

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÉGULATION DU TRANSPORTEUR MICROSOMIAL DU GLUCOSE-6-
PHOSPHATE PAR HIF-1 α : IMPACT SUR LA SURVIE DES CELLULES SOUCHES
MÉSENCHYMATEUSES EN HYPOXIE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
SIMON LORD-DUFOUR

AVRIL 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier tout particulièrement le Dr Borhane Annabi pour son soutien, ses conseils judicieux et de m'avoir enseigné une méthode de pensée unique et professionnelle, qui aidera certainement au développement de ma carrière en industrie. Je profite également de l'occasion pour remercier l'ensemble de mes collègues de laboratoire qui m'ont aidé au cours de mes études supérieures. Je pense plus précisément à Simon Fortier, Carl Laflamme, Jean-Christophe Currie et Marie-Paule Lachambre. Enfin, je tiens à souligner la contribution de la Fondation UQAM pour son soutien financier en m'octroyant une bourse du Fonds à l'Accessibilité et à la Réussite des Études (FARE).

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
RÉSUMÉ.....	x
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION.....	1
1. Le cancer et les cellules souches.....	1
1.1 Le cancer.....	1
1.1.1 Problématique et statistique.....	1
1.2 Les cellules souches adultes.....	2
1.2.1 Cellules souches hématopoïétiques.....	3
1.2.2 Cellules souches mésenchymateuses.....	3
1.2.3 Cellules endothéliales progénitrices.....	4
1.2.4 Cellules souches cancéreuses.....	4
1.3 Contribution des cellules souches mésenchymateuses au développement tumoral.....	5
2. L'hypoxie et la plasticité cellulaire.....	6
2.1 Environnement hypoxique.....	6
2.1.1 Développement tumoral.....	6

2.1.1.1	Angiogenèse.....	7
2.2	Régulation de la protéine HIF-1.....	7
2.2.1	Stabilisation de HIF-1 α	8
2.3	Régulation du métabolisme énergétique.....	9
3.	Le système Glucose-6-Phosphatase (G6Pase)	10
3.1	Rôle classique du système G6Pase.....	10
3.1.1	Le transporteur microsomial du Glucose-6-phosphate (G6PT).....	11
3.2	Pathologies reliées à un déficit du système G6Pase.....	11
3.3	Nouveaux rôles de G6PT.....	12
CHAPITRE II	22
PRÉSENTATION DU PROJET	22
Hypothèse de travail	22
Objectif 1	: Effet d'un environnement hypoxique sur l'expression génique de G6PT dans les MSC	22
Objectif 2	: Rôle de HIF-1α, la sous-unité régulatrice sensible à l'oxygène de HIF-1, sur l'expression génique de G6PT	23
Objectif 3	: Ciblage des fonctions pro-survie de G6PT	23
CHAPITRE III	25
ARTICLE	25
1.	Evidence for transcriptional regulation of the glucose-6-phosphate transporter by HIF-1 α : Targeting G6PT with mumbaistatin analogs in hypoxic mesenchymal stromal cells. Lord-	

Dufour S, Copland I B, Levros Jr L-C, Post M, Das A, Khosla C, Galipeau J, Rassart E et Annabi B. <i>Stem Cells</i> 2009 27(3):489-97.....	25
CHAPITRE IV.....	52
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	52
CONCLUSION.....	59
RÉFÉRENCES.....	60

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Classification des cellules souches</i>	14
Figure 2 : <i>Différenciation des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse</i>	15
Figure 3 : <i>Gènes induits par HIF lors de la tumorigenèse</i>	16
Figure 4 : <i>Représentation schématique de la régulation de HIF-1α</i>	17
Figure 5 : <i>Métabolisme du glucose</i>	18
Figure 6 : <i>Représentation schématique du système G6Pase localisé dans la membrane du RE</i>	19
Figure 7 : <i>Structure moléculaire de G6PT ainsi que de G6Pase -α du système G6Pase</i>	20
Figure 8 : <i>Inhibition dose-dépendante de la tubulogenèse des HBMEC sur matrigel par le traitement des cellules avec un analogue de la mumbaïstatine</i>	57
Figure 9 : <i>Inhibition de la formation de tubules par les HBMEC sur matrigel via l'utilisation d'un ARN interférant contre G6PT</i>	58

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : <i>Inhibiteurs connus de G6PT</i>	21
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ECM	Matrice extracellulaire
EPC	Cellule endothéliale progénitrice
EPO	Érythropoïétine
ESC	Cellule souche embryonnaire
GPCR	Récepteur couplé à une protéine G
GSD	Glycogénose
G6P	Glucose-6-phosphate
G6Pase	Système glucose-6 phosphatase
G6PC	Unité catalytique du système G6Pase
G6PT	Transporteur du G6P (T1)
hATF	« Urokinase-type plasminogen antagonist amino-terminal fragment »
HBMEC	Cellules de l'endothélium microvasculaire cérébral humain
HIF	Facteur inductible hypoxique
HSC	Cellule souche hématopoïétique
IGRP	« Islet-specific G6Pase-related protein »
MSC	Cellule souche mésenchymateuse
MT1-MMP	Métalloprotéase membranaire de type 1 (MMP-14)
OMS	Organisation mondiale de la santé
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PHD	Domaine prolyl hydroxylase
pVHL	Protéine suppresseur de tumeur Von Hippel-Lindau
RE	Réticulum endoplasmique

ROS	Espèce réactive dérivée de l'oxygène
siRNA	ARN interférant
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

