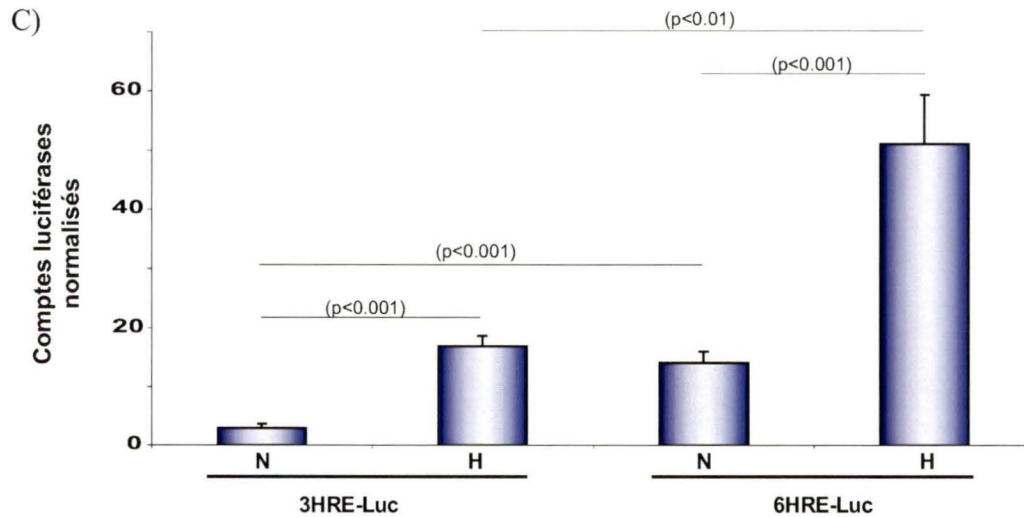
Adapté de Sánchez-Elsner et al., 2004

B)
3HRE-TK

GCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACCTCTCGACCTACCGGCCGTTCGAAGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTTCTGATCTCGACCTACCGGCCGTTCGAAGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACCTCTCGACCTACCGGCCGTTTCGAGTTCGACAGCTGTAAGTTCGAGATCCGGCCCCGCCAGCGTCTTGTTCATTGGCGAAATTCGAACACGCAGATGCAGTCCGGGGCGGCGCGGTCCGAGGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCCTGCAGCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTGCCG

6HRE-TK

GCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACCTCTCGACCTACCGGCCGTTCGAAGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTTCTGATCTCGACCTACCGGCCGTTTCGAGTTCGACAGCTGTAAGTTCGAGATCCGGCCCCGCCAGCGTCTTGTTCATTGGCGAATTCGAACACGCAGATGCAGTCCGGGGCGGCGCGGTCCGAGGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCCTGCAGCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTGCCG

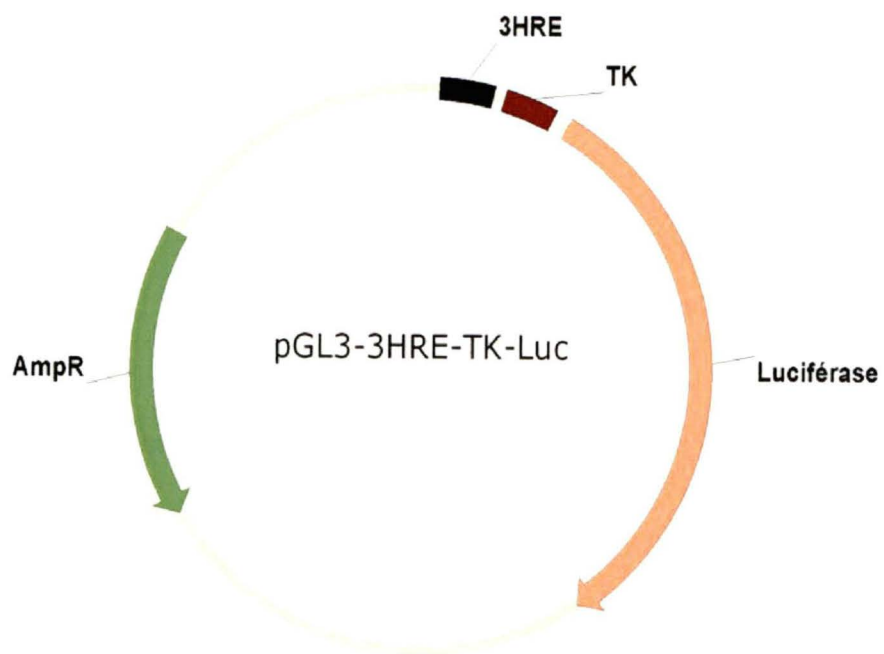


Afin de vérifier l'efficacité de ces répétitions, chacun des plasmides (pGL3-3HRE/6HRE-Luc) ont été transfectés de façon transitoire chez plusieurs types cellulaires, dont des cellules d'hépatomes humains (HepG2). Suite à la lyse cellulaire, l'activité luciférase a été évaluée en fonction de la concentration d'oxygène à laquelle avait été soumise les cellules. Lors d'une exposition de 16 heures en hypoxie, nous remarquons une augmentation de l'expression de la luciférase de 8 et 4 fois par rapport à leur contrôle en normoxie, dans les cellules transfectées avec les plasmides contenant 3 et 6 répétitions du HRE respectivement (figure 14C). Ces niveaux d'induction sont retrouvés dans plusieurs systèmes différents, utilisés par d'autres équipes de recherches (Post and Van Meir, 2003; Rapisarda et al., 2002). On remarque qu'en normoxie, le pGL3-6HRE-Luc possède une activité basale supérieure à celle du pGL3-3HRE-Luc, ce qui diminue l'induction en hypoxie. Cette augmentation de l'activité des promoteurs TK en normoxie, soit en conditions où le HIF-1 se retrouve à son niveau le plus bas, suggère que la séquence EPO³⁴⁵²⁻³⁵⁰¹ utilisée répond à des facteurs de transcription autres que le HIF-1. En effet, l'analyse de la séquence EPO³⁴⁵²⁻³⁵⁰¹ indique, en plus du HRE, la présence de 2 sites consensus HNF-4, un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires pouvant moduler l'activité de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés et du glucose (Hirota et al., 2005), ainsi qu'un site de liaison aux Smads (SBE) (figures 14A).

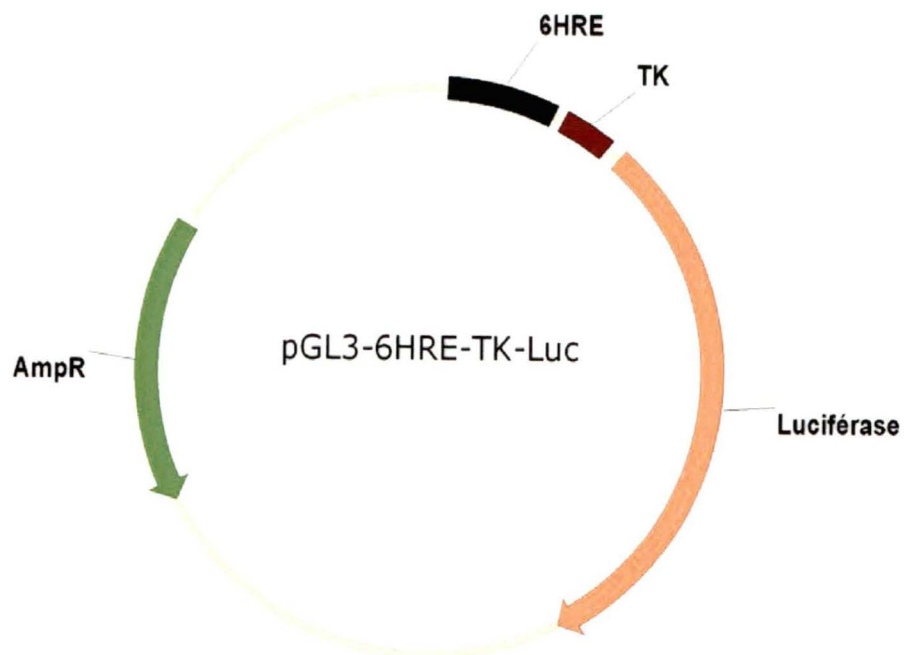
Puisque l'augmentation des répétitions HRE semble favoriser l'activation de promoteurs en condition normale d'oxygène et que notre objectif est de produire un inhibiteur de la furine (PDX) exprimé seulement en hypoxie, nous n'avons pas augmenté le nombre de répétitions du site HRE à plus de 6. Même si la séquence 6HRE augmente l'activité du promoteur en

Figure 15. Représentation schématique des vecteurs pGL3-3HRE-TK-Luc et pGL3-6HRE-TK-Luc. Illustration des constructions plasmidiques permettant l'expression de la luciférase sous le contrôle d'une séquence inductrice («enhancer») régulée en hypoxie, constituée de 3 et 6 répétitions du site de liaison au HIF-1 (HRE).

A)



B)



présence d'oxygène, cette séquence permet aussi une grande activation du promoteur en hypoxie. Nous avons donc poursuivi nos recherches avec les constructions contenant ces deux répétitions, soit le 3HRE et le 6HRE (figure 15).

3.2.2 Construction des plasmides 3 et 6HRE-PDX

Puisque les essais précédents ont démontré l'efficacité des constructions 3HRE et 6HRE en hypoxie, nous avons utilisé celles-ci afin d'exprimer l' α 1-AT-PDX en conditions réduites en oxygène. Les séquences HRE ont été clonées par digestions enzymatiques dans des plasmides d'expressions pCDNA3.1, en amont de la séquence du PDX. De plus, afin de maintenir des niveaux faibles d'expression de PDX en normoxie, nous avons substitué le promoteur CMV du pCDNA3.1 (un promoteur fort), par un promoteur minimal de la tyrosine kinase (TK) (figure 16).

En guise de contrôle négatif et positif, nous avons utilisé lors de nos expériences, un plasmide pCDNA3.1 vide ainsi qu'un plasmide exprimant le PDX sous le contrôle du promoteur constitutif CMV.

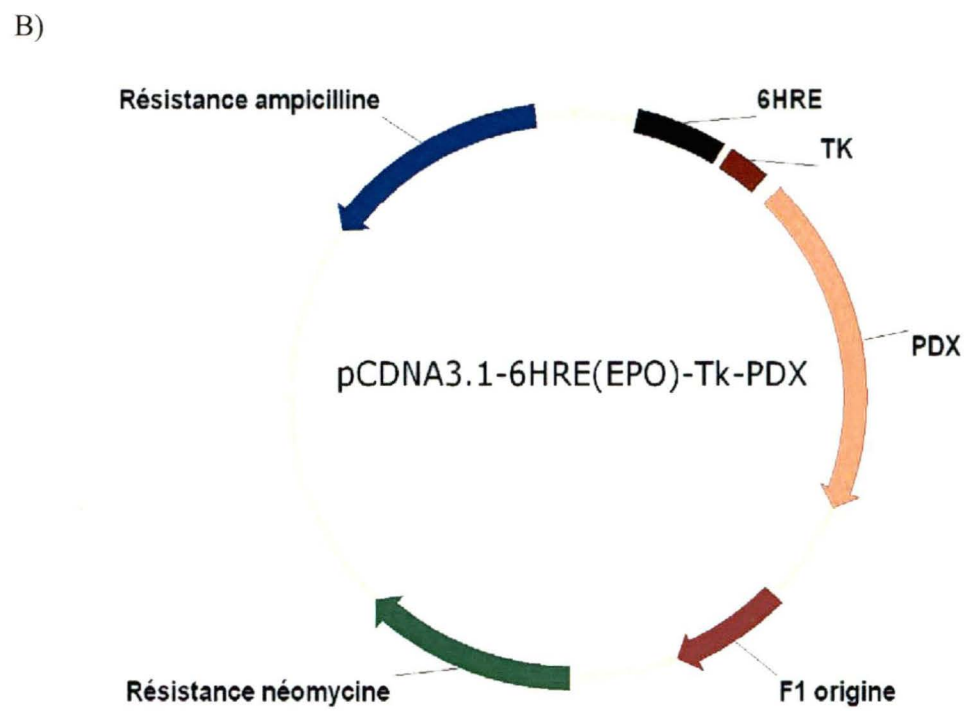
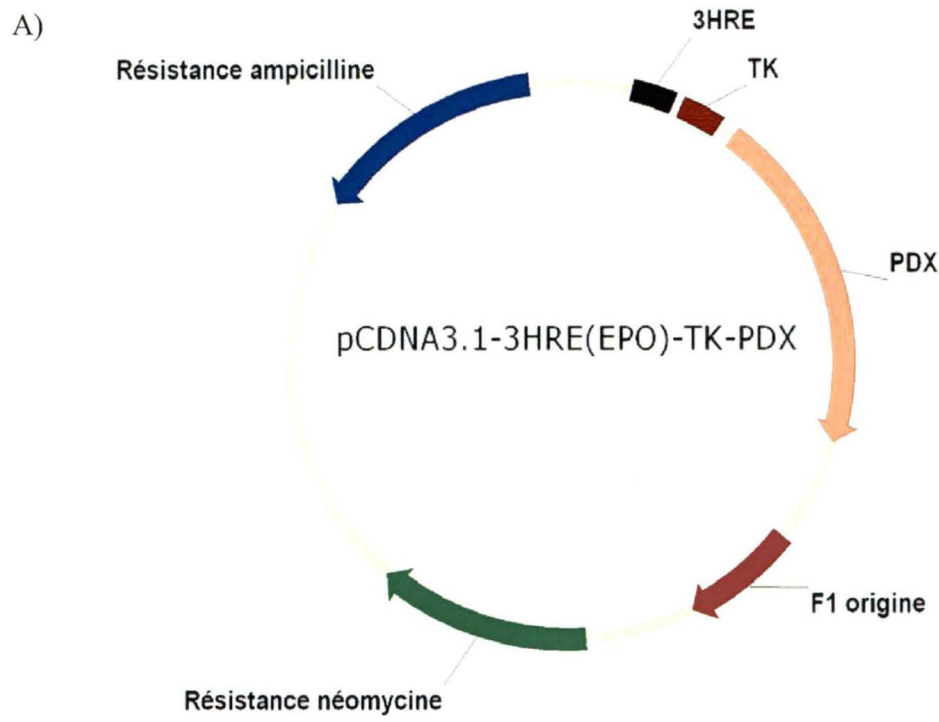
3.3 Établissement et caractérisation des modèles cellulaires exprimant le PDX

3.3.1 Caractérisation des cellules exprimant de façon transitoires du PDX

Afin de vérifier la fonctionnalité des constructions encodant le PDX décrites précédemment, nous avons utilisé des cellules de fibrosarcome humain (HT1080). Suite à la transfection transitoire des différents plasmides chez les cellules HT1080, l'expression de PDX a été vérifiée par immunobuvardage de type Western. Les résultats présentés à la figure 17A

Figure 16. Représentation schématique des constructions plasmidiques 3 et 6HRE-PDX.

Illustration des constructions plasmidiques permettant l'expression du PDX sous le contrôle d'«enhancers» de l'EPO régulés en hypoxie, constitués de 3 et 6 répétitions de site de liaison au HIF-1 (HRE).



démontrent qu'il y a une augmentation de l'expression de PDX chez les cellules HT1080 cultivées en hypoxie pendant 16 heures. Cette augmentation est principalement due à la stabilisation du HIF-1 α , puisque la co-transfection des cellules avec un vecteur encodant pour un dominant négatif du HIF-1 α (HIF-1 α DN) diminue en grande partie l'induction hypoxique de l'expression de PDX. Ce dominant négatif code pour une protéine tronquée en C-terminale pouvant lier la sous-unité β du HIF-1 ainsi que l'ADN. Cependant, ce facteur transcription modifié ne possède pas ses deux domaines de trans-activation (TAD) et ne peut donc pas activer la transcription des gènes cibles. Ce variant du HIF-1 compétitionne donc avec le HIF-1 α endogène.

