



HAL
open science

AMPK, signalisation hypoxique et métabolisme tumoral

Joffrey Pelletier

► **To cite this version:**

Joffrey Pelletier. AMPK, signalisation hypoxique et métabolisme tumoral. Médecine humaine et pathologie. Université Nice Sophia Antipolis, 2014. Français. NNT : 2014NICE4046 . tel-01067130

HAL Id: tel-01067130

<https://theses.hal.science/tel-01067130>

Submitted on 23 Sep 2014

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

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

MEMOIRE DE THESE

Présenté pour l'obtention du titre de :

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Interactions Moléculaires et Cellulaires

Joffrey PELLETIER

AMPK, SIGNALISATION HYPOXIQUE ET METABOLISME TUMORAL

Thèse soutenue publiquement le Mardi 1er juillet 2014, au Centre Antoine Lacassagne,
Nice, devant un jury composé de :

Dr Frédéric BOST

Président

Dr Francois VALLETTE

Rapporteur

Dr Marc BILLAUD

Rapporteur

Dr Jean-Emmanuel SARRY

Examineur

Dr Jacques POUYSSEGUR

Directeur de thèse

Dr Nathalie MAZURE

Directrice de thèse

« Qui recherche la lune ne voit pas les étoiles. »

Vicky Bellemare

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr **Frédéric Bost**, qui m'a fait l'honneur d'être mon président du jury de thèse. Je te remercie également de ta gentillesse, de ta contribution à ce travail par tes conseils avisés et de m'avoir intégré aux devenues célèbres « réunions AMPK ».

Je tiens également à remercier les membres du jury qui ont accepté de donner de leur précieux temps pour juger mon travail : mes rapporteurs **Dr François Vallette** et **Dr Marc Billaud**, ainsi que mon examinateur **Dr Jean-Emmanuel Sarry**.

Ca y est, le temps de la thèse est bientôt terminé et ces quatre dernières années sont passées à la vitesse de l'éclair. Que de bons souvenirs sont rattachés à ces années, dans le laboratoire et à l'extérieur... J'ai rencontré des personnes inoubliables. Quelle aventure... Bien entendu, je remercie particulièrement l'ensemble de l'équipe J.Pouysségur et G.Pagès.

Mes premiers remerciements vont naturellement à Jacques et Nathalie qui ont su me faire grandir scientifiquement et me laisser l'autonomie que je cherchais. Je n'oublierais jamais nos conversations scientifiques animées autour du tableau et ne saurais jamais suffisamment vous remercier pour l'excellente formation que j'ai reçue.

Jacques, je te remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir communiqué ta passion pour la recherche. Merci pour ta rigueur, toutes tes remarques pertinentes qui m'ont beaucoup fait avancer. Je te suis reconnaissant d'avoir partagé avec moi ta vision large et pointue de la biologie (et de l'enzymologie) et de m'avoir permis de participer à des congrès internationaux très formateurs.

Nathalie, je te remercie infiniment pour tout ton encadrement scientifique et technique, ta patience (je les ai fait finalement ces expériences de Bleu-Trypan !), ta disponibilité et ton aide précieuse dans la correction du mémoire et des demandes de financement. La thèse est une expérience scientifique et humaine et je te remercie pour tous tes conseils inestimables, professionnels ou personnels, que tu as su me distiller tout au long de ma thèse.

----- REMERCIEMENTS -----

J'aimerais remercier vivement les chercheurs permanents de l'équipe, qui ont contribué à mon apprentissage de la recherche et à ma personnalité scientifique. **Gilles**, je te remercie pour nos nombreuses conversations scientifiques dans le bureau qui ont élargi mon champ de perspectives. Merci également pour ton historique du laboratoire et de la science en général, et ton humour décalé! **Christiane**, je te remercie tout particulièrement, pour tes conseils scientifiques toujours avisés, tes corrections pointilleuses mais justes, et de m'avoir fait grandement progresser en anglais (et en Australien!). **Phil et Roser**, notre duo de franco-catalans de choc, merci pour votre gentillesse et votre aide en tout genre : biomol, apprentissage du catalan, et bons plans à Barcelone. ; Viva Barca ! (Même si Phil tu as mauvais goût dès qu'on parle football !) Merci à **Cercina**, pour tes qualités pédagogiques, et pour avoir été un repère rassurant à mes débuts. Merci à **Marie-Pierre**, notre corse du labo (on le dit !), **Danièle**, pour ton savoir-faire ta rigueur et ton organisation sans faille. **JCC**, merci pour ton initiation à la bidouille, ta « zénitude » et tes conseils toujours de très grande valeur!

Un énorme merci à mes acolytes du laboratoire, thésards, post-doc, ou autres sans qui la recherche aurait été moins agréable, et la vie en dehors moins festive!

Scott, merci pour nos conversations animées ces quatre dernières années, sur les ours et les saumons, le foot ou sur le pH. Merci pour nos parties de squash (que je t'ai laissé gagner avec plaisir), ta passion pour la reine (TA reine!), et nos escapades au ski et au Vel'. Je te souhaite un bel avenir de jeune papa. Le pH c'est la Vie ! **Sandy**, pâtissière hors pair spécialiste du macacao, et chanteuse ... originale! Je te remercie infiniment pour tous nos délires partagés, ta générosité et ta grande contribution à la vie au laboratoire, nos nombreuses tranches de rigolades et bien sûr ton aide de graphiste. Ce n'est qu'un au-revoir comme on dit (si tu veux ENCORE aller à Barcelone!) mais en attendant je te souhaite tout le bonheur et la réussite que tu mérites! **Yann**, dernier thésard arrivé (Poupinou pour les intimes), chambreur (un comble pour un nordiste !) et déterminé (malgré ta démarche nonchalante). Je te remercie pour nos discussions scientifiques constructives et tous les excellents moments partagés au labo ou à l'ASPEN (Notre Koscielny à nous !). Tu n'es pas le prochain sur la liste mais presque, alors je te souhaite bonne chance pour la suite... **Mathias**, notre rabat-joie au grand cœur, fan des comédies musicales démodées (si tant est qu'il y en ait une à la mode!), collègue de travaux forcés de portage des bouteilles d'azote malgré notre gabarit de crevette (surtout toi). Merci

----- REMERCIEMENTS -----

beaucoup pour cette année qu'on a passée ensemble et bon vent dans le pays d'Anne de Loire atlantique (hors de Bretagne, on est d'accord!). **Caro** et ta tignasse inoubliable, merci pour ton rire tonitruant, et ta joie communicative! Caro, POISSON !! **Sara**, notre Portugaise préférée fan de Figo, et fière du Benfica! Merci pour tes *Mesa pain* et tous nos échanges sur les MCTs! Un grand merci à **Vincent** «Le rebelle» serein en toute circonstance et fin jardinier! **Mel**, **Reno**, les farceurs du Parking (et bien d'autres encore !), **Emilie**, et **Karine**, merci pour ton aide, ton dynamisme et ta spontanéité. Je remercie également **Jerome Do.**, notre médecin au rire Germanique et à la franche camaraderie, **Jerome Du.**, merci pour ta bonne humeur et ton soutien en toute occasion. Reste fidèle aux aiglons (même si c'est souvent difficile). Merci à **Damien**, et aux nouveaux arrivés, **Julien** le piémontais et ses 10 rétros à son actif, **Benoit** et **Maëva** pour leur gentillesse. Enfin merci à mes collègues thésards **Tanesha** et **Ibtissam**. Je vous souhaite bonne chance pour la suite...

Je n'oublie pas les personnes présentes à mon arrivée qui sont parties surfer d'autres vagues, **Renaud LF** (Ah les finistériens et leurs artichauts et leurs crêpes salées...), **Seb**, **Auréli**, **Nadia**, **Christine**, **Dominique**, **Martine**, **Corinne**, ...

Je souhaiterais également remercier mes anciens professeurs de Polytech, devenus mes collègues, pour leur présence dans l'expérience enrichissante du monitorat. Merci particulièrement à **Annie** pour toute son aide et sa gentillesse.

Je voudrais avoir une petite attention à ceux qui au détour d'un geste d'une parole, ou d'un comportement nous ont fait beaucoup rire. Merci à ceux qui traversent les couloirs à toute allure pour envie pressante, ceux qui pensent que les chats vivent en cage, ceux qui ont une chiffonnette dans leur voiture, ceux qui injurient leurs cellules ou leur chantent des mélodies déprimantes, ceux qui se trempent les cheveux dans l'huile, ceux qui finissent les miettes après un pot, aux angoissés de la salle de culture, et à ceux qui « savent ».

Je remercie l'**ASPEN**, qui m'a permis de me défouler et de m'épanouir sur un terrain de football.

----- REMERCIEMENTS -----

Enfin Je voudrais remercier ma famille et mes amis qui contribuent à mon équilibre et mon bonheur, et sans qui rien de tout cela n'aurait été possible.

Je tiens à remercier du fond du cœur **ma mère** et **mon père** qui m'ont toujours soutenu et encouragé tout au long de mes études (et que ce fut long !). Vous avez toujours su aiguïser ma curiosité tout en étant des épaules solides et des oreilles attentives. Vous êtes pour moi le meilleur des modèles de courage, de persévérance et de non renoncement.

Merci à ma sœur **Gaëlle**, mon beau-frère **Julien**, et le petit nouveau de la famille, **Liam**.

Je tiens à remercier également mes amis d'enfance, qui sont devenus bien plus que des amis, **Ivan, Julie, Diane, Justine, Fanny, Djé, Xav, Brice, François ...** ainsi que mes amis Niçois qui se reconnaîtront.

Enfin je n'oublie pas ma belle famille **Catherine**, et mes belles sœurette **Aline** et **Albane, ainsi que Matthieu** et **Alex**.

Dorothee ces remerciements ne pourront jamais être à la hauteur de ton soutien inconditionnel. Merci à celle que j'ai l'impression de connaître depuis toujours, avec qui je partage mes tracas ou mes joies, mes insatisfactions ou mes réussites. Merci pour tous les sacrifices que tu as fait pour moi et merci d'avoir supporté mon indisponibilité (ou moi tout simplement) toutes ces années d'études, de la prépa à la thèse. Je te remercie de faire partie de ma vie tout simplement, de mon bonheur présent et futur, et me réjouis d'avance pour nos projets à venir, très proches... ou plus lointains!

Enfin, merci à tous, ceux qui de près ou de loin, ont eu une pensée pour moi lors de la rédaction de ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
Chapitre 1 : Rôle de l'hypoxie et de Hypoxia-Inducible Factor (HIF) dans le développement tumoral.....	2
A. Hypoxie et cancer	2
I. Hypoxie physiologique et pathologique.....	2
II. Etablissement de zones hypoxiques au sein de la tumeur	3
1. Evidences de la présence d'hypoxie au sein des tumeurs solides.....	3
2. Etablissement de gradients d'oxygène.....	4
3. Enjeux cliniques : une résistance accrue aux radio/chimiothérapies.....	5
B. Rôle central de HIF dans l'adaptation cellulaire à l'hypoxie	7
I. HIF, régulateur clé de l'homéostasie de l'oxygène.....	7
II. HIF et ses sous-unités α et β	7
1. Les domaines bHLH/PAS et la reconnaissance de l'ADN.....	7
2. Importances des différentes sous-unités.....	8
3. Les domaines de transactivation	9
III. PHDs et FIH, régulateurs de la stabilité et de l'activité de HIF1	9
1. Les PHDs et la dégradation oxygène-dépendante de HIF1 α	10
2. L'activité de HIF1 α est régulée par FIH	11
3. Une régulation fine des gènes HIF-dépendants via une fonction différencielle des TADs	11
4. Autres modes de régulation de HIF1	12
5. HIF1, promoteur du développement tumoral ?	14
Chapitre 2 : Métabolisme tumoral en hypoxie	16
A. Introduction au métabolisme cellulaire.....	16
I. La molécule d'ATP, unité d'énergie cellulaire.....	16
II. Glycolyse et respiration mitochondriale : les deux voies majeures de production d'énergie cellulaire.....	17
1. La glycolyse anaérobie : de l'entrée du glucose au pyruvate	18
2. Le pyruvate, carrefour métabolique	18
B. HIF1 et le métabolisme tumoral.....	22
I. L'effet Warburg et la glycolyse aérobie des cellules tumorales	22
II. HIF1 et le métabolisme des carbohydrates.....	24
1. HIF1 et la glycolyse exacerbée.....	24

2. La synthèse de glycogène et la voie des pentoses phosphates, deux voies interconnectées à la glycolyse, induites par HIF1	25
III. Les transporteurs de monocarboxylates, à l'interface entre le métabolisme cellulaire et la régulation du pH intracellulaire	26
1. MCT1, la forme ubiquitaire des MCTs	27
2. MCT4, l'isoforme adaptée pour les tissus glycolytiques.....	27
3. Les MCTs et la communication métabolique intercellulaire	28
4. Le lactate, un acteur important du développement tumoral	29
IV. HIF1 et la régulation du pH intracellulaire	30
1. Nécessité des cellules tumorales à maintenir un pH intracellulaire alcalin	30
2. HIF1 et les anhydrases carboniques CAIX et CAXII	31
3. NHE1 activé en hypoxie indépendamment de HIF1 ?	32
Chapitre 3 : AMPK, gardien de la balance énergétique cellulaire	33
A. Concept de kinase et introduction à l'AMPK	33
I. Les kinases et la phosphorylation	33
II. Découverte de l'AMPK	34
B. AMPK, structure et activité	35
I. AMPK, un complexe hétérotrimérique	35
1. Composition du complexe	35
2. Sous-unités α	35
3. Sous-unités β	36
4. sous-unités γ	36
II. Activité de l'AMPK	37
1. AMP et ATP, effecteurs allostériques de l'AMPK	37
2. Quand AMP et ATP entrent en compétition.....	38
3. Peu d'activation sans phosphorylation.....	38
4. La déphosphorylation de Thr172 et l'inactivation de l'AMPK.....	39
III. Kinases et phosphatases en amont de l'AMPK.....	39
1. LKB1, suppresseur de tumeurs et AMPK kinase majeure	39
2. CaMKK β et TAK1 peuvent également phosphoryler l'AMPK.....	40
3. Un mécanisme de phosphorylation encore plus complexe ?	41
4. Il n'existe pas une mais plusieurs phosphatases de l'AMPK.....	41
C. AMPK et homéostasie de l'énergie cellulaire	42
I. Régulation du métabolisme des carbohydrates.....	42
1. L'AMPK stimule le flux glycolytique.....	42

----- SOMMAIRE -----

2. Inhibition complexe de la synthèse de glycogène par l'AMPK	44
II. Régulation du métabolisme des lipides	44
III. Régulation de la synthèse protéique	45
IV. Recyclage du contenu mitochondrial et métabolisme oxydatif	47
V. Régulation de la prolifération cellulaire	48
VI. AMPK et HIF.....	49
D. AMPK et cancer	50
I. La metformine	50
II. AMPK, suppresseur de tumeurs ou promoteur du développement tumoral ?.....	51
OBJECTIFS ET ENJEUX DU TRAVAIL	54
RESULTATS.....	57
A. Publication 1 : The asparaginyl hydroxylase factor-inhibiting HIF is essential for tumor growth through suppression of the p53-p21 axis	59
I. Contexte et objectif de la recherche	59
II. Résultats	60
III. Conclusion, discussion et perspectives.....	61
B. Publication 2 : Glycogen synthesis is induced in hypoxia by the hypoxia-inducible factor and promotes cancer cell survival.....	67
I. Contexte et objectif de la recherche	67
II. Résultats	68
III. Conclusion, discussion et perspectives.....	69
C. Manuscrit 1 : The controversial role of AMPK in bioenergetics and tumor growth. AMPK is dispensable to maintain ATP levels following glycolysis inhibition <i>in vitro</i> but facilitates tumour engraftment of Ras-transformed fibroblasts.	76
I. Contexte et objectif de la recherche	76
II. Résultats	77
III. Conclusion, discussion et perspectives.....	78
DISCUSSION GENERALE.....	85
REFERENCES	89
ANNEXES.....	110
A. Biochemical Titration of Glycogen <i>In vitro</i>	112
B. Hypoxic Hyperfused Mitochondria Interact with Endolysosomes to cleave Mitochondrial VDAC1 in a TP53-BNIP3-Dependent Manner in Promoting Survival	113

LISTE DES ABREVIATIONS

4E-BP : 4E-Binding Protein

ACC : Acetyl-Coenzyme A Carboxylase

ADP : Adenosine DiPhosphate

AICAR : 5-AminoImidazole-4-CARboxamide-1- β -D-ribofuranoside

AMP : Adenosine MonoPhosphate

AMPK : 5' AMP-activated protein Kinase

ARKs : AMPK Related Kinases

ARNm : Acide RiboNucleotide messenger

Asn : Asparagine

ATP : Adenosine TriPhosphate

bHLH : basic Helix Loop Helix

CA : Carbonic Anhydrases

CaMKK β : Ca²⁺/CalModuline dependant protein Kinase Kinase β

CBS : Cystathionine β -Synthase

CDKs : Cyclin Dependant Kinases

ChREBP : Carbohydrate Regulatory Element Binding Protein

CoA : Coenzyme A

C-TAD : C-terminal TransActivation Domain

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

FIH : Factor Inhibiting HIF1

F6P : Fructose-6-Phosphate

G1P : Glucose-1-Phosphate

G3P : Glyceraldehyde-3-Phosphate

G6P : Glucose-6-Phosphate

----- LISTE DES ABREVIATIONS -----

GAPDH : GlycerAldehyde-Phosphate DeHydrogenase

GLUT : Glucose Transporter

GS : Glycogen Synthase

HIF : Hypoxia Inducible Factor

HRE : Hypoxia Responsive Element

Kd : Constante de dissociation

K_m : constante de Michaelis

LDH A : Lactate Dehydrogenase A

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases

MCT : MonoCarboxylate Transporters

MEF : Mouse Embryonic Fibroblasts

MDM2 : Mouse Double Minute 2

mTOR : Mamalian Target Of Rapamycin

mTORC1/2 : mTOR Complex 1/2

NAD : Nicotinamide Adenine Dinucléotide

NHE : Na⁺/H⁺ Exchanger

NLS : Nuclear Localisation Signal

N-TAD : N-terminal TransActivation Domain

ODDD : Oxygen-Dependant Degradation Domain

PAS : PER-ARNT-SIM

PHD : HIF- Proline HyDroxylase

pHe : pH extracellulaire

pHi : pH intracellulaire

PGM : PhosphoGlucoMutase

PDH : Pyruvate DeHydrogenase

PDK : Pyruvate Dehydrogenase Kinase

----- LISTE DES ABREVIATIONS -----

PK : Pyruvate Kinase

PFK : PhosphoFructoKinase

PGC1 α : Peroxisome proliferator-activated-receptor γ Coactivator-1 α

PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase

pO₂ : Partial pressure of Oxygen

Pro : Proline

PYGL : PhosphorYlase of Glycogen

R5P : Ribulose-5-Phosphate

Raptor : Regulated Associated Protein of mTOR

RHEB : Ras Homologous Enriched in Brain

ROS : Reactive Oxygen Species

RSK : Ribosomal S6 Kinase

ShRNA : Short Hairpin RNA

SNF1 : Sucrose Non-Fermenting 1

SREBP : Sterol Regulatory Element Binding Protein

TAK-1 : TGF β -Activated Kinase 1

TCA : Tricarboxylic Acid Cycle

Thr : Threonine

TKT : Transketolase

UGP : UDP-Glucose-Pyrophosphorylase

ULK : Unc51-like kinase-1

VBC : VHL/elongin B/elongin C

VEGF : Vascular Endothelium Growth Factor

VHL : Von Hippel-Lindau

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Chapitre 1 : Rôle de l'hypoxie et HIF dans le développement tumoral

Figure 1 : Caractéristiques des tumeurs solides hypoxiques.....	4
Figure 2 : Exemples de réseaux vasculaires tumoraux anarchiques et de la dynamique d'hypoxie intratumorale	5
Figure 3 : Fonctions majeures de HIF1 impliquées dans l'adaptation cellulaire à l'hypoxie et le développement tumoral.....	7
Figure 4 : Complexe hétérodimérique de HIF.	8
Figure 5 : Régulation de HIF1 α par les senseurs d'oxygène PHD et HIF.....	10
Figure 6 : Modèle de deux répertoires de gènes régulés par HIF1.....	12
Table 1 : Exemples d'approches pharmacologiques ciblant l'hypoxie au niveau moléculaire.	14

Chapitre 2 : Métabolisme tumoral en hypoxie

Figure 7 : Représentation de la molécule d'ATP et ses produits d'hydrolyse.	16
Figure 8 : Représentation du réseau métabolique cellulaire.....	17
Figure 9 : Voie de la glycolyse anaérobie.....	18
Figure 10 : Le pyruvate, à l'intersection de la glycolyse et du TCA.....	19
Figure 11 : Représentation simplifiée de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative (OXPHOS).	20
Figure 12 : Bilan énergétique de la glycolyse et la respiration mitochondriale.....	21
Figure 13 : Régulation du métabolisme du glucose par HIF1.....	24
Table 2 : Caractéristiques et propriétés des 4 transporteurs de la famille des MCTs	26
Figure 14 : Représentation topologique des MCTs.....	27
Figure 15 : Représentation des systèmes de régulation du pH intracellulaire des cellules tumorales.....	30

Chapitre 3 : AMPK gardien de la balance énergétique cellulaire

Figure 16 : Structure du complexe AMPK.....	35
Figure 17 : Représentation de l'agencement des motifs CBS et des sites de liaison à l'ATP/ADP/AMP.	37
Figure 18 : Modèle de régulation de l'AMPK.....	38
Figure 19 : Membres de la famille de l'AMPK et des ARK (Ampk Related Kinases).....	40

----- TABLE DES ILLUSTRATIONS -----

Figure 20 : Effets de l'AMPK sur le métabolisme cellulaire.....42
Figure 21 : Régulation de la croissance cellulaire et de la prolifération par l'AMPK.....46
Figure 22 : Interconnexions entre AMPK, p53 et mTOR.....48
Figure 23 : AMPK, suppresseur ou promoteur de tumeurs?51

Résultats

Figure 24: L'effet antiprolifératif de l'inactivation de FIH est accentué par l'absence de HIF1 en hypoxie.....61
Figure 25: Modèle hypothétique des effets de FIH sur la prolifération en hypoxie et en absence de HIF1.....62
Figure 26 : L'inactivation de FIH n'active pas l'AMPK.....64
Figure 27 : PGM1 est la seule phosphoglucomutase induite en hypoxique, mais la diminution drastique de son expression n'abolit pas le stockage de glycogène.70
Figure 28 : Les cellules déficientes pour la sous-unité catalytique *Ampk α 1* et/ou *Ampk α 2* présentent des stocks de glycogène plus importants en hypoxie..... 74
Figure 29: Modèle de régulation des voies bioénergétiques en normoxie et en hypoxie dans les fibroblastes transformés par Ras^{V12}..... .78
Figure 30 : Modèle de régulation des voies bioénergétiques en hypoxie, suite au blocage de l'export de lactate ou du blocage combiné de l'export de lactate et de l'OXPPOS dans les fibroblastes transformés par Ras^{V12}.....79
Figure 31 : Modèle de régulation des voies bioénergétiques en normoxie suite à une privation de glucose dans des fibroblastes transformés par Ras^{V12} *Ampk*^{+/+} ou *Ampk*^{-/-}80

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Rôle de l'hypoxie et de Hypoxia-Inducible Factor (HIF) dans le développement tumoral

A. Hypoxie et cancer

I. Hypoxie physiologique et pathologique

L'oxygène est une molécule essentielle dans la vie de nombreux organismes, incluant les mammifères. Elle est requise pour maintenir l'homéostasie énergétique de l'organisme et constitue un accepteur d'électrons dans de nombreuses réactions cellulaires, organiques ou inorganiques (Bertout et al., 2008). Un des rôles les plus primordiaux de l'oxygène est son rôle de substrat dans la respiration cellulaire aérobie.

Le niveau d'oxygène est très variable dans le corps humain, passant de 21% (160mmHg) dans l'air ambiant à environ 12% (95mmHg) dans les artères. Le sang veineux, qui repart des différents organes, contient approximativement 5% d'O₂ (40mmHg). La teneur en oxygène dans les tissus varie en fonction de l'organe considéré et est généralement inférieure à 4% d'oxygène (30mmHg). Par exemple, la pression partielle en oxygène (pO₂) mesurée est en moyenne de 16 mmHg (2,1% d'O₂) dans la rate et 10mmHg (1,3% d'O₂) dans le thymus de souris (Braun et al., 2001). Le cerveau est un organe encore moins oxygéné comme en atteste les pO₂ comprises entre 8 mmHg (1% O₂) et 0,4mmHg (0,05% O₂) mesurées dans le cerveau de rat (Erecinska and Silver, 2001). Notons que la disponibilité en oxygène fluctue également au sein même des organes en fonction de leur vascularisation, et que la distribution de l'oxygène serait même hétérogène à l'intérieur des cellules comme le suggère une étude montrant que l'inhibition de la respiration mitochondriale redistribue l'oxygène des mitochondries vers le cytoplasme (Hagen et al., 2003).

L'hypoxie, mot provenant du grec hupo (sous) et oxus (oxygène), correspond à une baisse de la disponibilité en oxygène. On considère en général qu'un environnement est hypoxique lorsque la proportion d'oxygène se trouve autour de 1% (7,5mmHg) alors que l'hypoxie sévère est plutôt définie dans des concentrations proches de 0,1% (0,75mmHg). Cependant, la concentration physiologique d'oxygène est différente dans

chaque tissu. Ainsi, l'hypoxie doit être considérée comme une notion relative à la teneur en oxygène basale dans le tissu concerné.

L'hypoxie peut se manifester dans les tissus de manière physiologique. On observe par exemple de nombreux épisodes hypoxiques au cours du développement embryonnaire (Chen et al., 1999; Pugh and Ratcliffe, 2003). De plus, L'hypoxie est un phénomène bien connu des randonneurs de montagne, puisque la concentration en oxygène diminue avec l'altitude, l'oxygène pouvant atteindre une proportion de 7% (54mmHg) dans l'air au niveau du mont Everest (8850m) (Brahimi-Horn et al., 2008). Dans ces conditions, la baisse d'oxygène dans le sang va être détectée au niveau des barorécepteurs de la crosse aortique et entraîner une réponse généralisée de l'organisme (augmentation de la fréquence respiratoire, production d'EPO et de globules rouges,...). L'hypoxie se retrouve également dans diverses situations pathologiques. Elle peut-être aiguë comme dans les maladies ischémiques¹ ou chroniques. L'hypoxie est particulièrement impliquée dans les pathologies telles que l'anémie, l'inflammation ou le cancer.

II. Etablissement de zones hypoxiques au sein de la tumeur

1. Evidences de la présence d'hypoxie au sein des tumeurs solides

Les tissus cancéreux sont peu différenciés, présentent une organisation structurale faible et sont insensibles aux « signaux » émis par le tissu environnant. Les tumeurs se développent grâce à une prolifération cellulaire intense et anarchique. (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Les premières observations histologiques de l'hypoxie tumorale ont été réalisées en 1955. A l'époque, Thomlinson *et al.* avaient observé que les cellules tumorales de poumon se développaient le long des vaisseaux sanguins sous la forme d'une « corde tumorale ». A des distances supérieures à 150µm des vaisseaux sanguins, les cellules présentaient un aspect nécrotique (Thomlinson and Gray, 1955).

¹ L'ischémie est une interruption de la circulation artérielle conduisant à un arrêt de l'apport d'oxygène, de glucose, et d'autres nutriments transportés par le sang aux organes. Les accidents vasculaires cérébraux ou l'infarctus du myocarde sont des exemples de maladies ischémiques.

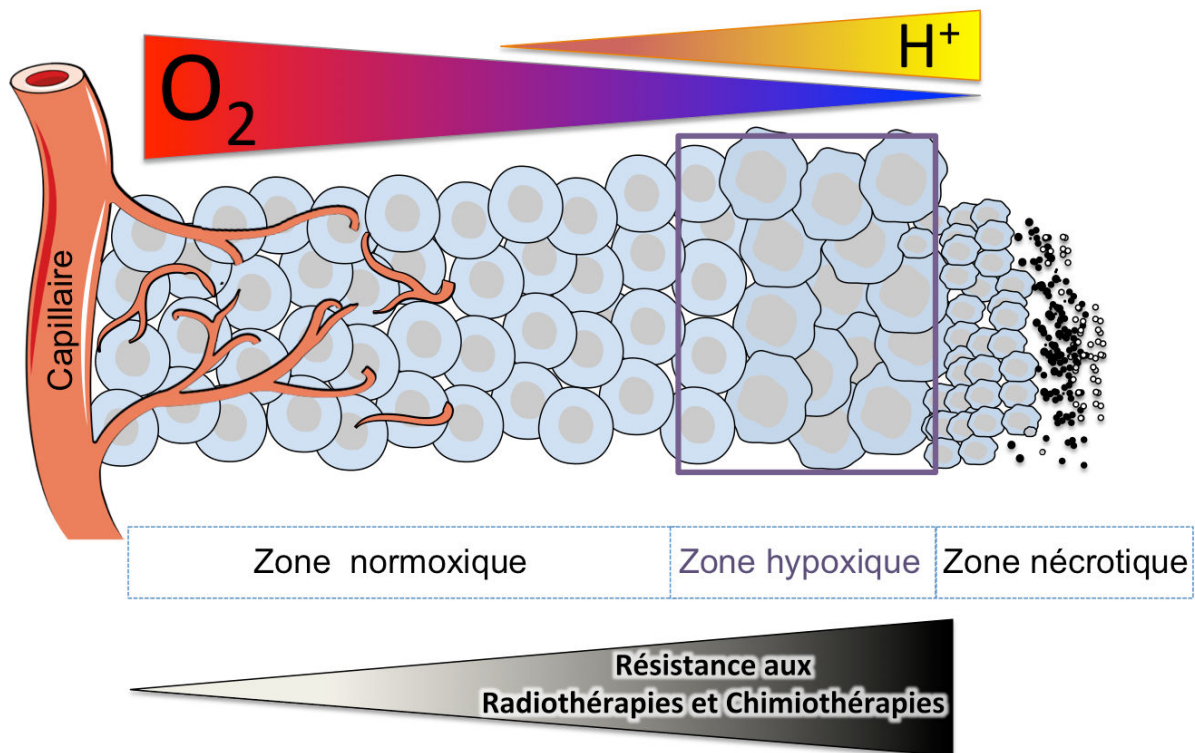


Figure 1 : Caractéristiques des tumeurs solides hypoxiques

L'oxygène et les autres nutriments contenus dans le sang sont apportés par les capillaires jusqu'aux tissus. En raison de la limite de diffusion de l'oxygène, les cellules tumorales doivent faire face à des tensions en oxygène (O_2) différentes en fonction de leur distance des vaisseaux (symbolisé par le gradient décroissant d'oxygène). En parallèle, l'accumulation d'acide lactique et de CO_2 augmentent l'acidose tumorale (H^+) dans les zones hypoxiques. La résistance aux radio/chimiothérapies est inversement proportionnelle à la concentration en oxygène dans la tumeur. (Adapté de (Brahimi-Horn et al., 2007)).

Ces vingt dernières années, le développement de multiples moyens de détection de l'hypoxie, utilisables en clinique, tel que le [¹⁸F]misonidazole-PET² scan, a permis d'établir l'existence de zones hypoxiques au sein de la plupart des tumeurs solides (Eschmann et al., 2005; Matsumoto et al., 2010; Vaupel, 2004; Vaupel et al., 2002; Vaupel et al., 2004; Vaupel et al., 2001; Yasui et al., 2010). Vaupel *et al.* ont pu directement mesurer la pO₂, à l'aide d'une microélectrode, dans le sein de 15 patientes atteintes de tumeur mammaires comparées à 16 patientes saines (Vaupel et al., 1991). Cette étude a révélé que la concentration en oxygène est globalement plus faible dans les tumeurs mammaires (médiane de 30mmHg ou 4% O₂) que dans le tissu sain (médiane de 60mmHg ou 8,6% O₂). De plus, 40% de ces tumeurs, au moment de la mesure, présentaient des zones d'hypoxie sévère (pO₂ inférieures à 2,5mmHg soit 0,3% O₂), alors que le tissu sain ne présentait pas de pO₂ plus basse que 12,5mmHg (1,6% O₂).

2. Etablissement de gradients d'oxygène

La masse tumorale se développe plus rapidement que le réseau vasculaire. Ainsi, à l'inverse des cellules initiatrices de la tumeur proches des vaisseaux, les cellules résultant d'une prolifération intense se retrouvent dans un microenvironnement avasculaire à distance des vaisseaux sanguins. En raison de la faible diffusion de l'oxygène, de l'ordre de 150µm (Folkman et al., 2000), ces cellules sont confrontées à l'hypoxie, voire même à l'anoxie (Figure 1) (Pouyssegur et al., 2006). Elles vont s'adapter en diminuant leur prolifération et en sécrétant des facteurs pro-angiogéniques stimulant la prolifération des cellules endothéliales, la production de nouveaux vaisseaux et la réoxygénation de la tumeur. Lorsque les cellules tumorales disposent de suffisamment d'oxygène, elles peuvent recommencer à proliférer intensivement et créer à nouveau des zones hypoxiques au sein de la tumeur (Brahimi-Horn et al., 2007).

Contrairement aux idées reçues, l'hypoxie tumorale n'est pas une spécificité des larges tumeurs solides mais se retrouve à tous les stades du développement tumoral et notamment dans les stades précoces pendant lesquels les tumeurs sont petites (<1mm³) et peu vascularisées (Li et al., 2007). Les micro-vaisseaux nouvellement formés au sein

² La tomoscintigraphie à émission de positons (PET) est une méthode d'imagerie de médecine nucléaire permettant de mesurer une activité métabolique en trois dimensions grâce aux émissions produites par les positons issus d'un produit injecté. Le produit injecté ici est le misonidazole, un produit se localisant naturellement dans les zones hypoxiques.

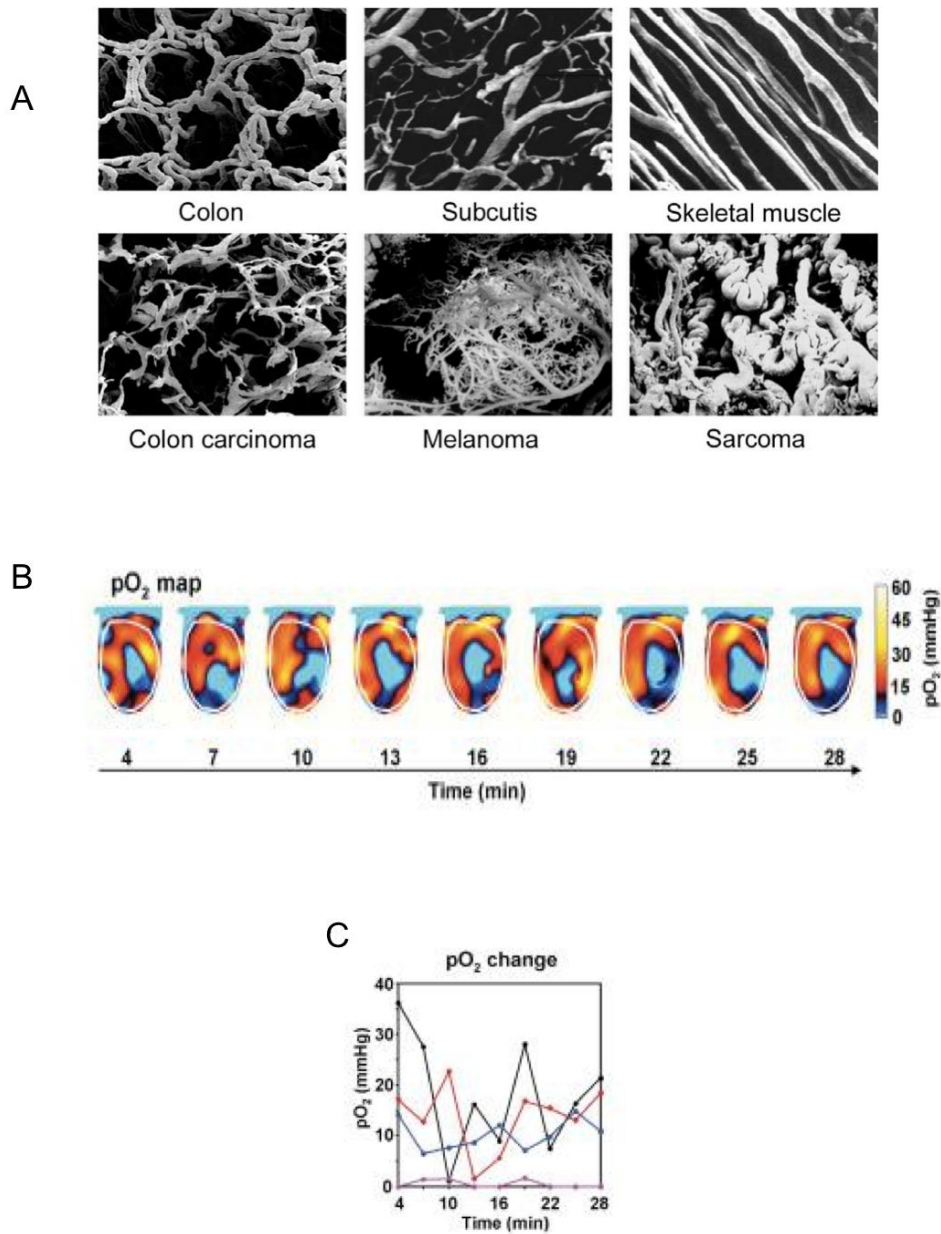


Figure 2 : Exemples de réseaux vasculaires tumoraux anarchiques et de la dynamique d'hypoxie intratumorale

(A) Clichés de microscopie électronique de réseaux vasculaires dans des tissus normaux (panneaux du haut) ou cancéreux (panneaux du bas). (Extrait de (Vaupel, 2004)).

(B) Carte en fonction du temps de la pO₂ d'une tumeur SCCVII (carcinomes squameux VII), obtenue par résonance paramagnétique (EPRI) dans un modèle murin. La ligne blanche représente le contour de la tumeur. (Extrait de (Yasui et al., 2010)).

(C) Valeurs de la pO₂ dans 3 régions distinctes de la tumeur (ligne bleue, rouge et noire) représentées en fonction du temps. (Extrait de (Yasui et al., 2010)).

de la tumeur sont immatures, excessivement ramifiés et perméables, perfusant peu efficacement les tumeurs (Figure 2A) (Carmeliet, 2005; Folkman, 1995; Vaupel, 2004). En conséquence, le flux sanguin et le transport d'oxygène sont affectés, amplifiant l'hypoxie tumorale. La visualisation des tumeurs avec les méthodes d'imagerie actuelles met en lumière à quel point l'hypoxie tumorale est un processus dynamique qui apparaît et disparaît de la tumeur au gré des épisodes de prolifération/néovascularisation (Figure 2B, 2C)(Matsumoto et al., 2010; Yasui et al., 2010). L'imagerie permet également de prendre conscience que les épisodes hypoxiques sont hétérogènes dans l'espace, le temps et la sévérité de la baisse de la teneur en oxygène d'une tumeur à l'autre, mais font partie indéniablement de leur développement.

3. Enjeux cliniques : une résistance accrue aux radio/chimiothérapies

L'étude des cellules tumorales hypoxiques s'avère extrêmement important dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Cet intérêt prend sa source dans trois observations cliniques majeures : i) les cellules hypoxiques sont plus résistantes à la radiothérapie, ii) elles sont également plus résistantes à la plupart des chimiothérapies utilisées en clinique, et finalement iii) les tumeurs hypoxiques présentent une prévalence supérieure pour les métastases (Cairns and Hill, 2004; Hockel et al., 1996). Cela fait de l'hypoxie un facteur de mauvais pronostic³ et un facteur prédictif⁴ de non-réponse aux traitements classiques utilisés en oncologie (Wilson and Hay, 2011).

L'implication de l'hypoxie dans la résistance à la radiothérapie est un véritable handicap dans le traitement du cancer. L'étude de ce phénomène, depuis sa découverte (Thomlinson and Gray, 1955), a permis d'en déterminer les origines, en majeure partie liées aux lois de la physique. En effet, la radiothérapie nécessite de l'oxygène pour créer des radicaux libres et induire des dommages à l'ADN responsables des effets cytotoxiques. *In vitro*, les cellules tumorales hypoxiques doivent être traitées avec des doses 2 à 3 fois plus fortes d'irradiation pour présenter une cytotoxicité similaire aux cellules normoxiques (Whillans and Hunt, 1982).

³ Le facteur pronostique permet de prédire les caractéristiques évolutives propres d'une pathologie (par exemple le stade tumoral ou la présence de métastases dans le cancer).

⁴ Le facteur prédictif permet de prédire l'efficacité d'un traitement sur une pathologie.

La résistance accrue des cellules hypoxiques aux chimiothérapies peut, quant à elle, s'expliquer par plusieurs raisons :

- (1) la distribution des agents anticancéreux est plus faible dans les cellules tumorales hypoxiques en raison de leur éloignement des vaisseaux et de l'inefficacité du transport sanguin par le réseau vasculaire intratumoral (Minchinton and Tannock, 2006; Tredan et al., 2007). L'hypothèse majeure du bénéfice de la combinaison d'agents anti-angiogéniques⁵ avec un agent cytotoxique est d'ailleurs largement attribué à la normalisation du réseau vasculaire tumoral par les traitements anti-angiogéniques et la meilleure distribution de l'agent cytotoxique dans le site tumoral (Jain, 2005).
- (2) de nombreux agents cytostatiques ou cytotoxiques utilisés en clinique (5-fluorouracile, carboplatine, étoposide, ..) affectent particulièrement les cellules engagées dans le cycle cellulaire. L'hypoxie, en réduisant la prolifération, diminue la sensibilité des cellules tumorales à ces drogues (Tannock, 1968).
- (3) l'hypoxie promeut la survie en régulant positivement des gènes impliqués dans la résistance à l'apoptose (Chiche et al., 2010; Erler et al., 2004), l'autophagie (Bellot et al., 2009; Rouschop et al., 2010), et l'efflux des agents anti-cancéreux par les canaux MDR (multidrug resistance) (Comerford et al., 2002).

Puisque les tissus cancéreux sont en moyenne plus hypoxiques que les tissus sains, l'hypoxie semble être une cible de choix dans le traitement du cancer. Deux stratégies majeures ont vu le jour : développer des drogues bioréductives⁶ devenant actives en hypoxie, ou sensibiliser les tissus hypoxiques aux traitements de radiothérapie/chimiothérapie. Le passage au stade clinique des composés développés est malheureusement un échec dans l'ensemble (Misonidazole, Nitracine, Tirapazamine,..), mais nourrit néanmoins beaucoup d'espoir et reste un pan de recherche très actif en cancérologie.

L'étude de la réponse cellulaire hypoxique au niveau moléculaire a permis d'identifier le rôle majeur du facteur de transcription Hypoxia-Inducible Factor (HIF) et a ouvert des perspectives nouvelles dans le traitement du cancer.

⁵ Molécules bloquant certains signaux pro-angiogéniques et inhibant la néo-angiogenèse tumorale.

⁶ Molécules réduites quand la disponibilité en oxygène diminue.

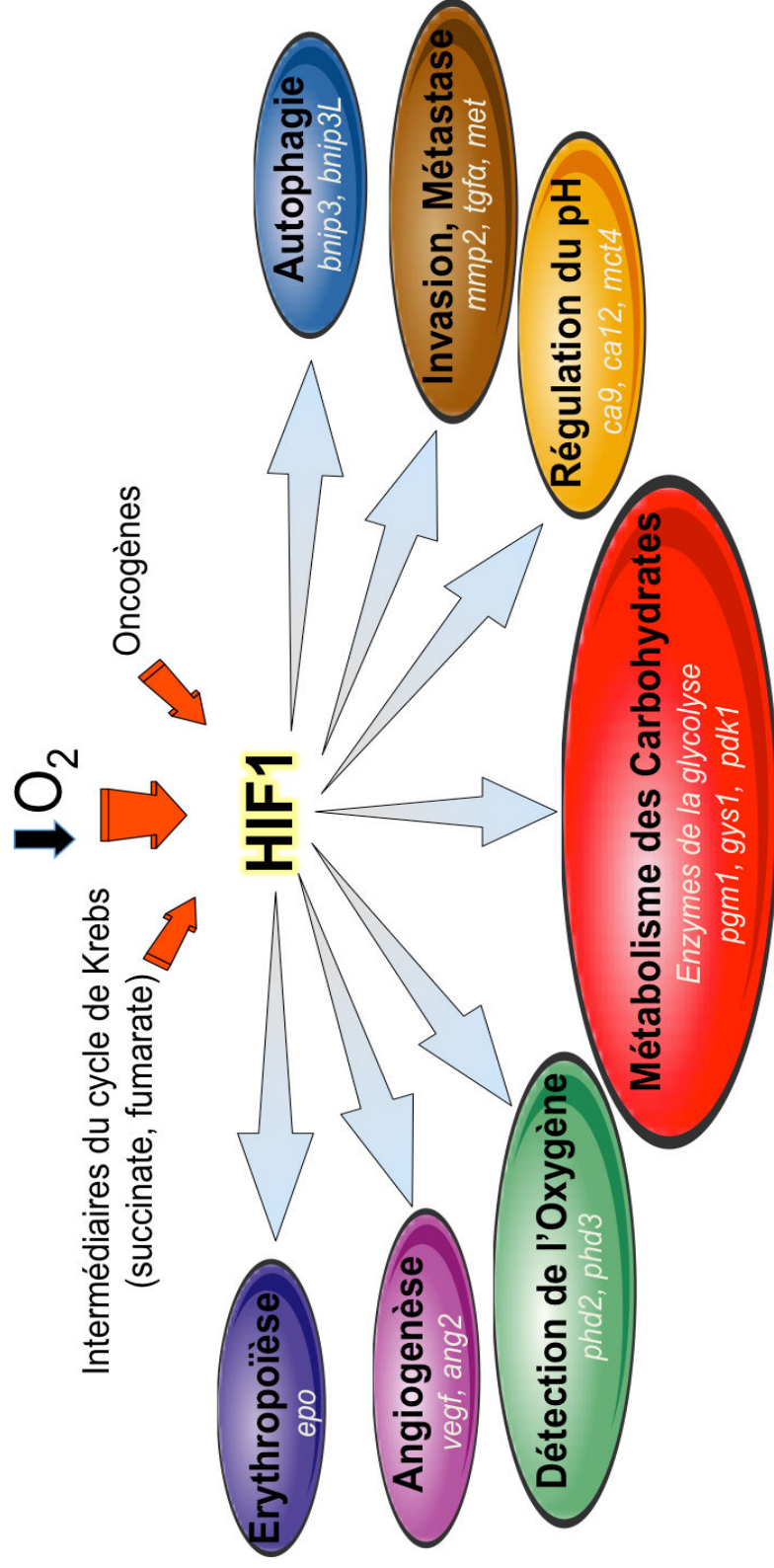


Figure 3 : Fonctions majeures de HIF1 impliquées dans l'adaptation cellulaire à l'hypoxie et le développement tumoral

HIF1, stabilisé par l'hypoxie, les oncogènes et/ou l'accumulation d'intermédiaires du cycle de Krebs, induit la transcription des gènes impliqués dans divers aspects de l'adaptation des cellules à l'hypoxie dans un contexte physiologique ou pathologique. Ces fonctions dans lesquelles HIF1 est impliqué sont essentielles dans le développement tumoral.

B. Rôle central de HIF dans l'adaptation cellulaire à l'hypoxie

I. HIF, régulateur clé de l'homéostasie de l'oxygène

Il y a 20 ans, Semenza *et al.* faisaient une découverte majeure qui allait bousculer de manière irréversible le champ des connaissances dans le domaine de l'hypoxie et du cancer. Ils découvraient un facteur nucléaire induit par l'hypoxie, HIF, qui se liait au gène de l'*epo* (Semenza *et al.*, 1991) et induisait sa transcription (Wang and Semenza, 1995). HIF s'est avéré depuis comme le chef d'orchestre de la réponse cellulaire à l'hypoxie, induisant la transcription de plus de 100 gènes, une part estimée à 1-2% du génome (Manalo *et al.*, 2005; Mazure *et al.*, 2004; Schofield and Ratcliffe, 2004; Semenza, 2000, 2003). Les gènes régulés par HIF sont impliqués dans diverses fonctions cellulaires (Figure 3) permettant aux tumeurs se développant de s'adapter à une faible disponibilité en oxygène (détails des gènes régulés par HIF dans la revue (Semenza, 2003)). HIF permet aux cellules (1) la survie à court terme (modification du métabolisme cellulaire, régulation du pH ou érythropoïèse), (2) la création d'un microenvironnement moins hostile pour prospérer dans un plus long terme (angiogenèse), et/ou (3) la recherche d'un nouvel environnement moins hostile (invasion et métastase).

II. HIF et ses sous-unités α et β

HIF est un complexe hétérodimérique constitué d'une sous-unité α , régulée par les niveaux d'oxygène, et d'une sous-unité β (également appelée Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator ou ARNT) constitutive et stable. Il existe trois isoformes de la sous-unité α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, et $\alpha 3$) et deux isoformes de la sous-unité β ($\beta 1$ et $\beta 2$) (Figure 4A et B). Ces cinq sous-unités appartiennent à la superfamille des protéines à domaine bHLH/PAS (basic Helix-Loop-Helix/Per-ARNT-SIM).

1. Les domaines bHLH/PAS et la reconnaissance de l'ADN

HIF α et HIF β possèdent, dans leurs régions N-terminales, deux domaines PAS (PAS-A et PAS-B), constitués de séquences répétées, et impliqués dans la dimérisation des sous-

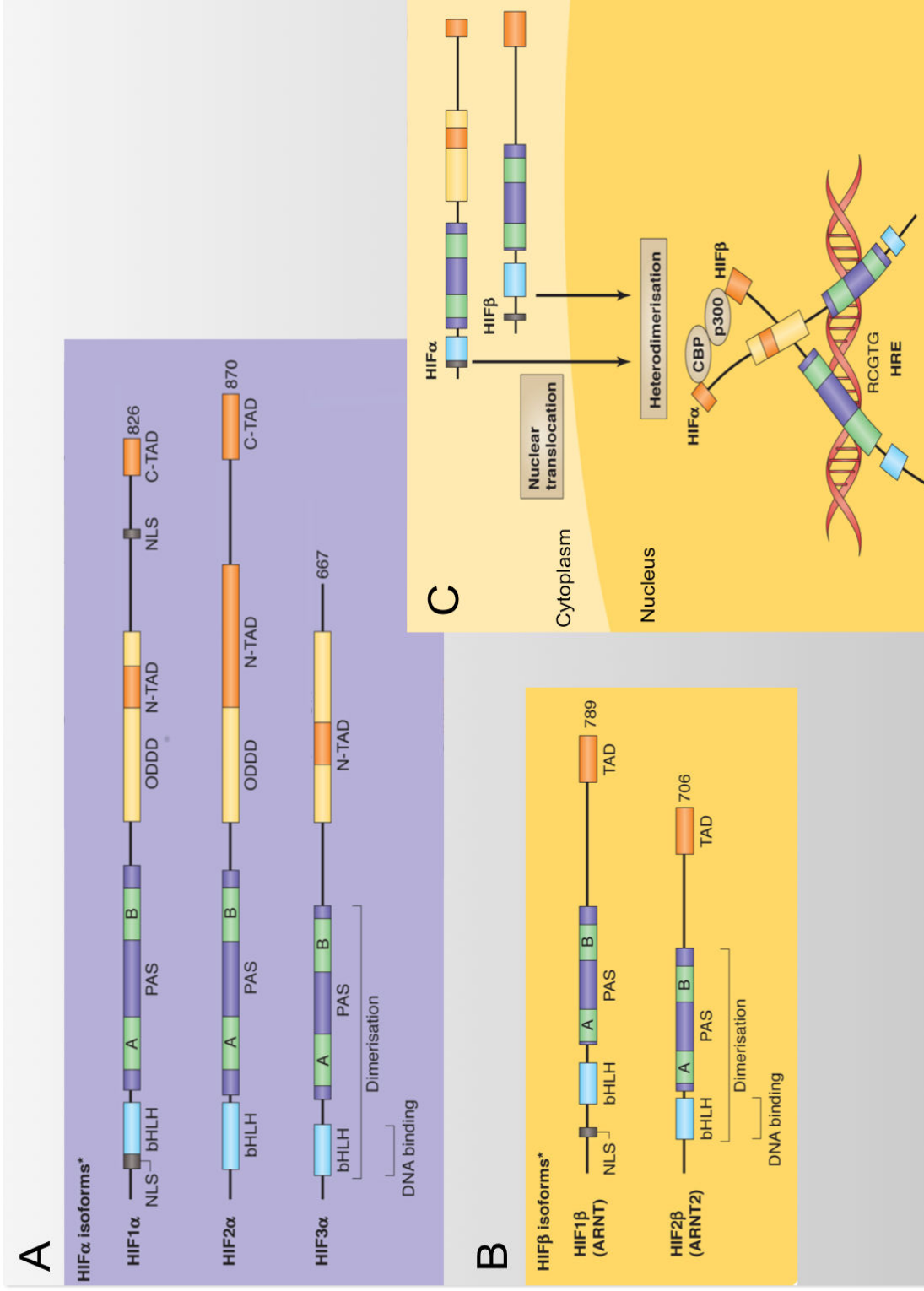


Figure 4 : Complexe hétérodimérique de HIF

Représentation schématique (A) des sous-unités α , (B) des sous-unités β de HIF, et (C) de la formation du complexe hétérodimérique

HIF α / β se liant aux HRE pour exercer son activité transcriptionnelle.. (Extrait de (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2009))

unités α et β (Hefti et al., 2004). Leur domaine bHLH est un domaine riche en éléments basiques, qui forme une structure tridimensionnelle de type hélice-boucle-hélice, permettant à la fois l'hétérodimérisation de HIF et sa fixation à l'ADN (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2009; Kewley et al., 2004). HIF se fixe à l'ADN sur un motif de reconnaissance appelé Hypoxia Response Element (HRE), dont la séquence consensus est RCGTG (R étant une base purine, A ou G) (Figure 4C). Les HRE sont des « enhanceurs » (sorte d'amplificateur) et peuvent donc se retrouver dans la région promotrice (comme pour *vegf*), mais également dans les introns, comme pour *igfbp1* (Tazuke et al., 1998), ou au niveau des régions régulatrices 3' UTR comme pour *l'epo* (Semenza et al., 1991). HIF-1 régule la transcription de ses gènes cibles grâce à ses co-facteurs (p300 et CBP) recrutés au niveau des HRE (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2009).

2. Importances des différentes sous-unités

Chez l'homme, les trois sous-unités α possèdent des régions N-terminales homologues, mais des régions C-terminales divergentes. HIF1 α est une isoforme ubiquitaire, à l'inverse de HIF2 α et HIF3 α restreintes à certains types cellulaires (Maynard et al., 2003; Wiesener et al., 1998). Notons que HIF3 α ne possède pas d'activité transcriptionnelle propre et joue un rôle de dominant négatif⁷ dans l'œil (Makino et al., 2001). Il existe également deux sous-unités β . HIF1 β est la sous-unité β majeure, indispensable au cours du développement embryonnaire et exprimée dans la plupart des tissus, alors que HIF2 β est plus spécifiquement exprimée dans les reins et le cerveau à l'âge adulte (Freeburg and Abrahamson, 2004). Les deux sous-unités β sont capables de se fixer à HIF α et de former un dimère fonctionnel (Keith et al., 2001), mais aucune étude n'a révélé un rôle distinct des complexes formés par HIF1 β ou HIF2 β .

HIF1 est considéré comme l'acteur majeur de l'adaptation cellulaire à l'hypoxie. L'activité différentielle de HIF1 et HIF2 est encore plutôt mal comprise et dépend du contexte. Il est cependant établi que HIF1 présente une activité transcriptionnelle supérieure à celle de HIF2. En effet, des expériences d'immunoprécipitation de la

⁷ En génétique, un effet dominant négatif est produit lorsque la protéine d'un gène muté est inactive et antagonise l'effet de la protéine endogène non mutée (en particulier dans le cas des polymères). Dans ce cas précis, HIF3 α en se liant à HIF1 β empêche la formation des dimères HIF1 α -HIF β et HIF2 α -HIF β .

chromatine généralisées sur l'ensemble du génome ont permis de mettre en évidence une corrélation forte entre la fixation de HIF1 à l'ADN et l'induction (ou la répression) de ses gènes cibles, alors que cette corrélation apparaît beaucoup plus faible dans le cas de HIF2 (Mole et al., 2009).

3. Les domaines de transactivation

Les domaines de transactivation (TAD) permettent le recrutement de l'ARN polymérase sur les gènes cibles. Ils sont responsables de la fonction de facteur de transcription de HIF. HIF α et HIF β possèdent toutes deux des domaines de transactivation, mais ceux de HIF β ne semblent pas impliqués dans l'activité transcriptionnelle de HIF (Li et al., 1996). HIF1 α et HIF2 α possèdent deux domaines de transactivation, ce qui est très rare pour un facteur de transcription et suggère une activité subtile de HIF1 et HIF2. Le premier domaine de transactivation de HIF1 α est situé dans sa partie N-terminale (N-TAD : acides aminés 531-575), alors que le second domaine est situé dans l'extrémité COOH (C-TAD : acides aminés 786-826). Le N-TAD et le C-TAD de HIF1 α présentent une faible similarité (21,7% d'identité chez l'homme) mais sont très conservés entre les espèces (Figure 4). De plus, il a été démontré au laboratoire que ces deux domaines ne sont pas redondants, puisqu'ils sont responsables de la régulation par HIF1 de deux répertoires de gènes distincts comme nous allons le voir par la suite : les gènes N-TAD sensibles et les gènes N+C-TAD sensibles (Dayan et al., 2006).

III. Les senseurs d'oxygène PHDs et FIH, régulateurs de la stabilité et de l'activité de HIF1

HIF1 nécessite plusieurs étapes préalables à son activation: une fois la sous-unité HIF1 α stabilisée en hypoxie, elle est transportée dans le noyau grâce aux signaux de localisation nucléaire (NLS) présents sur sa séquence (Figure 4). HIF1 α se dimérise avec HIF1 β dans le noyau, se lie alors aux séquences HRE présentes sur l'ADN, et recrute ses co-facteurs nécessaires à son activité transcriptionnelle. HIF1 β étant constitutive, l'étape cruciale dans l'activation de HIF1 est la stabilisation de HIF1 α régulée par les prolines

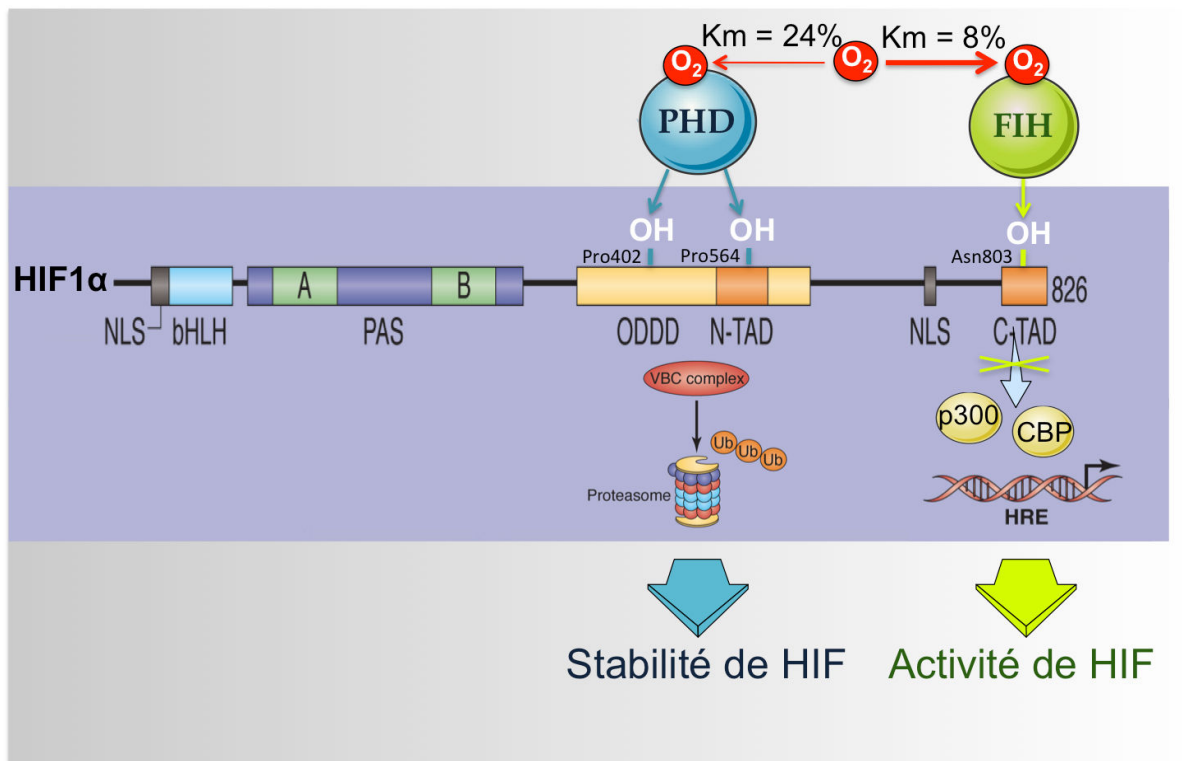


Figure 5 : Régulation de HIF1 α par les senseurs d'oxygène PHD et HIF

En normoxie, les PHDs hydroxylent les prolines 402 et 564 situées dans la partie ODDD de HIF-1 α , ce qui conduit au recrutement du complexe VBC contenant pVHL, à l'ajout de groupements ubiquitine (Ub) et la dégradation de HIF1 α par le protéasome. FIH hydroxyle l'asparagine 803 dans le C-TAD, ce qui inhibe l'interaction des co-activateurs p300 et CBP (CREB-binding protein) avec HIF1 α et inhibe son activité transcriptionnelle. FIH présente une affinité pour l'oxygène plus forte que les PHDs comme en atteste leur Km respectif pour l'oxygène. (Adapté de (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2009)).

hydroxylases (PHDs) et l'acquisition de sa pleine activité régulée par l'asparagine hydroxylase (FIH).

Les PHD et FIH sont des senseurs d'oxygène qui appartiennent à la large famille des dioxygénases. Ce sont des enzymes dépendantes du 2-oxoglutarate et du fer (II), qui modifient HIF1 α de manière post-traductionnelle, par hydroxylation. Elles utilisent le dioxygène pour simultanément hydroxyler leur substrat (à savoir HIF1 α et HIF2 α), et convertir le co-facteur 2-oxoglutarate en succinate et dioxyde de carbone. Quand le taux d'oxygène devient insuffisant, l'ion fer II (Fe²⁺) du site actif est chélaté par le cobalt II ou autre métal de transition, et l'enzyme devient alors inopérante. Il existe trois isoformes des PHDs et une isoforme de FIH. Elles présentent toutes une distribution tissulaire, une régulation, ou une spécificité vis-à-vis des sites d'hydroxylation de HIF différentes (détaillé dans (Jokilehto and Jaakkola, 2010)).

1. Les PHDs et la dégradation oxygène-dépendante de HIF1 α

HIF1 α est une protéine remarquable du point de vue de sa régulation. Elle est totalement dégradée en normoxie, mais est progressivement stabilisée quand le taux d'oxygène diminue. Il faut souligner sa demi-vie extrêmement courte qui lui confère sa labilité. En effet, la demi-vie de HIF est de l'ordre de 5 minutes en normoxie, soit l'une des demi-vie les plus courtes du monde vivant (Huang et al., 1998).

En normoxie, les PHDs sont responsables de l'hydroxylation des résidus prolines 402 et 564, situés dans la partie ODDD (oxygen-dependant degradation domain) de HIF1 α (Figure 5). Ces deux hydroxylations, catalysées majoritairement par la Proline Hydroxylase 2 (PHD2), favorisent l'interaction de HIF1 α avec la protéine von Hippel-Lindau (VHL), associée au complexe VHL/Elongin B/elongin C (VBC). Le complexe VBC, doté d'une activité E3 ubiquitine-ligase, ajoute de manière covalente des groupements ubiquitine à HIF1 α et favorise ainsi sa dégradation par le protéasome. Lorsque l'oxygène devient limitant, PHD2 est totalement inactivée : HIF-1 α est alors stabilisée. *In vitro*, son temps de demi-vie en hypoxie (1% O₂) est alors de 45 minutes (Salceda and Caro, 1997).

2. L'activité de HIF1 α est régulée par FIH

HIF1 α peut également être hydroxylée au niveau d'un résidu asparagine (Asn 803) du C-TAD (Figure 5). Cette modification post-traductionnelle, catalysée par FIH, inhibe l'interaction des co-activateurs p300 et CBP (CREB-binding protein) avec HIF1 α , et inhibe de fait son activité transcriptionnelle (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2009; Pouyssegur et al., 2006). Pour comprendre la régulation de l'activité de HIF1, il faut souligner que FIH bloque spécifiquement le C-TAD de HIF1 et laisse intacte l'activité du second domaine de transactivation N-TAD (Dayan et al., 2006).

Hormis son rôle dans la régulation de HIF1, il existe peu d'études décrivant la régulation de FIH par d'autres facteurs que l'oxygène ou son implication dans d'autres voies de signalisation. Certaines études suggèrent cependant que HIF1 α n'est pas l'unique cible de FIH. En effet, il peut hydroxyler *in vitro* des résidus asparagine situés dans des séquences spécifiques, les Ankyrin Repeat Domains (ARD). FIH interagit notamment avec les ARD de la protéine Notch et des protéines p105 et I κ B alpha impliqués dans la voie NF κ B (Cockman et al., 2006; Coleman et al., 2007) mais son rôle exact dans ces processus reste controversé et mal compris. De façon étonnante, une étude récente a mis en évidence un rôle important de FIH dans le système nerveux central puisque des souris knock-out pour *hif1an* (gène de FIH) présentent un phénotype « hypermétabolique » (hyperventilation, perte de poids, sensibilité accrue à l'insuline, résistance à l'obésité,..) qui est mimé par la perte spécifique de FIH dans les neurones (Zhang et al., 2010)

La régulation de FIH est, quant à elle, encore peu explorée. De plus en plus d'études récentes font cependant état d'une forte sensibilité de FIH à la modification des niveaux des miRNA. FIH posséderait pas moins de 100 sites consensus de fixation pour les miRNA (Chen et al., 2014), et Let-7, miR-125 et miR 31 (Liu et al.) sont des suppresseurs confirmés de l'activité de FIH (Liu et al., 2010a).

3. Une régulation fine des gènes HIF-dépendants via une fonction différentielle des TADs

Les PHDs et FIH peuvent être schématiquement considérées comme deux verrous de l'activité de HIF1 en normoxie impliquant d'une part la dégradation de HIF1 α par le protéasome, et d'autre part l'inhibition de l'activité de la protéine HIF1 résiduelle.

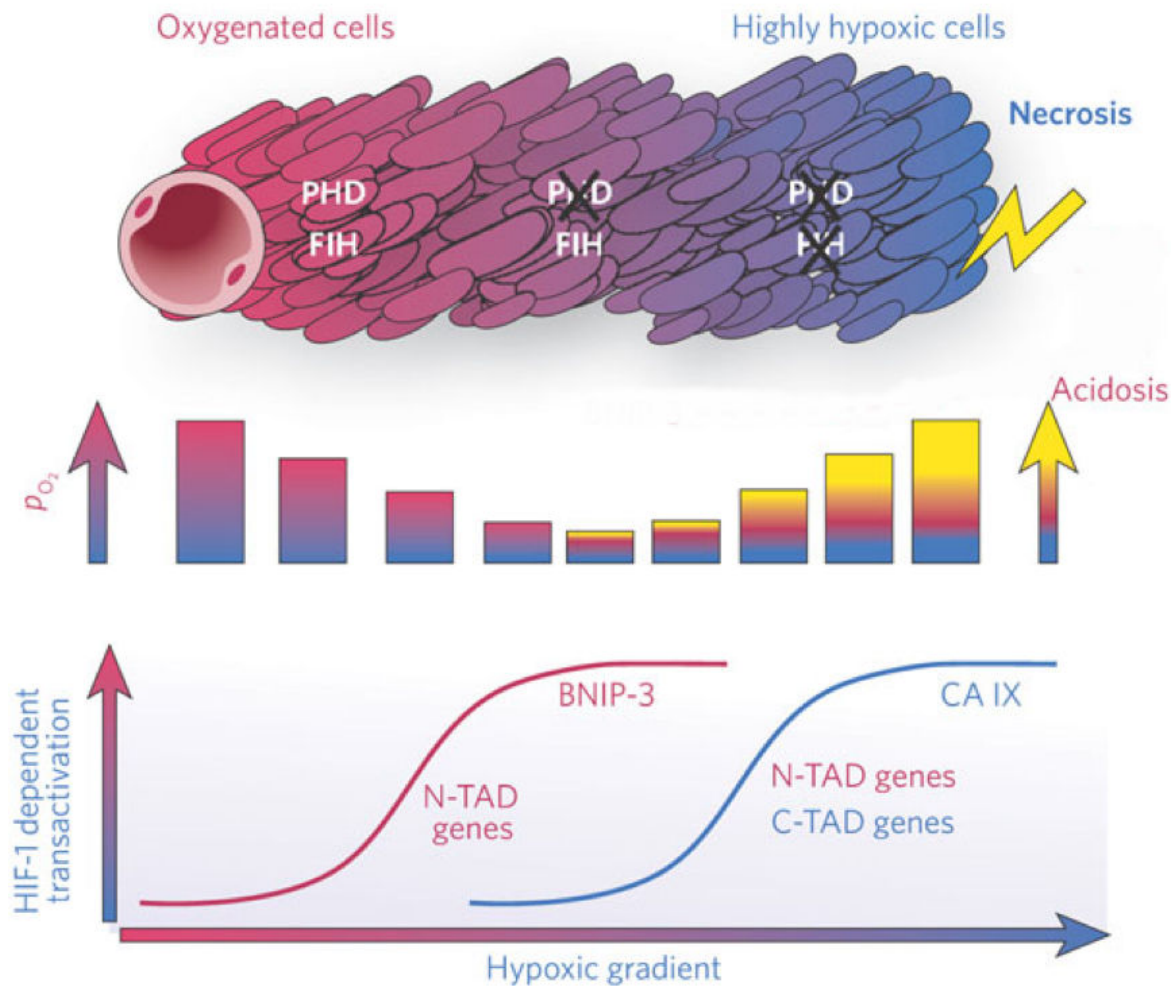


Figure 6 : Modèle de deux répertoires de gènes régulés par HIF1

Dans l'environnement de la tumeur, la pression partielle en oxygène (pO_2) diminue en fonction de l'éloignement des vaisseaux. A une pO_2 modérée, l'inactivation des PHD conduit à la stabilisation de HIF1 α , mais les gènes dépendants de l'activité du C-TAD ne sont pas induits en raison de l'activité de FIH. Les gènes uniquement dépendants du N-TAD (comme par exemple *Bnip3*) sont alors induits par HIF1. Lorsque la pO_2 diminue davantage, la répression du C-TAD par FIH est relâchée et HIF1 présente sa pleine activité transcriptionnelle vis-à-vis des deux répertoires de gènes dépendants du N-TAD ou dépendants du N+C-TAD (comme *ca9*). (Extrait de (Pouyssegur et al., 2006)).