RÉSUMÉ

L'une des caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses (MSC) est leur capacité à survivre en conditions hypoxiques et à contribuer au développement tumoral. Le transporteur du glucose-6-phosphate (G6PT) exerce, par ailleurs, un contrôle métabolique contribuant à la mobilisation et à la survie des MSC. Les effets d'un environnement faible en oxygène (1,2% O₂) sur l'expression de G6PT sont inconnus et pourraient expliquer en partie la contribution et le recrutement des MSC au centre d'un foyer tumoral hypoxique. Nous avons découvert que l'expression génique de G6PT ainsi que de la sous-unité catalytique G6PC-3 (β) du système glucose-6-phosphatase sont significativement exprimés, tandis que l'expression des isoformes G6PC-1 (α) et G6PC-2 (IGRP) était indétectable. L'environnement hypoxique ainsi que l'hypoxie artificielle induite suite à un traitement au chlorure de cobalt (CoCl₂), induisent à la fois l'expression de G6PT, du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), et du facteur inductible hypoxique-1α (HIF-1α), mais pas de G6PC-3 (β). L'analyse de la séquence promotrice du gène de G6PT révèle la présence de sites potentiels de liaison pour HIF-1α. Nous démontrons également, à l'aide d'ARN interférant (siRNA) dirigé contre le gène HIF-1α, que l'induction de G6PT ainsi que de VEGF dans les MSC en conditions de cultures hypoxiques est antagonisée. Finalement, nous avons généré un modèle de MSC exprimant constitutivement HIF-1α, et avons observé une augmentation significative des niveaux endogènes de l'expression de G6PT ainsi que de la mobilité cellulaire. De plus, nous avons démontré que l'inhibition de la fonction de G6PT par un dérivé de la mumbaïstatine (AD4-015) permettrait ainsi de cibler préférentiellement la mort des cellules possédant un niveau de G6PT élevé. Nos résultats démontrent un axe de régulation métabolique de G6PT dépendant de HIF-1α. Cet axe contribuerait à la flexibilité métabolique caractérisant les MSC et leur permettrait de survivre dans des conditions telles l'ischémie ou le développement tumoral, caractérisées par l'hypoxie et la privation en nutriments.

Mots-clés : Cellules souches mésenchymateuses, facteur inductible hypoxique-1α, transporteur du glucose-6-phosphate, migration des cellules souches, tumeur cérébrale.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1. Le cancer et les cellules souches

1.1 Le cancer

1.1.1 Problématique et statistique

Le cancer est l'une des causes de décès les plus importantes dans le monde. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), en 2007, 7,9 millions de personnes sont mortes du cancer, ce qui représente 13 % des 58 millions de décès dans le monde. On prévoit une augmentation du taux de décès d'environ 45% entre 2007 et 2030, soit de 7,9 à 11,5 millions de morts dus au cancer. Cette augmentation serait attribuable entre autres à l'augmentation ainsi qu'au vieillissement de la population mondiale. L'apparition d'un cancer peut être attribuable à plusieurs facteurs de risque, l'un d'eux est le mode de vie malsain qui regroupe la consommation de tabac ou d'alcool, une alimentation inadéquate ou un manque d'exercice physique. De plus, l'exposition à des substances cancérigènes dans les milieux de travail (par exemple l'amiante) ou dans l'environnement (par exemple les ultraviolets et les rayonnements ionisants) ainsi que certaines infections virales telles l'hépatite B ou le virus du papillome humain (VPH), sont des éléments pouvant engendrer l'apparition d'un cancer dans la société actuelle. Selon le même organisme, l'amélioration uniquement du mode de vie pourrait réduire significativement les risques de cancer d'environ 40%.

Une cellule cancéreuse est une cellule qui suite à une mutation, une infection ou à un stress, change de phénotype via une altération de son génome qui peut se traduire par l'activation d'un oncogène et l'acquisition subséquente de plusieurs avantages de croissance et de survie. Cette prolifération accrue permet donc la formation d'une tumeur solide qui pourra par la suite s'étendre à d'autres tissus via la formation de métastases (Marieb, 1993). L'environnement tumoral est un milieu très complexe et dynamique constitué de cellules cancéreuses, de cellules endothéliales, de cellules immunitaires, de cellules stromales ainsi que d'éléments de la matrice extracellulaire (ECM) (Albini et Sporn, 2007). Le foyer tumoral est une région faiblement vascularisée, ce qui engendre la formation d'un environnement à

faible pH et qui possède un apport déficient en oxygène et en nutriments. Ce faible niveau d'oxygène corrèle habituellement avec un développement tumoral accru grâce à différents processus adaptatifs telle l'angiogenèse, qui engendre la formation de vaisseaux sanguins permettant l'irrigation appropriée de la tumeur. De plus, un tel environnement complexifie la lutte au cancer puisqu'il réduit considérablement l'effet de la radiothérapie et de la chimiothérapie chez les patients, sans compter que ces approches affectent également les cellules saines environnantes (Carmeliet et Jain, 2000; Pouyssegur et al., 2006). Le cancer est donc une maladie qui nécessite un traitement multifactoriel étant donné sa très grande complexité et qui, encore de nos jours, se doit de retenir toute notre attention, puisqu'il est primordial d'expliquer l'ensemble des variables incluses lors du développement tumoral telle la contribution des cellules souches.

1.2 Les cellules souches adultes

Il existe deux principales caractéristiques pour décrire une cellule souche, l'autorenouvellement, ou le fait de se diviser sans cesse en produisant toutefois une cellule fille indifférenciée, ainsi que la capacité à se différencier en une cellule spécialisée ayant une fonction propre (Bongso et Lee, 2005). Les cellules souches se subdivisent principalement en deux grandes classes, les cellules souches embryonnaires (ESC) ainsi que les cellules souches adultes (Figure 1). Les cellules souches embryonnaires sont des cellules pluripotentes qui peuvent se différencier en tous les types cellulaires composant un organisme entier soit les cellules germinales ainsi que l'ensemble des trois niveaux d'organisation tissulaire : le mésoderme, l'ectoderme et l'endoderme. En ce qui concerne les cellules souches adultes multipotentes, ces dernières ont les mêmes caractéristiques qui décrivent une cellule souche, toutefois, leur degré de différenciation se restreint à un type de tissu donné. Cependant, il existe plusieurs divergences sur ce sujet dans la littérature et on peut donc en conclure que le processus de différenciation cellulaire demeure flexible selon l'environnement tissulaire. (Ulloa-Montoya et al., 2005). Il existe plusieurs types de cellules souches adultes, les cellules souches hématopoïétiques sont les plus étudiées (Bhatia et al., 1997). Par contre, les cellules souches mésenchymateuses, les cellules endothéliales progénitrices ainsi que les cellules souches cancéreuses sont de plus en plus caractérisées.