De plus, tel que démontré auparavant, la séquence EPO³⁴⁵²⁻³⁵⁰¹ utilisée contenant un site HRE, possède un site de liaison pour les Smads (SBE), des facteurs de transcription induits par le TGF- β , qui pourrait possiblement jouer un rôle dans l'augmentation de l'activité du promoteur en normoxie et/ou coopérer à la réponse hypoxique. Certaines expériences ont déjà démontré qu'il pouvait y avoir activation du gène de l'EPO suite à l'interaction directe entre le HIF-1 α , Smad3/4 ainsi que le HNF-4 (Sanchez-Elsner et al., 2004). Nous avons donc vérifié l'importance de ce site dans l'activation du promoteur TK en surexprimant le Smad7, un inhibiteur spécifique de cette voie. Le Smad7 diminue de façon modérée l'induction de PDX en hypoxie, suggérant que la voie des Smads n'est pas impliquée de façon majoritaire dans l'augmentation de l'activité du promoteur en hypoxie. Toutefois, lorsqu'on le surexprime en combinaison avec le HIF-1 α DN, on observe une inhibition complète de la production de PDX, ce qui indique que les Smads pourraient avoir un rôle dans l'activation du promoteur (figure 17B). Pour terminer, tel que les expériences de luciférase

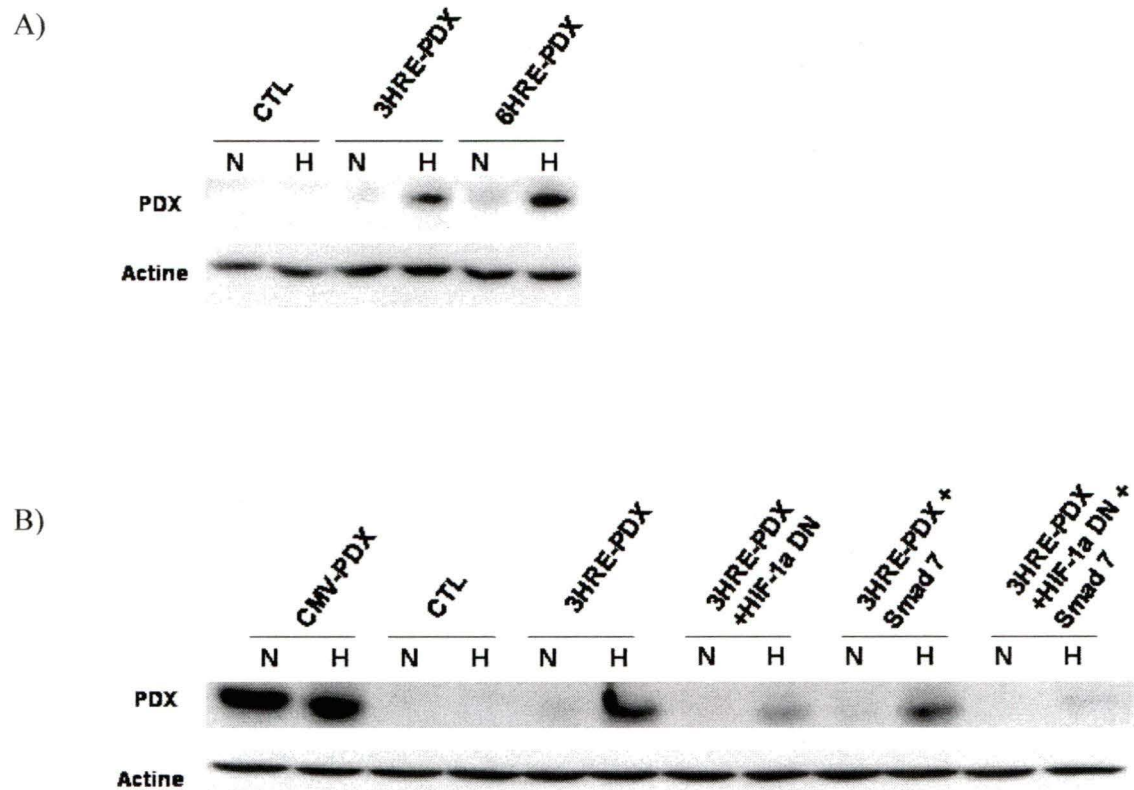


Figure 17. Caractérisation de la production d' α 1-AT-PDX en hypoxie. Les cellules HT1080 ont été transfectées avec les plasmides 3HRE-PDX ou 6HRE-PDX, privées de sérum et cultivées pendant 16 heures en hypoxie (H) ou en normoxie (N). A) La production de PDX a été évaluée par immunobuvardage de type Western. Résultat représentatif d'au moins 3 expériences distinctes pour chaque transfection. B) Immunobuvardage de type Western de la production de PDX par des cellules transfectées avec ou sans dominant négatif

le laissaient présager, nous observons une légère induction de l'expression de PDX en normoxie chez les cellules transfectées avec le 6HRE-PDX. du HIF-1 α et/ou du vecteur encodant le Smad7. Résultat représentatif d'au moins 3 expériences distinctes pour chaque transfection.

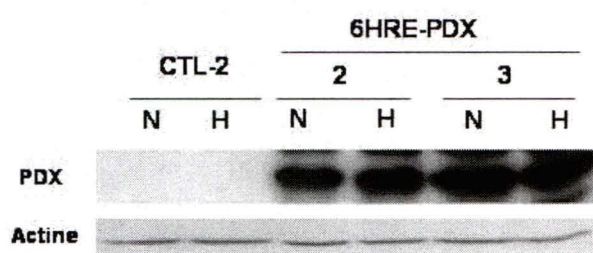
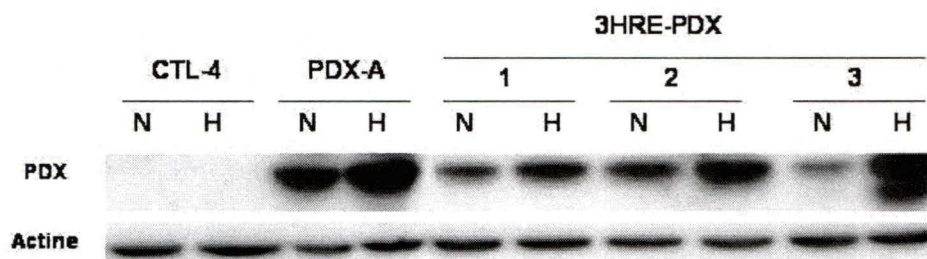
3.3.2 Caractérisation des clones exprimant de façon stable le PDX

L'établissement d'un modèle de xéno greffes chez la souris, permettant d'étudier l'impact de l'inhibition de la furine en hypoxie sur la croissance des tumeurs solides, nécessite un modèle cellulaire pouvant exprimer le PDX de façon stable, et ce, sur une longue période de temps. Nous avons donc transfecté des cellules HT1080 avec les différents plasmides codant pour le PDX, soit le 3HRE-PDX, 6HRE-PDX ainsi que le CMV-PDX. Suite à une sélection aux antibiotiques, nous avons étudié 3 clones cellulaires (1, 2, 3), et ce par types de plasmides transfectés. Par la suite, ces cellules ont été amplifiées dans un milieu contenant l'antibiotique de sélection (G418), afin de permettre aux cellules de maintenir les plasmides dans le bagage génétique cellulaire lors de leurs divisions. Après quelques semaines de culture cellulaire, nous avons caractérisé l'expression du PDX chez tous les clones par immunobuvardage de type Western.

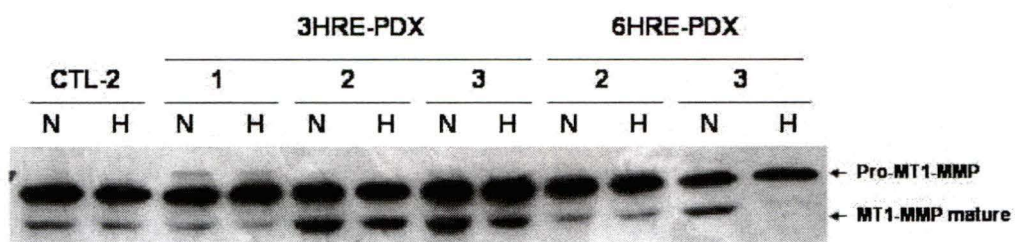
Tel que démontré chez les transfectants transitoires, les résultats présentés en figure 18A indiquent que l'expression de PDX chez les transfectants 3HRE-PDX et 6HRE-PDX stables est inductible en hypoxie. Ces derniers produisent des quantités supérieures de PDX en hypoxie, mais on décèle toujours la présence de PDX chez les cellules cultivées en

Figure 18. Caractérisation des clones PDX. Analyse par immunobuvardage de type Western des cellules exprimant les constructions encodant le PDX. Les cellules HT1080 transfectées avec les différents plasmides ont été privées de sérum et cultivées en hypoxie pendant 16 heures. A) Niveaux d'expression de PDX. Résultat représentatif de 2 expériences distinctes. B) Niveau de maturation de la MT1-MMP. Résultat représentatif de

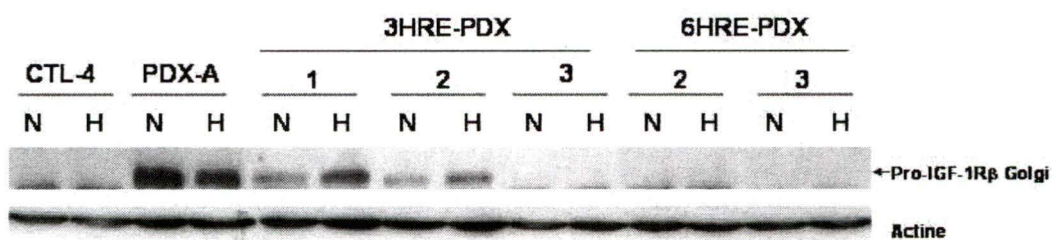
A)



B)



C)



normoxie. Toutefois, les niveaux d'expression de PDX diffèrent entre chacun des clones. Les clones 3HRE-PDX 1 et 2 ont une bonne induction en hypoxie, mais possèdent des niveaux de base plus élevés que le clone 3HRE-PDX 3. Pour ce qui est des clones surexprimant le 6HRE-PDX, nous observons une expression de PDX chez les clones 2 et 3, mais l'augmentation des niveaux de PDX en hypoxie n'est pas très marquée, puisque les niveaux de PDX en normoxie sont relativement élevés.

Afin de vérifier l'impact du PDX sur les niveaux de maturation des substrats de la furine, nous avons par la suite caractérisé l'expression et la maturation de protéines cellulaires en fonction de l'oxygène chez les différents clones obtenus. Tout d'abord, nous avons vérifié les niveaux d'activation de la MT1-MMP, une métalloprotéinase importante dans la progression tumorale. Cette dernière, un substrat de la furine, se retrouve principalement sous 2 formes, soit une forme latente de 63 kDa ainsi que sous une forme mature et active de 60 kDa, lorsqu'elle est clivée par la furine. L'analyse par immunobuvardage de type Western des lysats provenant des clones exprimant le PDX, nous démontre que suite à une incubation de 16 heures en hypoxie, la maturation de la MT1-MMP est inhibée en absence d'oxygène (figure 18B). Cette diminution de la forme mature de 60 kDa est observable chez tous les clones. Cependant, les niveaux d'expression et d'activation de la MT1-MMP semblent différer entre les clones surexprimant le même plasmide.

Tel que discuté en introduction, la chaîne β du récepteur de l'IGF-1 (IGF-1R β) est également une protéine nécessitant un clivage endoprotéolytique par une convertase de proprotéines afin d'acquérir son activité. De plus, il a déjà été démontré que la maturation de ce récepteur impliqué dans la survie cellulaire, est affectée par les niveaux d'expression

du PDX chez les cellules cancéreuses humaines HT-29. Cette protéine est présente sous plusieurs formes selon sa localisation cellulaire ainsi que son degré d'activation. Le pro-IGF-R se retrouve respectivement sous une forme de 200 kDa et 210 kDa dans le réticulum endoplasmique ainsi que dans le TGN (Khatib et al., 2002). Lors de son clivage par la furine, on observe une forme mature de 100kDa. En fait, la production de PDX en hypoxie augmente l'apparition de la pro-forme de 210 kDa du récepteur chez les HT1080 (figure 18C). Cependant, tel qu'observé pour la MT1-MMP, les niveaux d'expression de l'IGF-1R β , ainsi que les niveaux de maturation, diffèrent entre les clones. Chez les clones 3HRE-PDX 3 ainsi que 6HRE-PDX 2 et 3, aucune pro-forme n'est observable, malgré une expression relativement forte de PDX. Cependant, l'inhibition de la maturation du récepteur en hypoxie semble toutefois corrélée avec les niveaux de PDX exprimé chez les clones CTL, CMV-PDX ainsi que 3HRE-PDX 1 et 2.

Les résultats obtenus des études de maturation des substrats de la furine démontrent donc que la majorité des clones sélectionnés produisent du PDX fonctionnel capable d'inhiber l'activité enzymatique de la furine et de diminuer l'activation de ses substrats. Cependant, l'activation et l'expression des substrats étudiés varient grandement d'un clone à l'autre. Si nous extrapolons cette variation de l'activation protéique à toutes les autres protéines cellulaires, il devient difficile de déterminer si l'impact potentiel de l'inhibition de la furine en hypoxie sur la progression tumorale chez les souris immunodéficientes, est attribuable PDX, ou à des variations protéiques endogènes propres à chaque clone.

3.3.3 Caractérisation des populations « Pool » cellulaires, exprimant de façon stable le PDX

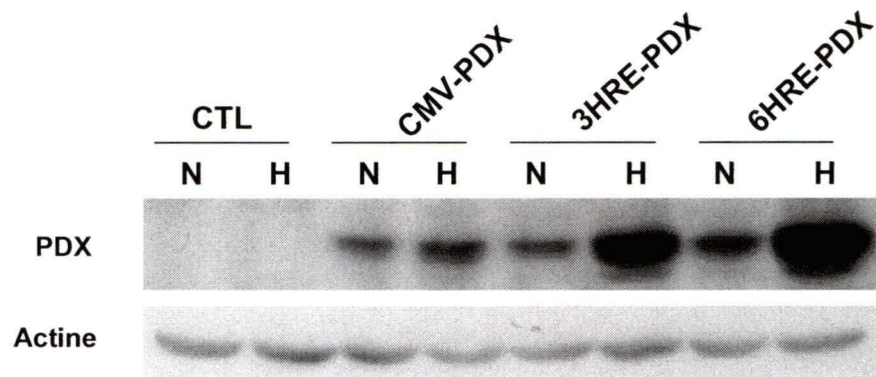
Dans les expériences de caractérisation des clones surexprimant le PDX, nous avons observé des variations entre ces derniers, au niveau de l'expression des substrats de la furine. Ces variations d'expression protéique pourraient compliquer l'interprétation des fluctuations observées dans la croissance tumorale dans notre modèle de xénogreffe et c'est pourquoi nous avons opté pour une autre stratégie. Au fait, depuis peu, plusieurs équipes de recherche favorisent l'utilisation de populations cellulaires hétérogènes et non clonales, exprimant les protéines d'intérêt de façon stable. En évitant la sélection clonale, il est possible d'éliminer les effets dus à la variation clonale, dont des changements au niveau de l'expression de certaines protéines. L'utilisation d'une population stable hétérogène, communément appelé « pool », a l'avantage de représenter plus fidèlement les variations phénotypiques d'une population cellulaire tumorale.

Suite à la transfection des cellules HT1080 avec les constructions plasmidiques 3 et 6HRE-PDX, ces cellules ont été cultivées dans du milieu de culture contenant deux concentrations différentes d'antibiotique de sélection, afin de vérifier si la concentration d'antibiotiques peut modifier les niveaux d'expression cellulaire de PDX. Après quelques semaines, lorsqu'il n'y avait plus de mortalité due à l'antibiotique, nous avons vérifié l'expression de PDX en normoxie et hypoxie dans les populations exprimant les différents plasmides.

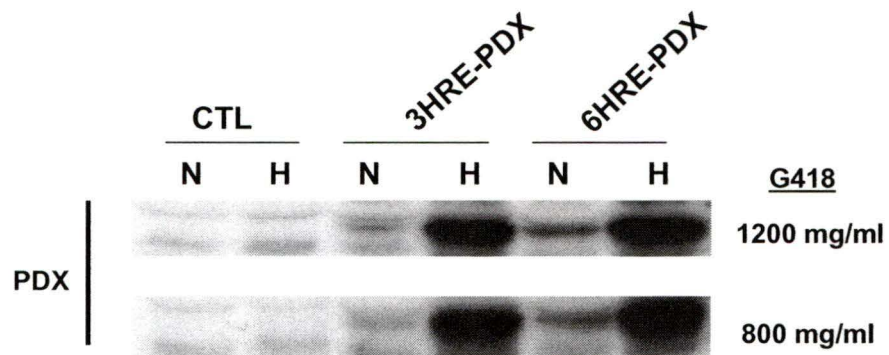
De façon semblable aux clones, nous observons une augmentation de la protéine PDX chez les pools cellulaires contenant les plasmides 3HRE-PDX et 6HRE-PDX (figure 19A). La

Figure 19. Caractérisation des populations cellulaires de HT1080 exprimant de façon stable le PDX. Les cellules ont été privées de sérum et exposées en hypoxie pendant 16 heures. A) Expression de PDX par les populations cellulaires de HT1080 utilisées pour la suite des expérimentations sur la progression tumorale. Résultat représentatif d'au moins 4 expériences distinctes. B) Expression de PDX selon la concentration d'antibiotique de sélection (G418) utilisée, soit 1200 mg/ml ou 800 mg/ml. Résultat représentatif de 2 expériences distinctes. C) Niveau de maturation de la MT1-MMP. D) Niveau de maturation de la chaîne β du récepteur de l'IGF-1. Résultat représentatif de 3 expériences distinctes.