Ces deux systèmes de régulation possèdent une activité finement régulée par les niveaux intracellulaires d'oxygène, mais présentent une affinité différente pour l'oxygène : *in vitro*, les PHDs ont un K_m (constante de Michaelis) pour l'oxygène de $230\mu\text{M}$ (correspondant à 24% O_2), soit une valeur trois fois plus importante que le K_m de FIH ($90\mu\text{M}$, correspondant à 8% O_2) (Koivunen et al., 2003). Ainsi, en normoxie (21% d' O_2), les PHDs sont déjà à 50% de leur activité, contrairement à FIH qui est encore totalement active.

L'extrapolation de ces données aux concentrations d'oxygène présentes dans les tumeurs solides a permis, au laboratoire, d'établir un modèle de régulation de l'activité de HIF1 au sein de la tumeur (Dayan et al., 2006; Pouyssegur et al., 2006) (Figure 6). En s'éloignant des vaisseaux sanguins, le taux d'oxygène décroissant va progressivement lever le premier verrou, incarné ici par les PHDs, et stabiliser HIF1 α . Le répertoire de gènes dépendants du N-TAD de HIF1 est alors induit mais le C-TAD est toujours réprimé par FIH. Une chute de la concentration en oxygène est nécessaire pour diminuer significativement l'activité de FIH, lever le second verrou et libérer le C-TAD rendant ainsi sa pleine activité transcriptionnelle à HIF1. Cette concentration en oxygène, de l'ordre de 0,1%, n'est présente que dans des cellules situées dans des zones fortement éloignées des vaisseaux proches de l'anoxie et la nécrose.

Soulignons que FIH ne joue pas uniquement sur l'amplitude d'activité transcriptionnelle de HIF1 α , mais modifie également la nature de ses cibles. En effet, la libération du C-TAD de HIF1 induit la transcription d'un second répertoire de gènes comprenant des gènes qui ne sont peu ou pas sensibles au N-TAD (pas ou peu induits dans des conditions d'hypoxie modérée ($\geq 1\% \text{O}_2$)). Le répertoire de gènes dépendants du N-TAD et du C-TAD comprend notamment *phd3*, *ca9*, *vegf*, et *p21*.

4. Autres modes de régulation de HIF1

Il existe de très nombreux mécanismes régulant HIF1 de manière indépendante des senseurs d'oxygènes PHD et FIH. En voici quelques-uns majeurs :

Tout d'abord, HIF1 peut être activé par les espèces réactives de l'oxygène (ROS)⁸ produites par les mitochondries et diffusant librement vers le cytosol où elles exerceraient un rôle de molécule de signalisation, en fonction de leur localisation, de leur concentration et de la durée de leur production (Ristow and Zarse, 2010 ; Wu et al., 2013). L'augmentation de la production des ROS en hypoxie est un sujet controversé, de même que l'activation de HIF1 par les ROS. Il a été démontré que les ROS produites en hypoxie oxydent l'élément Fe (II) en Fe (III) dans le site actif des PHDs , ce qui a pour conséquence d'inactiver les PHDs et de stabiliser HIF1 (Chandel et al., 2000 ; Gerald et al., 2004). Il a même été suggéré que les mitochondries soient elles-même des senseurs d'oxygène par l'intermédiaire des ROS (Klimova and Chandel, 2008; Majmundar et al., 2010). Cependant, le fait que HIF1 puisse également être stabilisé dans des cellules dans lesquelles les chaînes respiratoires de la mitochondries ne sont pas fonctionnelles semble impliquer un mécanisme de stabilisation plus complexe (Srinivas et al., 2001; Vaux et al., 2001).

L'accumulation de métabolites du glucose modifie également la stabilité de HIF1 en inhibant l'activité des PHDs. Les PHDs convertissent le 2-oxoglutarate (ou α -kétoglutarate) en succinate, deux métabolites impliqués dans le cycle de Krebs (ou cycle des acides tricarboxyliques (TCA)). La mutation de la fumarate hydratase ou de la succinate déshydrogénase, enzymes du TCA, provoque un blocage du cycle de Krebs et l'accumulation de succinate. Ce dernier rétro-inhibe alors les PHDs et stabilise HIF en normoxie, créant un état de « pseudohypoxie » (Pollard et al., 2005; Sudarshan et al., 2009). Notons que ces mutations peuvent conduire à une transformation maligne dans certains types cellulaires (phéochromocytomes) et que l'utilisation de dérivés de l' α -kétoglutarate, activant les PHDs, s'avère être une stratégie prometteuse dans le traitement de ces cancers (Tennant et al., 2009).

Il existe également une pléiade de modifications post-traductionnelles de HIF1 (SUMOylation, nitrosation, acétylation, phosphorylation) qui peuvent modifier sa stabilité ou son activité (détaillées dans (Brahimi-Horn et al., 2005)). Enfin, d'autres régulateurs génétiques comme les miRNA, et particulièrement miR-210 (Puissegur et al.,

⁸ Molécules oxygénées instables, radicalaires (HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$), ou génératrices de radicaux libres (H_2O_2 , NO) provenant de la réduction incomplète de l'oxygène par les mitochondries ou d'une fuite des électrons de la chaîne respiratoire.

Pathway	Target	Agent	Class	
HIF1 α expression	HIF antisense mRNA	EZN-2968	RNA oligonucleotide	
	Topoisomerase I	Topotecan	Camptothecin analogues	
	Multiple	PX-478	Melphalan N-oxide	
HIF1 transcription	Translation	Digoxin	Cardiac glycoside	
	HSP90	Geldanamycin and tanespimycin (17-AAG)	Benzoquinone ansamycin antibiotics	
	HIF-p300 binding	Chetomin and analogues	Dithiodiketopiperazine	
	Thioredoxin 1	PX12	Imidazole disulphide	
	DNA binding	PMX290	Indoloquinol	
		Echinomycin	DNA intercalator	
	HIF1 target gene products	CA9 and CA12	Aryl sulphonamides	Sulphonamide zinc binders
		GLUT1	Glufosfamide	Glucose isophosphoramidate mustard
		HK2	2-GLU-SNAP	Glucose SNAP conjugate
			Fasentin	Oxobutanilide
MCT1		STF-31154	Unknown	
Receptor tyrosine kinases	VEGFR	5TDG, 2DG, 2FDG	Glycolysis inhibitors	
	EGFR	α -cyano-4-hydroxycinnamate	Lactate transport inhibitor	
		Bevacizumab	Monoclonal antibody	
		Gefitinib and erlotinib	ATP competitive kinase inhibitors	

Table 1 : Exemples d'approches pharmacologiques ciblant l'hypoxie au niveau moléculaire

Ces approches ciblent l'expression de HIF1, son activité transcriptionnelle, ou ciblent spécifiquement les protéines régulées par HIF1.

CA, carbonic anhydrase; DG, deoxyH₂O; DH, glucose; EGFR, epidermal growth factor receptor; FDG, fluorodeoxyglucose; GLUT1, glucose transporter 1; HIF, hypoxia-inducible factor; HK2, hexokinase 2; HSP90, heat shock protein 90; MCT1, monocarboxylate transporter 1. (Extrait de (Wilson and Hay, 2011))

2011), ou épigénétiques comme les sirtuines (Lim et al.) apportent une complexité supplémentaire à la régulation de HIF1.

5. HIF1, promoteur du développement tumoral ?

De même que l'hypoxie, HIF1 est associé à un mauvais pronostic dans de nombreux types de cancers (Birner et al., 2001; Birner et al., 2000; Bos et al., 2001; Schindl et al., 2002; Sivridis et al., 2002). Ce n'est cependant pas universel puisqu'une forte expression de HIF1 a été corrélée dans deux études à une mortalité moins élevée chez les patients atteints de cancers de la face et du cou (Beasley et al., 2002) ou de cancers du poumon non à petites cellules (NSCLC) (Volm and Koomagi, 2000). A l'inverse, HIF2 est un facteur de mauvais pronostic dans ces deux types de cancer (Giatromanolaki et al., 2001; Koukourakis et al., 2002). Ce phénomène est probablement dû à une action distincte ou chevauchante de HIF1 et HIF2 dans l'activation de certains gènes (Gordan and Simon, 2007).

Les expériences de xénogreffes tumorales dans les modèles animaux ont, dans l'ensemble, confirmé un effet pro-tumoral de HIF1 de part son implication dans l'angiogenèse, le métabolisme cellulaire ou l'invasion (Kung et al., 2000; Liao et al., 2007; Maxwell et al., 1997; Ryan et al., 1998). Cependant, il existe quelques exceptions parmi lesquelles les cellules ES, dont l'inactivation de HIF1 semble accélérer au contraire la croissance tumorale (Carmeliet et al., 1998). En outre, au vu de ces multiples effets, HIF1 est une cible pharmacologique délicate mais permettant toutefois de cibler en même temps plusieurs gènes importants dans l'initiation et la progression tumorale. Il existe donc « deux écoles » dans le développement de thérapies ciblant l'hypoxie au niveau moléculaire: les partisans du ciblage direct de HIF (HIF1 ou HIF2) en inhibant son expression ou son activité transcriptionnelle, ou les adeptes d'une inhibition ciblée de certains gènes majeurs induits par HIF. Ces deux stratégies offrent des perspectives très intéressantes dans le traitement du cancer, comme en témoignent les anti-angiogéniques approuvés en clinique (bevacizumab, sorafenib,...), les ARNm antisens ciblant HIF (EZN2968) et l'inhibiteur du transporteur de monocarboxylates MCT1 (AZD3965), respectivement ayant passé la phase I d'essai clinique (Enzon Pharmaceuticals, Inc.) ou en cours de phase I (Cancer Research UK) (Table 1).

L'hypoxie est donc un évènement important dans la dynamique tumorale, contribuant à l'agressivité tumorale et la résistance aux chimiothérapies et radiothérapies. HIF en tant que « chef d'orchestre » de la réponse hypoxique apparaît comme une cible thérapeutique très intéressante et offre des espoirs de nouvelles thérapies anticancéreuses ciblées.

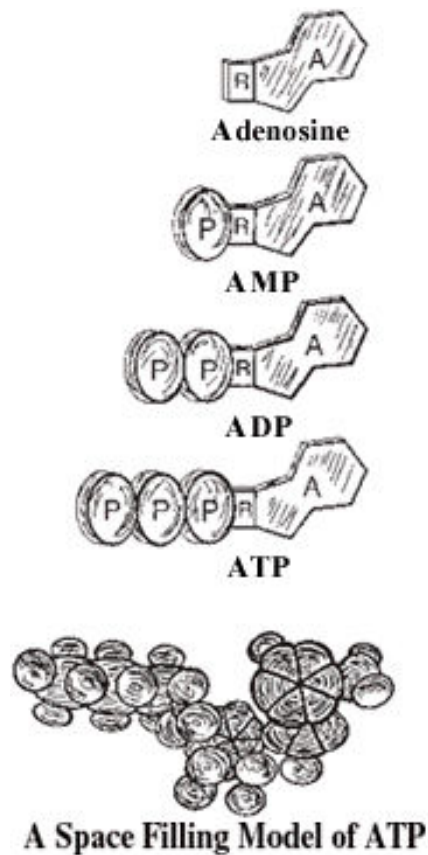


Figure 7 : Représentation de la molécule d'ATP et ses produits d'hydrolyse

La base de l'ATP est l'adénosine, nucléoside formé de la base purine adénine et d'un noyau ribose. A l'adénosine se greffe 1, 2, ou 3 groupements phosphates formant respectivement l'AMP (adénosine monophosphate), l'ADP (adénosine diphosphate), ou l'ATP (adénosine triphosphate). L'ATP est la molécule la plus énergétique de cette famille d'adénosines en raison de sa liaison pyrophosphate entre son deuxième et son troisième groupement phosphate le plus éloigné de l'adénosine. Le dernier dessin (en bas) représente schématiquement la conformation tridimensionnelle de l'ATP. (Extrait de (Goodsell, 1996)).

Chapitre 2 : Métabolisme tumoral en hypoxie

A. Introduction au métabolisme cellulaire

I. La molécule d'ATP, unité d'énergie cellulaire

L'adénosine triphosphate (ATP) est une molécule universelle et primordiale à la vie. C'est une coenzyme hautement énergétique constituée du nucléoside adénine et de trois groupements phosphates (Figure 7). La plupart de son énergie est contenue dans la liaison pyrophosphate. L'hydrolyse de cette liaison libère de l'énergie et convertit l'ATP en adénosine diphosphate (ADP), en plus d'un phosphate inorganique. Au contact de la respiration mitochondriale ou de la glycolyse, l'ADP peut être reconvertie en ATP, par transfert de l'énergie libérée par la dégradation du glucose sur la liaison pyrophosphate (Kornberg, 1989; McMurry and Castellion, 1996).

L'ATP est une molécule présentant peu d'encombrement stérique, qui permet de fournir de l'énergie cellulaire instantanément, avec un haut rendement, et qui peut être régénérée rapidement après son hydrolyse, par reformation de la liaison pyrophosphate. Ces caractéristiques font d'elle la molécule universelle de stockage et de transfert de l'énergie cellulaire. Elle fournit l'énergie nécessaire à toute fonction cellulaire, des plus primitives telles que la synthèse protéique ou le maintien du potentiel de membrane, aux plus évoluées comme la contraction musculaire ou la différenciation cellulaire (Boyer et al., 1977). L'ATP est en quelque sorte l'unité d'énergie cellulaire, ce qui lui confère son rôle de garant de la viabilité cellulaire dans toute forme de vie (McMurry and Castellion, 1996).

Etant donné que l'hydrolyse de l'ATP libère 12kcal/mole, et qu'une personne nécessite approximativement 2000kcal/jour (personne de 70kg), 167 moles d'ATP, soit 83kg d'ATP, sont converties en ADP en moyenne par jour. De plus, puisque la quantité d'ATP estimée dans le corps humain est d'environ 250 à 300g d'ATP, chaque molécule d'ATP doit suivre un cycle hydrolyse-régénération, 300 fois par jour en moyenne (Karp, 2010).

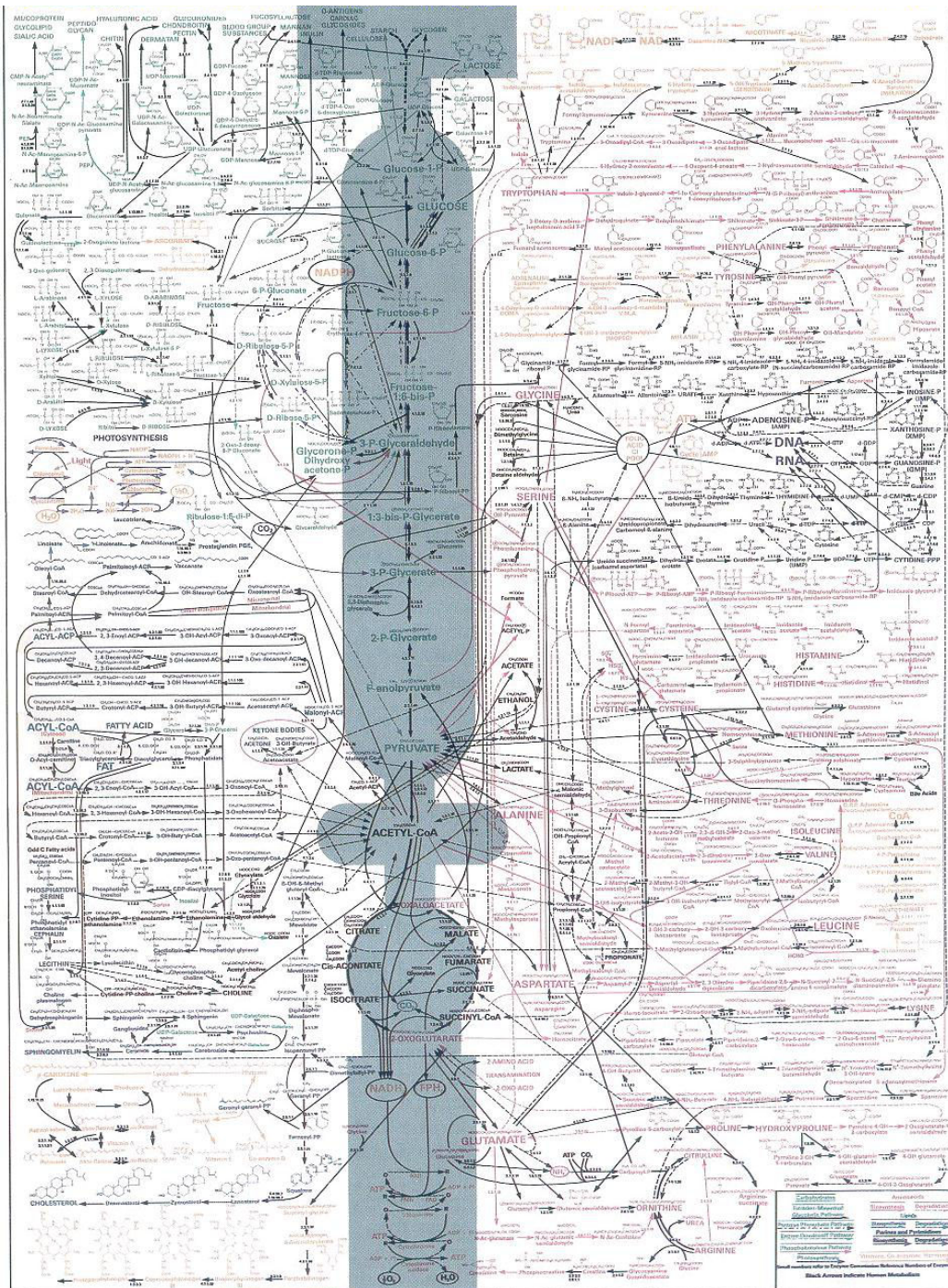


Figure 8 : Représentation du réseau métabolique cellulaire

Apparaissent en grisé les voies métaboliques majeures que sont la glycolyse anaérobie, le cycle de Krebs, et la phosphorylation oxydative. (Extrait de (Voet and Voet, 1995))

II. Glycolyse et respiration mitochondriale : les deux voies majeures de production d'énergie cellulaire

Le métabolisme cellulaire est un équilibre complexe entre les réactions cataboliques, c'est-à-dire dégradant des macromolécules pour fournir de l'ATP, et les réactions anaboliques, permettant la synthèse des macromolécules à partir de molécules simples et d'ATP. Il implique de nombreuses enzymes et intermédiaires métaboliques, formant un réseau dense, interconnecté, et articulé autour de quelques croisements majeurs (Figure 8). Plus de deux siècles d'enzymologie ainsi qu'une accélération très rapide des techniques d'analyse métabolomique⁹ durant ces dix dernières années ont permis de mieux appréhender ce réseau. Cela a permis d'identifier les voies centrales de la bioénergétique (glycolyse, cycle de Krebs, voie des pentoses phosphates, métabolisme des lipides, etc), les enzymes clés impliquées (phosphofructokinases, lactate déshydrogénase, pyruvate déshydrogénase, acétylCoA-carboxylase, etc), ainsi que de mettre en évidence certains «nœuds» du métabolisme (G6P, pyruvate, acétylCoenzyme A, etc). La mise en évidence de la dérégulation de certaines voies métaboliques dans les cellules tumorales a été responsable d'un véritable regain d'intérêt autour de l'étude du métabolisme cellulaire. « Le boom du métabolisme tumoral » est loin d'être terminé avec la mise en lumière relativement récente des interconnexions entre intermédiaires métaboliques et régulateurs de l'épigénétique (Gut and Verdin).

Le but de cette partie n'est bien évidemment pas de dresser le tableau complet du métabolisme cellulaire mais plutôt de fournir une vue simplifiée des voies de production d'énergie des cellules tumorales. Le glucose est probablement le carburant métabolique le plus universel qui soit. Le catabolisme du glucose peut schématiquement être décomposé en trois parties majeures : la conversion du glucose en pyruvate, autrement appelée glycolyse anaérobie, la respiration mitochondriale, et la fermentation lactique. On appelle communément glycolyse (du grec glykys « sucré » et lysis « dissolution ») l'ensemble des étapes de la glycolyse anaérobie et de la fermentation lactique.

⁹ La métabolomique est l'étude de l'ensemble des métabolites (métabolome) présents dans une cellule, un tissu, un organe ou un organisme, à un temps et dans des conditions données (état nutritif, facteurs environnementaux,...).

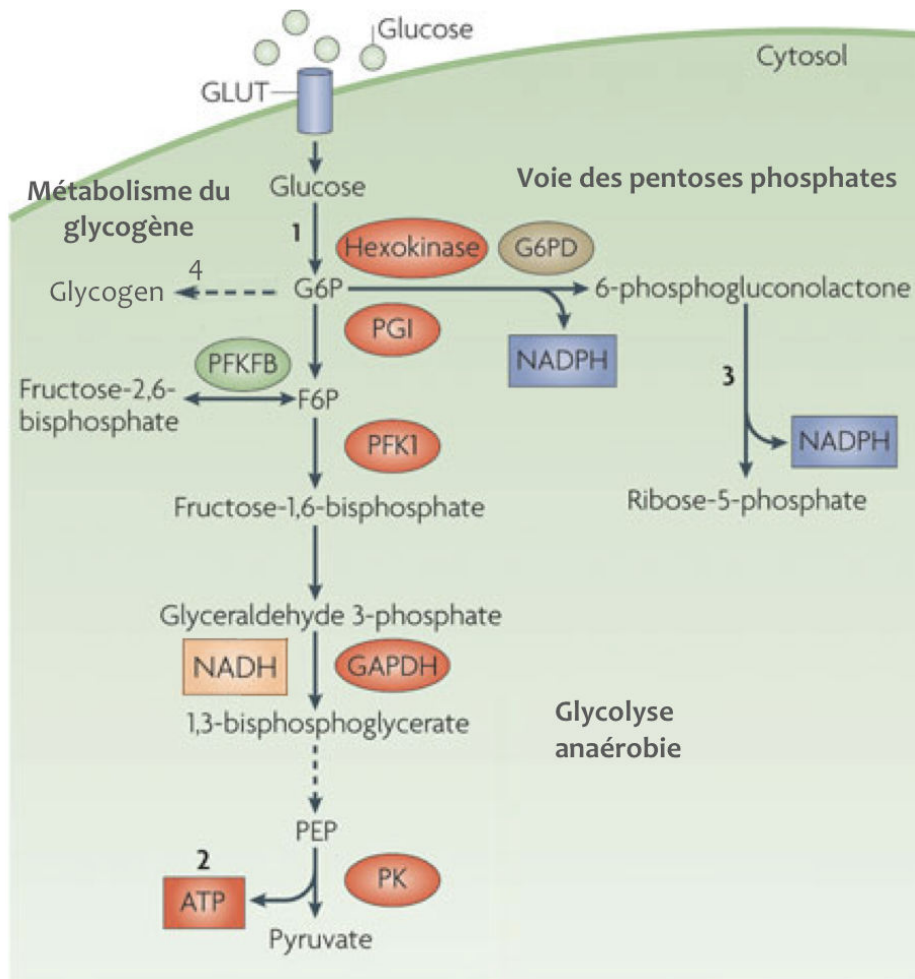


Figure 9 : Voie de la glycolyse anaérobie

Le glucose entre dans la cellule par les transporteurs de glucose puis est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par (1) l'hexokinase. Le G6P peut ensuite entrer (2) dans la glycolyse et produire de l'ATP, du NADH et du pyruvate, ou alternativement (3) dans la voie des pentoses phosphates, ou (4) dans la voie du métabolisme du glycogène.

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GLUT, glucose transporter; F6P, fructose-6-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; PFK1, phosphofructokinase 1; PFKFB, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase; PGI, phosphoglucose isomerase; PK, pyruvate kinase.. (Adapté de (Buchakjian and Kornbluth, 2010)).

1. La glycolyse anaérobie : de l'entrée du glucose au pyruvate

La glycolyse anaérobie, autrement appelée voie d'Embden-Meyerhof-Parnas, constitue très probablement un des plus anciens modes de production d'énergie, conservé des bactéries les plus primitives jusqu'aux hommes. Bien que peu rentable en terme d'énergie, elle est d'une vitesse incomparable et produit des intermédiaires qui alimenteront d'autres voies métaboliques. Les enzymes de la glycolyse, et leur mode de régulation, ont été fortement conservés au cours de l'évolution. De nombreux micro-organismes sont entièrement dépendants de la glycolyse pour produire de l'énergie. Chez les mammifères, dans certains types cellulaires tels que les hématies (présentant peu de mitochondries) et les muscles blancs glycolytiques, la glycolyse est la voie prédominante de production d'ATP.

Le glucose entre majoritairement dans la cellule par les transporteurs passifs et bidirectionnels GLUTs (glucose transporters) (Figure 9). Il en existe cinq isoformes, de GLUT1 à GLUT5, possédant des distributions tissulaires et des régulations différentes. Le glucose intracellulaire est phosphorylé par les hexokinases 1 et 2 en glucose 6-phosphate (G6P). Cette première étape limitante est importante car à l'inverse du glucose, le G6P ne peut plus ressortir de la cellule. Le G6P est un premier nœud métabolique qui peut être diverti vers la glycolyse, la synthèse de glycogène, ou la voie des pentoses phosphates. Le G6P entre majoritairement dans la glycolyse et alimente une série de 9 réactions enzymatiques qui vont aboutir à la production de deux molécules de pyruvate, 2 ATP et de pouvoir réducteur sous forme de 2 NADH. Les enzymes limitantes et irréversibles, représentant des points de contrôle importants de la glycolyse sont l'hexokinase et la phosphofructokinase 1 (PFK1) consommatrices d'ATP, ainsi que la pyruvate kinase productrice d'ATP.

2. Le pyruvate, carrefour métabolique

Le pyruvate est un intégrateur du métabolisme cellulaire à l'intersection des trois voies majeures que sont la glycolyse anaérobie, la fermentation lactique et le cycle de Krebs.

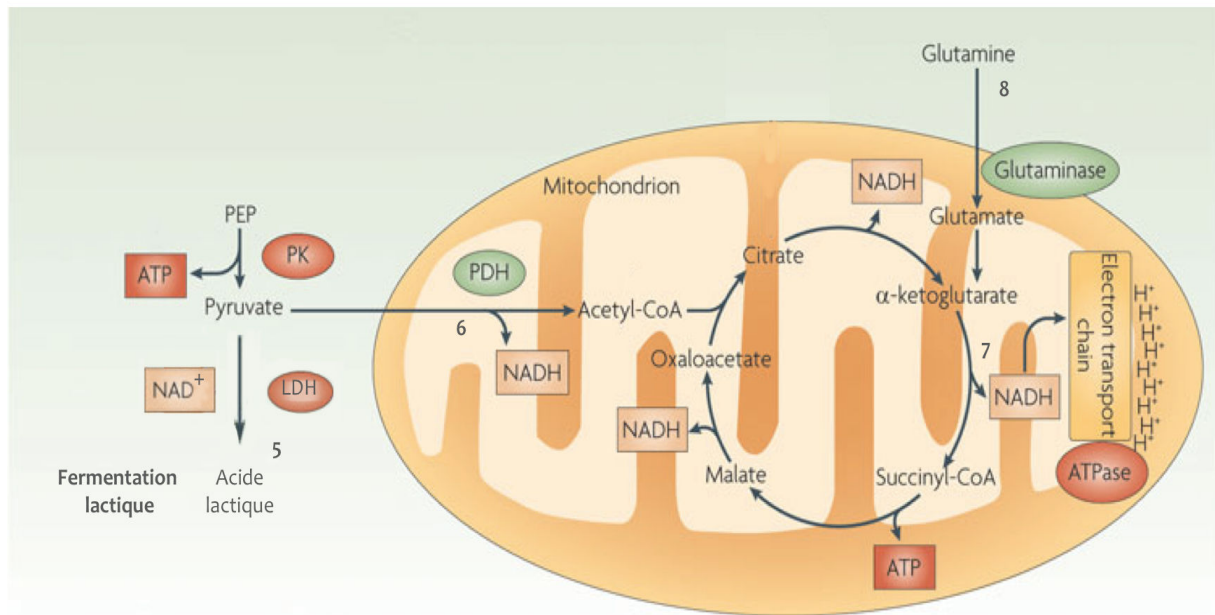


Figure 10 : Le pyruvate, à l'intersection de la glycolyse et du TCA

Le pyruvate produit peut être réduit en lactate (5) par la LDH-A, ou entrer dans la mitochondrie pour être incorporé dans le TCA. Après l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA par le complexe PDH (6) qui produit une molécule de NADH, l'acétylCoA alimente le TCA pour produire du NADH, du GTP (équivalent ATP), et du FADH₂. Le NADH et le FADH₂ sont ensuite utilisés pour fournir des électrons à la chaîne respiratoire productrice d'ATP (7). La glutamine ainsi que d'autres acides aminés peuvent également alimenter le TCA (8).

LDH, lactate dehydrogenase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PDH, pyruvate dehydrogenase; PEP, phosphoenolpyruvate. (Adapté de (Buchakjian and Kornbluth, 2010)).

La respiration mitochondriale est la voie métabolique privilégiée des cellules différenciées ne se divisant que très peu. Elle comprend deux étapes : le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative (Figure 10).

Pour alimenter le cycle de Krebs, le pyruvate doit tout d'abord entrer dans la mitochondrie. Pour ce faire, le pyruvate passe librement la membrane externe des mitochondries, à travers le voltage-dépendant anion channel (VDAC autrement appelé porine)(Gray et al., 2013). Les membranes internes des mitochondries étant imperméables¹⁰ aux molécules chargées, le pyruvate doit être transporté de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale, par les mitochondrial pyruvate carrier 1 et 2 (MPC1 et MPC2), identifiés très récemment dans les cellules de mammifère par l'équipe de Martinou (Herzig et al., 2012). Au niveau de la membrane interne mitochondriale, le pyruvate est converti en acétylCoA, CO₂ et NADH par la pyruvate déshydrogénase (PDH - autrement appelée pyruvate dehydrogenase complex), large complexe multienzymatique finement régulé (près de 100 sous-unités chez les mammifères, poids moléculaire d'environ 9,5MDa).

L'acétylCoA peut par la suite entrer dans le cycle de Krebs, ou être un précurseur de diverses réactions anaboliques telles que la lipogenèse, ou la production de cholestérol. Si il entre dans le cycle de Krebs, l'acétylCo-A est condensé avec l'oxaloacétate pour former du citrate. S'en suivront 7 réactions enzymatiques pour régénérer l'oxaloacétate, et permettre au cycle de fonctionner à nouveau.

Notons que le cycle de Krebs est un cycle enzymatique dont le produit initial est identique au produit final. La perte de certains intermédiaires redirigés vers d'autres voies métaboliques (par exemple le citrate, utilisé pour la synthèse des acides gras dans les cellules prolifératives) doit donc être compensé par des voies alternatives alimentant le cycle de Krebs. L' α -cétoglutarate peut, par exemple, être produit à partir de la glutamine, acide aminé le plus abondant dans la cellule, alors que le malate ou l'oxaloacétate peuvent être produits directement à partir du phosphoenolpyruvate.

De plus, il existe des systèmes de régulation complexes et des échanges d'intermédiaires du cycle entre le cytoplasme et la mitochondrie. Ces échanges sont

¹⁰ C'est ce qui lui permet de maintenir le gradient de protons nécessaire à la production d'ATP par l'OXPHOS.

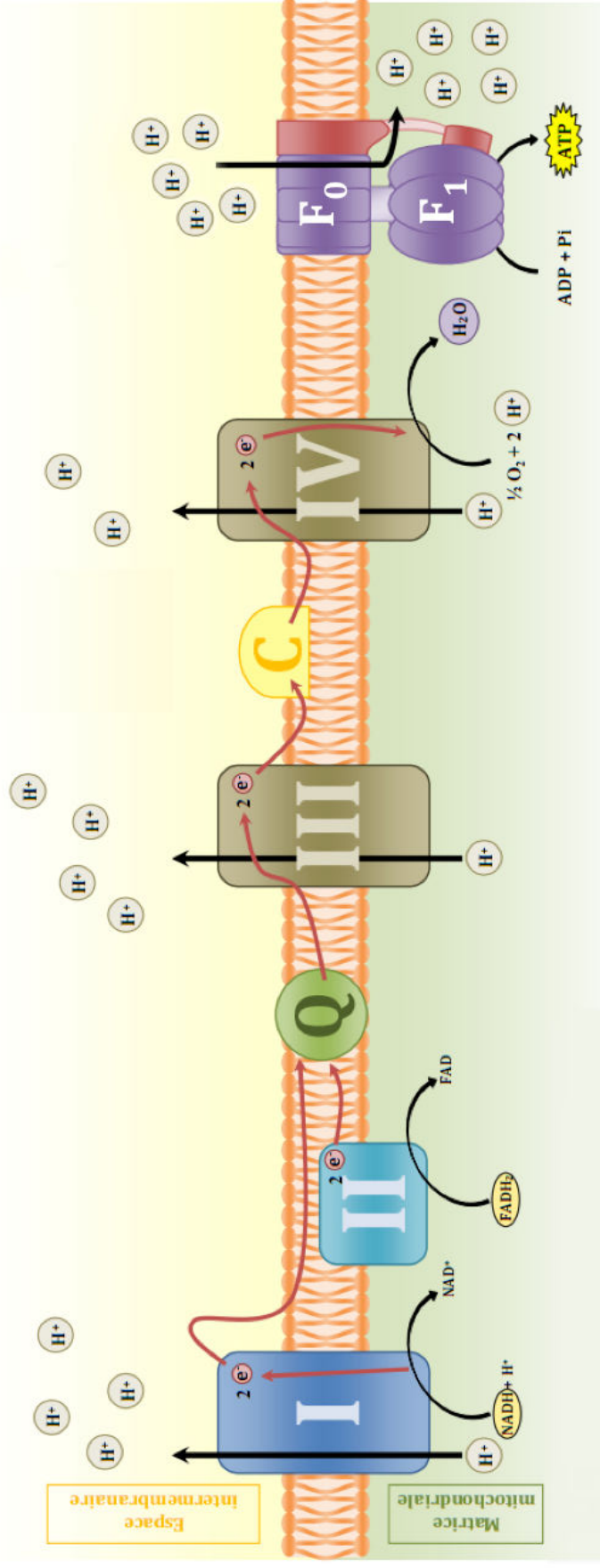


Figure 11 : Représentation simplifiée de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative (OXPHOS)

La chaîne respiratoire est constituée de quatre complexes protéiques dans la membrane interne mitochondriale et de la pompe proton ATPase permettant la production d'ATP. Les électrons sont soit récupérés à partir du NADH au niveau du complexe I (activité NADH coenzyme Q réductase), soit récupérés à partir de FADH2 au niveau du complexe 2 (activité succinate coenzyme Q réductase). NADH et FADH2 sont les coenzymes responsables du couplage TCA-OXPHOS. Le coenzyme Q (Q) permet la transition entre les complexes II et III alors que le cytochrome C (C) permet la transition entre les complexes III et IV. L'oxygène, dernier accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire, est réduit en H2O par la cytochrome C oxydase (COX) (complexe IV). Les complexes I, III et IV, en transportant des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire, génèrent un gradient électrochimique de proton qui permet le fonctionnement de la pompe proton ATPase (en violet, F0 : canal protonique ; F1 : activité ATP synthétase). (Extrait de (Simon, 2009))

permis grâce à la navette malate/aspartate ou la navette glycérol phosphate et revêtent un rôle important dans l'interconnexion des voies métaboliques entre elles ou la régulation d'enzymes impliquées dans la régulation génétique ou épigénétique.

a. La chaîne respiratoire

NADH et FADH₂, produits par le TCA, sont ensuite oxydés au niveau de la chaîne respiratoire (ou chaîne de transport des électrons) dans la membrane interne des mitochondries et fournissent ainsi les électrons nécessaires à la production d'ATP mitochondriale (Figure 11). La chaîne respiratoire est constituée de 4 complexes multiprotéiques (I à IV) en plus de l'ATP synthétase. NADH et FADH₂ sont oxydés respectivement au niveau du complexe I ou du complexe II et les électrons libérés suivent alors la chaîne respiratoire jusqu'à la réduction finale de l'O₂ en H₂O. Ce processus, couplé à la translocation de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, permet de faire fonctionner l'ATP synthétase (ou complexe V) (Jonckheere et al., 2012).

b. La fermentation lactique

Alternativement à son entrée dans la mitochondrie, le pyruvate peut être réduit en lactate dans le cytoplasme par la lactate déshydrogénase A (LDHA). La LDH est un complexe tétramérique, dont les monomères peuvent être l'isoforme M (prédominante dans le muscle, codée par *ldh-A*) ou H (prédominante dans le cœur, codée par *ldh-B*). Il existe cinq isoenzymes LDH en fonction du type d'assemblage des isoformes, mais les isoenzymes prédominantes sont les homotétramères LDH5 (ou LDH-A, 4 isoformes M) et LDH1 (4 isoformes H). Les deux isoformes de LDH fonctionnent dans un sens précis : la LDHA catalyse la réduction du pyruvate en lactate d'où son rôle important dans les muscles et autres tissus glycolytiques, alors que la LDHB favorise à l'inverse l'oxydation du lactate en pyruvate. La LDHB est notamment importante dans les cellules du foie spécialisée dans la néoglucogenèse (Dawson et al., 1964), ou dans les cellules utilisant le lactate comme carburant de la respiration mitochondriale.

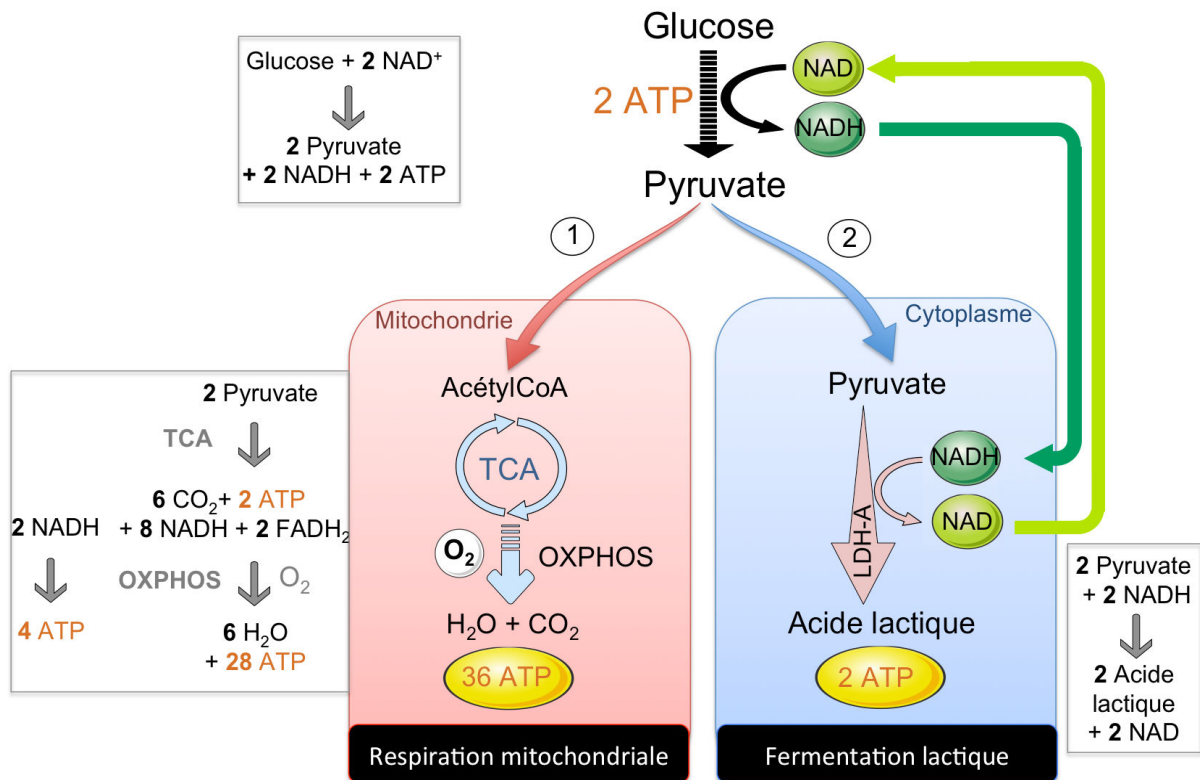


Figure 12 : Bilan énergétique de la glycolyse et la respiration mitochondriale

Au cours de la glycolyse anaérobie, le glucose est converti en pyruvate, générant 2 ATP et 2 NADH. Le pyruvate a ensuite deux alternatives, soit entrer dans la mitochondrie pour être incorporé dans le TCA (cycle tricarboxylique) et fournir NADH et FADH₂ substrats de l'OXPHOS (phosphorylation oxydative) (1), soit être converti en acide lactique dans le cytoplasme, ce qui ne fournit pas d'énergie supplémentaire mais permet de régénérer le NAD pour maintenir un flux glycolytique élevé (2). L'entrée du pyruvate dans l'une ou l'autre des voies conduit à un bilan énergétique différent, de 36 ATP/glucose pour la respiration ou de 2ATP/glucose pour la fermentation lactique.

c. Bilan énergétique

La fermentation lactique ne produit pas d'énergie cellulaire et consomme, en plus, du pouvoir réducteur sous forme de NADH. Cependant, elle permet de régénérer le NAD, qui peut être de nouveau utilisé par la GAPDH, et permet ainsi d'entretenir le flux glycolytique (Figure 12). Le bilan final de la glycolyse (glycolyse anaérobie + fermentation lactique) s'élève donc à 2 ATP.

Au niveau du cycle de Krebs, pour chaque molécule de glucose faisant tourner deux fois le cycle, sont produits 2 ATP (équivalents GTP), 8 NADH et 2 FADH₂. Chaque NADH permet la production de 3 ATP (24 ATP/glucose), alors que chaque FADH₂ en produit 2 (4 ATP/glucose). Notons que les 2 NADH produits au cours de la glycolyse anaérobie ne sont alors pas consommés par la respiration et peuvent fournir 4 ATP (6 ATP produits auxquels il faut retrancher 2ATP pour le transport du cytoplasme vers la mitochondrie).

Le bilan final de la respiration est donc 18 fois supérieur à celui de la glycolyse. En tenant compte de l'énergie transférée d'une molécule de glucose aux molécules d'ATP, on peut estimer un rendement de la glycolyse de 2%, contre un rendement de la respiration de 37%. Comme nous l'avons énoncé précédemment, la glycolyse possède néanmoins certains avantages importants : c'est une suite de réactions d'une vitesse incomparable qui ne nécessite pas d'oxygène pour fonctionner et qui produit des intermédiaires métaboliques importants.

B. HIF1 et le métabolisme tumoral

Le métabolisme d'une cellule cancéreuse doit répondre à deux impératifs formant une équation complexe : produire une quantité d'énergie suffisante pour répondre aux besoins exacerbés de la prolifération, et dans un même temps fournir les monomères biosynthétiques requis pour la production *de novo* des cellules filles (acides nucléiques, protéines, lipides membranaires,...).

I. L'effet Warburg et la glycolyse aérobie des cellules tumorales

L'étude du métabolisme tumoral n'est pas un sujet de recherche récent et prend racine dans les travaux menés dans les années 1920 par Otto Heinrich Warburg¹¹, professeur de Hans Adolf Krebs¹². Otto Warburg observe que les tumeurs (ascites) produisent de grandes quantités d'acide lactique comparativement à des tissus non cancéreux (Warburg, 1956b; Warburg et al., 1927). Il s'inspire alors des travaux de Louis Pasteur sur la fermentation des levures qu'il applique aux cellules de mammifère, et en vient aux conclusions que, malgré une présence suffisante d'oxygène, les cellules tumorales fermentent le glucose en acide lactique pour produire de l'énergie. Le grand débat autour du métabolisme tumoral est lancé : pourquoi les cellules cancéreuses privilégient-elles la glycolyse malgré son faible rendement énergétique? Il a émis l'hypothèse que ces changements métaboliques étaient dûs à un défaut des mitochondries des cellules tumorales (Warburg, 1956a). Cette hypothèse a été invalidée depuis, puisque la plupart des tumeurs présentent une respiration mitochondriale fonctionnelle, mais sous-utilisée (Frezza and Gottlieb, 2009).

Une connexion évidente s'est imposée ces dernières années entre l'effet Warburg et l'acquisition des mutations responsables de la transformation des cellules tumorales (Levine and Puzio-Kuter, 2010). Il est d'ailleurs de plus en plus admis que l'altération du métabolisme est une composante essentielle du mode d'action des oncogènes/suppresseurs de tumeurs, et n'est pas une simple conséquence de leurs effets sur le cycle cellulaire et la prolifération. En effet, le métabolisme tumoral

¹¹ Biochimiste Allemand, prix Nobel de médecine (1931) pour « la découverte de la nature et du mode opératoire de l'enzyme respiratoire »

¹² Biochimiste Britannique d'origine Allemande, prix Nobel de médecine (1953) pour la découverte du cycle de Krebs

participerait à la transformation mais également à l'acquisition de résistance à la mort cellulaire (Pecqueur et al., 2013; Tennant et al., 2010).

La transformation tumorale peut engendrer divers effets sur les voies métaboliques en fonction de l'oncogène ou du suppresseur de tumeur impliqué (effets détaillés dans les revues de Levine *et al.* et Galluzzi *et al.* (Galluzzi et al., 2013; Levine and Puzio-Kuter, 2010)). On peut citer l'exemple de l'activation de c-Myc qui induit l'expression des transporteurs de glutamine et rend les cellules dépendantes à la glutaminolyse (Wise et al., 2008) ou la perte de p53 qui rend les cellules sensibles à une carence en sérine (Maddocks et al., 2013). Cependant, l'activation de la plupart des oncogènes tels que Ras, la voie PI3K/AKT/mTOR, Myc, ou la perte des suppresseurs de tumeurs tels que p53 ou PTEN stimulent la glycolyse et conduisent à une « addiction au glucose ». Cette caractéristique des cellules tumorales est exploitée en clinique avec l'utilisation du ¹⁸F-fluorodeoxyglucose(FDG)- Pet Scan, une technique d'imagerie permettant de visualiser l'incorporation d'un analogue radiomarqué du glucose, le FDG, par les cellules tumorales (Gatenby and Gillies, 2004; Vander Heiden et al., 2009). Notons qu'environ 70% des tumeurs fixent le FDG au PET-scan, suggérant que les 30 autres % ne présentent pas une glycolyse exacerbée (tels que la plupart des tumeurs de la prostate (Liu et al., 2010b)), ou seulement à certains stades du développement de la tumeur (Vander Heiden et al., 2009).

En conséquence, la dérégulation du métabolisme énergétique a émergé comme une nouvelle capacité distinctive des cellules cancéreuses (« hallmark ») (Hanahan and Weinberg, 2011), et constitue une perspective de thérapies anticancéreuses ciblées très intéressante et intensivement étudiée à l'heure actuelle (Galluzzi et al., 2013).

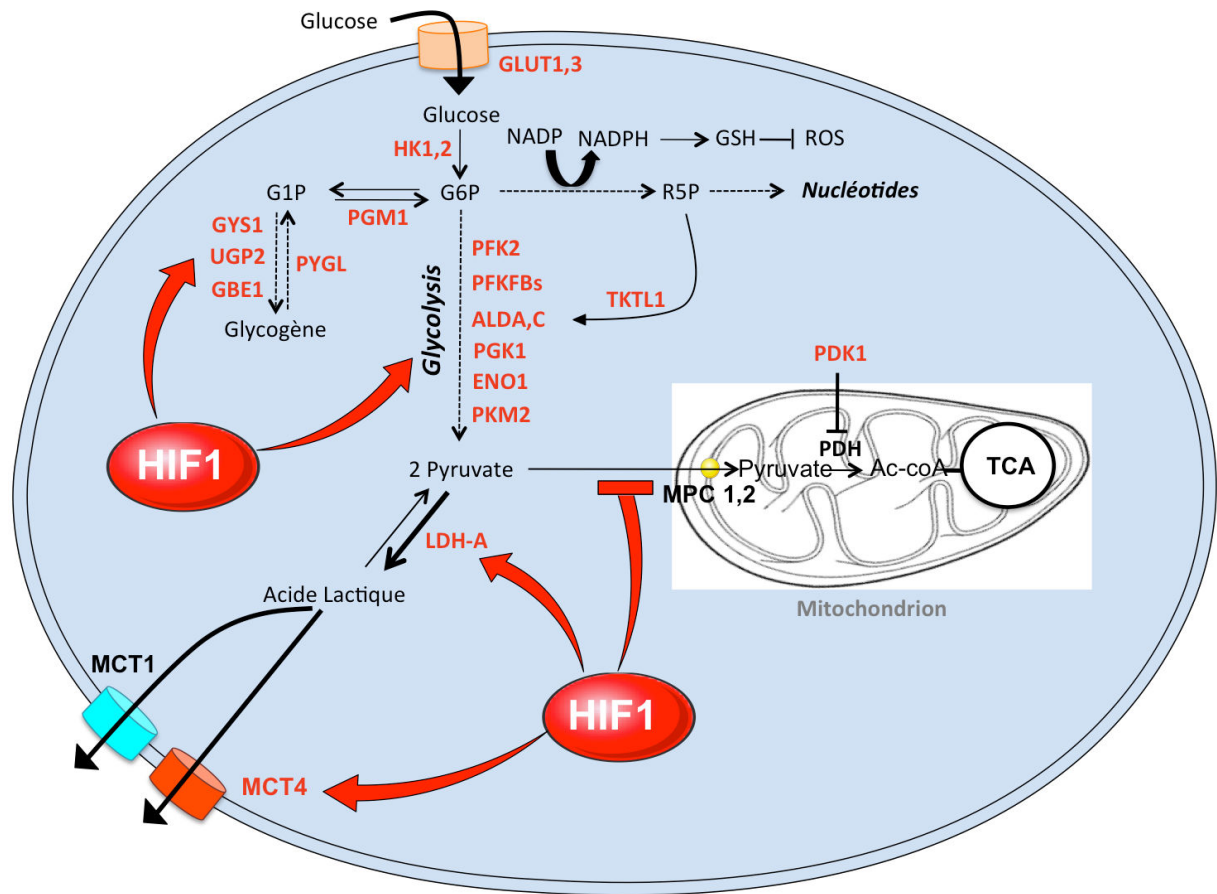


Figure 13 : Régulation du métabolisme du glucose par HIF1.

HIF1 régule la plupart des enzymes de la glycolyse, la synthèse de glycogène et la voie des pentoses phosphates. Il inhibe également la respiration mitochondriale en induisant la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1). Les enzymes induites par HIF1 apparaissent en rouge.

ENO Enolase ; G6P Glucose-6-phosphate ; G1P Glucose-1-phosphate ; GBE Glycogen Branching Enzyme ; GS Glycogen Synthase ; HK Hexokinase ; LDH Lactate Dehydrogénase ; MCT Monocarboxylate transporter ; PDH Pyruvate Dehydrogenase ; PFK Phosphofructokinase ; PGK Phosphoglycératokinase ; PGM Phosphoglucomutase ; R5P Roibose-5-Phosphate ; TKTL Transketolase Ligand ; UGP2 G1P-Uridylyl transférase. (Adapté de (Denko, 2008))

II. HIF et la glycolyse exacerbée en hypoxie

1. HIF et la glycolyse

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1 (Figure 3), HIF1 est responsable d'une reprogrammation métabolique critique dans l'adaptation cellulaire à l'hypoxie. Il a pour conséquence de promouvoir la glycolyse au dépend du TCA par l'intermédiaire de l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles, et accentue encore la dépendance des cellules tumorales à la glycolyse pour produire l'ATP (Figure 13).

Tout d'abord HIF1 induit les transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3, et augmente ainsi le flux entrant de glucose dans la cellule (Chen et al., 2001; Iyer et al., 1998). Il accélère ensuite la conversion du glucose en pyruvate en induisant la plupart des enzymes glycolytiques (Figure 13) (Kroemer and Pouyssegur, 2008; Semenza, 2010). Un tournant majeur dans l'étude du métabolisme en hypoxie a été la découverte de l'action duale de HIF induisant la lactate déshydrogénase-A (LDH-A) (Semenza et al., 1994) et inhibant la pyruvate déshydrogénase par l'induction de la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1)¹³ (Kim et al., 2006). De ce fait, HIF1 inhibe l'entrée de pyruvate dans le TCA et le redirige vers sa conversion en lactate (Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006). L'inhibition du TCA a le principal avantage d'économiser l'oxygène limitant, majoritairement consommé par l'O₂PHOS (Papandreou et al., 2006), le réservant pour d'autres réactions d'oxydation cellulaire essentielles, non productrice d'énergie (Leach and Treacher, 1998).

Notons que Myc et HIF1 partagent au moins cinq cibles majeures dans la glycolyse (GLUT1, HK2, PKM2, LDHA, PDK1) et conduisent à un effet similaire sur le métabolisme tumoral, tout particulièrement *via* leur rôle commun d'« aiguillage » du pyruvate vers sa réduction en lactate, dans le cytoplasme (Dang, 1999; Shim et al., 1997).

¹³ La PDK1 est une des 4 isoformes de PDKs (PDK1-4) qui phosphoryle l'enzyme PDHE1 α du complexe multienzymatique de la PDH et inhibe rapidement son activité. La réaction inverse de déphosphorylation est catalysée par les PDH Phosphatases 1 et 2 (PDP)

2. La synthèse de glycogène et la voie des pentoses phosphates, deux voies interconnectées à la glycolyse induites par HIF1

Le G6P peut alternativement entrer dans la glycolyse, la synthèse de glycogène, ou la voie des pentoses phosphates. Ces trois réactions sont activées par HIF1.

a. HIF1 et la synthèse de glycogène

Le glycogène constitue une des formes les plus importantes de stockage de glucose et d'énergie dans les cellules de mammifères. Les enzymes impliquées dans la synthèse de glycogène sont (1) les phosphoglucomutases, qui déplacent le groupement phosphate du carbone 6 au carbone 1 du glucose produisant alors le G1P, (2) les UDP-glucose-pyrophosphorylases (UGP) qui activent le G1P en UDP-glucose, (3) les enzymes glycogène synthase (GYS) qui allongent le polymère de glycogène, et (4) les enzymes de branchage (GBE ou α 1,4 glucan branching enzyme) qui offrent au glycogène sa structure ramifiée (Figure 14). Des enzymes à chacune de ces étapes sont induites par HIF, que ce soit PGM1, UGP2, GYS1, ou GBE1 (Favaro et al., 2012; Pelletier et al., 2012; Pescador et al., 2010). Il semblerait que PYGL, l'une des 3 phosphorylases existantes qui dépolymérisent le glycogène en G1P, soit également induite en hypoxie (Favaro et al., 2012). Nous discuterons ce point plus tard (Discussion article 2).

b. HIF1 et la voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates est constituée de deux phases : Une première phase dite oxydative suivie d'une seconde phase dite non-oxydative aboutissant au Ribose 5P (R5P). Le R5P peut être utilisé dans la synthèse de nucléotides, ou entrer dans une série de réactions impliquant les transcétolases et transaldolases, qui conduira à la formation de deux intermédiaires de la glycolyse, à savoir le fructose-6-phosphate (F6P) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P). La voie des pentoses phosphates a trois implications physiologiques majeures : (1) elle est essentielle dans la synthèse de nucléotides (2) elle produit du NADPH, substrat de la chaîne respiratoire et cofacteur important dans la réduction du glutathion, antioxydant (réduction du GSSG en GSH), et (3) elle représente une voie alternative permettant de maintenir un flux glycolytique minimum lorsque la phosphoglucoisomérase (PGI) ou la PFK1 sont inactives (en produisant du 3PG). Une étude a récemment démontré dans le contexte des cellules leucémiques que HIF1 inhibe

Transporteur	Gène	Substrats	Km pour le lactate (mM)	activateurs	Distribution tissulaire
MCT1	slc16a1	Lactate, pyruvate et corps cétoniques	3,5-10	Myc, Hypoxie?	Ubiquitaire
MCT2	slc16a7	Lactate, pyruvate et corps cétoniques	0,7		reins et cerveau
MCT3	slc16a8	Lactate	5		épithélium pigmentaire de la rétine
MCT4	slc16a3	Lactate	22-35	HIF1 méthylation du promoteur	muscles squelettiques, leucocytes, testicules, cœur, foie, placenta

Table 2 : Caractéristiques et propriétés des 4 transporteurs de la famille des MCTs qui catalysent le co-transport de protons et de monocarboxylates métaboliquement importants

la phase oxydative de la voie et augmente la phase non-oxydative par l'induction de la transcétolase (TKT) (Zhao et al., 2010).

III. Les transporteurs de monocarboxylates, à l'interface entre le métabolisme cellulaire et la régulation du pH intracellulaire

Le métabolisme glycolytique produit intensivement de l'acide lactique. Au vu du pKa¹⁴ de celui-ci (pKa=3,86), l'acide lactique est presque entièrement dissocié en ion lactate et proton dans des pH physiologiques (2000 fois plus de lactate que d'acide lactique à un pH=7,2) (Parks et al., 2013a). A l'inverse de l'acide lactique, le lactate chargé négativement ne peut pas diffuser librement à travers la membrane et nécessite un transport spécifique assuré par les transporteurs de monocarboxylates (MCTs). (Halestrap and Price, 1999; Mathupala et al., 2007; Poole and Halestrap, 1993).

La famille des MCTs comprend 14 membres, mais seulement 4 d'entre eux (MCT1-4) catalysent le co-transport de protons et de monocarboxylates métaboliquement importants, tels que le lactate, le pyruvate et les corps cétoniques (Halestrap and Meredith, 2004) (Table 2). Le co-transport lactate/proton permet à la fois de maintenir le flux glycolytique et de réguler le pH intracellulaire.

Les transporteurs MCTs sont des protéines à 12 domaines transmembranaires (Figure 14) (Halestrap and Price, 1999; Poole et al., 1996). Ils possèdent des distributions tissulaires et des Km différents pour les monocarboxylates, ce qui leur confèrent des fonctions différentes (Table 2). Notons que ces transporteurs sont bidirectionnels, la direction du transport dépendant à la fois du gradient de concentration du substrat et des protons entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. MCT1, ubiquitaire, et MCT4 induit en hypoxie, sont les deux isoformes majeures, représentant comme nous allons le voir des cibles thérapeutiques particulièrement intéressantes dans le cadre du cancer. Il faut noter que MCT1 et MCT4 nécessitent la protéine d'ancrage CD147 (également appelée Basigine ou EMPRINN) pour être exprimés et fonctionnels à la membrane (Halestrap and Price, 1999; Kirk et al., 2000; Le Floch et al., 2011; Pinheiro et al., 2012).

¹⁴ Le pKa représente le pH auquel la forme acide de la molécule est présente à la même concentration que sa forme basique. Plus le pH est supérieur au pKa, et plus la molécule se retrouve dans une forme dissociée (Base+H⁺).

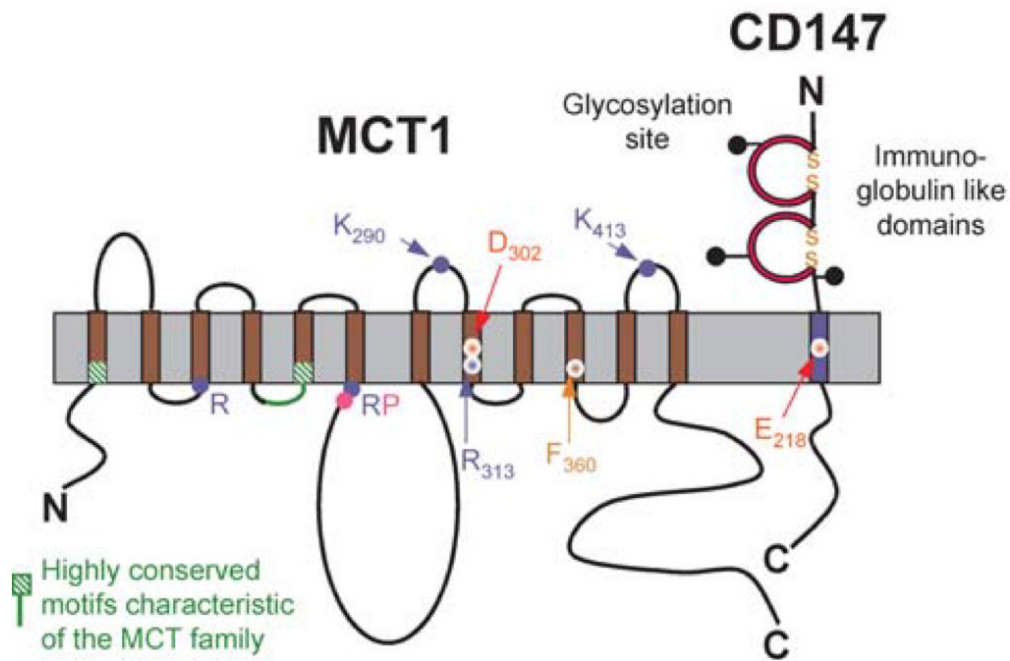


Figure 14 : Représentation topologique des MCTs

La séquence présentée est la séquence de MCT1. Les MCTs possèdent des régions N- et C-terminales intracellulaires, 12 domaines transmembranaires, et une large boucle intracellulaire entre les domaines transmembranaires 6 et 7. MCT1 et MCT4 nécessitent la protéine d'ancrage CD147 (basigine) pour être exprimée de manière fonctionnelle à la membrane. L'interaction de MCT1/4 avec la basigine se fait au niveau du domaine transmembranaire 8 (point orange). (Extrait de (Halestrap and Meredith, 2004)).

3. *MCT1, la forme ubiquitaire des MCTs*

MCT1 est ubiquitaire et présente une forte affinité pour le lactate (Km compris entre 3,5 et 10mM) (Halestrap and Price, 1999). En conséquence, il peut évacuer d'infimes quantités de lactate, mais se retrouve vite saturé lorsque ce dernier est produit en grande quantité (tissus glycolytiques). A ce titre MCT1 peut être considéré comme une « isoforme de ménage » permettant de maintenir un métabolisme de base, peu soutenu dans les cellules oxydatives. Il serait également impliqué dans la recapture de l'acide lactique (que l'on verra un peu plus loin).

MCT1 est également une cible transcriptionnelle de Myc et joue ainsi un rôle important dans la transformation maligne. En effet, l'équipe de J.L. Cleveland a observé une corrélation entre l'expression élevée de Myc et celle de MCT1 dans plusieurs types de tumeurs (lymphomes, neuroblastomes, adénocarcinomes de colon, etc), et montré dans un modèle de souris transgéniques E μ -Myc¹⁵ que *Mct1* est sous le contrôle de Myc en raison de la présence de deux E-box dans son promoteur (Doherty et al., 2013).

4. *MCT4, l'isoforme adaptée pour les tissus glycolytiques*

MCT4 possède une affinité 10 fois plus faible pour le lactate que MCT1 (Km entre 22 et 35mM). En conséquence il est difficilement saturable et est parfaitement adapté au transport de lactate dans les tissus fortement glycolytiques. Il n'est donc pas étonnant de le retrouver dans des tissus tels que les muscles ou les tumeurs (Deuticke, 1982; Dimmer et al., 2000; Wilson et al., 1998).

Mct4 est une cible transcriptionnelle de HIF1 (Ullah et al., 2006). Ainsi, HIF1 promeut non seulement la production mais également l'évacuation de l'acide lactique, et empêche ainsi l'accumulation de lactate délétère pour de nombreuses fonctions cellulaires (Parks et al., 2013a).

Une étude récente a mis en évidence une régulation épigénétique de MCT4 dans les cancer du rein à cellules claires (ccRCC) (Fisel et al., 2013). Cette étude, réalisée sur trois cohortes indépendantes de patients (773 patients au total), établit une corrélation

¹⁵ Souris transgéniques contractant des lymphomes spontanés en raison de l'expression de l'oncogène c-Myc sous le contrôle du promoteur de l'immunoglobuline.

inverse entre l'expression protéique de MCT4 (analysée par immunohistochimie) et l'état de méthylation de son promoteur. Ils ont confirmé *in vitro* que les méthylations du promoteur du gène de *mct4* inhibent sa transcription et montré qu'elles constituent un facteur de bon pronostic en clinique. On peut penser que la méthylation du promoteur de *mct4* pourrait être une des modifications épigénétiques responsables de son expression spécifique dans certains tissus. Par ailleurs, les ccRCC expriment constitutivement HIF2 et souvent HIF1 en raison d'une mutation dans *pVHL*, et il serait intéressant de déterminer si HIF1/2 jouent un rôle indirect dans la méthylation de *mct4*.

5. Les MCTs et la communication métabolique intercellulaire

Certains tissus (foie, rein et tissus adipeux) utilisent l'acide lactique comme substrat de la néoglucogenèse ou de la synthèse des lipides, et dépendent pour cela de l'expression de MCT1 ou MCT2 (Halestrap and Price, 1999; Halestrap and Meredith, 2004). Le lactate, importé *via* MCT1 principalement, peut également être utilisé comme une source énergétique dans les tissus fortement oxydatifs, tels que le cœur, les fibres musculaires oxydatives ou les neurones (Halestrap and Price, 1999; Bergersen, 2007; Halestrap and Meredith, 2004). Ces cellules doivent alors posséder l'isoforme LDH-B pour pouvoir oxyder le lactate en pyruvate.

Plusieurs études récentes indiquent l'existence de coopérations métaboliques entre plusieurs sous-types de cellules au sein d'un même tissu, coopérations rendues possibles grâce aux MCTs (Bergersen, 2007; Brooks, 2009; Pellerin et al., 1998; Sonveaux et al., 2008). Il existerait par exemple une coopération entre fibres musculaires glycolytiques (« muscles blancs ») et oxydatives (« muscles rouges »)(Brooks, 2009), de même qu'entre astrocytes (glycolytiques) et neurones (oxydatifs) (Bergersen, 2007; Pellerin et al., 1998). Dans ces modèles, la cellule glycolytique exporte le lactate *via* MCT4, qui est ensuite recapté *via* MCT1, ou MCT2 dans les tissus oxydatifs pour servir de carburant au cycle de Krebs. Au sein de la tumeur, deux modèles basés sur le même rationnel ont été suggérés :

- le premier modèle concerne une symbiose métabolique entre cellules tumorales et cellules du stroma. Le lactate, rejeté par les cellules tumorales et incorporé par les cellules stromales, pourrait alors y jouer un rôle de substrat métabolique ou de molécule

de signalisation. Il a, par exemple, été démontré que l'influx de lactate dans les cellules endothéliales, *via* MCT1, stimule l'angiogenèse de manière dépendante de la voie NFκB-IL8 (Vegran et al., 2011).

- un second modèle fait état d'une collaboration métabolique entre les cellules tumorales au sein d'un gradient d'oxygène (Sonveaux et al., 2008). Le lactate, qui est produit en grande quantité par les cellules hypoxiques éloignées du réseau vasculaire, serait recapté et métabolisé *via* le TCA par les cellules normoxiques oxydatives situées proches des vaisseaux. En utilisant préférentiellement le lactate au glucose, elles laisseraient ce dernier disponible pour les cellules hypoxiques. Ce dernier modèle est quelque peu controversé, et va à l'encontre de l'effet Warburg, c'est-à-dire de la préférence des cellules tumorales pour le métabolisme glycolytique en présence ou en absence d'oxygène.

6. Le lactate, un acteur important du développement tumoral

Le lactate produit par la glycolyse (et d'une façon mineure par la dégradation de la glutamine et de la sérine (Mazurek et al., 2000)), joue un rôle important dans la dynamique tumorale, l'agressivité des tumeurs, ainsi que l'acquisition de résistances aux chimio/radiothérapies (Gatenby and Gillies, 2004; Quennet et al., 2006). Une corrélation a été établie entre des niveaux d'acide lactique élevés au sein de la tumeur et l'incidence des métastases dans plusieurs types de cancers, notamment ORL (Brizel et al., 2001; Schwickert et al., 1995; Walenta et al., 1997). Cela peut être dû aux effets promoteurs du lactate sur le VEGF et l'angiogenèse (Kumar et al., 2007), la migration (Walenta et al., 2002), et l'invasion cellulaire (Stern et al., 2002). Il est cependant difficile de disséquer les effets propres au lactate des effets dûs à l'acidification du microenvironnement tumoral, dont certains des effets observés ci-dessus peuvent lui être attribués.