1.2.1 Cellules souches hématopoïétiques

La moelle osseuse, le sang ainsi que le sang de cordon ombilical sont les trois principales sources d'où sont issues les cellules souches hématopoïétiques (HSC). L'utilisation de l'une ou l'autre de ces sources pour usage thérapeutique chez les patients atteints d'une leucémie ou d'un lymphome, se justifie en fonction de la méthode de collection de la population cellulaire recherchée ainsi que du site de transplantation (Haspel et Miller, 2008). De façon remarquable, une seule HSC a la possibilité d'engendrer la production d'un système sanguin complet pour une vie entière (Osawa et al., 1996; Seiburg et al., 2006). Les HSC se démarquent fonctionnellement sur différents points des autres types de cellules souches adultes. Tout d'abord, les HSC se subdivisent en une population complexe, de plus, elles possèdent un potentiel de reconstitution à long terme, et finalement, elles constituent approximativement 1 sur 10,000 des cellules nucléées de la moelle osseuse. Il existe deux types de HSC connus actuellement avec un potentiel de différenciation de longue durée soit le phénotype α et β . Le premier type engendrera une population avec une plus grande concentration de cellules myéloïdes (macrophages et granulocytes) que de cellules lymphoïdes (lymphocytes T et B), tandis que la deuxième classe engendrera une population beaucoup plus équilibrée suivant les deux types de différenciation (Dykstra et al., 2007).

1.2.2 Cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules progénitrices multipotentes qui peuvent contribuer via leur différenciation au maintien ainsi qu'à la régénération des tissus conjonctifs tels les os, le tissu adipeux, le cartilage et les muscles (Figure 2) (Pittenger et al., 1999). Ce type cellulaire réside dans la moelle osseuse et peut être distribué de façon aléatoire et systémique dans les différents tissus pour constituer une réserve dormante de cellules souches (Young et al., 2001a; Young et al., 2001b). Une population de MSC doit être négative pour les marqueurs CD34, CD38 et CD45, alors qu'elle doit être positive pour CD105, CD73 et CD90 (Dvorakova et al., 2008). La contribution des MSC à la régénération tissulaire devient plus apparente lors de leur recrutement suivant une lésion ou une inflammation chronique. Ces conditions sont habituellement accompagnées par la libération d'un cocktail spécifique et complexe de facteurs de croissance permettant la

transmission d'un signal endocrine jusqu'à la moelle osseuse, ce qui engendre leur mobilisation et le recrutement de MSC au site de lésion (Fox et al., 2007). Dans le passé, il fut démontré que les MSC contribueraient activement au processus de cicatrisation suite à une blessure (Gregory et al., 2005).

1.2.3 Cellules endothéliales progénitrices

Les cellules endothéliales progénitrices (EPC) furent tout d'abord identifiées comme étant une population de cellules souches dans le sang périphérique possédant les marqueurs de surface suivant : CD34, KDR (VEGFR-2) et CD133 (Asahara et al., 1997; Gehling et al., 2000; Peichev et al., 2000). De plus, certaines études ont démontré qu'il était possible d'isoler des EPC de la moelle osseuse, du foie de fœtus ainsi que du sang de cordon ombilical (Shi et al., 1998; Murohara et al., 2000; Quirici et al., 2001). Les EPC peuvent contribuer au développement physiopathologique de vaisseaux sanguins anormaux, soit par exemple lors de l'activation de l'angiogenèse dans un contexte tumoral (Urbich et Dimmeler, 2004). De plus, il fut démontré que les EPC auraient un certain potentiel thérapeutique chez les patients souffrants de pathologies nécessitant la restauration d'une angiogenèse adéquate, tel lors d'un infarctus du myocarde (Rafii et Lyden, 2003).

1.2.4 Cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses (CSC) sont, entre autres selon les dernières évidences, responsables de l'échec des différentes thérapies anticancer actuelles. En effet, les CSC posséderaient un phénotype unique qui leur permettrait ainsi de survivre et de perpétuer la croissance tumorale grâce à des propriétés biologiques telles la dormance, la résistance aux différentes drogues ainsi qu'aux rayons ionisants. Les CSC sont présentement étudiées seulement dans un faible nombre de type tumoral, donc il est impossible pour le moment d'affirmer hors de tout doute que les CSC participent à l'ensemble des cancers (Wang et Dick, 2005). L'importance des CSC dans le développement tumoral sera d'autant plus pertinente lorsqu'une caractérisation plus approfondie sera effectuée à plus grande échelle. Ces études pourront ensuite être utilisées pour évaluer les stades de développement du cancer, plus adéquatement que les examens disponibles actuellement (Liu et al., 2007). Récemment, une glycoprotéine membranaire qui a longtemps été un marqueur des cellules

souches hématopoïétiques, CD133, fut identifiée comme étant préférentiellement exprimée chez les cellules tumorales capables d'autorenouvellement (Mizrak et al., 2008) et il a été suggéré que ces CSC CD133-positives soient la cible des futurs traitements thérapeutiques.

1.3 Contribution des cellules souches mésenchymateuses au développement tumoral

Le glioblastome, le cancer du cerveau le plus commun et le plus agressif, génère une tumeur hautement hypoxique (Kaur et al., 2005). Comme l'on vient de le voir, certains marqueurs moléculaires des cellules souches semblent caractériser également les cellules tumorales initiatrices impliquées dans le développement de glioblastome (Tso et al., 2006). On croit même que certains glioblastomes primaires dériveraient directement de cellules souches mésenchymateuses transformées. De plus, les MSC sont une population cellulaire adhérente et multipotente pouvant se différencier en plusieurs types cellulaires et provenant de l'intérieur d'un microenvironnement hypoxique soit celui rencontré dans la moelle osseuse (Prockop et al., 1997; Horwitz et al., 2005).

Récemment, il fut démontré que les MSC ont la capacité de survivre en condition d'ischémie et de résister en culture à l'hypoxie (Horwitz et al., 2005). De plus, le recrutement des MSC fut récemment démontré expérimentalement à l'aide d'un modèle de tumeurs artificielles vascularisées. Suite à la mobilisation des MSC s'en suivait l'incorporation de ces dernières à l'architecture tumorale (Studený et al., 2002; Nakamizo et al., 2006). L'ensemble de ces évidences suggère donc que les MSC ont la capacité de répondre aux facteurs de croissances tumoraux. Dernièrement, il a été démontré qu'une classe de tumeur de glioblastomes isolés de patients montrait un profil d'expression génique comparable aux MSC, et que dans ces cas les patients avaient de très faibles chances de survie (Joo et al., 2008). En résumé, les MSC pourraient être des candidats légitimes pour approvisionner une tumeur puisqu'elles peuvent s'adapter facilement à un environnement faible en oxygène et en nutriments.