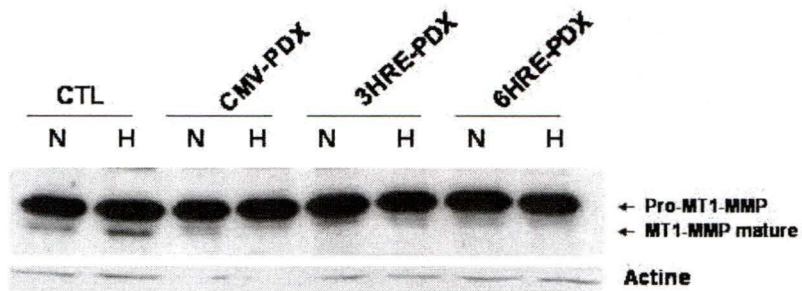
A)



B)



C)



D)



concentration de G418 utilisée pour faire la sélection ne semble pas affecter les niveaux d'expression de PDX, que ce soit en hypoxie ou en normoxie, puisque les bandes de détection du PDX sont identiques (figure 19B). Nous avons donc continué les expériences avec une concentration de 800 mg/ml de G418.

Pour ce qui est de l'effet du PDX sur la maturation des substrats de la furine, nous avons évalué les niveaux de maturation de la chaîne bêta du récepteur de l'IGF-1 ainsi que la maturation de la MT1-MMP dans les nouvelles populations de cellules transfectées avec les plasmides codant pour le PDX (« pool »). Tel qu'illustré à la figure 19C, les niveaux de maturation de la MT1-MMP corrélaient de façon étroite avec les niveaux d'expression de PDX chez les « pool » de cellules. Pour ce qui est de l'IGF-1R β (figure 19D), il y a une augmentation de la pro-forme de l'IGF-1R β (210 kDa) chez les populations exprimant le PDX sous le contrôle de séquences 3 et 6HRE. Ces résultats nous indiquent que comparativement aux clones, l'inhibition de la maturation des substrats furine chez les « pool » cellulaire exprimant le PDX, coïncide de façon plus étroite avec les niveaux d'expression de ce dernier.

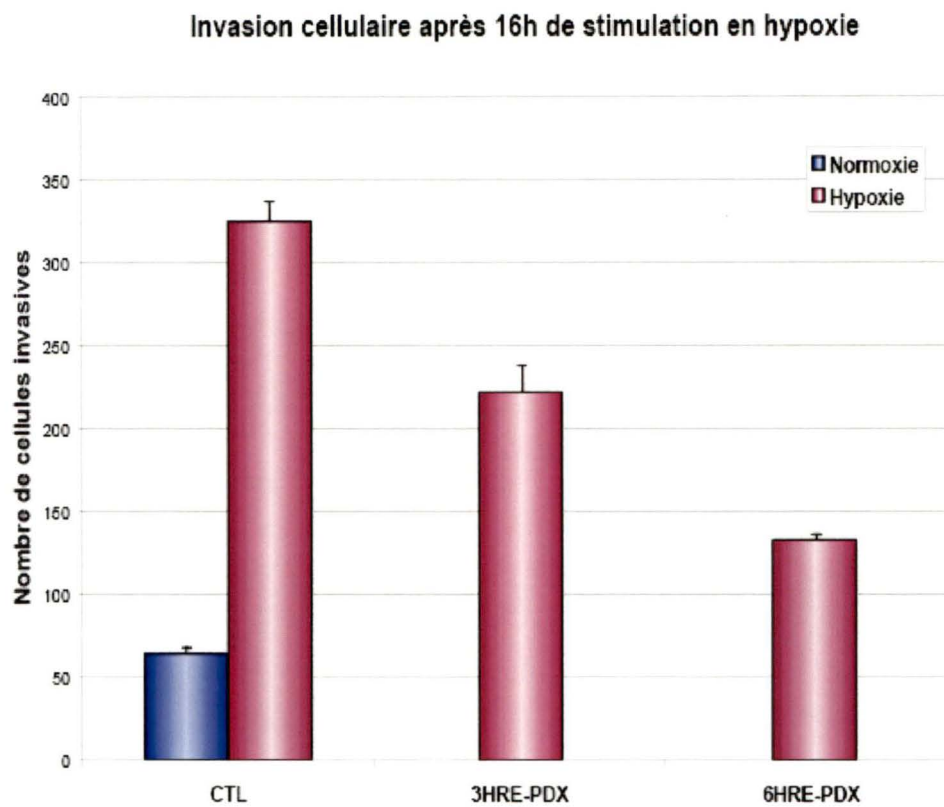
3.3.4 Impact de l'expression hypoxique du PDX sur l'invasion des cellules cancéreuses HT1080

Nous avons observé, lors des expériences précédentes, une variation dans la maturation de substrats de la furine chez les cellules exprimant le PDX en hypoxie. Afin de poursuivre la caractérisation de ces « pool » cellulaires exprimant du PDX, nous avons tenté d'élucider

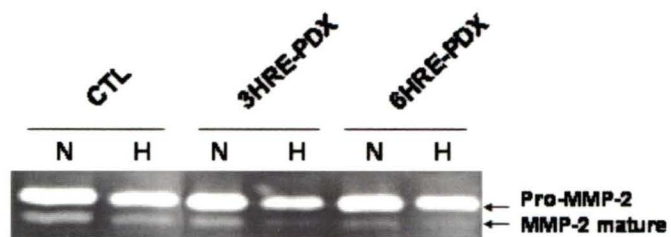
Figure 20. Effets phénotypiques associés à l'inhibition de la furine chez les HT1080.

A) Les cellules HT1080, exprimant ou non les plasmides encodant le PDX, ont été soumises à un essai d'invasion in vitro pendant 16 heures en hypoxie ou en normoxie. Résultats préliminaire en duplicata. B) La production de MMP-2 dans le surnageant des cellules HT1080, exprimant ou non les plasmides encodant le PDX, cultivées en hypoxie ou en normoxie pendant 16 heures, ont été analysées par zymographie. Le poids moléculaire apparent de la bande correspondant à la forme active de la MMP-2 est de 62 kDa.

A)



B)



comment l'expression de PDX induite en hypoxie, pouvait modifier les cellules HT1080 et ainsi provoquer des changements au niveau des processus de progression tumorale.

Tout d'abord, nous avons vérifié le potentiel invasif des cellules exprimant le PDX. Ce phénomène est essentiel à la progression tumorale et nécessite la participation de plusieurs protéases tel que la MMP-2, une protéase impliquée dans l'invasion des cellules tumorales et dont l'activation est en étroite relation avec l'activité de la MT1-MMP. Les résultats préliminaires présentés à la figure 20 indiquent que l'hypoxie augmente le potentiel invasif des cellules HT1080 CTL. Chez les cellules HT1080 possédant les plasmides 3 et 6HRE-

PDX, nous observons une diminution de l'invasion en hypoxie. Cette diminution de la capacité invasive des cellules exprimant le PDX concorde avec les niveaux d'expression de l'inhibiteur de la furine en immunobuvardage de type Western (figure 19A).

Suite à ces observations, nous avons vérifié les niveaux d'activation de la MMP-2. Un essai de dégradation de gélatine (zymographie) a été effectué avec les surnageants des cellules HT1080, exprimant ou non les plasmides encodant le PDX en hypoxie, tel que décrit dans la section matériels et méthodes. Après 16h de dégradation, on observe une variation dans les niveaux d'activation de la MMP-2 (figure 20B). Dans les puits ayant reçu les surnageants des cellules exprimant les plasmides 3 et 6HRE-PDX cultivées en hypoxie, on observe une diminution de la bande de dégradation effectuée par la forme mature de la MMP-2 (62 kDa), nous indiquant une diminution de sa forme active. Nous observons également une diminution de la production de la pro-forme à 66 kDa dans ces mêmes puits. La diminution

des niveaux protéiques totaux de la MMP-2 pourrait donc modifier, en partie, les niveaux d'activité de la forme active.

3.4 Expérience de xénogreffes chez des souris immunodéficientes

Afin de vérifier l'impact de la surexpression de furine en hypoxie dans le processus de progression tumorale, nous avons mis au point un modèle expérimental d'induction de tumeurs chez la souris. Pour ce, nous avons utilisé des souris BALB/c CD1 nu/nu, âgées entre 28 et 42 jours. Ces souris sont immunodéficientes suite à une mutation caractérisées par un dysfonctionnement de l'épithélium thymique empêchant la maturation des lymphocytes T (Charles River Laboratories, MA, USA). Ces souris peuvent recevoir des xénogreffes de cellules humaines (HT1080) sans qu'il y ait de rejet de l'hôte envers la greffe. Les souris ont été injectées de façon sous-cutanée avec $2,5 \times 10^6$ cellules resuspendues dans du milieu ne contenant ni antibiotique, ni sérum. Tout au long de la croissance tumorale, nous avons évalué la progression des tumeurs par la mesure du volume des tumeurs qui se sont développées. Étant donné qu'on observe fréquemment de l'inflammation spécifique les premiers jours suivant l'injection, les mesures ont été prises à partir du 5^e jour post-injection. On remarque l'apparition d'une différence significative ($p < 0.05$) entre les volumes des tumeurs formées après 25 jours chez les différents groupes de souris (figure 21). La croissance des cellules utilisées en tant que contrôle négatif (transfectées avec le plasmide vide) semble être exponentielle et concorde avec les résultats démontrés précédemment dans la littérature (Cowen et al., 2004; Mori et al., 1999). Pour ce qui est du contrôle positif, soit les cellules HT1080 qui expriment le PDX de façon constitutive, aucune tumeur n'a progressée après le 10^e jour suivant l'inoculation des

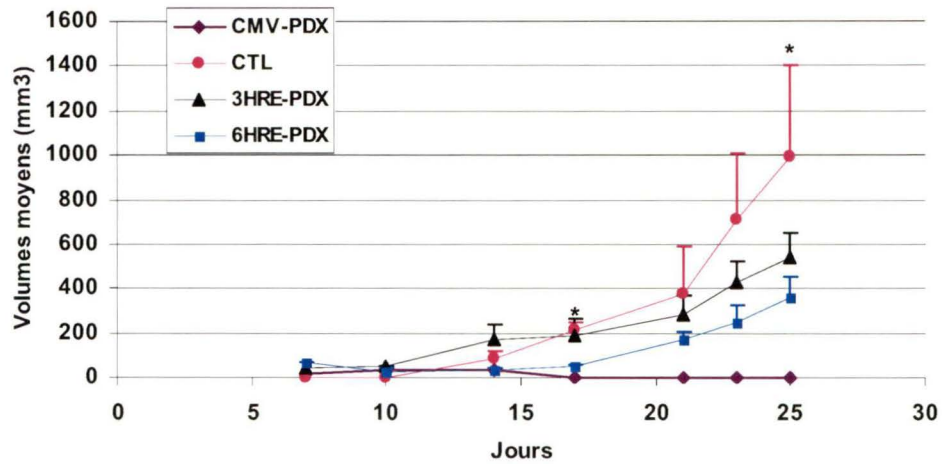


Figure 21. Expérience de progression tumorale *in vivo*. Les populations de HT1080 (2.5×10^6) ont été injectées de façon sous-cutanée chez des souris femelles âgées de 4 semaines. Le volume tumoral a été évalué régulièrement selon la formule $0.5 \times \text{longueur} \times (\text{largeur})^2$. Les souris ont été sacrifiées 25 jours après l'injection. Le test statistique d'Anova de gourpe a été utilisé pour évaluer les différences de croissance.

cellules tumorales. Jusqu'au jour 15, les tumeurs formées de cellules CTL, 3 et 6HRE-PDX, semblent avoir une croissance similaire. Par la suite, on observe une inhibition de la croissance des tumeurs formées de cellules exprimant les plasmides 3 et 6HRE-PDX. L'expression de PDX dans les tumeurs 6HRE-PDX inhibe de façon significative la progression tumorale. Au jour 25, on observe une croissance qui atteint 400 mm^3 comparativement aux tumeurs contrôles (formées de cellules contenant un vecteur vide) qui atteignent un sommet de 1000 mm^3 . Pour ce qui est des tumeurs issues de cellules exprimant le plasmide 3HRE-PDX, nous notons une inhibition de la croissance tumorale par rapport aux tumeurs contrôles (CTL). Cette inhibition est plus faible que celle observée chez les tumeurs composées de cellules exprimant le plasmide 6HRE-PDX, ce qui corrèle avec les résultats d'immunobuvardage démontrant une forte expression de PDX ainsi qu'une diminution de la maturation des substrats de la furine. Effectivement, les niveaux d'expression de PDX sont plus élevés chez les cellules 6HRE-PDX cultivées en hypoxie.

Ces résultats, suggèrent que la furine, présente dans les zones hypoxiques, joue un rôle important dans la croissance tumorale. Ils suggèrent également que la production de PDX à l'intérieur de ces zones permet l'inhibition de l'activité furine et la diminution des niveaux de maturation de plusieurs substrats dont les rôles ont été démontrés dans la progression tumorale.

3.4.1 Caractérisation des niveaux de PDX présent à l'intérieur des tumeurs provenant des xénogreffes

Suite à l'excision des tumeurs, nous avons analysé l'expression de PDX exprimé dans les tumeurs formées des cellules exprimant les plasmides CTL, 3 et 6HRE-PDX. Nous avons donc vérifié si il y avait expression de PDX dans les xénogreffes. Pour ce faire, nous avons coupé chaque tumeur en différentes sections, que nous avons homogénéisées et analysées de façon indépendante. Ces homogénats ont été migrés sur gels de poly-acrylamide. La révélation, à l'aide des anticorps anti- α 1-antitrypsine, nous permet d'observer une modulation des niveaux d'expression du PDX dans les différentes sections de tumeurs, et ce, en fonction des vecteurs exprimés dans les cellules constituant ces tumeurs. La variation des niveaux de PDX coïncide avec les expériences *in vitro* effectuées précédemment (figure 19A), qui démontraient une expression de PDX chez les cellules exprimant les vecteurs 3 et 6 \times HRE-PDX. Cependant, tel que montré à la figure 22a, certaines sections ne semble pas exprimer de PDX.

Le marquage immunohistochimique des coupes de tumeurs composées de cellules possédants les plasmide 3 ou 6HRE-PDX, a mis en évidence, avec l'anticorps anti- α 1-antitrypsine (PDX), la présence de PDX à l'intérieur des tumeurs (figure 22b). Cette expression se retrouvent majoritairement près des zones nécrotiques et colocalisent avec les zones pauvres en oxygène, identifiées à l'aide du pimonidazole.

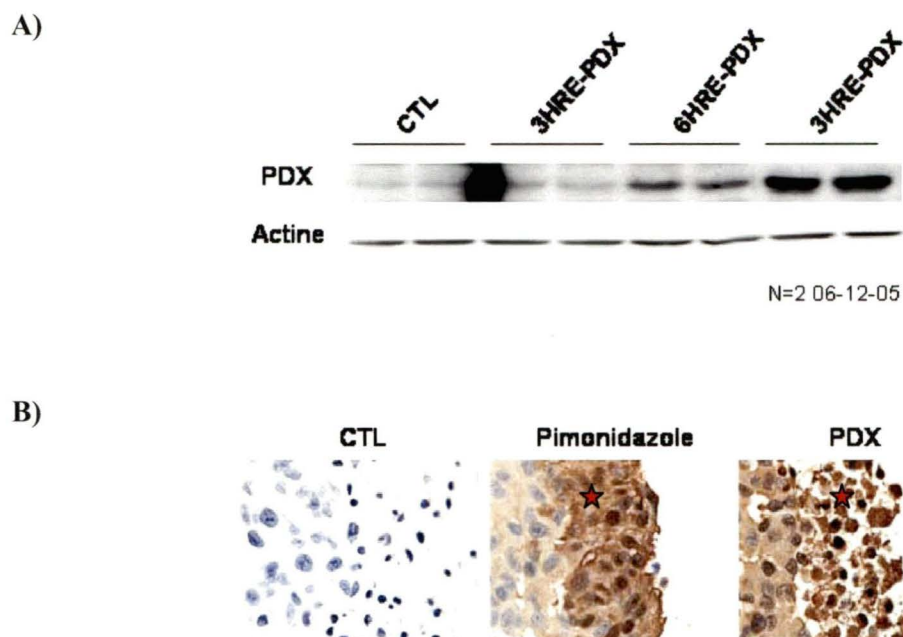


Figure 22. Variation de l'expression de PDX dans différentes sections de tumeurs. A) Analyse par immunobuvardage de type Western des sections de tumeurs homogénéisées. Niveau d'expression de PDX. Chaque puits représente une section d'une même tumeur, formée par des cellules exprimant soit le vecteur CTL, le 3HRE-PDX ou le 6HRE-PDX. B) Analyses immunohistochimiques des coupes de tumeurs obtenues au jour 25 après l'injection des populations de HT1080. Marquage immunohistochimique à l'aide d'un anticorps spécifique à la forme réduite du pimonidazole et au PDX. CTL (étoile rouge), coupes tumorales révélées seulement à l'aide d'un anticorps secondaire.