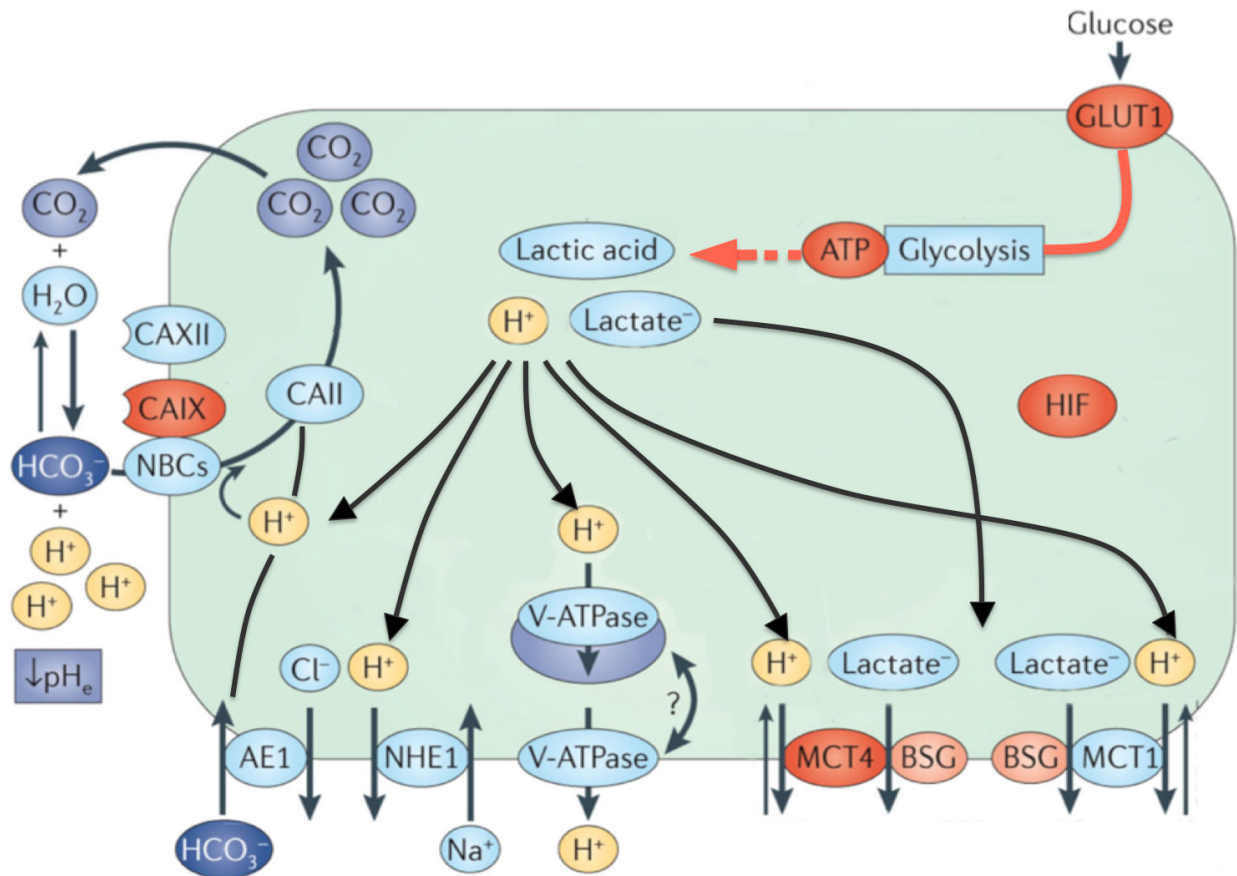


Figure 15 : Représentation des systèmes de régulation du pH intracellulaire des cellules tumorales

Le maintien d'un flux glycolytique élevé dans les cellules tumorales nécessite un export constant des protons pour éviter une acidose délétère. Le système de régulation du pH intracellulaire comprend les transporteurs de monocarboxylates (MCT1 et MCT4), l'échangeur sodium/proton (NHE1), les anhydrases carboniques (CAII, CAIX, et CAXII), les co-transporteurs sodium/bicarbonates (NBCs), l'échangeur d'anions (AE1), et potentiellement la pompe protons ATPase (V-ATPase). Les cibles de HIF sont indiquées en rouge, à savoir le transporteur de glucose GLUT1, les enzymes de la glycolyse, l'export d'acide lactique par MCT4, et de protons *via* CAIX. (Adapté de (Parks et al., 2013)).

IV. HIF1 et la régulation du pH intracellulaire

1. Nécessité des cellules tumorales à maintenir un pH intracellulaire alcalin

Le pH intracellulaire (pHi) physiologique d'une cellule normale, respiratoire, est compris entre 7 et 7,2 alors que le pH extracellulaire moyen se situe autour de 7,3-7,4. Dans des tumeurs hautement glycolytiques, les systèmes de régulation du pH protègent de l'acidose cytoplasmique, délétère, en expulsant les espèces acides à l'extérieur de la cellule. En conséquence, le pH extracellulaire (pHe) devient beaucoup plus acide (6,2-6,9) alors que le pHi reste neutre à légèrement alcalin (7,1-7,6) (Cardone et al., 2005).

L'induction de la glycolyse par HIF1 ne serait pas viable sans un contrôle strict du pH intracellulaire. Le pHi influe directement sur la glycolyse et la production d'ATP. L'hexokinase (Wohlhueter and Plagemann, 1981) et la PFK (Buckwitz et al., 1988; Spriet, 1991), enzymes critiques de la glycolyse, sont particulièrement sensibles à un pH acide. Notons également que la S6 kinase, protéine majeure dans la synthèse protéique (que l'on introduira plus en détails dans le prochain chapitre : III-C-3), est fortement inhibée suite à l'altération des systèmes de régulation du pH (Chambard and Pouyssegur, 1986), de même que la progression du cycle cellulaire et la prolifération (L'Allemain et al., 1984; Pouyssegur et al., 1984), la migration et la survie cellulaire (Roos and Boron, 1981).

Parmi les systèmes de régulation du pHi, on trouve les MCTs, la famille d'échangeurs sodium/protons (Na^+/H^+ Exchanger, NHE) régulés par les facteurs de croissance (Sardet et al., 1989), la pompe H^+ -ATPase de type vacuolaire (V-ATPase) exportant activement les protons¹⁶ (Gluck et al., 1992), les transporteurs sodium/bicarbonates ($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporters, NBCs), et l'échangeur chlore/bicarbonates ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, AE) (Figure 15).

HIF1 contrôle MCT4 mais agit également directement ou indirectement sur plusieurs de ces autres régulateurs du pH, que nous allons détailler ci-dessous.

¹⁶ Elle exporte deux protons après la consommation de chaque molécule d'ATP.

2. HIF1 et les anhydrases carboniques CAIX et CAXII

Les anhydrases carboniques (CA) forment une superfamille comprenant 16 isoformes qui catalysent l'hydratation réversible du CO₂ en HCO₃⁻ et H⁺, et sont majoritairement impliquées dans les échanges gazeux (voire pour revue (Supuran, 2008)). Elles peuvent être ancrées dans les membranes plasmiques, cytoplasmiques, mitochondriales ou bien sécrétées.

Les gènes *ca12* mais surtout *ca9* sont très fortement induits par HIF1 (Svastova et al., 2004; Wykoff et al., 2000). CAIX et CAXII sont membranaires et leur site catalytique est orienté vers l'extérieur de la cellule. Ainsi, le CO₂, produit par la respiration cellulaire et qui diffuse librement à l'extérieur de la cellule, est hydraté en protons et ions bicarbonates (HCO₃⁻). Cette action participe à l'acidification du milieu extracellulaire (Svastova et al., 2004), mais a également été montrée comme régulateur du pHi (Chiche et al., 2009; Parks et al., 2011; Parks et al., 2013b; Swietach et al., 2010; Swietach et al., 2009). Dans notre laboratoire, a été proposé un modèle basé sur un couplage de la production de HCO₃⁻ par CAIX/CAXII, avec son import par les transporteurs sodium/bicarbonates. Une fois dans la cellule, dans une réaction inverse des CA extracellulaires, CAII cytoplasmique peut déshydrater HCO₃⁻ en CO₂, en captant un proton intracellulaire (Figure 15) (Pouyssegur et al., 2006). Notre équipe a pu démontrer que l'implication de CAIX et CAXII, dans la régulation du pHi, est importante dans la prolifération des fibroblastes et des cellules tumorales hypoxiques (Chiche et al., 2009; Parks et al., 2011), et augmente la sensibilité à la radiothérapie (Doyen et al., 2013; Dubois et al., 2011).

Une attention toute particulière doit être donnée à CAIX puisque cette isoforme est retrouvée très peu fréquemment dans les tissus sains (dans certaines parties du tractus gastrointestinal), mais s'exprime dans de nombreux tissus tumoraux, probablement en raison de son induction hypoxique mais également de l'avantage sélectif qu'elle confère aux cellules tumorales qui l'exprime (Parks et al., 2013a). CAIX représente une cible thérapeutique particulièrement intéressante et fait l'objet d'une intense recherche autour du développement d'inhibiteurs spécifiques (Neri and Supuran, 2011).

3. NHE1 activé en hypoxie indépendamment de HIF1 ?

Parmi la famille des échangeurs antiport Na^+/H^+ qui comprend 9 membres, NHE1 a été le plus étudié dans le contexte tumoral. Le laboratoire de J. Pouyssegur a largement contribué à la connaissance que l'on a de ce transporteur (voir (Parks et al., 2013a) pour revue). Les facteurs de croissance, ou la transformation par les oncogènes, augmentent l'affinité de NHE1 pour les protons et l'activité du transporteur, ce qui explique en partie l'alcalinisation du pHi observée dans les cellules tumorales (L'Allemain et al., 1984; Paris and Pouyssegur, 1984; Reshkin et al., 2000). NHE1 est particulièrement important dans les cellules glycolytiques (Pouyssegur et al., 2001), tumorales ou non, puisqu'il répond très rapidement à une acidification du pHi en échangeant un proton contre un ion sodium. NHE1 est un transporteur électro-neutre qui ne consomme pas d'énergie puisque les ions sont transportés selon leur gradient. Son implication dans la migration cellulaire et la formation des métastases a récemment été démontré dans le cancer du sein (Amith and Fliegel, 2013; Loo et al., 2012). La régulation de NHE1 en hypoxie est quelque peu controversée dans la littérature. En effet, l'expression et l'activité de NHE1 ont été montrées comme augmentées dans des muscles lisses des artères pulmonaires en réponse à une hypoxie prolongée (Rios et al., 2005), de manière HIF1 dépendante (Shimoda et al., 2006). Cependant, une autre étude suggère que le différentiel d'expression de NHE1 est tissu-spécifique (Hulikova et al., 2012). Il est raisonnable de penser que, même si son expression n'est pas augmentée en hypoxie, la production de protons par la glycolyse exacerbée en hypoxie puisse augmenter son activité.

En conclusion, les cellules tumorales hypoxiques doivent adapter leur métabolisme pour faire face à un accès restreint à l'oxygène et survivre dans de telles conditions drastiques. Cibler la reprogrammation métabolique en hypoxie et particulièrement le métabolisme des carbohydrates exacerbé apparaît alors comme une perspective prometteuse.

Chapitre 3 : AMPK, gardien de la balance énergétique cellulaire

A. Concept de kinase et introduction à l'AMPK

I. Les kinases et la phosphorylation

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle des protéines centrale dans la signalisation et la régulation de presque tous les aspects de la vie cellulaire (Cohen, 2002). Elle est caractérisée par l'addition d'un groupement phosphate sur un ou plusieurs acide(s) aminé(s) d'une protéine et est catalysée par les kinases, à l'inverse de la déphosphorylation catalysée par les phosphatases. C'est un système de régulation immédiat, flexible et réversible impliqué dans la plupart des fonctions cellulaires telles que le contrôle de la division cellulaire, le métabolisme, le réarrangement du cytosquelette, la différenciation, ou encore l'apoptose (Manning et al., 2002b).

Les kinases ont la capacité intrinsèque de catalyser le transfert du groupement phosphate en position γ d'une molécule d'ATP vers trois acides aminés chez les mammifères : la tyrosine, la sérine et la thréonine, acides aminés polaires possédant une fonction alcool ($\text{CH}_x\text{-OH}$) (Cohen, 2000; Ubersax and Ferrell, 2007). Les kinases peuvent ainsi avoir toutes les répercussions imaginables sur ses protéines cibles pouvant aboutir à un effet activateur ou inhibiteur de celles-ci. Elles peuvent modifier leur structure ou leur conformation, leur stabilité, leur association avec d'autres protéines, leur activité intrinsèque, ou encore leur localisation subcellulaire. L'identification des gènes codant l'ensemble des protéines kinases (ou kinome) a permis de mettre en évidence l'existence de 518 gènes non redondants, soit environ 1,7% du génome, qui codent pour des kinases (Manning et al., 2002c).

L'étude des kinases est un champ de recherche majeur en cancérologie. Le développement et le relatif succès des inhibiteurs de tyrosine kinases, de B-RAF^{V600E}/MEK, ou de la mammalian target of rapamycine (mTOR) en sont des parfaites illustrations (Druker, 2002; Flaherty et al., 2010; Owonikoko and Khuri, 2013).

II. Découverte de l'AMPK

La 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) fait partie de la classe des sérine/thréonine kinases et est impliquée dans la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR. Elle est aujourd'hui considérée comme un acteur majeur dans l'homéostasie énergétique, tant au niveau cellulaire qu'au niveau de l'organisme entier, coordonnant prise alimentaire et besoins énergétiques. La découverte de cette kinase et de son rôle majeur est relativement récente. Du fait du grand nombre de protéines qu'elle régule, elle a été identifiée plusieurs fois, avec des approches différentes. Les premières observations expérimentales de l'AMPK ont été réalisées par deux laboratoires distincts en 1973. Z.H Beg *et al.* ont remarqué que la protéine HMG-CoA réductase, impliquée dans la synthèse du cholestérol et purifiée à partir de foie de rat, était inhibée par un facteur cytosolique et des concentrations croissantes d'ATP (Beg et al., 1973). La même année, Carlson & Kim ont démontré qu'une enzyme impliquée dans la synthèse de lipides, dénommée acétylCoA carboxylase (ACC), était elle aussi inactivée par une kinase présente dans la préparation (Carlson and Kim, 1973).

Il faut attendre 1987, soit 14 ans plus tard, pour que l'équipe de D.G. Hardie démontre que les kinases responsables de l'inhibition de l'HMG-CoA réductase et de l'ACC sont en fait une seule et même kinase (Carling et al., 1987), et 1989 pour que le nom d'AMPK lui soit donné. Le clonage des différentes sous-unités de l'AMPK entre 1994 et 1996 (Carling et al., 1994; Gao et al., 1996; Gao et al., 1995; Stapleton et al., 1994; Woods et al., 1996) a ensuite été un puissant moteur dans l'étude de la structure, la régulation, et l'activité de l'AMPK.

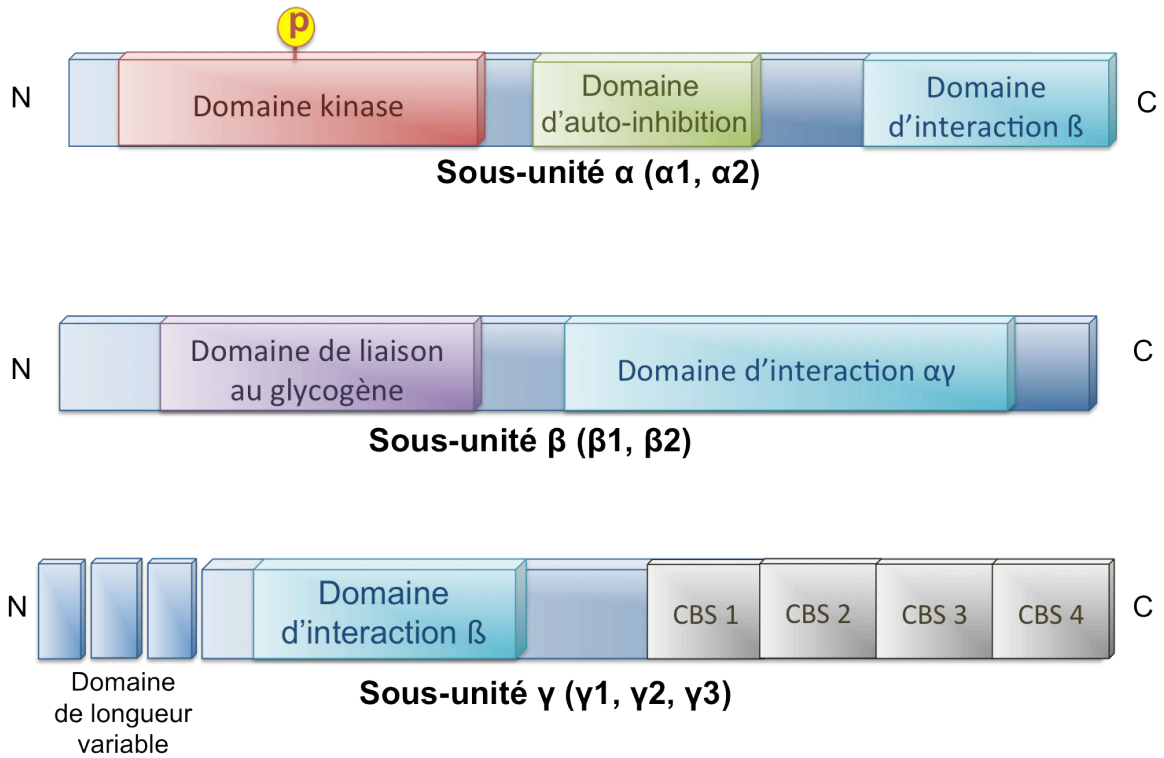


Figure 16 : Structure du complexe AMPK

L'AMPK est un complexe hétérotrimérique constitué d'une sous-unité catalytique AMPK α et de deux sous-unités régulatrices AMPK β et AMPK γ . Les isoformes α ($\alpha 1/\alpha 2$) ou β ($\beta 1/\beta 2$) possèdent une structure proche, alors que les isoformes γ ($\gamma 1/\gamma 2/\gamma 3$) ont un domaine N-terminal de longueur variable. (Adapté de (Hardie, 2007)).

B. AMPK, structure et activité

I. AMPK, un complexe hétérotrimérique

1. Composition du complexe

L'AMPK est une protéine hautement conservée au cours de l'évolution des eucaryotes. Elle est présente chez les levures (Sucrose non-fermenting 1 ou SNF1), les plantes (SNF1 related kinases) et les mammifères (AMPK)(Hardie, 2000). L'AMPK et ses orthologues existent sous la forme d'un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité régulatrice α et de deux sous-unités régulatrices β et γ (Figure 16)(Kahn et al., 2005). Chaque sous-unité est présente sous différentes isoformes codées par des gènes distincts. Chez les mammifères, il existe les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (codés respectivement par *prkaa1* et *prkaa2*), $\beta 1$ et $\beta 2$ (codés par *prkab1* et *prkab2*), ainsi que $\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\gamma 3$ (codés par *prkag1*, *prkag2* et *prkag3*). Dès lors, 12 complexes $\alpha\beta\gamma$ peuvent potentiellement être formés. Cependant, l'existence de ces complexes est dictée par l'expression tissulaire de chaque isoforme (Hardie, 2007; Mahlapuu et al., 2004; Salt et al., 1998). Le complexe $\alpha 2\beta 2\gamma 3$ est, par exemple, le complexe majoritairement exprimé dans les muscles striés squelettiques, en raison de la prépondérance de ces trois isoformes dans ces tissus (Mahlapuu et al., 2004). On pourrait également imaginer des propriétés ou des fonctions spécifiques de certains complexes mais cela reste à l'heure actuelle totalement hypothétique.

2. Sous-unités α

Les sous-unités α sont constituées du domaine catalytique dans la région N-terminale, d'un domaine d'auto-inhibition, ainsi que d'un domaine C-terminal d'interaction avec la sous-unité β . L'AMPK α possède dans son domaine catalytique le site de fixation de l'ATP nécessaire à son activité kinase. La plupart des kinases, pour être actives, nécessitent l'activité en amont d'une autre kinase qui phosphoryle un résidu de la boucle d'activation du domaine catalytique. C'est également le cas de l'AMPK qui requiert la phosphorylation du résidu thréonine 172 (Thr172) pour présenter une activité significative (Hawley et al., 1996). Les kinases impliquées dans cette

phosphorylation seront décrites dans le Chapitre 3-B-III. Les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ présentent des expressions tissulaires et subcellulaires différentes. La sous-unité $\alpha 1$ est fortement exprimée dans les poumons, les reins, ou le tissu adipeux alors que la sous-unité $\alpha 2$ est plutôt spécifique du cœur et des muscles striés squelettiques. Il est intéressant de noter qu'à la différence de l'AMPK $\alpha 1$ exclusivement cytoplasmique, l'AMPK $\alpha 2$ est à la fois cytoplasmique et nucléaire lui permettant de réguler des facteurs de transcription, tel que le sterol regulatory element binding protein (SREBP1) et le carbohydrate regulatory element binding protein (ChREBP) impliqués dans la lipogenèse et la néoglucogenèse (Foretz et al., 2005 ; Kawaguchi et al., 2002 ; Koo et al., 2005).

3. Sous-unités β

Les sous-unités β possèdent dans leur région C-terminale deux domaines d'interactions, un avec la sous-unité α et l'autre avec la sous-unité γ . Cela leur confère un rôle de protéine d'échaffaudage nécessaire à la formation du complexe. En plus de son rôle de soutien, la sous-unité β possède un domaine de liaison au glycogène dans sa région N-terminale, (Hudson et al., 2003; Polekhina et al., 2003; Polekhina et al., 2005). La fonction physiologique de ce domaine est encore mal comprise et sera discutée plus tard dans cette introduction (Cf chapitre 3-C-I.). La sous-unité $\beta 1$ est constitutivement exprimée alors que la sous-unité $\beta 2$ est la sous-unité majoritairement exprimée dans les muscles squelettiques (Koay et al.).

4. sous-unités γ

Les sous-unités γ jouent un rôle crucial dans l'activité de l'AMPK puisqu'elles sont responsables de sa régulation par les niveaux d'ATP, d'ADP et d'AMP. Elles possèdent un site de fixation à la sous-unité β dans leurs régions N-terminales, ainsi que des sites de liaison aux adénosines, conférant à l'AMPK son rôle de senseur du niveau d'énergie cellulaire (Figure 16). Ces sites de liaison se présentent sous la forme d'une répétition en tandem, de quatre séquences d'environ 60 acides aminés, appelés motifs cystathionine- β -synthase (CBS). Les CBS fonctionnent par paire, et chaque paire forme un domaine « Bateman », nom du chercheur qui l'a découvert (Bateman, 1997). Selon les études

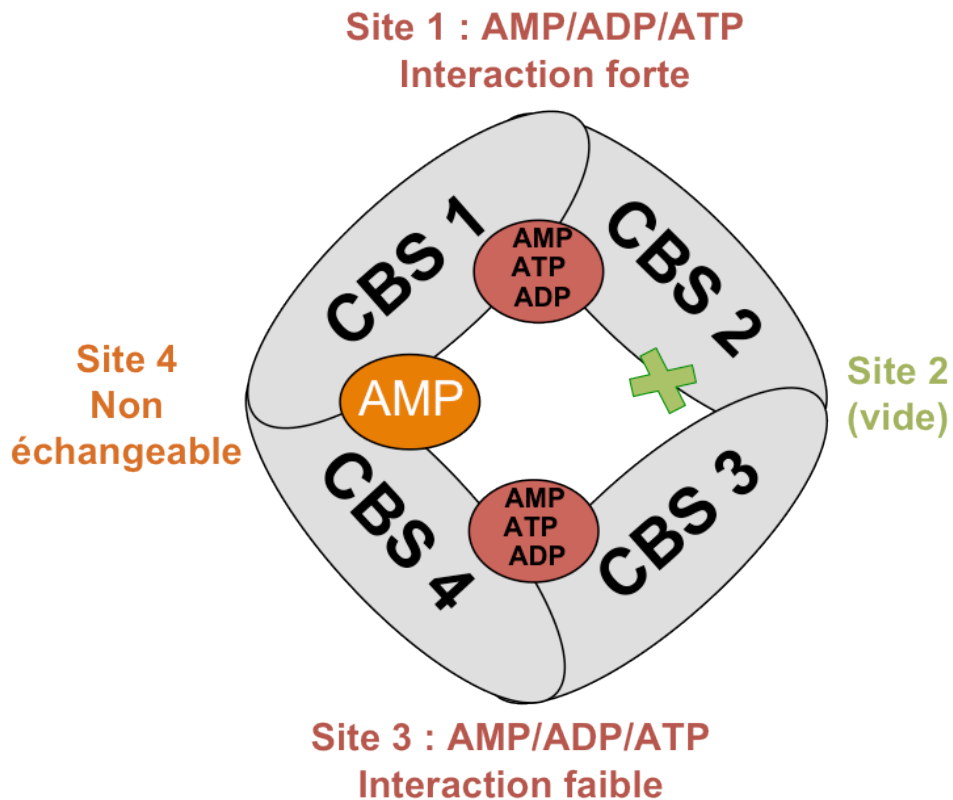


Figure 17 : Représentation de l'agencement des motifs CBS et des sites de liaison à l'ATP/ADP/AMP

La sous-unité γ est constituée de deux paires de motifs CBS (domaines « Bateman ») s'associant de façon « tête-bêche », et formant ainsi quatre sites potentiels de liaison des nucléotides. Le site 4 est occupé en permanence par une molécule d'AMP alors que le site 2 est vide. Le site 1 et le site 3 sont des sites où peuvent se fixer AMP/ADP/ATP de façon réversible et interchangeable en fonction de la concentration de chaque nucléotide formé d'adénosine. (Adapté de (Carling et al., 2011)).

cristallographiques réalisées sur le complexe hétérotrimérique de SNF1 et de l'AMPK humaine, ces deux domaines « Bateman » s'associent de manière « tête-bêche » et forment ainsi quatre cavités où peuvent théoriquement se loger AMP, ADP et ATP (Figure 17) (Amodeo et al., 2007; Hardie et al., 2011; Xiao et al., 2007).

En réalité, le site de liaison numéro 2 est inactif chez les mammifères¹⁷ (Xiao et al., 2007). Le site numéro 4 (entre CBS 3-4), est, quant à lui, constamment occupé par l'AMP, en raison d'une très forte affinité pour celle-ci, et ne peut être échangé par une molécule d'ATP ou d'ADP, dans des conditions physiologiques (Kemp et al., 2007; Xiao et al., 2007). Ce site serait hypothétiquement impliqué dans la stabilisation de la sous-unité γ , mais sa fonction réelle reste à l'heure actuelle incertaine. Il reste donc, chez l'AMPK γ de mammifère, deux sites fonctionnels où peuvent se fixer les nucléotides : le site 1 de haute affinité pour les nucléotides (constante de dissociation (Kd) comprise entre 1 et 3 μM) et le site 3 de basse affinité pour les nucléotides (Kd comprise entre 50 et 80 μM) (Xiao et al., 2011). Notons que chez les mammifères, γ 1, γ 2, et γ 3 possèdent une région N-terminale de taille variable dont la fonction n'est pas élucidée.

II. Activité de l'AMPK

L'AMPK est probablement l'une des kinases les plus complexes d'un point de vue de la régulation de son activité. Il existe, de fait, plusieurs niveaux de régulation de l'AMPK : l'activation allostérique de l'AMPK, la phosphorylation du résidu Thr172 de la sous-unité α et la protection de la Thr172 contre la déphosphorylation (Figure 18).

1. AMP et ATP, effecteurs allostériques de l'AMPK

L'AMPK, ou AMP-Kinase, doit son nom à la découverte de sa régulation allostérique¹⁸ par l'AMP. L'AMP (à la différence de l'ADP ou l'ATP) est aujourd'hui le seul activateur allostérique connu de l'AMPK. Cette activation fait intervenir les sites de fixation 1 et 3 de la sous-unité γ (cf paragraphe précédent). La fixation d'une première molécule d'AMP sur le site 1, hautement affin, va modifier la conformation du site 3, et

¹⁷ En raison d'une mutation d'un groupement aspartate sur le site du CBS 2, qui empêche l'interaction avec le groupement ribose des adénosines

¹⁸ Mode de régulation de l'activité d'enzymes spécifiques (possédant des structures quaternaires) par lequel la fixation d'une molécule (effecteur allostérique) modifie la fixation d'une autre molécule sur un second site, distant, de la protéine.

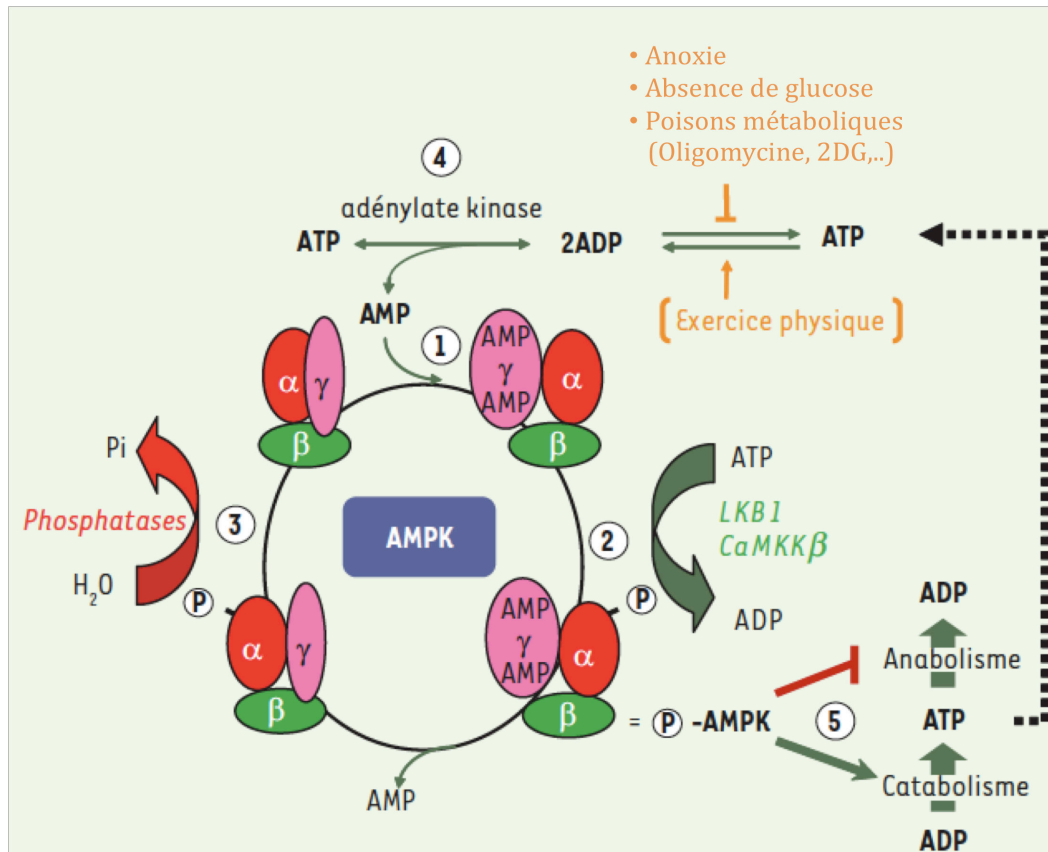


Figure 18 : Modèle de régulation de l'AMPK

Les trois sous-unités α (ovale rouge), β (ovale vert) et γ (ovale rose) sont représentées. L'AMPK est régulée par les niveaux d'ATP, d'ADP et d'AMP. Suite à un stress énergétique (absence de glucose, exercice musculaire, etc...) l'ATP est hydrolysé en ADP et la balance énergétique cellulaire est perturbée. Les rapports ATP/ADP et ATP/AMP sont alors automatiquement modifiés par l'intervention de l'adénylate kinase (4). L'AMP entre alors en compétition avec l'ATP pour se fixer à l'AMPK γ (sur son site de forte affinité) (1) et activer allostériquement l'AMPK. La liaison de l'AMP modifie la conformation de toute la protéine, ce qui se répercute à la sous-unité α et favorise la phosphorylation de la thréonine 172 de la sous-unité catalytique α par les AMPK kinases (LKB1 et CaMKK β) (2). La phosphorylation de ce résidu est critique dans l'activation de l'AMPK. L'AMP protège de la déphosphorylation par les protéines phosphatases et empêche ainsi un retour de l'AMPK à son état inactif (3). Une fois activée, l'AMPK favorise les réactions cataboliques productrices d'ATP tout en réduisant les voies anaboliques consommatrices d'ATP (5). (Extrait de (Foretz et al., 2006)).

augmenter ainsi son affinité pour l'AMP. L'ATP (mais pas l'ADP) est un inhibiteur allostérique de l'AMPK, cinq fois moins affin que l'AMP (Scott et al., 2004). Ainsi, l'AMPK est régulé par le ratio AMP:ATP, ratio rendu extrêmement sensible par l'adénylate cyclase, enzyme convertissant 2 molécules d'ADP (produit de la consommation d'ATP) en une molécule d'AMP et une molécule d'ATP.

2. Quand AMP et ATP entrent en compétition

Pour comprendre la compétition AMP/ATP, il faut entrer dans les détails des concentrations de ces deux nucléotides dans la cellule. Les concentrations absolues d'ATP ou d'AMP sont très variables d'un type cellulaire à l'autre et dépendent d'une multitude de facteurs, dont l'état nutritionnel, le tissu d'origine ou la présence de créatine (tampon d'ATP majoritairement présent dans les muscles). Cependant, de manière universelle, l'ATP est beaucoup plus concentré (de l'ordre de 1000 à 10000 μM) que l'ADP (de l'ordre de 100 μM) ou l'AMP (de l'ordre de 1 à 10 μM) (Hellsten et al., 1999; Veech et al., 1979; Xiao et al., 2007). L'ATP libre ne représente cependant qu'une petite partie de l'ATP total (1/20^{ème} à 1/100^{ème}) majoritairement complexé avec l'ion magnésium Mg^{2+} (Hardie, 2007; Hardie et al., 2011; Xiao et al., 2011). Le Mg^{2+} -ATP n'étant pas un inhibiteur allostérique de l'AMPK, on comprend mieux comment des concentrations d'AMP de l'ordre du μM peuvent entrer en compétition avec des concentrations d'ATP libres de l'ordre de 10 à 50 μM (mais avec une affinité cinq fois moindre).

3. Peu d'activation sans phosphorylation

L'activation allostérique de l'AMPK est importante mais reste toutefois modeste comparée à l'activation induite par la phosphorylation de la Thr172. L'AMP, liée aux sites d'interaction de la sous-unité γ , va modifier la structure du complexe $\alpha\beta\gamma$ et rendre accessible la Thr172 de la sous-unité α aux kinases en amont de l'AMPK (Cf prochain paragraphe). Alors que l'activation allostérique *in vitro* augmente d'un facteur 2 à 5 l'activité de l'AMPK (en fonction des isoformes présentes dans le complexe), la phosphorylation de la Thr172, combinée à son activation allostérique, l'augmente d'un facteur 100 à 1000 (Carling et al., 2011).

4. La déphosphorylation de Thr172 et l'inactivation de l'AMPK

Enfin, l'AMPK possède un niveau supplémentaire de complexité dans sa régulation, par l'intermédiaire des phosphatases. Lorsque le ratio AMP:ATP est rétabli, les phosphatases (cf prochain paragraphe) entrent en jeu pour déphosphoryler le résidu Thr172 de la sous-unité α . Cette déphosphorylation rapide ne doit être rendue possible que lorsque le ratio AMP:ATP est rétabli à un niveau élevé. C'est en fait directement l'AMP, ou l'ADP, qui, fixé au site 3 de basse affinité, protège la Thr172 de la déphosphorylation par les phosphatases (Hardie et al., 2011; Xiao et al., 2011). La protection contre la déphosphorylation s'avère d'ailleurs être un mécanisme majeur dans l'activation de l'AMPK (Sanders et al., 2007).

III. Kinases et phosphatases en amont de l'AMPK

La connaissance de la phosphorylation de l'AMPK (Thr172) et de son rôle critique est connu depuis 1996 (Hawley et al., 1996). L'identification des kinases en amont a été beaucoup plus tardive, ce qui est notamment dû à la faible homologie entre les kinases en amont de SNF1 dans la levure, et les kinases en amont de l'AMPK chez les mammifères (Hardie, 2007). Il existe trois AMPK kinases : LKB1 (ou sérine/thréonine kinase 11 (STK11)), Calmodulin-dépendant kinase β (CamKK β), et TGF- β -activated kinase-1 (TAK-1). Chaque kinase active l'AMPK en réponse à divers stimuli.

1. LKB1, suppresseur de tumeurs et AMPK kinase majeure

Des études dans plusieurs modèles animaux ont identifié LKB1 comme la kinase majeure impliquée dans l'activation de l'AMPK en réponse à l'augmentation du ratio AMP:ATP (Carling et al., 2008). LKB1 est constitutivement active, n'est pas régulée par le niveau d'énergie cellulaire et s'associe généralement aux deux protéines adaptatrices mouse-protein-25 (MO25) et stérile-20-related adaptator (STRAD) (Lizcano et al., 2004; Sakamoto et al., 2004). De façon intéressante, le gène *lkb1* est muté dans le syndrome de Peutz-Jeghers, une maladie génétique associée à l'apparition de polypes gastriques et intestinaux, faisant de *lkb1* un gène suppresseur de tumeurs (Alessi et al., 2006). C'est d'ailleurs, après *p53*, le gène suppresseur de tumeurs le plus fréquemment muté dans le

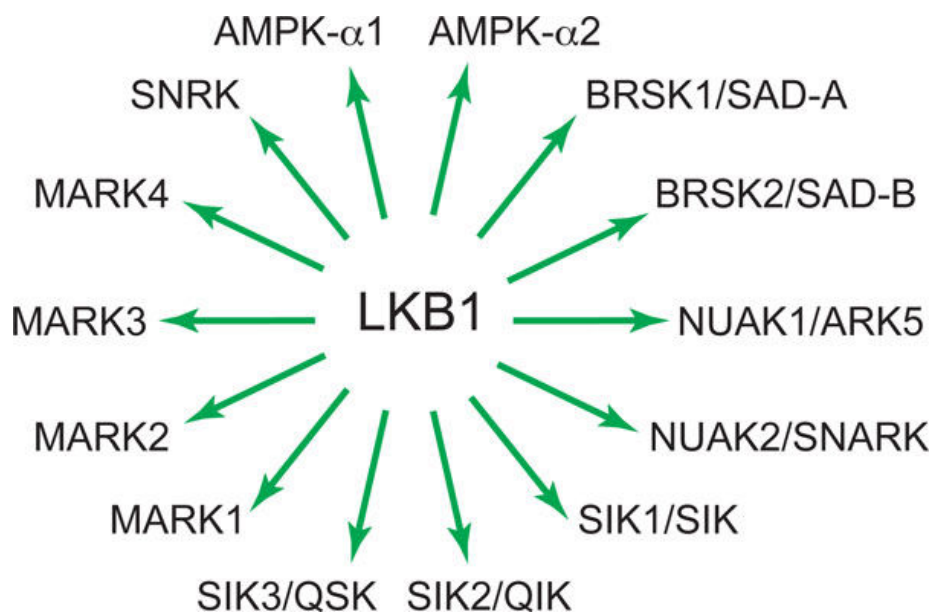


Figure 19 : Membres de la famille de l'AMPK et des ARK (Ampk Related Kinases)

LKB1 phosphoryle AMPK α 1/2 au niveau de la Thr 172 et les 12 ARKs au niveau d'un site équivalent entouré d'une séquence hautement conservée. La régulation de la phosphorylation des ARKs par LKB1 est méconnue. Les 12 ARKs sont impliquées dans la polarité (MARKs, BRSK/SAD), la prolifération cellulaire (NUAKs) ou la transcription des gènes régulés par CREB (SIKs). (Extrait de (Hardie and Alessi, 2013)).

cancer du poumon (Sanchez-Cespedes et al., 2002). Le rôle de LKB1 dans le cancer n'est cependant pas uniquement attribuable à son rôle activateur de l'AMPK puisque LKB1 active également 12 autres kinases de la sous-famille des AMPK related kinases, apparentées phylogénétiquement à l'AMPK (Figure 19) (Alessi et al., 2006; Lizcano et al., 2004). Ces kinases sont impliquées dans des fonctions diverses particulièrement cruciales dans la polarité cellulaire et le développement embryonnaire (Watts et al., 2000), mais aucune d'entre-elles n'a une activité directement régulée par les niveaux intracellulaires d'ATP, d'ADP ou d'AMP (Al-Hakim et al., 2005). L'équipe de D.J. Murphy a récemment mis en évidence que l'un des membres de cette famille, ARK5 (ou NUA5), possède un rôle crucial dans les effets pro-tumoraux de Myc (Liu et al.). Les auteurs ont démontré que l'inhibition de ARK5, dans des cellules murines ou humaines exprimant l'oncogène Myc, réduit la capacité respiratoire de ces cellules, provoque une chute d'ATP et une mort apoptotique. Ceci semble indiquer que Myc induit une dépendance vis-à-vis de ARK5, pour maintenir la viabilité cellulaire.

2. *CaMKK β* et *TAK1* peuvent également phosphoryler l'AMPK

La Ca²⁺/Calmoduline dependant protein kinase kinase β (CaMKK β) est la seconde kinase importante impliquée dans l'activation de l'AMPK (Hawley et al., 1995). En comparaison de LKB1, Elle est plus proche phylogénétiquement des kinases phosphorylant SNF1 chez la levure mais phosphoryle plus faiblement l'ampk *in vitro*. La CaMKK β semble pouvoir remplacer LKB1 dans certaines circonstances (Hurley et al., 2005; Woods et al., 2005). CaMKK β est activée par une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et est impliquée dans des tissus et des fonctions précis tels que l'excitabilité neuronale (Hawley et al., 2005), l'activation de la thrombine dans les cellules endothéliales (Stahmann et al., 2006) ou les contractions musculaires (Hawley et al., 1995). Il est légitime de penser que le calcium, étant le signal d'une intense consommation d'énergie imminente, prépare la cellule à mobiliser de l'énergie cellulaire. La dernière kinase capable de phosphoryler l'AMPK *in vitro* est la TGF β -activated kinase 1 (TAK1), un membre de la famille des mitogen activated protein kinase (MAPK) kinase kinase (Momcilovic et al., 2006). Son implication physiologique dans l'activation de l'AMPK reste cependant incertaine et méconnue (Carling et al., 2008; Hardie, 2007).

3. Un mécanisme de phosphorylation encore plus complexe ?

La caractérisation des kinases en amont de l'AMPK semble bien avancée. Cependant, il existe dans la littérature un certain nombre de zones d'ombre, d'incertitudes et de contradictions au sujet du rôle « exclusif » de LKB1 dans l'activation de l'AMPK en réponse à un stress énergétique (Hurley et al., 2005; Rocha et al., 2011; Sun et al., 2007). De plus, la phosphorylation de l'AMPK n'est pas encore totalement comprise ni maîtrisée suggérant un mécanisme plus complexe que celui décrit actuellement. On peut émettre plusieurs hypothèses quant à ce phénomène. Il est, par exemple, possible que les complexes contenant AMPK α 1 ou AMPK α 2 soient phosphorylés par différentes kinases expliquant pourquoi la phosphorylation de la Thr172 n'est jamais totalement abolie. On peut également envisager l'existence de facteurs inconnus interférant avec l'association de LKB1 avec ses protéines adaptatrices MO25 and STE-20, ou encore l'existence d'une kinase de l'AMPK non-identifiée.

4. Il n'existe pas une mais plusieurs phosphatases de l'AMPK

Enfin, les phosphatases possèdent également un rôle crucial dans le maintien de l'activité de l'AMPK. Il n'existe cependant pas de phosphatase unique déphosphorylant l'AMPK. PP1, PP2A (famille des PPP) et PP2C α (de la famille des PPM), trois des quatre classes majeures de sérine/thréonine phosphatases chez les mammifères, sont capables de déphosphoryler la Thr172 (Hardie et al., 2011).

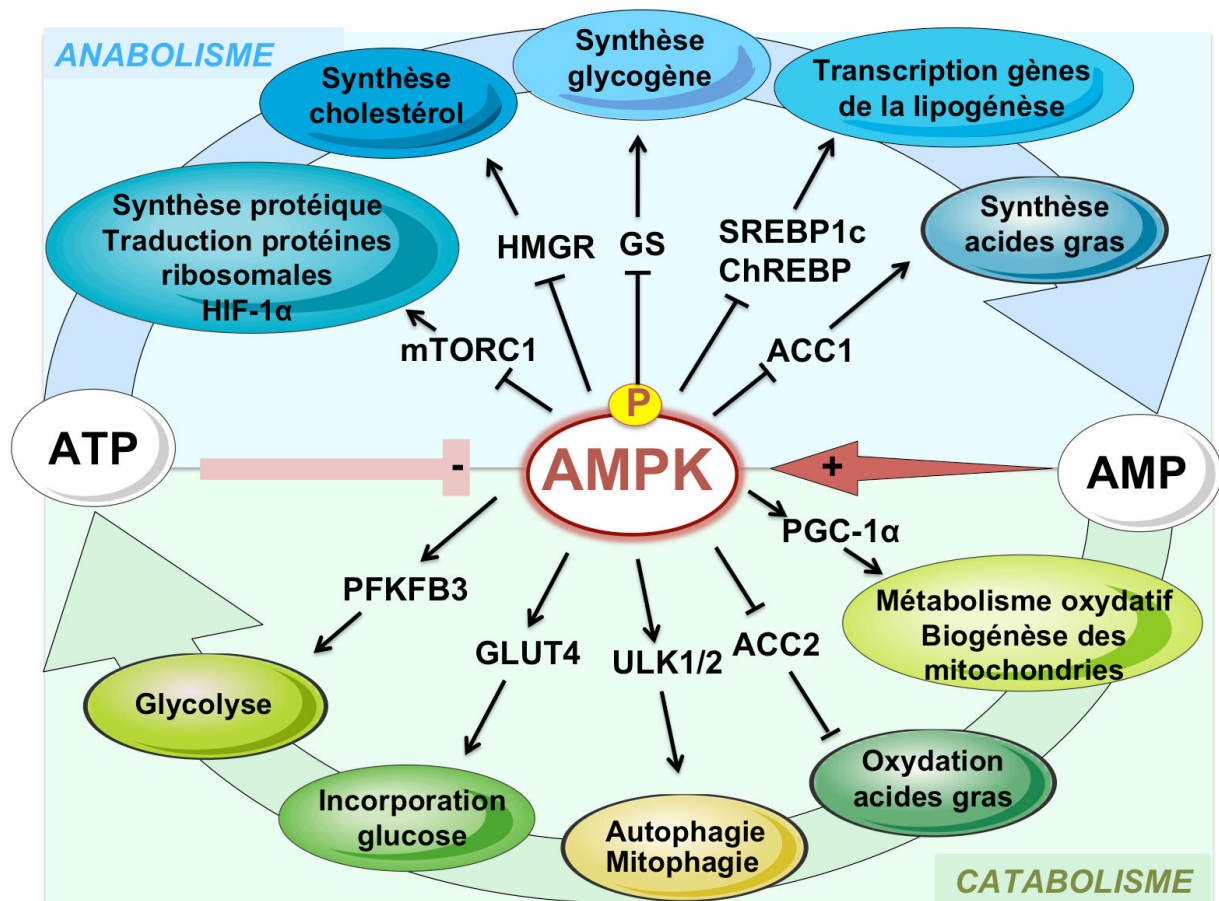


Figure 20 : Effets de l'AMPK sur le métabolisme cellulaire

L'AMPK inhibe les voies anaboliques consommatrices d'énergie (conversion de l'ATP en ADP, puis en AMP par l'adénylate cyclase) présentes dans la partie supérieure du cycle (partie bleue). Elle active les voies cataboliques productrices d'énergie (régénération de l'AMP en ATP) dans la partie inférieure du cycle (partie verte). Ce schéma résume de façon non-exhaustive les cibles majeures de l'AMPK dans le métabolisme cellulaire et les fonctions dans lesquelles elles sont impliquées.

ACC, Acetyl-CoA Carboxylase; GLUT, glucose transporters; GS, glycogen synthase; HMGR, 3-hydroxy-3-methyl-CoA reductase; PGC1 α , peroxisome proliferator-activated receptor-g co-activator-1a; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1. PFKFB, 6- phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases; ULK, Unc51-like kinase-1 ; ChREBP, carbohydrate response element binding protein ; SREBP1c, stérol response element binding protein . (Adapté de (Hardie, 2007))

C. AMPK et homéostasie de l'énergie cellulaire

L'AMPK phosphoryle un nombre pléthorique de substrats, parmi lesquels des facteurs de transcriptions, des protéines de la régulation épigénétique, ou des kinases, qui possèdent eux-mêmes un grand nombre d'effecteurs. Cela implique l'AMPK dans de nombreuses et diverses fonctions cellulaires, et la liste ne cesse de s'allonger encore avec l'identification fréquente de nouvelles cibles, directes ou indirectes, de l'AMPK. Chez la levure, par exemple, une déficience dans le gène de *snf1* est responsable d'une modification d'expression (supérieure à un facteur 2) de plus de 400 ARN messagers (ARNm) (Young et al., 2003).

L'AICAR et la metformine ont grandement contribué à élaborer cette liste, et la découverte relativement récente d'effets AMPK-indépendants de ces composés soulève des questions sur certaines cibles supposées de l'AMPK.

Dans cette partie, mon but n'est pas d'être exhaustif vis-à-vis de toutes les cibles de l'AMPK, mais de fournir quelques « clés » permettant de comprendre comment l'AMPK influe sur le métabolisme cellulaire et la prolifération afin de maintenir un niveau stable et viable d'ATP (Figure 20).

I. Régulation du métabolisme des carbohydrates

L'AMPK, activée en réponse à un stress énergétique, stimule l'incorporation de glucose dans la cellule et la glycolyse aérobie. En parallèle, elle inhibe la synthèse de glycogène pour limiter d'une part la consommation d'énergie, et empêcher d'autre part que le glucose-6-phosphate ne soit dérivé de la glycolyse vers la synthèse de glycogène.

1. L'AMPK stimule le flux glycolytique

Tout d'abord, l'AMPK active l'entrée de glucose dans les muscles et les organes de stockage en stimulant la translocation du transporteur de glucose GLUT4¹⁹ à la

¹⁹ Seule isoforme des GLUTs régulée par l'insuline et exprimée de fait dans les organes périphériques stockant le glucose sous forme de glycogène ou de lipides, comme le foie, les muscles squelettiques et cardiaques, ou le tissu adipeux.

membrane plasmique (Kurth-Kraczek et al., 1999). Ce système de régulation est cependant spécifique de certains tissus, et des doutes persistent encore sur un potentiel rôle de l'AMPK sur GLUT1 (Barnes et al., 2002).

Ensuite, l'AMPK active la glycolyse en stimulant l'activité PFK2 dans la plupart des cellules humaines, et particulièrement dans les cellules tumorales (Marsin et al., 2000; Marsin et al., 2002). L'activité PFK2 produit le fructose 2-6 bisphosphate (F2-6BP), un activateur allostérique de la PFK1²⁰. La plupart des PFK2 sont des enzymes réversibles qui catalysent l'interconversion F6P et F2,6BP dans les deux sens avec la même vitesse. (Activité PFK2 Vs activité Fructose-Bisphosphatase ou FBPase). il existe un membre de cette famille d'enzymes qui constitue une exception puisqu'il possède une forte activité PFK2 sans activité FBPase : Il s'agit de la PFKFB3²¹ (Okar and Lange, 1999). Cette enzyme est surexprimée dans de nombreux cancers (Hue and Rousseau, 1993; Minchenko et al., 2005a; Minchenko et al., 2005b), suffisante pour promouvoir la glycolyse quand elle est surexprimée (Hue and Rousseau, 1993; Telang et al., 2006) et est étroitement interconnectée avec le cycle cellulaire (Tudzarova et al., 2011). Il a été démontré que L'AMPK, activée par un stress anoxique stimule l'activité de la PFK2 et la glycolyse en phosphorylant et activant la PFKFB3 (Marsin et al., 2002).

Enfin, un rôle de l'AMPK dans le transport du lactate par les MCTs a déjà été suggéré mais jamais clairement démontré. Une première étude réalisée chez *Drosophila melanogaster* a permis d'identifier un rôle de LKB1 dans le transport à la membrane de Sln/dMCT1, l'homologue de MCT1 chez la drosophile. Cette étude a été réalisée dans un modèle particulier de cellules polarisées (disque imaginal de l'aile), dans lequel butyrate, pyruvate et lactate, importés par dMCT1, semblent essentiels pour maintenir la polarité et la viabilité cellulaire. Il serait intéressant de déterminer si LKB1 peut affecter le transport de MCT1 dans les cellules de mammifères, et si cet effet implique l'AMPK ou toute autre enzyme de la famille des kinases apparentées à l'AMPK, et régulées par LKB1. Toutefois, on peut d'ores et déjà remarquer que ni les isoformes MCT1 et MCT4 de mammifères, ni la basigine importante pour leurs ancrages, ne possèdent de site putatif de phosphorylation par l'AMPK dans leur séquence protéique

²⁰ Le F6P peut être converti par la PFK1 en F1,6BP qui peut poursuivre dans la voie glycolytique. Alternativement le F6P peut être converti en F2,6BP par l'activité PFK2. et promouvoir l'activité PFK1.

²¹ La PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3) est autrement appelée « inducible PFK2 » ou « placentale PFK2 ».

(site optimal : -5 LRRVxSxxNL +4 ; <http://scansite.mit.edu>, numéro d'accèsion O15427, P53985, P35613 respectivement pour MCT4, MCT1, Basigine, humains). Une seconde étude, réalisée dans les muscles à fibre rapide, a mis en évidence que l'AICAR et la caféine augmentent l'expression d'ARN messager de MCT1 et MCT4 en parallèle de l'activation de l'AMPK. Cependant, il est légitime de se demander si l'effet observé n'est pas dû à un effet indépendant de ces composés ou à la stabilisation de HIF1 en raison de l'effet activateur de l'AMPK sur la glycolyse.

2. Inhibition complexe de la synthèse de glycogène par l'AMPK

La régulation de cette étape par l'AMPK est complexe et n'est pas encore totalement résolue. Dans des conditions de stress nutritif, l'AMPK inhibe directement la glycogène synthase (Carling and Hardie, 1989). Paradoxalement, des niveaux élevés de glycogène dans les muscles sont associés à une faible activation de l'AMPK au cours de la contraction musculaire (Wojtaszewski et al., 2003). Ceci peut, en partie, être expliqué par le fait que le glycogène se fixe à l'AMPK *via* le domaine GBD de la sous-unité AMPK β (Cf chapitre 3-B-I-1) et devient un inhibiteur allostérique de l'AMPK (McBride et al., 2009). La structure du glycogène est importante dans cette inhibition, puisque plus le degré de branchement du glycogène est important (glucoses reliés par des liaisons α 1-6), et meilleure sera l'inhibition de l'AMPK. En conclusion, l'AMPK possède un effet globalement inhibiteur de la synthèse de glycogène, mais cet effet pourrait être levé lorsque le glycogène est dégradé (ce qui augmente son degré de branchement), afin que la cellule remplisse à nouveau ses stocks de glycogène.

II. Régulation du métabolisme des lipides

L'AMPK joue un rôle important dans le métabolisme des lipides. De manière similaire au métabolisme des carbohydrates, son action peut être dirigée sur certaines cibles exprimées dans des tissus particuliers, ou peut-être ubiquitaire. L'AMPK régule plusieurs acteurs importants du métabolisme des lipides et son action globale est en faveur de l'oxydation des acides gras et en défaveur de leur biosynthèse.

Une des cibles historiques les mieux caractérisées de l'AMPK est probablement l'acétylCoA carboxylase (ACC). C'est un complexe enzymatique catalysant la

carboxylation irréversible de l'acétylCoA en malonyl-coA, étape initiatrice et limitante dans la biosynthèse des acides gras. ACC existe sous deux isoformes : ACC1²², et ACC2²³. Lorsque le malonyl-coA est produit par ACC1 (cytoplasmique), il est ensuite utilisé par la fatty acid synthase (FAS) cytoplasmique comme « brique de construction » pour l'élongation des acides gras (Ruderman and Prentki, 2004; Tong, 2005). Lorsque le malonyl-coA est produit par ACC2 (face externe des mitochondries), il inhibe la carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I) responsable de l'entrée dans la mitochondrie des acides gras et inhibe ainsi la β -oxydation (Abu-Elheiga et al., 2000). En phosphorylant ACC1²⁴ et ACC2, l'AMPK inhibe là la fois la synthèse des acides gras et promeut leur oxydation (Figure 20). Notons que l'AMPK joue un rôle encore plus complexe dans la synthèse lipidique dans les tissus lipogéniques puisqu'il active les facteurs de transcription SREBP-1c et chREBP (Ferre et al., 2003; Foretz et al., 1998). Les acides gras, étant les précurseurs des lipides (triglycérides, phospholipides, etc...), ils représentent un point de contrôle majeur de la lipogenèse.

En parallèle, l'AMPK inhibe la HMG-CoA reductase, enzyme centrale dans la synthèse du mévalonate, précurseur du cholestérol (Hardie et al., 1998). Au vu des forts effets antiprolifératifs des statines, médicaments hypocholestérolémiants ciblant la HMG-coA réductase (Elrod and Lefer, 2005), on peut penser que l'inhibition de la prolifération par l'AMPK passe, en partie du moins, par son effet inhibiteur de la synthèse du mévalonate (Demierre et al., 2005; Swanson and Hohl, 2006).

III. Régulation de la synthèse protéique

Pour survivre, les cellules sont destinées à s'adapter très rapidement à leur environnement et particulièrement à la disponibilité des nutriments. Les changements

²² Isoforme cytoplasmique et ubiquitaire

²³ Isoforme localisée à la membrane externe des mitochondries et exprimée spécifiquement dans les muscles et le foie.

²⁴ L'AMPK est la seule kinase connue à ce jour qui phosphoryle ACC sur le site spécifique de la sérine 79. L'expression de Phospho-ACC (Ser 79) est devenue un témoin universel de l'activité de l'AMPK.

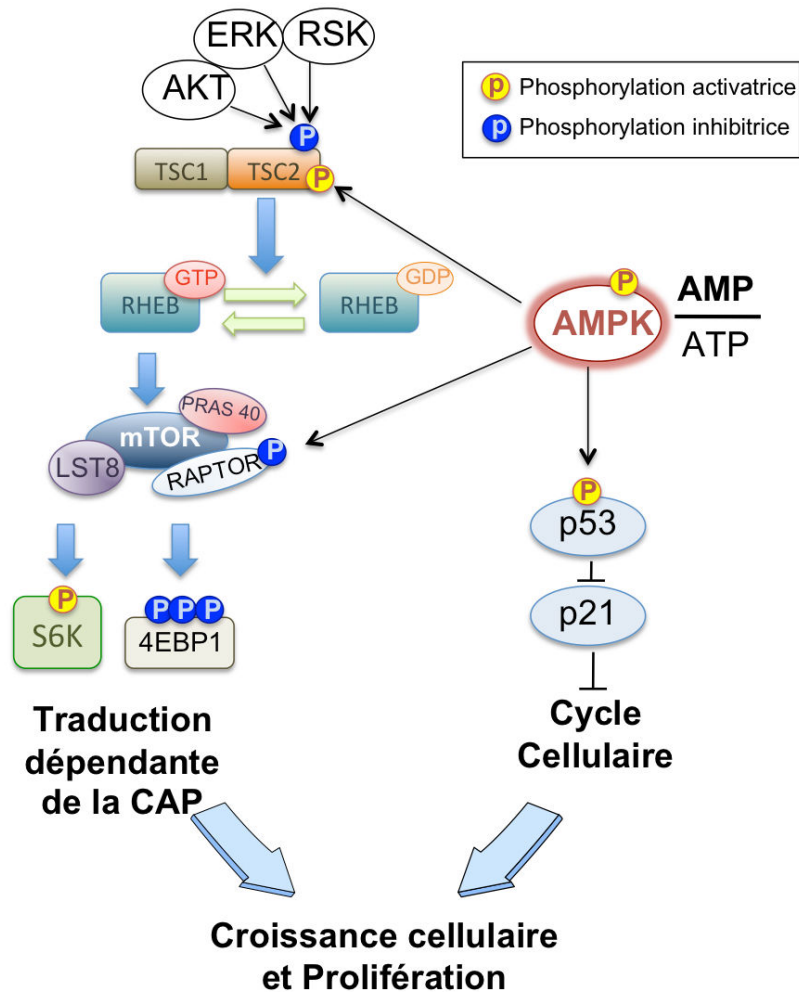


Figure 21 : Régulation de la croissance cellulaire et de la prolifération par l'AMPK

L'AMPK inhibe le complexe mTORC1 (Mammalian target of rapamycin complex 1) et active p53, deux actions conduisant à l'inhibition de la croissance cellulaire et de la prolifération. L'action inhibitrice de l'AMPK sur mTORC1 est due à la phosphorylation directe de RAPTOR, mais également à l'activation du complexe Tuberous Sclerosis 1 (TSC1)-TSC2, à activité GTPase (GAP) TSC2 en convertissant RHEB dans son état inactif lié au GDP, inhibe mTORC1 *in fine*. De façon antagoniste à l'AMPK, les voies de signalisation PI3K-AKT ou Ras-ERK-RSK inhibent TSC2 et conduisent à l'activation de la synthèse protéique en présence de facteurs de croissance. (Adapté de (Ma and Blenis, 2009)).

environnementaux modifient la nature et la quantité des protéines synthétisées, en altérant la transcription des gènes, la stabilité et la traduction des ARNm. L'étape de traduction est un des processus les plus coûteux en énergie car elle nécessite la biogénèse des ribosomes et de nombreux facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison. Une action majeure de l'AMPK pour maintenir l'homéostasie énergétique en condition de stress métabolique consiste dans le « frein » de la synthèse protéique qu'elle exerce essentiellement dans l'étape d'initiation de la traduction (Figure 21).

La voie de signalisation de mammalian Target of Rapamycin (mTOR) est un élément majeur de l'étape initiatrice de la traduction en présence de mitogènes, énergie et précurseurs biosynthétiques. mTOR est présente dans la cellule sous la forme de deux complexes multiprotéiques, mammalian TOR complex 1 (mTORC1) et mammalian TOR complex 2 (mTORC2). mTORC1 exerce ses effets par le biais de l'activation de la S6 kinase 1 (S6K1) et de l'inhibition de 4E-Binding protein 1(4EBP1), puissant répresseur de la traduction dépendante de la CAP. mTORC2 implique quant à lui l'activation d'AKT (Ma and Blenis, 2009). Ces deux complexes répondent à l'insuline et aux facteurs de croissance mais seul mTORC1 est sensible à la présence de nutriments et d'énergie cellulaire (Dann et al., 2007; Um et al., 2004).

L'inhibition de mTORC1 consécutive à la baisse du niveau d'ATP est connue depuis plusieurs années (Dennis et al., 2001). Ce n'est cependant que depuis récemment que le rôle majeur de l'AMPK dans ce processus est connu. L'AMPK inhibe mTORC1 de deux façons :

- elle phosphoryle TSC2 (Sérine 1345), ce qui provoque le recrutement de glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) et la phosphorylation de S1341 et S1337. Cela a pour conséquence de renforcer l'activité GAP de TSC2 vis-à-vis de Rheb et d'inhiber mTORC1 (Inoki et al., 2003; Moon, 2005). Ainsi, l'AMPK inhibe TSC2 alors que les kinases activées par les facteurs de croissance ou l'insuline, telles que Extracellular signal-regulated Kinase (ERK), AKT (ou Protein kinase B), ou Ribosomal S6 kinase (RSK), en sont des activateurs (Inoki et al., 2002; Manning et al., 2002a).

- elle phosphoryle directement la protéine adaptatrice RAPTOR (S722, S792), de manière directe et indépendante de TSC2. Ces phosphorylations facilitent l'interaction de RAPTOR avec la protéine 14-3-3 et l'inhibition du complexe mTORC1 (Gwinn et al., 2008).

mTOR intègre en permanence les signaux informant de la disponibilité en énergie, en facteurs de croissance, et en nutriments (acides aminés, oxygène...) nécessaires à la prolifération. Si l'un de ces trois éléments devient limitant, l'initiation de la traduction s'en retrouve fortement altérée, de même que la progression du cycle cellulaire. C'est en quelque sorte le pouvoir prolifératif décisionnel de la cellule, et l'AMPK constitue un point de contrôle important de ce pouvoir décisionnel.

IV. Recyclage du contenu mitochondrial et métabolisme oxydatif

L'AMPK serait également impliquée dans le renouvellement du contenu mitochondrial cellulaire en stimulant d'une part la dégradation des mitochondries défectueuses par le biais d'ULK1/2 (Unc51-like kinase), et en activant d'autre part la biogenèse de nouvelles mitochondries *via* PGC1 α .

PGC1 α est un régulateur particulièrement important de la biogenèse mitochondriale et l'activité respiratoire dans les adipocytes (Rohas et al., 2007), mais également dans d'autres tissus (Lin et al., 2005). L'AMPK peut activer directement PGC1 α (peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 α), ou indirectement par le biais de SIRT1 (Canto et al., 2009).

L'activation de l'autophagie²⁵ par l'AMPK fournit nutriments (acides aminés,..) et énergie nécessaires à maintenir les fonctions cellulaires vitales en condition de carence en glucose. L'AMPK active l'autophagie de par l'inhibition de mTOR (inhibiteur de l'autophagie) et l'activation directe de ULK1 (phosphorylation de S317, S377), initiateur important de l'autophagie (Egan et al., 2011; Kim et al., 2011). La voie LKB1-AMPK-ULK1 est particulièrement impliquée dans le recyclage des mitochondries devenues défectueuses (Egan et al., 2011; Nakada et al., 2010; Shackelford et al., 2013).

De plus, Il a été démontré que l'H₂O₂ et l'oxyde nitrique (NO) sont deux activateurs forts de l'AMPK (Cidad et al., 2004; Scarpulla, 2008). Il a ainsi été suggéré que l'AMPK puisse être un régulateur du stress oxydatif activée par les ROS, et induisant en retour la mitophagie pour contenir la production de ROS, tout en maintenant un niveau élevé de

²⁵ Processus de dégradation des organelles cellulaires (macroautophagie) ou des protéines cytoplasmiques (micrautophagie)

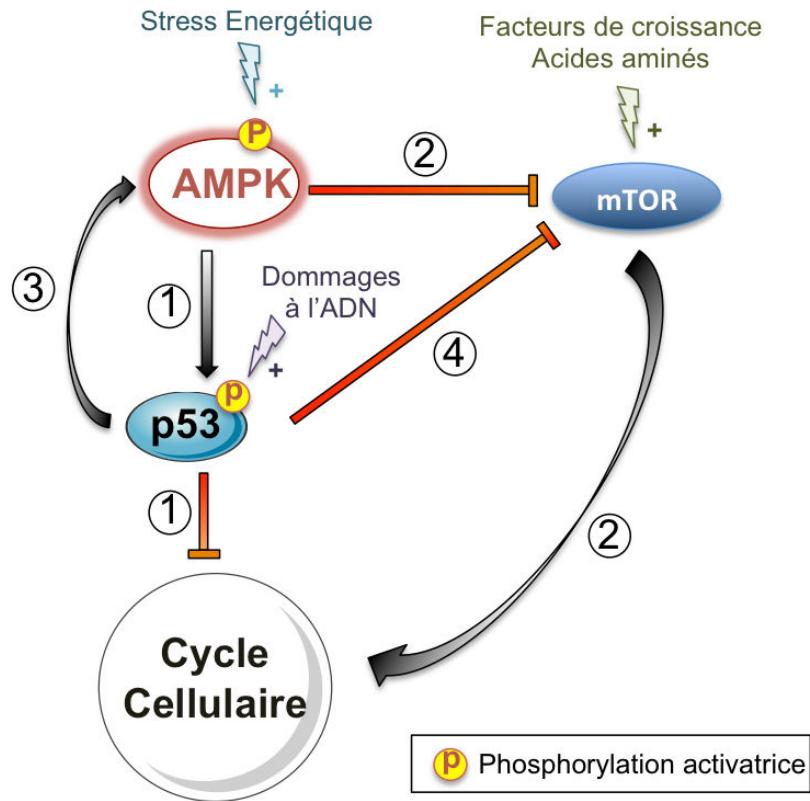


Figure 22 : Interconnexions entre AMPK, p53 et mTOR

L'AMPK activée par un stress énergétique phosphoryle et active p53 qui inhibe la progression du cycle cellulaire (1). L'AMPK réprime mTOR, et ainsi la traduction des acteurs du cycle cellulaire (2). P53 activée par les dommages à l'ADN ou directement par l'AMPK exerce un rétrocontrôle positif sur l'AMPK (3) et régule négativement mTOR (4).

l'antioxydant NADPH. Le ratio NADPH/NADP⁺ est en effet maintenu élevé par l'AMPK *via* une inhibition du métabolisme des acides gras (Jeon et al., 2012).

On peut noter cependant qu'une telle action est longue à se mettre en place et relève d'un mécanisme constitutif, en condition de restriction calorique par exemple, et non à une réponse soudaine à un stress énergétique.

V. Régulation de la prolifération cellulaire

L'effet de l'AMPK sur la prolifération cellulaire est vraisemblablement dû à l'ensemble de ses actions inhibitrices sur les voies anaboliques (synthèse des protéines, acides gras, cholestérol) nécessaires à la division cellulaire. Cependant, plusieurs études indépendantes ont récemment suggéré un rôle inhibiteur direct de l'AMPK sur la progression du cycle cellulaire (Igata et al., 2005; Imamura et al., 2001; Jones et al., 2005). Une étude en particulier a bousculé les connaissances concernant les effets antiprolifératifs de l'AMPK, en mettant en évidence, pour la première fois, la phosphorylation directe de la Ser15 de p53 par l'AMPK (Jones et al., 2005). Cette phosphorylation est centrale dans l'activation de p53 et intervient classiquement en réponse aux dommages à l'ADN (Vousden and Prives, 2009). Dans cette étude, Jones *et al.* ont montré dans des fibroblastes de souris (MEF) qu'une moindre disponibilité en glucose (1mM/0,1/0mM) conduit à un arrêt du cycle en phase G1, et que cela nécessite l'activation de l'AMPK et de p53. De plus, l'expression d'une forme constitutive active de l'AMPK reproduit les effets de la carence en glucose sur la phosphorylation de p53. Cette étude suggère un « checkpoint » AMPK-p53 qui, en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire quand l'énergie est limitante, protège les cellules à court terme et provoque la sénescence à plus long terme. Notons qu'en réponse aux dommages à l'ADN, cette même Ser15 de p53 est phosphorylée par d'autres kinases mais ne requiert pas l'AMPK.