2. L'hypoxie et la plasticité cellulaire

2.1 Environnement hypoxique

2.1.1 Développement tumoral

Il existe une gradation dans les processus menant au développement d'une tumeur. Tout d'abord, le premier stade se nomme l'hyperplasie, et caractérise un tissu contenant un nombre anormalement élevé de cellules. Ces cellules, qui ont une prolifération dérégulée gardent toutefois leur capacité à s'organiser en un tissu d'apparence normale. Dans le même ordre d'idée, la métaplasie, est constituée encore une fois de cellules d'apparence normale en pleine prolifération, mais se retrouvant dans un compartiment tissulaire qui ne leur est pas destiné; la métaplasie est le plus couramment retrouvée dans les zones de transition des tissus épithéliaux. Par la suite, la dysplasie caractérise le deuxième stade de développement d'un cancer, dans ce stade les cellules ne sont plus normales d'un point de vue morphologique en plus d'une prolifération incontrôlée, affectant l'ensemble de l'architecture tissulaire. La dysplasie est considérée comme une étape transitoire entre une croissance bénigne et pré-maligne (Weinberg R.A., 2007).

Finalement, le dernier stade, la néoplasie qui signifie nouveau type cellulaire, caractérise un regroupement cellulaire morphologiquement anormal, ayant une prolifération accrue et pouvant s'incorporer aux tissus connexes. L'ultime étape du développement tumoral qui n'est pas attribuable à tous les cancers, est le stade métastatique, qui permet à la tumeur primaire grâce à un processus très complexe de coloniser plusieurs sites dans l'ensemble du corps par les voies sanguines et lymphatiques, pour générer de nouvelles tumeurs. Les tumeurs se classifient en deux différentes catégories dépendamment de l'agressivité de la croissance, bénigne ou maligne. Les tumeurs se développant localement sont considérées comme bénignes, les autres qui envahissent les tissus voisins et engendrent des métastases sont qualifiées de malignes (Weinberg R.A., 2007). Ce type de prolifération atypique engendre donc la création d'un environnement faible en oxygène et en nutriments, toutefois, la cellule possède plusieurs mécanismes d'adaptation pouvant pallier à ce type de situation.

2.1.1.1 Angiogenèse

La néovascularisation est une étape critique du développement tumoral puisque l'approvisionnement en oxygène et en nutriments devient limité lorsque les cellules cancéreuses sont localisées à plus de 100 μm d'un vaisseau sanguin (Carmeliet et Jain, 2000). La capacité d'une tumeur à induire l'angiogenèse se déroule en plusieurs étapes multifactorielles qui permettent la production ainsi que la libération de facteurs pro-angiogéniques (Hanahan et Weinberg, 2000). Le complexe HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1), peut activer bon nombre de ces facteurs tels VEGF-A, les récepteurs au VEGF : FLT-1 et FLK-1, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), l'angiopoïétine (ANG-1 et ANG-2), le facteur de croissance dérivé des plaquettes B (PDGF-B), le récepteur TIE-2 et les métalloprotéinases pouvant dégrader la ECM (MMP-2 et MMP-9) (Figure 3) (Hickey et Simon, 2006).

2.2 Régulation de la protéine HIF-1

La plupart des réponses à l'hypoxie se traduisent par la modification de l'expression de nombreux types de gènes. L'un des principaux joueurs en condition hypoxique est HIF-1 un facteur de transcription hétérodimérique qui, en se liant au HRE (« Hypoxia-response elements »), permet l'induction d'une grande variété de gènes associés à l'angiogenèse (VEGF), la prolifération cellulaire (EPO), la survie, le métabolisme glucidique (GLUT-1), la régulation du pH et de la migration (MMP), lors de l'adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie (Patiar et Harris, 2006). Les protéines HIF font partie de la famille des facteurs de transcription bHLH-PAS (« basic helix-loop-helix - Per-Arnt/AhR-Sim homology sequence ») et peuvent engendrer l'expression d'au moins 150 gènes (Figure 3). Le système de régulation des HIF se compose de deux principaux éléments soit HIF-1 α et HIF-1 β (ou ARNT) (Pouyssegur et al., 2006). HIF-1 α possède, deux autres isoformes soient HIF-2 α et HIF-3 α , toutefois, leurs rôles et leurs implications sont encore peu connus (Weideman et Johnson, 2008). HIF-1 α , la sous-unité sensible à l'oxygène de HIF-1, a également été démontrée comme ayant la capacité de réguler le recrutement de cellules souches progénitrices dérivant de la moelle osseuse au site de lésion du tissu afin d'amorcer sa régénération (Ceradini et al., 2005). La surexpression de HIF-1 α fut démontrée dans la majorité des cancers, et il y aurait donc une corrélation entre le niveau d'expression et la

mortalité des patients dans plusieurs types de tumeurs (Semenza G.L., 2007). De plus, plusieurs études précliniques affirment que HIF-1 α peut induire la croissance tumorale ainsi que l'activation de l'angiogenèse (Ravi et al., 2000), et que l'ensemble de ces adaptations peut être inhibé en bloquant HIF-1 (Stoeltzing et al., 2004). Par ailleurs, HIF-1 permet également l'augmentation de l'expression de gènes codant pour la résistance aux drogues (MDR-1), qui permet le transport de drogues chimiothérapeutiques à l'extérieur de la cellule (Wartenberg et al., 2003). Ce prélude nous oriente donc vers une avenue où l'inhibition de HIF-1 pourrait servir de thérapie anticancéreuse. La voie de signalisation de HIF-1 sera donc au premier plan tout le long de mon étude.