4.0 DISCUSSION

Le grand éventail de substrats pouvant être activés par la furine et ayant des rôles dans plusieurs pathologies impliquant la croissance cellulaire et l'inflammation, a incité depuis quelques années plusieurs équipes de recherche à porter un intérêt particulier pour la furine dans le processus de progression tumorale. Jusqu'à maintenant, plusieurs évidences ont démontré l'implication de la furine dans les processus de progression tumorale, autant chez l'humain que dans les modèles de xénogreffes chez la souris (Bassi et al., 2000). On observe, entre autres, une surexpression de cette protéase chez différents types de cancer et son niveau d'expression a été associé avec le niveau d'agressivité des tumeurs (Cheng et al., 1997). Des expériences où l'on a exprimé de façon ectopique un inhibiteur de la furine, l' α 1-antitrypsine PDX (α 1-AT-PDX), ont démontré une diminution de l'incidence et de la croissance des tumeurs formées chez un modèle de xénogreffes chez la souris. De plus, l'expression d' α 1-AT-PDX chez différentes cellules cancéreuses telles que des cellules de carcinome de colon, de tumeurs de la tête et du cou, a entraîné une inhibition de leur capacité invasive (Bassi et al., 2001a; Khatib et al., 2001). Bien que de façon générale les études indiquent une action protumorigénique de la furine, une seule étude a démontré que l'inhibition de la furine pouvait favoriser le développement de métastases en augmentant la capacité de migration et d'invasion des cellules humaines de carcinome de colon HT-29 chez un modèle de xénogreffes chez le rat (Nejjari et al., 2004). Ces résultats sont toutefois en contradiction avec ceux obtenus par l'équipe du Dr Seidah, qui ont utilisé le même modèle cellulaire et qui démontrait une diminution de la capacité invasive des cellules HT-29 surexprimant l' α 1-AT-PDX (Khatib et al., 2001). Ces résultats contradictoires pourraient

venir du fait que l'équipe de recherche du Dr. Nejari a utilisé qu'un seul clone dans leurs expériences. Il serait donc possible que les effets observés par cette équipe soient dus à la sélection clonale, favorisant de ce fait un phénotype cellulaire possédant des propriétés spécifiques et différentes quant à la capacité de migration. Cependant, cette expérience pourrait aussi laissé présager un autre rôle différent de la furine dans la progression tumorale, plus complexe que celui qui a été proposé jusqu'à maintenant.

À la lumière de ces observations, la compréhension des mécanismes qui contrôlent l'expression physiopathologique de la furine a particulièrement intéressée notre laboratoire. Bien que les connaissances sur la régulation du gène *fur*, qui encode la furine, ne sont encore qu'à leur tout premiers balbutiements, il est connu que ce gène est exprimé à des niveaux différents selon les types de cellules (Seidah et al., 1994). Cette variation dans les niveaux d'expression peut s'expliquer par la présence de 3 promoteurs différents (P1, P1A et P1B) qui codent pour 3 ARNm distincts. Cependant, les ARNm produits par chacun de ces promoteurs sont traduits en une seule protéine identique (Ayoubi et al., 1994). Une étude de la réponse à l'hypoxie des différents promoteurs de la furine a démontré que le promoteur P1 est le plus sensible et qu'il exhibe un site de liaison au HIF-1 (HBS) nécessaire à cette réponse (McMahon et al., 2005). Ce facteur de transcription est connu pour son implication dans les processus de progression tumorale ainsi que dans l'embryogenèse, via la modulation de l'expression de plusieurs gènes (Chen et al., 2001; Maxwell et al., 1997; Ryan et al., 1998). Ces résultats représentent les premières évidences démontrant un mécanisme pouvant affecter l'expression de la furine dans les cancers. Suite à ces évidences et observations et puisque l'hypoxie est une caractéristique commune aux tumeurs solides,

nous avons voulu vérifier si la furine était augmentée dans les zones hypoxiques tumorales *in vivo* ainsi que l'implication d'une surexpression hypoxique de la furine sur les processus de progression tumorale.

Depuis peu, certaines équipes de recherche ont tenté d'exploiter et d'atteindre les zones hypoxiques des tumeurs afin cibler ces dernières par thérapie génique (Greco et al., 2003). L'idée générale étant de se servir de la séquence de reconnaissance pour le HIF-1 (HRE) afin d'induire l'expression de la protéine d'intérêt. Cette séquence « enhancer », permettant une augmentation de l'activité des promoteurs par le HIF-1, a été utilisée à plusieurs reprises dans des expériences d'induction protéique en hypoxie. Par exemple, cette technique a été utilisée afin d'augmenter l'expression de la réductase P450 (P450R) dans les zones hypoxiques tumorales, permettant ainsi d'augmenter l'activation de la tirapazamine, un médicament chimiothérapeutique qui nécessite une maturation par la P450R (Cowen et al., 2004). De plus, ce système est utilisé dans les expériences portant sur le traitement des maladies des artères coronaires qui provoquent une ischémie du tissu cardiaque. L'objectif de cette recherche était d'induire la production de VEGF, un facteur ayant un grand potentiel angiogénique, afin de permettre le réapprovisionnement sanguin des zones hypoxiques du coeur (Post and Van Meir, 2001; Su et al., 2002). Nous avons donc utilisé cette stratégie afin de créer un vecteur répondant à l'hypoxie, en utilisant une séquence provenant de la région 3' du gène de l'érythropoïétine (EPO) contenant un site HRE (figure 2b). Cette construction plasmidique permettrait donc de produire de façon spécifique l'inhibiteur de la furine, l' α 1-AT-PDX, dans les zones hypoxiques tumorales. Plusieurs évidences ont démontré la présence du HIF-1 dans les zones hypoxiques des tumeurs ainsi que son rôle

indispensable dans la progression tumorale (Hutchison et al., 2004; Ryan et al., 1998; Schindl et al., 2002). Les inhibiteurs de la furine ayant des niveaux de spécificité variable ont été rapportés dans la littérature (Section 1.2.3). Cependant, l'inhibiteur le mieux caractérisé et le plus utilisé dans les expériences d'inhibition de la furine *in vitro* ainsi qu'*in vivo*, est sans aucun doute l' α 1-AT-PDX. Cet inhibiteur est un variant de l'alpha-1-antitrypsine endogène dans lequel deux acides aminés ont été mutés afin de créer un site consensus de reconnaissance pour la furine (**Arg-Iso-Pro-Arg**) (Anderson et al., 1993; Dufour et al., 1998; Jean et al., 1998; Khatib et al., 2001). De façon générale, la stabilité, la spécificité ainsi que l'efficacité de l' α 1-PDX (PDX) démontre bien que cette protéine est un choix judicieux afin d'inhiber la furine (tableau 2). Donc, afin d'inhiber spécifiquement la furine surexprimée dans les régions hypoxiques tumorales, nous avons utilisé cet inhibiteur dans la conception des plasmides 3HRE-PDX ainsi que 6HRE-PDX (figure 11).

Grâce à des essais luciférase, nous avons déterminé le nombre optimal de répétition de la séquence contenant le HRE de l'EPO, c'est-à-dire 3 et 6 fois, permettant une induction optimale de la protéine d'intérêt en hypoxie tout en gardant une expression de base faible en normoxie. Nous avons observé que des constructions contenant 6 répétitions de HRE, avaient le potentiel d'augmenter l'activité luciférase en normoxie. Cette augmentation des niveaux de bases pourrait s'expliquer par la présence de sites pour d'autres facteurs de transcription dans la séquence EPO³⁴⁵¹⁻⁶⁻³⁵⁰¹. Tel qu'observé à la figure 14, la séquence utilisée contient en plus d'un site HRE, d'autres sites de liaison pour des facteurs de transcription pouvant moduler l'activité du promoteur. D'abord, il a un site pour le HNF-4, un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires pouvant moduler l'activité de gènes

impliqués dans le métabolisme des acides aminés et du glucose (Hirota et al., 2005). La séquence HRE utilisée possède également un site de liaison au Smads (SBE). Ces facteurs de transcriptions font parti de la voie de signalisation du TGF- β (transforming growth factor). Ce dernier est un facteur de croissance ubiquiste essentiel à la régulation de plusieurs phénomènes physiologiques tels que la prolifération, la différenciation, la migration, la survie, l'angiogenèse et l'immunosurveillance (voir revue (Elliott and Blobel, 2005)). Les nombreuses caractéristiques du TGF- β lui confèrent un rôle important dans les processus de progression tumorale. D'autres expériences ont déjà démontré son rôle dans l'activation du gène de l'EPO, un facteur pro-angiogénique important dans l'adaptation des tumeurs au manque d'oxygène, suite à l'interaction directe entre le HIF-1 α , le Smad3/4 ainsi que le HNF-4 (Sanchez-Elsner et al., 2004). De plus, des études effectuées au laboratoire par la Dre. McMahon, ont permis d'observer une stabilisation de la sous-unité α du HIF-1 en normoxie via l'inhibition des PHD par le TGF- β (McMahon et al., 2006). Ces évidences nous laisse croire que le TGF- β , ainsi que le HIF-1, pourrait être responsables de l'augmentation de l'activité du promoteur 6HRE en normoxie.

Afin de vérifier la fonctionnalité des constructions encodant le PDX, nous avons utilisé des cellules de fibrosarcomes humains (HT1080). Ces cellules ont été utilisées à plusieurs reprises dans des expériences portant sur la progression tumorale (Cowen et al., 2004; Gupta et al., 2001). Les cellules HT1080 ont été transfectées de façon transitoire avec les plasmides 3 et 6HRE-PDX. Nos résultats démontrent que ces cellules expriment du PDX en hypoxie. L'expression du PDX est modulée par le HIF-1, tel que démontré par l'inhibition de l'expression de la protéine suite à la transfection d'un dominant négatif du HIF-1 α (figure

17). Puisque la séquence contenant les HRE possède également des sites de liaison aux Smads, nous avons utilisé un inhibiteur de cette voie, soit le smad7, afin de déterminer l'implication des Smads dans la régulation du promoteur. Ce dernier diminue légèrement la production de PDX en normoxie et en hypoxie. Ces résultats démontrent donc que la production de PDX en normoxie est en partie affectée par les Smads via leurs liaisons à un site présent dans la séquence HRE utilisé pour les constructions plasmidiques. Ainsi, puisque le TGF- β est une cytokine importante du microenvironnement tumoral, qui engendre une augmentation de l'activation des Smads en normoxie, il pourrait participer à l'activation de nos promoteurs et ainsi induire la production de PDX en normoxie. Dans le but de réduire la production de PDX en normoxie, il serait donc pertinent, dans des expériences futures, d'éliminer les sites de reconnaissance Smad en utilisant une technique de mutagenèse dirigée afin d'éliminer la production de PDX en normoxie. Cette opération nous permettrait également d'obtenir un système permettant une expression plus restreinte et spécifique du PDX en hypoxie.

Tout au long des processus de progression tumorale, plusieurs protéines effectrices et régulatrices sont nécessaires afin de permettre à la tumeur de s'adapter à son nouvel environnement et de continuer sa progression. C'est donc l'expression et l'activation différentielle de ces protéines, modulées par les changements physiques et biologiques qui permettent d'établir un micro-environnement pro-tumorigénique. Bon nombre de protéines impliquées dans les diverses étapes du processus de progression tumorale nécessitent un clivage enzymatique afin de devenir active. Depuis sa découverte en 1989 (Fuller et al., 1989), il a été démontré que l'activité enzymatique de la furine, le prototype de la famille

des PC, est responsable de l'activation et de la disponibilité d'un grand nombre de protéines ayant des rôles importants dans plusieurs phénomènes physiologiques et pathologiques (Bassi et al., 2005; Stawowy and Fleck, 2005; Thomas, 2002). L'implication de la furine dans la maturation de plusieurs substrats qui contribuent au potentiel invasif des cellules tumorales tels que la MMP-2 et la MT1-MMP, a déjà été démontrée par certains chercheurs (Maquoi et al., 1998; McMahon et al., 2003). Afin de vérifier la fonctionnalité de nos vecteurs ainsi que l'impact de l'expression du PDX par les cellules HT1080 sur la maturation de substrats en hypoxie, nous avons donc vérifié les niveaux de maturation de la MT1-MMP suite à l'expression des constructions 3 et 6HRE-PDX. Chez les cellules transfectées avec les plasmides PDX, on observe une diminution de la maturation de la MT1-MMP en hypoxie, ce qui indique que notre système d'étude est fonctionnel et que le PDX inhibe l'activité de la furine dans notre modèle cellulaire. La surexpression de PDX inhibe donc de façon efficace l'activité protéase de la furine en hypoxie, nécessaire à la maturation de ses substrats. Cette inhibition pourrait donc compromettre la maturation de substrats impliqués dans le processus de progression tumorale. Par exemple, l'augmentation des niveaux de furine dans les tumeurs permettrait une augmentation de la MT1-MMP active et une meilleure dégradation de la MEC par celle-ci. Par ailleurs, cette activité protéase est connue pour augmenter le potentiel invasif des cellules endothéliales et des cellules tumorales, augmentant de ce fait l'angiogenèse ainsi que la formation de métastases (Egeblad and Werb, 2002; McCawley and Matrisian, 2000; Yana and Weiss, 2000).

Depuis le début des recherches sur le cancer, plusieurs équipes de recherche ont utilisé des modèles de xénogreffes chez la souris afin d'étudier la progression tumorale. L'implantation

de cellules humaines transformées permet d'étudier l'implication des protéines d'intérêts, dans les processus de développement tumorale *in vivo*. Afin d'étudier l'impact de l'inhibition de la furine en hypoxie sur la croissance des tumeurs solides, nous avons poursuivi nos recherches en créant un modèle de cellules exprimant de façon stable les plasmides 3 et 6 HRE-PDX. L'analyse protéique des différents clones sélectionnés nous a cependant quelque peu surpris. L'expression du PDX, comme on pouvait s'y attendre, était plus faible chez les cellules cultivées en condition normoxique, comparativement aux cellules exposées à l'hypoxie. Cependant, les niveaux de substrats de la furine que nous avons obtenu étaient plutôt intrigants. Bien que les taux d'activation de la MT1-MMP soit inhibés par le PDX en absence d'oxygène, on observe des variations au niveau de l'expression et de l'activation de la MT1-MMP. Celle-ci diffère entre les clones surexprimant le même plasmide. Des variations clonales, au niveau de l'expression de d'autres substrats de la furine, sont également observées. Entre autres, la maturation de la chaîne β du récepteur de l'IGF-1 (IGF-1R β) est diminuée en fonction des niveaux d'expression du PDX (Khatib et al., 2001). Cependant, les niveaux d'expression et d'activation de ce récepteur sont également différents d'un clone à l'autre et ce, à l'intérieur d'un groupe de cellules exprimant le même plasmide. Ces changements entre les niveaux d'expression de protéines endogènes, ainsi que de leur niveau de maturation, nous a donc amener à nous poser des questions sur la pertinence d'utiliser un modèle cellulaire clonale pour la suite de nos recherches. En fait, nous craignons que les variations dans les niveaux de maturation et d'expression de substrats de la furine observés entre chaque clone surexprimant le PDX puissent compliquer l'interprétation des observations faites lors des études de xéno greffes. Afin d'éviter ce problème, nous avons opté pour une stratégie

utilisant une population cellulaire hétérogène de HT1080 (population non-clonale), exprimant les plasmides d'intérêts. Cette technique avait pour but de diminuer les effets dus à la variation clonale des niveaux d'expression protéiques et de représenter plus fidèlement les caractéristiques phénotypiques d'une population cellulaire tumorale. Cependant, après avoir transfecté et sélectionné la population cellulaire exprimant les plasmides encodant le PDX, les résultats d'expression protéiques ont soulevé d'autres questions. En fait, l'expression moyenne du PDX est plus faible dans les populations cellulaires (pool) que chez nos clones. Cette population de cellules contient des cellules exprimant des niveaux de PDX très hétérogènes, dont la plupart sont faibles ou moyens. Puisque la furine est une endoprotéase importante pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, les cellules exprimant un haut niveau de l'inhibiteur de la furine sont possiblement désavantagées face aux cellules exprimant le PDX de façon plus modérée, ou plus faible. Tel que discuté précédemment, les sites HRE présents dans nos constructions 3HRE-PDX et 6HRE-PDX pourraient être induits en normoxie par le TGF- β via les Smads et l'inhibition des PHD. Donc, une augmentation du nombre de copies de notre construction exprimant le PDX à l'intérieur des cellules, favoriserait l'expression de l'inhibiteur de la furine, et ce, même en normoxie. Ce désavantage pourrait favoriser la perte d'expression du PDX ou une division plus lente des cellules ayant trop d'ADN codant pour le PDX. Ce phénomène entraînerait donc, à long terme, un appauvrissement de notre population en cellules exprimant de hauts niveaux de l'inhibiteur de la furine. De manière générale, les pools cellulaires exprimant les différentes constructions PDX présentent des niveaux de maturation des substrats de la furine en hypoxie diminués et surtout, expriment des niveaux protéiques similaires. Ainsi, ces pools cellulaires semblent donc être un meilleur modèle que les clones cellulaires pour nos études.