Il est difficile de disséquer les effets de l'AMPK sur la prolifération (Figure 22). La régulation du cycle cellulaire par l'AMPK est due à deux effets majeurs : l'activation de p53 et l'inhibition *via* mTOR de la traduction de certains acteurs cruciaux du cycle cellulaire (Feng et al., 2007). Le lien entre AMPK, P53 et mTOR est un peu plus complexe

en réalité : p53 exerce un rétrocontrôle positif sur l'AMPK en induisant la transcription des sous-unités AMPK β 1 et β 2 (Feng et al., 2007) et en facilitant la phosphorylation de la Thr172 des sous-unités AMPK α (Budanov and Karin, 2008; Feng et al., 2005). De plus, il conduit à une augmentation d'expression transcriptionnelle de PTEN ou TSC2, deux régulateurs négatifs de la signalisation de mTOR (Feng et al., 2007). En conclusion, les gardiens du génome (p53), de la balance énergétique (AMPK) et de la synthèse protéique (mTOR) entretiennent un dialogue permanent, responsable du pouvoir d'adaptation rapide des cellules en réponse à des stress divers.

VI. AMPK et HIF

Nous avons vu, au cours des paragraphes précédents, que l'AMPK et HIF partagent un certain nombre de cibles et ont des effets similaires, la plupart du temps, ou au contraire des effets antagonistes. Par exemple, HIF1 et l'AMPK activent tous deux la glycolyse *via* les GLUTs ou la PFKFB3, inhibent tous deux mTORC1, participent dans la stabilisation de p53 et l'activation de l'autophagie. A l'inverse, HIF1 induit la synthèse de glycogène et de lipides, alors que l'AMPK les répriment. Le lien exact entre ces deux protagonistes n'est pas clairement établi et est probablement dépendant du tissu considéré et de l'oncogène initiateur de la tumeur dans le cadre du cancer.

La diminution de la teneur en oxygène est largement considérée dans la littérature comme un stress métabolique impliquant l'activation de l'AMPK. Il faut cependant distinguer les effets de l'hypoxie (0,1%-5% O₂) aux effets de l'anoxie (0% O₂) vis-à-vis de l'activation de l'AMPK. En effet, l'hypoxie est un signal de survie pour les cellules qui, grâce à une glycolyse exacerbée, conservent des niveaux d'ATP relativement stables et une viabilité cellulaire intacte. En contraste, l'anoxie est une situation trop critique pour la cellule, aboutissant à une chute de l'ATP et une forte cytotoxicité. La plupart des études sur la régulation physiologique de l'AMPK par l'oxygène ont été réalisées sur des muscles isolés, des cellules en culture, ou sur l'AMPK recombinante dans des conditions d'anoxie ou d'ischémie (Beauloye et al., 2001; Frederich et al., 2005; Marsin et al., 2000; Marsin et al., 2002). Laderoute *et al.* ont démontré que l'anoxie altère les niveaux d'ATP et active l'AMPK, dans des fibroblastes embryonnaires de souris exprimant ou non HIF1 (Laderoute et al., 2006). Dans des MEFs, l'abolition de l'activité de l'AMPK (par un Knock-out d'Ampk α 1 et Ampk α 2) ne modifie pas la stabilisation de HIF1 en normoxie,

ou en anoxie. Notons que Faubert *et al.* ont obtenu des résultats différents avec un modèle similaire mais inductible²⁶, puisqu'ils ont montré que le Knock-out des sous-unités α stabilise HIF1, et suggèrent l'implication de mTORC1 et de la traduction dépendante de la CAP dans ce mécanisme (Faubert et al.).

Enfin, Puisque les ROS sont des activateurs directs de l'AMPK (Cf chapitre 3-C-IV-3), dont la production est augmentée en hypoxie (Cf Chapitre 1-B-III-4), l'AMPK est peut être régulée par l'intermédiaire des ROS en hypoxie. Emerling *et al.* ont en effet montré que les ROS générés par une exposition courte à l'hypoxie (15 à 60 minutes ; 1,5 % O₂) activent l'AMPK alors que les concentrations en AMP, ADP, ou ATP ne présentent pas de changement notable (Emerling et al., 2009). Il est cependant dommage que les auteurs n'aient pas utilisé un modèle dans lequel AMPK γ ne puisse plus interagir avec l'AMP, pour confirmer si cette activation hypoxique dépendante des ROS est totalement indépendante des niveaux d'énergie cellulaire.

D. AMPK et cancer

VII. La metformine

Du fait de ses implications dans la régulation de la glycémie, du stockage des lipides dans les tissus adipeux, et de la prise alimentaire, l'AMPK a été depuis sa découverte, étudiée dans les pathologies associées au diabète et à l'obésité. La metformine, de la classe des biguanidines, est le traitement du diabète de type 2 de première ligne le plus prescrit au monde, avec succès et très peu de toxicité. Cette drogue activatrice de l'AMPK apparaît comme le traitement idéal contre diabète de type 2, puisque son action est hypoglycémiant (en raison de l'inhibition de la néoglucogenèse hépatique), diminue l'insulino-résistance des tissus périphérique, et réduit les niveaux de cholestérol et de triglycérides.

Grâce à l'utilisation clinique de la metformine, un intérêt grandissant s'est manifesté autour de l'AMPK en cancérologie. En effet, des études épidémiologiques rétrospectives, menées sur des patients diabétiques traités à la metformine, ont mis en évidence que

²⁶ MEF déficientes constitutives pour le gène d'AMPK α 1 (*Ampk α 1^{-/-}*) et conditionnelles pour le gène d'AMPK α 2 (*Ampk α 2^{fl/fl}*).

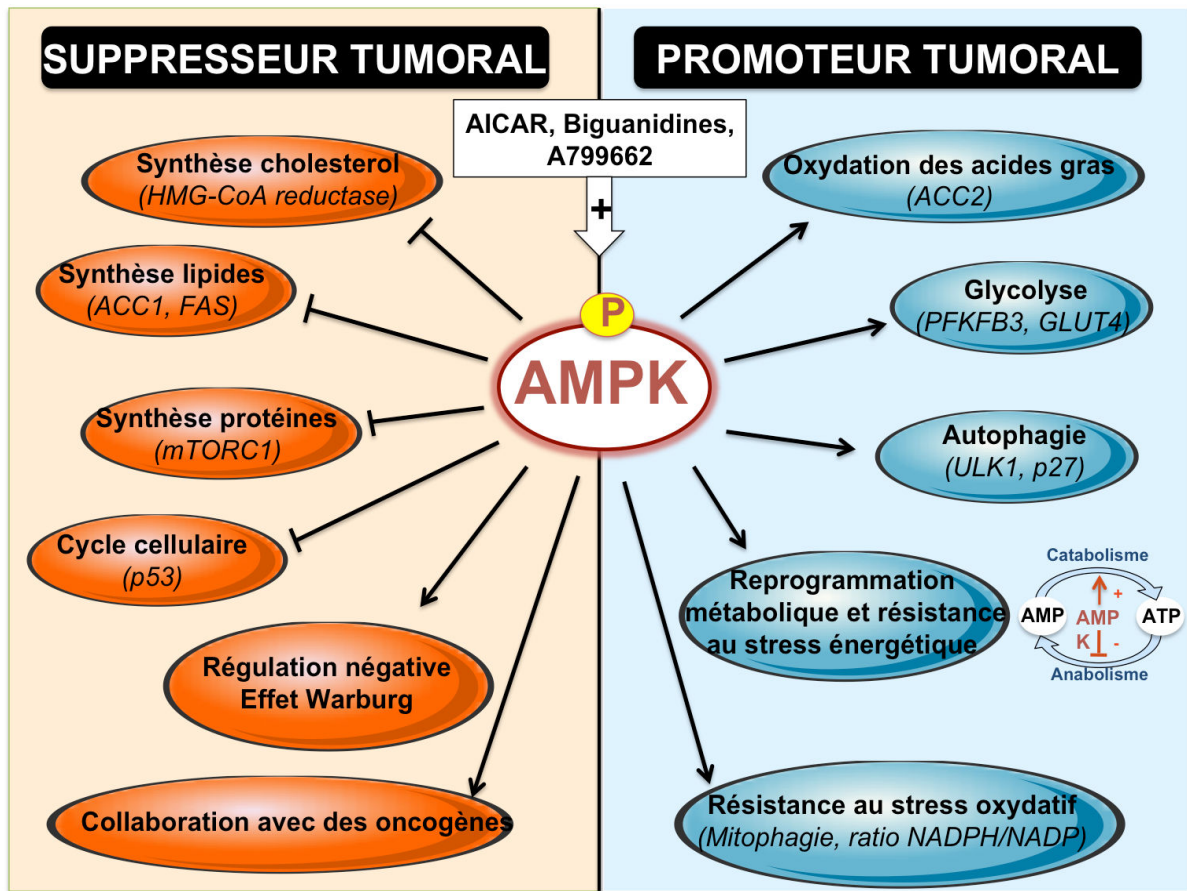


Figure 23 : AMPK suppresseur ou promoteur de tumeurs?

L'AMPK exerce à la fois des actions antitumorales (à gauche) et protumorales (à droite), et son action globale dépend de plusieurs critères dont l'environnement de la tumeur, l'état nutritif, ou l'oncogène initiateur de la tumeur. Les activateurs directs ou indirects de l'AMPK utilisés en clinique (AICAR, Biguanidines, A799662) exacerbent son rôle suppresseur de tumeurs.

celle-ci diminue fortement l'incidence de plusieurs cancers (cancer du sein, de la prostate, du colon) chez les patients diabétiques, et augmente la survie globale des patients diabétique atteints de cancer (He et al., 2011; Landman et al., 2010; Libby et al., 2009). Depuis lors, la metformine a été étudiée intensivement en oncologie et a montré des effets antitumoraux *in vitro* et *in vivo*, de manière dépendante mais le plus souvent indépendante de l'AMPK, inhibant le complexe I de la respiration mitochondriale (Guigas et al., 2004), la signalisation de l'insuline (Kisfalvi et al., 2009; Liu et al., 2011), ou directement mTORC1 (Ben Sahra et al., 2011 ; Kalender et al., 2010; Liu et al., 2014).

VIII. AMPK, suppresseur de tumeurs ou oncogène ?

1. Evidences d'un rôle suppresseur de tumeur

Une balance s'établit entre les fonctions anti-tumorales de l'AMPK, et ses fonctions protectrices, donc pro-tumorales (Figure 23). Il apparaît crucial de déterminer si un déséquilibre de cette balance peut conduire à l'apparition de tumeurs ou promouvoir leur développement. L'AMPK étant une des cibles privilégiées de LKB1, suppresseur de tumeur avéré, on peut se questionner sur un potentiel rôle suppresseur de tumeurs de l'AMPK. Deux études le suggèrent. Une étude histologique réalisée sur deux cohortes de patientes atteintes d'un cancer du sein primaire (349 femmes pré/post ménopause au total) a comparé les niveaux d'activité de l'AMPK dans les tissus mammaires tumoraux, comparés aux tissus sains environnants (Hadad et al., 2009). L'expression de P-AMPK et P-ACC, est moins élevée au sein de la tumeur que dans l'épithélium normal adjacent, et ceci dans 90% des cas (318/349 patients). De plus, un faible marquage pour P-AMPK est significativement associé avec un grade histologique élevé et la présence de métastases dans les ganglions axillaires. La perte de la signalisation de l'AMPK semble ainsi être fréquente dans le cancer du sein et conférer un avantage aux tumeurs. Notons cependant qu'elle n'est pas associée significativement à une augmentation de l'expression du Ki67, marqueur de la prolifération cellulaire. B. Faubert *et al.* ont mis en évidence que des souris transgéniques E μ -Myc qui sont *knock-out* pour l'AMPK α 1 contractent des lymphomes beaucoup plus rapidement que les souris E μ -Myc exprimant AMPK α 1 (Faubert et al., 2013). Cette étude confirme des résultats obtenus *in vitro* (Zhou

et al., 2009) et établit, pour la première fois de manière claire, que la perte de l'activité de l'AMPK augmente la tumorigenicité. Notons cependant que cette étude a été réalisée dans un modèle particulier de tumeurs liquides dont l'oncogène est c-Myc. Des investigations avec d'autres oncogènes et modèles tumoraux sont indispensables pour statuer définitivement sur un rôle suppresseur de tumeur de l'AMPK.

Cependant, certaines observations laissent à penser que la perte de l'AMPK n'est pas un élément crucial dans l'initiation tumorale. Tout d'abord, le réseau de recherches sur l'atlas du génome du cancer (TCGA)²⁷ permet d'établir une faible fréquence de mutations dans les sous-unités de l'AMPK, à l'inverse d'autres suppresseurs de tumeur tels que P53, PTEN, ou LKB1 (Network; Network, 2012a, b). On pourrait penser que l'existence de plusieurs isoformes redondantes pour chaque sous-unité de l'AMPK est un frein à l'apparition spontanée de mutations inactivatrices de l'AMPK. Cependant, des mutations dans la sous-unité γ (particulièrement $\gamma 2$) de l'AMPK sont associées à diverses maladies cardiaques chez l'homme (syndromes de Wolff, de Parkinson, de White), et aucune de ces mutations génétiques connues ne prédispose au cancer (Hardie, 2007). De même, les souris dans lesquelles les sous-unités α sont invalidées, de façon tissu spécifique, ne présentent pas de tumeurs spontanées. Ces observations sont autant d'indices suggérant que la perte de l'AMPK ne serait peut-être pas capable à elle seule d'induire l'initiation tumorale.

Enfin l'AMPK pourrait même être un oncogène dans certains contextes. En effet, l'activation de l'AMPK en condition de stress énergétique et son rôle dans la reprogrammation métabolique confèrent aux cellules tumorales une résistance à la mort cellulaire dans de nombreux types cellulaires (Chhipa et al., 2010 ; Kato et al., 2002; Matsui et al., 2007; Ng et al., 2012). L'impact de l'AMPK a tout particulièrement été étudié dans les tumeurs de la prostate, donnant lieu à des tumeurs solides souvent peu vascularisées, confrontées de fait à l'hypoxie et à la carence de glucose (Zhong et al., 1998). L'utilisation dans ces modèles d'ARN interférence ciblant les sous-unités catalytiques AMPK $\alpha 1$ et AMPK $\alpha 2$ (Chhipa et al., 2010), ou d'une forme dominant négative d'AMPK $\alpha 1$ (Matsui et al., 2007), conduisent à une sensibilité accrue à une carence en glucose. Au cours de l'établissement des tumeurs et de leur développement,

²⁷ Réseau regroupant les données concernant les fréquences de mutations du génome de divers tissus cancéreux (cancer colorectal, cancer du sein, cancer du rein à cellules claires, etc)

les cellules se retrouvent confrontées à des périodes d'hypoxie et de stress énergétique pendant lesquelles le rôle de protecteur de l'AMPK semble critique (Kato et al., 2002; Laderoute et al., 2006).

L'AMPK apparaît donc comme un régulateur central du métabolisme et de l'homéostasie énergétique à l'échelle de l'organisme comme à l'échelle de la cellule. Certaines de ses cibles sont spécifiques de certains tissus alors que d'autres sont universelles. Son action globale au niveau de la cellule est de répondre à une baisse des niveaux d'ATP par un arrêt quasi immédiat de la consommation d'ATP et d'une activation des voies productrices d'énergie.

En conclusion, HIF1 est le facteur de transcription clé dans l'adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie. La reprogrammation métabolique et particulièrement son rôle activateur du flux glycolytique sont essentiels dans son mode d'action. Le stress hypoxique est souvent accompagné d'une faible teneur en nutriments et notamment en glucose, carburant principal de la glycolyse. L'AMPK joue alors un rôle déterminant dans ce contexte pour adapter les besoins énergétiques à la disponibilité en nutriments.

OBJECTIFS ET ENJEUX DU TRAVAIL

Comme nous venons de le voir, l'établissement de zones hypoxiques au sein de la tumeur est un phénomène important dans le développement tumoral et l'acquisition de résistances aux chimiothérapies et radiothérapies (Figure 1). HIF1 est un acteur central dans l'adaptation cellulaire à l'hypoxie et représente une cible importante en oncologie. Il existe trois niveaux d'action pour cibler la réponse adaptative dirigée par HIF1 : altérer la régulation de HIF1, inhiber directement HIF1, ou interférer avec certaines de ses cibles transcriptionnelles.

Mon travail de thèse s'est orienté sur HIF1, de sa régulation par FIH à ses effets sur la reprogrammation métabolique des cellules tumorales hypoxiques. Il s'est articulé en 3 axes majeurs :

- **La caractérisation des effets antitumoraux de FIH, un des régulateurs majeurs de HIF1.** Il avait été découvert avant mon arrivée au laboratoire que l'inactivation de FIH conduisait à un fort effet antitumoral, et que celui-ci était en grande partie indépendant de HIF1. Mon objectif a été de déterminer le ou les acteur(s) impliqué(s) dans ce phénomène.

- **L'étude de la régulation de la synthèse de glycogène par HIF1.** Le glycogène, en tant que polymère de glucose, constitue une source intracellulaire de glucose. Il a été observé au laboratoire, que les fibroblastes et cellules tumorales stockent de grandes quantités de glycogène en hypoxie. Mon objectif a été d'analyser ce phénomène, de déterminer si HIF1 était impliqué, si le glycogène pouvait être métabolisé quand le glucose devenait limitant, et si cela conférait un avantage de survie aux cellules hypoxiques.

- **L'étude de l'inhibition combinée de la glycolyse exacerbée en hypoxie, par le biais du blocage de l'export d'acide lactique, et de l'inhibition de l'AMPK, gardien de la balance énergétique.** Un des effets majeurs de HIF1 sur le métabolisme tumoral est de privilégier la glycolyse au détriment du cycle de Krebs. Ce faisant, il exacerbe la dépendance des cellules tumorales à la glycolyse. Une des stratégies majeures du laboratoire consiste à cibler l'export de lactate dans le but d'inhiber la glycolyse et ainsi d'impacter le métabolisme des cellules tumorales glycolytiques. Cette stratégie induit un effet cytostatique mais ne modifie pas les niveaux d'ATP cellulaire, ni n'affecte la viabilité des cellules tumorales. **L'objectif majeur de ma thèse** a été de mettre au point

une stratégie permettant de valider ou invalider l'hypothèse suivante : l'AMPK, senseur de l'ATP cellulaire et gardien de la balance énergétique, est-il l'acteur responsable de cet effet cytotatique qui garantit la viabilité des cellules tumorales malgré le stress énergétique imposé?

Nous allons voir maintenant les résultats obtenus suite à l'étude de ces trois aspects de la réponse hypoxique.

RESULTATS

Cette section présente deux publications et un manuscrit en préparation :

A. PUBLICATION 1 - The asparaginyl hydroxylase factor-inhibiting HIF is essential for tumor growth through suppression of the p53-p21 axis.

B. PUBLICATION 2 - Glycogen synthesis is induced in hypoxia by the hypoxia-inducible factor and promotes cancer cell survival

C. MANUSCRIT 1 - The controversial role of AMPK in bioenergetics and tumor growth. AMPK is dispensable to maintain ATP levels following glycolysis inhibition *in vitro* but facilitates tumour engraftment of Ras-transformed fibroblasts.

A. Publication 1 : The asparaginyl hydroxylase factor-inhibiting HIF is essential for tumor growth through suppression of the p53-p21 axis

Pelletier J, Dayan F, Durivault J, Ilc K, Pécou E, Pouysségur J, and Mazure NM

(Article publié dans le journal Oncogene, en Septembre 2011)

I. Contexte et objectif de la recherche

Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) est le facteur de transcription clé de la réponse adaptative des cellules à l'hypoxie. Sa sous-unité régulatrice HIF-1 α , stabilisée en hypoxie, est régulée par deux senseurs d'oxygène : les proline-hydroxylases (PHDs) et une HIF-Asn-Hydroxylase (FIH). HIF-1 α présente deux domaines de transactivation, le domaine N-Terminal (N-TAD) et le domaine C-Terminal (C-TAD).

Le laboratoire du Dr J. Pouysségur a été un des laboratoires pionniers dans l'étude de la régulation de HIF1 par les prolyls hydroxylases (PHD) et par Factor Inhibiting HIF1 (FIH). Avant mon arrivée au laboratoire, il avait été établi un modèle de régulation de HIF1, basé sur les différentes affinités des PHDs et de FIH pour l'oxygène et sur des résultats obtenus *in vitro* (Dayan et al., 2006)(Cf Introduction chapitre 1-B-III 3). HIF1 régule ainsi un premier répertoire de gènes dépendant du N-TAD, dans des conditions d'hypoxie modérée (3 à 1% O₂), et un second répertoire de gènes dépendant du N-TAD et du C-TAD, dans des conditions sévères d'hypoxie (0,1% O₂). FIH serait le facteur discriminant entre la régulation de ces deux répertoires de gènes. Ce modèle avait été confirmé avant mon arrivée dans un modèle de sphéroïdes et dans un modèle de xénogreffes *in vivo*. Il avait été également mis en évidence un effet protumoral de FIH *in vivo*. Mon implication dans ce travail a consisté à tester les effets de l'inactivation de FIH sur la prolifération et la mortalité cellulaire *in vitro* et à déterminer le mécanisme impliqué dans l'effet protumoral de FIH.

II. Résultats

Nous avons essentiellement utilisé, dans cette étude, des lignées cellulaires cancéreuses humaines (cellules d'adénocarcinome de colon LS174, et de mélanome A375), modifiées génétiquement pour surexprimer ou pour invalider FIH (par shRNA), de façon inductible, en présence de tétracycline (système Tet-OFF).

Dans une première partie de l'étude, nous avons démontré que dans le contexte d'un gradient naturel d'oxygène (sphéroïdes *in vitro* ou xénogreffes *in vivo*), FIH module la distribution des protéines dont le gène est induit par le C-TAD de HIF1 (tel que CAIX). La surexpression de FIH restreint l'expression de ces gènes dans des zones encore plus sévèrement hypoxiques alors que son invalidation permet au contraire l'expression de ces gènes dans des zones d'hypoxie modérée.

Dans une seconde partie de cette étude, nous avons mis en évidence pour la première fois des effets protumoraux de FIH. Nous avons montré que son invalidation inductible par shRNA inhibe la prolifération cellulaire *in vitro* et la croissance tumorale des cellules LS174 et A375, alors que sa surexpression produit un effet opposé. Enfin, nous avons déterminé que réduire l'expression de FIH conduit à une activation de p53 *in vitro* et *in vivo* et que ce mécanisme est responsable de l'effet antiprolifératif observé, puisque des cellules mutées ou Knock-out pour p53 (MEFp53^{-/-}, Hep3B,..) ne répondent plus à la manipulation de l'expression de FIH *in vitro*.

Ces résultats suggèrent un rôle important de FIH dans le développement tumoral par la régulation de l'activité de HIF1 et l'inhibition du suppresseur de tumeurs p53.

ORIGINAL ARTICLE

The asparaginyl hydroxylase factor-inhibiting HIF is essential for tumor growth through suppression of the p53–p21 axis

J Pelletier^{1,3}, F Dayan^{1,2,3}, J Durivault¹, K Ilc¹, E Pécou², J Pouyssegur¹ and NM Mazure¹

¹Institute of Developmental Biology and Cancer Research, University of Nice Sophia-Antipolis, CNRS-UMR 6543, Nice, France and ²Laboratoire J-A Dieudonné, University of Nice Sophia-Antipolis, CNRS-UMR 6632, Parc Valrose, Nice, France

We showed previously that factor-inhibiting hypoxia-inducible factor HIF (FIH) monitors the expression of a spectrum of genes that are dictated by the cell's partial oxygen pressure. This action is mediated by the C-TAD, one of two transactivation domains (TADs) of the hypoxia-inducible factor. Here, we questioned: (1) the function of FIH as a HIF-1 modulator of gene expression in the context of a physiological oxygen gradient occurring in three-dimensional cultures and in tumors and (2) the role of FIH as a modulator of the growth of human tumor cells. We first showed that the expression pattern of HIF target genes that depend on the C-TAD, such as carbonic anhydrase IX, was spatially displaced to more oxygenated areas when FIH was silenced, whereas overexpression of FIH restricted this pattern to more hypoxic areas. Second, we showed that silencing *fih* severely reduced *in vitro* cell proliferation and *in vivo* tumor growth of LS174 colon adenocarcinoma and A375 melanoma cells. Finally, silencing of *fih* significantly increased both the total and phosphorylated forms of the tumor suppressor p53, leading to an increase in its direct target, the cell cycle inhibitor p21. Moreover, p53-deficient or mutant cells were totally insensitive to FIH expression. Thus, FIH activity is essential for tumor growth through the suppression of the p53–p21 axis, the major barrier that prevents cancer progression.

Oncogene (2012) 31, 2989–3001; doi:10.1038/onc.2011.471; published online 17 October 2011

Keywords: FIH; HIF-1; hypoxia; p53; tumor growth

Introduction

The hypoxia-inducible factor (HIF) is the master regulator of adaptation to the hypoxic microenvironment within tumors. This transcription factor is a powerful stimulator of critical processes of tumor

development, such as angiogenesis, the metabolic switch, inflammation and invasion (for review see Pouyssegur *et al.*, 2006; Dayan *et al.*, 2008; Semenza, 2010). These processes are mediated through the induction of a repertoire of HIF target genes. About a hundred genes are driven by HIF (Manalo *et al.*, 2005). The rapid turnover of the HIF- α protein, the subunit regulated by oxygen, is due to one of two oxygen sensors that control HIF- α stability and transcriptional activity: the HIF-prolyl-hydroxylase domain proteins (PHDs; Jaakkola *et al.*, 2001) and the asparaginyl hydroxylase, known as factor-inhibiting HIF-1 (FIH-1 or FIH; Mahon *et al.*, 2001; Lando *et al.*, 2002a, b), respectively. Interestingly, HIF- α possesses two distinct transactivation domains (TADs), the C-terminal TAD (C-TAD) and the N-terminal TAD (N-TAD). However, FIH specifically hydroxylates only a single asparaginyl (Asn) residue within the C-terminal part, which modifies the HIF activity by impairing its interaction with the coactivators p300/CBP (Ema *et al.*, 1997; Flamme *et al.*, 1997; Hogenesch *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 1997; Wiesener *et al.*, 1998; O'Rourke *et al.*, 1999; Mahon *et al.*, 2001; Lando *et al.*, 2002a). Importantly, the N-TAD is not affected by FIH (Lisy and Peet, 2008).

Tumors contain variable oxygen gradients that form between adjacent capillaries. Within this microenvironment, the relative contribution of the two hydroxylases, which require oxygen for activity, remains to be clarified. The estimated K_m values for oxygen for the PHDs and FIH *in vitro* are quite different: 250 and 90 μM , respectively (Koivunen *et al.*, 2003). Consistent with this work, a recent study showed in *in vivo* experiments, using the endogenous human HIF-1 α protein, that both prolyl hydroxylation was more sensitive to inhibition to hypoxia (Hx) than asparaginyl hydroxylation (Tian *et al.*, 2011). Thus, the PHD activity should be more sensitive to a moderate decrease in oxygen compared with that of FIH. Unlike the PHDs that are inactivated in relatively mild Hx, FIH requires more drastic hypoxic conditions to be inactivated. Consequently, a sequential derepression of the TAD activity in a gradient of oxygen was hypothesized and modeled (Dayan *et al.*, 2006). In moderate Hx, HIF- α would be stabilized and the N-TAD active; however, the C-TAD would still be repressed by FIH. In severe Hx, the C-TAD would be activated, as FIH would be inactive. Thus, compared with the PHDs, FIH has

Correspondence: Dr NM Mazure, Institute of Developmental Biology and Cancer Research, University of Nice Sophia-Antipolis, CNRS-UMR 6543, Centre A Lacassagne, 33 Avenue de Valombrose, 06189 Nice, France.

E-mail: Nathalie.Mazure@unice.fr

³These authors are co-first authors.

Received 18 April 2011; revised 9 August 2011; accepted 7 September 2011; published online 17 October 2011

a more subtle effect. We demonstrated previously that FIH does not act as a pure inhibitor of HIF- α but rather as a discriminator between two repertoires of HIF targets: N-TAD sensitive (for example, Bcl-2/E1B 19-kDa-interacting protein 3 (*bnip3*) and *pgk1*) and C-TAD sensitive (for example, *ca9* and *phd3*; Dayan *et al.*, 2006). FIH drives the repression/activation of the C-TAD subset as a function of the oxygen concentration; therefore, it should theoretically control a shift between the two categories of genes in the context of a physiological oxygen gradient, from a blood vessel to the core of the tumor tissue (Dayan *et al.*, 2009).

In this study, we investigated three major points (1) the role of FIH in *HIF*-dependent gene expression, analyzed in the context of spheroids and tumor xenografts in which a natural oxygen gradient is present, (2) the impact of FIH (short hairpin RNA (shRNA) knockdown or overexpression) on cell proliferation *in vitro* and on tumor growth (LS174 colon carcinoma and A375 melanoma cells) and (3) the effect of FIH on expression of proteins regulating cell proliferation *in vitro*. We showed (1) a strong FIH-dependent spatial distribution of gene expression along an oxygen gradient, (2) an unexpected pro-tumoral action of FIH *in vivo* and *in vitro* and (3) a decrease in cell proliferation when the FIH activity was diminished either with small interfering RNA, which occurred *via* activation of the p53–p21 axis. Therefore FIH activity is essential for optimal tumor growth through the suppression of the p53–p21 axis.

Results

FIH modulates the profile of HIF downstream genes: predictions from a biomathematical model

To question the theoretical impact of FIH on both the N-TAD and C-TAD of HIF-1, we used a mathematical approach. This approach theorized on how FIH modulates the HIF spectrum of genes in a virtual oxygen gradient (Dayan *et al.*, 2006, 2009). Theoretical gene induction curves are shown in Figure 1a. Endogenous FIH expression was arbitrarily given the value of 100 (FIH = 100), FIH knockdown 10 (FIH = 10) and potential knockout of FIH 0 (FIH = 0). The black and red curves represent N-TAD ($q = 0$) and N + C-TAD ($q = 1.5$) gene stimulation, respectively, and were plotted as a function of the oxygen concentration. When endogenous FIH expression was total, 50% induction of N + C-TAD genes was obtained at 1% O₂, whereas 50% induction of N-TAD genes was obtained at 12% O₂ (Figure 1a, top graph). As the expression of FIH decreased, the N + C-TAD curve tended to converge toward the N-TAD curve (that is, displaced to mildly hypoxic areas; Figure 1a, middle/bottom graphs). We then modeled oxygen penetration into spheroids using a color code: red for maximal oxygenation and blue for Hx (Figure 1b). In this theoretical spheroid, black and red circles symbolized the location of C-TAD-insensitive (N-TAD gene) and C-TAD-sensitive (N + C-TAD gene)

gene expression, respectively, indicating their '50%-activity threshold' obtained previously.

This mathematical model clearly shows that FIH progressively 'derepresses' the C-TAD spectrum of genes along a decreasing O₂ gradient (Figure 1b). C-TAD- and N-TAD-sensitive genes should react in opposite directions in response to FIH. Numerical simulation predicts that C-TAD-sensitive genes should be relocalized to drastic hypoxic regions (center of the spheroid) following overexpression of FIH. In a symmetrical way, these genes should be shifted to mildly hypoxic areas of the spheroid (periphery) following inhibition of FIH with small interfering RNA. This model is in agreement with that anticipated previously (Dayan *et al.*, 2006, 2009): the oxygen sensor FIH is a spatial modulator of *HIF* target gene expression *in silico*. We then challenged this model in a more physiological context of three-dimensional cell cultures using spheroids and tumors in which there exists an oxygen and nutrient gradient.

FIH modulates the profile of HIF target genes in a physiological oxygen gradient: the in vitro spheroid model
We explored the effect of modulation of FIH expression in tumor spheroids containing a natural oxygen gradient *in vitro*. Human colon adenocarcinoma HT29 cells were grown in three-dimensional culture in suspended droplets (Supplementary Figures S1a and b; Chiche *et al.*, 2009). We also obtained a stable HT29 cell population expressing shRNA-FIH (HT29-shFIH), in which the expression of FIH was repressed by more than 90% compared with the control (HT29-control; Supplementary Figure S1c).

The expression of HIF-1 α in three-dimensional HT29 spheroids was examined (Figure 2a, I and III). The yellow dotted line delimits the threshold of the spatial distribution of HIF-1 α (Figure 2). Several layers of cells on the periphery did not label for HIF-1 α expression in the presence (HT29-control FIH) or absence of FIH (HT29-shFIH), confirming that FIH did not control HIF-1 α expression. The Hx-induced genes *ca9* and *bnip3* were examined, as we showed previously that these genes were N + C-TAD- and N-TAD-sensitive genes, respectively (Dayan *et al.*, 2006). Although the spatial distribution of carbonic anhydrase IX (CAIX) was similar to that of HIF-1 α in the presence of endogenous FIH (Figures 2a, II, and b, VI versus Figure 2a, I), silencing of *fiH* (HT29-shFIH) strongly modulated the CAIX distribution in spheroids (Figure 2a, IV versus Figure 2b, VIII). CAIX was expressed beyond the HIF-1 α threshold. The spatial distribution of BNIP3 did not change in the presence (HT29-control; Figure 2b, V) or absence (HT29-shFIH; Figure 2b, VII) of the FIH protein.

As predicted by the mathematical model (Figure 1), expression of the N + C-TAD gene (in red; that is, *ca9*) is clearly dependent on FIH expression, whereas expression of the N-TAD gene (in black; that is, *bnip3*) was retained even in the presence (HT29-control) or the absence (HT29-shFIH) of FIH expression. Thus, the

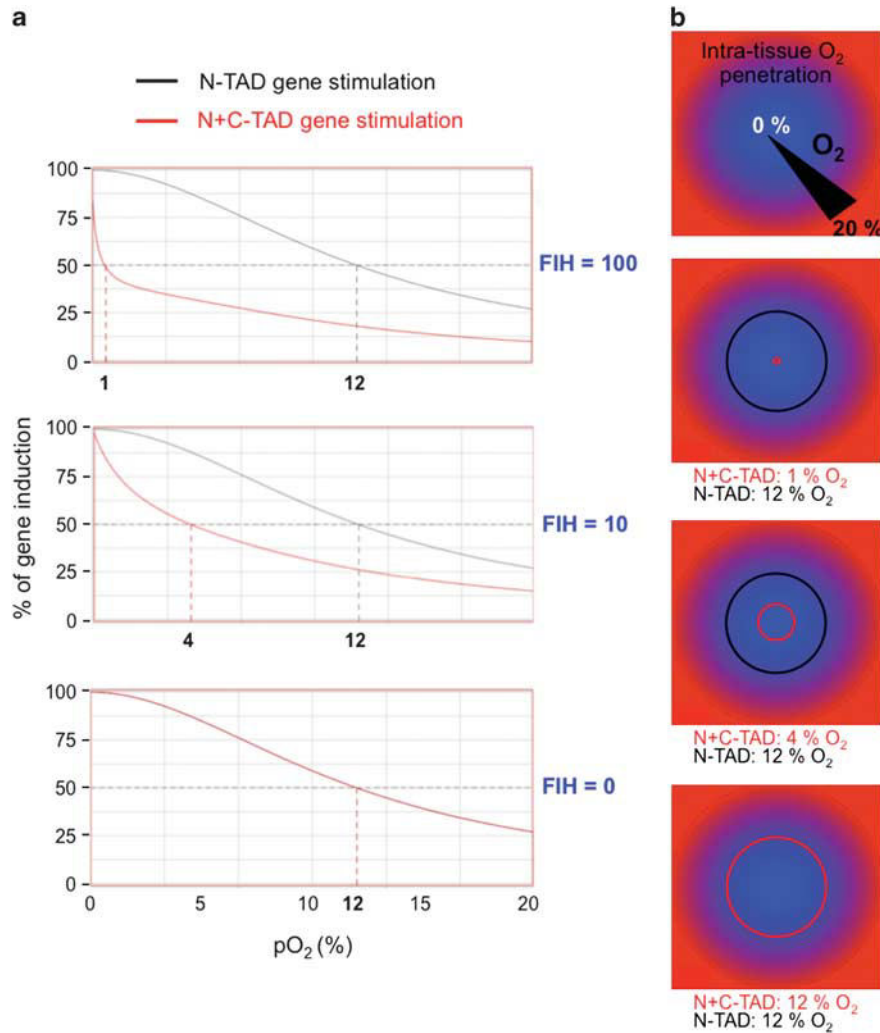


Figure 1 Silencing of *fih* modified the spatial distribution of *HIF*-target genes *in silico*. (a) Silencing of *fih* displaced the expression curves of *C-TAD*-sensitive genes from highly hypoxic areas to mildly hypoxic areas. Screenshots of numerical simulation were made with Xdim. Red curves: *N+C-TAD* gene ($q=1.5$). Black curves: *N-TAD*-only gene ($q=0$). FIH expression is reduced from 100 (arbitrary value) to 10 and 0. All other parameters correspond to the set of parameters obtained in Dayan *et al.* (2009) and fitted to biological data. Induction of half of the genes (that is, the percentage O_2 corresponding to 50% of gene expression) is reported under each curve. (b) Silencing of *fih* displaced the localization of the expression of *C-TAD*-sensitive genes in a virtual spheroid. Screenshots of numerical simulation were made with Xdim. Color code: blue, hypoxic; red, normoxic. Oxygen diffusion and consumption are taken into account in this representation. Red circle: 50% induction of an *N+C-TAD* gene ($q=1.5$). Black circle: 50% induction of an *N-TAD*-only gene ($q=0$). The three representations correspond to the three graphs in a, for FIH = 100, 10 and 0.

FIH activity can change the localization of CAIX expression in modulating the HIF-1 activity without changing the pattern of HIF-1 α expression.

FIH modulates the profile of HIF target genes in a physiological oxygen gradient in in vivo xenografts

We questioned the *in vivo* consequences of FIH expression on spatial modulation of *HIF* target genes in tumors. Clones from a cell line expressing the tetracycline (Tet) repressor were analyzed: human colon carcinoma LS174 cells (Dayan *et al.*, 2006). We used the Tet-inducible system to either silence *fih* with shRNA (LS174-shFIH) or to overexpress *fih* with a pTREX-FIH-expressing vector (LS174-pFIH; Figure 3a). We

first compared the spatial distribution of HIF-1 α with the *C-TAD*-sensitive HIF target CAIX in xenograft tumors (Figures 3b and c). Tumor sections from mice injected with LS174-control (doxycycline (Dox)-untreated mice), cells silenced for *fih* (LS174-shFIH; Dox-treated mice) or cells overexpressing FIH (LS174-pFIH; Dox-treated mice) were analyzed by immunohistochemistry (HIF-1 α) and immunofluorescence (CAIX) on the same tumor section (Figure 3b). The dashed yellow zone indicates the limit of expression of HIF-1 α . Comparison of LS174-control (Figure 3b—I, II) with LS174-shFIH (Figure 3b—III, IV) clearly indicates that suppression of FIH induces a much wider spatial expression of CAIX, extending beyond the yellow line into more oxygenated areas. This enlarged pattern

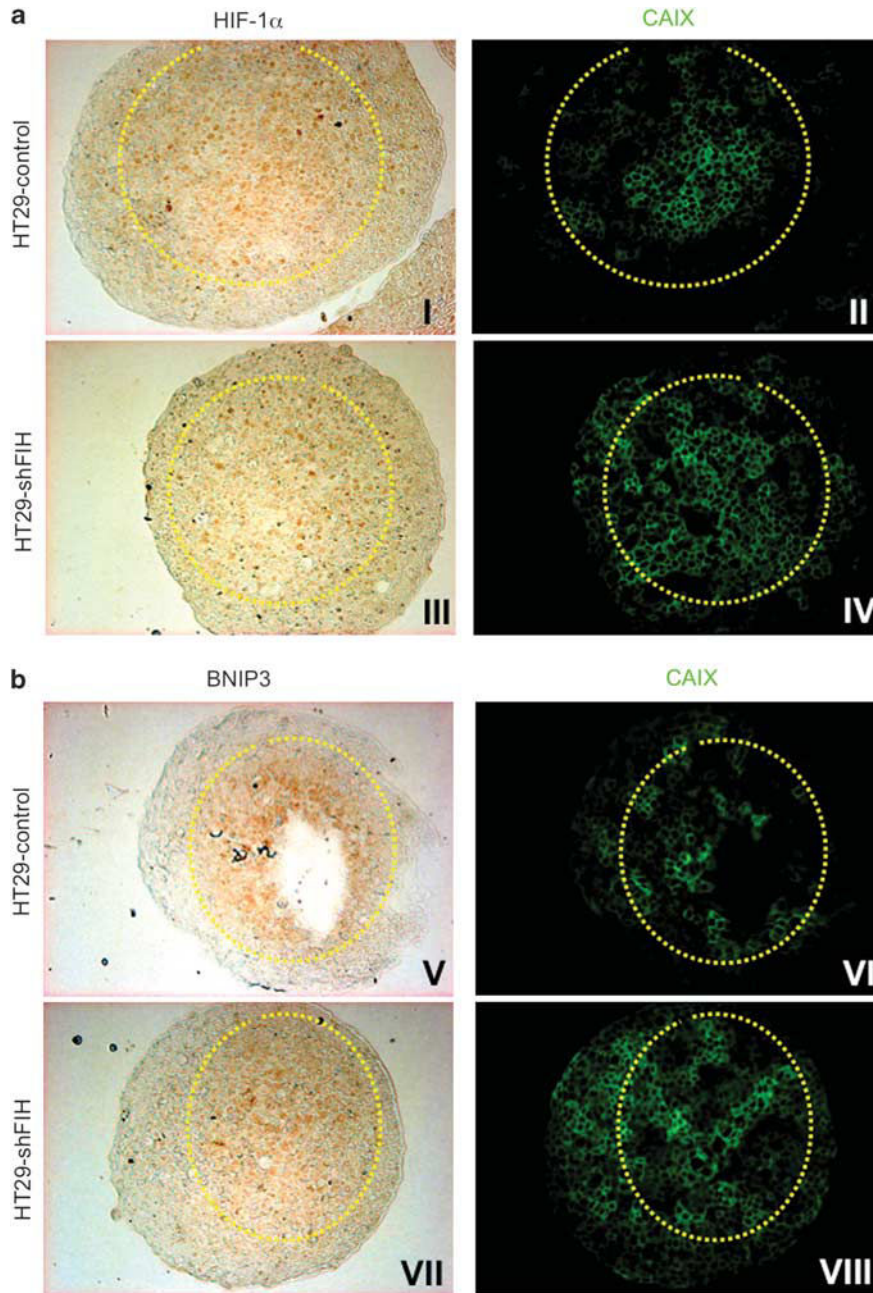


Figure 2 Silencing of *fiH* modified spatial distribution of *HIF*-target genes in HT29 three-dimensional (3D) spheroids. (a) Silencing of *fiH* modified the spatial distribution of CAIX in HT29 3D spheroids. HT29 wt cells with endogenous *fiH* (HT29-control, I and II) or a HT29 clone silenced for *fiH* (HT29-shFIH, III and IV) were cultured as 3D spheroids for 14 days. Sections of spheroids of the same size were stained for nuclear expression of HIF-1 α (I and III) or for membrane expression of CAIX (II and IV). Co-staining of spheroid sections was done first using the immunofluorescence protocol for CAIX, followed by immunohistochemistry for HIF-1 α . Magnification $\times 20$. The yellow dotted line represented maximal threshold expression of BNIP3. (b) Silencing of *fiH* did not modify the BNIP3 spatial distribution in 3D spheroids. The HT29 wt cell lines with endogenous *fiH* (HT29-control, V and VI) or the HT29 clones silenced for *fiH* (HT29-shFIH, VII and VIII) were cultured as spheroids for 14 days. Sections of spheroids of the same size were stained for mitochondrial expression of BNIP3 (V and VII) or for membrane expression of CAIX (VI and VIII). Co-staining of spheroid sections was done first using the immunofluorescence protocol for CAIX, followed by immunohistochemistry for BNIP3. Magnification $\times 20$. The yellow dotted line represented maximal threshold expression of HIF-1 α . Data represent an average of 20 spheroids for each condition.

of CAIX expression contrasts with the more restricted pattern of CAIX expression when FIH is over-expressed (LS174-pFIH; Figure 3b—V, VI). Immunohistochemical staining for BNIP3 was also performed

on these sections (Figure 3c—VII, VIII). Nevertheless, the results were harder to interpret because of the weak punctuate signal for BNIP3. However, the trend was the same as that observed in spheroids: BNIP3 (C-TAD

insensitive) behaved in an opposite manner to CAIX (C-TAD sensitive), and was not retained in severely hypoxic areas by FIH expression (Figure 3c—IX, X versus Figure 3c—XI, XII). These results clearly confirmed that the function of FIH is not simply to inhibit HIF-1 α activity but rather to determine the spatial expression of the *N*- and *C-TAD* spectrum of genes, and more precisely to retain the expression of the C-TAD subset in highly hypoxic zones.

FIH enhances tumorigenesis

Although we were looking at differences in the spatial distribution of *HIF*-targeted genes in LS174-shFIH and LS174-pFIH xenografts, we observed a significant difference in tumor size between LS174-control and LS174-sh/pFIH tumors. A second Tet-inducible cell line, human melanoma A375Tr cells, either silenced for FIH or overexpressing FIH was compared with LS174 cells (Figure 3d). Athymic mice were subcutaneously injected with Tet-inducible LS174-shFIH, A375-shFIH (Figure 3e), LS174-pFIH or A375-pFIH cells (Figure 3f). Dox had no significant effect on tumor growth of control cells as shown previously (Chiche *et al.*, 2009). However, Dox-induced silencing of *fiH* showed a substantial decrease in tumor growth (60%) in both LS174-shFIH and A375-shFIH tumor xenografts (Figure 3e). Similar results were obtained with two independent shRNA to FIH sequences derived from a pLKO.1 vector in a lentivirus system (Supplementary Figure S2a). The mRNA level of *fiH* in these tumors confirmed 70% and 85% silencing of *fiH* in the silenced LS174-shFIH and A375-shFIH clones, respectively, when Dox was added (Supplementary Figure S2b). In contrast, tumor xenografts overexpressing *fiH* showed a substantial increase in tumor growth for both LS174-pFIH and A375-pFIH tumors of a 1.5- and 3.6-fold increase, respectively (Figure 3f). We confirmed that *fiH* was overexpressed 7-fold in LS174-pFIH and 14-fold in A375-pFIH tumor xenografts (Supplementary Figure S2c). These results highlighted a new role for FIH in the control of tumor growth.

FIH enhances proliferation *in vitro*

We next tested the *in vitro* impact of FIH on proliferation and cell death using LS174-shFIH cells (Figure 3). The cell number in normoxia (Nx), without Tet (LS174-control), observed on day 7 increased significantly compared with Nx in the presence of Tet (FIH⁻; Figure 4a). In Hx without Tet, the cell number was comparable to that obtained in Nx without Tet (FIH⁻). A significant but slight decrease in the cell number was observed in Hx in the presence of Tet (FIH⁻). No impact on proliferation was observed in the presence of Tet for the two negative controls, LS174-shEV (empty vector, data not shown) and LS174-shSIMA (control sequence, Supplementary Figure S3a). A colony-forming assay was performed to evaluate whether *fiH* silencing inhibited LS174 cell proliferation or increased cell death (Figure 4b and Supplementary Figure S2d). After 10 days of Tet, proliferation was

dramatically decreased in both Nx and Hx, which reinforced the previous results. The control LS174-shSIMA showed no difference (Supplementary Figure S3b). The *fiH* silencing only slightly induced cell death in both Nx and Hx, but this never reached more than 6% of cell death even after 7 days of culture (Figure 4c). Taken together, these results indicate that FIH silencing significantly decreased proliferation *in vitro* of LS174 cells in both Nx and Hx. These results are very similar to those observed for spheroids and *in vivo* experiments, which validates the *in vitro* model.

Large-scale screening of cancer-related gene expression following modulation of FIH

Immunostaining of tumor sections or spheroids showed that the expression of the HIF target CAIX was influenced by FIH. However, the expression of CAIX cannot explain the pro-tumorigenic effect of FIH, as silencing of FIH suppressed tumor growth, whereas expression of CAIX favored tumor growth (Chiche *et al.*, 2009). We thus looked at the expression of the mRNA of 96 genes involved in different processes engaged in tumor progression (Cancer PathwayFinder PCR array from SABioscience (Frederick, MD, USA) including *HIF*-dependent and *HIF*-independent genes): angiogenesis (*angpt1*, *angpt2*, *ifn α 1*, *pdgfa*, *pdgfb*, *tgfb1* and *vegfa*), cell senescence and apoptosis (*apaf1*, *bad*, *casp8*, *cflar*, *tert*, *tnfrsfA* and *tnfrsf25*), invasion and metastasis (*met*, *mmp1*, *plaur* and *serpinb5*), signal transduction and transcription factors (*erb2*, *ets2*, *jun* and *sncg*), cell cycle control and DNA damage repair (*atm*, *brca1*, *cdkn1a*, *rb1* and *tp53*) and adhesion (*itga2*, *itga3*, *itgb1* and *pnn*; Table 1). The expression of these genes in Nx, which was given a reference value of 1.0, was first compared with that in Hx to confirm or identify *HIF*-target genes in LS174-shFIH cells in the absence of Tet, that is, with endogenous FIH expression. Gene expression in Nx and Hx was then examined in the presence of Tet (Nx FIH⁻ and Hx FIH⁻), that is, without expression of FIH (Table 1). Only genes that were influenced by Hx or FIH are shown. Interestingly, not all the *FIH*-sensitive genes were under the direct control of Hx. *Angpt2*, *ifn α 1*, *pdgfa*, *pdgfb*, *apaf1*, *tnfrsfA*, *tnfrsf25*, *plaur*, *cdkn1a*, *erb2*, *jun*, *sncg* and *itga3* were not induced after 48 h of Hx, whereas they all responded to *fiH* silencing in both Nx and Hx. However, FIH modified quantitatively the spectrum of Hx-induced genes, including *angpt1*, *vegfa*, *bad*, *casp8*, *cflar*, *met*, *mmp1*, *serpinb5*, *brca1*, *tp53*, *itga2* and *itgb1*. However, *tgfb1* and *pnn* were only sensitive to *fiH* silencing in Hx, whereas *rb1* was only sensitive to *fiH* silencing in Nx. Finally, only two genes (*tert* and *ets2*) showed a decrease in expression in the absence of *fiH* in both Nx and Hx.

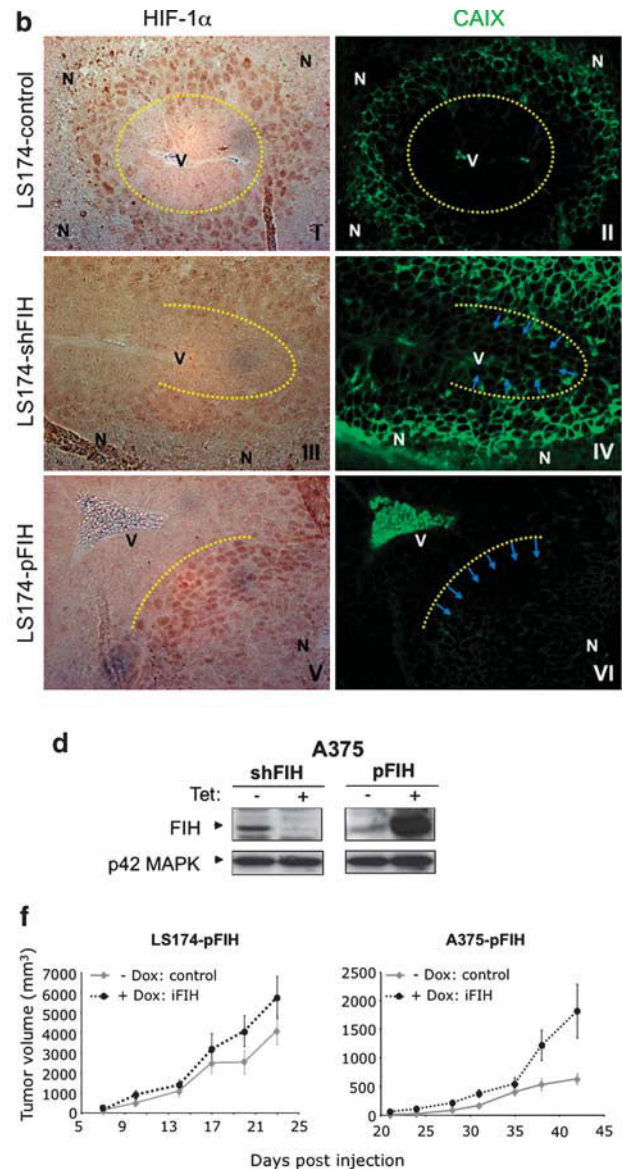
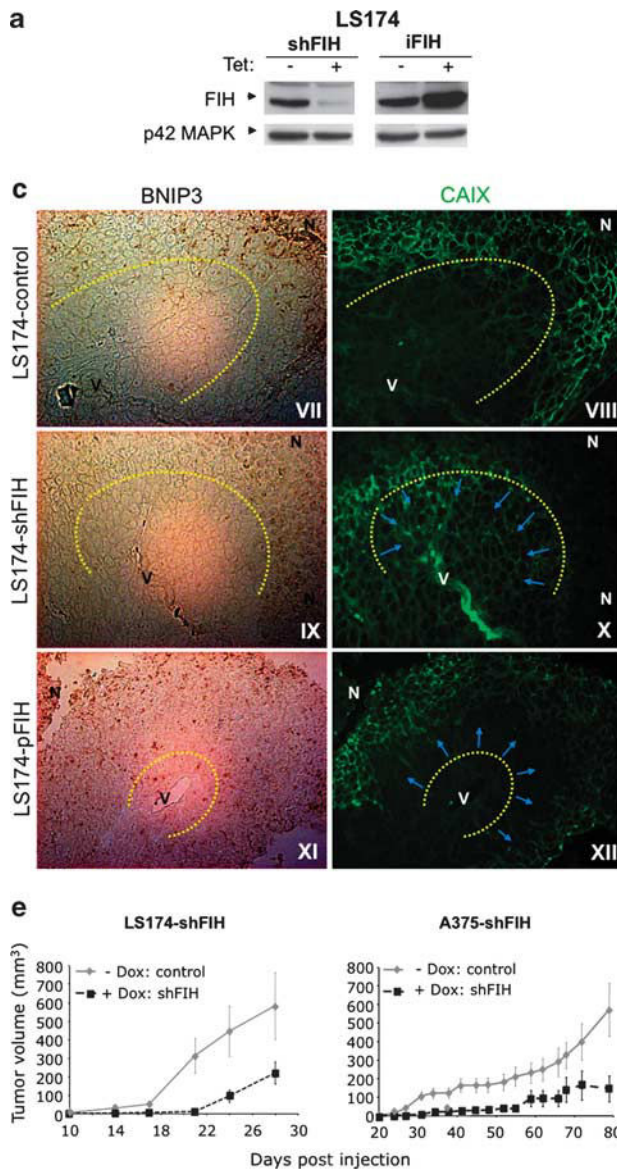
FIH controls *in vitro* p53 expression

We decided first to focus on *tert*, the telomerase reverse transcriptase, as telomerase deficiency induces senescence (Newbold, 2002). Moreover, the catalytic subunit of the enzyme telomerase is robustly expressed in cancer

cells, conferring on these cells an ability to proliferate. A decrease in the mRNA level of *tert* was confirmed by semiquantitative and quantitative PCR when *fih* was silenced in both Nx and Hx (data not shown). However, the decrease in cell proliferation observed in LS174-shFIH cells when *fih* was silenced in the presence of Tet was not alleviated by overexpression of *Tert*, thus suggesting that the decrease in *Tert* expression was not responsible for inhibition of cell proliferation.

We then looked at the key protein p53, as it is known to respond to various types of stress signals by activating specific transcriptional targets that control cell cycle arrest and apoptosis (Vousden and Prives, 2009). Moreover, numerous studies provide *in vitro* evidence supporting a direct interaction between p53 and HIF (Fels and Koumenis, 2005). The array data indicated that *tp53* was induced in Hx and further induced when *fih* was silenced (Table 1). However, comparable levels of expression of *tp53* mRNA, in LS174-shFIH cells,

were detected in Nx and Hx in the absence or presence of Tet, when quantitative PCR was performed, which is not in favor of possible transcriptional regulation of *tp53* by FIH (Figure 5a). However, silencing of *fih* in both Nx and Hx induced p53 expression (total p53) at the protein level (Figure 5b). A slight but reproducible increase in the phosphorylated form of p53 (p53-P) was observed in Nx but not in Hx. p21, the direct target of p53, which mediates cell cycle arrest, was used as a readout of the p53 activity. As expected, p21 expression followed the p53 activity: increased when *fih* was silenced in Nx and increased in Hx. However, an increase in p21 expression was not observed in Hx when *fih* was silenced; nor a slight impact on total p53, p53-P and p21 was observed in the presence of Tet for the control LS141-shSIMA (Supplementary Figure S3c). These results already suggest a potential role of p53 in tumor growth enhanced by FIH. To confirm this, we used nutlin-3 (nutlin), a potent inhibitor of the inter-



action of murine double-minute type 2 (Mdm2) with p53. As Mdm2 promotes the degradation of p53, p53 is induced and consequently proliferation is inhibited in the presence of nutlin. Several concentrations (0–0.1–0.3–1 μM) of nutlin were tested in both Nx and Hx, and endogenous expression of HIF-1 α , total p53, p53-P, p21 and FIH was examined (Figure 5c). In Nx, total p53, p53-P and p21 expression was dependent on the nutlin concentration. In contrast, in Hx, the expression of total p53, p53-P and p21 increased substantially at 0.1 μM of nutlin, whereas it decreased rapidly with 0.3–1 μM . Total p53 and p53-P were slightly induced when cells were subjected to Hx for only 8 h. We thus decided to use the nutlin concentration that gave a similar level of induction of p53 (1 μM in Nx versus 0.3 μM in Hx) and a comparable concentration in both Nx and Hx (1 μM). In Nx, nutlin was able to block proliferation to a similar extent to that obtained when *fiH* was silenced (Figure 5d). However, proliferation was slightly reduced in Hx with 0.3 and 1 μM of nutlin. Moreover, nutlin-induced p53 did not induce cell death in this model (Supplementary Figure S4) but decreased proliferation, as did silencing of FIH. Similar results were obtained in clonogenic assays of LS174-shFIH cells when endogenous FIH was expressed (Figure 5e, –Tet). The results with respect to proliferation were similar when FIH silencing was compared with nutlin. These results reinforce the idea that p53 potentially regulates control of proliferation through FIH. Murine embryonic fibroblasts, either p53 wild type (+/+) (wt) or p53 deficient (p53–/–; Figure 5F), human cancer cells expressing wt p53 (p53 wt; LS174-shFIH and human melanoma SkMel-28; Figures 4a and 5g, h) and cells

with mutated p53 (human hepatoma Hep3B and human prostate carcinoma DU145; Figures 5g, h) were silenced for *fiH*. The *fiH* silencing in p53 wt cells (Figures 5f–h) was similar to that obtained in LS174-shFIH cells (p53 wt; Figure 4a). However, silencing of *fiH* had no impact on proliferation in p53-deficient or mutated cells in Nx, thereby confirming the crucial role of p53.

FIH controls in vivo p53 expression

Tumor sections from mice injected with LS174-shFIH cells and given or not given Dox were analyzed by immunohistochemistry (p53 total). Figure 6a shows the expression of p53 under two conditions of FIH expression: endogenous FIH (–Dox, top) and FIH knockdown (+Dox, bottom) in LS174-shFIH cells. The dashed yellow zone indicates the limit of the tumor growth around a blood vessel (V). Comparison of treatment without or with Dox indicates that suppression of FIH induces higher expression of p53 wt in nuclei (insert). However, it was difficult to distinguish a clear pattern of expression from Nx (blood vessel, V) to drastic Hx. The two- to threefold induction of p53 expression observed in the absence of FIH expression can thus explain the decrease in *in vivo* tumor growth observed in Figure 3b. Moreover, these results were confirmed with KI-67 staining (Figure 6b). FIH knockdown (+Dox, bottom) in LS174-shFIH cells showed less proliferation than endogenous FIH (–Dox, top). There was no difference in cleaved caspase 3 between no Dox and Dox treatment, confirming that induction of p53 expression when *fiH* was silenced triggered a decrease in proliferation and not apoptosis (Figure 6c).

Figure 3 FIH promotes tumor growth. (a) Characterization of the FIH[–] and FIH⁺ Tet-inducible clones in LS174 (LS174-shFIH and LS174-pFIH) cell line. Cells were incubated in Nx in the absence (–) or presence (+) of Tet (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 7 days). Total cellular extracts were analyzed by immunoblotting with antibodies against FIH and p42MAPK. The latter was used as a loading control. (b) Silencing of *fiH* increased CAIX spatial distribution in xenografts. Expression of HIF-1 α and CAIX in hypoxic regions of tumor xenografts with endogenous *fiH* (LS174-control, I and II), silenced for *fiH* (LS174-shFIH, III and IV) or overexpressing for *fiH* (LS174-pFIH, V and VI) was examined. Sections of xenografts of the same size were stained for nuclear staining of HIF-1 α (I, III and V) or for membrane staining of CAIX (II, IV and VI). Co-staining of xenograft sections was done first using immunofluorescence for CAIX, followed by immunohistochemistry for HIF-1 α . N, necrosis; V, vessel. Magnification $\times 20$. (c) In contrast to CAIX, silencing of *fiH* did not change the spatial distribution of BNIP3 in xenografts. Immunohistochemistry of the expression of BNIP3 and CAIX in hypoxic regions of the corresponding tumor xenografts with endogenous *fiH* (LS174-control, VII and VIII), silenced for *fiH* (LS174-shFIH, IX and X) or overexpressing *fiH* (LS174-pFIH, XI and XII). Sections of xenografts of the same size were stained for mitochondrial staining of BNIP3 (VII, IX and XI) or for membrane staining of CAIX (VIII, X and XII). Co-staining of xenograft sections was done first using immunofluorescence for CAIX, followed by immunohistochemistry for BNIP3. Magnification $\times 20$. The yellow dotted line represented maximal threshold expression of HIF-1 α . (b, c) Immunohistochemistry and immunofluorescent staining is representative of the five tumors obtained in the absence of Tet and the five tumors obtained in the presence of Tet. (d) Characterization of the FIH[–] and FIH⁺ Tet-inducible clones in A375 (A375-shFIH and A375-pFIH) cell line. Cells were incubated in Nx in the absence (–) or presence (+) of Tet (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 7 days. Total cellular extracts were analyzed by immunoblotting with antibodies against FIH and p42MAPK. The latter was used as a loading control. (e) Characterization of the growth of FIH-deficient xenograft tumors. Seven days before injection of LS174-shFIH (left panel) and A375-shFIH (right panel), cells were incubated without (–Dox, grey line) or with (+Dox, dotted line) Dox to silence *fiH*. For the respective conditions, mice received or not Dox, a semisynthetic Tet, in the drinking water. Treatment was started 4 days before injection of cells. *In vivo* xenograft assays were performed by subcutaneously injecting into the back of athymic nude mice 1×10^6 viable and individual tumor LS174-shFIH–Dox (LS174-control), LS174-shFIH + Dox (FIH[–]), A375-shFIH–Dox (A375-control) and A375-shFIH + Dox (FIH[–]) cells. Xenograft growth was determined by measuring the tumor volume. Five mice were studied per condition. *In vivo* experiments were repeated twice. (f) Characterization of the growth of FIH-overexpressed xenograft tumors. Four days before injection of LS174-pFIH (left panel) and A375-pFIH (right panel), cells were incubated without (–Dox, grey line) or with (+Dox, dotted line) Dox to overexpress *fiH*. For the respective conditions, mice received or not Dox, a semisynthetic Tet, in the drinking water. Treatment was started 4 days before injection of cells. *In vivo* xenograft assays were performed by subcutaneously injecting into the back of athymic nude mice 1×10^6 viable and individual tumor cells LS174-pFIH–Dox (LS174-control), LS174-pFIH + Dox (FIH⁺), A375-pFIH–Dox (A375-control) and A375-pFIH + Dox (FIH⁺). Xenograft growth was determined by measuring the tumor volume. Five mice were studied per condition. *In vivo* experiments were repeated twice.

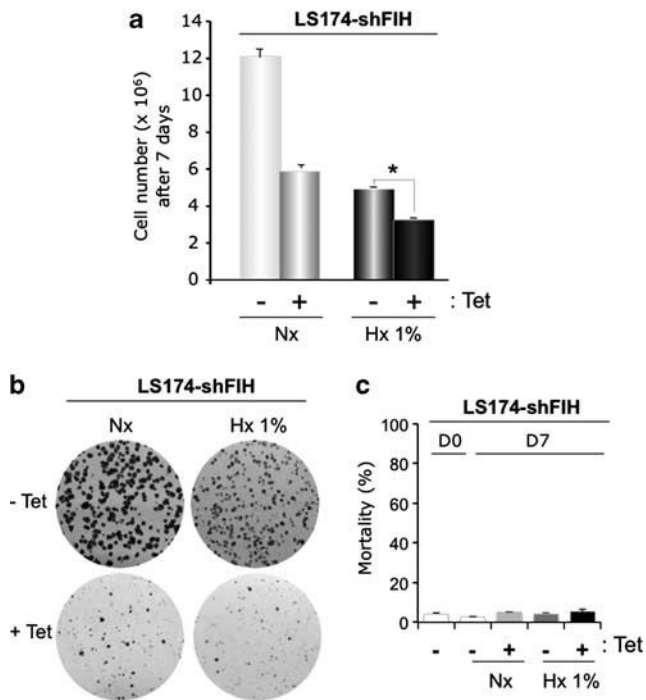


Figure 4 FIH silencing reduced proliferation *in vitro*. (a) Characterization of the growth of the LS174-shFIH cells. LS174-shFIH cells were preincubated in the absence (–) or presence (+) of Tet (10 µg/ml) for 10 days to silence *fiH* and then incubated in Nx or in Hx 1% O₂ (Hx 1%) in the absence (–) or presence (+) of Tet for 7 days. **P* < 0.005. (b) The viability assay of the Tet-inducible LS174-shFIH clone. Cells (5000) were seeded in 60-mm dishes. Once attached, cells were incubated 10 days in Nx or in Hx 1% in the absence (–) or presence (+) of Tet before staining for visualization of colonies. (c) Measurement of cell death in the LS174-shFIH clone. LS174-shFIH cells (50 000) were seeded in 60-mm dishes and cell death was measured after attachment (D0). LS174-shFIH cells were incubated in either Nx or Hx 1% in the absence (–) or presence (+) of Tet for 7 days before measuring cell death with trypan blue. Data represent the average of at least three independent experiments.

Discussion

We proposed previously that two different groups of HIF-target genes are regulated by FIH expression and thus dependent on the N-TAD or the C-TAD activity (Dayan *et al.*, 2006). Another independent study confirmed this proposal. The authors showed that *pgk1* is a specific target of the N-TAD in the context of exogenous expression of truncated HIF- α constructs (Hu *et al.*, 2007). Moreover, the N-TAD is essential to confer HIF-1 versus HIF-2 specificity of a given target (Hu *et al.*, 2007), which consolidates our proposal of two non-redundant TADs. Therefore, pharmacological inhibition of FIH, in renal cells constitutively expressing HIF-1 α , led to specific induction of C-TAD genes, such as *phd3* and *vegf*, but did not affect N-TAD genes, such as *pgk1* and *bnip3* (Yan *et al.*, 2007).

In the present report, we further explored the function of FIH *in vivo* by examining a physiological model system consisting of an intra-tissue tumor oxygen

gradient. We examined the function of FIH as a spatial modulator of the gene expression profile downstream of HIF. We now establish for the first time that FIH promotes tumor growth *in vivo* in both colon adenocarcinoma and melanoma cells. Silencing of *fiH* severely decreased the size of mice xenografts originating from two different cell lines (LS174 and A375), whereas overexpression of *fiH* increased tumor growth.

Has modulation of FIH expression been observed in cancer?

To date, no mutations in the gene coding for *fiH* have been identified (Morris *et al.*, 2004). However, these authors only investigated primary renal clear cell carcinoma (clear cell RCCs, papillary RCCs, and oncocytomas) and RCC cell lines. A systematic study of potential germline or somatic mutations in the gene for *fiH* in different types of human cancer would be of interest, as we demonstrated that FIH has an impact on tumorigenesis. Schodel *et al.* (2010) showed a distinct pattern of FIH expression in the kidney, with expression in distal tubules and podocytes that overlapped HIF expression. Interestingly, FIH controlled gene expression in a HIF-dependent manner in tubular cells, whereas in podocytes it controlled expression in a HIF-independent manner. This report reinforces the results of the present study that show that FIH controls a distinct pattern of genes. FIH expression is not regulated by Hx. However, it has been shown to be downregulated by miR-31 in head and neck squamous-cell carcinoma (Liu *et al.*, 2010) and by Mint3/APBA3, a member of the Mint protein family involved in the signaling and trafficking of membrane proteins in HEK293 cells and macrophages (Sakamoto and Seiki, 2009). As expected, downregulation of FIH triggered the activity of HIF. Furthermore, low nuclear FIH levels were correlated to poor overall survival, suggesting that it is an independent prognostic factor in clear cell RCC patients (Kroeze *et al.*, 2010). Few compounds have been tested to control FIH activity or expression in modulating tumor cell adaptation to Hx. Shin *et al.* (2008) have shown that bortezomib, a proteasome inhibitor used for the treatment of multiple myeloma and solid tumors, stimulated the interaction between the C-TAD and FIH in Hx. Attenuation of HIF-1-mediated hypoxic gene activation strongly repressed the induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) and erythropoietin (EPO), and could thus affect angiogenesis and hypoxic tumor adaptation of solid tumors. However, Kaluz *et al.* (2008) contested the universality of these results.

How does FIH act on tumor growth?