2.2.1 Stabilisation de HIF-1 α

En condition de normoxie, soit environ de 8-10 % d'oxygène dans un tissu, la protéine HIF-1 α a un temps de demie-vie très court (Jewell et al., 2001). Donc dans ce type d'environnement, un équilibre entre la synthèse et la dégradation de HIF-1 α s'établit, ce qui empêche du même coup sa translocation au noyau. Toutefois, lorsque la concentration d'oxygène intratissulaire diminue, la dégradation de HIF-1 α est retardée (Jiang et al., 1996). La dégradation de HIF-1 α est modulée grâce à l'action d'un type d'enzyme bien précis : les prolyl hydroxylases (PHD). Il existe trois différentes isoformes de l'enzyme PHD toutes responsables de la régulation de HIF-1 α toutefois, PHD2 fut démontré comme étant l'isoforme principal dans plusieurs types cellulaires (Berra et al., 2003). Ce type d'enzyme permet l'hydroxylation de HIF-1 α en utilisant l'oxygène ainsi que le 2-oxoglutarate comme substrats et le fer ainsi que l'acide ascorbique comme cofacteurs (Appelhoff et al., 2004). En effet, l'hydroxylation de deux prolines soit P402 et P564 du domaine ODD (« oxygen-dependent domain ») de HIF-1 α permet ensuite la liaison de pVHL (« Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein »). Conséquemment, ce complexe sera reconnu par la E3 ubiquitine ligase qui, comme son nom l'indique, polyubiquitine le complexe HIF-1 α -pVHL pour le rediriger vers sa destination finale soit la destruction via le protéasome (Pouysseguer et al., 2006).

En condition hypoxique, l'activité des enzymes responsables de l'hydroxylation est cependant inhibée ce qui empêche la dégradation de HIF-1 α et ainsi sa liaison à la protéine

HIF-1 β (ou ARNT) qui est exprimée constitutivement dans la cellule. Par la suite, le complexe se lie à l'ADN et, grâce à un coactivateur CBP/p300, permet la transcription d'une importante quantité de gènes (Figure 4) (Pouysseguer et al., 2006). Par ailleurs, il existe également d'autres stimuli pouvant réguler la protéine HIF-1 α . En effet, l'ensemble des modulations impliquant les niveaux des substrats et cofacteurs des PHD peuvent affecter la stabilisation de HIF-1 α . Il fut démontré qu'en augmentant la génération de ROS intracellulaire, il était possible d'augmenter la concentration de H₂O₂ et donc, diminuer les niveaux d'acide ascorbique ainsi que le niveau disponible de Fe²⁺ via la réaction de Fenton pour ainsi empêcher l'hydroxylation et donc la dégradation de HIF-1 α (Pagé et al., 2008). Il faut cependant garder en tête que la régulation de HIF-1 α , malgré le fait qu'elle ait été largement étudiée, demeure un processus très complexe. De plus, l'augmentation de la transcription de HIF-1 α peut être induite par divers facteurs et via plusieurs voies de signalisation différentes outre la privation d'oxygène. En effet, il fut même démontré qu'il était possible d'augmenter la synthèse protéique de HIF-1 α grâce à des agonistes GPCR comme l'angiotensine II et la thrombine (Pagé et al., 2002).

2.3 Régulation du métabolisme énergétique

Lorsque l'on aborde le sujet de la réponse cellulaire suite à une activation de HIF-1, on fait alors référence à une multitude de mécanismes de régulations métaboliques. Il existe plusieurs mécanismes majeurs par lesquels HIF-1 reprogramme le métabolisme énergétique cellulaire ainsi que le métabolisme glucidique suite à un environnement hypoxique ou à une perte d'activité de pVHL (Semenza, G.L., 2008). Premièrement, l'expression génique des transporteurs de glucose de type GLUT (importation du glucose extracellulaire), des enzymes glycolytiques (conversion du glucose en pyruvate) ainsi que de l'enzyme lactate déshydrogénase A (conversion du pyruvate en lactate) est augmentée. L'ensemble de ces modifications a pour but ultime l'augmentation du flux de transfert du glucose en lactate, et donc en une augmentation de la disponibilité énergétique (Iliopoulos et al., 1996; Iyer et al., 1998). Par la suite, HIF-1 via l'hypoxie engendre un changement dans l'expression d'un intermédiaire de la chaîne de transport d'électron (« cytochrome c oxidase complex IV »), augmentant ainsi l'efficacité de la respiration sous des conditions pauvres en oxygène (Fukuda et al., 2007). Troisièmement, l'expression de l'enzyme pyruvate déshydrogénase

(PDH) kinase 1 (PDK1) est induite, permettant ainsi la phosphorylation et donc l'inactivation de la PDH, empêchant du même coup la conversion du pyruvate en acétyl coenzyme A qui est nécessaire au cycle mitochondrial et à la génération des acides tricarboxyliques (Kim et al., 2006a). De plus, il fut également démontré que plusieurs autres enzymes glycolytiques tel PFK-L, ALD-A, ALD-C, PGK-1, ENO-1 et LDH-A (Figure 3) étaient régulés à la hausse dans certains tissus en condition hypoxique (Semenza et al., 1994; Ebert et al., 1996).

Une perte de l'activité de pVHL engendre par la suite une réduction de la consommation de l'oxygène ainsi que de l'activité de la chaîne de transport d'électron par la cellule qui se traduit par une diminution de la biogenèse mitochondriale (Zhang et al., 2007). Cette modification du métabolisme normal passe par l'inhibition d'une voie dépendant de myc par HIF-1, empêchant ainsi la transcription d'un gène que l'on nomme le coactivateur-1 β de PPAR- γ (PGC-1 β), un médiateur bien connu de la biogenèse mitochondriale (Zhang et al., 2007). Finalement, il fut également démontré qu'en condition hypoxique, on pouvait assister à de l'autophagie mitochondriale, ce qui illustre bien encore une fois un autre mécanisme permettant la reprogrammation de la production énergétique (Zhang et al., 2008). L'ensemble de ces modifications caractérise bien la perte d'activité d'une protéine suppresseur de tumeur (pVHL) qui en hypoxie permet la formation du complexe HIF-1, et ainsi une augmentation de la glycolyse et une diminution de la respiration mitochondriale dans les cellules cancéreuses, ce type de changement se nomme l'effet Warburg (Airley et Mobasher, 2007).