Afin de vérifier les niveaux d'expression dans le temps de la protéine PDX chez les pools cellulaires, il pourrait être pertinent de fabriquer un vecteur bi-cistronique exprimant le PDX ainsi que la protéine fluorescente verte (GFP) sous le contrôle d'éléments régulables en hypoxie (HRE). Cette stratégie a déjà été utilisée par d'autres équipes dans des études portant sur l'inhibition de c-jun chez les HT1080 (Hennigan and Stambrook, 2001). Ce vecteur nous permettrait, grâce à la visualisation de la GFP dans les tumeurs, de mieux visualiser les niveaux d'expression de PDX ainsi que la proportion de cellules HT1080 exprimant l'inhibiteur de la furine dans les zones hypoxiques tumorales plusieurs jours après l'injection des cellules. Bien que notre système ne soit pas transposable à une stratégie de thérapie génique chez l'homme, il demeure adéquat pour la poursuite de nos études.

La poursuite de nos objectifs nous a donc conduit à l'établissement d'un modèle de xénogreffe chez la souris. L'injection des populations de cellules HT1080 transfectées avec des vecteurs permettant l'expression de PDX en hypoxie nous a permis de constater l'importance du rôle de la surexpression de la furine en hypoxie dans la progression tumorale. En effet, les tumeurs des groupes de souris formées par des cellules exprimant les vecteurs 3 et 6 HRE-PDX, ont un volume plus petit que les tumeurs contrôles. La croissance des tumeurs formées de cellules exprimant de façon constitutive le PDX (CMV-PDX) est nulle. Ces résultats nous indiquent donc que l'inhibition de la furine affecte sévèrement la croissance tumorale, tels que déjà démontré chez des modèles de xénogreffes, formées à partir de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses exprimant du PDX (Mercapeide et al., 2002; Bassi et al., 2001a). Lors de ces expériences, les auteurs ont observés une diminution du potentiel invasif *in vivo* des lignées cellulaires cancéreuse du cou et de la tête (HNSCC;

SCC15, A 253 et Detroit 562) transfectées avec le PDX. . Il serait intéressant de vérifier si à long terme, les tumeurs exprimant du PDX en hypoxie finiraient par se résorber totalement. L'inhibition de la maturation de plusieurs substrats de la furine qui sont importants au niveau de l'adaptation à l'hypoxie ainsi qu'au développement global de la tumeur pourrait entraîner son déclin à long terme. Par exemple, certain substrat de la furine tel le TGF- β 1, sont des facteurs de croissances important impliqués dans la progression tumorale (Derynck et al., 2001). D'autres, tels la MT1-MMP ou le VEGF-C, sont quant à eux impliqués au niveau de l'angiogenèse et du remodelage des tissus squelettiques et des tissus conjonctifs (Holmbeck et al., 1999; Schoppmann et al., 2006). Leurs actions permettent la migration des cellules endothéliales, mais aussi une augmentation de la capacité invasive des cellules tumorales, de la formation des métastases et du processus angiogénique (Egeblad and Werb, 2002; McCawley and Matrisian, 2000). Par ailleurs, il pourrait être pertinent de tester la combinaison de notre système avec des agents anti-cancéreux (chimiothérapie) afin de voir le potentiel thérapeutique associé au ciblage de la furine dans le cancer. Bien que le rôle de la furine dans la progression tumorale a déjà été démontré, ces résultats démontrent pour la première fois le rôle spécifique de la furine induite en hypoxie dans la progression tumorale *in vivo*.

On sait depuis au moins 100 ans que les leucocytes font partie intégrante des tumeurs et que l'inflammation joue un rôle important dans le développement tumoral (voir revue (Sica et al., 2006). Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) peuvent représenter jusqu'à 70% de la masse d'une tumeur (Kelly et al., 1988). Ces macrophages proviennent des monocytes périphériques présents dans le sang et sont recrutés dans la tumeur (Stephens et al., 1978) par

différents chimioattractants tels que CCL-2 et RANTES, qui sont produits soit par les cellules tumorales ou par les cellules stromales de la tumeur (Azenshtein et al., 2002; Negus et al., 1997). En plus des cellules tumorales, les TAM participent activement au développement des tumeurs en produisant plusieurs facteurs pro-tumorigéniques. Entre autres, l'accumulation de TAM dans les tumeurs a été associée à une augmentation de l'angiogenèse via la production de facteurs pro-angiogéniques dont le VEGF et le facteur de croissance des cellules endothéliales (Mantovani et al., 2002). Plus récemment, il a été proposé que les TAMs, dans le cancer du cerveau, joueraient un rôle important dans la formation des vaisseaux lymphatiques via la production de VEGF-C et favoriserait ainsi la formation de métastases lymphatiques (Schoppmann et al., 2002). De plus, la production de TGF- β ainsi que d'IL-10 par les TAM contribue à diminuer de façon générale les réponses anti-tumorales (Sica et al., 2006). Des études ont démontré que ces macrophages étaient présents en grand nombre dans les zones hypoxiques tumorales et pouvaient augmenter l'angiogenèse dans les tumeurs du sein, du poumon et de la prostate (Leek et al., 1999; Leek et al., 1996; Lissbrant et al., 2000; Takanami et al., 1999). Puisque la furine est exprimée par les macrophages, il serait pertinent de vérifier si la furine est augmentée chez les macrophages infiltrant les tumeurs, ce qui pourrait contribuer à l'augmentation de la furine dans les zones hypoxiques tumorales (Marcinkiewicz et al., 1999). Cette expérience pourrait être effectuée à l'aide de la technique de PCR en temps réel, puisque la furine humaine contenue dans les cellules tumorales humaines de notre modèle, diffère dans sa séquence de celle produite par les macrophages infiltrant de la souris. Il serait donc possible de synthétiser deux oligonucléotides distincts spécifiques pour la furine humaine ou murine. Dans notre modèle de xénogreffes, les macrophages n'expriment pas de PDX et pourraient

donc participer à l'activation de substrats de la furine, dont le TGF- β et ainsi favoriser la croissance tumorale. De plus, tel que montré à la figure 22a, certaines sections des tumeurs ne semble pas exprimer de PDX. Les tumeurs étant composées de plusieurs types cellulaires non tumoraux, incluant des fibroblastes, des cellules endothéliales ainsi que des leucocytes, chaque section d'une même tumeur peut avoir une composition cellulaire distincte (Balkwill and Mantovani, 2001; Mantovani et al., 2002). Ces cellules infiltrantes proviennent de l'hôte et ne possède donc pas de vecteur exprimant le PDX, ce qui peut faire varier le taux de cellules pouvant exprimer le PDX d'une région à l'autre de la tumeur. La présence des TAMs est peut-être une des raisons pour laquelle l'expression de PDX ne peut inhiber complètement la progression tumorale, puisque seul les cellules injectées expriment cet inhibiteur.

L'hypoxie est une condition physique ayant plusieurs effets au niveau cellulaire. Cette condition nécessite une adaptation de la part des cellules afin de maintenir une certaine homéostasie. Les techniques actuelles nous permettent de visualiser les zones hypoxiques à l'intérieur des tissus sains et pathologiques. La création dans les laboratoires de chimie du pimonidazole, une molécule non toxique réduite en hypoxie, a déjà permis à plusieurs équipes de visualiser les changements de concentration d'oxygène à l'intérieur des tumeurs humaines (Kaanders et al., 2002; Ljungkvist et al., 2000). Ces zones sont situées majoritairement dans les régions péri-nécrotiques des tumeurs ainsi que dans les régions éloignées du système vasculaire (figure 18). Tel que discuté auparavant, la présence de zones hypoxiques à l'intérieur des tumeurs amène la stabilisation du facteur de transcription HIF-1. Ce dernier est responsable de l'augmentation de l'expression de plusieurs gènes,

dont certains ont un rôle important dans les processus de progression tumorale ainsi que dans l'adaptation des cellules face aux nouvelles conditions hostiles du micro-environnement. De plus, la contribution de l'hypoxie dans la progression tumorale a été étudiée en utilisant un inhibiteur spécifique pour le HIF-1 dans des expériences de xénogreffes chez la souris. Ces expériences démontraient une diminution de l'angiogenèse ainsi que de la croissance tumorale lorsque le facteur de transcription HIF-1 est inhibé (Chun et al., 2001; Yeo et al., 2003). Lors de nos expériences de xénogreffes, le marquage à l'aide d'anticorps spécifiques à la furine démontre une surexpression de celle-ci dans les régions hypoxiques. Ces régions ont été mises en évidence par le pimonidazole, ce qui confirme que la furine est régulée à la hausse *in vivo* dans les régions hypoxiques (figure 20). À la lumière de ces observations, il serait intéressant de vérifier si la furine colocalise avec d'autres marqueurs endogènes de l'hypoxie. Le HIF-1 a été utilisé durant plusieurs années comme un marqueur endogène (Hutchison et al., 2004). Cependant, il n'est stable que pendant une courte période de temps, étant dégradé après seulement trois minutes de ré-oxygénation, ce qui complique les manipulations des tissus. De plus, le HIF-1 est connu pour être stabilisé dans certaines conditions normoxiques, ce qui amène une grande disparité quant à la localisation stricte du HIF-1 à l'intérieur des zones hypoxiques (Janssen et al., 2002). Par ailleurs, les produits de certains gènes induits par le HIF-1, tels que le récepteur Glut-1 ainsi que l'anhydrase carbonique 9 (CAIX) sont plus stables et ils colocalisent de façon plus étroite avec les zones hypoxiques marquées à l'aide du pimonidazole (Airley et al., 2001; Airley et al., 2003).

De façon intéressante, dans les étapes de mises au point des techniques de marquages, on a pu observer une relocalisation de la furine en hypoxie. Cette dernière semble quitté le TGN

pour aller se relocaliser à la membrane plasmique (figure 12). Il a été démontré que l'hypoxie a un impact sur la structure cellulaire ainsi que sur le transport intra-cellulaire des protéines. Récemment, l'équipe de Yoon a démontré que l'hypoxie augmente le potentiel invasif des cellules cancéreuses du sein en modifiant la localisation de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$. Cette dernière quitte les vésicules péri-nucléaires pour se relocaliser à la membrane plasmique. Ces recherches ont pu démontrer que la modification du transport cellulaire en hypoxie de cette intégrine est effectuée en partie grâce à la modulation de la protéine Rab11, une molécule importante dans le transport vésiculaire des protéines entre le TGN et la membrane plasmique, ainsi que par la stabilisation du réseau de microtubules (Yoon et al., 2005). Il serait donc intéressant de vérifier le rôle potentiel de rab11 dans la relocalisation de la furine en hypoxie. De plus, d'autres protéines sont connues pour participer au transport intra-cellulaire de la furine. Tel que discuté dans l'introduction, même si la furine se retrouve de façon majoritaire au TGN, elle voyage aussi entre ce compartiment et la surface cellulaire via la voie des endosomes (Bosshart et al., 1994; Jones et al., 1995; Liu et al., 1997a; Molloy et al., 1994; Schafer et al., 1995; Shapiro et al., 1997). La caséine kinase II (CKII), une kinase capable de phosphoryler la furine, est une protéine importante dans le déplacement cette dernière vers la membrane (Jones et al., 1995; Molloy et al., 1998). De façon intéressante, cette kinase est surexprimée dans les cellules cancéreuses et son expression est augmentée en hypoxie. D'ailleurs, il a déjà été démontré que la CKII augmente l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription HIF-1 (Critchfield et al., 1997; Mottet et al., 2005). La relocalisation de la furine à la membrane plasmique, par des phénomènes engendrés par une atmosphère hypoxique, pourrait jouer un rôle important dans les processus de progression tumorale. Il serait intéressant d'étudier ces mécanismes afin de

vérifier l'impact de cette relocalisation sur la maturation de substrats de la furine, tel que le TGF- β , sur la croissance tumorale.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'hypoxie régule à la hausse l'expression de la furine dans les tumeurs solides formées à partir de cellules cancéreuses humaines chez la souris. L'impact général de la furine sur la progression tumorale a déjà été démontré, mais c'est la première fois qu'on démontre l'implication d'une surexpression de la furine sur les processus de tumorigenèse. Ces résultats démontrent clairement une diminution de la croissance tumorale suite à l'inhibition de la furine présente dans les zones hypoxiques. Ces découvertes pourraient s'ajouter aux moyens connus utilisés pour lutter contre le cancer et ainsi permettent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre cette pathologie. Par exemple, puisque les tumeurs solides possèdent plusieurs zones hypoxiques, on pourrait inhiber la furine induite en hypoxie dans les tumeurs solide en utilisant un vecteur exprimant le PDX en hypoxie. En plus de diminuer la progression tumorale, ce système a l'avantage de cibler strictement les zones hypoxiques et donc, n'affecte pas directement les systèmes endogènes de défense contre la tumeur et pourrait diminuer les effets secondaire sur le système en général. Cependant, il reste plusieurs pas à franchir avant de pouvoir utiliser ce système, surtout au niveau des moyens permettant de délivrer les vecteurs.

Afin de régler ce problème de transport, des chercheurs ont mis au point un véhicule capable de cibler les zones hypoxiques. Le mécanisme de sélection de ce véhicule implique un changement de structure d'une molécule appelée quinone, en présence d'un environnement hypoxique (Jaffar et al., 2004). Cette technique pourrait être utilisée afin de créer une

molécule chimique capable d'inhiber la furine, qui deviendrait active seulement dans les régions pauvres en oxygène. Puisque la furine est impliquée dans l'homéostasie des tumeurs, cette stratégie permettrait d'inhiber la progression tumorale en inhibant la furine dans les régions hypoxiques des tumeurs. Cette idée générale pourrait aussi servir à d'autres pathologies impliquant un environnement hypoxique (Jaffar et al., 2001).

5.0 CONCLUSION

L'objectif de cette recherche consistait donc à étudier l'implication de la régulation hypoxique de la furine dans le développement du cancer. Tout d'abord, nous avons démontré par la technique d'immunohistochimie qu'il y avait présence de zones hypoxique dans les tumeurs, et qu'il y avait une surexpression de furine à l'intérieur de ces régions.

Afin de vérifier l'impact de la surexpression de furine en hypoxie, nous avons utilisé des constructions plasmidiques codant pour un inhibiteur de la furine, le PDX, sous le contrôle d'un promoteur inductible en hypoxie. Ces promoteurs possèdent 3 ou 6 répétitions du site de reconnaissance pour le HIF-1 du gène de l'érythropoïétine, soit le *hypoxia responsive element* (HRE). Grâce à ces plasmides, nous avons démontré chez un modèle de xénogreffes chez la souris que la progression tumorale est inhibée chez les tumeurs formées à partir des cellules HT1080 exprimant du PDX en hypoxie. L'expression de PDX, chez les cellules transfectées avec les vecteurs 3 et 6HRE-PDX et cultivées en hypoxie, diminue les niveaux d'activation de la MT1-MMP, de l'IGF-1R β et de la MMP-2, des substrats de la furine impliqués dans les processus de progression tumorale.

Ces travaux, démontrent pour la première fois qu'une inhibition ciblée de la furine dans les zones hypoxiques des tumeurs affecte négativement la progression tumorale. De plus, ces résultats contribuent à la compréhension des mécanismes impliqués dans l'augmentation de la maturation/activation de proprotéines impliqués dans la tumorigenèse et confirment les effets néfaste d'une surexpression de furine en hypoxie sur l'homéostasie des cellules.

Ces résultats soutiennent les recherches antérieures portant sur le potentiel thérapeutique de l'utilisation de l'hypoxie tumoral dans la lutte au cancer et confirment la furine comme cible potentielle dans le contrôle de la progression tumorale.

Finalement, ce projet de recherche contribue donc de façon général à l'avancement des connaissances sur le cancer et amène de nouvelles perspectives dans le traitement de cette pathologie du 21^e siècle.

6.0 REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier le Dre Claire Dubois, qui m'a d'abord accueilli comme stagiaire dans son laboratoire, et qui m'a ensuite confié ce projet intéressant. Tout au long de ma maîtrise, grâce à sa confiance, j'ai pu agir selon mes idées afin de réaliser ce projet. Je la remercie aussi pour sa patience et le temps qu'elle m'a alloué.

Je voudrais également remercier les membres du laboratoire, sans lesquels ma maîtrise n'aurait pas été la même. Merci particulièrement au Dre Stéphanie McMahon, qui a passé beaucoup de temps à répondre à mes questions et qui m'a aidé à plusieurs reprises avec ses idées (quelques fois « hilarantes »...). Merci aussi à Francine Grondin pour son aide, ses conseils techniques et ses encouragements.

Mes remerciements à tous les professeurs, les secrétaires et le personnel technique du programme d'immunologie qui m'ont guidé tout au long de mes études et avec qui il fut bon de discuter.

Je remercie sincèrement ma famille pour leur support et leurs encouragements tout au long de mes études. Merci Marie-Pierre pour ton support et ta patience! Ta présence dans ma vie m'a permis de passer à travers ces années. Merci aussi à mes amis (es) qui m'ont permis de garder une santé mentale et physique.

Je remercie également les membres du jury, Dre Claire M.Dubois, Dr. Claudine Rancourt et Dr. Abdelaziz Amarani pour avoir donné de votre temps à la correction de ce mémoire.