Analysis of spheroids (HT29 cells) and xenografts (LS174 and A375 cells) clearly showed a change in the spatial distribution of the N + C-TAD genes (that is, *ca9*) when *fiH* was silenced. N-TAD-sensitive genes (that is, *bnip3*) were not subjected to special modification. The spatial distribution of the expression of *pgk1*, another N-TAD-sensitive gene (Dayan *et al.*, 2006), was not modified by FIH expression (data not shown). The

Table 1 Silencing of *fih* modifies expression of *HIF* target genes involved in tumor growth in the LS174-shFIH clone

Angiogenesis			Apoptosis and Cell Senescence			Invasion and metastasis			Signal Transduction Molecules and Transcription Factors		
1.00	Nx	<i>angpt1</i>	1.00	Nx	<i>apaf1</i>	1.00	Nx	<i>met</i>	1.00	Nx	<i>erbB2</i>
2.00	Nx FIH ⁻		1.24	Nx FIH ⁻		7.37	Nx FIH ⁻		2.11	Nx FIH ⁻	
1.63	Hx		1.66	Hx		5.50	Hx		0.94	Hx	
3.08	Hx FIH ⁻		3.45	Hx FIH ⁻		17.57	Hx FIH ⁻		1.72	Hx FIH ⁻	
1.00	Nx	<i>angpt2</i>	1.00	Nx	<i>bad</i>	1.00	Nx	<i>mmp1</i>	1.00	Nx	<i>ets2</i>
1.51	Nx FIH ⁻		2.68	Nx FIH ⁻		6.18	Nx FIH ⁻		0.33	Nx FIH ⁻	
1.07	Hx		2.58	Hx		4.27	Hx		0.81	Hx	
2.06	Hx FIH ⁻		3.46	Hx FIH ⁻		11.25	Hx FIH ⁻		0.36	Hx FIH ⁻	
1.00	Nx	<i>ifna1</i>	1.00	Nx	<i>casp8</i>	1.00	Nx	<i>pleur</i>	1.00	Nx	<i>jun</i>
2.30	Nx FIH ⁻		3.66	Nx FIH ⁻		2.24	Nx FIH ⁻		0.84	Nx FIH ⁻	
1.22	Hx		2.54	Hx		1.02	Hx		0.73	Hx	
3.88	Hx FIH ⁻		4.61	Hx FIH ⁻		3.13	Hx FIH ⁻		3.48	Hx FIH ⁻	
1.00	Nx	<i>pdgfra</i>	1.00	Nx	<i>cflar</i>	1.00	Nx	<i>serpinb5</i>	1.00	Nx	<i>snog</i>
2.96	Nx FIH ⁻		2.95	Nx FIH ⁻		2.89	Nx FIH ⁻		5.47	Nx FIH ⁻	
0.72	Hx		4.23	Hx		3.01	Hx		0.94	Hx	
2.88	Hx FIH ⁻		6.73	Hx FIH ⁻		8.53	Hx FIH ⁻		6.18	Hx FIH ⁻	
1.00	Nx	<i>pdgfb</i>	1.00	Nx	<i>tert</i>	1.00	Nx	<i>Cell Cycle Control & DNA Damage Repair</i>	Adhesion		
4.00	Nx FIH ⁻		0.22	Nx FIH ⁻		1.00	Nx		1.00	Nx	<i>igf2</i>
1.34	Hx		0.50	Hx		1.42	Nx FIH ⁻		3.54	Nx FIH ⁻	
5.58	Hx FIH ⁻		0.11	Hx FIH ⁻		1.24	Hx		2.01	Hx	
1.00	Nx	1.00	Nx	2.16	Hx FIH ⁻	5.83	Hx FIH ⁻				
1.30	Nx FIH ⁻	<i>igfb1</i>	1.00	Nx	<i>tnfrsf1A</i>	1.00	Nx	<i>igf3</i>	1.00	Nx	<i>igb1</i>
2.89	Hx		1.42	Nx FIH ⁻		1.00	Nx		2.04	Nx FIH ⁻	
4.28	Hx FIH ⁻		1.24	Hx		2.84	Nx FIH ⁻		0.88	Hx	
1.00	Nx		2.16	Hx FIH ⁻		3.53	Hx		2.72	Hx FIH ⁻	
5.11	Nx FIH ⁻	<i>vegfa</i>	1.00	Nx	<i>tnfrsf25</i>	1.00	Nx	1.00	Nx	<i>pnn</i>	
4.88	Hx		2.43	Nx FIH ⁻		2.84	Nx FIH ⁻	6.26	Nx FIH ⁻		
12.26	Hx FIH ⁻		1.21	Hx		5.44	Hx FIH ⁻	7.42	Hx		
			3.35	Hx FIH ⁻		5.44	Hx FIH ⁻	25.61	Hx FIH ⁻		
						1.00	Nx	1.00	Nx		
						2.27	Nx FIH ⁻	6.26	Nx FIH ⁻		
						0.73	Hx	7.42	Hx		
						1.80	Hx FIH ⁻	25.61	Hx FIH ⁻		
						1.00	Nx	1.00	Nx		
						3.97	Nx FIH ⁻	0.91	Nx FIH ⁻		
						9.88	Hx	1.90	Hx		
						9.96	Hx FIH ⁻	3.18	Hx FIH ⁻		
						1.00	Nx				
						3.74	Nx FIH ⁻				
						3.39	Hx				
						6.92	Hx FIH ⁻				

Abbreviations: CI, confidence interval; FIH, factor-inhibiting HIF-1; HIF, hypoxia-inducible factor; Tet, tetracycline. Expression of the mRNA level of 31 out of the 96 genes involved in tumor progression (angiogenesis, cell senescence and apoptosis, invasion and metastasis, signal transduction molecules, cell cycle control and DNA damage repair, adhesion) was determined by real-time quantitative PCR in LS174-shFIH. These genes are included in the Cancer PathwayFinder PCR array (SABiosciences). Only genes that were influenced by hypoxia or FIH are shown, and the mean values of the screening of two independent PCR arrays, performed on complementary DNA from two independent experiments, are given. Hypoxic induction of each gene was first determined by comparing the mRNA levels in normoxia (Nx) and hypoxia (Hx 1% O₂, 24 h) using the LS174-shFIH clone in the absence of Tet. The sensitivity to FIH was then examined in LS174-shFIH cells in the presence of Tet (Nx FIH⁻ and Hx FIH⁻, respectively, in Nx and Hx).

■, ■ and ■ represent an increase in gene expression when *fih* was silenced. ■ and ■ represent a decrease in gene expression when *fih* was silenced.

Experiments were done in duplicate (two independent cell cultures). Results from one representative experiment. Each difference in gene expression was estimated within the limits of a 95% CI.

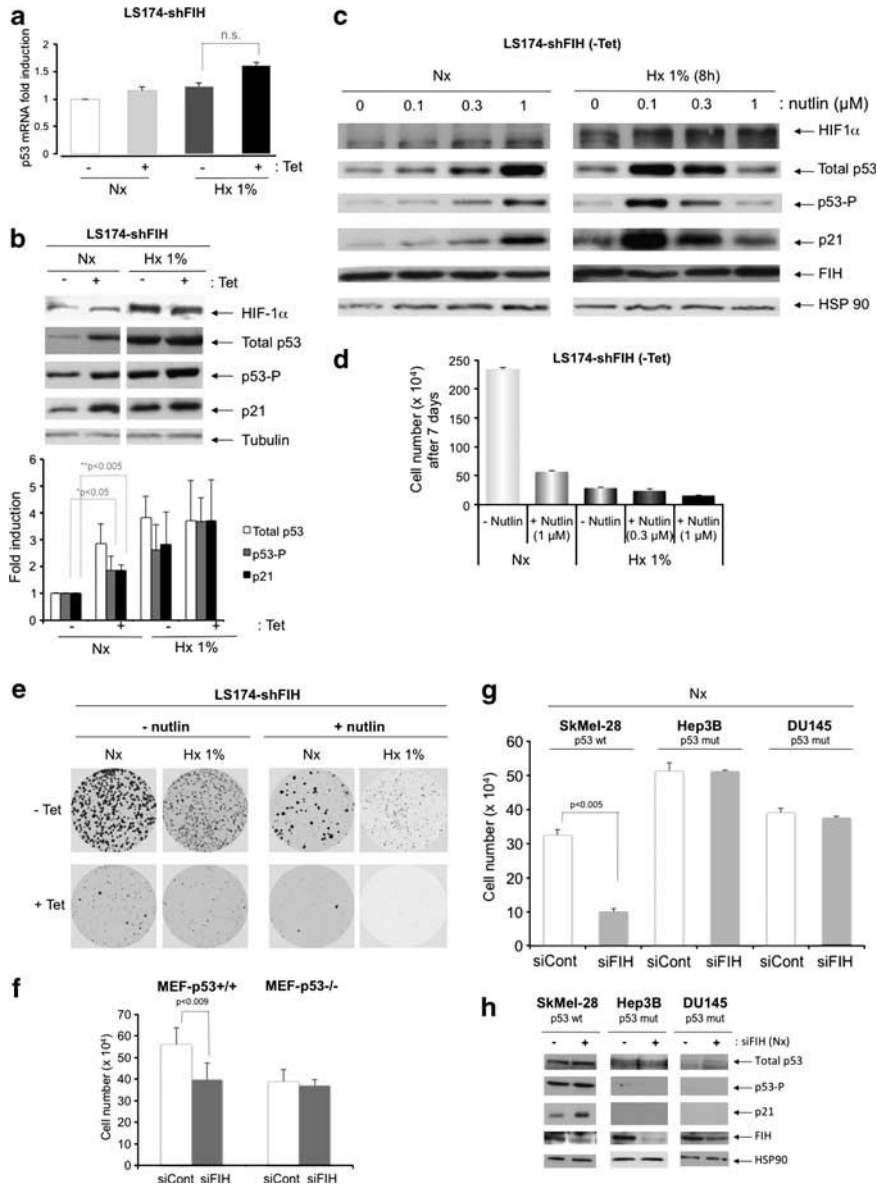


Figure 5 FIH promotes cell proliferation in Nx through the inhibition of p53 and p21 protein expression. **(a)** Expression of the mRNA of p53 in LS-shFIH cells exposed for 24 h to Nx or Hx 1% O₂ (Hx 1%) in the absence (-) or presence (+) of Tet (10 μg/ml). LS174-shFIH cells were either pretreated (+) or not (-) for 10 days with Tet to silence *fiH*. The level of *tp53* mRNA was determined by real-time quantitative PCR. Results are representative of at least two separate experiments with two different primers for *tp53*. **(b)** Total cellular extracts of LS174-shFIH cells exposed for 24 h to Nx or Hx 1% in the absence (-) or presence (+) of Tet (10 μg/ml), were analyzed by immunoblotting with antibodies against FIH, total p53, p53-P, p21, HIF-1α and tubulin. The latter was used as a loading control. **(c)** Total cellular extracts of LS174-shFIH incubated in Nx in the presence of dimethyl sulfoxide (0) or in the presence of 0.1, 0.3 or 1.0 μM of nutlin for 8 h were analyzed by immunoblotting with antibodies against FIH, total p53, phospho-p53 (p53-P), p21, HIF-1α and heat shock protein 90 (HSP90). The latter was used as a loading control. **(d)** Characterization of the growth of LS174-shFIH cells incubated in Nx or in Hx 1% for 7 days without Tet and in the absence (-) or presence (+) of nutlin (0.3 or 1.0 μM, for 7 days). **(e)** The viability assay of the LS174-shFIH cells in the absence (LS174-shFIH) or presence (LS174-shFIH + nutlin) of 1 μM nutlin. Cells (5000) were seeded in 60-mm dishes. Once attached, cells were incubated 10 days in Nx or in Hx 1% in the absence (-Tet) or presence (+Tet) of Tet before staining for visualization of colonies. Nutlin was added for 7 days. **(f)** Characterization of the growth of p53 wt murine embryonic fibroblast cells (MEF-p53+/+) compared with the p53-deficient MEF cells (MEF-p53-/-). The two cell lines were transfected with 50 nm of small interfering RNA (siRNA) to *fiH* and then incubated in Nx for 7 days. **(g)** Characterization of the growth of p53 wt melanoma SkMel-28 cells compared with the p53-mutated hepatocellular carcinoma Hep3B and prostate carcinoma DU-145 cells. The three cell lines were transfected with 50 nm of siRNA to *fiH* and then incubated in Nx for 7 days. **(h)** Total extracts of p53 wt SkMel-28 cells and p53-mutated Hep3B and DU-145 cells pretransfected with 50 nm of the control siRNA (-) or *fiH* siRNA (+) and incubated in Nx for 24 h. Immunoblotting with antibodies against FIH, p53 total, phospho-p53 (p53-P), p21 and HSP90 were then performed. The latter was used as a loading control. Data represent the average of at least three independent experiments.

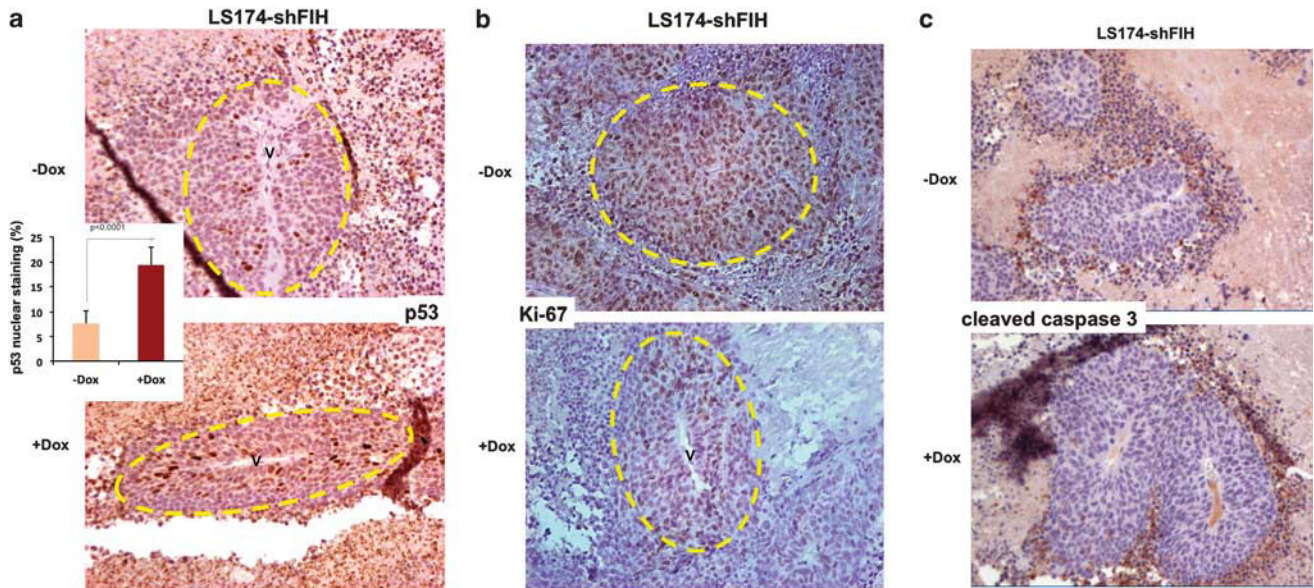


Figure 6 Silencing of *fih* increases p53 expression in xenografts. (a) Immunohistochemistry for the expression of p53 in tumor xenografts expressing endogenous *fih* (–Dox), or silenced for *fih* (+Dox). Serial sections of xenografts of the same size were stained for nuclear staining of p53. Magnification $\times 20$. Insert, stained nuclei of cells in the absence (–) or in the presence (+) of Dox were counted. (b) Immunohistochemistry of the expression of ki67 in tumor xenografts expressing endogenous *fih* (–Dox), or silenced for *fih* (+Dox). Magnification $\times 20$. (c) Immunohistochemistry of the expression of cleaved caspase 3 in tumor xenografts expressing endogenous *fih* (–Dox), or silenced for *fih* (+Dox). Magnification $\times 20$. All tumors have been tested.

expression of the *N+C-TAD* genes along a gradient of oxygen may contribute to both a decrease (*fih* silencing) or an increase (*fih* overexpression) in tumor size. As shown here, FIH is not simply an inhibitor of HIF but also a discriminator between two types of HIF-targets (N-TAD versus C-TAD), which influences the spatial organization in an intra-tissue oxygen gradient. The change in the spatial distribution of the *N+C-TAD* genes probably explains, in part, the impact of FIH on tumor growth. We also demonstrated that FIH can modulate numerous cancer-related genes as shown with the Cancer PathwayFinder PCR array (Table 1). Interestingly, some of these genes were HIF independent, whereas some were HIF dependent, including *tert* and *tp53*. Modulation of some of these genes probably contributes to the development of tumors, but some may have a more pronounced influence on the growth rate. As the effect of FIH on proliferation was more pronounced than the effect on cell death, we focused on a possible role of FIH in senescence through *tert* expression. However, even though we confirmed that FIH had a strong negative impact on *tert* regulation, forced expression of Tert had a strong positive action on proliferation, as recently documented by activation of the wnt pathway. However, these *Tert*-overexpressing cells remained sensitive to FIH silencing. Hence, we then examined whether FIH could modulate the control of the cell cycle via *tp53*. Although FIH did not regulate p53 at the transcriptional level, we found that FIH regulated p53 expression at the protein level, which thereby controls proliferation. Indeed, *fih* silencing increased the level of both the total and p53-P, resulting in an increase in expression of p21 and thus a decrease in proliferation. How does FIH regulate p53? Could it be

direct? Unlike HIF- α , p53 does not possess a TAD containing a Val–Asn–Ala sequence as a potential hydroxylation site (Linke *et al.*, 2004). However, it is tempting to suggest that FIH acts on p53 through the same mechanism as it does on HIF, that is, through inhibition of its interaction with p300/CBP. Cockman *et al.* (2006) proposed a second class of FIH substrates that contained an ankyrin repeat domain (ARD). p105 and I κ B α were the first ARD-containing proteins to be characterized, which was then followed by notch1, rabankyrin-5, RNaseL and toankyrase-1 (Cockman *et al.*, 2009). However, p53 does not have an ARD motif, suggesting that FIH-mediated p53 regulation is not acting through ARD hydroxylation. Thus, it seems unlikely that FIH will directly regulate p53. As the guardian of the genome and cellular integrity, p53 is very sensitive to stress, such as DNA damage, oncogene expression, nutrient deprivation and ribosome dysfunction (Brady and Attardi, 2010). As all the targets of FIH have not yet been identified, we propose that FIH silencing creates a cellular stress that leads to p53 stabilization. In this context, it is interesting to note that FIH has been reported to be an essential regulator of metabolism (Zhang *et al.*, 2010). Respiration, energy balance and lipid metabolism were closely regulated by FIH expression. Silencing of FIH could thus be seen as a metabolic stress, which then triggers activation of p53. p53 is regulated primarily through its interaction with Mdm2. As nutlin-3, a small-molecule antagonist of Mdm2, was able to reproduce the effect on proliferation of silencing of *fih* and that cells mutated for p53 do not respond to *fih* silencing, we propose that the anti-tumor effects of FIH knockdown is mediated by the p53–p21 axis.

Materials and methods

Numerical simulation

On the basis of the Numerical Molecular Interaction Map describing the HIF signaling pathway (Dayan *et al.*, 2009), simulation of the spatial distribution of *HIF*-target genes was done with Xdim software (online: <http://irh.unice.fr/spip.php?rubrique17>). The value of ' q ', that is, the sensitivity of a given gene to the C-TAD of HIF, can be adjusted. The extreme q ($q=0$) represents the behavior of a C-TAD-insensitive gene, whereas $q>0$ represents the relative balance between the C-TAD and the N-TAD sensitivity.

Cell culture

LS174, A375, 293T, DU145, Hep3B and SKMel-28 cells were obtained from the ATCC (Molsheim, France), HT29 cells were obtained from DSMZ (Braunschweig, Germany) and maintained according to their recommendations. LS174 and A375 cells expressing the Tet repressor were kindly provided by Dr van de Wetering (van de Wetering *et al.*, 2003) and Dr E Vial (Institut Cochin, Paris, France), respectively. Murine embryonic fibroblast p53^{+/+} and ^{-/-} were kindly provided by Dr P Roux (CNRS, Montpellier, France). Incubation of cells in Hx was performed in a sealed Bug-Box anaerobic workstation (Ruskinn Technology Biotrace International Plc, Wales, UK). The oxygen level was maintained at 9, 3 or 0.2% with the residual gas mixture of 86 to 95% nitrogen and 5% carbon dioxide.

Three-dimensional cell culture

To grow spheroids, 1600 HT29 (HT29-control and HT29-shFIH) cells were seeded in drops in 20 μ l in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum. After 12 days, spheroids were collected and analyzed.

Plasmids and small interfering RNA

LS174-shFIH or LS174-pFIH clones were described previously (Dayan *et al.*, 2006). The same shRNA sequence used to construct pTerFIH (Dayan *et al.*, 2006) was inserted into the pLVTHM viral vector (Addgene plasmid 12247; Addgene, Cambridge, MA, USA; Wiznerowicz and Trono, 2003). pCMV-8.91 was kindly provided by Dr D Trono (EPFL, Lausanne, Switzerland; Wiznerowicz and Trono, 2003). The 21-nucleotide RNAs were chemically synthesized (Eurogentec, Belgium). Small interfering RNA sequences targeting *fiH*, *tp53* and *siCtl* have been described previously (Berra *et al.*, 2003; Dayan *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2007). Two other shRNA sequences to FIH from Sigma-Aldrich Mission shRNA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) were used: sequence no. 4 (TRCN0000064826): 5'-CCGGCCCTGAAATGGGACCTGATCTCGAGATTCAAGGTCCTTCAGGGTTTTTG-3' and sequence no. 5 (TRCN0000064827): 5'-CCGGGAGAATTGAATATCCTCTCAACTCGAGTTGAGAGGATATCAATCTCTTTTTG-3'.

Stable clones

A375 cells were transfected with the shRNA-FIH or pTRES-FIH vectors (Dayan *et al.*, 2006). Recombinant lentivirus pLVTHM-FIH⁻ together with pCMV-8.91 and pMD2G (Addgene plasmid 12259) were produced by transient transfection of 293T cells. For transduction, medium containing recombinant lentivirus vectors was added to HT29 cells.

Clonogenicity assay

Cells (5000 cells) were seeded in 60-mm dishes, and once attached incubated in the absence (-) or the presence (+) of

Tet, without (LS174-shFIH) or with 1 μ M nutlin (LS174-shFIH + nutlin), for a further 10 days in Nx or Hx 1% O₂ (Hx 1%) before staining for viable cell colonies.

RNA extraction and PCR array

mRNA was extracted as reported previously (Dayan *et al.*, 2006). The Cancer PathwayFinder PCR array was used with the qPCR Master Mix for SYBR from Eurogentec on an ABI PRISM SDS 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative PCR results are the means of two experiments performed from two independent cell cultures.

Immunoblotting

Immunoblotting was performed as reported previously (Dayan *et al.*, 2006).

Antibodies

Anti-HIF-1 α (antiserum 2087), p42MAPK (antiserum E1B4) and anti-FIH (antiserum 810) were produced and characterized in our laboratory as described (Dayan *et al.*, 2006). Rabbit polyclonal antibodies to p53 and phospho-p53 (ser15) were purchased from Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA). Membranes were also blotted with the mouse monoclonal antibodies to tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), vinculin (Sigma-Aldrich) or HSP90 (Abcam, Cambridge, MA, USA) as loading controls.

Nude mice tumorigenicity and immunohistochemistry

Tumors were collected for RNA, protein and immunohistochemical analysis, as described (Chiche *et al.*, 2009). Sections were incubated with antibodies to hypoxypromote, HIF-1 α , CAIX, BNIP3, p53 or cleavage of caspase 3 for 1.5 h, followed by incubation with anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin G-horseradish peroxidase antibodies.

Statistical analysis

The Student's *t* test was used wherein *P*-values of <0.05 were considered significant.

Abbreviations

BNIP3, Bcl-2/E1B 19-kDa-interacting protein 3; CAIX, carbonic anhydrase IX; FIH, factor-inhibiting HIF-1; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor-1 α .

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The laboratory is funded by the Ligue Nationale Contre le Cancer (équipe labellisée), the Association pour la Recherche contre le Cancer, the Institut National du Cancer, the Agence Nationale pour la Recherche, METOXIA (EU program FP7), the Centre A Lacassagne, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the University of Nice (<http://www.unice.fr/isdbc/>). We thank Dr Corinne Bertolotto and Dr Frédéric Bost for their helpful advices. We also thank Dr M Christiane Brahimi-Horn for critical reading and editorial correction.

References

- Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* **22**: 4082–4090.
- Brady CA, Attardi LD. (2010). p53 at a glance. *J Cell Sci* **123**: 2527–2532.
- Chiche J, Ilc K, Laferriere J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM et al. (2009). Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res* **69**: 358–368.
- Cockman ME, Lancaster DE, Stolze IP, Hewitson KS, McDonough MA, Coleman ML et al. (2006). Posttranslational hydroxylation of ankyrin repeats in IkappaB proteins by the hypoxia-inducible factor (HIF) asparaginyl hydroxylase, factor inhibiting HIF (FIH). *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 14767–14772.
- Cockman ME, Webb JD, Ratcliffe PJ. (2009). FIH-dependent asparaginyl hydroxylation of ankyrin repeat domain-containing proteins. *Ann NY Acad Sci* **1177**: 9–18.
- Dayan F, Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. (2008). A dialogue between the hypoxia-inducible factor and the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron* **1**: 53–68.
- Dayan F, Monticelli M, Pouyssegur J, Pecou E. (2009). Gene regulation in response to graded hypoxia: the non-redundant roles of the oxygen sensors PHD and FIH in the HIF pathway. *J Theor Biol* **259**: 304–316.
- Dayan F, Roux D, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J, Mazure NM. (2006). The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res* **66**: 3688–3698.
- Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4273–4278.
- Fels DR, Koumenis C. (2005). HIF-1alpha and p53: the ODD couple? *Trends Biochem Sci* **30**: 426–429.
- Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. (1997). HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev* **63**: 51–60.
- Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M et al. (1997). Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* **272**: 8581–8593.
- Hu CJ, Sataur A, Wang L, Chen H, Simon MC. (2007). The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. *Mol Biol Cell* **18**: 4528–4542.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ et al. (2001). Targeting of HIF-1alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**: 468–472.
- Kaluz S, Kaluzova M, Stanbridge EJ. (2008). Comment on the role of FIH in the inhibitory effect of bortezomib on hypoxia-inducible factor-1. *Blood* **111**: 5258–5259.
- Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. (2003). Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem* **279**: 9899–9904.
- Kroeze SG, Vermaat JS, van Brussel A, van Melick HH, Voest EE, Jonges TG et al. (2010). Expression of nuclear FIH independently predicts overall survival of clear cell renal cell carcinoma patients. *Eur J Cancer* **46**: 3375–3382.
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. (2002a). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* **16**: 1466–1471.
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. (2002b). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* **295**: 858–861.
- Linke S, Stojkoski C, Kewley RJ, Booker GW, Whitelaw ML, Peet DJ. (2004). Substrate requirements of the oxygen-sensing asparaginyl hydroxylase factor inhibiting HIF. *J Biol Chem* **279**: 14391–14397.
- Liu CJ, Tsai MM, Hung PS, Kao SY, Liu TY, Wu KJ, Chiou SH, Lin SC, Chang KW. (2010). miR-31 ablates expression of the HIF regulatory factor FIH to activate the HIF pathway in head and neck carcinoma. *Cancer Res* **70**: 1635–1644.
- Lisy K, Peet DJ. (2008). Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ* **15**: 642–649.
- Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. (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.
- Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ et al. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* **105**: 659–669.
- Morris MR, Maina E, Morgan NV, Gentle D, Astuti D, Moch H et al. (2004). Molecular genetic analysis of FIH-1, FH, and SDHB candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma. *J Clin Pathol* **57**: 706–711.
- Newbold RF. (2002). The significance of telomerase activation and cellular immortalization in human cancer. *Mutagenesis* **17**: 539–550.
- O'Rourke JF, Tian YM, Ratcliffe PJ, Pugh CW. (1999). Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* **274**: 2060–2071.
- Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **441**: 437–443.
- Sakamoto T, Seiki M. (2009). Mint3 enhances the activity of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in macrophages by suppressing the activity of factor inhibiting HIF-1. *J Biol Chem* **284**: 30350–30359.
- Schodel J, Bohr D, Klanke B, Schley G, Schlotzer-Schrehardt U, Warnecke C et al. (2010). Factor inhibiting HIF limits the expression of hypoxia-inducible genes in podocytes and distal tubular cells. *Kidney Int* **78**: 857–867.
- Semenza GL. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* **20**: 51–56.
- Shin DH, Chun YS, Lee DS, Huang LE, Park JW. (2008). Bortezomib inhibits tumor adaptation to hypoxia by stimulating the FIH-mediated repression of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* **111**: 3131–3136.
- Tian H, McKnight SL, Russell DW. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* **11**: 72–82.
- Tian YM, Yeoh KK, Eriksson T, Kessler BM, Kramer HB, Edelman MJ et al. (2011). Differential sensitivity of hypoxia factor hydroxylation sites to hypoxia and hydroxylase inhibitors. *J Biol Chem* **286**: 13041–13051.
- van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D et al. (2003). Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* **4**: 609–615.
- Vousden KH, Prives C. (2009). Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* **137**: 413–431.
- Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL et al. (1998). Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* **92**: 2260–2268.
- Wiznerowicz M, Trono D. (2003). Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* **77**: 8957–8961.
- Yan J, Jiang J, Lim CA, Wu Q, Ng HH, Chin KC. (2007). BLIMP1 regulates cell growth through repression of p53 transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 1841–1846.
- Zhang N, Fu Z, Linke S, Chicher J, Gorman JJ, Visk D et al. (2010). The asparaginyl hydroxylase factor inhibiting HIF-1alpha is an essential regulator of metabolism. *Cell Metab* **11**: 364–378.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

Legends to Supplementary Figures

Figure S1. Wild-type HT29 (HT29-control) cells and *fiH* silenced HT29 (HT29-shFIH) clones form spheroids.

(a) HT29 wild-type cells were cultured as spheroids in normoxia (21% O₂) or various concentrations of oxygen (9%-, 3%-, and 1%-O₂) for 12 days. HypoxyprobeTM (pimonidazole - 45 µg/mL) was added to the extracellular media for staining of hypoxic zones 4h before formaldehyde fixation. (b) HT29 wild-type cells were cultured as spheroids in hypoxia (1% O₂) for 12 days. HypoxyprobeTM (pimonidazole - 45 µg/mL) was added to the extracellular media for staining of hypoxic zones (HIF-1α and HypoxyprobeTM) 4h before formaldehyde fixation. (c) Characterization of HT29-shFIH clones. HT29 cells were stably transfected with pLVTH-FIH⁻ (FIH⁻). Total cell extracts were analyzed by immunoblotting with antibodies against FIH and vinculin. The latter was used as a loading control. (d) Comparison of the size of HT29 and HT29-shFIH spheroids.

Figure S2. Silencing and overexpression of *fiH* in LS174-shFIH and A375-shFIH xenograft tumors.

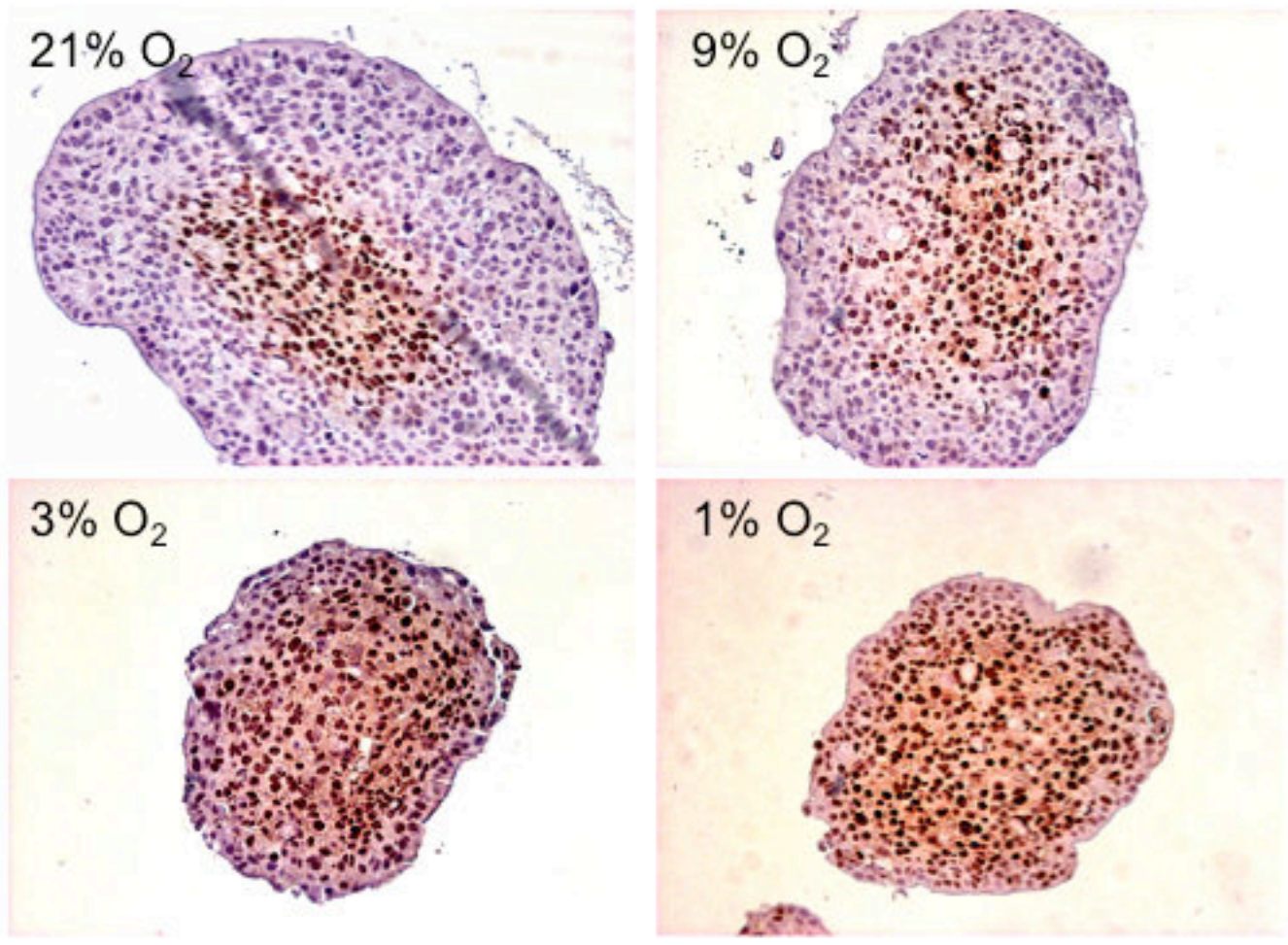
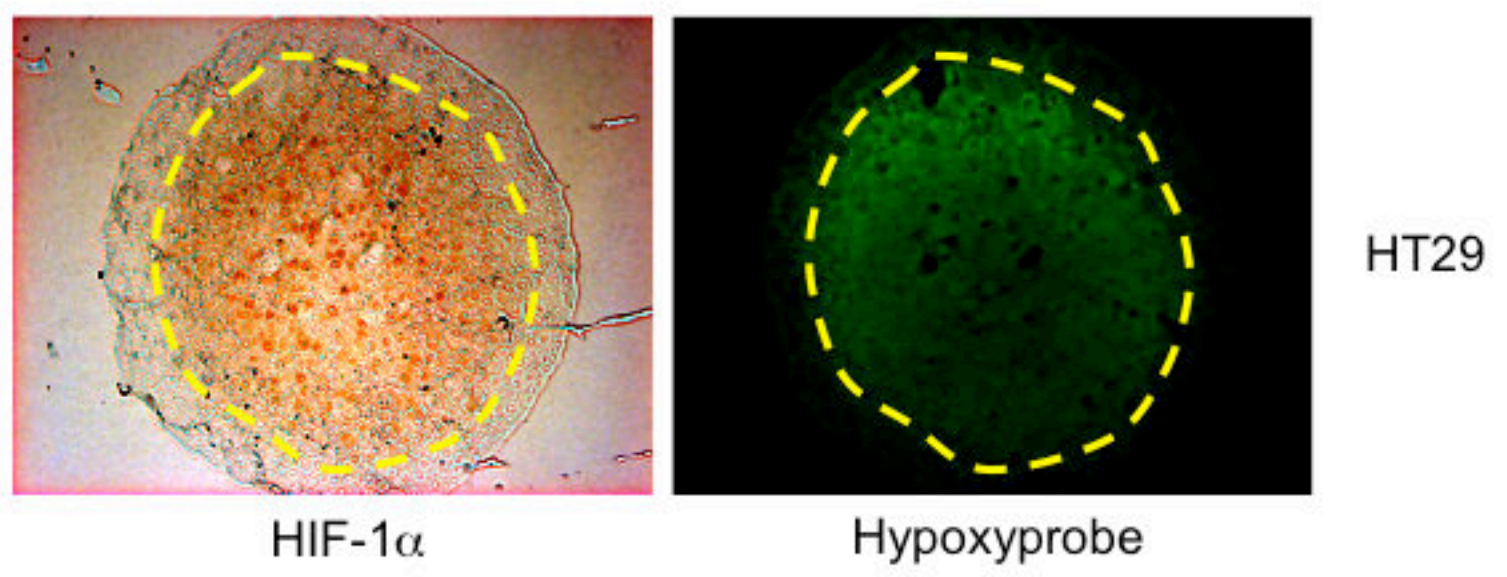
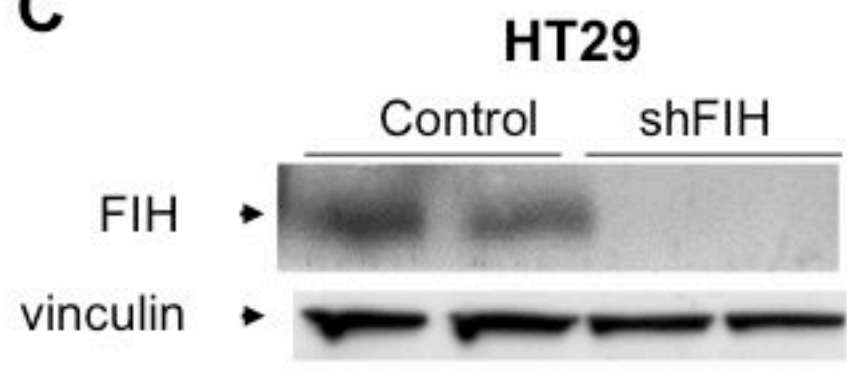
(a) Characterization of the growth of FIH-deficient xenograft tumors obtained with a lentivirus system. *In vivo* xenograft assays were performed by subcutaneously injecting into the back of athymic nude mice 1x10⁶ viable and individual tumor LS174-shSCRAMBLE, LS174-shFIH#4 (FIH⁻) and LS174-shFIH#5 (FIH⁻) cells. Xenograft growth was determined by measuring the tumor volume. Five mice were studied per condition. *In vivo* experiments were repeated twice. (b and c) The level of mRNA expression of *fiH* in the xenograft tumors of different transgenic cells (LS174 and A375), determined by real-time qPCR. Results represent an average of four tumors for each condition.

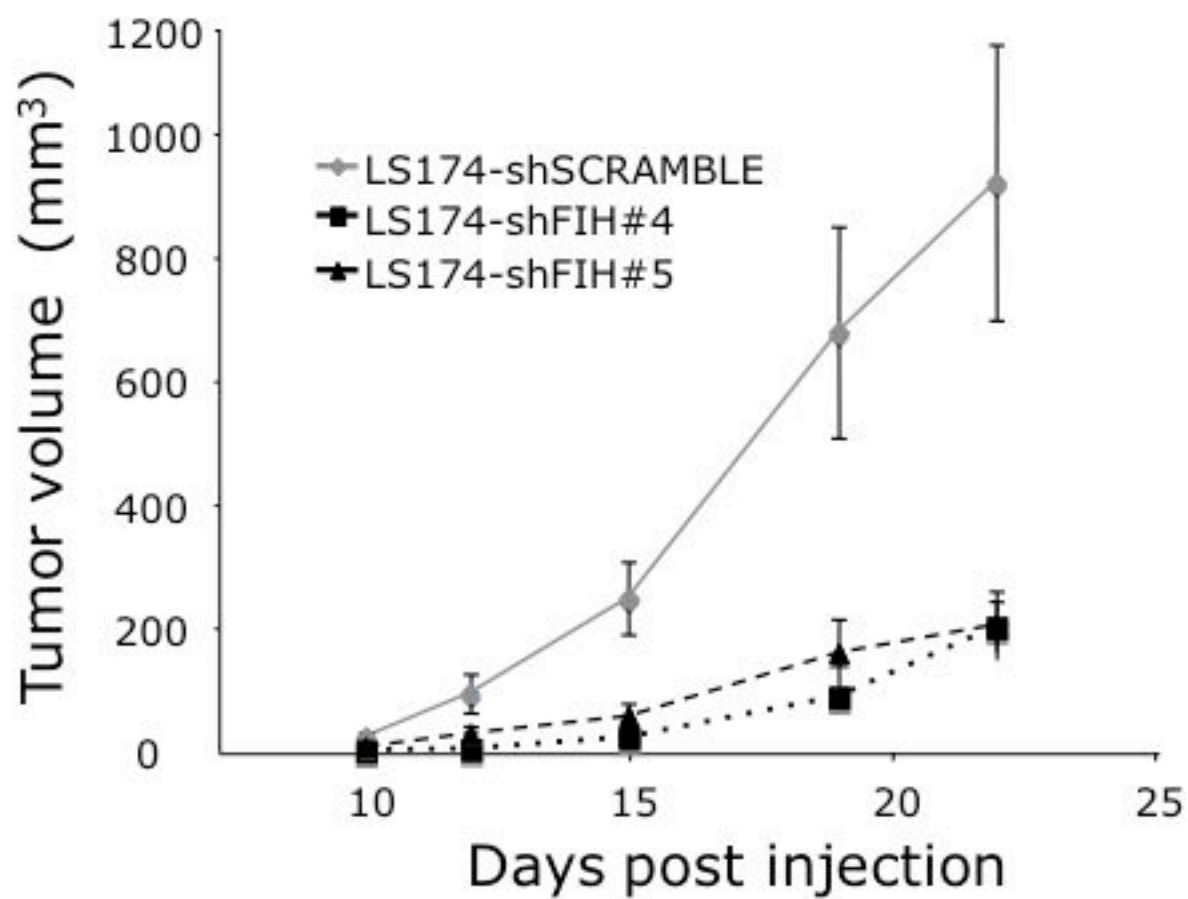
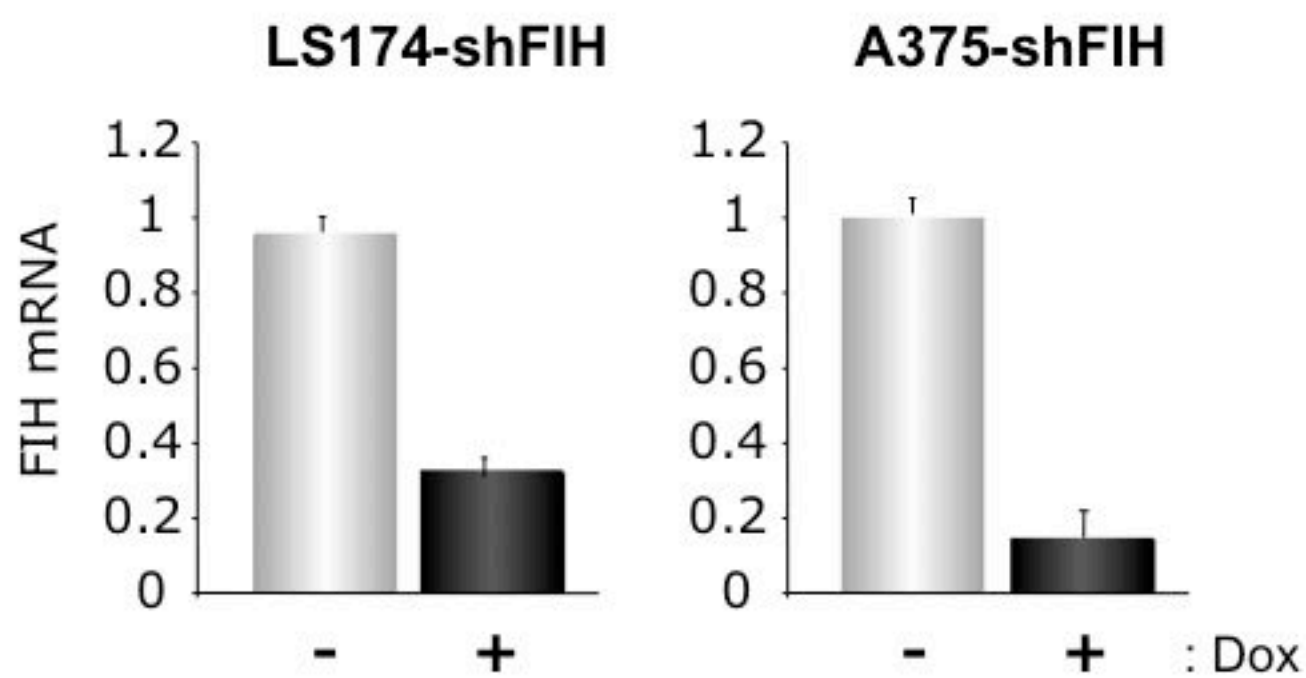
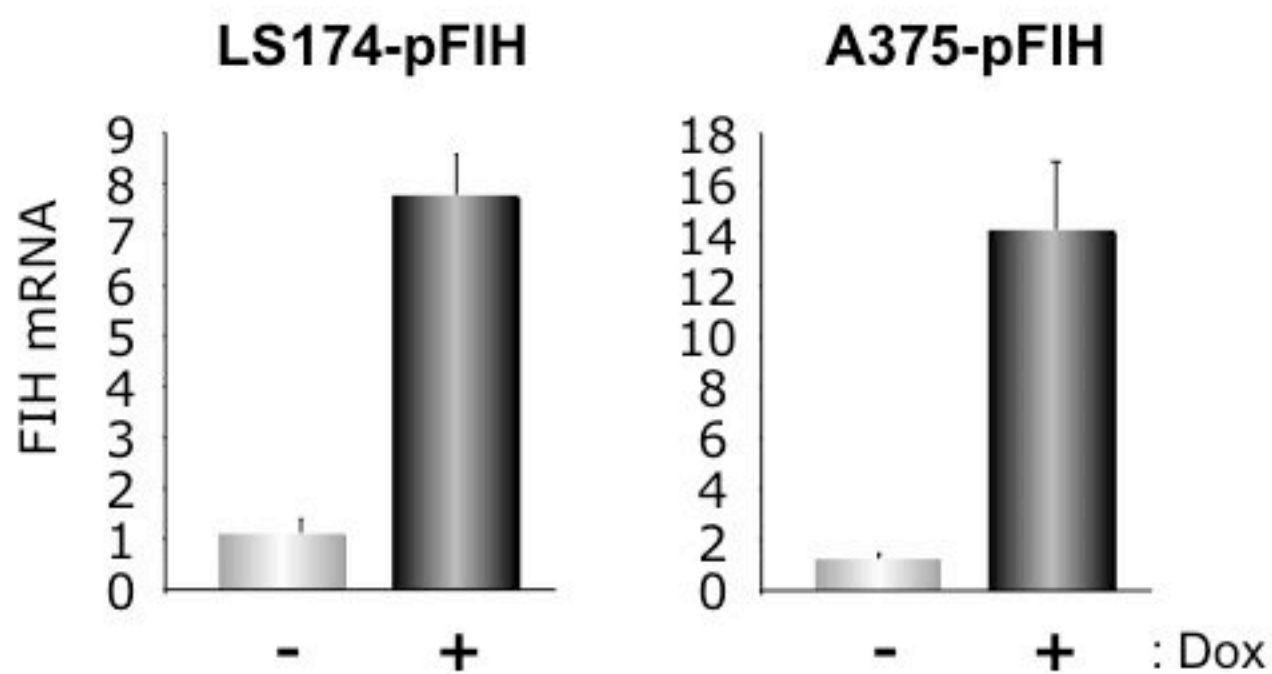
Figure S3. Doxocyclin and tetracycline have no effect on proliferation and on the p53-p21 axis.

(a) Characterization of the growth of control (shSIMA) xenograft tumors. 7 days before injection of LS174-shSIMA cells were incubated without (-Dox, black line) or with (+Dox, dotted line) doxycycline (Dox) to produce the control sequence (SIMA). For the respective conditions, mice received or not Dox, a semi-synthetic tetracycline, in the drinking water starting 4 days before cell injection. *In vivo* xenograft assays were performed by subcutaneously injecting into the back of athymic nude mice 1×10^6 viable and individual tumor LS174-shSIMA -Dox and LS174-shSIMA +Dox cells. Xenograft growth was determined by measuring the tumor volume. Five mice were studied per condition. *In vivo* experiments were repeated twice. (b) The viability assay of the Tet-inducible LS174-shSIMA clone. Cells (5,000) were seeded in 60-mm dishes. Once attached, cells were incubated 10 days in normoxia (Nx) or in hypoxia (Hx 1%) in the absence (-) or presence (+) of Tet before staining for visualization of colonies. (c) Total cellular extracts of LS174-shSIMA cells exposed for 24h to normoxia (Nx) or hypoxia 1% O₂ (Hx 1%) in the absence (-) or presence (+) of Tet (10 µg/mL), were analyzed by immunoblotting with antibodies against FIH, total p53, phosphorylated p53 (p53-P), p21, HIF-1 α , and HSP90. The latter was used as a loading control.

Figure S4. Nutlin does not induce cell mortality in LS174-shFIH.

Measurement of cell death by trypan blue exclusion in the LS174-shFIH cells incubated in normoxia (Nx) or in hypoxia 1% O₂ (Hx 1%) for 7 days without Tet and in the presence of DMSO (0) or in the presence of nutlin (0.3 or 1.0µM, for 7 days). Data represent the average of at least three independent experiments.

aHT29
Hypoxyprobe**b****C****Figure S1**

a**b****c****Figure S2**

d

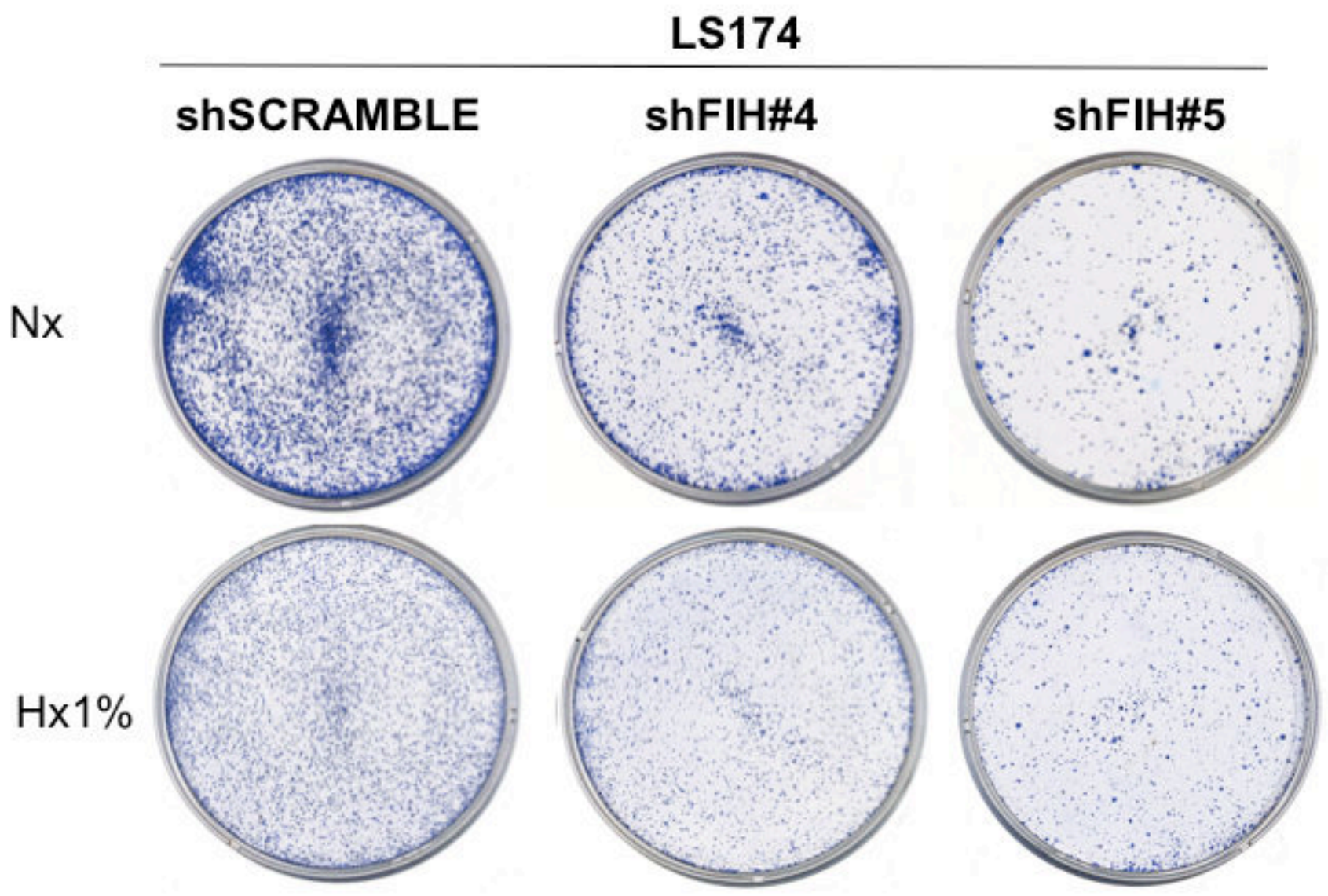


Figure S2

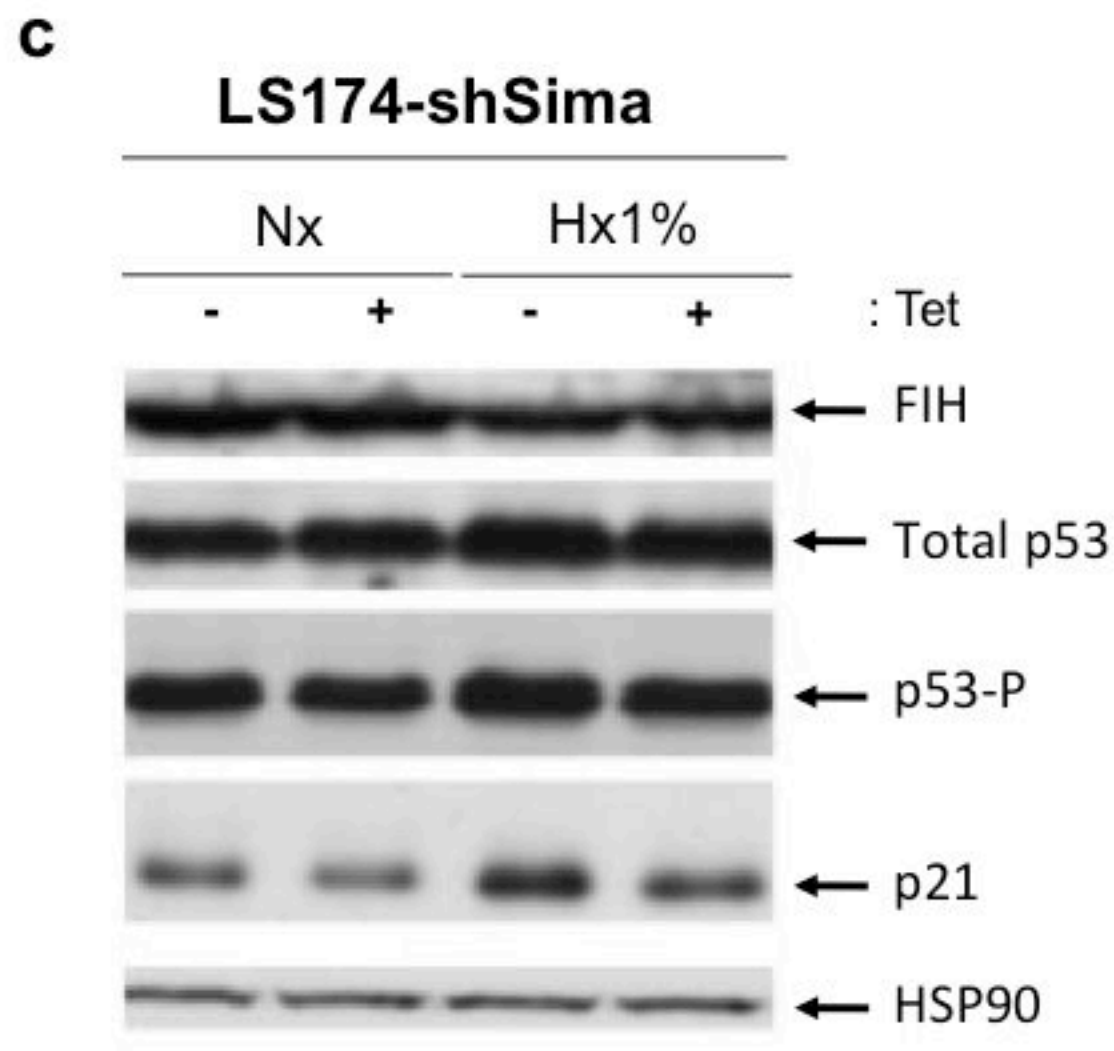
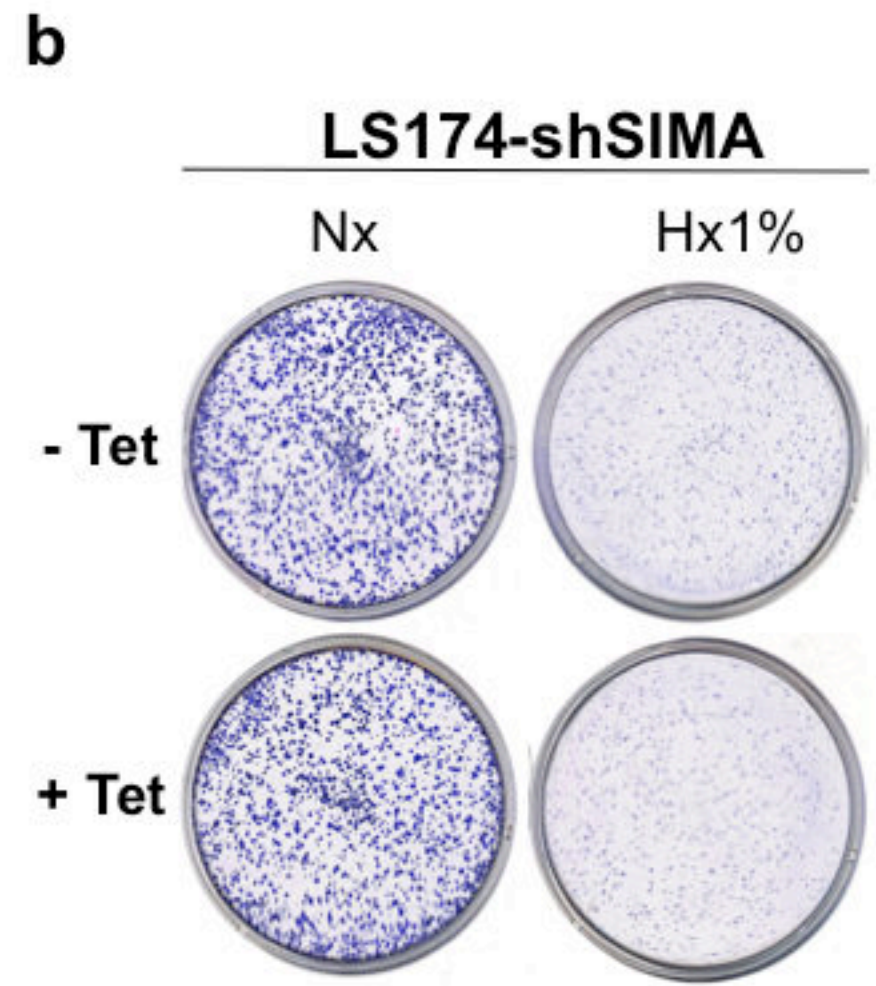
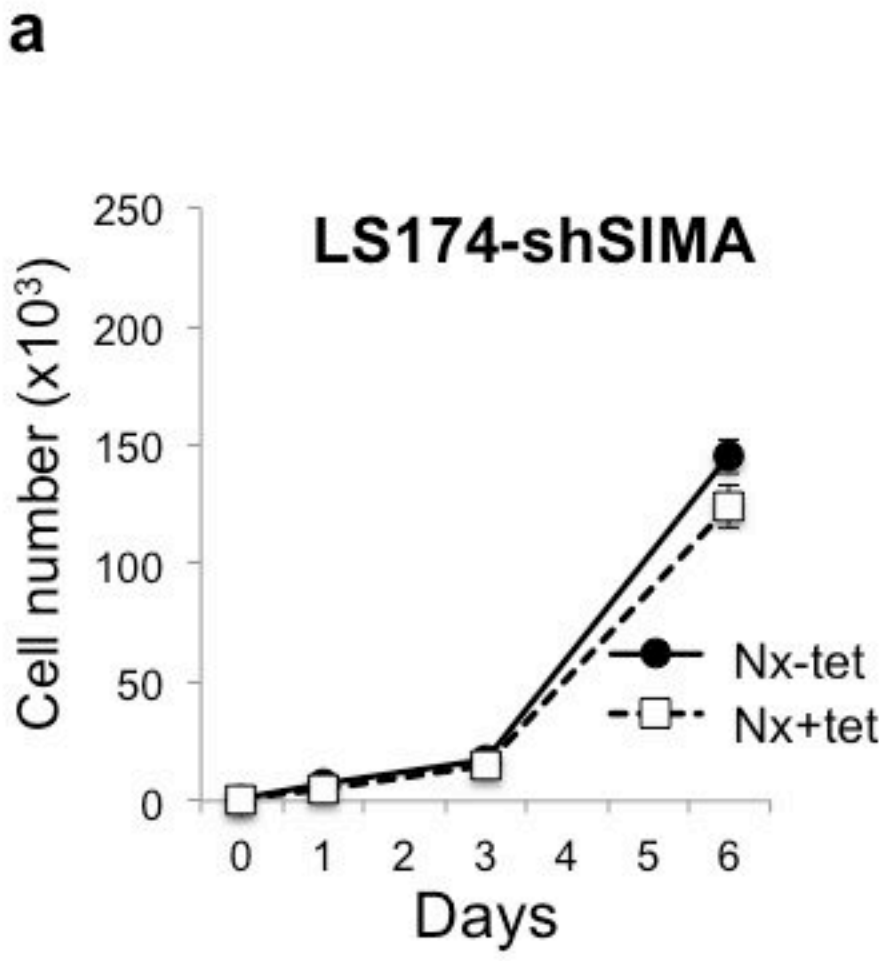


Figure S3

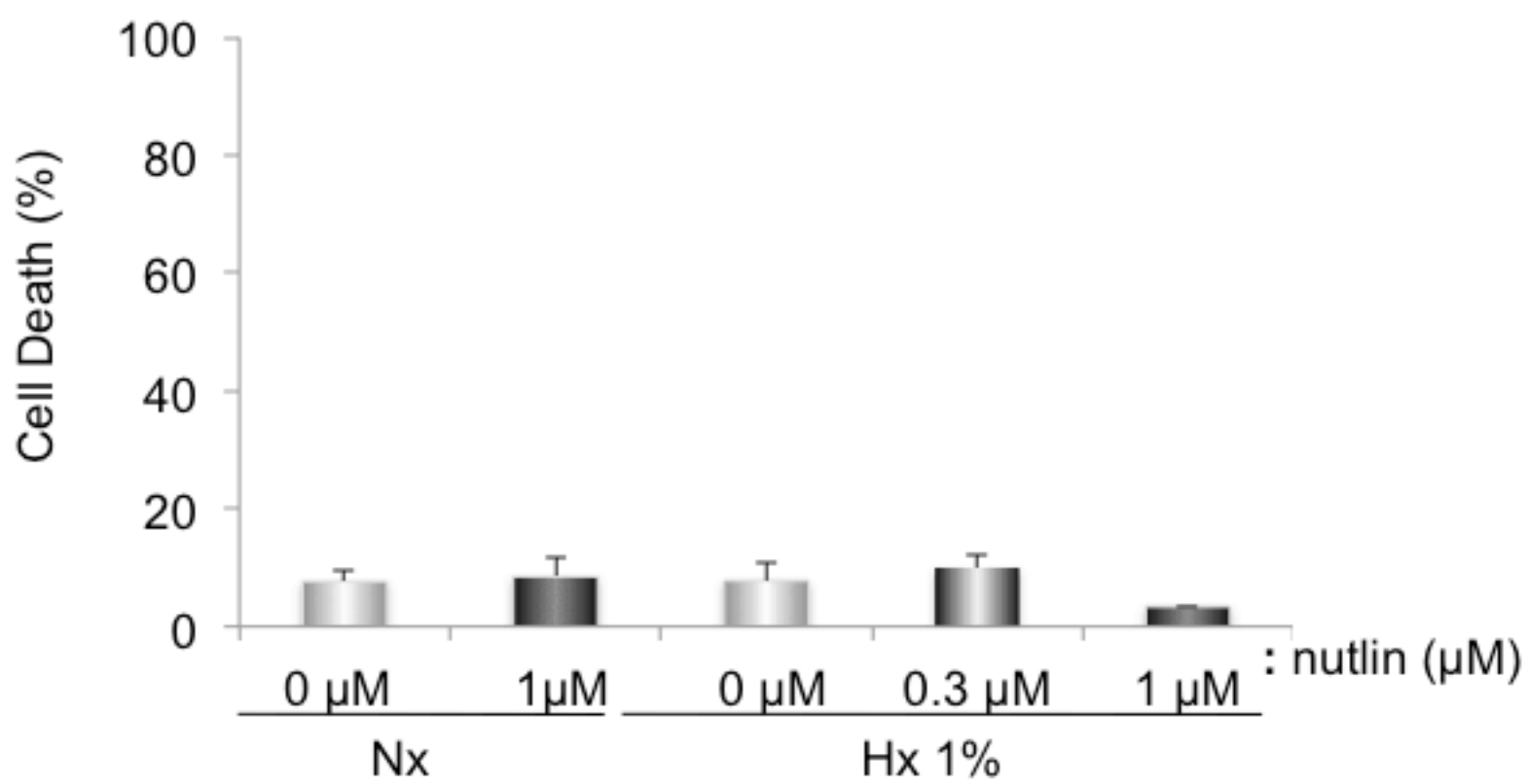


Figure S4

III. Conclusion, discussion et perspectives

Nous avons démontré dans cette étude que FIH possède deux actions distinctes sur le développement tumoral. D'une part, il contrôle l'activité transcriptionnelle de HIF1 et la distribution des protéines codées par les gènes C-TAD sensibles le long du gradient d'oxygène établi au sein de la tumeur. D'autre part il exerce une inhibition sur la voie p53-p21, et la rupture de cette inhibition conduit à une forte inhibition de la prolifération et de la croissance tumorale.

Ces résultats ont soulevés plusieurs questions auxquelles nous apportons ici des réponses ou des pistes de réponses.

Un trio FIH-HIF-p53 ?

Nous nous sommes tout d'abord demandé si ces deux actions de FIH, sur HIF et p53 étaient liées. Nous avons démontré dans cette étude que l'inactivation de FIH à un effet antiprolifératif drastique en normoxie (HIF1 peu exprimé), mais que cet effet est minoré en hypoxie en raison d'une prolifération d'ores et déjà réduite et d'une activation déjà présente de p53. Nous avons alors étudié l'implication de FIH en hypoxie, dans un contexte où HIF1 serait absent (Figure 24). Les résultats que nous avons obtenus sont surprenants puisque l'effet antiprolifératif de FIH semble être amplifié en absence de HIF1 *in vitro*.

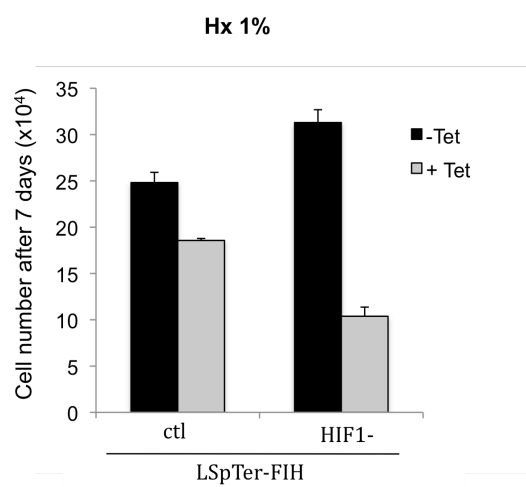


Figure 24: l'effet antiprolifératif de l'inactivation de FIH est accentué par l'absence de HIF1 en hypoxie.

Caractérisation de la prolifération des cellules d'adénocarcinome de colon LS174Tr suite à l'inactivation tétracycline-inductible de FIH (+ Tet) avec un lentivirus contenant un shRNA contrôle (ctl), ou un shRNA invalidant constitutivement HIF1 (HIF1-). Les cellules LSpTerFIH/ctl et LSpTerFIH/HIF1- ont été incubées en absence (-

Tet) ou en présence (+Tet) de tétracycline pendant 7 Jours avant d'être incubées en hypoxie 1% O₂ pendant une nouvelle période de 7 jours (+/- tétracycline) avant le comptage.

A l'heure actuelle, nous n'avons pas encore totalement compris ce phénomène. Il est possible que l'inactivation de FIH puisse avoir deux actions antagonistes : d'une part, indépendamment du rôle de FIH sur HIF, elle pourrait inhiber la prolifération (Figure 25, flèche orange) probablement en jouant sur les mêmes substrats qu'en normoxie. D'autre part, elle pourrait stimuler la prolifération en raison de la libération du C-TAD de HIF (Figure 25, flèche bleue).