3. Le système Glucose-6-Phosphatase

3.1 Rôle classique du système G6Pase

Le complexe Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) est composé de cinq protéines, soit trois translocases et deux phosphatases α et β . Le système G6Pase permet l'hydrolyse du glucose-6-phosphate (G6P) qui est tout d'abord généré via la gluconéogenèse (Figure 5), en glucose et en phosphate inorganique par la sous-unité G6Pase- α (G6PC-1), qui est majoritairement active comparativement à la sous-unité G6Pase- β (G6PC-3). Par la suite, les translocases T2 et T3 permettent le transport des produits de l'hydrolyse dans le cytosol. Puisque la plupart des sucres ne peuvent traverser la membrane du réticulum endoplasmique

(RE), cette réaction d'hydrolyse est donc limitée par le transporteur de glucose-6-phosphate T1 (G6PT) qui permet d'importer le G6P du cytosol au RE (Figure 6) (Foster et Nordlie, 2002; van der Werve et al., 2000). L'action concertée de G6PT et de G6Pase- α est essentielle pour maintenir l'homéostasie glucidique entre les repas. De plus, un déficit dans l'expression ou une mutation inactivant l'une ou l'autre de ces protéines engendre une dérégulation de l'homéostasie glucidique, qui peut se traduire par une hypoglycémie précoce, une hépatomégalie, une néphromégalie, une hyperlipidémie, hyperuricémie, une acidose lactique ainsi qu'un retard de croissance (Chou et al., 2002; Chou et Mansfield, 2003).

3.1.1 Le transporteur microsomial de Glucose-6-phosphate (G6PT)

La protéine G6PT est codée par un seul gène de 5.3 Kb contenant 9 exons localisés sur le chromosome 11q23 (Annabi et al., 1998). De plus, contrairement à la sous unité α du système G6Pase qui est exprimé majoritairement dans le foie, les reins et l'intestin, la sous-unité G6PT est une protéine exprimée de façon ubiquitaire (Annabi et al., 1998; Lin et al., 1998). En effet, plusieurs études ont prouvé, à l'aide d'inhibiteurs spécifiques, l'existence de G6PT de même que sa masse de 46 kDa, migrant à un poids apparent de 37 kDa sur un gel SDS/Page (Herling et al., 1999; Kramer et al., 1999). Par ailleurs, l'ADN complémentaire de G6PT fut cloné ainsi que séquencé en 1998, les résultats démontrent qu'il s'agit bien d'une protéine de 429 acides aminés, possédant 9 boucles extramembranaires et 10 domaines transmembranaires. De plus, les deux extrémités C- et N-terminales se trouvent à l'extérieur du RE (Figure 7) (Lin et al., 1998). Il existe plusieurs inhibiteurs naturels et synthétiques pouvant bloquer la sous-unité G6PT du système G6Pase (Tableau I). L'une des familles de composés la plus spécifique se nomme les mumbaïstatines, un produit naturel anthraquinone qui fut isolée de cultures de *Streptomyces sp* (Ramakrishna et al., 1997).

3.2 Pathologies liées en une déficience du système G6Pase

Les maladies héréditaires qui affectent le stockage du glucose en glycogène ou à l'inverse soit l'utilisation de ce dernier pour maintenir une glycémie normale, se nomme glycogénoses (GSD, « Glycogen Storage Disease »). Il existe principalement sept sortes de glycogénoses avec des caractéristiques biochimiques et cliniques propres à chacune. L'incidence totale des GSD toutes confondues est estimée à environ 1 sur 20,000 - 43,000

(Ozen, 2007). En ce qui nous concerne, on s'intéressera plus particulièrement à la GSD de type I ou maladie de Gierke qui est une maladie autosomique récessive, et qui implique des déficits dans les différents constituants du système G6Pase.

La GSD-I a une incidence dans la population d'environ 1 sur 400,000 naissances, et il en existe deux principales formes soit la GSD-Ia et la GSD-Ib (Ozen, 2007). De nos jours, il n'existe aucun remède pour ces deux types de maladie et de plus, elles se doivent d'être contrôlées dans les premières années par la prescription d'un régime approprié au métabolisme du patient, sinon elles sont fatales. La GSD-Ia représente environ 80% des GSD-I et se caractérise par une déficience de la sous-unité G6Pase- α du système G6Pase. L'autre 20% des GSD-I sont les cas de GSD-Ib soit ayant une déficience de la sous-unité G6PT (Chou et al., 2002). Les deux principaux types de GSD-I possèdent les mêmes pathologies cliniques dues entre autre à l'accumulation du glycogène dans le foie et les reins. Toutefois, les patients souffrants de GSD-Ib manifestent également des signes de neutropénie, de dysfonction myéloïde, en plus des ulcérations au niveau des voies orales et intestinales (Chou et Mansfield, 2003). Cependant, la neutropénie ainsi que la dérégulation myéloïde ne semblent pas être reliées au métabolisme du G6P dans les organes glycolytiques tels le foie, les reins et le petit intestin, mais plutôt vers un rôle potentiel de G6PT au niveau de la moelle osseuse. En effet, certains chercheurs ont démontré *in vivo*, qu'un déficit en G6PT dans le foie, les reins et le petit intestin engendre un dysfonctionnement métabolique. Toutefois, la défaillance myéloïde était principalement due à une perte d'expression de G6PT dans la moelle osseuse et les neutrophiles (Kim et al., 2006b).

3.3 Nouveaux rôles de G6PT

Lorsque l'on parle de G6PT, on y associe inévitablement un rôle régulant le métabolisme du glucose. Toutefois, il fut démontré que G6PT pourrait participer à plusieurs autres mécanismes de régulation cellulaire importants dans la régulation du potentiel invasif tumoral. Récemment, le groupe de recherche du Dr Annabi démontra que la régulation de l'expression de G6PT à la hausse pouvait induire la migration cellulaire (Belkaid et al., 2006b) ainsi que la survie et le chimiotactisme des MSC (Currie et al., 2007). De plus, il fut établi que G6PT pourrait jouer un rôle dans le chimiotactisme des neutrophiles ainsi que dans

le contrôle du flux calcique. En effet, G6PT contribuerait également à la régulation de l'homéostasie du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire via une réaction ATP-dépendante permettant sa séquestration à l'intérieure du RE (Figure 6) (Chen et al., 2003; Fortier et al., 2008). Enfin, en ce qui concerne le volet tumoral, la modulation de l'expression de G6PT pourrait également réguler la migration ainsi que la survie des glioblastomes (U-87) grâce à un axe MT1-MMP/G6PT (Belkaid et al., 2006a; Belkaid et al., 2007). L'ensemble de ces rôles non orthodoxes de G6PT sur ces différents types cellulaires, nous pousse donc à vouloir comprendre davantage les mécanismes qui peuvent moduler l'expression de ce transporteur.