7.0 BIBLIOGRAPHIE

- Airley, R., Loncaster, J., Davidson, S., Bromley, M., Roberts, S., Patterson, A., Hunter, R., Stratford, I. and West, C. (2001) Glucose transporter glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res*, **7**, 928-934.
- Airley, R.E., Loncaster, J., Raleigh, J.A., Harris, A.L., Davidson, S.E., Hunter, R.D., West, C.M. and Stratford, I.J. (2003) GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazole binding. *Int J Cancer*, **104**, 85-91.
- Allard, D., Amsellem, S., Abifadel, M., Trillard, M., Devillers, M., Luc, G., Krempf, M., Reznik, Y., Girardet, J.P., Fredenrich, A., Junien, C., Varret, M., Boileau, C., Benlian, P. and Rabes, J.P. (2005) Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Hum Mutat*, **26**, 497.
- Anderson, E.D., Thomas, L., Hayflick, J.S. and Thomas, G. (1993) Inhibition of HIV-1 gp160-dependent membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant. *J Biol Chem*, **268**, 24887-24891.
- Appelhoff, R.J., Tian, Y.M., Raval, R.R., Turley, H., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Gleadle, J.M. (2004) Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*, **279**, 38458-38465.
- Atkinson, S.J., Crabbe, T., Cowell, S., Ward, R.V., Butler, M.J., Sato, H., Seiki, M., Reynolds, J.J. and Murphy, G. (1995) Intermolecular autolytic cleavage can contribute to the activation of progelatinase A by cell membranes. *J Biol Chem*, **270**, 30479-30485.
- Ayoubi, T.A., Creemers, J.W., Roebroek, A.J. and Van de Ven, W.J. (1994) Expression of the dibasic proprotein processing enzyme furin is directed by multiple promoters. *J Biol Chem*, **269**, 9298-9303.
- Azenshtein, E., Luboshits, G., Shina, S., Neumark, E., Shahbazian, D., Weil, M., Wigler, N., Keydar, I. and Ben-Baruch, A. (2002) The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. *Cancer Res*, **62**, 1093-1102.
- Baker, A.H., Edwards, D.R. and Murphy, G. (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*, **115**, 3719-3727.

- Balkwill, F. and Mantovani, A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, **357**, 539-545.
- Baramova, E.N., Bajou, K., Remacle, A., L'Hoir, C., Krell, H.W., Weidle, U.H., Noel, A. and Foidart, J.M. (1997) Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Lett*, **405**, 157-162.
- Bassi, D.E., Fu, J., Lopez de Cicco, R. and Klein-Szanto, A.J. (2005) Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression. *Mol Carcinog*, **44**, 151-161.
- Bassi, D.E., Lopez De Cicco, R., Mahloogi, H., Zucker, S., Thomas, G. and Klein-Szanto, A.J. (2001a) Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10326-10331.
- Bassi, D.E., Mahloogi, H., Al-Saleem, L., Lopez De Cicco, R., Ridge, J.A. and Klein-Szanto, A.J. (2001b) Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol Carcinog*, **31**, 224-232.
- Bassi, D.E., Mahloogi, H. and Klein-Szanto, A.J. (2000) The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression. *Mol Carcinog*, **28**, 63-69.
- Bathurst, I.C., Brennan, S.O., Carrell, R.W., Cousens, L.S., Brake, A.J. and Barr, P.J. (1987) Yeast KEX2 protease has the properties of a human proalbumin converting enzyme. *Science*, **235**, 348-350.
- Benjannet, S., Savaria, D., Laslop, A., Munzer, J.S., Chretien, M., Marcinkiewicz, M. and Seidah, N.G. (1997) Alpha1-antitrypsin Portland inhibits processing of precursors mediated by proprotein convertases primarily within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem*, **272**, 26210-26218.
- Bentley, A.K., Rees, D.J., Rizza, C. and Brownlee, G.G. (1986) Defective propeptide processing of blood clotting factor IX caused by mutation of arginine to glutamine at position -4. *Cell*, **45**, 343-348.
- Berra, E., Ginouves, A. and Pouyssegur, J. (2006) The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep*, **7**, 41-45.
- Bhaumick, B., Goren, H.J. and Bala, R.M. (1981) Further characterization of human basic-somatomedin: comparison with insulin-like growth factors I and II. *Horm Metab Res*, **13**, 515-518.

- Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. and Engler, J.A. (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*, **4**, 197-250.
- Blanchette, F., Day, R., Dong, W., Laprise, M.H. and Dubois, C.M. (1997) TGFbeta1 regulates gene expression of its own converting enzyme furin. *J Clin Invest*, **99**, 1974-1983.
- Blanchette, F., Rivard, N., Rudd, P., Grondin, F., Attisano, L. and Dubois, C.M. (2001a) Cross-talk between the p42/p44 MAP kinase and Smad pathways in transforming growth factor beta 1-induced furin gene transactivation. *J Biol Chem*, **276**, 33986-33994.
- Blanchette, F., Rudd, P., Grondin, F., Attisano, L. and Dubois, C.M. (2001b) Involvement of Smads in TGFbeta1-induced furin (fur) transcription. *J Cell Physiol*, **188**, 264-273.
- Bos, J.L., Verlaan-de Vries, M., Jansen, A.M., Veeneman, G.H., van Boom, J.H. and van der Eb, A.J. (1984) Three different mutations in codon 61 of the human N-ras gene detected by synthetic oligonucleotide hybridization. *Nucleic Acids Res*, **12**, 9155-9163.
- Bosshart, H., Humphrey, J., Deignan, E., Davidson, J., Drazba, J., Yuan, L., Oorschot, V., Peters, P.J. and Bonifacino, J.S. (1994) The cytoplasmic domain mediates localization of furin to the trans-Golgi network en route to the endosomal/lysosomal system. *J Cell Biol*, **126**, 1157-1172.
- Bruick, R.K. and McKnight, S.L. (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, **294**, 1337-1340.
- Bruzzaniti, A., Goodge, K., Jay, P., Taviaux, S.A., Lam, M.H., Berta, P., Martin, T.J., Moseley, J.M. and Gillespie, M.T. (1996) PC8 [corrected], a new member of the convertase family. *Biochem J*, **314** (Pt 3), 727-731.
- Bryan, P., Pantoliano, M.W., Quill, S.G., Hsiao, H.Y. and Poulos, T. (1986) Site-directed mutagenesis and the role of the oxyanion hole in subtilisin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 3743-3745.
- Bryan, T.M. and Cech, T.R. (1999) Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 318-324.
- Cao, J., Rehemtulla, A., Pavlaki, M., Kozarekar, P. and Chiarelli, C. (2005) Furin directly cleaves proMMP-2 in the trans-Golgi network resulting in a nonfunctioning proteinase. *J Biol Chem*, **280**, 10974-10980.

- Carrero, P., Okamoto, K., Coumailleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H. and Poellinger, L. (2000) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Cell Biol*, **20**, 402-415.
- Carrozza, M.J., Utley, R.T., Workman, J.L. and Cote, J. (2003) The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet*, **19**, 321-329.
- Chandler, L.A. and Bourgeois, S. (1991) Posttranscriptional down-regulation of fibronectin in N-ras-transformed cells. *Cell Growth Differ*, **2**, 379-384.
- Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F. and Maity, A. (2001) Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem*, **276**, 9519-9525.
- Cheng, M., Watson, P.H., Paterson, J.A., Seidah, N., Chretien, M. and Shiu, R.P. (1997) Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int J Cancer*, **71**, 966-971.
- Chernausk, S.D., Jacobs, S. and Van Wyk, J.J. (1981) Structural similarities between human receptors for somatomedin C and insulin: analysis by affinity labeling. *Biochemistry*, **20**, 7345-7350.
- Chretien, M. and Li, C.H. (1967) Isolation, purification, and characterization of gamma-lipotrophic hormone from sheep pituitary glands. *Can J Biochem*, **45**, 1163-1174.
- Chun, Y.S., Choi, E., Yeo, E.J., Lee, J.H., Kim, M.S. and Park, J.W. (2001) A new HIF-1 α variant induced by zinc ion suppresses HIF-1-mediated hypoxic responses. *J Cell Sci*, **114**, 4051-4061.
- Constam, D.B., Calfon, M. and Robertson, E.J. (1996) SPC4, SPC6, and the novel protease SPC7 are coexpressed with bone morphogenetic proteins at distinct sites during embryogenesis. *J Cell Biol*, **134**, 181-191.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B. and Bacchetti, S. (1992) Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J*, **11**, 1921-1929.
- Coussens, L.M. and Werb, Z. (1996) Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol*, **3**, 895-904.
- Cowell, S., Knauper, V., Stewart, M.L., D'Ortho, M.P., Stanton, H., Hembry, R.M., Lopez-Otin, C., Reynolds, J.J. and Murphy, G. (1998) Induction of matrix metalloproteinase

activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3. *Biochem J*, **331** (Pt 2), 453-458.

Cowen, R.L., Williams, K.J., Chinje, E.C., Jaffar, M., Sheppard, F.C., Telfer, B.A., Wind, N.S. and Stratford, I.J. (2004) Hypoxia targeted gene therapy to increase the efficacy of tirapazamine as an adjuvant to radiotherapy: reversing tumor radioresistance and effecting cure. *Cancer Res*, **64**, 1396-1402.

Creemers, J.W., Siezen, R.J., Roebroek, A.J., Ayoubi, T.A., Huylebroeck, D. and Van de Ven, W.J. (1993) Modulation of furin-mediated proprotein processing activity by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, **268**, 21826-21834.

Creemers, J.W., Vey, M., Schafer, W., Ayoubi, T.A., Roebroek, A.J., Klenk, H.D., Garten, W. and Van de Ven, W.J. (1995) Endoproteolytic cleavage of its propeptide is a prerequisite for efficient transport of furin out of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **270**, 2695-2702.

Critchfield, J.W., Coligan, J.E., Folks, T.M. and Butera, S.T. (1997) Casein kinase II is a selective target of HIV-1 transcriptional inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6110-6115.

Dahlen, J.R., Jean, F., Thomas, G., Foster, D.C. and Kisiel, W. (1998) Inhibition of soluble recombinant furin by human proteinase inhibitor 8. *J Biol Chem*, **273**, 1851-1854.

De Bie, I., Marcinkiewicz, M., Malide, D., Lazure, C., Nakayama, K., Bendayan, M. and Seidah, N.G. (1996) The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments. *J Cell Biol*, **135**, 1261-1275.

del Peso, L., Castellanos, M.C., Temes, E., Martin-Puig, S., Cuevas, Y., Olmos, G. and Landazuri, M.O. (2003) The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen. *J Biol Chem*, **278**, 48690-48695.

Derynck, R., Akhurst, R.J. and Balmain, A. (2001) TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*, **29**, 117-129.

d'Ortho, M.P., Will, H., Atkinson, S., Butler, G., Messent, A., Gavrilovic, J., Smith, B., Timpl, R., Zardi, L. and Murphy, G. (1997) Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem*, **250**, 751-757.

- Dufour, E.K., Denault, J.B., Hopkins, P.C. and Leduc, R. (1998) Serpin-like properties of alpha1-antitrypsin Portland towards furin convertase. *FEBS Lett*, **426**, 41-46.
- Egeblad, M. and Werb, Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, **2**, 161-174.
- Elagoz, A., Benjannet, S., Mammabassi, A., Wickham, L. and Seidah, N.G. (2002) Biosynthesis and cellular trafficking of the convertase SKI-1/S1P: ectodomain shedding requires SKI-1 activity. *J Biol Chem*, **277**, 11265-11275.
- Elliott, R.L. and Blobe, G.C. (2005) Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol*, **23**, 2078-2093.
- Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J. and Ratcliffe, P.J. (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, **107**, 43-54.
- Fedi. (1997) *Growth factors*, Baltimore.
- Feldser, D., Agani, F., Iyer, N.V., Pak, B., Ferreira, G. and Semenza, G.L. (1999) Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*, **59**, 3915-3918.
- Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C. and Williams, G. (1971) Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*, **133**, 275-288.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D. and Semenza, G.L. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, **16**, 4604-4613.
- Freedman, S.J., Sun, Z.Y., Poy, F., Kung, A.L., Livingston, D.M., Wagner, G. and Eck, M.J. (2002) Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5367-5372.
- Froesch, E.R. and Zapf, J. (1985) Insulin-like growth factors and insulin: comparative aspects. *Diabetologia*, **28**, 485-493.
- Fu, X., Inouye, M. and Shinde, U. (2000) Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. The inhibitory and chaperone functions of the subtilisin propeptide are not obligatorily linked. *J Biol Chem*, **275**, 16871-16878.

- Fugere, M., Limperis, P.C., Beaulieu-Audy, V., Gagnon, F., Lavigne, P., Klarskov, K., Leduc, R. and Day, R. (2002) Inhibitory potency and specificity of subtilase-like pro-protein convertase (SPC) prodomains. *J Biol Chem*, **277**, 7648-7656.
- Fukuda, R., Hirota, K., Fan, F., Jung, Y.D., Ellis, L.M. and Semenza, G.L. (2002) Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem*, **277**, 38205-38211.
- Fukuda, R., Kelly, B. and Semenza, G.L. (2003) Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res*, **63**, 2330-2334.
- Fuller, R.S., Brake, A.J. and Thorner, J. (1989) Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science*, **246**, 482-486.
- Garten, W., Hallenberger, S., Ortmann, D., Schafer, W., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E. and Klenk, H.D. (1994) Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie*, **76**, 217-225.
- Giannelli, G., Astigiano, S., Antonaci, S., Morini, M., Barbieri, O., Noonan, D.M. and Albin, A. (2002) Role of the alpha3beta1 and alpha6beta4 integrins in tumor invasion. *Clin Exp Metastasis*, **19**, 217-223.
- Gluschankof, P. and Fuller, R.S. (1994) A C-terminal domain conserved in precursor processing proteases is required for intramolecular N-terminal maturation of pro-Kex2 protease. *Embo J*, **13**, 2280-2288.
- Goodman, L.J. and Gorman, C.M. (1994) Autoproteolytic activation of the mouse prohormone convertase mPC1. *Biochem Biophys Res Commun*, **201**, 795-804.
- Gordon, V.M., Klimpel, K.R., Arora, N., Henderson, M.A. and Leppla, S.H. (1995) Proteolytic activation of bacterial toxins by eukaryotic cells is performed by furin and by additional cellular proteases. *Infect Immun*, **63**, 82-87.
- Gray, M.J., Zhang, J., Ellis, L.M., Semenza, G.L., Evans, D.B., Watowich, S.S. and Gallick, G.E. (2005) HIF-1alpha, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene*, **24**, 3110-3120.

- Greco, O., Marples, B., Joiner, M.C. and Scott, S.D. (2003) How to overcome (and exploit) tumor hypoxia for targeted gene therapy. *J Cell Physiol*, **197**, 312-325.
- Gross, M.W., Karbach, U., Groebe, K., Franko, A.J. and Mueller-Klieser, W. (1995) Calibration of misonidazole labeling by simultaneous measurement of oxygen tension and labeling density in multicellular spheroids. *Int J Cancer*, **61**, 567-573.
- Gupta, S., Stuffrein, S., Plattner, R., Tencati, M., Gray, C., Whang, Y.E. and Stanbridge, E.J. (2001) Role of phosphoinositide 3-kinase in the aggressive tumor growth of HT1080 human fibrosarcoma cells. *Mol Cell Biol*, **21**, 5846-5856.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, **86**, 353-364.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Harris, C.C. (1996) p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*, **17**, 1187-1198.
- Hatsuzawa, K., Murakami, K. and Nakayama, K. (1992a) Molecular and enzymatic properties of furin, a Kex2-like endoprotease involved in precursor cleavage at Arg-X-Lys/Arg-Arg sites. *J Biochem (Tokyo)*, **111**, 296-301.
- Hatsuzawa, K., Nagahama, M., Takahashi, S., Takada, K., Murakami, K. and Nakayama, K. (1992b) Purification and characterization of furin, a Kex2-like processing endoprotease, produced in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, **267**, 16094-16099.
- Hausinger, R.P. (2004) FcII/alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **39**, 21-68.
- Hennigan, R.F. and Stambrook, P.J. (2001) Dominant negative c-jun inhibits activation of the cyclin D1 and cyclin E kinase complexes. *Mol Biol Cell*, **12**, 2352-2363.
- Hirota, K., Aoyama, H. and Fukamizu, A. (2005) Mutation analysis of HNF-4 binding sites in the human glucose-6-phosphatase promoter. *Int J Mol Med*, **15**, 487-490.
- Hofmann, U.B., Westphal, J.R., Waas, E.T., Zendman, A.J., Cornelissen, I.M., Ruiter, D.J. and van Muijen, G.N. (1999) Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br J Cancer*, **81**, 774-782.

- Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S.A., Mankani, M., Robey, P.G., Poole, A.R., Pidoux, I., Ward, J.M. and Birkedal-Hansen, H. (1999) MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*, **99**, 81-92.
- Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W.S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K. and Nakayama, K. (1991) Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem*, **266**, 12127-12130.
- Huang, L.E., Gu, J., Schau, M. and Bunn, H.F. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7987-7992.
- Hutchison, G.J., Valentine, H.R., Lancaster, J.A., Davidson, S.E., Hunter, R.D., Roberts, S.A., Harris, A.L., Stratford, I.J., Price, P.M. and West, C.M. (2004) Hypoxia-inducible factor 1alpha expression as an intrinsic marker of hypoxia: correlation with tumor oxygen, pimonidazole measurements, and outcome in locally advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res*, **10**, 8405-8412.
- Imamura, T., Ohshio, G., Mise, M., Harada, T., Suwa, H., Okada, N., Wang, Z., Yoshitomi, S., Tanaka, T., Sato, H., Arai, S., Seiki, M. and Imamura, M. (1998) Expression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in human pancreatic adenocarcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol*, **124**, 65-72.
- Itoh, Y., Takamura, A., Ito, N., Maru, Y., Sato, H., Suenaga, N., Aoki, T. and Seiki, M. (2001) Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *Embo J*, **20**, 4782-4793.
- Ivanov, S.V., Kuzmin, I., Wei, M.H., Pack, S., Geil, L., Johnson, B.E., Stanbridge, E.J. and Lerman, M.I. (1998) Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12596-12601.
- Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y. and Semenza, G.L. (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*, **12**, 149-162.
- Jacobs, S., Kull, F.C., Jr., Earp, H.S., Svoboda, M.E., Van Wyk, J.J. and Cuatrecasas, P. (1983) Somatomedin-C stimulates the phosphorylation of the beta-subunit of its own receptor. *J Biol Chem*, **258**, 9581-9584.

- Jaffar, M., Abou-Zeid, N., Bai, L., Mrema, I., Robinson, I., Tanner, R. and Stratford, I.J. (2004) Quinone bioreductive prodrugs as delivery agents. *Curr Drug Deliv*, **1**, 345-350.
- Jaffar, M., Williams, K.J. and Stratford, I.J. (2001) Bioreductive and gene therapy approaches to hypoxic diseases. *Adv Drug Deliv Rev*, **53**, 217-228.
- Janssen, H.L., Haustermans, K.M., Sprong, D., Blommestijn, G., Hofland, I., Hoebbers, F.J., Blijweert, E., Raleigh, J.A., Semenza, G.L., Varia, M.A., Balm, A.J., van Velthuysen, M.L., Delaere, P., Sciot, R. and Begg, A.C. (2002) HIF-1A, pimonidazole, and iododeoxyuridine to estimate hypoxia and perfusion in human head-and-neck tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **54**, 1537-1549.
- Jean, F., Boudreault, A., Basak, A., Seidah, N.G. and Lazure, C. (1995) Fluorescent peptidyl substrates as an aid in studying the substrate specificity of human prohormone convertase PC1 and human furin and designing a potent irreversible inhibitor. *J Biol Chem*, **270**, 19225-19231.
- Jean, F., Stella, K., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Reason, A.J. and Thomas, G. (1998) alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7293-7298.
- Jean, F., Thomas, L., Molloy, S.S., Liu, G., Jarvis, M.A., Nelson, J.A. and Thomas, G. (2000) A protein-based therapeutic for human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2864-2869.
- Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J. and Kim, K.W. (2002) Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, **111**, 709-720.
- Jewell, U.R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R.H. and Gassmann, M. (2001) Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *Faseb J*, **15**, 1312-1314.
- Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R. and Semenza, G.L. (1996a) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **271**, 17771-17778.
- Jiang, B.H., Semenza, G.L., Bauer, C. and Marti, H.H. (1996b) Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol*, **271**, C1172-1180.

- Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R. and Semenza, G.L. (1997) Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem*, **272**, 19253-19260.
- Jones, B.G., Thomas, L., Molloy, S.S., Thulin, C.D., Fry, M.D., Walsh, K.A. and Thomas, G. (1995) Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *Embo J*, **14**, 5869-5883.
- Julius, D., Schekman, R. and Thorner, J. (1984) Glycosylation and processing of prepro-alpha-factor through the yeast secretory pathway. *Cell*, **36**, 309-318.
- Kaanders, J.H., Wijffels, K.I., Marres, H.A., Ljungkvist, A.S., Pop, L.A., van den Hoogen, F.J., de Wilde, P.C., Bussink, J., Raleigh, J.A. and van der Kogel, A.J. (2002) Pimonidazole binding and tumor vascularity predict for treatment outcome in head and neck cancer. *Cancer Res*, **62**, 7066-7074.
- Kelly, P.M., Davison, R.S., Bliss, E. and McGee, J.O. (1988) Macrophages in human breast disease: a quantitative immunohistochemical study. *Br J Cancer*, **57**, 174-177.
- Khatib, A.M., Siegfried, G., Chretien, M., Metrakos, P. and Seidah, N.G. (2002) Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *Am J Pathol*, **160**, 1921-1935.
- Khatib, A.M., Siegfried, G., Prat, A., Luis, J., Chretien, M., Metrakos, P. and Seidah, N.G. (2001) Inhibition of proprotein convertases is associated with loss of growth and tumorigenicity of HT-29 human colon carcinoma cells: importance of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor processing in IGF-1-mediated functions. *J Biol Chem*, **276**, 30686-30693.
- Kiefer, M.C., Tucker, J.E., Joh, R., Landsberg, K.E., Saltman, D. and Barr, P.J. (1991) Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA Cell Biol*, **10**, 757-769.
- Kimura, H., Weisz, A., Ogura, T., Hitomi, Y., Kurashima, Y., Hashimoto, K., D'Acquisto, F., Makuuchi, M. and Esumi, H. (2001) Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem*, **276**, 2292-2298.
- Knauper, V., Will, H., Lopez-Otin, C., Smith, B., Atkinson, S.J., Stanton, H., Hembry, R.M. and Murphy, G. (1996) Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem*, **271**, 17124-17131.

- Kolkenbrock, H., Hecker-Kia, A., Orgel, D., Ulbrich, N. and Will, H. (1997) Activation of progelatinase A and progelatinase A/TIMP-2 complex by membrane type 2-matrix metalloproteinase. *Biol Chem*, **378**, 71-76.
- Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P. and Semenza, G.L. (2003) Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res*, **63**, 1138-1143.
- Kung, A.L., Wang, S., Klco, J.M., Kaelin, W.G. and Livingston, D.M. (2000) Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med*, **6**, 1335-1340.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L. and Bruick, R.K. (2002) FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*, **16**, 1466-1471.
- Laprise, M.H., Grondin, F., Cayer, P., McDonald, P.P. and Dubois, C.M. (2002) Furin gene (fur) regulation in differentiating human megakaryoblastic Dami cells: involvement of the proximal GATA recognition motif in the P1 promoter and impact on the maturation of furin substrates. *Blood*, **100**, 3578-3587.
- Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C. and Semenza, G.L. (2001) HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol*, **21**, 3995-4004.
- Leduc, R., Molloy, S.S., Thorne, B.A. and Thomas, G. (1992) Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J Biol Chem*, **267**, 14304-14308.
- Leek, R.D., Landers, R.J., Harris, A.L. and Lewis, C.E. (1999) Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer*, **79**, 991-995.
- Leek, R.D., Lewis, C.E., Whitehouse, R., Greenall, M., Clarke, J. and Harris, A.L. (1996) Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*, **56**, 4625-4629.
- Lehti, K., Lohi, J., Juntunen, M.M., Pei, D. and Keski-Oja, J. (2002) Oligomerization through hemopexin and cytoplasmic domains regulates the activity and turnover of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem*, **277**, 8440-8448.

- Lipkind, G.M., Zhou, A. and Steiner, D.F. (1998) A model for the structure of the P domains in the subtilisin-like prohormone convertases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7310-7315.
- Lissbrant, I.F., Stattin, P., Wikstrom, P., Damber, J.E., Egevad, L. and Bergh, A. (2000) Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *Int J Oncol*, **17**, 445-451.
- Liu, G., Thomas, L., Warren, R.A., Enns, C.A., Cunningham, C.C., Hartwig, J.H. and Thomas, G. (1997a) Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates proprotein processing in the endocytic pathway. *J Cell Biol*, **139**, 1719-1733.
- Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J. and Efstratiadis, A. (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type I IGF receptor (Igf1r). *Cell*, **75**, 59-72.
- Liu, Z.Y., Ganju, R.K., Wang, J.F., Ona, M.A., Hatch, W.C., Zheng, T., Avraham, S., Gill, P. and Groopman, J.E. (1997b) Cytokine signaling through the novel tyrosine kinase RAFTK in Kaposi's sarcoma cells. *J Clin Invest*, **99**, 1798-1804.
- Ljungkvist, A.S., Bussink, J., Rijken, P.F., Raleigh, J.A., Denekamp, J. and Van Der Kogel, A.J. (2000) Changes in tumor hypoxia measured with a double hypoxic marker technique. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **48**, 1529-1538.
- Llano, E., Pendas, A.M., Freije, J.P., Nakano, A., Knauper, V., Murphy, G. and Lopez-Otin, C. (1999) Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res*, **59**, 2570-2576.
- Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., Day, R., Chretien, M. and Seidah, N.G. (1993) cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6691-6695.
- Macaulay, V.M., Teale, J.D., Everard, M.J., Joshi, G.P., Smith, I.E. and Millar, J.L. (1988) Somatomedin-C/insulin-like growth factor-I is a mitogen for human small cell lung cancer. *Br J Cancer*, **57**, 91-93.
- Mahon, P.C., Hirota, K. and Semenza, G.L. (2001) FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*, **15**, 2675-2686.

- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. and Sica, A. (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, **23**, 549-555.
- Maquoi, E., Noel, A., Frankenhe, F., Angliker, H., Murphy, G. and Foidart, J.M. (1998) Inhibition of matrix metalloproteinase 2 maturation and HT1080 invasiveness by a synthetic furin inhibitor. *FEBS Lett*, **424**, 262-266.
- Marcinkiewicz, M., Marcinkiewicz, J., Chen, A., Leclaire, F., Chretien, M. and Richardson, P. (1999) Nerve growth factor and proprotein convertases furin and PC7 in transected sciatic nerves and in nerve segments cultured in conditioned media: their presence in Schwann cells, macrophages, and smooth muscle cells. *J Comp Neurol*, **403**, 471-485.
- Matrisian, L.M. (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*, **14**, 455-463.
- Maxwell, P.H. (2005) The HIF pathway in cancer. *Semin Cell Dev Biol*, **16**, 523-530.
- Maxwell, P.H., Dachs, G.U., Gleadle, J.M., Nicholls, L.G., Harris, A.L., Stratford, I.J., Hankinson, O., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (1997) Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8104-8109.
- Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (2001) Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 293-299.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. and Ratcliffe, P.J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, **399**, 271-275.
- Mayer-Jaekel, R.E. and Hemmings, B.A. (1994) Protein phosphatase 2A--a 'menage a trois'. *Trends Cell Biol*, **4**, 287-291.
- McCawley, L.J. and Matrisian, L.M. (2000) Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today*, **6**, 149-156.
- McMahon, S., Charbonneau, M., Grandmont, S., Richard, D.E. and Dubois, C.M. (2006) TGFbeta 1 induces HIF-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. *J Biol Chem*.
- McMahon, S., Grondin, F., McDonald, P.P., Richard, D.E. and Dubois, C.M. (2005) Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by

- hypoxia-inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins. *J Biol Chem*, **280**, 6561-6569.
- McMahon, S., Laprise, M.H. and Dubois, C.M. (2003) Alternative pathway for the role of furin in tumor cell invasion process. Enhanced MMP-2 levels through bioactive TGFbeta. *Exp Cell Res*, **291**, 326-339.
- Medema, R.H. and Bos, J.L. (1993) The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog*, **4**, 615-661.
- Meerabux, J., Yaspo, M.L., Roebroek, A.J., Van de Ven, W.J., Lister, T.A. and Young, B.D. (1996) A new member of the proprotein convertase gene family (LPC) is located at a chromosome translocation breakpoint in lymphomas. *Cancer Res*, **56**, 448-451.
- Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L.S., Cox, G.W. and Varesio, L. (1995) A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med*, **182**, 1683-1693.
- Mercapide, J., Lopez De Cicco, R., Bassi, D.E., Castresana, J.S., Thomas, G. and Klein-Szanto, A.J. (2002) Inhibition of furin-mediated processing results in suppression of astrocytoma cell growth and invasiveness. *Clin Cancer Res*, **8**, 1740-1746.
- Mercier, P. and Ekindjian, O.G. (1990) [Collagen type IV: major component of basement membranes. Current knowledge]. *Ann Biol Clin (Paris)*, **48**, 695-711.
- Mizuno, K., Nakamura, T., Ohshima, T., Tanaka, S. and Matsuo, H. (1988) Yeast KEX2 genes encodes an endopeptidase homologous to subtilisin-like serine proteases. *Biochem Biophys Res Commun*, **156**, 246-254.
- Moeller, L.C., Dumitrescu, A.M. and Refetoff, S. (2005) Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and glycolytic genes. *Mol Endocrinol*, **19**, 2955-2963.
- Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R. and Thomas, G. (1992) Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem*, **267**, 16396-16402.
- Molloy, S.S., Thomas, L., Kamibayashi, C., Mumby, M.C. and Thomas, G. (1998) Regulation of endosome sorting by a specific PP2A isoform. *J Cell Biol*, **142**, 1399-1411.

- Molloy, S.S., Thomas, L., VanSlyke, J.K., Stenberg, P.E. and Thomas, G. (1994) Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *Embo J*, **13**, 18-33.
- Mori, A., Arii, S., Furutani, M., Hanaki, K., Takeda, Y., Moriga, T., Kondo, Y., Gorrin Rivas, M.J. and Imamura, M. (1999) Vascular endothelial growth factor-induced tumor angiogenesis and tumorigenicity in relation to metastasis in a HT1080 human fibrosarcoma cell model. *Int J Cancer*, **80**, 738-743.
- Mottet, D., Ruys, S.P., Demazy, C., Raes, M. and Michiels, C. (2005) Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity. *Int J Cancer*, **117**, 764-774.
- Moulard, M. and Decroly, E. (2000) Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochim Biophys Acta*, **1469**, 121-132.
- Munzer, J.S., Basak, A., Zhong, M., Mamarbachi, A., Hamelin, J., Savaria, D., Lazure, C., Hendy, G.N., Benjannet, S., Chretien, M. and Seidah, N.G. (1997) In vitro characterization of the novel proprotein convertase PC7. *J Biol Chem*, **272**, 19672-19681.
- Nagase, H. and Woessner, J.F., Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, **274**, 21491-21494.
- Nakagawa, T., Hosaka, M., Torii, S., Watanabe, T., Murakami, K. and Nakayama, K. (1993a) Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: its striking structural similarity to PACE4. *J Biochem (Tokyo)*, **113**, 132-135.
- Nakagawa, T., Murakami, K. and Nakayama, K. (1993b) Identification of an isoform with an extremely large Cys-rich region of PC6, a Kex2-like processing endoprotease. *FEBS Lett*, **327**, 165-171.
- Nakayama, K., Hosaka, M., Hatsuzawa, K. and Murakami, K. (1991) Cloning and functional expression of a novel endoprotease involved in prohormone processing at dibasic sites. *J Biochem (Tokyo)*, **109**, 803-806.
- Nakayama, K., Kim, W.S., Torii, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Baba, T. and Murakami, K. (1992) Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. Its testis-specific expression. *J Biol Chem*, **267**, 5897-5900.
- Naureckiene, S., Ma, L., Sreekumar, K., Purandare, U., Lo, C.F., Huang, Y., Chiang, L.W., Grenier, J.M., Ozenberger, B.A., Jacobsen, J.S., Kennedy, J.D., DiStefano, P.S.,

- Wood, A. and Bingham, B. (2003) Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch Biochem Biophys*, **420**, 55-67.
- Negus, R.P., Stamp, G.W., Hadley, J. and Balkwill, F.R. (1997) Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. *Am J Pathol*, **150**, 1723-1734.
- Nejjari, M., Berthet, V., Rigot, V., Laforest, S., Jacquier, M.F., Seidah, N.G., Remy, L., Bruyneel, E., Scoazec, J.Y., Marvaldi, J. and Luis, J. (2004) Inhibition of proprotein convertases enhances cell migration and metastases development of human colon carcinoma cells in a rat model. *Am J Pathol*, **164**, 1925-1933.
- Nissley, S.P. and Rechler, M.M. (1984) Somatomedin/insulin-like growth factor tissue receptors. *Clin Endocrinol Metab*, **13**, 43-67.
- Nomura, H., Sato, H., Seiki, M., Mai, M. and Okada, Y. (1995) Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res*, **55**, 3263-3266.
- Ohh, M., Park, C.W., Ivan, M., Hoffman, M.A., Kim, T.Y., Huang, L.E., Pavletich, N., Chau, V. and Kaelin, W.G. (2000) Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*, **2**, 423-427.
- Ohtani, H., Motohashi, H., Sato, H., Seiki, M. and Nagura, H. (1996) Dual over-expression pattern of membrane-type metalloproteinase-1 in cancer and stromal cells in human gastrointestinal carcinoma revealed by in situ hybridization and immunoelectron microscopy. *Int J Cancer*, **68**, 565-570.
- Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M. and Okada, Y. (1997) Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem*, **272**, 2446-2451.
- Owen, M.C., Brennan, S.O., Lewis, J.H. and Carrell, R.W. (1983) Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N Engl J Med*, **309**, 694-698.
- Paterson, H., Reeves, B., Brown, R., Hall, A., Furth, M., Bos, J., Jones, P. and Marshall, C. (1987) Activated N-ras controls the transformed phenotype of HT1080 human fibrosarcoma cells. *Cell*, **51**, 803-812.
- Patterson, A.V., Williams, K.J., Cowen, R.L., Jaffar, M., Telfer, B.A., Saunders, M., Airley, R., Honess, D., van der Kogel, A.J., Wolf, C.R. and Stratford, I.J. (2002) Oxygen-

sensitive enzyme-prodrug gene therapy for the eradication of radiation-resistant solid tumours. *Gene Ther*, **9**, 946-954.