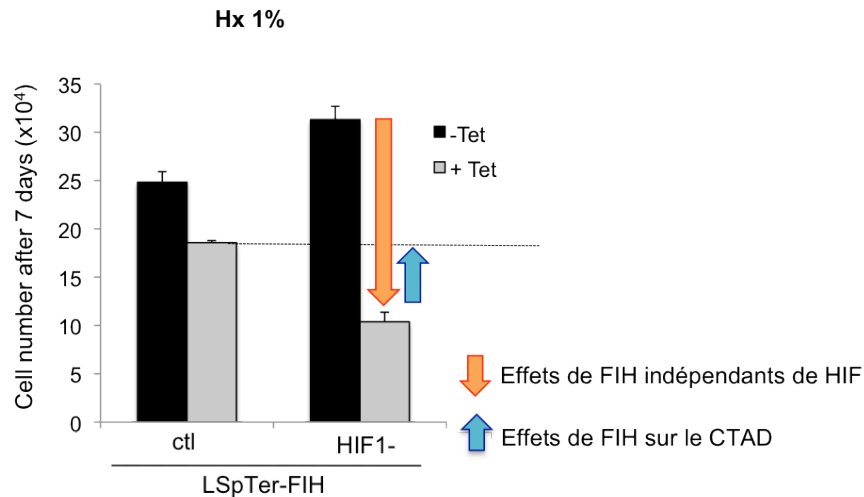


Figure 25: Modèle hypothétique des effets de FIH sur la prolifération en hypoxie et en absence de HIF1.

Il est également possible que FIH, HIF1 et p53 entretiennent une relation complexe. En effet, il a été montré que p53 pouvait interagir avec le domaine ODDD de HIF1 *in vitro* bloquant le recrutement de co-facteurs tels que p300, alors que HIF1 pourrait interagir avec MDM2 et bloquer la dégradation de p53 (Fels and Koumenis, 2005). Le complexe HIF-p53 est cependant controversé et ses implications biologiques pas totalement élucidées. Dans ce cadre, il serait intéressant d'étudier des potentiels complexes entre FIH, HIF1, MDM2, p53 et p300.

L'activation de p53 est-elle une réponse à un stress métabolique ?

Comme nous l'avons détaillé dans l'Introduction (Cf chapitre 1-B-III-2), des souris knock-out pour FIH ont été récemment générées par Zhang *et al*, (Zhang et al., 2010). Ces souris ne présentent pas de défauts majeurs dans les fonctions régulées par HIF (telle que l'angiogenèse ou l'érythropoïèse) mais présentent un métabolisme hyperactif (perte de poids, hyperventilation, résistance à un régime riche en graisse,...) causé en majeure partie par la perte de FIH dans les neurones. L'AMPK joue un rôle important dans la régulation du métabolisme à l'échelle de l'organisme entier comme à l'échelle de la cellule. Même si l'effet observé dans les souris knock-out semble spécifique d'un effet de FIH au niveau du système nerveux central, nous nous sommes demandé si FIH ne pouvait pas interagir d'une manière ou d'une autre sur l'activité de l'AMPK dans notre modèle cellulaire. De plus, comme nous l'avons vu dans l'Introduction (Cf chapitre 3-C-V), l'AMPK phosphoryle la sérine 15 de p53, ce qui est responsable de sa stabilisation et de son activation. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'invalidation de FIH pourrait créer un stress métabolique activant l'AMPK qui en retour phosphorylerait p53 et inhiberait la prolifération cellulaire (Figure 26A). Cependant, nous avons démontré que l'invalidation de FIH n'active pas l'AMPK (Figure 26B). De plus, l'invalidation de FIH n'altère pas l'amplitude d'activation de l'AMPK suite à une carence en glucose (Figure 26C).

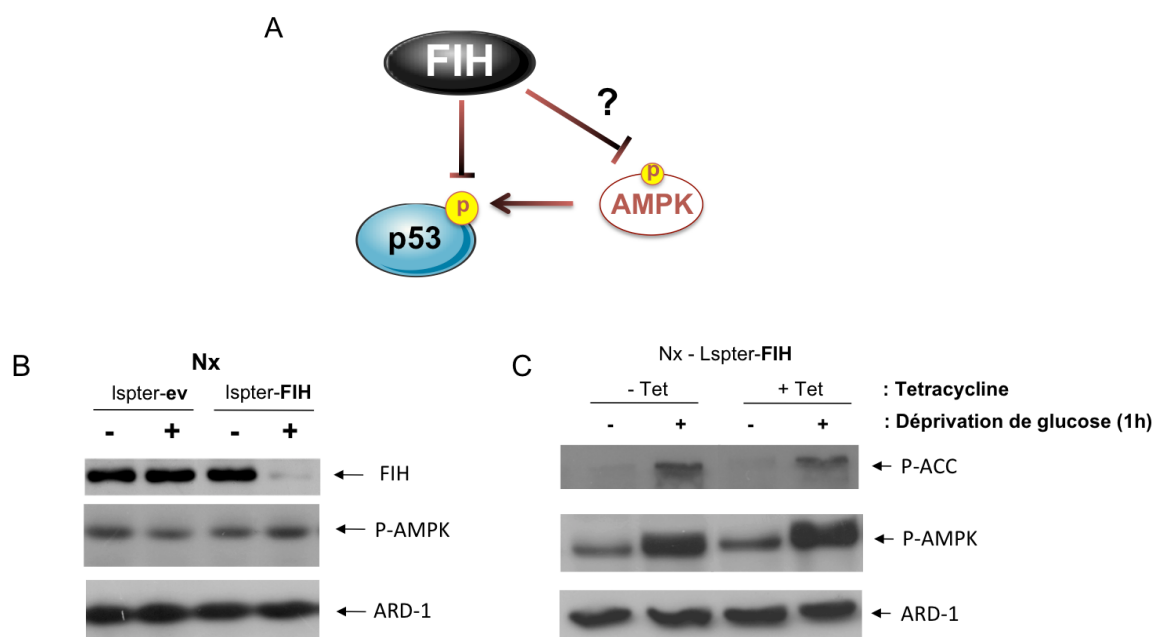


Figure 26 : L'inactivation de FIH n'active pas l'AMPK.

(A) Modèle hypothétique d'une inhibition de p53 par FIH dépendante de l'AMPK. (B) Expression tétracycline-inductible d'un vecteur vide (Ispt-er-ev) ou d'un shRNA ciblant FIH (Ispt-er-FIH) dans des cellules d'adénocarcinome de colon LS174Tr. Les cellules ont été incubées en absence (- Tet) ou en présence (+Tet) de tétracycline pendant 7 jours. Les extraits cellulaires ont été analysés par immunoblot avec des anticorps dirigés contre FIH, P-AMPK, ou ARD1 (contrôle de charge). (C) Expression tétracycline-inductible d'un shRNA ciblant FIH (Ispt-er-FIH) dans des cellules d'adénocarcinome de colon LS174Tr. Les cellules ont été incubées en absence (- Tet) ou en présence (+Tet) de tétracycline pendant 7 jours, puis soumises à une carence en glucose pendant 1h. Les extraits cellulaires ont été analysés par immunoblot avec des anticorps dirigés contre P-ACC, P-AMPK, ou ARD1 (contrôle de charge).

Un intérêt à étudier FIH dans le métabolisme tumoral ?

FIH inhibe la transcription d'un répertoire spécifique de gènes dépendants du domaine C-TAD de HIF1 (Dayan et al., 2006). Parmi ces gènes, on retrouve des gènes essentiels de la glycolyse tel que *glut1*, *hk2*, ou *ldha*. Ainsi, l'expression de ces gènes, déjà induite en hypoxie modérée, est encore exacerbée dans des conditions d'hypoxie sévère où FIH est inactivée (<0,1%O₂), probablement pour compenser une inhibition des COX plus forte à de telles concentrations en oxygène. Il serait donc intéressant d'étudier le

rôle de FIH dans ces conditions: son inactivation exacerbe-t-elle plus encore la glycolyse? Peut-on envisager d'associer une inhibition de FIH augmentant potentiellement la dépendance des cellules au glucose avec un traitement ciblant la glycolyse (inhibition des MCTs par exemple, Cf manuscript) ?

De plus, une étude récente du groupe de Semenza suggère que PKM2 joue un rôle dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF dépendante de son C-TAD (Luo et al., 2011). La PKM2 est une isoforme de pyruvate kinase importante dans le contrôle de la glycolyse et la régulation du métabolisme cellulaire²⁸, exprimée dans de nombreux types de cancers (Luo and Semenza, 2012). Luo *et al.* ont démontré, dans des cellules HeLa, que la protéine PKM2 (induite par HIF1) interagit avec la partie C-Terminale de HIF1 α et que cela stimule l'activité transcriptionnelle de HIF. Enfin, ils ont démontré que la PHD3 hydroxyle PKM2, en parallèle de HIF1 α , et que cela favorise leur interaction. De plus, ils montrent que la présence de PKM2 augmenterait la présence de HIF1 α , HIF1 β et p300 au niveau des HRE de *LdhA* et de *Pdk1*. Puisque FIH est fortement impliquée dans l'interaction de HIF avec p300 et régule l'activité du C-TAD, il serait très intéressant d'étudier si FIH a une action potentielle dans le « dialogue » entre HIF, PKM2 et le recrutement de p300. De plus, on pourrait se demander si FIH peut également hydroxyler PKM2 et si cela pourrait modifier la glycolyse ?

Beaucoup de questions restent en suspens concernant les rôles de FIH

Nous avons montré dans notre étude que FIH est un promoteur tumoral et que son inhibition conduit à l'activation de l'axe p53-p21. Cependant, nous n'avons pas déterminé le mécanisme précis impliqué dans ce phénomène.

L'hydroxylation des protéines est une modification post-traductionnelle encore mal connue comparativement à d'autres modifications telle que la phosphorylation, la glycosylation ou encore l'acétylation. L'importance de cette modification a été mise en

²⁸ PKM2 peut exister sous la forme d'un tétramère actif stimulant la glycolyse, ou sous la forme d'un dimère inactif qui va rediriger le PEP vers la voie des pentoses phosphates et les réactions anaboliques. On peut noter que la PKM2 est activée allostériquement par le F1,6BP et contrôlée positivement par les facteurs de croissance, ou l'activation des oncogènes.

évidence dans la biosynthèse du collagène ou dans la signalisation et l'adressage au protéasome de HIF.

Beaucoup de points restent cependant à éclaircir à propos de l'hydroxylation, tant au niveau de l'étude des hydroxylases impliquées que de l'identification des sites et des protéines hydroxylés. FIH ne déroge pas à la règle. Comme nous l'avons vu dans l'Introduction (Cf Introduction, chapitre 1-B-III-2), il existe peu de données dans la littérature concernant des cibles potentielles de FIH, autres que HIF1 α et HIF2 α . Il a été déterminé par spectrométrie de masse que FIH est capable d'hydroxyler des motifs Ankryn Repeat Domain (ARD) sur la protéine NOTCH, ou IkappaB²⁹, mais les effets de cette modification sont inconnus. L'interaction de FIH, avec ces deux protéines, pourrait être responsable de l'activation de p53, mais cela pourrait être également une toute autre cible de FIH non encore identifiée, ou une réponse généralisée à un stress cellulaire activant p53 (stress du réticulum endoplasmique, stress des ribosomes,...).

FIH apparaît donc comme une cible antitumorale intéressante de part l'action qu'il exerce sur la régulation de la distribution des gènes C-TAD sensibles au sein de la tumeur, mais surtout de part son action sur l'axe p53-p21 et la régulation de la prolifération. Cependant des études complémentaires sont nécessaires pour bien appréhender l'étendue de ses actions.

²⁹ régulateur de la voie NF κ B

B. Publication 2 : Glycogen synthesis is induced in hypoxia by the hypoxia-inducible factor and promotes cancer cell survival

Pelletier J, Bellot G, Gounon P, Lacas-Gervais S, Pouysségur J, and Mazure N

(Article publié dans le journal Frontiers in Oncology en Février 2012)

I. Contexte et objectif de la recherche

Le glycogène est le polymère énergétique de glucose le plus important du monde animal et joue un rôle crucial dans le métabolisme cellulaire comme dans le métabolisme de l'organisme entier. C'est un polymère de structure complexe et ramifiée constituant une réserve de glucose rapidement métabolisable. Son implication est essentielle dans les hépatocytes pour réguler la glycémie, ou dans les muscles pour libérer rapidement du glucose en condition d'activité musculaire intense et de glycolyse exacerbée. L'équipe du Dr J. Pouysségur s'est intéressée depuis de nombreuses années à exploiter « l'addiction au glucose » des cellules tumorales comme talon d'Achille pour cibler spécifiquement les cellules cancéreuses prolifératives. Dans cette optique, s'est posée la question de savoir si, dans la cellule tumorale, le glucose provenait exclusivement du milieu extracellulaire ou si il existait une source intracellulaire de glucose. Ainsi, l'attention s'est focalisée sur le glycogène. Avant mon arrivée, le Dr G. Bellot avait pu détecter du glycogène dans la plupart des lignées cellulaires qu'il a testé, et avait pu montrer, par microscopie électronique, la présence de granules de glycogène dans le cytoplasme des cellules (CCL39) incubées en hypoxie (1% O₂). Mon travail a alors consisté à déterminer le mécanisme responsable du stockage hypoxique de glycogène et l'implication physiologique de ce processus.

II. Résultats

La quantification du glycogène dans des lignées de fibroblastes immortalisés ou de cellules cancéreuses (8 au total) nous a permis d'établir que non seulement la plupart d'entre elles (7/8) présentent du glycogène en normoxie, mais qu'elles sont en plus capables d'accumuler de grandes quantités de glycogène en hypoxie. Les quantités stockées dépendent de la sévérité de l'hypoxie (stockage plus intense en présence de 0,1% que de 1% d'O₂), de la durée d'exposition, et du type cellulaire considéré (niveau de glycogène induit d'un facteur 5 à 37 en fonction de la lignée cellulaire considérée, après 96h d'hypoxie 1% O₂). Nous avons démontré que cette accumulation de glycogène est dépendante de HIF1 et avons mis en évidence pour la première fois que PGM1, l'enzyme initiatrice de la synthèse de glycogène est induite par HIF1. Enfin, nous avons montré que la synthèse de glycogène et la glycolyse sont étroitement connectées et qu'en condition de carence en glucose, le glycogène stocké peut vite être métabolisé, ce qui confère un avantage de survie aux cellules hypoxiques sur un court terme.



Glycogen synthesis is induced in hypoxia by the hypoxia-inducible factor and promotes cancer cell survival

Joffrey Pelletier¹, Grégory Bellot¹, Pierre Gounon², Sandra Lacas-Gervais², Jacques Pouyssegur¹ and Nathalie M. Mazure^{1*}

¹ Institute of Developmental Biology and Cancer Research, CNRS-UMR 6543, Centre Antoine Lacassagne, University of Nice-Sophia Antipolis, Nice, France

² Centre Commun de Microscopie Appliquée, University of Nice-Sophia Antipolis, Nice, France

Edited by:

Lorenzo Galluzzi, INSERM, France

Reviewed by:

Valerio Donato, New York University Medical Center, USA

Anna Maria Porcelli, University of Bologna, Italy

Hilary Ann Collier, Princeton University, USA

*Correspondence:

Nathalie M. Mazure, Institute of Developmental Biology and Cancer Research, CNRS-UMR 6543, Centre Antoine Lacassagne, University of Nice-Sophia Antipolis, 33 Avenue de Valombrose, 06189 Nice, France.
e-mail: mazure@unice.fr

Joffrey Pelletier and Grégory Bellot are the first co-authors.

The hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), in addition to genetic and epigenetic changes, is largely responsible for alterations in cell metabolism in hypoxic tumor cells. This transcription factor not only favors cell proliferation through the metabolic shift from oxidative phosphorylation to glycolysis and lactic acid production but also stimulates nutrient supply by mediating adaptive survival mechanisms. In this study we showed that glycogen synthesis is enhanced in non-cancer and cancer cells when exposed to hypoxia, resulting in a large increase in glycogen stores. Furthermore, we demonstrated that the mRNA and protein levels of the first enzyme of glycogenesis, phosphoglucomutase1 (PGM1), were increased in hypoxia. We showed that induction of glycogen storage as well as PGM1 expression were dependent on HIF-1 and HIF-2. We established that hypoxia-induced glycogen stores are rapidly mobilized in cells that are starved of glucose. Glycogenolysis allows these “hypoxia-preconditioned” cells to confront and survive glucose deprivation. In contrast normoxic control cells exhibit a high rate of cell death following glucose removal. These findings point to the important role of hypoxia and HIF in inducing mechanisms of rapid adaptation and survival in response to a decrease in oxygen tension. We propose that a decrease in pO₂ acts as an “alarm” that prepares the cells to face subsequent nutrient depletion and to survive.

Keywords: cancer cell, glycogen, HIF-1, hypoxia, PGM1

INTRODUCTION

Modified metabolism is a hallmark of cancer cells. It is now well known that tumors in general have a high rate of glucose uptake in parallel to elevated glucose consumption (Semenza, 2010; Brahimi-Horn et al., 2011; Porporato et al., 2011). This high avidity for glucose coupled to an increase in glycolysis in the presence of plentiful amounts of oxygen is called the “Warburg effect” or aerobic glucose metabolism, a common feature of many cancer cells (Vander Heiden et al., 2009). Internalized glucose is converted into pyruvate and then into lactic acid. In contrast, in non-cancer cells pyruvate is transported to the mitochondria, where it enters the tricarboxylic acid (TCA) cycle and participates in oxidative phosphorylation. As tumor cells proliferate rapidly they become distanced from oxygen-carrying blood vessels and are no longer oxygenated. Thus tumors contain extensive regions of hypoxia, a deficiency in the availability of oxygen, which activates a signaling cascade driven by the transcription factor hypoxia-inducible factor (HIF), often referred to as the master regulator in the hypoxic response of cells (Mazure et al., 2004; Majmundar et al., 2010). HIF belongs to the large family of basic-helix-loop-helix (bHLH) proteins and is a heterodimer of a constitutively expressed and stable HIF-1 β subunit, and one of three oxygen-regulated HIF-1 α subunits (HIF-1 α , HIF-2 α , or HIF-3 α). HIF activation is a multi-step process involving HIF-1 α stabilization, nuclear translocation, heterodimerization, transcriptional activation, and interaction with other proteins (Brahimi-Horn et al., 2007a; Aragones et al., 2009;

Semenza, 2010). One of these proteins, the von Hippel-Lindau (pVHL) protein, is a component of an E3 ubiquitin ligase complex that negatively regulates the stability of the HIF-1 α protein and thus its activity. In clear cell renal carcinoma cells (cRCC) pVHL loss of function results in constitutive HIF-1 activation and thus constitutive up-regulation of HIF-target genes in normoxic conditions (Kaelin, 2009). More than a hundred genes are estimated to be regulated by HIF, in an induced or repressed manner (Manalo et al., 2005). Interestingly, the majority of the gene products involved in glycolysis are up-regulated in hypoxia through HIF-1 α stabilization and more specifically through HIF-1. While fermentative glucose metabolism produces less ATP, cells compensate via HIF-1 by increasing uptake and consumption of glucose thereby triggering an increased rate of ATP production along with a high amount of lactic acid, a process referred to as “the Pasteur effect” (Gatenby and Gillies, 2004; Brahimi-Horn et al., 2007b; Kroemer and Pouyssegur, 2008).

As energy is the key to cancer cell growth, multiple alternative catalytic processes, diverging, or not from the glycolytic pathway, are induced to fuel cells in all circumstances (Kaelin and Thompson, 2010). The pentose phosphate pathway (PPP) or hexose monophosphate shunt contributes to nucleic acid synthesis (Buchakjian and Kornbluth, 2010). This pathway generates ribose 5-phosphate and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), which are essential in protecting cells from reactive oxygen species (ROS). In addition, glutamine enters the

mitochondria where it is oxidized by the TCA cycle (Shanware et al., 2011). Some cancer cells cannot survive in the absence of exogenous glutamine and exhibit “glutamine addiction” (Wise and Thompson, 2010). Like glucose, glutamine also participates in nucleotide synthesis by contributing nitrogen for pyrimidine and purine synthesis. Together with glucose, glutamine can contribute to the production of non-essential amino acids through pyruvate transamination. Recent studies suggested that glutamine could be a key substrate required for anabolic growth of mammalian cells. Finally, autophagy, an evolutionarily conserved cell survival pathway, participates in degradation of cytoplasmic constituents and the recycling of ATP. As such it is essential for maintenance of cellular biosynthesis during nutrient deprivation or metabolic stress (Chen and Karantza, 2011). We showed recently that hypoxic stress induces autophagy, which temporarily allows non-cancer and cancer cells to survive (Bellot et al., 2009; Mazure and Pouyssegur, 2009). We proposed that hypoxia is an early pro-survival condition, acting as a warning signal for cells to anticipate extreme nutritional stress (Brahimi-Horn et al., 2011).

The various metabolic adaptation strategies described above enable tumor cells to survive under drastic environmental conditions including severe hypoxia combined with glucose deprivation. Glycogen storage is emerging as a metabolic survival pathway. Glycogen, a polymer of glucose residues, that is found in the form of granules, are visible with an electron microscope in the cytoplasm in many cell types (McBride et al., 2009). Glycogen plays an important role in glucose metabolism and forms an energy reserve that can be quickly mobilized to meet a sudden need for energy. It is essentially present in the liver and skeletal muscle. Vigoda et al. (2003) were the first to propose that hypoxia plays a role in glycogen metabolism in rat heart muscle cell cultures. However, the authors showed that the glycogen content decreased by 15% compared to the control after only 2 h of drastic hypoxia (0.01% O₂) in glucose-free medium. Pescador et al. (2010) showed that hypoxia (1% O₂) resulted in accumulation of glycogen in mouse myotubes, hepatocytes, and hepatoma cells. These authors demonstrated that glycogen synthase 1 (GYS1), through HIF-1, was implicated in hypoxia-induced glycogen metabolism together with up-regulation of the enzymes UTP: glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UGP2) and 1,4- α glucan branching (GBE1). Importantly, cells preconditioned in hypoxia were more resistant to cell death when exposed to anoxia than cells preconditioned in normoxia. Similar results were obtained by Shen et al. (2010) in human MCF-7 cells when the cells were exposed to 24 or 48 h of hypoxia (1% O₂). They found that the protein phosphatase 1 regulatory subunit 3C gene (PPP1R3C), also regulated by HIF-1, activated glycogen synthase, and limited glycogen breakdown through a reduction in the glycogen phosphorylase activity. These two actions lead to glycogen accumulation. However, the authors did not discuss the survival potential of such a mechanism in cancer cells and did not investigate glycogen accumulation as a general characteristic of tumor cells. Finally, we established that RCC cells, in which pVHL is mutated in approximately 50% of cRCC patients (Kaelin, 2009), showed an enlarged cytoplasm due to abnormalities in glycogen and sterol storage (Medina Villaamil et al., 2011). As tumor cells are addicted to glucose and glucose deprivation occurs in parallel to hypoxia, we hypothesized that the

decrease in the oxygen level sensed by cancer cells signals energy storage. Thus, hypoxia heralds drastic microenvironmental conditions and gives cells time to respond and survive. We previously reported the importance of glycolysis, however there exists also a branched circuit, glycogen synthesis, which can play a role in energy storage. Glucose taken up by the cell is rapidly modified from glucose-6-phosphate (G6P) to glucose-1-phosphate (G1P) and then to UDP-glucose. UDP-glucose is then incorporated into glycogen particles through a α 1–4 linkage. When a chain of at least 11 residues is formed, a branching enzyme transfers seven glucose residues to another chain making 1–6 linkages between glucose. This process is repeated to form a huge fractal structure, as described by Whelan’s model (Meléndez et al., 1999). This reversible process, catalyzed by phosphorylases, can occur in a very short period of time and thus can become a supplier of a substantial amount of fuel.

Do cancer cells store glycogen? Does it occur in hypoxia when glycolysis is already exacerbated? Once accumulated, is glycogen used as a fuel, to feed into glycolysis? For how long can cells survive on this energy source? These are the questions we asked in this study.

MATERIALS AND METHODS

CELL CULTURE

Non-neoplastic Chinese hamster lung fibroblasts CCL39, the respiratory-deficient CCL39-derived mutants (Res⁻; Franchi et al., 1981) and the glycolysis-deficient CCL39-derived mutants (Gly⁻) due to a mutation that inactivates the expression of the phosphoglucose isomerase gene (Pouyssegur et al., 1980), MEF HIF-1+/+ and -/-, human colon carcinoma LS174, human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB231, human renal clear cell carcinoma RCC4 cells were grown in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM; Gibco-BRL) supplemented with 7.5 or 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) as appropriate. LS174 cells expressing the tetracycline (Tet) repressor were kindly provided by van de Wetering et al. (2003). The antibiotics penicillin G (50 U/ml) and streptomycin sulfate (50 μ g/ml) were added. When experiments with cells were done with medium containing 5 mM glucose, medium was changed every 24 h to minimize variations in the glucose concentration in the medium during the time of the experiment.

A Bug-BoxTM anaerobic work station (Ruskinn Technology Biotrace International Plc, Bridgend, UK) set at 1 or 0.1% oxygen, 94 or 94.9% nitrogen, and 5% carbon dioxide was used.

GLYCOGEN TITRATION

The titration of glycogen was performed using the Glycogen Assay Kit (Abcam) according to the manufacturer instructions. Briefly, cells were harvested and washed two times with PBS to remove traces of glucose from the culture medium. The cell pellet was then resuspended in 100 μ l H₂O and 100 μ l of the lysis buffer provided with the kit. Samples were then centrifuge 15 min 16,000 g at 4°C and the supernatant retained. Fifty microliter of the supernatant was then digested with glucoamylase to obtain the amount of “total glucose” in the sample; a non-digested sample was used to obtain the amount of “free glucose.” The glucose generated for each sample was then oxidized to generate a product that reacts

with a OxiRed probe to generate fluorescence (Ex 535 nm/Em 587 nm), which was measured by fluorescence spectroscopy, using a Perkin-Elmer LS-50B luminescence spectrometer (Perkin-Elmer, Waltham, USA). The glycogen content of the sample was calculated by subtracting “free glucose” present in the extract before digestion and normalized to the protein concentration of the sample.

ELECTRON MICROSCOPY

Cells were fixed *in situ* with 1.6% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer at room temperature (RT) and stored overnight at 4°C. Samples were rinsed in the same buffer and then post-fixed with 1% osmium tetroxide and 1% potassium ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h at RT to enhance the staining of cytoplasmic membranes. Cells were rinsed with distilled water, embedded in epoxy resin, sectioned, and examined with a Philips CM12 transmission electron microscope equipped with an Olympus SIS CCD camera.

PERIODIC ACID SCHIFF STAINING AND GLYCOGEN DETERMINATION

Coverslips were placed in six-well plates, and CCL39, LS174, and RCC4 cells added. After incubation and treatment, the medium was removed and the cells were fixed with Carnoy's fixative for 1 h. The cells on coverslips were rinsed with absolute alcohol and 66% alcohol once for 2 min, followed by rinsing with deionized water for 90 s (3 × 30 s). The cells were treated with periodic acid solution for 10 min and then rinsed with deionized water for 90 s (3 × 30 s). Then the cells were treated with Schiff reagent for 15–20 min and rinsed for 5 min with running tap water. For visualizing nuclei, the cells were counterstained using Mayer's hematoxylin for 1 min and washed in running tap water for 5 min. After air-drying, the stained cells were covered with a glass slides using pure glycerol as mounting medium. For glycogen determination, glycogen was extracted as previous described by Shen et al. (2010).

RNA EXTRACTION, RT-PCR, AND REAL-TIME QUANTITATIVE PCR

Total RNA was extracted from cells using the RNA extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Total cDNA were then obtained using the Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Expression levels of *pgm1* and *rplp0*, the latter was used as control, were analyzed by real-time quantitative PCR using the Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems).

IMMUNOBLOT ANALYSIS

Cells were lysed in 1.5× sodium dodecyl sulfate (SDS)-buffer, and the protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay. Forty micrograms of each whole-cell extract was resolved by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). Membranes were blocked in 5% fat-free milk in TN buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) and incubated in the presence of the primary and then the secondary antibody in 5% fat-free milk in TN buffer. After washing in TN buffer containing 1% Triton X-100 and then in TN buffer, immunoreactive bands were visualized with the ECL system (Amersham Biosciences).

The anti-PGM1 antibody (clone 3B8-H4) was purchased from Sigma. The anti-HIF-2 α antibody (NB100-480) was purchased from Novus Biochemicals. The rabbit polyclonal anti-HIF-1 α (antiserum 2087; Richard et al., 1999) and anti-ARD-1 (Bilton et al., 2005) antibodies were produced and characterized in our laboratory.

CELL SURVIVAL ASSAY

Cells were preconditioned in hypoxia (1 or 0.1% O₂ for the given time period stated in figure legends) prior to glucose removal. Cells cultured in normoxic conditions were used as a control. Withdrawal of glucose was done after washing cells twice with PBS by adding DMEM without glucose, without pyruvate (Invitrogen) supplemented with 7.5% of dialyzed FBS and 1 mM sodium pyruvate. The rate of mortality was assessed using Trypan blue exclusion staining (Sigma, St. Louis, MO, USA).

STATISTICS

All values are the means \pm SD of the indicate number of determinations (*n*) and significant differences are based on the Student's *t*-test and *P*-values indicated.

RESULTS

HYPOXIA INDUCES GLYCOGEN STORAGE IN NON-CANCER AND CANCER CELL LINES

We first analyzed non-neoplastic (CCL39 and MEF) and tumor (BE, MCF-7, MDA-MB213, PC3, and RCC4) cell lines. As seen in **Table 1**, all the cells tested had detectable levels of glycogen when

Table 1 | Basal level and glycogen accumulation (ng/ μ g proteins) after 96 h of hypoxia in normal (CCL39 and MEF) and cancer (BE, MCF-7, MDA-MB231, LS174, PC3, RCC4) cells.

		Nx or (+)pVHL (ng/ μ l proteins)	Hx 1% 96 h or (–)pVHL (ng/ μ l proteins)	Fold induction (Hx/Nx)
RCC4	Human renal clear carcinoma cell	247.5 \pm 3.5	1184 \pm 228.3	4.8
MCF-7	Human breast carcinoma cells	113.9 \pm 5.8	680.0 \pm 12.6	6
CCL39	Chinese hamster lung fibroblast cells	17.2 \pm 11.4	638.7 \pm 193.6	37
MEF	Mouse embryonic fibroblast cells	10.5 \pm 7.7	106.0 \pm 18.2	10
MDA-MB231	Human breast carcinoma cells	10.0 \pm 2.3	98.0 \pm 13.7 (Hx 0.1% – 48 h)	9.8
LS174	Human colon carcinoma cells	5.0 \pm 4.4	128.0 \pm 58.2	25.6
BE	Human colon carcinoma cells	3.0 \pm 1.0	60.0 \pm 6.3	20
PC3	Human prostate carcinoma cells	Not detected	Not detected	

Cells were grouped according to their basal amount of glycogen in normoxia.

grown in tissue culture, with the exception of human prostate carcinoma PC3 cells. We grouped these cells according to their basal amount of glycogen in normoxia. The range of glycogen concentrations was quite broad (Table 1). Human renal clear cell carcinoma RCC4 cells had a large amount of glycogen (247.5 ± 3.5 ng/ μ g protein). All cells except PC3 cells, showed an increase in the amount of glycogen after incubation for 96 h in hypoxia.

Electron microscopy revealed in numerous cell types, non-membrane-bound cytoplasmic inclusions composed of densely packed fine granular material that resembled glycogen as defined by Ghadially (1989). Particules of glycogen are represented by either are electron-dense granules of approximately 15–30 nm diameter (β particles or monoparticulate form) or as collections of such particules forming rosettes of about 80–100 nm in diameter. Figure 1A showed that CCL39 and LS174 cells show intensely stained monoparticulate forms of glycogen in the cytoplasm (Figure 1 – white arrows). While electron micrographs of normoxic non-neoplastic Chinese hamster lung fibroblasts CCL39 and human colon carcinoma LS174 cancer cells did not show glycogen particles (Figures 1A–C) hypoxic CCL39 cells showed large areas of electron-dense cores of glycogen particles after 96 h of hypoxia (Figure 1A, left panels) in contrast to hypoxic LS174 cells that showed finely dispersed glycogen particles or small aggregates of glycogen (Figure 1A, right panels). These observations were confirmed by both Periodic acid Schiff (PAS) staining and by biochemical titration of the glycogen content of these cells in normoxia and hypoxia at different times points (Figures 1B,C). Moreover, as predicted by electron microscopy, CCL39 cells had more glycogen than LS174 cells. The cell culture media contained 25 mM glucose, a concentration that is not physiological in blood vessels around normal or tumor cells. So we measured glycogen accumulation in CCL39 cells in hypoxia at the same time points and in drastic hypoxia (0.01% O_2), but at the more physiological concentration of 5 mM glucose (Figure 1D). Glycogen accumulation was still observed but to a lesser extent. Taken together these results indicate that hypoxia stimulates glycogen formation in both non-cancer and cancer cells.

HYPOXIA-INDUCED GLYCOGEN ACCUMULATION OCCURS VIA HIF

As HIF is the key regulator of hypoxic adaptation of normal and cancer cells, we investigated the potential role of HIF in glycogen accumulation using human renal clear cell carcinoma RCC4 and 786-O cells that contained constitutively stable HIF-1 α and HIF-2 α or HIF-2 α only respectively due to a defect in the tumor suppressor pVHL, which participates in the degradation of the HIF- α proteins (Figure 2A). We thus examined RCC4 cells in which wild-type VHL was re-introduced. Using electron microscopy, we observed large aggregates of glycogen particles in RCC4 (–pVHL) cells under normoxic conditions (Figure 2B). However, no glycogen was observed in RCC4 (+pVHL) cells, in which HIF- α was degraded in normoxia. To confirm these results, we measured glycogen accumulation in RCC4 cells. As expected, RCC4/786-O (–pVHL) cells showed a high concentration of glycogen compared to RCC4/786-O (+pVHL) cells (1184 ± 228.3 ng/ μ g protein versus 247.5 ± 3.5 ng/ μ g protein,

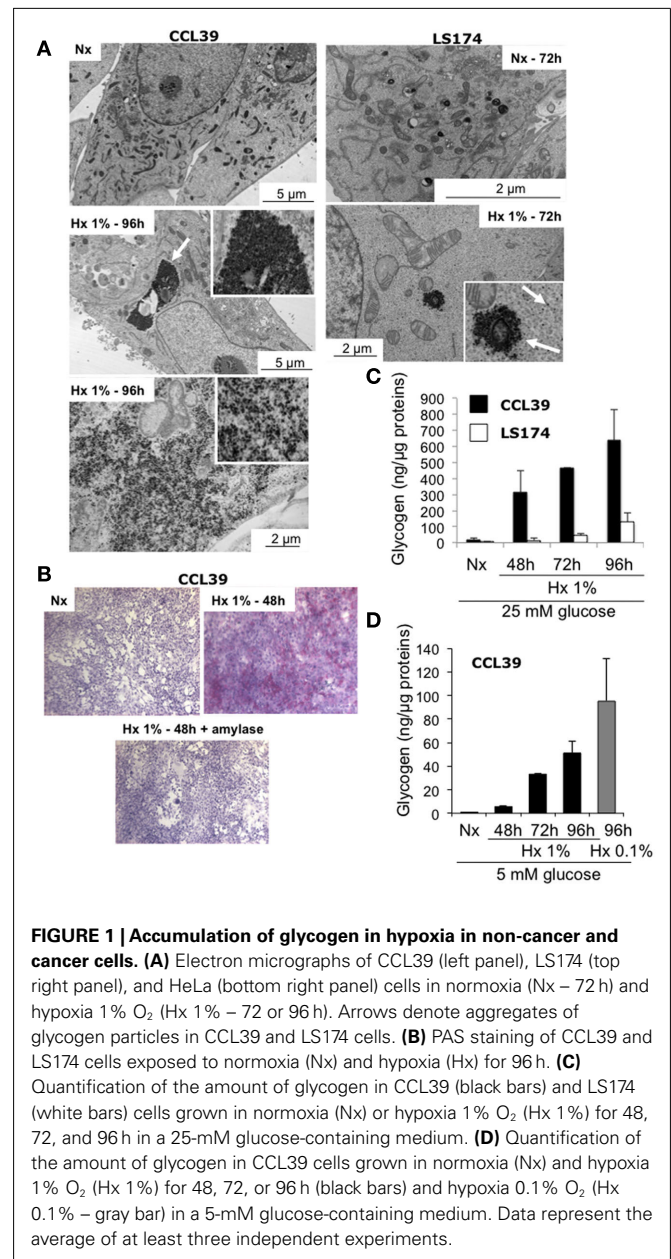
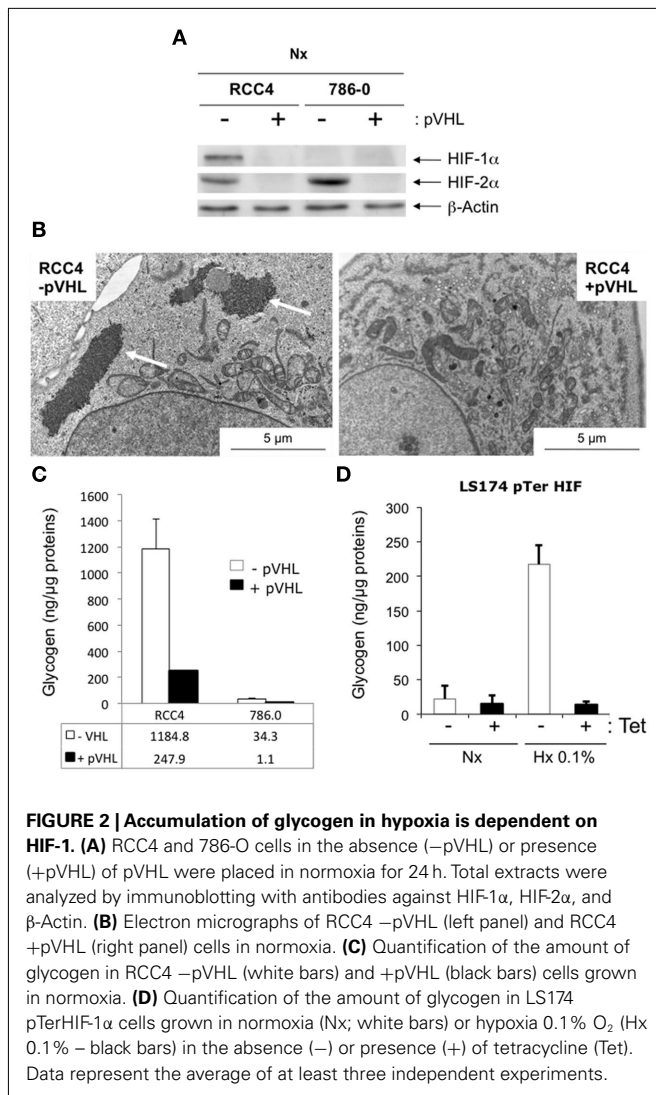


FIGURE 1 | Accumulation of glycogen in hypoxia in non-cancer and cancer cells. (A) Electron micrographs of CCL39 (left panel), LS174 (top right panel), and HeLa (bottom right panel) cells in normoxia (Nx – 72 h) and hypoxia 1% O_2 (Hx 1% – 72 or 96 h). Arrows denote aggregates of glycogen particles in CCL39 and LS174 cells. **(B)** PAS staining of CCL39 and LS174 cells exposed to normoxia (Nx) and hypoxia (Hx) for 96 h. **(C)** Quantification of the amount of glycogen in CCL39 (black bars) and LS174 (white bars) cells grown in normoxia (Nx) or hypoxia 1% O_2 (Hx 1%) for 48, 72, and 96 h in a 25-mM glucose-containing medium. **(D)** Quantification of the amount of glycogen in CCL39 cells grown in normoxia (Nx) and hypoxia 1% O_2 (Hx 1%) for 48, 72, or 96 h (black bars) and hypoxia 0.1% O_2 (Hx 0.1% – gray bar) in a 5-mM glucose-containing medium. Data represent the average of at least three independent experiments.

respectively for RCC4 and 34.3 ± 18.5 ng/ μ g protein versus 1.1 ± 0.8 ng/ μ g protein, respectively for 786-O cells (Figure 2C; Table 1). Finally, we used LS174Tr cells in which *hif-1 α* was silenced by tetracycline (Tet)-inducible shRNA expression. Hypoxic LS-sh *hif-1 α* cells treated with Tet showing a 90% decrease in the mRNA level of HIF-1 α (Chiche et al., 2009) did not accumulate glycogen after 48 h in 0.1% O_2 (Figure 2D). These results demonstrate that hypoxia-induced glycogen accumulation is primarily dependent on HIF-1 α in majority but also on HIF-2 α .

PHOSPHOGLUCOMUTASE 1 IS UP-REGULATED IN HYPOXIA

Phosphoglucomutase 1 (PGM1) is the first enzyme in glycogenesis that catalyzes the conversion of glucose-6-phosphate to glucose-



1-phosphate (Figure 3A). Since we were unable to examine the mRNA level of PGM1 by qPCR in CCL39 cells, since the Hamster DNA sequence is not available and mouse primers did not detect hamster PGM1, we examined the PGM1 mRNA level in LS174, MCF-7, MDA-MB231 (Figure 3B), and RCC4 cells (Figure 3C). From 24 to 72 h of hypoxia (Hx 1% O₂), the PGM1 mRNA level increased about fourfold. Induction of PGM1 was HIF-dependent as a threefold increase was detected in RCC4 (–pVHL) cells compared to RCC4 (+pVHL) cells (Figure 3C) and as a twofold increase was detected in LSpTerHIF-1α in the absence of Tet (–Tet) and was not observed in the presence of Tet (+Tet) when HIF-1α was silenced (Figure 3D). Moreover, PGM1 induction in hypoxia (Hx 1% O₂) was observed in both CCL39 (Figure 3E) and LS174/MCF-7/MDA-MB231 (Figure 3F) cells at the protein level. Moreover, in LSpTerHIF-1α, hypoxic induction of PGM1 was not observed in the presence of Tet (+Tet) when HIF-1α was silenced (Figure 3G). These results indicate that *pgm1* is a new HIF-target gene and suggest that PGM1 could promote the first step of glycogenesis in hypoxia.

GLYCOLYSIS, RESPIRATION, AND GLYCOGENESIS ARE CLOSELY CONNECTED

To define a possible interconnection between glycogenesis, glycolysis, and respiration, we examined respiration-defective CCL39 cells (Res[–]) cells and glycolysis defective CCL39 cells (Gly[–]), cell lines derived from wild-type CCL39 (WT) cells (Pouyssegur et al., 2001). As previously observed (Figure 3D), PGM1 was induced in hypoxia in WT cells. However, Res[–] cells, which use mainly glycolysis for glucose metabolism and are glucose addicted, showed a higher amount of PGM1 protein in normoxia compared to WT cells (Figure 4A). The difference between normoxia and hypoxia was weak but reproducible in Res[–] cells. In Gly[–] cells, which use only oxidative metabolism and grow slowly, hypoxic induction of PGM1 was similar to that observed in WT cells. Glycogen accumulation was measured in parallel (Figure 4B). Interestingly, cells with no respiration (Res[–]) but a high level of glycolysis and low hypoxic induction of PGM1 stored less glycogen than cells defective in glycolysis (Gly[–]) but dependent on oxidative metabolism and with strong induction of PGM1. We next investigated how fast cells consumed glycogen in the absence of glucose after accumulation of glycogen in hypoxia. More than 75% of the glycogen stored by the WT cells was consumed in 3 h, whereas 90% of the glycogen was used by Res[–] cells (Figure 4C). However, Gly[–] cells needed more time (8 h) to consume less than 75%.

Taken together, these results show direct and indirect connections between glycolysis, respiration, and glycogenesis. In Res[–] cells, forced glycolysis impacts on basal PGM1 expression but does not impact on hypoxic induction of PGM1 and glycogen accumulation. However, it significantly modified the rate of glycogen consumption. While in Gly[–] cells PGM1 expression and glycogen storage were comparable to that of WT cells. However, as Gly[–] cells do not require more energy as they survived on respiration, glycogen consumption was lower than that of WT cells.

GLYCOGEN ACCUMULATION IS A SURVIVAL RESPONSE IN NON-CANCER AND IN MANY CANCER CELL LINES

We then hypothesized that the glycogen stored in hypoxia, is mobilized through glycogenolysis when cells encounter a low glucose-containing microenvironment (Figure 3A). Cells were thus exposed to hypoxia of 1% O₂ for 96 h and the glucose was then removed. Glycogen was measured after removal of glucose for 1, 3, and 6 h. As the amount of glycogen stored after 96 h of hypoxia is different for each cell line (Table 1), glycogen degradation was given as a percentage. CCL39 and MCF-7 cells, with similar amounts of accumulated glycogen (638.7 ± 193.6 ng/μg protein and 680 ± 12.6 ng/μg protein, respectively) also showed a similar rate of glycogen degradation. After 6 h, the amount of glycogen decreased by 87.3 and 75%, respectively (Figure 5A). However, LS174 cells consumed all their glycogen in 6 h when glucose was removed whereas MDA-MB cells consumed less than 70% of their glycogen. Thus the rate of glycogenolysis was similar for different cell types when the cells had a comparable amount of stored glycogen to start with (high glycogen for CCL39 and MCF-7 cells and low glycogen for LS174 and MDA-MB231; Figure 5A; Table 1). Finally, we investigated whether glycogen conversion to glucose-1-phosphate, a derivative of glucose that feeds into glycolysis, favors cell survival in hypoxic and no glucose conditions.

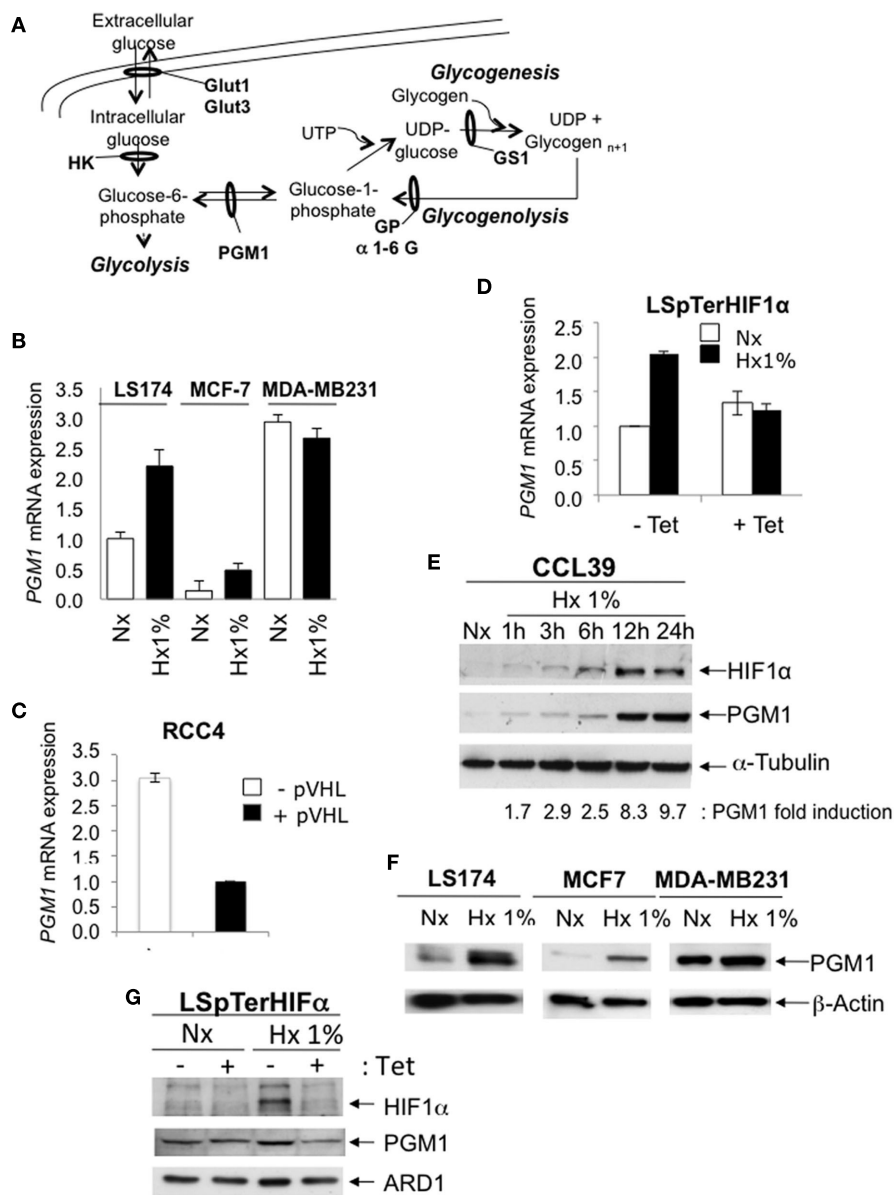
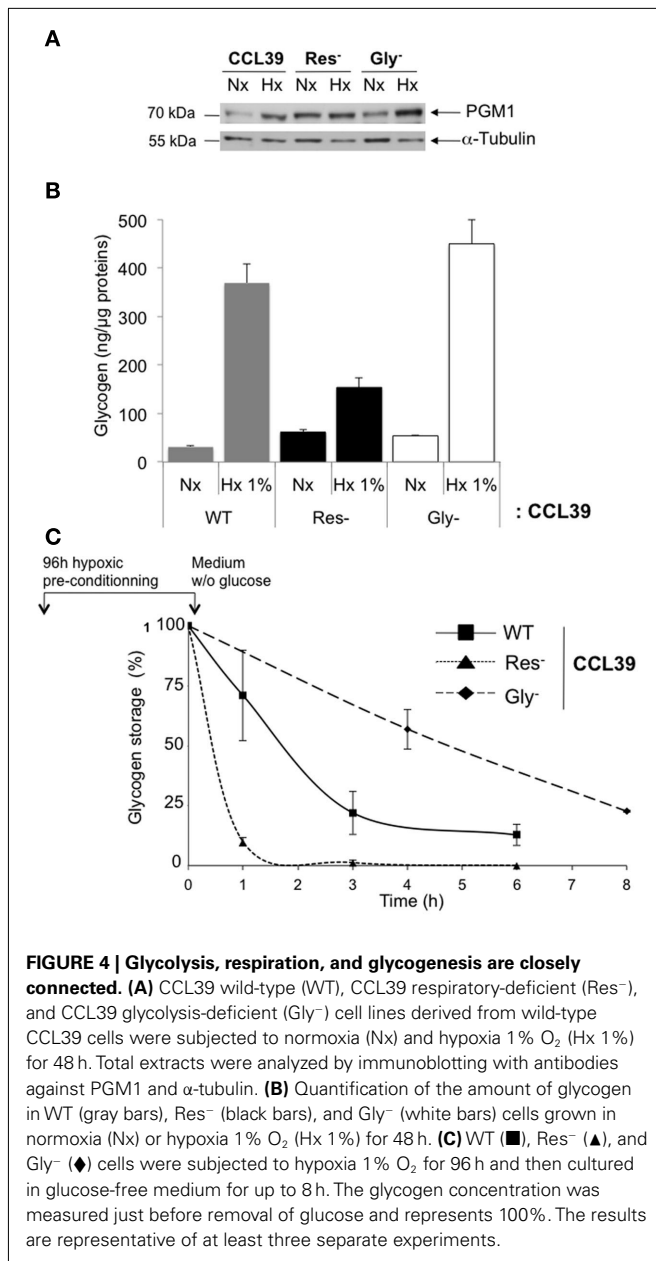


FIGURE 3 | Phosphoglucosyltransferase 1 is overexpressed in hypoxia to induce glycogen production. (A) Formation (glycogenesis) and hydrolysis (glycogenolysis) of glycogen. Glucose is rapidly transported into the cytoplasm for transformation into glucose-6-phosphate by hexokinases 1 and 2 (HK). Glucose-6-phosphate is at the junction between glycolysis and glycogenesis. Phosphoglucosyltransferase 1 (PGM1) is the first enzyme in glycogenesis that catalyzes the conversion of glucose-6-phosphate into glucose-1-phosphate, then into UDP-glucose. Glycogen synthase 1 (GS1) finalizes glycogen synthesis. This process is called glycogenesis. The reverse process that hydrolyzes glycogen into glucose via glycogen phosphorylase (GP) and a 1-6 glucosidase (1-6 G) is called the glycogenolysis. **(B)** Expression of the mRNA of PGM1 was determined by real-time qPCR in LS174 (black bars), MCF-7 (gray bars) and MDA-MB231 (white bars) cells in 24-, 48-, and 72-h in normoxia (Nx) and hypoxia 1% O₂ (Hx 1%). Each difference in gene expression was estimated within the limits of a 95% confidence interval. The results are representative of at least two separate experiments. **(C)** Expression of the mRNA of PGM1 was determined by real-time qPCR in

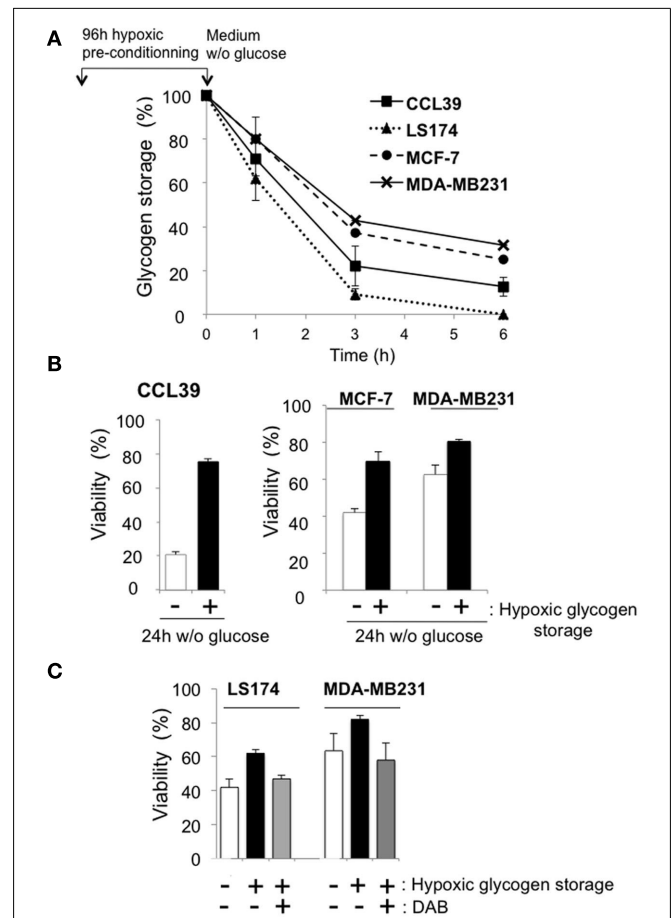
RCC4 (black bars) and 786-O cells (white bars) in the absence (-) or presence (+) of pVHL expression. Each difference in gene expression was estimated within the limits of a 95% confidence interval. The results are representative of at least two separate experiments. **(D)** Expression of the mRNA of PGM1 in LS174 pTerHIFα cells exposed to 48 h of normoxia (Nx) or hypoxia 1% O₂ (Hx 1%) in the absence (-) or presence (+) of Tet (10 μg/mL). The level of PGM1 mRNA was determined by real-time qPCR. Results are representative of at least two separate experiments with two different primers for PGM1. **(E)** CCL39 cells were subjected to normoxia (Nx) or hypoxia 1% O₂ (Hx 1%) for 1, 3, 6, 12, and 24 h. Total extracts were analyzed by immunoblotting with antibodies against HIF-1α, PGM1, and α-tubulin. **(F)** LS174, MCF7, and MDA-MB231 cells were subjected to normoxia (Nx) or hypoxia 1% O₂ (Hx 1%) for 48 h. Total extracts were analyzed by immunoblotting with antibodies against PGM1 and β-Actin. **(G)** LS174 pTerHIFα cells were exposed for 24 h to normoxia (Nx) or hypoxia 1% O₂ (Hx 1%) in the absence (-) or presence (+) of Tet (10 μg/mL). Total extracts were analyzed by immunoblotting with antibodies against HIF-1α, PGM1, and ARD-1.



Hypoxic CCL39 cells without stored glycogen and in the absence of glucose died massively (80% cell death) whereas cells with a high amount of glycogen were able to survive under these conditions (76% cell survival; **Figure 5B** – left panel). Moreover, both MCF-7, MDA-MB, and LS174 cells were able to survive better under drastic conditions when they accumulated glycogen (**Figure 5B** – left panel and **Figure 5C**). In summary, non-cancer and most cancer cells use glycogen as a source of fuel that can be mobilized very rapidly to produce energy for survival in a hostile microenvironment.

DISCUSSION

In this study, we established that almost all the cell lines tested contain a detectable amount of glycogen, from very low (BE



cells) to very high (RCC4 and MCF-7 cells) under normal cell culture conditions (**Table 1**; **Figure 2**). We arbitrarily grouped these cells into those with the highest (MCF-7 cells) to the lowest (BE cells) level of glycogen (**Table 1**). All these cells responded by an increase in glycogen accumulation when exposed to hypoxia. However, the previous classification totally changes if the cells are grouped based on the highest level of induction in hypoxia. CCL39, 786-O, LS174, and BE cells showed the highest difference between hypoxic and normoxic levels and MCF-7 and RCC4

cells showed the lowest difference. Only prostate cancer PC3 cells did not show a difference in the amount of glycogen between normoxia and hypoxia. Since prostate cancers show a low level of glucose uptake and a low rate of glycolysis (Liu et al., 2010) they may rely more on fatty acid metabolism. Alternatively, these cells might be impaired in glycogen synthesis, a question that will be addressed in the future with additional prostate cancer cell lines.

How do cells store glycogen in hypoxia? We demonstrated that the transcription factor HIF is involved in induction (Figure 2). Using two different models cell lines, RCC4 (HIF-1 and HIF-2) ± pVHL and LS174 pTerHIF-1 cells, we showed that glycogen accumulation was dependent on HIF. Our results confirmed previous results showing that silencing of HIF-1 α abrogated glycogen accumulation in mouse myotubes (Pescador et al., 2010) and in human MCF-7 cells (Shen et al., 2010). However, in the first study, the authors suggested that HIF-2 could contribute to glycogen accumulation whereas in the second, the authors showed that silencing of HIF-2 α slightly, but not significantly, decreased glycogen storage. Here, we also used renal clear cell carcinoma 768-O cells that contain only HIF-2 α (Figure 2C). We also examined 786-O cells in which wild-type VHL was re-introduced. However, 786-O (–pVHL) showed a 40 times (34.3 ± 18.5 ng/ μ g protein) lower glycogen content than RCC4 (+pVHL). In the presence of pVHL, 786-O cells had a lower glycogen content (1.1 ± 0.8 ng/ μ g protein) than in the absence of pVHL. These results, as suggested by Pescador et al. (2010) and Shen et al. (2010), indicate that HIF-2 α could be involved but does not predominate. Four new hypoxia-regulated genes involved in glycogenesis have now been described: muscle glycogen synthase (GYS1), UTP:glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UGP2), 1,4- α glucan branching enzyme (GB1; Pescador et al., 2010) and protein phosphatase 1, regulatory subunit 3C (PPP1R3C; Shen et al., 2010). Here, we propose that phosphoglucomutase 1 (PGM1), which converts glucose-6-phosphate into glucose-1-phosphate, is a target for HIF-1 (Figure 3C). Hypoxia-induced PGM1 expression was observed in all the cells tested (Figure 3) and correlated with HIF-1 α stabilization (Figure 3D). However, the level of PGM1 expression in normoxia did not correlate with the level of glycogen present in the cells. For example, normoxic PGM1 expression in MCF-7 cells was weak compared to normoxic expression of PGM1 in MDA-MB231 cells (Figure 3E); the amount of glycogen was about 113.9 ± 5.8 ng/ μ g protein and 10.0 ± 2.3 ng/ μ g protein, respectively (Table 1). Thus most of the genes involved in glycogenesis seem to be up-regulated by hypoxia suggesting that glycogen

accumulation under hypoxic conditions is an important step in metabolism.

Why do normal and cancer cells store glycogen? We reported previously that non-cancer and cancer cells sense hypoxia as the beginning of a change in the microenvironment (Bellot et al., 2009). Thus, cells attempt to antagonize these drastic conditions by creating new survival strategies such as increased glycolysis or autophagy. Herein we demonstrated that glycogen storage is a survival process used by cells that sense a forthcoming impoverishment in the nutrients of the microenvironment. This is in agreement with data obtained with mouse neonatal hepatocytes (Pescador et al., 2010). Glycogenolysis is a fast event as more than 70% of the total glycogen was consumed in only 6 h in all tested cells. However, the baseline amount of glycogen was different in different cell lines, MCF-7 cells still had 170 ng/ μ g protein after 6 h whereas MDA-MB231 had only 30 ng/ μ g protein (Figure 5A). Does this make a difference to the survival process? Almost all the cell lines tested showed improved cell survival in glucose-free medium after hypoxic preconditioning. As expected CCL39 and MCF-7 cells, with a high level of glycogen, increased their survival potential by almost 70 and 50%, respectively. However, MDA-MB231 cells, with a low level of glycogen and fast consumption of glycogen were able to survive even better than CCL39 and MCF-7 cells. It is worth noting that MDA-MB231 cells are highly aggressive breast cancer cells compared to the less invasive MCF-7 cells. LS174 cells, which consumed the total amount of glycogen in 6 h, did not benefit from their glycogen stores after 24 h (data not shown).

Taken together, this study showed that non-cancer and cancer cells could accumulate glycogen in order to adapt and survive in an oxygen- and glucose-free microenvironment. Thus cells in general, and cancer cells in particular, will show an incredible capacity to adapt and make the most of the harsh conditions to which they are exposed in assuring tumor progression.

ACKNOWLEDGMENTS

The laboratory is funded by the Ligue Nationale Contre le Cancer (équipe labellisée), the Association pour la Recherche contre le Cancer, the Institut National du Cancer (INCa), the Agence Nationale pour la Recherche, METOXIA (EU program FP7), the Centre Antoine Lacassagne, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the University of Nice (<http://www.unice.fr/isdbc/>). We thank Dr. M. Christiane Brahimi-Horn for critical reading and editorial correction. We also thank Dr. Thierry Pourcher for giving us the ability to measure glycogen concentration.

REFERENCES

- Aragones, J., Fraisl, P., Baes, M., and Carmeliet, P. (2009). Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. *Cell Metab.* 9, 11–22.
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., and Mazure, N. M. (2009). Hypoxia-induced Autophagy is mediated through HIF-induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3-domains. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2570–2581.
- Bilton, R., Mazure, N., Trottier, E., Hat-tab, M., Déry, M. A., Richard, D. E., Pouyssegur, J., and Brahimi-Horn, M. C. (2005). Arrest-defective-1 protein, an acetyltransferase, does not alter stability of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and is not induced by hypoxia or HIF. *J. Biol. Chem.* 280, 31132–31140.
- Brahimi-Horn, M. C., Bellot, G., and Pouyssegur, J. (2011). Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 67–72.
- Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2007a). Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 223–229.
- Brahimi-Horn, M. C., Laferrière, J., Mazure, N. M., and Pouyssegur, J. (2007b). “Tumour Angiogenesis,” in *Basic Mechanisms and Cancer Therapy*, eds D. Marmé and N. Fusenig, Springer.
- Buchakjian, M. R., and Kornbluth, S. (2010). The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 715–727.
- Chen, N., and Karantza, V. (2011). Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biol. Ther.* 11, 157–168.

- Chiche, J., Ilc, K., Laferrriere, J., Trotter, E., Dayan, F., Mazure, N. M., Brahimi-Horn, M. C., and Pouyssegur, J. (2009). Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res.* 69, 358–368.
- Franchi, A., Silvestre, P., and Pouyssegur, J. (1981). A genetic approach to the role of energy metabolism in the growth of tumor cells: tumorigenicity of fibroblast mutants deficient either in glycolysis or in respiration. *Int. J. Cancer* 27, 819–827.
- Gatenby, R. A., and Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4, 891–899.
- Ghadially, F. (1989). *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix*. Third Edn, Vol. II, Butterworths.
- Kaelin, W. G. Jr. (2009). Treatment of kidney cancer: insights provided by the VHL tumor-suppressor protein. *Cancer* 115, 2262–2272.
- Kaelin, W. G. Jr., and Thompson, C. B. (2010). Q&A: cancer: clues from cell metabolism. *Nature* 465, 562–564.
- Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13, 472–482.
- Liu, Y., Zuckier, L. S., and Ghesani, N. V. (2010). Dominant uptake of fatty acid over glucose by prostate cells: a potential new diagnostic and therapeutic approach. *Anticancer Res.* 30, 369–374.
- Majmundar, A. J., Wong, W. J., and Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol. Cell* 40, 294–309.
- Manalo, D. J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B. D., Ye, S. Q., Garcia, J. G., and Semenza, G. L. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105, 659–669.
- Mazure, N. M., Brahimi-Horn, M. C., Berta, M. A., Benizri, E., Bilton, R. L., Dayan, F., Ginouves, A., Berra, E., and Pouyssegur, J. (2004). HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochem. Pharmacol.* 68, 971–980.
- Mazure, N. M., and Pouyssegur, J. (2009). Atypical BH3-domains of BNIP3 and BNIP3L lead to autophagy in hypoxia. *Autophagy* 5, 868–869.
- McBride, A., Ghilagaber, S., Nikolaev, A., and Hardie, D. G. (2009). The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab.* 9, 23–34.
- Medina Villaamil, V., Aparicio Gallego, G., Valbuena Rubira, L., Garcia Campelo, R., Valladares-Ayerbes, M., Grande Pulido, E., Victoria Bolos, M., Santamarina Cainzos, I., and Anton Aparicio, L. M. (2011). Fructose transporter Glut5 expression in clear renal cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 25, 315–323.
- Meléndez, R., Meléndez-Hevia, E., and Canela, E. I. (1999). The fractal structure of glycogen: a clever solution to optimize cell metabolism. *Biophys. J.* 77, 1327–1332.
- Pescador, N., Villar, D., Cifuentes, D., Garcia-Rocha, M., Ortiz-Barahona, A., Vazquez, S., Ordonez, A., Cuevas, Y., Saez-Morales, D., Garcia-Bermejo, M. L., Landazuri, M. O., Guinovart, J., and Del Peso, L. (2010). Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. *PLoS ONE* 5, e9644. doi:10.1371/journal.pone.0009644
- Porporato, P. E., Dhup, S., Dadhich, R. K., Copetti, T., and Sonveaux, P. (2011). Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front. Pharmacol.* 2:49. doi:10.3389/fphar.2011.00049
- Pouyssegur, J., Franchi, A., and Pages, G. (2001). pHi, aerobic glycolysis and vascular endothelial growth factor in tumour growth. *Novartis Found. Symp.* 240, 186–196.
- Pouyssegur, J., Franchi, A., Salomon, J. C., and Silvestre, P. (1980). Isolation of a Chinese hamster fibroblast mutant defective in hexose transport and aerobic glycolysis: its use to dissect the malignant phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 2698–2701.
- 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.
- Semenza, G. L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 51–56.
- Shanware, N. P., Mullen, A. R., Deberardinis, R. J., and Abraham, R. T. (2011). Glutamine: pleiotropic roles in tumor growth and stress resistance. *J. Mol. Med.* 89, 229–236.
- Shen, G. M., Zhang, F. L., Liu, X. L., and Zhang, J. W. (2010). Hypoxia-inducible factor 1-mediated regulation of PPP1R3C promotes glycogen accumulation in human MCF-7 cells under hypoxia. *FEBS Lett.* 584, 4366–4372.
- van de Wetering, M., Oving, I., Muncan, V., Pon Fong, M. T., Brantjes, H., Van Leenen, D., Holstege, F. C., Brummelkamp, T. R., Agami, R., and Clevers, H. (2003). Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep.* 4, 609–615.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., and Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033.
- Vigoda, A., Mamedova, L. K., Shneyvays, V., Katz, A., and Shainberg, A. (2003). Glycogen metabolism in rat heart muscle cultures after hypoxia. *Mol. Cell. Biochem.* 254, 311–318.
- Wise, D. R., and Thompson, C. B. (2010). Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 35, 427–433.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 29 August 2011; accepted: 09 February 2012; published online: 28 February 2012.

Citation: Pelletier J, Bellot G, Gounon P, Lacas-Gervais S, Pouyssegur J and Mazure NM (2012) Glycogen synthesis is induced in hypoxia by the hypoxia-inducible factor and promotes cancer cell survival. *Front. Oncol.* 2:18. doi: 10.3389/fonc.2012.00018

This article was submitted to *Frontiers in Molecular and Cellular Oncology*, a specialty of *Frontiers in Oncology*.

Copyright © 2012 Pelletier, Bellot, Gounon, Lacas-Gervais, Pouyssegur and Mazure. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited.

III. Conclusion, discussion et perspectives

Dans cette étude, nous avons mis à jour un mécanisme important impliqué dans la plasticité métabolique des cellules tumorales en hypoxie, et identifié *pgm1* comme une cible de HIF1. Cela ouvre des perspectives intéressantes et laisse des questions ouvertes auxquelles nous allons essayer de répondre ou d'apporter des pistes de réflexion.

Peut-on envisager PGM1 comme une cible antitumorale ?

Nous nous sommes intéressés à PGM1 pour deux raisons majeures : (1) nous l'avons retrouvée induite en hypoxie dans toutes les lignées cellulaires testées, et (2) c'est l'enzyme initiatrice de la synthèse de glycogène. Or les étapes initiatrices revêtent souvent un rôle particulièrement important dans les voies métaboliques (exemples de l'hexokinase, de la PDH dans le TCA, de la G6PDH dans la voie des pentoses phosphates, de mTORC1 dans la traduction). PGM1 a de surcroît une place particulière dans le métabolisme des carbohydrates puisqu'elle détourne de manière réversible le G6P de la glycolyse ou de la voie des pentoses phosphates. Ainsi, malgré le fait que la PGM1 ne soit pas l'enzyme limitante de la synthèse de glycogène, rôle tenu par la glycogène synthase, nous nous sommes demandés si l'induction hypoxique de la PGM1 pouvait être un « driver » de la synthèse de glycogène. Autrement dit réduire l'expression de PGM1 est-il suffisant à bloquer le stockage de glycogène ?