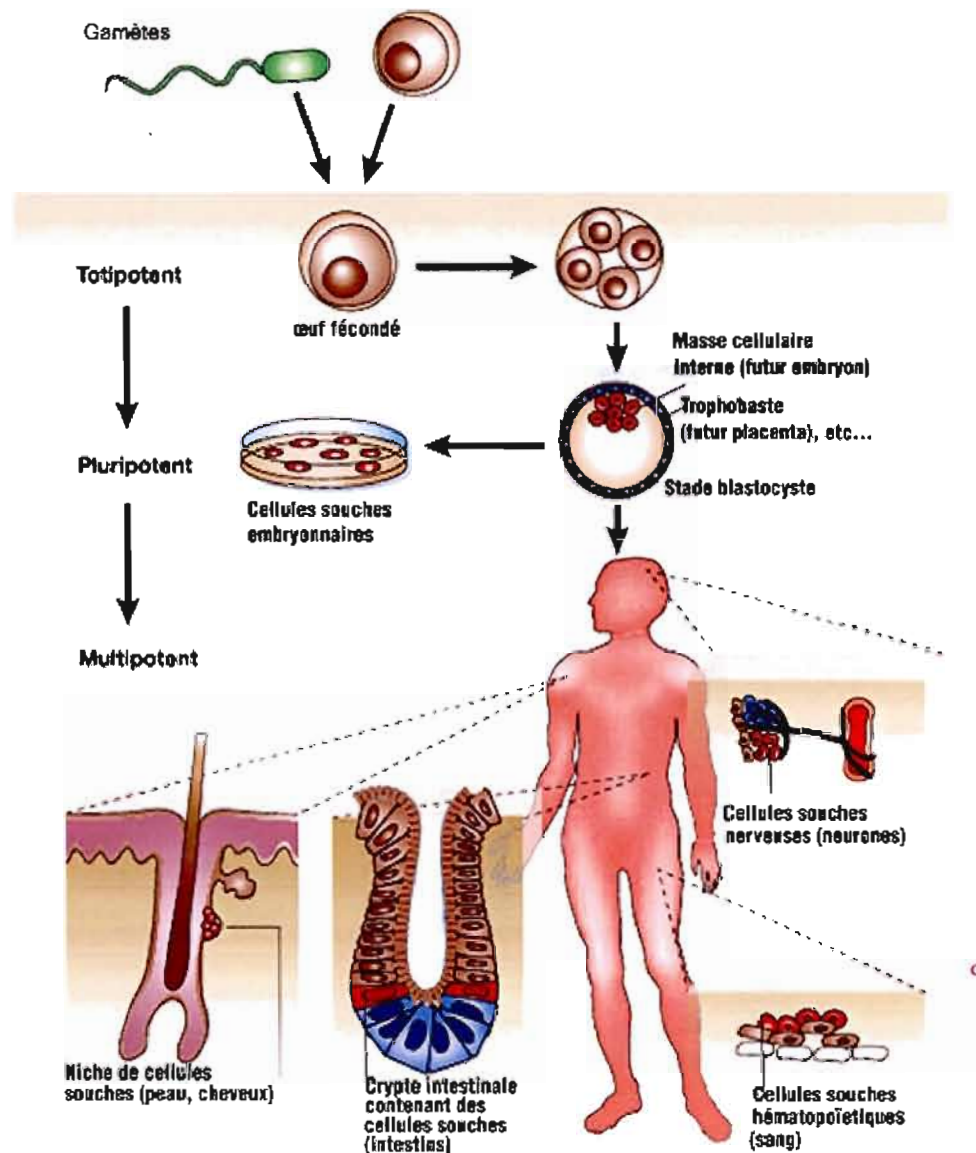


Figure 1: *Classification des cellules souches.* Les cellules souches se subdivisent principalement en deux grandes classes, les cellules souches embryonnaires ainsi que les cellules souches adultes. Les cellules souches embryonnaires sont des cellules pluripotentes qui peuvent se différencier en tous les types cellulaires composant un organisme entier. En ce qui concerne les cellules souches adultes multipotentes, ces dernières ont les mêmes caractéristiques qui décrivent une cellule souche, toutefois, leur degré de différenciation se restreint à un type de tissu donné (Eckfeldt et al., 2005).