- Pei, D. and Weiss, S.J. (1996) Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J Biol Chem*, **271**, 9135-9140.
- Perlmutter, D.H. and Pierce, J.A. (1989) The alpha 1-antitrypsin gene and emphysema. *Am J Physiol*, **257**, L147-162.
- Peters, R.J., Shiau, A.K., Sohl, J.L., Anderson, D.E., Tang, G., Silen, J.L. and Agard, D.A. (1998) Pro region C-terminus:protease active site interactions are critical in catalyzing the folding of alpha-lytic protease. *Biochemistry*, **37**, 12058-12067.
- Post, D.E. and Van Meir, E.G. (2001) Generation of bidirectional hypoxia/HIF-responsive expression vectors to target gene expression to hypoxic cells. *Gene Ther*, **8**, 1801-1807.
- Post, D.E. and Van Meir, E.G. (2003) A novel hypoxia-inducible factor (HIF) activated oncolytic adenovirus for cancer therapy. *Oncogene*, **22**, 2065-2072.
- Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M. and Ratcliffe, P.J. (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem*, **272**, 11205-11214.
- Raleigh, J.A., Chou, S.C., Calkins-Adams, D.P., Ballenger, C.A., Novotny, D.B. and Varia, M.A. (2000) A clinical study of hypoxia and metallothionein protein expression in squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*, **6**, 855-862.
- Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Scudiero, D.A., Selby, M., Sausville, E.A., Shoemaker, R.H. and Melillo, G. (2002) Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res*, **62**, 4316-4324.
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P. and Gardner, M.B. (1974) Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer*, **33**, 1027-1033.
- Richard, D.E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D. and Pouyssegur, J. (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*, **274**, 32631-32637.

- Rijken, P.F., Bernsen, H.J., Peters, J.P., Hodgkiss, R.J., Raleigh, J.A. and van der Kogel, A.J. (2000) Spatial relationship between hypoxia and the (perfused) vascular network in a human glioma xenograft: a quantitative multi-parameter analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **48**, 571-582.
- Roberts, W.G. and Palade, G.E. (1997) Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res*, **57**, 765-772.
- Roebroek, A.J., Creemers, J.W., Pauli, I.G., Kurzik-Dumke, U., Rentrop, M., Gateff, E.A., Leunissen, J.A. and Van de Ven, W.J. (1992) Cloning and functional expression of Dfurin2, a subtilisin-like proprotein processing enzyme of *Drosophila melanogaster* with multiple repeats of a cysteine motif. *J Biol Chem*, **267**, 17208-17215.
- Roebroek, A.J., Schalken, J.A., Leunissen, J.A., Onnekink, C., Bloemers, H.P. and Van de Ven, W.J. (1986) Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *Embo J*, **5**, 2197-2202.
- Roebroek, A.J., Taylor, N.A., Louagie, E., Pauli, I., Smeijers, L., Snellinx, A., Lauwers, A., Van de Ven, W.J., Hartmann, D. and Creemers, J.W. (2004) Limited redundancy of the proprotein convertase furin in mouse liver. *J Biol Chem*, **279**, 53442-53450.
- Roebroek, A.J., Umans, L., Pauli, I.G., Robertson, E.J., van Leuven, F., Van de Ven, W.J. and Constam, D.B. (1998) Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development*, **125**, 4863-4876.
- Rouille, Y., Duguay, S.J., Lund, K., Furuta, M., Gong, Q., Lipkind, G., Oliva, A.A., Jr., Chan, S.J. and Steiner, D.F. (1995) Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Front Neuroendocrinol*, **16**, 322-361.
- Ruan, H., Wang, J., Hu, L., Lin, C.S., Lamborn, K.R. and Deen, D.F. (1999) Killing of brain tumor cells by hypoxia-responsive element mediated expression of BAX. *Neoplasia*, **1**, 431-437.
- Ryan, H.E., Lo, J. and Johnson, R.S. (1998) HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J*, **17**, 3005-3015.
- Sanchez-Elsner, T., Ramirez, J.R., Sanz-Rodriguez, F., Varela, E., Bernabeu, C. and Botella, L.M. (2004) A cross-talk between hypoxia and TGF-beta orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads. *J Mol Biol*, **336**, 9-24.

- Sato, H., Kinoshita, T., Takino, T., Nakayama, K. and Seiki, M. (1996a) Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett*, **393**, 101-104.
- Sato, H., Takino, T., Kinoshita, T., Imai, K., Okada, Y., Stetler Stevenson, W.G. and Seiki, M. (1996b) Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett*, **385**, 238-240.
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. and Seiki, M. (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*, **370**, 61-65.
- Sato, T., Kondo, T., Fujisawa, T., Seiki, M. and Ito, A. (1999) Furin-independent pathway of membrane type 1-matrix metalloproteinase activation in rabbit dermal fibroblasts. *J Biol Chem*, **274**, 37280-37284.
- Schafer, W., Stroh, A., Berghofer, S., Seiler, J., Vey, M., Kruse, M.L., Kern, H.F., Klenk, H.D. and Garten, W. (1995) Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *Embo J*, **14**, 2424-2435.
- Schindl, M., Schoppmann, S.F., Samonigg, H., Hausmaninger, H., Kwasny, W., Gnant, M., Jakesz, R., Kubista, E., Birner, P. and Oberhuber, G. (2002) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*, **8**, 1831-1837.
- Schofield, C.J. and Ratcliffe, P.J. (2005) Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun*, **338**, 617-626.
- Schofield, C.J. and Zhang, Z. (1999) Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol*, **9**, 722-731.
- Schoppmann, S.F., Birner, P., Stockl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kriehuber, E., Nagy, K., Alitalo, K. and Kerjaschki, D. (2002) Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol*, **161**, 947-956.
- Schoppmann, S.F., Fenzl, A., Nagy, K., Unger, S., Bayer, G., Geleff, S., Gnant, M., Horvat, R., Jakesz, R. and Birner, P. (2006) VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival. *Surgery*, **139**, 839-846.

- Seidah, N.G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S.B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A. and Chretien, M. (2003) The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 928-933.
- Seidah, N.G. and Chretien, M. (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res*, **848**, 45-62.
- Seidah, N.G., Chretien, M. and Day, R. (1994) The family of subtilisin/kexin like proprotein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie*, **76**, 197-209.
- Seidah, N.G., Day, R., Hamelin, J., Gaspar, A., Collard, M.W. and Chretien, M. (1992) Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase. *Mol Endocrinol*, **6**, 1559-1570.
- Seidah, N.G., Day, R., Marcinkiewicz, M., Benjannet, S. and Chretien, M. (1991) Mammalian neural and endocrine pro-protein and pro-hormone convertases belonging to the subtilisin family of serine proteinases. *Enzyme*, **45**, 271-284.
- Seidah, N.G., Day, R., Marcinkiewicz, M. and Chretien, M. (1998) Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann N Y Acad Sci*, **839**, 9-24.
- Seidah, N.G., Gaspar, L., Mion, P., Marcinkiewicz, M., Mbikay, M. and Chretien, M. (1990) cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol*, **9**, 415-424.
- Seidah, N.G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tardos, H., Mbikay, M., Chretien, M. and Day, R. (1996) cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3388-3393.
- Seidah, N.G., Mowla, S.J., Hamelin, J., Mamarbachi, A.M., Benjannet, S., Toure, B.B., Basak, A., Munzer, J.S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., Barale, J.C., Lazure, C., Murphy, R.A., Chretien, M. and Marcinkiewicz, M. (1999) Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1321-1326.
- Seiki, M. and Yana, I. (2003) Roles of pericellular proteolysis by membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer Sci*, **94**, 569-574.

- Semenza, G. (2002) Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*, **64**, 993-998.
- Semenza, G.L. (2000) Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **35**, 71-103.
- Semenza, G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **3**, 721-732.
- Shapiro, J., Sciaky, N., Lee, J., Bosshart, H., Angeletti, R.H. and Bonifacino, J.S. (1997) Localization of endogenous furin in cultured cell lines. *J Histochem Cytochem*, **45**, 3-12.
- Shay, J.W. and Bacchetti, S. (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, **33**, 787-791.
- Shinde, U. and Inouye, M. (1995) Folding mediated by an intramolecular chaperone: autoprocessing pathway of the precursor resolved via a substrate assisted catalysis mechanism. *J Mol Biol*, **247**, 390-395.
- Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A. and Allavena, P. (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*, **42**, 717-727.
- Smeekens, S.P., Avruch, A.S., LaMendola, J., Chan, S.J. and Steiner, D.F. (1991) Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 340-344.
- Smeekens, S.P., Chan, S.J. and Steiner, D.F. (1992) The biosynthesis and processing of neuroendocrine peptides: identification of proprotein convertases involved in intravesicular processing. *Prog Brain Res*, **92**, 235-246.
- Smeekens, S.P. and Steiner, D.F. (1990) Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J Biol Chem*, **265**, 2997-3000.
- Sounni, N.E., Baramova, E.N., Munaut, C., Maquoi, E., Frankenne, F., Foidart, J.M. and Noel, A. (2002) Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in A2058 melanoma cells is associated with MMP-2 activation and increased tumor growth and vascularization. *Int J Cancer*, **98**, 23-28.
- Sporn, M.B. (1996) The war on cancer. *Lancet*, **347**, 1377-1381.

- Springman, E.B., Angleton, E.L., Birkedal-Hansen, H. and Van Wart, H.E. (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 364-368.
- Stawowy, P. and Fleck, E. (2005) Proprotein convertases furin and PC5: targeting atherosclerosis and restenosis at multiple levels. *J Mol Med*, **83**, 865-875.
- Steiner, D.F., Cunningham, D., Spigelman, L. and Aten, B. (1967) Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science*, **157**, 697-700.
- Stephens, T.C., Currie, G.A. and Peacock, J.H. (1978) Repopulation of gamma-irradiated Lewis lung carcinoma by malignant cells and host macrophage progenitors. *Br J Cancer*, **38**, 573-582.
- Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S. and Liotta, L.A. (1993) Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol*, **9**, 541-573.
- Stiehl, D.P., Jelkmann, W., Wenger, R.H. and Hellwig-Burgel, T. (2002) Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett*, **512**, 157-162.
- Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A. and Goldberg, G.I. (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem*, **270**, 5331-5338.
- Su, H., Arakawa-Hoyt, J. and Kan, Y.W. (2002) Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia response element-regulated gene expression in mouse ischemic heart model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9480-9485.
- Symonds, H., Krall, L., Remington, L., Saenz-Robles, M., Lowe, S., Jacks, T. and Van Dyke, T. (1994) p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*, **78**, 703-711.
- Takahashi, C., Sheng, Z., Horan, T.P., Kitayama, H., Maki, M., Hitomi, K., Kitaura, Y., Takai, S., Sasahara, R.M., Horimoto, A., Ikawa, Y., Ratzkin, B.J., Arakawa, T. and Noda, M. (1998) Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13221-13226.

- Takahashi, S., Nakagawa, T., Banno, T., Watanabe, T., Murakami, K. and Nakayama, K. (1995) Localization of furin to the trans-Golgi network and recycling from the cell surface involves Ser and Tyr residues within the cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, **270**, 28397-28401.
- Takanami, I., Takeuchi, K. and Kodaira, S. (1999) Tumor-associated macrophage infiltration in pulmonary adenocarcinoma: association with angiogenesis and poor prognosis. *Oncology*, **57**, 138-142.
- Takino, T., Sato, H., Shinagawa, A. and Seiki, M. (1995a) Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J Biol Chem*, **270**, 23013-23020.
- Takino, T., Sato, H., Yamamoto, E. and Seiki, M. (1995b) Cloning of a human gene potentially encoding a novel matrix metalloproteinase having a C-terminal transmembrane domain. *Gene*, **155**, 293-298.
- Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 753-766.
- Thomas, G., Thorne, B.A., Thomas, L., Allen, R.G., Hruby, D.E., Fuller, R. and Thorner, J. (1988) Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science*, **241**, 226-230.
- Timar, J. and Paterson, H. (1990) Localization and production of proteoglycans by HT1080 cell lines with altered N-ras expression. *Cancer Lett*, **53**, 145-150.
- Troeberg, L., Tanaka, M., Wait, R., Shi, Y.E., Brew, K. and Nagase, H. (2002) E. coli expression of TIMP-4 and comparative kinetic studies with TIMP-1 and TIMP-2: insights into the interactions of TIMPs and matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A). *Biochemistry*, **41**, 15025-15035.
- Tuder, R.M., Flook, B.E. and Voelkel, N.F. (1995) Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest*, **95**, 1798-1807.
- Ueno, H., Nakamura, H., Inoue, M., Imai, K., Noguchi, M., Sato, H., Seiki, M. and Okada, Y. (1997) Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. *Cancer Res*, **57**, 2055-2060.

- Velasco, G., Cal, S., Merlos-Suarez, A., Ferrando, A.A., Alvarez, S., Nakano, A., Arribas, J. and Lopez-Otin, C. (2000) Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res*, **60**, 877-882.
- Vidricaire, G., Denault, J.B. and Leduc, R. (1993) Characterization of a secreted form of human furin endoprotease. *Biochem Biophys Res Commun*, **195**, 1011-1018.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. and Semenza, G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5510-5514.
- Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **270**, 1230-1237.
- Wang, P., Tortorella, M., England, K., Malfait, A.M., Thomas, G., Arner, E.C. and Pei, D. (2004) Proprotein convertase furin interacts with and cleaves pro-ADAMTS4 (Aggrecanase-1) in the trans-Golgi network. *J Biol Chem*, **279**, 15434-15440.
- Whitelock, J.M., Murdoch, A.D., Iozzo, R.V. and Underwood, P.A. (1996) The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem*, **271**, 10079-10086.
- Wise, R.J., Barr, P.J., Wong, P.A., Kiefer, M.C., Brake, A.J. and Kaufman, R.J. (1990) Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9378-9382.
- Woessner, J.F., Jr. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J*, **5**, 2145-2154.
- Wykoff, C.C., Beasley, N.J., Watson, P.H., Turner, K.J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G.D., Turley, H., Talks, K.L., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Harris, A.L. (2000) Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res*, **60**, 7075-7083.
- Yana, I. and Weiss, S.J. (2000) Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell*, **11**, 2387-2401.
- Yeo, E.J., Chun, Y.S., Cho, Y.S., Kim, J., Lee, J.C., Kim, M.S. and Park, J.W. (2003) YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Natl Cancer Inst*, **95**, 516-525.

- Yoon, S.O., Shin, S. and Mercurio, A.M. (2005) Hypoxia stimulates carcinoma invasion by stabilizing microtubules and promoting the Rab11 trafficking of the $\alpha 6\beta 4$ integrin. *Cancer Res*, **65**, 2761-2769.
- Yu, A.Y., Frid, M.G., Shimoda, L.A., Wiener, C.M., Stenmark, K. and Semenza, G.L. (1998) Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol*, **275**, L818-826.
- Zheng, M., Seidah, N.G. and Pintar, J.E. (1997) The developmental expression in the rat CNS and peripheral tissues of proteases PC5 and PACE4 mRNAs: comparison with other proprotein processing enzymes. *Dev Biol*, **181**, 268-283.
- Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.M., Simons, J.W. and Semenza, G.L. (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*, **60**, 1541-1545.
- Zhong, H., Hanrahan, C., van der Poel, H. and Simons, J.W. (2001) Hypoxia-inducible factor 1 α and 1 β proteins share common signaling pathways in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **284**, 352-356.
- Zhong, M., Munzer, J.S., Basak, A., Benjannet, S., Mowla, S.J., Decroly, E., Chretien, M. and Seidah, N.G. (1999) The prosegments of furin and PC7 as potent inhibitors of proprotein convertases. In vitro and ex vivo assessment of their efficacy and selectivity. *J Biol Chem*, **274**, 33913-33920.
- Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., LaMendola, J. and Steiner, D.F. (1998) Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J Biol Chem*, **273**, 11107-11114.
- Zhou, J., Schmid, T. and Brune, B. (2004) HIF-1 α and p53 as targets of NO in affecting cell proliferation, death and adaptation. *Curr Mol Med*, **4**, 741-751.
- Zucker, S., Moll, U.M., Lysik, R.M., DiMassimo, E.I., Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A. and Schwedes, J.W. (1990) Extraction of type-IV collagenase/gelatinase from plasma membranes of human cancer cells. *Int J Cancer*, **45**, 1137-1142.