Il existe 4 isoformes de phosphoglucomutases, PGM1, PGM2, PGM3 et PGM5. Nous avons alors analysé la quantité d'ARNm de ces 4 isoformes dans les cellules LS174 et les cellules HeLa (Figure 27A) et observé que seul l'ARNm de PGM1 est induit en hypoxie malgré la détection de l'ARNm de PGM2 et PGM3 (PGM5 indétectable) en normoxie ou en hypoxie. Nous avons ensuite réduit très fortement l'expression de PGM1 par siRNA (Figure 27B) et observé que cela n'atténuait pas le stockage de glycogène (Figure 27C) dans les cellules HeLa. Nous avons utilisé ce modèle cellulaire qui a l'avantage de présenter une grande efficacité de transfection mais le désavantage de stocker des quantités relativement faibles de glycogène en hypoxie, bien que supérieures à celles retrouvées en normoxie.

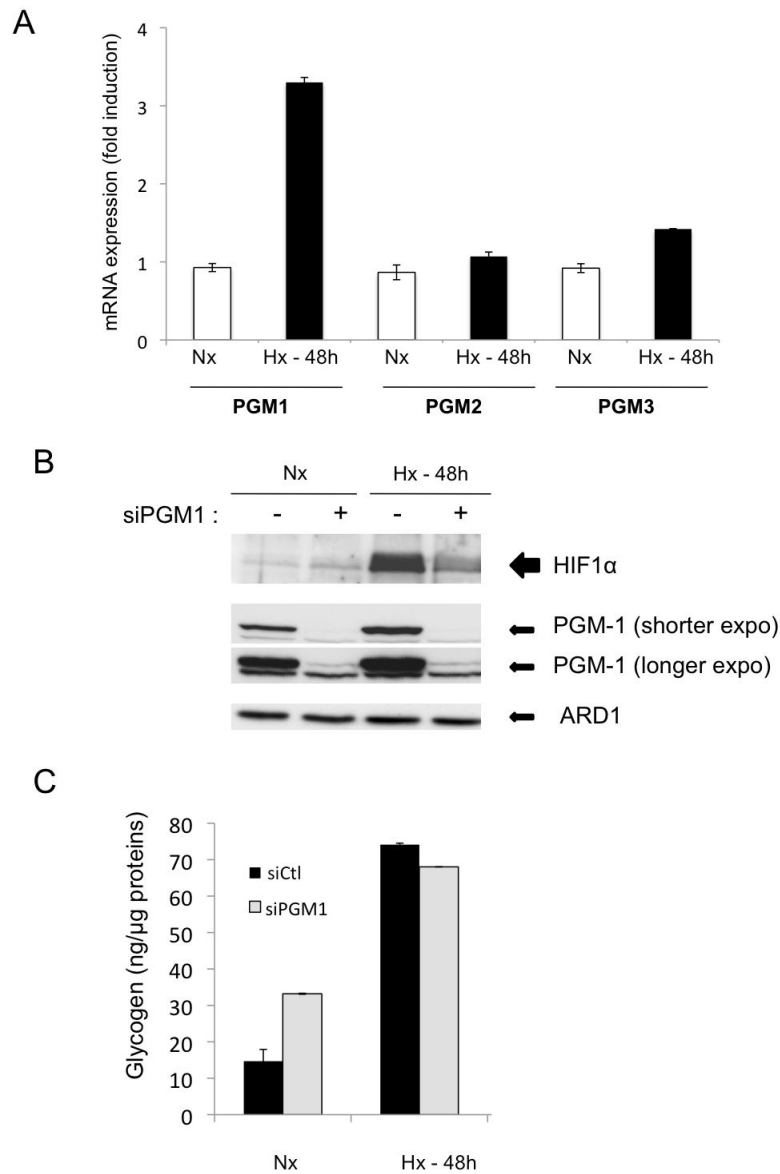


Figure 27 : PGM1 est la seule phosphoglucomutase induite en hypoxie, mais la diminution drastique de son expression n’abolit pas le stockage de glycogène.

(A) Expression de l’ARN messager de PGM1, PGM2 et PGM3, après 48h d’incubation en normoxie (Nx, barres blanches), ou en hypoxie 1%O₂ (Hx, barres noires) dans les cellules HeLa. Une double transfection transitoire de siRNA ciblant *pgm1* a été réalisée sur des cellules HeLa qui ont ensuite été incubées en normoxie (Nx) ou en hypoxie 1% O₂ (Hx-48h) pendant 48h. (B) Le lysat cellulaire total a été analysé par immunoblot avec les anticorps contre PGM1 (avec une exposition courte «shorter expo» ou longue «longer expo» de la membrane à un film autoradiographique), HIF1 ou ARD1 (témoin de charge). (C) En parallèle, le glycogène a été quantifié dans ces cellules 48h post-transfection avec un siRNA control (SiCtl) ou ciblant *pgm1* (siPGM1), après incubation en normoxie (Nx) ou en hypoxie 1% O₂ (Hx-48h)

Ce résultat apporte une réponse claire : inhiber fortement la PGM1 n'abolit pas la synthèse de glycogène en hypoxie. Nous nous sommes donc penchés sur ce phénomène et avons fait deux observations pouvant expliquer ce phénomène :

- La quantité de l'ARNm de PGM3 est augmentée (d'un facteur 3) en compensation de la réduction de l'expression de PGM1 par siRNA dans les cellules HeLa (données non communiquées).

- L'utilisation d'un « cocktail » de siRNA, ciblant PGM1, PGM2 et PGM3, ne provoque qu'un effet minime sur la synthèse de glycogène (-10%), malgré une réduction prononcée de l'expression de ces 3 protéines (données non communiquées).

Les phosphoglucomutases étant les seules enzymes capables de produire du glucose-1-phosphate, elles sont un passage obligé dans la synthèse du glycogène. Le fait que l'on ait relativement peu affecté les niveaux de glycogène suggère que l'activité « mutase » des PGM n'est pas fortement inhibée malgré une réduction drastique de leur expression. Ce résultat n'est pas tellement surprenant au vu du fait que les PGMs ne sont pas des enzymes limitantes. Des résultats similaires avaient été obtenus dans l'équipe du Dr J. Pouysségur (Laferrrière, J. *et al.*, données non publiées) quelques années auparavant avec la phosphoglucoisomérase (PGI)³⁰, « porte d'entrée » de la glycolyse. En effet la diminution de plus de 90% de l'expression de la PGI, par l'utilisation de shRNA, n'avait pas provoqué d'effet sur le flux glycolytique suggérant que l'expression résiduelle est suffisante pour totalement maintenir le flux glycolytique.

Nous pensons donc que l'activité de la PGM est déterminée majoritairement par la concentration intracellulaire de G6P. Cette hypothèse est soutenue par les expériences que nous avons réalisées avec des fibroblastes (CCL39) mutants pour la respiration (Res⁻) (Publication 2 - Figure 4A) puisque ces cellules, qui présentent une forte glycolyse et un faible pool de glucose-6-phosphate (GLUT1 et l'hexokinase n'étant pas induits par HIF1 dans ces conditions), présentent un stockage de glycogène fortement atténué. La synthèse de glycogène semble donc déterminée par deux éléments : **l'activité de la Glycogène Synthase (GS)**, enzyme limitante de la voie et **la concentration intracellulaire en G6P**, un nœud métabolique intégrant les informations concernant

³⁰ Enzyme à activité isomérase qui convertit le Glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate

l'activité de l'hexokinase (elle-même dépendante du flux entrant de glucose), de l'intensité du flux de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates. HIF induit donc la synthèse de glycogène en régulant ces deux éléments, tout en facilitant le flux de la glycogenogenèse *via* l'induction de *pgm1*, *UGP2*, *PPP1R3C* et *GB1*. De plus, au vu de l'existence d'autres isoformes de PGM et du caractère non limitant de PGM1, celle-ci n'est peut-être pas une cible antitumorale aussi intéressante qu'elle a pu apparaître au cours de notre étude.

Quand la glycogène phosphorylase (PYGL) entre dans l'équation

Une étude récente de Favaro *et al.* supporte nos résultats *in vitro*, les transposent *in vivo* et identifie PYGL comme un acteur impliqué dans le métabolisme du glycogène en hypoxie (Favaro *et al.*, 2012). Ils ont montré en effet dans des cellules cancéreuses de glioblastomes (U87), de sein (MCF7) ou de colon (HCT116), dans un modèle de sphéroïdes *in vitro*, ou de xénogreffes tumorales *in vivo* traitées avec l'anti-angiogénique Bévacicumab (pour amplifier l'hypoxie tumorale) que le glycogène est fortement accumulé dans les zones tumorales hypoxiques. Ils ont associé le stockage de glycogène avec une expression augmentée de la glycogène synthase (GYS1), mais également, de façon surprenante, avec l'expression de la glycogène phosphorylase (PYGL) qui libère des molécules de glucose-1-phosphate du polymère de glycogène. De plus, ils ont démontré que la diminution d'expression de PYGL par shRNA conduit à une accumulation de glycogène, une augmentation de la production de ROS, et en parallèle à l'activation de p53, de la sénescence et une inhibition de la prolifération tumorale *in vitro et in vivo*. Les auteurs suggèrent que le blocage de PYGL pourrait conduire au piégeage du glucose dans les polymères de glycogène. Ainsi, le G6P ne serait plus disponible pour alimenter la voie des pentoses phosphates qui produit la glutathione et le NADPH protecteurs des ROS. Il apparaît surprenant que l'hypoxie active deux actions totalement antagonistes : la synthèse et la dégradation de glycogène. Les auteurs interprètent ce phénomène par la possibilité que le G6P, nouvellement formé, doive subir un cycle d'incorporation/libération du glycogène avant de rentrer dans la glycolyse ou la voie des pentoses phosphates. Cette dernière hypothèse est cependant contre-intuitive d'un point de vue métabolique car la cellule ne retirerait aucun avantage de ce cycle, ni pouvoir réducteur, ni énergie. Il apparaît peut être plus vraisemblable que

PYGL soit impliquée dans un autre processus que la dégradation du glycogène. Enfin, une autre possibilité envisageable pourrait être que le glycogène exerce en hypoxie un rôle autre que celui de polymère de glucose. On peut, par exemple, penser à un rôle de molécule d'échafaudage permettant la co-localisation de certaines protéines, comme c'est par exemple le cas pour le complexe glycogène-AMPK-GYS, dans lequel la fixation de l'AMPK au glycogène lui permet d'interagir avec GYS (McBride et al., 2009). Quelque soit le mécanisme impliqué, cette étude confirme un rôle important du métabolisme du glycogène dans les cellules cancéreuses et souligne l'intérêt antitumoral potentiel du ciblage de cette voie métabolique.

Rôle de l'AMPK dans le stockage de glycogène en hypoxie?

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'AMPK agit comme un frein sur la synthèse de glycogène en phosphorylant la glycogène synthase. Nous nous sommes donc demandés si l'absence de ce frein conduirait à une accumulation plus importante de glycogène. Nous avons pour cela quantifié le glycogène dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) sauvages, knock-out pour une des sous-unités catalytiques de l'AMPK (*Ampk α 1* ou *Ampk α 2*), ou pour les deux (*Ampk α 1* et *Ampk α 2*, absence totale d'activité AMPK). Comme on peut le constater sur la figure 28, l'absence de(s) sous-unité(s) catalytique(s) de l'AMPK (*Ampk α 1* et/ou *Ampk α 2*) modifie peu les concentrations intracellulaires de glycogène en normoxie. En hypoxie, les MEF sauvages stockent peu de glycogène, mais le knock-out de l'*Ampk α 1* ou des deux sous-unités α conduit à une accumulation quatre fois plus importante de glycogène. Il faut cependant rester prudent car ces résultats ont été obtenus sur des populations hétérogènes de MEF, et il semble nécessaire de les confirmer sur un modèle inductible (shRNA,..). Néanmoins ils offrent des perspectives intéressantes. Il serait par exemple intéressant d'étudier les effets d'un activateur direct (composé A769662) ou indirect (metformine) de l'AMPK, sur la synthèse de glycogène en hypoxie (ou en normoxie dans des carcinomes rénaux à cellules claires mutées pour pVHL exprimant constitutivement HIF1 (RCC4,RCC10)), et la sensibilité de ces cellules à une carence en glucose.

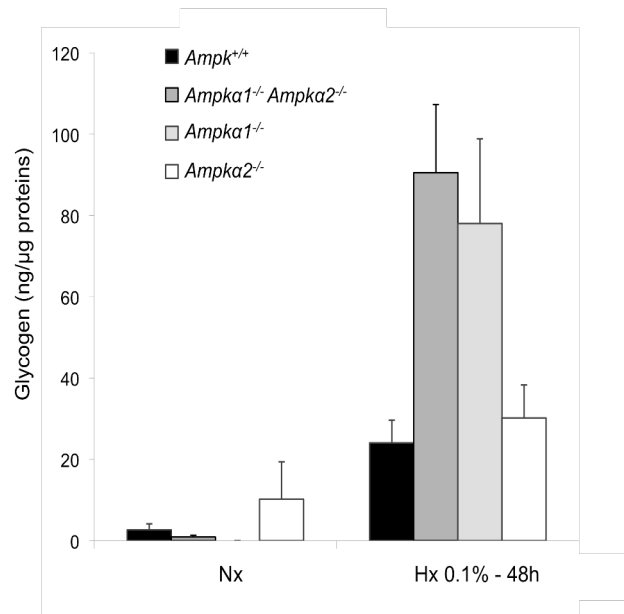


Figure 28 : Les cellules déficientes pour la sous-unité catalytique *Ampk* α 1 et/ou *Ampk* α 2 présentent des stocks de glycogène plus importants en hypoxie.

Des fibroblastes embryonnaires de souris MEF sauvages (*Ampk*^{+/+}), knock-out pour la sous-unité AMPK α 1 (*Ampk* α 1^{-/-}), la sous-unité AMPK α 2 (*Ampk* α 2^{-/-}), ou pour les deux sous-unités catalytiques *Ampk* α 1 et *Ampk* α 2 (*Ampk* α 1^{-/-}*Ampk* α 2^{-/-}) ont été incubées pendant 48h en hypoxie 0,1% O₂ (Hx 0.1%-48h), en présence de 25mM de glucose avant la quantification du glycogène.

L'étude du stockage de glycogène dans des conditions riches en glucose est-il un modèle pertinent ?

Nous avons montré dans cette étude que la plupart des cellules, que ce soit des fibroblastes ou des cellules cancéreuses, sont capables d'accumuler du glycogène en hypoxie (1% O₂). Cependant, une critique peut être émise vis-à-vis de la pertinence physiologique de cette découverte, du moins dans le cadre du cancer. En effet, ces résultats ont été obtenus en présence de 25mM de glucose. Nous avons également démontré que le stockage de glycogène avait également lieu, à un degré dix fois moindre, en présence de 5mM de glucose (publication 2, Figure 1). En revanche, en présence de 1mM, les quantités de glycogène stockées sont indétectables dans les cellules étudiées (CCL39) (données non communiquées).

La glycémie à jeun est en moyenne de 0,9g/L soit une concentration de glucose dans le sang d'environ 5mM. Au vu du réseau vasculaire anarchique présent autour de la tumeur, on peut se demander quelles sont les valeurs atteintes par les concentrations intratumorales de glucose. La concentration de glucose dans les tissus est probablement variable, de même que dans les cellules tumorales en fonction de leur distance d'éloignement des vaisseaux sanguins. Alors que les cellules tumorales aux abords des vaisseaux sont à priori capables de stocker du glycogène (5mM glucose), les zones tumorales les plus hypoxiques sont probablement confrontées à des concentrations de glucose inférieures à 1mM. Cependant, Il n'existe malheureusement pas de données dans la littérature permettant de statuer sur les concentrations réelles de glucose au sein des tumeurs. Quoiqu'il en soit on peut se questionner sur la pertinence de notre modèle étudiant l'accumulation de glycogène en hypoxie en présence de 25mM de glucose, et se demander si ce phénomène existe, ou du moins est aussi prononcé *in vivo*. Le modèle de xénogreffes utilisé dans l'étude de Favaro *et al.* (Favaro *et al.*, 2012) a permis d'établir la présence de glycogène *in vivo* dans les zones hypoxiques de la tumeur, et bien que ce modèle ne soit pas totalement physiologique, il nous conforte dans l'existence d'un mécanisme de stockage de glycogène dans les zones plus ou moins hypoxiques de la tumeur.

C. Manuscrit 1 : The controversial role of AMPK in bioenergetics and tumor growth. AMPK is dispensable to maintain ATP levels following glycolysis inhibition *in vitro* but facilitates tumour engraftment of Ras-transformed fibroblasts.

I. Contexte et objectif de la recherche

L'AMPK est une kinase majeure, impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires, et possède un rôle central dans le contrôle du métabolisme en régulant les niveaux d'énergie cellulaire. Le rôle que joue l'AMPK dans le cancer est complexe controversé. C'est un suppresseur de tumeurs responsable d'un effet cytostatique lorsqu'elle est activée. Cependant, c'est également un protecteur des cellules tumorales qui sont confrontées à un environnement hostile, pendant des périodes de temps prolongées, au cours du développement de la tumeur. Alors que de nombreuses études fondamentales et cliniques visent à activer l'AMPK par le biais de l'AICAR, des biguanidines Metformine/Phenformine, ou de l'activateur direct A799662 (ou MT 63-78), dans le but de prévenir l'apparition de cancer et d'inhiber la prolifération des cellules tumorales, notre stratégie a été au contraire d'inhiber l'AMPK dans le but d'atténuer la plasticité métabolique des cellules tumorales. L'objectif de ce projet a consisté à étudier l'effet du blocage de la glycolyse, principale voie productrice d'ATP dans les cellules tumorales hypoxiques, sur la régulation des niveaux d'ATP, la viabilité cellulaire et la croissance tumorale *in vivo*, et ceci dans un contexte où l'AMPK est absente.

II. Résultats

Nous avons utilisé un modèle de fibroblastes embryonnaires de souris sauvages (*Ampk^{+/+}*) ou inactivés pour l'AMPK (*Ampk^{-/-}*), transformés par l'oncogène RAS^{V12}. Nous avons démontré que l'inactivation de l'AMPK n'influe pas sur la bioénergétique en absence de stress métabolique. Dans un premier temps, notre approche pour réduire le flux glycolytique a été de cibler les transporteurs de monocarboxylates MCT1 et MCT4. Nous avons montré que cette stratégie abolit le transport de lactate, aboutit à une accumulation intracellulaire de celui-ci et conduit à une forte inhibition de la glycolyse *in vitro*, indépendamment de l'AMPK. Nous avons ensuite montré que l'AMPK n'était pas requise pour maintenir les niveaux d'ATP dans ces conditions, et à l'inverse pas suffisante en condition de « catastrophe métabolique » générée par le blocage combiné de l'export de lactate et de la respiration mitochondriale. Nous avons cependant confirmé son effet protecteur en condition de carence en glucose. Nous avons enfin démontré *in vivo*, dans un modèle de xénogreffes tumorales, que l'absence de l'AMPK ou de MCT4 génère une latence d'apparition des tumeurs. L'absence simultanée de ces deux acteurs se répercute fortement sur la tumorigénicité suggérant une importance cruciale de MCT4 et de l'AMPK pour maintenir la bioénergétique tumorale et promouvoir l'initiation des tumeurs solides dans un environnement hostile.

**The controversial role of AMPK in bioenergetics and tumor growth
AMPK is dispensable to maintain ATP levels following glycolysis inhibition
in vitro but facilitates tumour engraftment of Ras-transformed fibroblasts.**

Joffrey Pelletier¹, Danièle Roux¹, Benoit Viollet², Nathalie Mazure¹
and Jacques Pouyssegur^{1,3}

¹ *Institute for Research on Cancer and Ageing of Nice (IRCAN), University of Nice-Sophia Antipolis, CNRS UMR 7284 – INSERM U1081 -UNS, Centre Antoine Lacassagne, 33 Avenue de Valombrose, 06189 Nice, France.*

² *Institut Cochin, University of Paris Descartes, CNRS UMR 8104, Paris F-75014, France.*

³ *Centre Scientifique de Monaco (CSM), Monaco.*

Correspondence

Dr. Jacques Pouyssegur

Institute for Research on Cancer and Ageing of Nice (IRCAN),

Centre Antoine Lacassagne

33 Avenue de Valombrose

06189 Nice, France

pouyssegur@unice.fr

Running title: Role of AMP Kinase under bioenergetic stresses and tumoral growth

Keywords: AMPK, AMPK-null cells, cancer cell, glycolysis, lactate transport, MCTs, OXPHOS, ATP, hypoxia.

Abstract

Tumor metabolic reprogramming exacerbates the addiction of cancer cells to glycolysis in order to produce energy and multiple intermediates important during tumor growth. As a result of high glycolytic rates, the lactate massively produced must be exported mainly by the two monocarboxylates transporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 to maintain energy production. MCTs inhibition reduced tumour growth but did not affect ATP levels or cell viability. AMPK as a central regulator of energy homeostasis was the best candidate to explain how cells reduce their ATP consumption in response to inhibition of ATP production in order to maintain a viable ATP level. We showed in RAS-transformed mouse embryonic fibroblasts (MEF) deficient in AMPK activity that blockade of lactate transport (1) reduced drastically glycolysis but did not affect ATP maintenance nor viability, whereas (2) it collapsed ATP levels and cell viability as rapidly as in control cells when combined with OXPHOS inhibitors phenformine/oligomycin. However, we showed an important role of AMPK in ATP preservation following glucose deprivation, suggesting a complex effect of AMPK on cellular energetic regulation. Finally we showed that genetic disruption of *Mct4* and *Ampk* dramatically reduced tumorigenicity in a xenograft model suggesting a crucial role of these two actors during establishment of the tumor in a hostile environment. These findings confirm lactate transport blockade as an efficient anticancer strategy and highlight the interest of targeting *Mct4* in a context of impaired AMPK activity, like in *Lkb1* mutated tumors.

III. Conclusion, discussion et perspectives

Cette étude nous a permis d'établir un modèle simplifié de régulation des niveaux d'ATP par l'acidose et l'AMPK. L'ATP en normoxie est produit majoritairement par la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et dans une plus faible proportion par la glycolyse (Figure 29A). Le niveau d'ATP cellulaire résulte d'un équilibre entre l'ATP produit (prod) et l'ATP consommé (conso). L'AMPK n'exerce pas un rôle prépondérant en absence de stress énergétique dans notre modèle cellulaire (flèche en pointillés). En hypoxie, (Figure 29B) HIF1 induit un shift métabolique de la respiration cellulaire vers la glycolyse. On se rapproche alors un peu plus du contexte des tumeurs glycolytiques. L'ATP provient alors majoritairement de la glycolyse et minoritairement de l'OXPHOS. Nous avons observé que le niveau d'ATP tend légèrement à augmenter dans notre modèle en raison probablement de la diminution de la consommation d'ATP par la prolifération cellulaire (et les réactions cataboliques que cela comporte). L'AMPK ne joue également pas de rôle prépondérant dans le maintien de l'ATP en hypoxie.

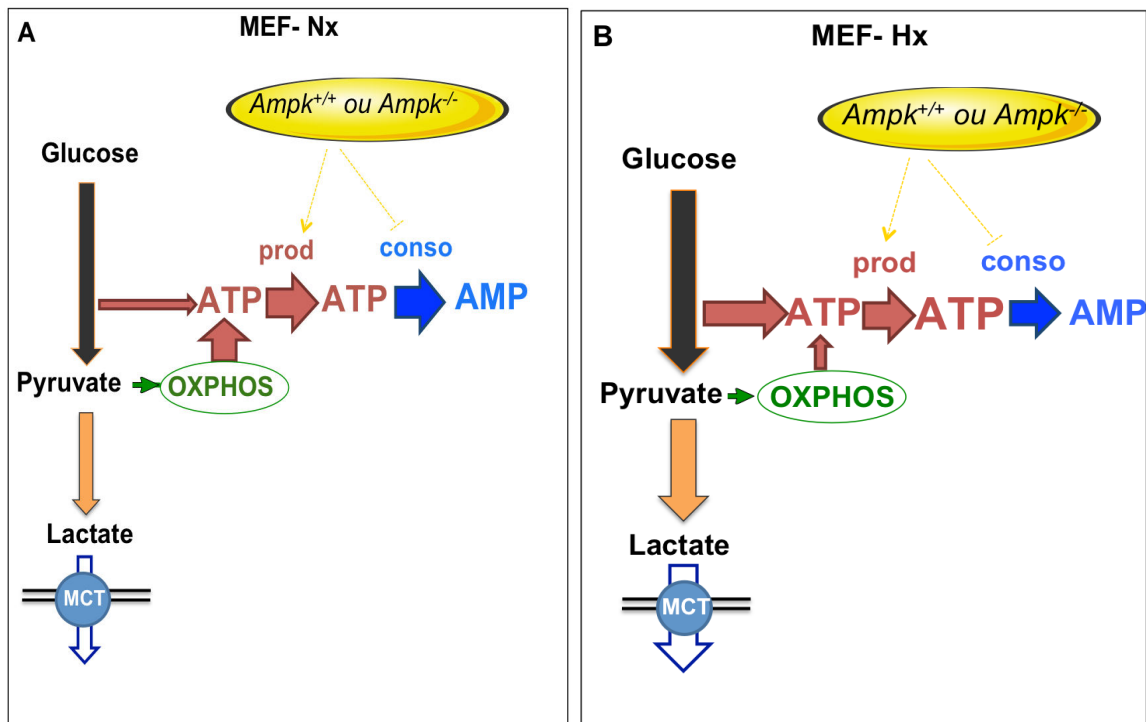


Figure 29: Modèle de régulation des voies bioénergétiques en normoxie (A) et en hypoxie (B) dans les fibroblastes transformés par Ras^{V12}.

En hypoxie, le blocage de l'export de lactate (Figure 30A) conduit à la rétro-inhibition de la glycolyse, sans activer d'avantage l'OXPPOS dans notre modèle. La production d'ATP diminue alors. Cependant, le niveau d'ATP n'est pas affecté en raison d'une diminution de la consommation d'ATP. Cette régulation a lieu indépendamment de l'AMPK et fait intervenir, du moins en partie, l'acidose intracellulaire (inhibition de phospho-p70 S6 Kinase et activation de p53 (données non communiquées)). Si dans ces conditions est ajouté un inhibiteur de l'OXPPOS (phenformine ou oligomycine) (Figure 30B), la production globale d'ATP devient alors inférieure à sa consommation, ce qui conduit à une chute des niveaux d'ATP et de la viabilité cellulaire. Notre étude suggère que l'AMPK ne joue également aucun rôle dans ce scénario.

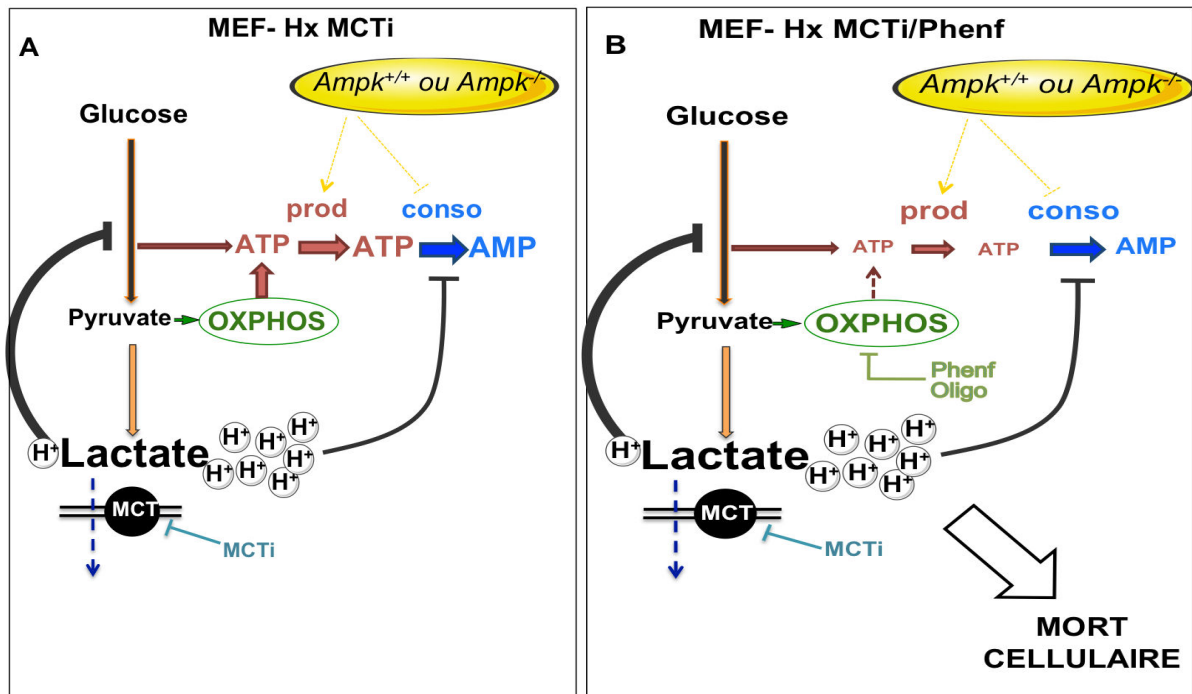


Figure 30 : Modèle de régulation des voies bioénergétiques en hypoxie, suite au blocage de l'export de lactate (A) ou du blocage combiné de l'export de lactate et de l'OXPPOS (B) dans les fibroblastes transformés par Ras^{V12}

Enfin, en présence de quantités réduites de glucose exogène (< 1mM), le flux glycolytique s'effondre, de même que les quantités de pyruvate entrant dans l'OXPPOS. En absence de rétrocontrôle négatif de l'acidose sur la consommation d'ATP, le rôle de l'AMPK est magnifié (Figure 30A). Elle exerce enfin son rôle de régulateur du métabolisme énergétique (en inhibant la consommation d'ATP et en stimulant la production d'ATP), et son rôle de protéine de survie, ceci en fonction de la sévérité et de

la durée du stress métabolique. Sans AMPK fonctionnelle, les cellules ne contrôlent plus leur balance énergétique, ce qui conduit à une chute du niveau d'ATP et à une mortalité cellulaire plus prononcée. (Figure 30B)

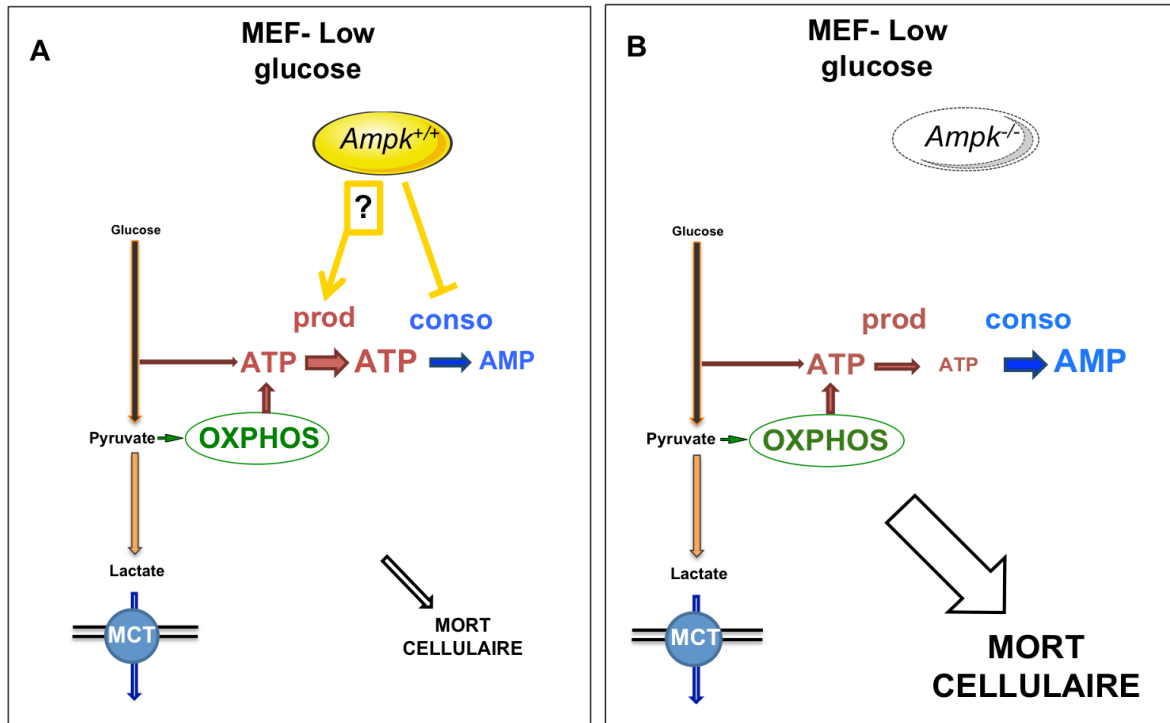


Figure 31 : Modèle de régulation des voies bioénergétiques en normoxie suite à une privation de glucose dans des fibroblastes transformés par Ras^{V12} $Ampk^{+/+}$ (A) ou $Ampk^{-/-}$ (B).

Cette étude pose alors quelques questions et offre des perspectives que nous développons ici :

L'AMPK détourne-t-elle d'autres intermédiaires métaboliques afin d'alimenter glycolyse/TCA et contourner l'effet de la carence en glucose ?

Il existe une autre possibilité que le rétrocontrôle du pH pour expliquer pourquoi l'avantage de survie que confère l'AMPK dans des conditions de carence en glucose est perdu lorsque l'on bloque en aval glycolyse et respiration mitochondriale. En effet, nous avons jusqu'alors considéré exclusivement le rôle énergétique de l'AMPK, sans prendre en compte l'impact qu'elle peut avoir sur les intermédiaires métaboliques. Or nous

avons vu que l'AMPK active une « signature métabolique catabolique » (Cf Introduction chapitre 3-C) en activant notamment la production d'acétyl-CoA (par le biais de la dégradation des acides gras), ou d'acides aminés (par le biais de l'autophagie). Ainsi, on pourrait penser qu'en condition de carence en glucose, l'AMPK stimule la libération de ces intermédiaires qui peuvent être utilisés comme « matière première » pour alimenter le TCA ou la glycolyse.

Une étude approfondie de l'axe LKB1-AMPK dans le métabolisme énergétique est requise.

LKB1 est la kinase prédominante impliquée dans l'activation de l'AMPK en réponse à un stress énergétique (Alessi et al., 2006), ce qui les lie intimement. Cependant, des divergences existent entre ces deux protéines puisque d'une part l'AMPK peut être phosphorylée par la CaMKK β en présence de stress énergétique (-III), et d'autre part LKB1 phosphoryle 12 autres kinases de la famille des AMPK related kinases (ARKs) dans un site équivalent à la Thr172, régulant ainsi positivement leur activité (Cf Introduction, chapitre 3-B).

Plusieurs études réalisées par Shaw et ses collaborateurs suggèrent un rôle important de LKB1 dans la réponse au stress énergétique. Ils ont en effet montré que la viabilité des cellules *lkb1*^{-/-} (HeLa, MEF *lkb1*^{-/-}, A549) est plus fortement atteinte (comparées à leurs homologues exprimant une LKB1 exogène) en présence de l'AMP mimétique AICAR mimant de faibles niveaux énergétiques, ou en présence de phenformine (Shackelford et al., 2013; Shaw et al., 2004). A des concentrations d'AICAR identiques (2,5mM), nous n'avons pas été en mesure d'observer plus de mortalité cellulaire dans les MEF *Ampk*^{-/-} que dans les MEF *Ampk*^{+/+} malgré un taux de prolifération réduit dans les deux populations cellulaires. Les MEF *Ampk*^{-/-} ne sont également pas plus sensibles à la phenformine que leur homologue sauvage (Manuscrit 3 - Figure S4C). Cet antagonisme entre nos résultats et ceux de Shaw est intéressant et suggère un rôle important de LKB1, directement ou par l'intermédiaire d'une des 12 autres kinases qu'il régule, dans l'homéostasie énergétique.

La question de savoir si LKB1 peut réguler l'homéostasie énergétique indépendamment de l'AMPK mériterait d'être adressée, d'autant plus que ni LKB1, ni

aucune des ARKs autre que l'AMPK α 1 ou l'AMPK α 2 n'a encore été démontrée comme activée en condition de stress énergétique. On pourrait utiliser la technologie des CRISPR-Cas9 pour réaliser un knock-out de *lkb1* (ou de l'un de ses partenaires MO25 ou STRAD), dans nos cellules *Ampk*^{-/-} et adresser la question de la sensibilité de ces cellules à un stress énergétique.

Choix du modèle cellulaire :

Comparer la prolifération ou la tumorigénicité de populations de MEFs, sauvages ou mutées pour un ou plusieurs gène(s) s'avère souvent délicat en raison de l'hétérogénéité des populations, même lorsque celles-ci sont immortalisées avec la protéine oncogène virale SV40T, comme c'est le cas dans notre étude. A l'initiation de ce projet, l'objectif était d'invalider le gène *Mct4* dans les MEF déficientes pour *Ampk α 1* et *Ampk α 2* (*Ampk*^{-/-}) puis de réintroduire une forme exogène activable de Ampk α 1. On aurait pu alors comparer l'effet du MCTi sur ces cellules par rapport aux cellules « parentales » *Ampk*^{-/-} *Mct4*^{-/-}. Nous avons pour cela obtenu, grâce au Pr D. Carling (MRC, Londres), le plasmide contenant l'ADNc de l'Ampk α 1-*wt* de rat (contenant le tag Myc) sous le contrôle du promoteur CMV. Alors que nous avons réussi à la faire exprimer par les cellules HEK293 ou les cellules MEF *Ampk*^{+/+} en transfection transitoire, nous n'avons pas été en mesure de faire exprimer l'ampk α 1-*wt* de rat dans les MEF *Ampk*^{-/-}, de façon transitoire et de façon stable, malgré plusieurs tentatives. Notre hypothèse pour expliquer ce phénomène est qu'en absence de sous-unité α , les sous-unités β et/ou γ se retrouvent dégradées. Ainsi lorsque nous avons essayé d'exprimer la sous-unité Ampk α 1, elle a pu être déstabilisée en absence de ses partenaires β et/ou γ . Plusieurs études ont démontré que le knock-out d'une des sous-unités β ou γ peut altérer l'expression des autres sous-unités de l'AMPK ainsi que l'activité du complexe. C'est notamment le cas de la sous-unité γ 1 (Foretz et al., 2010) ou des sous-unité β 1 et β 2 (O'Neill et al., 2011). De plus, il a été démontré dans des cellules COS-7³¹ (possédant des sous-unités α , β , γ endogènes) que la demi-vie d'une sous-unité α 1 exogène transfectée (6,1 h) était multipliée par 2 lorsque elle était co-transfectée avec des sous-unité β et γ (13,7 h) (Crute et al., 1998). Nous aurions pu répondre à cette hypothèse en analysant l'expression des sous-unités β et γ par immunoblot.

³¹ Cellules rénales de singe vert d'Afrique

Afin de pallier l'impossibilité de réexprimer l'AMPK α 1 dans les MEF *Ampk^{p/p}*, nous avons alors deux solutions : faire exprimer tout un complexe hétérotrimérique de l'AMPK (AMPK α 1 β 1 γ 1 par exemple, comme réalisé par Viana *et al.* (Viana et al., 2007)) ou invalider *Mct4* dans des MEF *Ampk^{+/+}*. Nous avons opté pour la deuxième option car nous étions certains de son succès rapide. Cependant cette stratégie a eu le désavantage de confronter des populations distinctes, hétérogènes et exprimant des niveaux de RAS^{V12} différents.

Pourquoi cette étude a-t-elle été réalisée sur des fibroblastes embryonnaires de souris, transformés par l'oncogène RAS^{V12} et non pas directement sur des lignées cellulaires tumorales humaines ? Nous avons la possibilité d'utiliser des cellules d'adénocarcinome de colon LS174 invalidées pour le gène *Mct4* (Le Floch et al., 2011), ou des fibroblastes transformés (CCL39) n'exprimant pas le transporteur MCT4 de manière endogène. Il nous fallait pour cela inhiber l'AMPK et moduler le transport de lactate avec l'inhibition pharmacologique de MCT1. Ces cellules, ainsi que la plupart de celles testées au laboratoire possèdent les sous-unités AMPK α 1 et AMPK α 2. Ces deux sous-unités catalytiques sont redondantes et l'absence de l'une d'entre elles n'abolit pas l'activation de l'AMPK (Laderoute et al., 2006). Nous ne voulions pas utiliser de shRNA contre l'AMPK α 1 et l'AMPK α 2 car nous avons, par le passé, constaté que l'activité d'une enzyme et notamment d'une kinase n'est pas forcément altérée par la diminution de son expression. Nous avons choisi alors d'exprimer un dominant négatif de l'AMPK α 1³². Nous espérons ainsi détourner les sous-unités AMPK β et AMPK γ des sous-unités AMPK α fonctionnelles. Cette approche est couramment utilisée dans les cellules hépatiques avec l'utilisation d'adénovirus (Woods et al., 2000, Rencurel, 2006 #1426). Cependant les adénovirus ne se transmettent pas aux cellules filles, et ne sont donc pas adaptés aux cellules tumorales proliférant rapidement. Nous avons donc généré des clones stables (LS174 ou CCL39) en co-transfectant un vecteur permettant l'expression du dominant négatif AMPK α 1 (sous le contrôle du promoteur CMV, fourni par le Dr F. Foufelle, centre de recherche des Cordeliers, Paris) et un vecteur contenant le gène de résistance à un antibiotique. Parmi plus de 200 clones stables testés, nous avons obtenu

³² Cette protéine correspond à la sous-unité AMPK α 1-wt de rat mutée au niveau de son site de fixation de l'ATP nécessaire à son activité kinase

des cellules exprimant plus ou moins fortement l'AMPK α 1-DN, mais aucun a des niveaux permettant de réduire fortement l'activation de l'AMPK en réponse à un stress énergétique.

La récente avancée technologique du système CRISPR/cas9 dans l'édition du génome offre maintenant la possibilité de cibler efficacement et relativement rapidement les gènes de l'*Ampk α 1* et *Ampk α 2* dans les cellules tumorales humaines. Il serait également fort intéressant d'obtenir un modèle cellulaire et/ou un modèle *in vivo* dans lequel on pourrait abolir de manière inductible l'expression de l'AMPK dans les tumeurs (technologie CRE-LOX par exemple). Ce modèle existe dans les lymphomes (Faubert et al., 2013) mais non dans les tumeurs solides.

L'utilisation du modèle imparfait des MEFs a cependant ouvert des questions quant au rôle de l'AMPK de « gardien universel de la balance énergétique » décrit dans la littérature et ouvre de nombreuses questions et perspectives d'études dans le cadre du cancer.

DISCUSSION GENERALE

L'environnement d'une tumeur est extrêmement dynamique et en perpétuelle évolution. Au cours de son développement, la tumeur doit faire face à des conditions drastiques, pauvres en glucose et en oxygène, et adapter son métabolisme cellulaire pour survivre dans un court terme. Cette étape de survie en milieu hostile s'accompagne d'un remodelage du réseau vasculaire tumoral pour créer des conditions propices à son expansion. HIF1 est un acteur majeur de la réponse hypoxique et de la reprogrammation métabolique des cellules tumorales. Ainsi, il constitue une cible thérapeutique particulièrement intéressante dans l'optique du développement de thérapies anticancéreuses ciblées.

Mon travail de thèse s'est inscrit dans le cadre d'une meilleure compréhension de l'hypoxie tumorale et de la capacité d'adaptation remarquable des cellules cancéreuses qui leur permet de résister aux stress qu'elles rencontrent naturellement au sein de la tumeur, ou aux stress qui leur sont imposés par les divers traitements cliniques (conventionnels, antiangiogéniques,...).

Nous avons étudié deux points précis du mode d'action de HIF1, au cœur de la signalisation hypoxique et de la reprogrammation du métabolisme tumoral : (1) la régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF1 par FIH, en amont de la signalisation hypoxique ; (2) l'effet de l'hypoxie sur le métabolisme des carbohydrates, en aval de HIF1. Nous avons donc montré, dans un premier temps, un fort potentiel thérapeutique à cibler FIH dans les cellules tumorales p53 sauvages, car en plus de modifier qualitativement l'activité transcriptionnelle de HIF1 avec des conséquences multiples sur la tumeur, inhiber FIH exerce un frein direct sur la prolifération par le biais du suppresseur de tumeur p53. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives mais requièrent cependant des études complémentaires afin d'établir le mécanisme impliqué dans ce phénomène, ainsi qu'une étude généralisée sur différents types de cancers.

La découverte de ce nouveau mécanisme protecteur de stockage de glucose, sous la forme de polymères de glycogène, ouvre également plusieurs perspectives dans le diagnostic de l'hypoxie intratumorale et le développement de nouvelles thérapies. En effet, le glycogène peut être détecté très facilement, de façon qualitative dans les cellules/tissus par le marquage histochimique Periodic Acid Schiff, utilisé en routine (PAS). Ainsi, on peut imaginer alors estimer le degré d'hypoxie intratumorale par le PAS, afin d'apprécier l'efficacité d'un antiangiogénique ou anticiper une résistance accrue aux

radiothérapies/chimiothérapies. D'un point de vue thérapeutique, cibler la régulation de la synthèse de glycogène par HIF pourrait être particulièrement intéressant, surtout dans le cas des ccRCC (accumulant de très grandes quantités de glycogène, souvent responsable du phénotype clair du cytoplasme de ces cellules³³).

Notre troisième étude a, quant à elle, soulevé de nombreuses interrogations vis-à-vis du rôle de l'AMPK en tant que « gardien de la balance énergétique cellulaire » communément admis dans la littérature. L'absence d'expression de l'AMPK n'a pas généré le différentiel auquel nous nous attendions dans notre approche ciblant la bioénergétique. La vision que j'avais de l'AMPK et du métabolisme énergétique au début de ma thèse a clairement évolué au cours de mes années de recherche. Avec un peu plus de recul, je réalise que l'idée d'un senseur unique du niveau d'ATP était un peu naïve au vu de la complexité, l'interconnection et la plasticité du réseau métabolique. De plus, l'ATP est une molécule tellement cruciale et centrale élevée au rang « d'unité d'énergie de la cellule » que les cellules de mammifère ont élaboré, probablement au cours de l'évolution, des systèmes de régulation coordonnés. Cependant, nous ne remettons pas en cause l'importance de l'AMPK dans les fonctions physiologiques de mammifères. Ce n'est d'ailleurs pas un hasard si elle est phylogéniquement conservée des levures à l'homme, « verrouillée » par l'existence d'au moins deux isoformes pour chaque sous-unité et si le knock-out de ses deux sous-unités catalytiques est létal au stade embryonnaire (E10,5) chez la souris.

L'action prépondérante et physiologique de l'AMPK sur les métabolismes des carbohydrates ou des lipides a été largement étudiée dans des tissus qui stockent du glycogène ou des lipides, afin ultérieurement de réguler le métabolisme systémique ou de les consommer au cours de contractions musculaires. Cependant, les résultats obtenus au cours de ma thèse laissent un grand nombre de questions ouvertes à propos du rôle de l'AMPK dans la régulation de ces voies anaboliques au sein des cellules cancéreuses. En effet, la plupart des cellules tumorales, ou les MEFs que nous avons utilisés, sont capables de stocker du glycogène ou des lipides mais à des quantités faibles par rapport à celles retrouvées dans les cellules spécialisées dans le stockage de ces polymères. Cependant, le besoin en lipides des cellules cancéreuses est tout aussi important mais destiné à un autre usage : la production de membranes lipidiques pour

³³ Le cytoplasme clair peut aussi être causé par une accumulation de lipides dans certains types de ccRCC

les cellules filles. Ainsi, bien que nous ayons pu observer un rôle protecteur de l'AMPK dans des conditions de déprivation en glucose dans les MEF, le phénotype engendré par la perte de l'AMPK n'est pas aussi marqué que ce à quoi nous nous attendions. Cependant, en aurait-il été de même dans des tumeurs de tissus spécialisées dans le stockage de lipides/glycogène (hépatome, sarcome des tissus mous, myosarcome, etc...)?

HIF1 et l'AMPK sont deux acteurs importants dans la plasticité métabolique et font partie d'un réseau communicant avec des oncogènes ou suppresseurs de tumeurs tels que Myc, la voie PI3K/AKT/mTOR et p53. La plasticité des cellules tumorales n'étant pas infini, trouver des approches combinatoires incluant plusieurs de ces acteurs, grâce aux techniques émergentes de métabolomique et d'édition du génome, pourraient offrir des perspectives novatrices et prometteuses dans le traitement du cancer.

REFERENCES

- Abu-Elheiga, L., Brinkley, W.R., Zhong, L., Chirala, S.S., Woldegiorgis, G., and Wakil, S.J. (2000). The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1444-1449.
- Al-Hakim, A.K., Goransson, O., Deak, M., Toth, R., Campbell, D.G., Morrice, N.A., Prescott, A.R., and Alessi, D.R. (2005). 14-3-3 cooperates with LKB1 to regulate the activity and localization of QSK and SIK. *J Cell Sci* 118, 5661-5673.
- Alessi, D.R., Sakamoto, K., and Bayascas, J.R. (2006). LKB1-dependent signaling pathways. *Annu Rev Biochem* 75, 137-163.
- Amith, S.R., and Fliegel, L. (2013). Regulation of the Na⁺/H⁺ Exchanger (NHE1) in Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res* 73, 1259-1264.
- Amodeo, G.A., Rudolph, M.J., and Tong, L. (2007). Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homologue SNF1. *Nature* 449, 492-495.
- Barnes, K., Ingram, J.C., Porras, O.H., Barros, L.F., Hudson, E.R., Fryer, L.G., Fougelle, F., Carling, D., Hardie, D.G., and Baldwin, S.A. (2002). Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Cell Sci* 115, 2433-2442.
- Bateman, A. (1997). The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci* 22, 12-13.
- Beasley, N.J., Leek, R., Alam, M., Turley, H., Cox, G.J., Gatter, K., Millard, P., Fuggle, S., and Harris, A.L. (2002). Hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res* 62, 2493-2497.
- Beauloye, C., Marsin, A.S., Bertrand, L., Krause, U., Hardie, D.G., Vanoverschelde, J.L., and Hue, L. (2001). Insulin antagonizes AMP-activated protein kinase activation by ischemia or anoxia in rat hearts, without affecting total adenine nucleotides. *FEBS Lett* 505, 348-352.
- Beg, Z.H., Allmann, D.W., and Gibson, D.M. (1973). Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 54, 1362-1369.
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., and Mazure, N.M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 29, 2570-2581.
- Ben Sahra, I., Regazzetti, C., Robert, G., Laurent, K., Le Marchand-Brustel, Y., Auberger, P., Tanti, J.F., Giorgetti-Peraldi, S., and Bost, F. (2011). Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Res* 71, 4366-4372.
- Bergersen, L.H. (2007). Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience* 145, 11-19.
- Bertout, J.A., Patel, S.A., and Simon, M.C. (2008). The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 967-975.
- Birner, P., Gatterbauer, B., Oberhuber, G., Schindl, M., Rossler, K., Prodinger, A., Budka, H., and Hainfellner, J.A. (2001). Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer* 92, 165-171.
- Birner, P., Schindl, M., Obermair, A., Plank, C., Breitenecker, G., and Oberhuber, G. (2000). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 60, 4693-4696.
- Bos, R., Zhong, H., Hanrahan, C.F., Mommers, E.C., Semenza, G.L., Pinedo, H.M., Abeloff, M.D., Simons, J.W., van Diest, P.J., and van der Wall, E. (2001). Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 93, 309-314.

- Boyer, P.D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E., and Slater, E.C. (1977). Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Annu Rev Biochem* 46, 955-966.
- Brahimi-Horn, C., Laferrière, J., Mazure, N., and Pouyssegur, J. (2008). Tumor angiogenesis (Springer).
- Brahimi-Horn, C., Mazure, N., and Pouyssegur, J. (2005). Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal* 17, 1-9.
- Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2007). Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl)* 85, 1301-1307.
- Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2009). HIF at a glance. *J Cell Sci* 122, 1055-1057.
- Braun, R.D., Lanzen, J.L., Snyder, S.A., and Dewhirst, M.W. (2001). Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H2533-2544.
- Brizel, D.M., Schroeder, T., Scher, R.L., Walenta, S., Clough, R.W., Dewhirst, M.W., and Mueller-Klieser, W. (2001). Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51, 349-353.
- Brooks, G.A. (2009). Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *J Physiol* 587, 5591-5600.
- Buchakjian, M.R., and Kornbluth, S. (2010). The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 715-727.
- Buckwitz, D., Jacobasch, G., Gerth, C., Holzhutter, H.G., and Thamm, R. (1988). A kinetic model of phosphofructokinase from *Plasmodium berghei*. Influence of ATP and fructose-6-phosphate. *Mol Biochem Parasitol* 27, 225-232.
- Budanov, A.V., and Karin, M. (2008). p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* 134, 451-460.
- Cairns, R.A., and Hill, R.P. (2004). Acute hypoxia enhances spontaneous lymph node metastasis in an orthotopic murine model of human cervical carcinoma. *Cancer Res* 64, 2054-2061.
- Canto, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J.N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J.C., Elliott, P.J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056-1060.
- Cardone, R.A., Casavola, V., and Reshkin, S.J. (2005). The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 5, 786-795.
- Carling, D., Aguan, K., Woods, A., Verhoeven, A.J., Beri, R.K., Brennan, C.H., Sidebottom, C., Davison, M.D., and Scott, J. (1994). Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *J Biol Chem* 269, 11442-11448.
- Carling, D., and Hardie, D.G. (1989). The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta* 1012, 81-86.
- Carling, D., Mayer, F.V., Sanders, M.J., and Gamblin, S.J. (2011). AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nat Chem Biol* 7, 512-518.
- Carling, D., Sanders, M.J., and Woods, A. (2008). The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 4, S55-59.
- Carling, D., Zammit, V.A., and Hardie, D.G. (1987). A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 223, 217-222.

- Carlson, C.A., and Kim, K.H. (1973). Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 248, 378-380.
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., *et al.* (1998). Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394, 485-490.
- Chambard, J.C., and Pouyssegur, J. (1986). Intracellular pH controls growth factor-induced ribosomal protein S6 phosphorylation and protein synthesis in the G0---G1 transition of fibroblasts. *Exp Cell Res* 164, 282-294.
- Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., and Schumacker, P.T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 275, 25130-25138.
- 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.
- Chen, E.Y., Fujinaga, M., and Giaccia, A.J. (1999). Hypoxic microenvironment within an embryo induces apoptosis and is essential for proper morphological development. *Teratology* 60, 215-225.
- Chen, S., Xue, Y., Wu, X., Le, C., Bhutkar, A., Bell, E.L., Zhang, F., Langer, R., and Sharp, P.A. (2014). Global microRNA depletion suppresses tumor angiogenesis. *Genes Dev* 28, 1054-1067.
- Chhipa, R.R., Wu, Y., Mohler, J.L., and Ip, C. (2010). Survival advantage of AMPK activation to androgen-independent prostate cancer cells during energy stress. *Cell Signal* 22, 1554-1561.
- Chiche, J., Ilc, K., Laferriere, J., Trottier, E., Dayan, F., Mazure, N.M., Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2009). Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer research* 69, 358-368.
- Chiche, J., Rouleau, M., Gounon, P., Brahimi-Horn, M.C., Pouyssegur, J., and Mazure, N.M. (2010). Hypoxic enlarged mitochondria protect cancer cells from apoptotic stimuli. *J Cell Physiol* 222, 648-657.
- Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Wu, N., Asara, J.M., and Cantley, L.C. (2008). Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* 452, 181-186.
- Cidad, P., Almeida, A., and Bolanos, J.P. (2004). Inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide rapidly stimulates cytoprotective GLUT3-mediated glucose uptake through 5'-AMP-activated protein kinase. *Biochem J* 384, 629-636.
- Cockman, M.E., Lancaster, D.E., Stolze, I.P., Hewitson, K.S., McDonough, M.A., Coleman, M.L., Coles, C.H., Yu, X., Hay, R.T., Ley, S.C., *et al.* (2006). Posttranslational hydroxylation of ankyrin repeats in I κ B proteins by the hypoxia-inducible factor (HIF) asparaginyl hydroxylase, factor inhibiting HIF (FIH). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14767-14772.
- Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci* 25, 596-601.
- Cohen, P. (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol* 4, E127-130.
- Coleman, M.L., McDonough, M.A., Hewitson, K.S., Coles, C., Mecinovic, J., Edelman, M., Cook, K.M., Cockman, M.E., Lancaster, D.E., Kessler, B.M., *et al.* (2007). Asparaginyl hydroxylation of the Notch ankyrin repeat domain by factor inhibiting hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 282, 24027-24038.

Comerford, K.M., Wallace, T.J., Karhausen, J., Louis, N.A., Montalto, M.C., and Colgan, S.P. (2002). Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 62, 3387-3394.

Crute, B.E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B.E., and Witters, L.A. (1998). Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273, 35347-35354.

Dang, C.V. (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 19, 1-11.

Dann, S.G., Selvaraj, A., and Thomas, G. (2007). mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends Mol Med* 13, 252-259.

Dawson, D.M., Goodfriend, T.L., and Kaplan, N.O. (1964). Lactic Dehydrogenases: Functions of the Two Types Rates of Synthesis of the Two Major Forms Can Be Correlated with Metabolic Differentiation. *Science* 143, 929-933.

Dayan, F., Roux, D., Brahimi-Horn, M.C., Pouyssegur, J., and Mazure, N.M. (2006). The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res* 66, 3688-3698.

Demierre, M.F., Higgins, P.D., Gruber, S.B., Hawk, E., and Lippman, S.M. (2005). Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 5, 930-942.

Denko, N.C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 8, 705-713.

Dennis, P.B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S.C., and Thomas, G. (2001). Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294, 1102-1105.

Deuticke, B. (1982). Monocarboxylate transport in erythrocytes. *J Membr Biol* 70, 89-103.

Dimmer, K.S., Friedrich, B., Lang, F., Deitmer, J.W., and Broer, S. (2000). The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* 350 Pt 1, 219-227.

Doherty, J.R., Yang, C., Scott, K.E., Cameron, M.D., Fallahi, M., Li, W., Hall, M.A., Amelio, A.L., Mishra, J.K., Li, F., *et al.* (2013). Blocking lactate export by inhibiting the Myc target MCT1 Disables glycolysis and glutathione synthesis. *Cancer Res* 74, 908-920.

Doyen, J., Parks, S.K., Marcie, S., Pouyssegur, J., and Chiche, J. (2013). Knock-down of hypoxia-induced carbonic anhydrases IX and XII radiosensitizes tumor cells by increasing intracellular acidosis. *Front Oncol* 2, 199.

Druker, B.J. (2002). Perspectives on the development of a molecularly targeted agent. *Cancer Cell* 1, 31-36.

Dubois, L., Peeters, S., Lieuwes, N.G., Geusens, N., Thiry, A., Wigfield, S., Carta, F., McIntyre, A., Scozzafava, A., Dogne, J.M., *et al.* (2011). Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo therapeutic effect of tumor irradiation. *Radiother Oncol* 99, 424-431.

Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., *et al.* (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456-461.

Elrod, J.W., and Lefer, D.J. (2005). The effects of statins on endothelium, inflammation and cardioprotection. *Drug News Perspect* 18, 229-236.

Emerling, B.M., Weinberg, F., Snyder, C., Burgess, Z., Mutlu, G.M., Viollet, B., Budinger, G.R., and Chandel, N.S. (2009). Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. *Free Radic Biol Med* 46, 1386-1391.

- Erecinska, M., and Silver, I.A. (2001). Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* 128, 263-276.
- Erler, J.T., Cawthorne, C.J., Williams, K.J., Koritzinsky, M., Wouters, B.G., Wilson, C., Miller, C., Demonacos, C., Stratford, I.J., and Dive, C. (2004). Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol* 24, 2875-2889.
- Eschmann, S.M., Paulsen, F., Reimold, M., Dittmann, H., Welz, S., Reischl, G., Machulla, H.J., and Bares, R. (2005). Prognostic impact of hypoxia imaging with 18F-misonidazole PET in non-small cell lung cancer and head and neck cancer before radiotherapy. *J Nucl Med* 46, 253-260.
- Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., Dupuy, F., Chambers, C., Fuerth, B.J., Viollet, B., *et al.* (2013). AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab* 17, 113-124.
- Favaro, E., Bensaad, K., Chong, M.G., Tennant, D.A., Ferguson, D.J., Snell, C., Steers, G., Turley, H., Li, J.L., Gunther, U.L., *et al.* (2012). Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells. *Cell Metab* 16, 751-764.
- Fels, D.R., and Koumenis, C. (2005). HIF-1alpha and p53: the ODD couple? *Trends Biochem Sci* 30, 426-429.
- Feng, Z., Hu, W., de Stanchina, E., Teresky, A.K., Jin, S., Lowe, S., and Levine, A.J. (2007). The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res* 67, 3043-3053.
- Feng, Z., Zhang, H., Levine, A.J., and Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8204-8209.
- Ferre, P., Azzout-Marniche, D., and Foufelle, F. (2003). AMP-activated protein kinase and hepatic genes involved in glucose metabolism. *Biochem Soc Trans* 31, 220-223.
- Fisel, P., Kruck, S., Winter, S., Bedke, J., Hennenlotter, J., Nies, A.T., Scharpf, M., Fend, F., Stenzl, A., Schwab, M., *et al.* (2013). DNA methylation of the SLC16A3 promoter regulates expression of the human lactate transporter MCT4 in renal cancer with consequences for clinical outcome. *Clin Cancer Res* 19, 5170-5181.
- Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., O'Dwyer, P.J., Lee, R.J., Grippo, J.F., Nolop, K., *et al.* (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363, 809-819.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31.
- Folkman, J., Hahmfeldt, P., and Hlatky, L. (2000). Cancer: looking outside the genome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 76-79.
- Foretz, M., Ancellin, N., Andreelli, F., Saintillan, Y., Grondin, P., Kahn, A., Thorens, B., Vaulont, S., and Viollet, B. (2005). Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes* 54, 1331-1339.
- Foretz, M., Carling, D., Guichard, C., Ferre, P., and Foufelle, F. (1998). AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 273, 14767-14771.
- Foretz, M., Taleux, N., Guigas, B., Horman, S., Beauloye, C., Andreelli, F., Bertrand, L., and Viollet, B. (2006). [Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]. *Med Sci (Paris)* 22, 381-388.

- Foretz, M., Hebrard, S., Guihard, S., Leclerc, J., Do Cruzeiro, M., Hamard, G., Niedergang, F., Gaudry, M., and Viollet, B. (2010). The AMPK γ 1 subunit plays an essential role in erythrocyte membrane elasticity, and its genetic inactivation induces splenomegaly and anemia. *Faseb J* 25, 337-347.
- Frederich, M., Zhang, L., and Balschi, J.A. (2005). Hypoxia and AMP independently regulate AMP-activated protein kinase activity in heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H2412-2421.
- Freeburg, P.B., and Abrahamson, D.R. (2004). Divergent expression patterns for hypoxia-inducible factor-1 β and aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter-2 in developing kidney. *J Am Soc Nephrol* 15, 2569-2578.
- Frezza, C., and Gottlieb, E. (2009). Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. *Semin Cancer Biol* 19, 4-11.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Vander Heiden, M.G., and Kroemer, G. (2013). Metabolic targets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 12, 829-846.
- Gao, G., Fernandez, C.S., Stapleton, D., Auster, A.S., Widmer, J., Dyck, J.R., Kemp, B.E., and Witters, L.A. (1996). Non-catalytic beta- and gamma-subunit isoforms of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271, 8675-8681.
- Gao, G., Widmer, J., Stapleton, D., Teh, T., Cox, T., Kemp, B.E., and Witters, L.A. (1995). Catalytic subunits of the porcine and rat 5'-AMP-activated protein kinase are members of the SNF1 protein kinase family. *Biochim Biophys Acta* 1266, 73-82.
- Gatenby, R.A., and Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4, 891-899.
- Gerald, D., Berra, E., Frapart, Y.M., Chan, D.A., Giaccia, A.J., Mansuy, D., Pouyssegur, J., Yaniv, M., and Mechta-Grigoriou, F. (2004). JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell* 118, 781-794.
- Giatromanolaki, A., Koukourakis, M.I., Sivridis, E., Turley, H., Talks, K., Pezzella, F., Gatter, K.C., and Harris, A.L. (2001). Relation of hypoxia inducible factor 1 α and 2 α in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br J Cancer* 85, 881-890.
- Gluck, S.L., Nelson, R.D., Lee, B.S., Wang, Z.Q., Guo, X.L., Fu, J.Y., and Zhang, K. (1992). Biochemistry of the renal V-ATPase. *J Exp Biol* 172, 219-229.
- Goodsell, D.S. (1996). *Our molecular nature* (New York, Springer-Verlag).
- Gordan, J.D., and Simon, M.C. (2007). Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 17, 71-77.
- Gray, L.R., Tompkins, S.C., and Taylor, E.B. (2013). Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci*.
- Guigas, B., Demaille, D., Chauvin, C., Batandier, C., De Oliveira, F., Fontaine, E., and Leverve, X. (2004). Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem J* 382, 877-884.
- Gut, P., and Verdin, E. (2013). The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. *Nature* 502, 489-498.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30, 214-226.
- Hadad, S.M., Baker, L., Quinlan, P.R., Robertson, K.E., Bray, S.E., Thomson, G., Kellock, D., Jordan, L.B., Purdie, C.A., Hardie, D.G., *et al.* (2009). Histological evaluation of AMPK signalling in primary breast cancer. *BMC Cancer* 9, 307.

Hagen, T., Taylor, C.T., Lam, F., and Moncada, S. (2003). Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1 α . *Science* 302, 1975-1978.

Halestrap, A.P., and Meredith, D. (2004). The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 447, 619-628.

Halestrap, A.P., and Price, N.T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343 Pt 2, 281-299.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hardie, D.G. (2000). Metabolic control: a new solution to an old problem. *Curr Biol* 10, R757-759.

Hardie, D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 774-785.

Hardie, D.G., Carling, D., and Carlson, M. (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 67, 821-855.

Hardie, D.G., Carling, D., and Gamblin, S.J. (2011). AMP-activated protein kinase: also regulated by ADP? *Trends Biochem Sci* 36, 470-477.

Hardie, D.G., and Alessi, D.R. (2013). LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after. *BMC Biol* 11, 36.

Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., and Hardie, D.G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271, 27879-27887.

Hawley, S.A., Pan, D.A., Mustard, K.J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A.M., Frenguelli, B.G., and Hardie, D.G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2, 9-19.

Hawley, S.A., Selbert, M.A., Goldstein, E.G., Edelman, A.M., Carling, D., and Hardie, D.G. (1995). 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *J Biol Chem* 270, 27186-27191.

He, X., Esteva, F.J., Ensor, J., Hortobagyi, G.N., Lee, M.H., and Yeung, S.C. (2011). Metformin and thiazolidinediones are associated with improved breast cancer-specific survival of diabetic women with HER2+ breast cancer. *Ann Oncol* 23, 1771-1780.

Hefti, M.H., Francoijs, K.J., de Vries, S.C., Dixon, R., and Vervoort, J. (2004). The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *Eur J Biochem* 271, 1198-1208.

Hellsten, Y., Richter, E.A., Kiens, B., and Bangsbo, J. (1999). AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after intense exercise. *J Physiol* 520 Pt 3, 909-920.

Herzig, S., Raemy, E., Montessuit, S., Veuthey, J.L., Zamboni, N., Westermann, B., Kunji, E.R., and Martinou, J.C. (2012). Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science* 337, 93-96.

Hockel, M., Schlenger, K., Aral, B., Mitze, M., Schaffer, U., and Vaupel, P. (1996). Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 56, 4509-4515.

- Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H.F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂- dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7987-7992.
- Hudson, E.R., Pan, D.A., James, J., Lucocq, J.M., Hawley, S.A., Green, K.A., Baba, O., Terashima, T., and Hardie, D.G. (2003). A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol* 13, 861-866.
- Hue, L., and Rousseau, G.G. (1993). Fructose 2,6-bisphosphate and the control of glycolysis by growth factors, tumor promoters and oncogenes. *Adv Enzyme Regul* 33, 97-110.
- Hulikova, A., Harris, A.L., Vaughan-Jones, R.D., and Swietach, P. (2012). Regulation of intracellular pH in cancer cell lines under normoxia and hypoxia. *J Cell Physiol* 228, 743-752.
- Hurley, R.L., Anderson, K.A., Franzone, J.M., Kemp, B.E., Means, A.R., and Witters, L.A. (2005). The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* 280, 29060-29066.
- Igata, M., Motoshima, H., Tsuruzoe, K., Kojima, K., Matsumura, T., Kondo, T., Taguchi, T., Nakamaru, K., Yano, M., Kukidome, D., *et al.* (2005). Adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses vascular smooth muscle cell proliferation through the inhibition of cell cycle progression. *Circ Res* 97, 837-844.
- Imamura, K., Ogura, T., Kishimoto, A., Kaminishi, M., and Esumi, H. (2001). Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole- 4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 562-567.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4, 648-657.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, 577-590.
- 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., *et al.* (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 12, 149-162.
- Jain, R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307, 58-62.
- Jeon, S.M., Chandel, N.S., and Hay, N. (2012). AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* 485, 661-665.
- Jokilehto, T., and Jaakkola, P.M. (2010). The role of HIF prolyl hydroxylases in tumour growth. *J Cell Mol Med* 14, 758-770.
- Jonckheere, A.I., Smeitink, J.A., and Rodenburg, R.J. (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* 35, 211-225.
- Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and Thompson, C.B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 18, 283-293.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1, 15-25.
- Kalender, A., Selvaraj, A., Kim, S.Y., Gulati, P., Brule, S., Viollet, B., Kemp, B.E., Bardeesy, N., Dennis, P., Schlager, J.J., *et al.* (2010). Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab* 11, 390-401.
- Karp, G. (2010). *Biologie cellulaire et moléculaire: Concepts and experiments.*

- Kato, K., Ogura, T., Kishimoto, A., Minegishi, Y., Nakajima, N., Miyazaki, M., and Esumi, H. (2002). Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cancer cells to nutrient deprivation and tumor formation. *Oncogene* 21, 6082-6090.
- Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T., and Uyeda, K. (2002). Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277, 3829-3835.
- Keith, B., Adelman, D.M., and Simon, M.C. (2001). Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6692-6697.
- Kemp, B.E., Oakhill, J.S., and Scott, J.W. (2007). AMPK structure and regulation from three angles. *Structure* 15, 1161-1163.
- Kewley, R.J., Whitelaw, M.L., and Chapman-Smith, A. (2004). The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 189-204.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13, 132-141.
- Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3, 177-185.
- Kirk, P., Wilson, M.C., Heddle, C., Brown, M.H., Barclay, A.N., and Halestrap, A.P. (2000). CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* 19, 3896-3904.
- Kisfalvi, K., Eibl, G., Sinnott-Smith, J., and Rozengurt, E. (2009). Metformin disrupts crosstalk between G protein-coupled receptor and insulin receptor signaling systems and inhibits pancreatic cancer growth. *Cancer Res* 69, 6539-6545.
- Klimova, T., and Chandel, N.S. (2008). Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ* 15, 660-666.
- Koay, A., Woodcroft, B., Petrie, E.J., Yue, H., Emanuelle, S., Bieri, M., Bailey, M.F., Hargreaves, M., Park, J.T., Park, K.H., *et al.* AMPK beta subunits display isoform specific affinities for carbohydrates. *FEBS Lett* 584, 3499-3503.
- Koivunen, P., Hirsila, M., Gunzler, V., Kivirikko, K.I., and Myllyharju, J. (2003). Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem* 279, 9899-9904.
- Koo, S.H., Flechner, L., Qi, L., Zhang, X., Srean, R.A., Jeffries, S., Hedrick, S., Xu, W., Boussouar, F., Brindle, P., *et al.* (2005). The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 437, 1109-1111.
- Kornberg, A. (1989). *For the love of enzymes*, Harvard University Press edn (Cambridge, MA).
- Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Simopoulos, C., Turley, H., Talks, K., Gatter, K.C., and Harris, A.L. (2002). Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53, 1192-1202.
- Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13, 472-482.
- Kumar, V.B., Viji, R.I., Kiran, M.S., and Sudhakaran, P.R. (2007). Endothelial cell response to lactate: implication of PAR modification of VEGF. *J Cell Physiol* 211, 477-485.

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.

Kurth-Kraczek, E.J., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., and Winder, W.W. (1999). 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes* 48, 1667-1671.

L'Allemain, G., Paris, S., and Pouyssegur, J. (1984). Growth factor action and intracellular pH regulation in fibroblasts. Evidence for a major role of the Na⁺/H⁺ antiport. *J Biol Chem* 259, 5809-5815.

Laderoute, K.R., Amin, K., Calaoagan, J.M., Knapp, M., Le, T., Orduna, J., Foretz, M., and Viollet, B. (2006). 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol Cell Biol* 26, 5336-5347.

Landman, G.W., Kleefstra, N., van Hateren, K.J., Groenier, K.H., Gans, R.O., and Bilo, H.J. (2010). Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16. *Diabetes Care* 33, 322-326.

Le Floch, R., Chiche, J., Marchiq, I., Naiken, T., Ilc, K., Murray, C.M., Critchlow, S.E., Roux, D., Simon, M.P., and Pouyssegur, J. (2011). CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16663-16668.

Leach, R.M., and Treacher, D.F. (1998). Oxygen transport-2. Tissue hypoxia. *BMJ* 317, 1370-1373.

Levine, A.J., and Puzio-Kuter, A.M. (2010). The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 330, 1340-1344.

Li, H., Ko, H.P., and Whitlock, J.P. (1996). Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia. Roles of Arnt and HIF1alpha. *J Biol Chem* 271, 21262-21267.

Li, X.F., Carlin, S., Urano, M., Russell, J., Ling, C.C., and O'Donoghue, J.A. (2007). Visualization of hypoxia in microscopic tumors by immunofluorescent microscopy. *Cancer Res* 67, 7646-7653.

Liao, D., Corle, C., Seagroves, T.N., and Johnson, R.S. (2007). Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res* 67, 563-572.

Libby, G., Donnelly, L.A., Donnan, P.T., Alessi, D.R., Morris, A.D., and Evans, J.M. (2009). New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32, 1620-1625.

Lim, J.H., Lee, Y.M., Chun, Y.S., Chen, J., Kim, J.E., and Park, J.W. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell* 38, 864-878.

Lin, J., Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 1, 361-370.

Liu, B., Fan, Z., Edgerton, S.M., Yang, X., Lind, S.E., and Thor, A.D. (2011). Potent anti-proliferative effects of metformin on trastuzumab-resistant breast cancer cells via inhibition of erbB2/IGF-1 receptor interactions. *Cell Cycle* 10, 2959-2966.

Liu, C.J., Tsai, M.M., Hung, P.S., Kao, S.Y., Liu, T.Y., Wu, K.J., Chiou, S.H., Lin, S.C., and Chang, K.W. (2010a). miR-31 ablates expression of the HIF regulatory factor FIH to activate the HIF pathway in head and neck carcinoma. *Cancer Res* 70, 1635-1644.

Liu, L., Ulbrich, J., Muller, J., Wustefeld, T., Aeberhard, L., Kress, T.R., Muthalagu, N., Rycak, L., Rudalska, R., Moll, R., *et al.* (2012). Deregulated MYC expression induces dependence upon AMPK-related kinase 5. *Nature* 483, 608-612.

Liu, X., Chhipa, R.R., Pooya, S., Wortman, M., Yachyshin, S., Chow, L.M., Kumar, A., Zhou, X., Sun, Y., Quinn, B., *et al.* (2014). Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, E435-444.

Liu, Y., Zuckier, L.S., and Ghesani, N.V. (2010b). Dominant uptake of fatty acid over glucose by prostate cells: a potential new diagnostic and therapeutic approach. *Anticancer Res* *30*, 369-374.

Lizcano, J.M., Goransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Makela, T.P., Hardie, D.G., *et al.* (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J* *23*, 833-843.

Loo, S.Y., Chang, M.K., Chua, C.S., Kumar, A.P., Pervaiz, S., and Clement, M.V. (2012). NHE-1: a promising target for novel anti-cancer therapeutics. *Curr Pharm Des* *18*, 1372-1382.

Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O'Meally, R., Cole, R.N., Pandey, A., and Semenza, G.L. (2011). Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* *145*, 732-744.

Luo, W., and Semenza, G.L. (2012). Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. *Trends Endocrinol Metab* *23*, 560-566.

Ma, X.M., and Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 307-318.

Maddocks, O.D., Berkers, C.R., Mason, S.M., Zheng, L., Blyth, K., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2013). Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature* *493*, 542-546.

Mahlapuu, M., Johansson, C., Lindgren, K., Hjalms, G., Barnes, B.R., Krook, A., Zierath, J.R., Andersson, L., and Marklund, S. (2004). Expression profiling of the gamma-subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for gamma3 in white skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *286*, E194-200.

Majmundar, A.J., Wong, W.J., and Simon, M.C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* *40*, 294-309.

Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., and Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* *414*, 550-554.

Manalo, D.J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B.D., Ye, S.Q., Garcia, J.G., and Semenza, G.L. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* *105*, 659-669.

Manning, B.D., Tee, A.R., Logsdon, M.N., Blenis, J., and Cantley, L.C. (2002a). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* *10*, 151-162.

Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002b). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci* *27*, 514-520.

Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002c). The protein kinase complement of the human genome. *Science* *298*, 1912-1934.

Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., and Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol* *10*, 1247-1255.

Marsin, A.S., Bouzin, C., Bertrand, L., and Hue, L. (2002). The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem* *277*, 30778-30783.

- Mathupala, S.P., Colen, C.B., Parajuli, P., and Sloan, A.E. (2007). Lactate and malignant tumors: a therapeutic target at the end stage of glycolysis. *J Bioenerg Biomembr* 39, 73-77.
- Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., Asano, T., Levine, B., and Sadoshima, J. (2007). Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res* 100, 914-922.
- Matsumoto, S., Yasui, H., Mitchell, J.B., and Krishna, M.C. (2010). Imaging cycling tumor hypoxia. *Cancer Res* 70, 10019-10023.
- 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.
- Maynard, M.A., Qi, H., Chung, J., Lee, E.H., Kondo, Y., Hara, S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Ohh, M. (2003). Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem* 278, 11032-11040.
- Mazure, N.M., Brahimi-Horn, M.C., Berta, M.A., Benizri, E., Bilton, R.L., Dayan, F., Ginouves, A., Berra, E., and Pouyssegur, J. (2004). HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochem Pharmacol* 68, 971-980.
- Mazurek, S., Grimm, H., Oehmke, M., Weisse, G., Teigelkamp, S., and Eigenbrodt, E. (2000). Tumor M2-PK and glutaminolytic enzymes in the metabolic shift of tumor cells. *Anticancer Res* 20, 5151-5154.
- McBride, A., Ghilagaber, S., Nikolaev, A., and Hardie, D.G. (2009). The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab* 9, 23-34.
- McMurry, J., and Castellion, M. (1996). *Fundamentals of general, organic and biological chemistry*, Prentice Hall edn (Upper Saddle River, NJ).
- Minchenko, O.H., Ochiai, A., Opentanova, I.L., Ogura, T., Minchenko, D.O., Caro, J., Komisarenko, S.V., and Esumi, H. (2005a). Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. *Biochimie* 87, 1005-1010.
- Minchenko, O.H., Ogura, T., Opentanova, I.L., Minchenko, D.O., Ochiai, A., Caro, J., Komisarenko, S.V., and Esumi, H. (2005b). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family overexpression in human lung tumor. *Ukr Biokhim Zh* 77, 46-50.
- Minchinton, A.I., and Tannock, I.F. (2006). Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* 6, 583-592.
- Mole, D.R., Blancher, C., Copley, R.R., Pollard, P.J., Gleadle, J.M., Ragoussis, J., and Ratcliffe, P.J. (2009). Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* 284, 16767-16775.
- Momcilovic, M., Hong, S.P., and Carlson, M. (2006). Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem* 281, 25336-25343.
- Moon, R.T. (2005). Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE* 2005, cm1.
- Munday, M.R., Campbell, D.G., Carling, D., and Hardie, D.G. (1988). Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *Eur J Biochem* 175, 331-338.
- Nakada, D., Saunders, T.L., and Morrison, S.J. (2010). Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature* 468, 653-658.

Neri, D., and Supuran, C.T. (2011). Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat Rev Drug Discov* 10, 767-777.

Network Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 489, 519-525.

Network Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 499, 43-49.

Network (2012a). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330-337.

Network (2012b). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61-70.

Ng, T.L., Leprivier, G., Robertson, M.D., Chow, C., Martin, M.J., Laderoute, K.R., Davicioni, E., Triche, T.J., and Sorensen, P.H. (2012). The AMPK stress response pathway mediates anoikis resistance through inhibition of mTOR and suppression of protein synthesis. *Cell Death Differ* 19, 501-510.

O'Neill, H.M., Maarbjerg, S.J., Crane, J.D., Jeppesen, J., Jorgensen, S.B., Schertzer, J.D., Shyroka, O., Kiens, B., van Denderen, B.J., Tarnopolsky, M.A., *et al.* (2011). AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16092-16097.

Okar, D.A., and Lange, A.J. (1999). Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *Biofactors* 10, 1-14.

Owonikoko, T.K., and Khuri, F.R. (2013). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway: biomarkers of success and tribulation. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*.

Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L., and Denko, N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 3, 187-197.

Paris, S., and Pouyssegur, J. (1984). Growth factors activate the Na⁺/H⁺ antiporter in quiescent fibroblasts by increasing its affinity for intracellular H⁺. *J Biol Chem* 259, 10989-10994.

Parks, S.K., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2011). pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J Cell Physiol* 226, 299-308.

Parks, S.K., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2013a). Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 13, 611-623.

Parks, S.K., Mazure, N.M., Counillon, L., and Pouyssegur, J. (2013b). Hypoxia promotes tumor cell survival in acidic conditions by preserving ATP levels. *J Cell Physiol* 228, 1854-1862.

Pecqueur, C., Oliver, L., Oizel, K., Lalier, L., and Vallette, F.M. (2013). Targeting metabolism to induce cell death in cancer cells and cancer stem cells. *Int J Cell Biol* 2013, 805975.

Pellerin, L., Pellegrini, G., Bittar, P.G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J.L., Stella, N., and Magistretti, P.J. (1998). Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci* 20, 291-299.

Pelletier, J., Bellot, G., Gounon, P., Lacas-Gervais, S., Pouyssegur, J., and Mazure, N.M. (2012). Glycogen Synthesis is Induced in Hypoxia by the Hypoxia-Inducible Factor and Promotes Cancer Cell Survival. *Frontiers in oncology* 2, 18.

Pescador, N., Villar, D., Cifuentes, D., Garcia-Rocha, M., Ortiz-Barahona, A., Vazquez, S., Ordonez, A., Cuevas, Y., Saez-Morales, D., Garcia-Bermejo, M.L., *et al.* (2010). Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. *PLoS One* 5, e9644.

- Pinheiro, C., Longatto-Filho, A., Azevedo-Silva, J., Casal, M., Schmitt, F.C., and Baltazar, F. (2012). Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J Bioenerg Biomembr* 44, 127-139.
- Polekhina, G., Gupta, A., Michell, B.J., van Denderen, B., Murthy, S., Feil, S.C., Jennings, I.G., Campbell, D.J., Witters, L.A., Parker, M.W., *et al.* (2003). AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr Biol* 13, 867-871.
- Polekhina, G., Gupta, A., van Denderen, B.J., Feil, S.C., Kemp, B.E., Stapleton, D., and Parker, M.W. (2005). Structural basis for glycogen recognition by AMP-activated protein kinase. *Structure* 13, 1453-1462.
- Pollard, P.J., Briere, J.J., Alam, N.A., Barwell, J., Barclay, E., Wortham, N.C., Hunt, T., Mitchell, M., Olpin, S., Moat, S.J., *et al.* (2005). Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet* 14, 2231-2239.
- Poole, R.C., and Halestrap, A.P. (1993). Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* 264, C761-782.
- Poole, R.C., Sansom, C.E., and Halestrap, A.P. (1996). Studies of the membrane topology of the rat erythrocyte H⁺/lactate cotransporter (MCT1). *Biochem J* 320 (Pt 3), 817-824.
- Pouyssegur, J., Dayan, F., and Mazure, N.M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437-443.
- Pouyssegur, J., Franchi, A., and Pages, G. (2001). pHi, aerobic glycolysis and vascular endothelial growth factor in tumour growth. *Novartis Found Symp* 240, 186-196.
- Pouyssegur, J., Sardet, C., Franchi, A., L'Allemain, G., and Paris, S. (1984). A specific mutation abolishing Na⁺/H⁺ antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4833-4837.
- Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9, 677-684.
- Puissegur, M.P., Mazure, N.M., Bertero, T., Pradelli, L., Grosso, S., Robbe-Sermesant, K., Maurin, T., Lebrigand, K., Cardinaud, B., Hofman, V., *et al.* (2011). miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death Differ* 18, 465-478.
- Quennet, V., Yaromina, A., Zips, D., Rosner, A., Walenta, S., Baumann, M., and Mueller-Klieser, W. (2006). Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. *Radiother Oncol* 81, 130-135.
- Reshkin, S.J., Bellizzi, A., Caldeira, S., Albarani, V., Malanchi, I., Poignee, M., Alunni-Fabbroni, M., Casavola, V., and Tommasino, M. (2000). Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *Faseb J* 14, 2185-2197.
- Rios, E.J., Fallon, M., Wang, J., and Shimoda, L.A. (2005). Chronic hypoxia elevates intracellular pH and activates Na⁺/H⁺ exchange in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289, L867-874.
- Ristow, M., and Zarse, K. (2010). How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp Gerontol* 45, 410-418.
- Rocha, G.Z., Dias, M.M., Ropelle, E.R., Osorio-Costa, F., Rossato, F.A., Vercesi, A.E., Saad, M.J., and Carnevali, J.B. (2011). Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth. *Clin Cancer Res* 17, 3993-4005.

- Rohas, L.M., St-Pierre, J., Uldry, M., Jager, S., Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2007). A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7933-7938.
- Roos, A., and Boron, W.F. (1981). Intracellular pH. *Physiol Rev* 61, 296-434.
- Rouschop, K.M., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., *et al.* (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* 120, 127-141.
- Ruderman, N., and Prentki, M. (2004). AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov* 3, 340-351.
- Ryan, H.E., Lo, J., and Johnson, R.S. (1998). HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* 17, 3005-3015.
- Sakamoto, K., Goransson, O., Hardie, D.G., and Alessi, D.R. (2004). Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E310-317.
- Salceda, S., and Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272, 22642-22647.
- Salt, I., Celler, J.W., Hawley, S.A., Prescott, A., Woods, A., Carling, D., and Hardie, D.G. (1998). AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the α 2 isoform. *Biochem J* 334 (Pt 1), 177-187.
- Sanchez-Cespedes, M., Parrella, P., Esteller, M., Nomoto, S., Trink, B., Engles, J.M., Westra, W.H., Herman, J.G., and Sidransky, D. (2002). Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res* 62, 3659-3662.
- Sanders, M.J., Grondin, P.O., Hegarty, B.D., Snowden, M.A., and Carling, D. (2007). Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* 403, 139-148.
- Sardet, C., Franchi, A., and Pouyssegur, J. (1989). Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter. *Cell* 56, 271-280.
- Scarpulla, R.C. (2008). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* 88, 611-638.
- 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 1 α 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. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 343-354.
- Schwickert, G., Walenta, S., Sundfor, K., Rofstad, E.K., and Mueller-Klieser, W. (1995). Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis. *Cancer Res* 55, 4757-4759.
- Scott, J.W., Hawley, S.A., Green, K.A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G.A., Norman, D.G., and Hardie, D.G. (2004). CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* 113, 274-284.
- Semenza, G.L. (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 88, 1474-1480.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.

- Semenza, G.L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 20, 51-56.
- Semenza, G.L., Neufeldt, M.K., Chi, S.M., and Antonarakis, S.E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5680-5684.
- Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M., and Wang, G.L. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269, 23757-23763.
- Shackelford, D.B., Abt, E., Gerken, L., Vasquez, D.S., Seki, A., Leblanc, M., Wei, L., Fishbein, M.C., Czernin, J., Mischel, P.S., *et al.* (2013). LKB1 inactivation dictates therapeutic response of non-small cell lung cancer to the metabolism drug phenformin. *Cancer Cell* 23, 143-158.
- Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3329-3335.
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B.C., Wu, C.S., Dang, G., Jungmann, R.A., Dalla-Favera, R., and Dang, C.V. (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6658-6663.
- Shimoda, L.A., Fallon, M., Pisarcik, S., Wang, J., and Semenza, G.L. (2006). HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalinization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291, L941-949.
- Simon, M. (2009). <http://www.cours-pharmacie.com/biochimie/chaine-respiratoire-et-phosphorylation-oxydative.html>.
- Sivridis, E., Giatromanolaki, A., Gatter, K.C., Harris, A.L., and Koukourakis, M.I. (2002). Association of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma. *Cancer* 95, 1055-1063.
- Sonveaux, P., Vegran, F., Schroeder, T., Wergin, M.C., Verrax, J., Rabbani, Z.N., De Saedeleer, C.J., Kennedy, K.M., Diepart, C., Jordan, B.F., *et al.* (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 118, 3930-3942.
- Spriet, L.L. (1991). Phosphofructokinase activity and acidosis during short-term tetanic contractions. *Can J Physiol Pharmacol* 69, 298-304.
- Srinivas, V., Leshchinsky, I., Sang, N., King, M.P., Minchenko, A., and Caro, J. (2001). Oxygen sensing and HIF-1 activation does not require an active mitochondrial respiratory chain electron-transfer pathway. *J Biol Chem* 276, 21995-21998.
- Stahmann, N., Woods, A., Carling, D., and Heller, R. (2006). Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *Mol Cell Biol* 26, 5933-5945.
- Stapleton, D., Gao, G., Michell, B.J., Widmer, J., Mitchelhill, K., Teh, T., House, C.M., Witters, L.A., and Kemp, B.E. (1994). Mammalian 5'-AMP-activated protein kinase non-catalytic subunits are homologs of proteins that interact with yeast Snf1 protein kinase. *J Biol Chem* 269, 29343-29346.
- Stern, R., Shuster, S., Neudecker, B.A., and Formby, B. (2002). Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res* 276, 24-31.
- Sudarshan, S., Sourbier, C., Kong, H.S., Block, K., Valera Romero, V.A., Yang, Y., Galindo, C., Mollapour, M., Scroggins, B., Goode, N., *et al.* (2009). Fumarate hydratase deficiency in renal cancer induces glycolytic addiction and hypoxia-inducible transcription factor 1 α stabilization by glucose-dependent generation of reactive oxygen species. *Mol Cell Biol* 29, 4080-4090.

- Sun, Y., Connors, K.E., and Yang, D.Q. (2007). AICAR induces phosphorylation of AMPK in an ATM-dependent, LKB1-independent manner. *Mol Cell Biochem* 306, 239-245.
- Supuran, C.T. (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov* 7, 168-181.
- Svastova, E., Hulikova, A., Rafajova, M., Zat'ovicova, M., Gibadulinova, A., Casini, A., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Pastorek, J., *et al.* (2004). Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett* 577, 439-445.
- Swanson, K.M., and Hohl, R.J. (2006). Anti-cancer therapy: targeting the mevalonate pathway. *Curr Cancer Drug Targets* 6, 15-37.
- Swietach, P., Hulikova, A., Vaughan-Jones, R.D., and Harris, A.L. (2010). New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation. *Oncogene* 29, 6509-6521.
- Swietach, P., Patiar, S., Supuran, C.T., Harris, A.L., and Vaughan-Jones, R.D. (2009). The role of carbonic anhydrase 9 in regulating extracellular and intracellular pH in three-dimensional tumor cell growths. *J Biol Chem* 284, 20299-20310.
- Tannock, I.F. (1968). The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Br J Cancer* 22, 258-273.
- Tazuke, S.I., Mazure, N.M., Sugawara, J., Carland, G., Faessen, G.H., Suen, L.F., Irwin, J.C., Powell, D.R., Giaccia, A.J., and Giudice, L.C. (1998). Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP- 1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10188-10193.
- Telang, S., Yalcin, A., Clem, A.L., Bucala, R., Lane, A.N., Eaton, J.W., and Chesney, J. (2006). Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene* 25, 7225-7234.
- Tennant, D.A., Duran, R.V., and Gottlieb, E. (2010). Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 10, 267-277.
- Tennant, D.A., Frezza, C., MacKenzie, E.D., Nguyen, Q.D., Zheng, L., Selak, M.A., Roberts, D.L., Dive, C., Watson, D.G., Aboagye, E.O., *et al.* (2009). Reactivating HIF prolyl hydroxylases under hypoxia results in metabolic catastrophe and cell death. *Oncogene* 28, 4009-4021.
- Thomlinson, R.H., and Gray, L.H. (1955). The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 9, 539-549.
- Tong, L. (2005). Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell Mol Life Sci* 62, 1784-1803.
- Tredan, O., Galmarini, C.M., Patel, K., and Tannock, I.F. (2007). Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 99, 1441-1454.
- Tudzarova, S., Colombo, S.L., Stoeber, K., Carcamo, S., Williams, G.H., and Moncada, S. (2011). Two ubiquitin ligases, APC/C-Cdh1 and SKP1-CUL1-F (SCF)-beta-TrCP, sequentially regulate glycolysis during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 5278-5283.
- Ubersax, J.A., and Ferrell, J.E., Jr. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 530-541.
- Ullah, M.S., Davies, A.J., and Halestrap, A.P. (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem* 281, 9030-9037.
- Um, S.H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P.R., Kozma, S.C., Auwerx, J., *et al.* (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431, 200-205.

- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.
- Vaupel, P. (2004). Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol* 14, 198-206.
- Vaupel, P., Briest, S., and Hockel, M. (2002). Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications. *Wien Med Wochenschr* 152, 334-342.
- Vaupel, P., Mayer, A., and Hockel, M. (2004). Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol* 381, 335-354.
- Vaupel, P., Schlenger, K., Knoop, C., and Hockel, M. (1991). Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res* 51, 3316-3322.
- Vaupel, P., Thews, O., and Hoekel, M. (2001). Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 18, 243-259.
- Vaux, E.C., Metzzen, E., Yeates, K.M., and Ratcliffe, P.J. (2001). Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain. *Blood* 98, 296-302.
- Veech, R.L., Lawson, J.W., Cornell, N.W., and Krebs, H.A. (1979). Cytosolic phosphorylation potential. *J Biol Chem* 254, 6538-6547.
- Vegran, F., Boidot, R., Michiels, C., Sonveaux, P., and Feron, O. (2011). Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Res* 71, 2550-2560.
- Viana, R., Towler, M.C., Pan, D.A., Carling, D., Viollet, B., Hardie, D.G., and Sanz, P. (2007). A conserved sequence immediately N-terminal to the Bateman domains in AMP-activated protein kinase gamma subunits is required for the interaction with the beta subunits. *J Biol Chem* 282, 16117-16125.
- Voet, D., and Voet, J.G. (1995). *Biochemistry* (John Wiley and Sons).
- Volm, M., and Koomagi, R. (2000). Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res* 20, 1527-1533.
- Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413-431.
- Wakil, S.J., Stoops, J.K., and Joshi, V.C. (1983). Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem* 52, 537-579.
- Walenta, S., Salameh, A., Lyng, H., Evensen, J.F., Mitze, M., Rofstad, E.K., and Mueller-Klieser, W. (1997). Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am J Pathol* 150, 409-415.
- Walenta, S., Schroeder, T., and Mueller-Klieser, W. (2002). Metabolic mapping with bioluminescence: basic and clinical relevance. *Biomol Eng* 18, 249-262.
- Wang, G.L., and Semenza, G.L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270, 1230-1237.
- Warburg, O. (1956a). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269-270.
- Warburg, O. (1956b). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.
- Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* 8, 519-530.

- Watts, J.L., Morton, D.G., Bestman, J., and Kempthues, K.J. (2000). The *C. elegans* par-4 gene encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development* 127, 1467-1475.
- Whillans, D.W., and Hunt, J.W. (1982). A rapid-mixing comparison of the mechanisms of radiosensitization by oxygen and misonidazole in CHO cells. *Radiat Res* 90, 126-141.
- Wiesener, M.S., Turley, H., Allen, W.E., Willam, C., Eckardt, K.U., Talks, K.L., Wood, S.M., Gatter, K.C., Harris, A.L., Pugh, C.W., *et al.* (1998). Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* 92, 2260-2268.
- Wilson, M.C., Jackson, V.N., Heddle, C., Price, N.T., Pilegaard, H., Juel, C., Bonen, A., Montgomery, I., Hutter, O.F., and Halestrap, A.P. (1998). Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter isoform MCT3. *J Biol Chem* 273, 15920-15926.
- Wilson, W.R., and Hay, M.P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 11, 393-410.
- Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., *et al.* (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18782-18787.
- Wohlhueter, R.M., and Plagemann, P.G. (1981). Hexose transport and phosphorylation by Novikoff rat hepatoma cells as function of extracellular pH. *J Biol Chem* 256, 869-875.
- Wojtaszewski, J.F., MacDonald, C., Nielsen, J.N., Hellsten, Y., Hardie, D.G., Kemp, B.E., Kiens, B., and Richter, E.A. (2003). Regulation of 5'AMP-activated protein kinase activity and substrate utilization in exercising human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E813-822.
- Woods, A., Azzout-Marniche, D., Foretz, M., Stein, S.C., Lemarchand, P., Ferre, P., Foufelle, F., and Carling, D. (2000). Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol* 20, 6704-6711.
- Woods, A., Cheung, P.C., Smith, F.C., Davison, M.D., Scott, J., Beri, R.K., and Carling, D. (1996). Characterization of AMP-activated protein kinase beta and gamma subunits. Assembly of the heterotrimeric complex in vitro. *J Biol Chem* 271, 10282-10290.
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.P., Momcilovic, M., Johnstone, S.R., Carlson, M., and Carling, D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2, 21-33.
- Wu, S.B., Wu, Y.T., Wu, T.P., and Wei, Y.H. (2013). Role of AMPK-mediated adaptive responses in human cells with mitochondrial dysfunction to oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1840, 1331-1344.
- 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., *et al.* (2000). Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 60, 7075-7083.
- Xiao, B., Heath, R., Saiu, P., Leiper, F.C., Leone, P., Jing, C., Walker, P.A., Haire, L., Eccleston, J.F., Davis, C.T., *et al.* (2007). Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* 449, 496-500.
- Xiao, B., Sanders, M.J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F.V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Haire, L.F., *et al.* (2011). Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 472, 230-233.

- Yasui, H., Matsumoto, S., Devasahayam, N., Munasinghe, J.P., Choudhuri, R., Saito, K., Subramanian, S., Mitchell, J.B., and Krishna, M.C. (2010). Low-field magnetic resonance imaging to visualize chronic and cycling hypoxia in tumor-bearing mice. *Cancer Res* 70, 6427-6436.
- Young, E.T., Dombek, K.M., Tachibana, C., and Ideker, T. (2003). Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *J Biol Chem* 278, 26146-26158.
- Zhang, N., Fu, Z., Linke, S., Chicher, J., Gorman, J.J., Visk, D., Haddad, G.G., Poellinger, L., Peet, D.J., Powell, F., *et al.* (2010). The asparaginyl hydroxylase factor inhibiting HIF-1alpha is an essential regulator of metabolism. *Cell Metab* 11, 364-378.
- Zhao, F., Mancuso, A., Bui, T.V., Tong, X., Gruber, J.J., Swider, C.R., Sanchez, P.V., Lum, J.J., Sayed, N., Melo, J.V., *et al.* (2010). Imatinib resistance associated with BCR-ABL upregulation is dependent on HIF-1alpha-induced metabolic reprogramming. *Oncogene* 29, 2962-2972.
- Zhong, H., Agani, F., Baccala, A.A., Laughner, E., Rioseco-Camacho, N., Isaacs, W.B., Simons, J.W., and Semenza, G.L. (1998). Increased expression of hypoxia inducible factor-1alpha in rat and human prostate cancer. *Cancer Res* 58, 5280-5284.
- Zhou, J., Huang, W., Tao, R., Ibaragi, S., Lan, F., Ido, Y., Wu, X., Alekseyev, Y.O., Lenburg, M.E., Hu, G.F., *et al.* (2009). Inactivation of AMPK alters gene expression and promotes growth of prostate cancer cells. *Oncogene* 28, 1993-2002.

ANNEXES

Cette section présente une publication et un manuscrit :

A. PUBLICATION 3 – Biochemical Titration of glycogen

B. MANUSCRIT 2 - Hypoxic Hyperfused Mitochondria Interact with Endolysosomes to cleave Mitochondrial VDAC1 in a TP53-BNIP3-Dependent Manner in Promoting Survival

A. Biochemical Titration of Glycogen *In vitro*

Pelletier J, Bellot G, Pouysségur J, and Mazure NM

(Article publié dans le journal Journal Of Visualized Experiments en Novembre 2013)

SUMMARY

Glycogen is the main energetic polymer of glucose in vertebrate animals and plays a crucial role in whole body metabolism as well as in cellular metabolism. Many methods to detect glycogen already exist but only a few are quantitative. We describe here a method using the Abcam Glycogen assay kit, which is based on specific degradation of glycogen to glucose by glucoamylase. Glucose is then specifically oxidized to a product that reacts with the OxiRed probe to produce fluorescence. Titration is accurate, sensitive and can be achieved on cell extracts or tissue sections. However, in contrast to other techniques, it does not give information about the distribution of glycogen in the cell. As an example of this technique, we describe here the titration of glycogen in two cell lines, Chinese hamster lung fibroblast CCL39 and human colon carcinoma LS174, incubated in normoxia (21% O₂) versus hypoxia (1% O₂). We hypothesized that hypoxia is a signal that prepares cells to synthesize and store glycogen in order to survive.

Video Article

Biochemical Titration of Glycogen *In vitro*

Joffrey Pelletier¹, Grégory Bellot¹, Jacques Pouysségur¹, Nathalie M. Mazure¹

¹Institute for Research on Cancer and Ageing of Nice, UMR CNRS 7284 - INSERM, U1081 - UNS, Centre Antoine Lacassagne, University of Nice - Sophia Antipolis

Correspondence to: Joffrey Pelletier at Joffrey.Pelletier@unice.fr

URL: <http://www.jove.com/video/50465>

DOI: [doi:10.3791/50465](https://doi.org/10.3791/50465)

Keywords: Basic Protocol, Issue 81, Glycogen, Glucoamylase, Fluorescence, Oxidation, Periodic Acid Schiff staining (PAS)

Date Published: 11/24/2013

Citation: Pelletier, J., Bellot, G., Pouysségur, J., Mazure, N.M. Biochemical Titration of Glycogen *In vitro*. *J. Vis. Exp.* (81), e50465, doi:10.3791/50465 (2013).

Abstract

Glycogen is the main energetic polymer of glucose in vertebrate animals and plays a crucial role in whole body metabolism as well as in cellular metabolism. Many methods to detect glycogen already exist but only a few are quantitative. We describe here a method using the Abcam Glycogen assay kit, which is based on specific degradation of glycogen to glucose by glucoamylase. Glucose is then specifically oxidized to a product that reacts with the OxiRed probe to produce fluorescence. Titration is accurate, sensitive and can be achieved on cell extracts or tissue sections. However, in contrast to other techniques, it does not give information about the distribution of glycogen in the cell. As an example of this technique, we describe here the titration of glycogen in two cell lines, Chinese hamster lung fibroblast CCL39 and human colon carcinoma LS174, incubated in normoxia (21% O₂) versus hypoxia (1% O₂). We hypothesized that hypoxia is a signal that prepares cells to synthesize and store glycogen in order to survive¹.

Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/50465/>

Introduction

Glycogen is a multibranched polymer of glucose residues, which is present in the cytoplasm of many cell types. It is one of the main forms of energy storage in cells and plays an important role in glucose metabolism. Most mammalian cells are able to produce and store glycogen, which can be rapidly degraded into glucose to promote glycolysis and ATP production during metabolic stress. Hepatocytes produce massive amounts of glycogen to regulate the blood sugar level thereby providing a continuous supply of glucose to the body. In contrast, the concentration of glycogen in other cells (muscles, red blood cells, etc.) is relatively low. However, locally, these quantities are sufficient to provide energy in the short-term when the cells are suddenly exposed to an environment deprived of nutrients.

Glycogen synthesis and glycogen breakdown follows the same steps in all tissues (**Figure 1**). Firstly, glucose enters cells by glucose transporters (GLUTs), and is rapidly converted from glucose-6-phosphate (G6P) into glucose-1-phosphate (G1P) by phosphoglucomutase. G1P is then modified into UDP-glucose, and the carbon C1 of UDP-glucose is attached to a tyrosine residue of glycogenin, the anchoring protein of glycogen. This molecule, considered a glycogen primer, is extended by attachment of the UDP-glucose to the terminal glucose by an $\alpha(1\rightarrow4)$ bond *via* the glycogen synthase. Finally, when a linear chain of over 11 glucose residues is formed, the branching enzyme transfers a terminal oligosaccharide constituted by a minimum of 6 glucose residues to another glucose of the chain nearby through an $\alpha(1\rightarrow6)$ linkage. The repetition of this process gives a massive fractal structure containing branches that form a helix with 6.5 glucose per turn. Glycogen can be reversely hydrolyzed to glucose by the concerted action of debranching enzymes that hydrolyze the $\alpha(1\rightarrow6)$ bond and glycogen phosphorylase that hydrolyzes the $\alpha(1\rightarrow4)$ glycosidic bond between the last residue of glucose of a branch and the glycogen molecule. This reaction called glycogenolysis is activated by increasing levels of AMP (reflecting ATP consumption), and inhibited by glucose and ATP^{2,3}.

By electron microscopy, glycogen molecules have been described in many cell types as β free particles (or glycogen monoparticles) of 15-30 nm in diameter. In specific cell types such as hepatocytes, β particles can be assembled into a complex to form rosettes, also known as α particles that vary in diameter from 80 nm to a maximum of 200 nm⁴. The way these β particles are bonded to form larger clusters of α particles is still not fully elucidated. Some evidence tends to prove that β particles can be bonded by covalent bonding⁵, hydrogen bonding, or even through protein-protein interactions⁶. The amount of glycogen stored in the cells depends on many parameters: (I) the amount of glycogenin in the cell that initiates glycogen synthesis; (II) the activity of glycogen synthase and phosphorylase regulated by protein phosphorylation/dephosphorylation; (III) the concentration of glucose in the cells, which is dependent on several parameters such as the supply of glucose from the vascular system and glucose uptake by cells. Glycogen stores are tightly regulated by allosteric regulation of biosynthetic hormones through intermediate metabolites, by hormones regulating energy metabolism, and by nutrient sensing signaling pathways⁷.

It is important to be able to quantify glycogen in biological samples to better understand the importance of glycogen metabolism at the whole body and cellular level. We describe here a precise, reproducible and convenient biochemical *in vitro* assay for glycogen. This technique is based on the quantification glucose fluorescence before and after specific hydrolysis of glycogen.

Other methods exist to estimate the level of glycogen in the cells, but most of them are not quantitative. One of the first techniques described for quantification of glycogen in cells was based on measurement of [¹⁴C]-glucose incorporation into glycogen^{8,9}. The use of radioactivity makes this process more difficult to handle but it has the advantage of providing the rate of glucose incorporation into glycogen and in distinguishing between the distribution of glucose residues on the outer branches and in the core of the molecule (it also requires an additional β-amylolysis and a chromatographic step). Another technique was developed more recently and is based on the incorporation of 2-NBDG (2-[N-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl] amino]-2-deoxyglucose), a 2-deoxyglucose fluorescent derivative, into glycogen¹⁰. The measured fluorescence intensity reflects the amount of glycogen produced and can be measured with a fluorescence reader. Distribution of fluorescence in the cell can also be evaluated by confocal microscopy.

Among the other nonquantitative techniques, Periodic Acid-Schiff staining (PAS) is perhaps the most common. It can be used for the detection of glycogen in fixed cells, tissue sections in paraffin or frozen. This histological technique colors non specifically polysaccharides, glycolipids, glycoproteins, cellulose and neutral mucins in purple. The specificity of this test can be increased by treatment of fixed cells or tissue sections with diastase, which specifically digests glycogen. Thereafter, the level of glycogen can be qualitatively estimated by comparing unhydrolyzed samples (all carbohydrate modified macromolecules) to hydrolyzed samples (carbohydrate modified macromolecules except glycogen). PAS staining and microscopic analysis, unlike biochemical assays of glycogen, provides information concerning the distribution of glycogen in the cell, which can be diffused or concentrated in a certain part of the cell. However, even though PAS staining estimates differences in glycogen accumulation between different conditions, it is not quantitative¹¹.

A monoclonal mouse antibody originally made using mandibular condylar cartilage as the antigen has been shown to react with glycogen in cells and with purified glycogen *in vitro*¹². As this antibody specifically recognizes glycogen-related sugar chains, it is a useful tool for the detection of glycogen by immunohistochemistry in a more specific way than the PAS staining.

Electron microscopy is another technique that allows visualization of grains of glycogen in cells and evaluation of the degree of glycogen storage. In fact, glycogen β particles are easily recognizable with an electron microscopy as electron dense granules¹.

Protocol

Biochemical Titration of Glycogen

1. Cell Lysis

1. Seed cells at a concentration of $0.5\text{--}2 \times 10^6$ per 100 mm diameter dish.
2. Treatment: incubate cells 24, 48, or 72 hr in low oxygen concentration (hypoxia) in a Bug-Box anaerobic work station (Ruskin Technology Biotrace International Plc, Bridgend, UK) set at 1% or 0.1% O₂, 94% or 94.9% N₂, and 5% CO₂. In parallel, incubate cells in normoxia (21% O₂, 5% CO₂). Change medium (25 mM glucose-containing medium) every 24 hr to minimize variations in the glucose concentration during the time of experiment.
3. After treatment, wash cells 2x with PBS to remove traces of glucose from culture medium. Scrape the cells in cold PBS.
4. Centrifuge the solution at 1,000 rpm for 5 min, discard the supernatant and wash the pellet once with PBS. The pellet can be frozen at -20 °C before proceeding further.
5. Resuspend the pellet in 100 μl of distilled water. Add 100 μl of the Glycogen Hydrolysis Buffer provided with the Glycogen Assay Kit (Abcam). Boil the lysate at 95 °C for 5 min to inactivate enzymes.
6. Vortex and centrifuge the lysate at 13,000 rpm for 10 min to remove the insoluble products. Keep the supernatant.
7. To normalize glycogen levels to the protein content between samples, quantification of proteins can be done with 25-35 μl of the supernatant using the Bicinchoninic Acid assay (BCA-Interchim).

Some of the lysate can be used to measure the free glucose concentration inside the cells.

2. Hydrolysis of Glycogen

1. Mix 50 μl of the supernatant (step 1) with 1 μl of the Hydrolysis Enzyme Mix. This mixture contains glucoamylase. Incubate for 30 min at room temperature.
2. Prepare the calibration curve by diluting the standard glycogen (2 mg/ml) supplied with the kit to a solution of 10 μg/ml in the hydrolysis buffer. Next, prepare six separate tubes with 0, 4, 8, 12, 16, and 20 μl of 10 μg/ml standard and adjust each tube to a final volume of 50 μl with hydrolysis buffer to give a concentration of glycogen of 0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, and 0.2 μg/ml. Add 1 μl of Hydrolysis Enzyme Mix in the standards and incubate for 30 min at room temperature.

The background glucose concentration of the cell line, given by value for the free glucose concentration, must be subtracted from the value for the total glucose concentration (glucose from the glycogen hydrolysis + free-glucose) to determine the level of glycogen in the cell.

3. Development and Reading of Fluorescence

1. For each condition, prepare one tube (tube 1) to measure free glucose concentration and two tubes (tubes 2 and 3) to measure total glucose concentration (each tube with a different volume of hydrolyzed glycogen).
2. Add 15 μl of supernatant extracted at the end of step 1 in tube 1. Add 35 μl of hydrolysis buffer to complete to a final volume of 50 μl. Obtained fluorescence will give the free glucose concentration.
3. Add X μl of hydrolyzed glycogen (obtained in step 2) in tube 2. Adjust to a final volume of 50 μl. Sample volume (X μl) has to be adjusted according to cell density and/or cell type in order to obtain fluorescence values that are not beyond concentrations of the calibration curve.

4. Add 2X μl of hydrolyzed glycogen in tube 3. Adjust to a final volume of 50 μl .
5. Prepare a development solution for samples and standards by mixing for each tube 48.7 μl of Development Buffer, 1 μl of Development Enzyme Mix and 0.3 μl of OxiRed Probe (supplied in the Glycogen Assay Kit). For example, for 2 conditions, prepare a mix for 12 tubes (6 for standards, 2 for free glucose and 4 for total glucose fluorescence).
6. Add 50 μl of this mix to each tube and incubate for 30 min at room temperature in the dark.
7. Measure the fluorescence at an excitation wavelength of 535 nm, an emission wavelength of 587 nm as recommended, and a slit of 3 nm for excitation and emission.

Representative Results

A low level of oxygen (hypoxia) in tumors signals to tumor cells the need to store energy to handle subsequent nutrient depletion, so as to survive. As glycogen is the main energetic polymer of glucose in mammalian cells, we studied the regulation of glycogen storage in hypoxia. The calculation and standardization of the concentration of glycogen in cell lysates must be performed on the raw data of fluorescence as shown in **Tables 1, 2, and 3**. The biochemical assay for glycogen confirmed that the electron-dense aggregates observed on electron micrographs of CCL39 cells (**Figure 2A**) were glycogen particles (**Figure 2B**). The accumulation of glycogen in hypoxia is dependent on the transcription factor Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) (**Figure 3**), the major transcription factor involved in cellular adaptation to hypoxia. Finally, we demonstrate in different cancer and noncancer cell lines that stored glycogen can be rapidly metabolized by the cell in less than 6 hr (**Figure 4A**), and that the use of glycogen protects against cell death under conditions of glucose starvation (**Figure 4B**)¹.

Table 1.

	glu. (μg)	0	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2
Raw Data Fluorescence (RDF)	flu.	60	88.8	106.7	121.8	148	172.1
RDF - Background (fluorescence for 0 μg in standard curve)	correction	0	28.8	46.7	61.8	88	112.1
	Raw Data Fluor. (RDF)	RDF - Background	(correction*1000) slope standard curve	Volume of sample used to titrate glycogen	Raw data protein concentration	γ * volume sample	Glucose (ng) / protein total
Total glucose concentration 1	<i>flu.</i>	<i>correction</i>	<i>glucose (ng)</i>	<i>volume sample</i>	<i>γ ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)</i>	<i>protein total</i>	<i>glucose (ng/μg Pr.)</i>
Sample 1 (CCL39-NX 1)	65.8	5.8	10.5	20	0.07	1.4	7.5
Sample 2 (CCL39-NX 2)	64.1	4.1	7.4	20	0.11	2.2	3.4
Sample 3 (CCL 39 HX 48 hr 1)	177.3	117.3	211.5	4	0.22	0.88	240.3

Table 1.5.

Sample 4 (CCL 39 HX 48h 2)	174.2	114.2	205.9	4	0.24	0.96	214.5
Sample 5 (CCL 39 HX 72 hr 1)	164.7	104.7	188.8	2	0.22	0.44	429.1
Sample 6 (CCL 39 HX 72 hr 2)	174.7	114.7	206.8	2	0.24	0.48	430.9
	Raw Data Fluo. (RDF)	RDF - Background	(correction*1000) slope standard curve	Volume of sample used to titrate glycogen	Raw data protein concen- tration	γ * volume sample	Glucose (ng) / protein total
Total glucose concentration 2	fluo.	correction	glucose (ng)	volume sample	γ (μg/μl)	protein total	glucose (ng/ μg Pr.)
Sample 1 (CCL39-NX 1)	63	3	5.4	10	0.07	0.7	7.7
Sample 2 (CCL39-NX 2)	61.2	1.2	2.2	10	0.11	1.1	2.0
Sample 3 (CCL 39 HX 48 hr 1)	121.6	61.6	111.1	2	0.22	0.44	252.4
Sample 4 (CCL 39 HX 48 hr 2)	111.9	51.9	93.6	2	0.24	0.48	195.0
Sample 5 (CCL 39 HX 72 hr 1)	110.3	50.3	90.7	1	0.22	0.22	412.3
Sample 6 (CCL 39 HX 72 hr 2)	117.8	57.8	104.2	1	0.24	0.24	434.3

Table 2.

free glucose	fluo.	correc-tion	glucose (ng)	volume sample	γ (μg/μl)	protein total	glucose (ng/ μg Pr.)	negative values are Considered as 0
Sample 1 (CCL39-NX 1)	60.2	0.2	0.4	15	0.07	1.05	0.3	0.3
Sample 2 (CCL39-NX 2)	55.3	-4.7	-8.5	15	0.11	1.65	-5.1	0
Sample 3 (CCL 39 HX 48 hr 1)	56.5	-3.5	-6.3	15	0.22	3.3	-1.9	0
Sample 4 (CCL 39 HX 48 hr 2)	56.7	-3.3	-6.0	15	0.24	3.6	-1.7	0
Sample 5 (CCL 39 HX 72 hr 1)	57.5	-2.5	-4.5	15	0.22	3.3	-1.4	0
Sample 6 (CCL 39 HX 72 hr 2)	56.9	-3.1	-5.6	15	0.24	3.6	-1.6	0

Table 3.

	Total glucose concentration 1	Total glucose concentration 2	Total glucose concentration average	Free glucose concentration	Glycogen (ng/ μ g Pr.) (total average glucose - free glucose)	Average glycogen (between duplicates)	Standard error
Sample 1 (CCL39-NX 1)	7.5	7.7	7.6	0.3	7.3	5.0	3.3
Sample 2 (CCL39-NX 2)	3.4	2.0	2.7	0.0	2.7		
Sample 3 (CCL 39 HX 48 hr 1)	240.3	252.4	246.4	0.0	246.4	225.6	29.5
Sample 4 (CCL 39 HX 48 hr 2)	214.5	195.0	204.7	0.0	204.7		
Sample 5 (CCL 39 HX 72 hr 1)	429.1	412.3	420.7	0.0	420.7	426.6	8.4
Sample 6 (CCL 39 HX 72 hr 2)	430.9	434.3	432.6	0.0	432.6		

Tables 1, 2, 3. Representative calculation and normalization of glycogen content of CCL39 cells from fluorescence row data. Glycogen was titrated in CCL39 after incubation in normoxia (Nx) or in hypoxia 1% O₂ (Hx) for 48 hr or 72 hr. Glycogen measurements have been done in duplicate for each condition. Top part of **Table 1** (table and figure on the top) contains calculation and representation of standard curve. Middle part of **Table 1** shows how to calculate and normalize free glucose concentration and total glucose concentration (from two different volumes of sample) from fluorescence data. Bottom part of **Table 1** indicates how to calculate glycogen concentration from total glucose concentration and free glucose concentration.

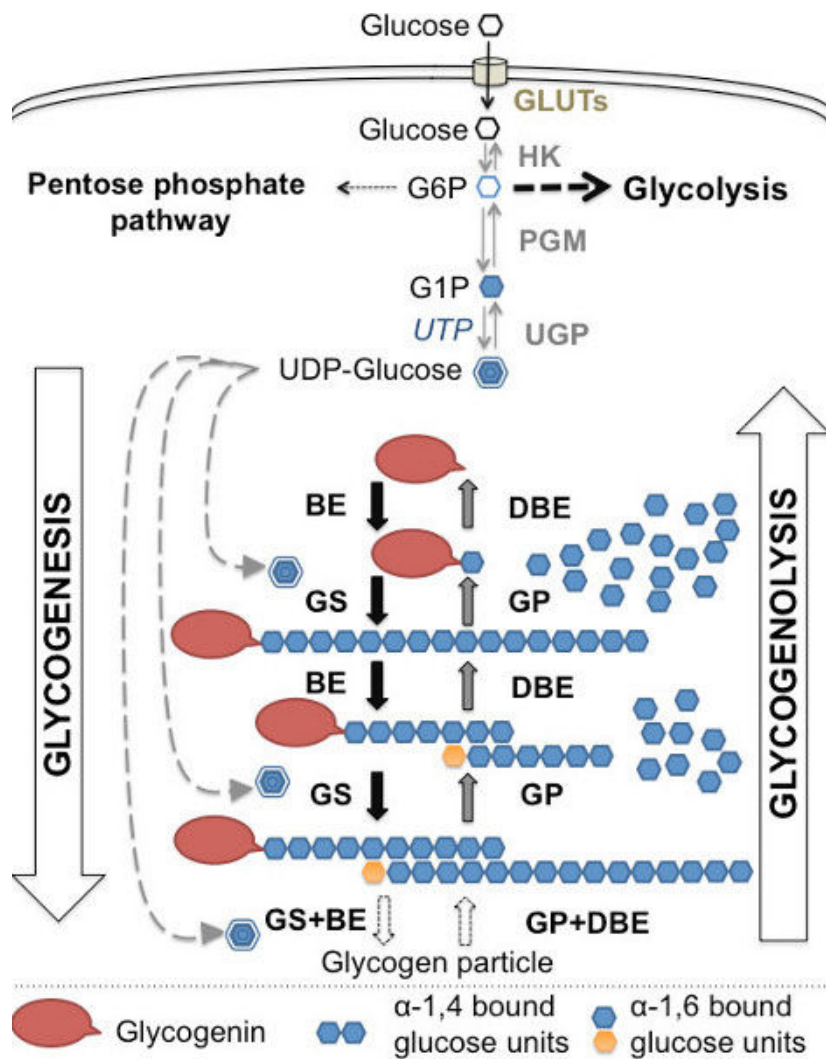
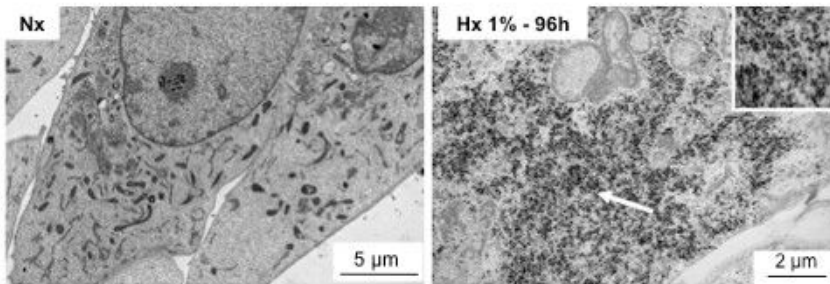


Figure 1. Glycogen metabolism: overview of the synthesis and degradation of glycogen. Glucose enters into the cell cytoplasm through glucose transporters (GLUTs) for transformation into glucose-6-phosphate by hexokinases 1 and 2 (HK). Glucose-6-phosphate (G6P) is at the junction between glycolysis, the pentose phosphate pathway and glycogenesis. Phosphoglucomutase (PGM) is the first enzyme in glycogenesis that catalyzes the conversion of G6P into glucose 1-phosphate (G1P), which is then transformed into UDP-glucose by glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UGP). UDP-glucose is used by glycogen synthase (GS) to elongate an anchorage molecule constituted of glycogenin and a glucose residue attached by a branching enzyme (BE). Glycogen synthase and branching enzymes collaborate in the formation of glycogen, also called glycogenesis. The reverse process that hydrolyzes glycogen into G1P via glycogen phosphorylase (GP) and debranching enzymes (DBE) is called glycogenolysis. Adapted from³.

A

CCL39



B

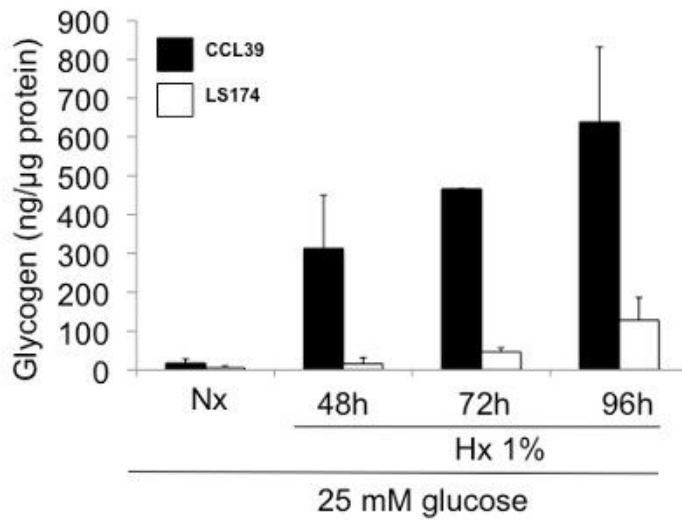


Figure 2. Accumulation of glycogen in hypoxia in non cancer cells and cancer cells. (A) Electron micrographs of CCL39 in normoxia (Nx) (left panel) and hypoxia 1% O₂ (Hx 1% 96 hr) (right panel). Arrows denote aggregates of glycogen particles. (B) Quantitation of the amount of glycogen in CCL39 (black bars) and LS174 (white bars) cells grown in normoxia (Nx) or hypoxia 1% O₂ (Hx 1%) for 48, 72, and 96 hr in a 25 mM glucose-containing medium.

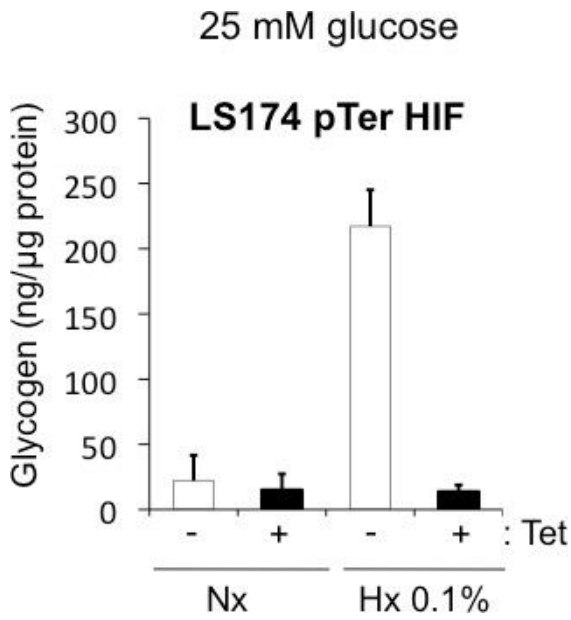


Figure 3. Accumulation of glycogen in hypoxia is dependent on HIF-1. Quantification of the glycogen amount in LS174 pTerHIF-1α. These cells are inducible clones expressing a shRNA against HIF-1α in condition of tetracycline. Cells grew in normoxia (Nx) (white bars) or hypoxia 0.1% O₂ (Hx 0.1% - black bars) in the absence (-) or presence (+) of tetracycline (Tet).

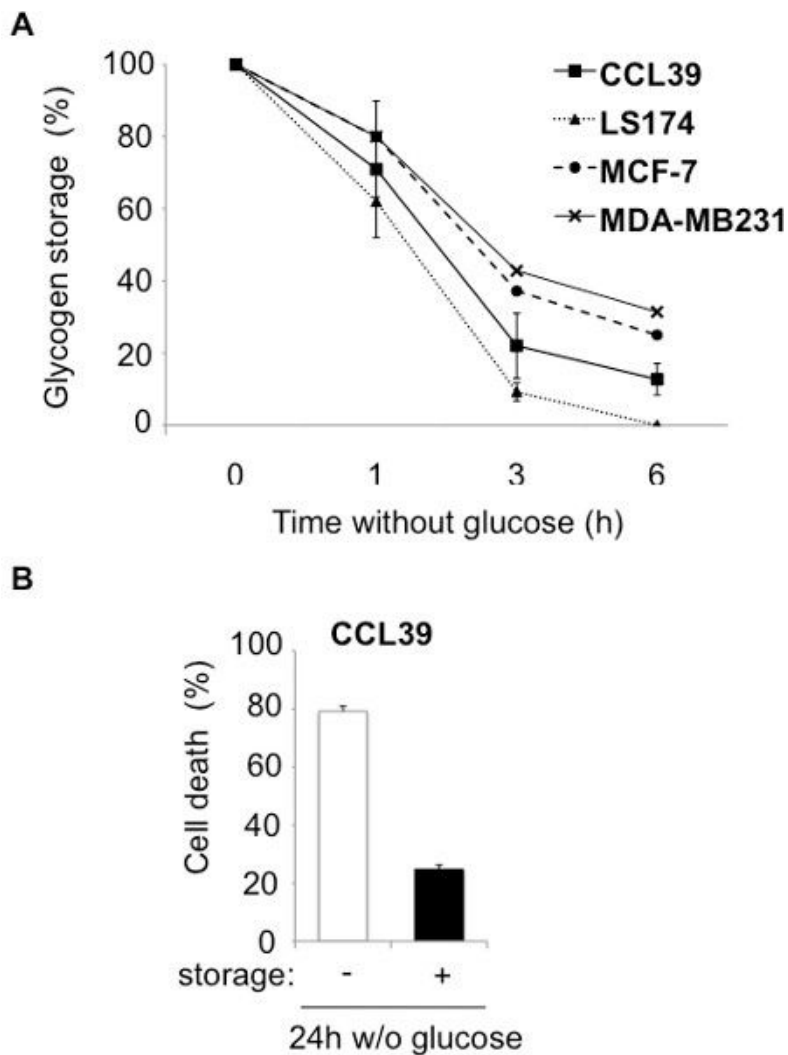


Figure 4. Glycogen storage protects from cell death. (A), CCL39 (■), LS174 (▲), MCF-7 (●), and MDA-MB231 (x) cells were subjected to 1% O₂ hypoxia for 96 hr and then cultured in glucose-free medium for 6 hr. The glycogen concentration was measured just before removal of glucose and represents 100%. Glycogen was then measured at 1, 3, and 6 hr. The results are representative of at least three separate experiments. (B) Measurement of cell death in CCL39 cells. Cells were subjected to either normoxia (- storage) or hypoxia (+ storage) for 96 hr and incubated in glucose-free medium in hypoxia for 24 hr before measuring cell death.

Discussion

Biochemical titration of glycogen *in vitro* allows an accurate quantification of cells glycogen content. Comparing to some other techniques (PAS, immunofluorescence with a glycogen antibody, etc.), this titration is very specific, sensitive and reproducible. Moreover, the method is convenient since it requires no radioactivity but a fluorescence spectrometer. However, this technique is purely quantitative and does not provide information about glycogen distribution in the cell.

The technique described in this manuscript is achieved on cell extracts but it can also be achieved on tissue sections with an appropriate method for extraction of glycogen from tissues. This assay is used for *in vitro* applications and due to an indirect measurement of glycogen (after hydrolysis into glucose), it can not be developed to follow glycogen stores *in vivo*.

PAS staining is already widely used to diagnose many glycogen storage diseases (von Gierke's disease, Cori's disease, McArdle's disease, etc.). It is also used to detect fungal infections or to discriminate between different subtypes of tumors. In theory, PAS staining could be coupled to an image analyzer to determine the glycogen concentration. In practice, this technique is difficult to perform and is less appropriate than the method described here for the following reasons. Firstly, as PAS positive staining (violet) overlaps with the negative staining (Hematoxylin-blue), it is technically difficult to exclude the negative signal without removing the positive signal. In addition, PAS staining is not reproducible enough to quantify glycogen, because the intensity of the color can depend on the time of fixation, efficacy of coloration, washing, etc. Finally, this biochemical methodology gives an average concentration of glycogen for a large number of cells, while PAS staining focuses on a specific field and therefore is less representative of the overall glycogen concentration.

The biochemical assay of glycogen could provide very accurate and informative data on the level of glycogen in tissue. These data could for example be hypothetically correlated with disease progression, or may help to understand the effects of treatment on glycogen metabolism. On the other hand, this technique requires several steps (protein quantitation, hydrolysis of glycogen and a minimum of three fluorescence readings per sample), and seems less practical than the PAS staining. For a better understanding of the physiological or pathophysiological metabolism (cancer, *etc.*), it is important to precisely quantify the glucose (and ATP) provided by glycogen. However, glycogen quantification alone is not sufficient to understand glycogen metabolism and must be coupled with microscopy to determine the distribution of glycogen in cells.

It is important to point out that despite the accuracy and reproducibility of this assay, a small variation in the protein content can lead to large variations of normalized values of glycogen. In addition, although there is a linear increase in the fluorescence with glycogen concentration, the linearity is not maintained at high concentration for which the signal drops dramatically. Thus, we recommend not to take into account the fluorescence values beyond concentrations of the calibration curve. We therefore recommend performing two readings with two different sample volumes. In this way the fluorescence reflects the glycogen in the cells and is not offset by a decrease in fluorescence.

Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We are grateful to the Dr. Thierry Pourcher for allowing us to use the fluorescence spectrometer and for his help. The laboratory is funded by the Ligue Nationale Contre le Cancer (équipe labellisée), the Association pour la Recherche contre le Cancer, the Institut National du Cancer (INCa), the Agence Nationale pour la Recherche, METOXIA (EU program FP7), the Centre A. Lacassagne, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the University of Nice (<http://www.unice.fr/isdbc/>). We thank Dr. M Christiane Brahimi-Horn for critical reading and editorial correction.

References

1. Pelletier, J., *et al.* Glycogen Synthesis is Induced in Hypoxia by the Hypoxia-Inducible Factor and Promotes Cancer Cell Survival. *Front Oncol.* **2**, 18, doi:10.3389/fonc.2012.00018 (2012).
2. Alonso, M.D., Lomako, J., Lomako, W.M., & Whelan, W.J. A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* **9**, 1126-1137 (1995).
3. Bollen, M., Keppens, S., & Stalmans, W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* **336** (Pt 1), 19-31 (1998).
4. Parker, G.J., Koay, A., Gilbert-Wilson, R., Waddington, L.J., & Stapleton, D. AMP-activated protein kinase does not associate with glycogen alpha-particles from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 811-815, doi:S0006-291X(07)01740-8 [pii] 10.1016/j.bbrc.2007.08.080 (2007).
5. Sullivan, M.A., *et al.* Nature of alpha and beta particles in glycogen using molecular size distributions. *Biomacromolecules.* **11**, 1094-1100, doi:10.1021/bm100074p (2010).
6. Chee, N.P. & Geddes, R. The structure of liver glycogen. *FEBS Lett.* **73**, 164-166, doi:0014-5793(77)80972-1 [pii] (1977).
7. Roach, P.J., Depaoli-Roach, A.A., Hurley, T.D., & Tagliabracci, V.S. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem. J.* **441**, 763-787, doi:BJ20111416 [pii] 10.1042/BJ20111416 (2012).
8. Moses, S.W., Bashan, N., & Gutman, A. Glycogen metabolism in the normal red blood cell. *Blood.* **40**, 836-843 (1972).
9. Agbanyo, M. & Taylor, N.F. Incorporation of 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose into glycogen and trehalose in fat body and flight muscle in *Locusta migratoria*. *Biosci. Rep.* **6**, 309-316 (1986).
10. Louzao, M.C., *et al.* "Fluorescent glycogen" formation with sensibility for *in vivo* and *in vitro* detection. *Glycoconj. J.* **25**, 503-510, doi:10.1007/s10719-007-9075-7 (2008).
11. Sheehan, D.C.H., B.B. *Theory and practice of histotechnology*. 2nd edition. Batelle Press, (1980).
12. Baba, O. Production of monoclonal antibody that recognizes glycogen and its application for immunohistochemistry. *Kokubyo Gakkai Zasshi.* **60**, 264-287 (1993).

B. Hypoxic Hyperfused Mitochondria Interact with Endolysosomes to cleave Mitochondrial VDAC1 in a TP53-BNIP3-Dependent Manner in Promoting Survival

Brahimi-Horn MC, Lacas-Gervais S, Adaixo R, Ilc K, Rouleau M, Notte A, Dieu M, Michels C, Voeltzel T, Maguer-Satta V, Pelletier J, Ilie M, Hofman P, Manoury B, Schmidt A, Hiller S, Pouysségur J and Mazure NM

(Article soumis dans le journal Molecular cell)

SUMMARY

The oxygen-limited microenvironment (hypoxia) of tumors induces metabolic adaptation and cell survival, but the underlying mechanisms remain poorly understood. We identified a HIF-1- and TP53-dependent mechanism that mediates hyperfusion of mitochondria that dock onto late endosomes and lysosomes in hypoxic cells in culture and in patient's tumor tissue. HIF-1 and TP53 regulated the post-translational truncation of the mitochondrial outer-membrane voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) through respectively, induction of mitochondrial BNIP3 and Mieap, a BNIP binding mitochondrial protein. We propose that truncation of VDAC1 to VDAC1- Δ C is a readout of contact between mitochondria and endolysosomes, since it occurs through cleavage by the endolysosomal asparagine endopeptidase. Hypoxic cells with hyperfused mitochondria containing truncated VDAC1 were more resistant to drug-induced cell death; which may be indicative of increased patient chemoresistance. Overall, these findings provide the framework for a better understanding of hypoxic cell metabolism and cell survival through mitochondrial-endolysosomal crosstalk.

RESUME

La masse tumorale se développe plus rapidement que le réseau vasculaire. Ainsi, certaines régions de la tumeur se retrouvent dans un environnement peu vascularisé et hypoxique. Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF1) est le facteur de transcription clé de l'adaptation cellulaire à l'hypoxie, régulant un large panel de gènes impliqués dans l'angiogenèse, le métabolisme cellulaire, ou la régulation du pH intracellulaire. Mon projet de thèse s'articule en trois axes autour de HIF1 et la reprogrammation métabolique en hypoxie.

Une première partie de ma thèse a porté sur l'étude de l'asparagine hydroxylase Factor-Inhibiting HIF1 (FIH), l'un des deux senseurs d'oxygène régulant HIF-1. Nous avons démontré que FIH est essentiel dans le développement tumoral de part ses actions inhibitrices de l'activité transcriptionnelle de HIF1 ainsi que ses actions suppressives de la voie p53-p21.

L'induction, par HIF1, du « shift » du métabolisme cellulaire vers une glycolyse anaérobie est primordiale dans l'adaptation à l'hypoxie. Glycolyse et synthèse du glycogène sont étroitement connectées. Nos travaux ont montré que les cellules tumorales hypoxiques synthétisent du glycogène par l'intermédiaire de HIF1, et que celui-ci constitue une réserve de glucose intracellulaire. Le glycogène peut être utilisé en condition de carence en glucose conférant alors une résistance accrue à ce stress énergétique.

La glycolyse exacerbée des cellules tumorales hypoxiques fournit l'essentiel de l'ATP et aboutit à une production massive d'acide lactique qui doit être exportée par le biais des transporteurs de monocarboxylates (MCTs). L'inhibition des MCTs réduit fortement la prolifération tumorale *in vitro* et *in vivo* mais n'éradique pas les tumeurs. La dernière partie de ma thèse a consisté à tester si le blocage des MCTs pourrait activer l'AMP kinase (AMPK), senseur direct et gardien de la balance énergétique, qui, en retour, réduirait la consommation d'ATP (synthèse de protéines, de lipides,..), et garantirait un niveau viable d'ATP. Nous avons démontré dans des fibroblastes embryonnaires de souris que l'AMPK (1) n'est pas requise pour préserver des niveaux viables d'ATP suite au blocage modéré de la glycolyse, (2) n'est pas suffisante pour maintenir la survie dans des conditions sévères d'inhibition de la production d'ATP par la glycolyse/OXPHOS, et (3) est cependant importante pour préserver le niveau d'ATP suite à une carence en glucose. Ces résultats suggèrent un effet complexe de l'AMPK dans la régulation de la bioénergétique tumorale. Nous avons finalement démontré que l'inactivation génétique de *Mct4* et *Ampk* réduit dramatiquement la tumorigénicité dans un modèle de xénogreffes, suggérant un rôle crucial de ces deux acteurs au cours de l'établissement de la tumeur dans un environnement hostile.

Nous avons ainsi identifié plusieurs cibles potentielles dans la signalisation hypoxique, au niveau de la régulation de HIF1 ou de ses cibles dans la reprogrammation métabolique hypoxique.

Mots clés : AMPK, ATP, FIH, glycogène, glycolyse, HIF-1, Hypoxie, métabolisme, prolifération tumorale, p53, transporteurs de monocarboxylates