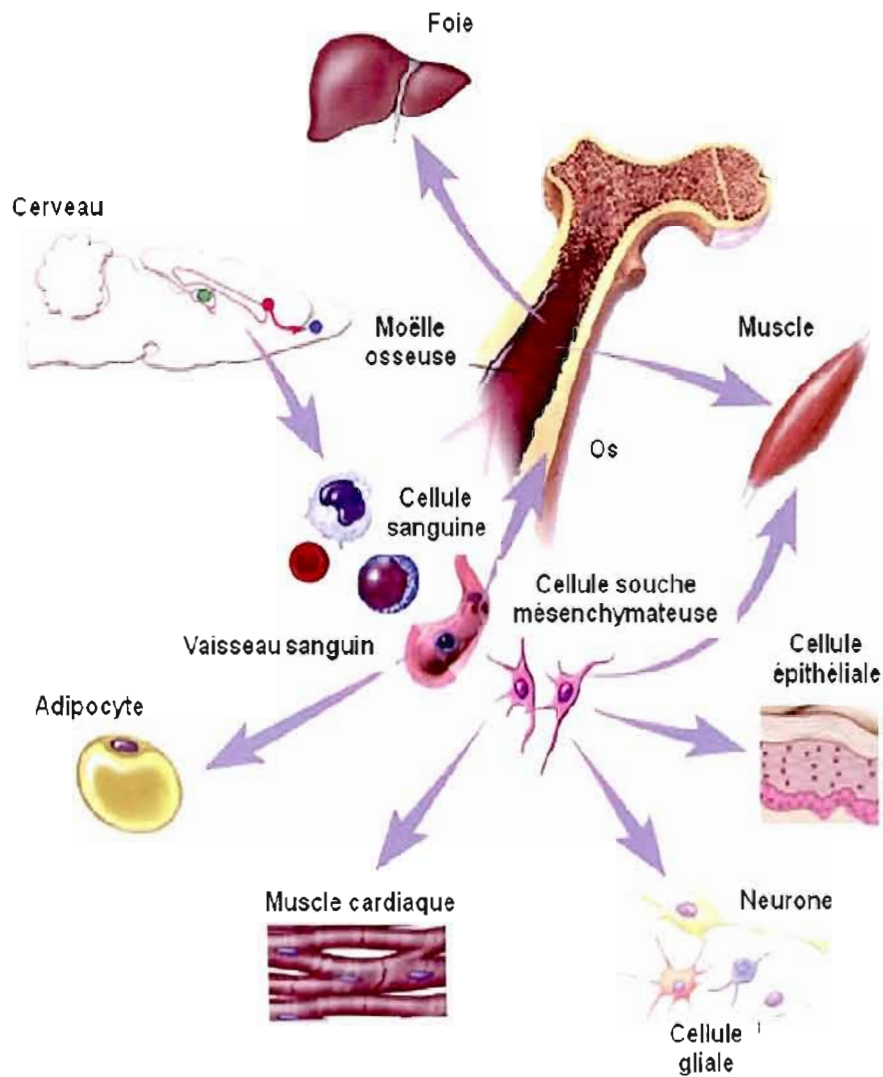


Figure 2 : Différenciation des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse. De par leur potentiel de différenciation, les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules progénitrices multipotentes qui peuvent contribuer au maintien ainsi qu'à la régénération des tissus conjonctifs tels les os, le tissu adipeux, le cartilage et les muscles. Ce type cellulaire réside dans la moelle osseuse et peut être distribué de façon aléatoire et systémique dans les différents tissus pour constituer une réserve dormante de cellules souches (Young et al., 2001a; Young et al., 2001b; Zech, N., 2004).

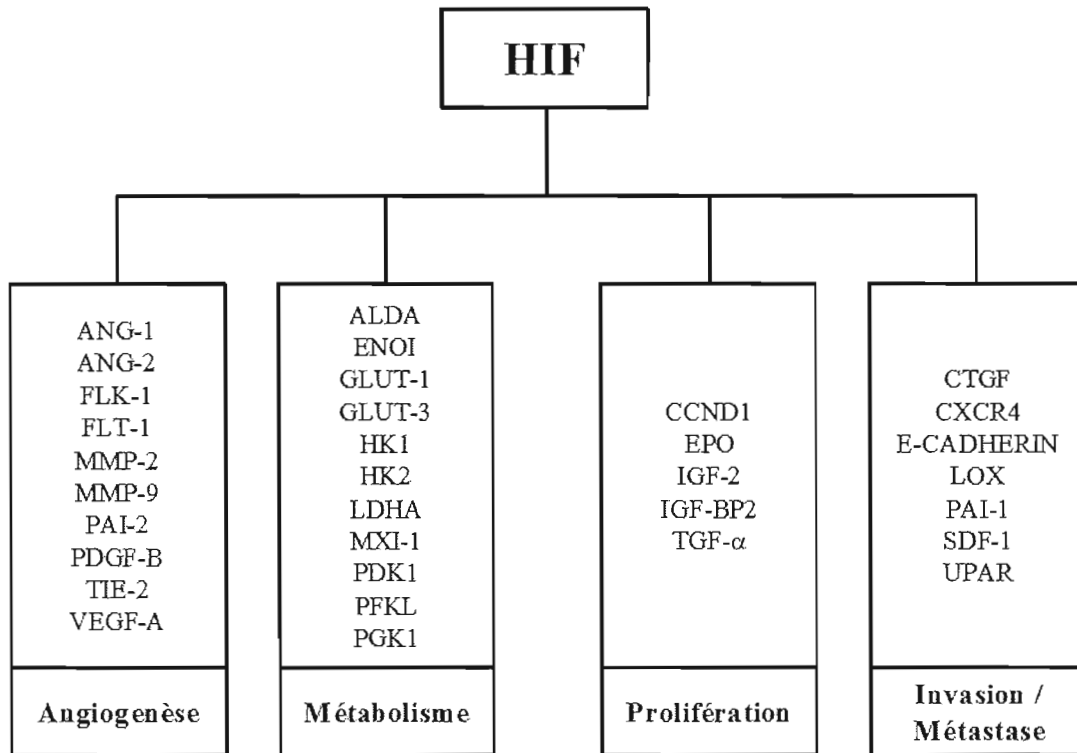


Figure 3 : Gènes induits par HIF lors de la tumorigenèse. (ALDA, aldolase A; ANG-1, angiopoietin 1; ANG-2, angiopoietin 2; CCND1, cyclin D1; CTGF, connective tissue growth factor; CXCR4, C-X-C chemokine receptor type 4; E-cadherin; EPO, erythropoietin; ENO1, enolase1; FLT-1, VEGF receptor 1; FLK-1, VEGF receptor 2; GLUT-1, glucose transporter-1; GLUT-3, glucose transporter-3; HK1, hexokinase 1; HK2, hexokinase 2; IGF-2, insulin growth factor-2; IGF-BP2, IGF-factor-binding protein 2; LDHA, lactatedehydrogenase A; LOX, lysyl oxidase; MMP-2, matrix metalloproteinase-2; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; MXI-1, max interactor 1; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PDGF-B, platelet-derived growth factor-B; PDK1, pyruvate dehydrogenase kinase 1; PFKL, phosphofructokinase L; PGK1, phosphoglycerate kinase 1; SDF-1, stromal-derived factor 1; TGF-a, transforming growth factor-a; TIE-2, ANG receptor; UPAR, urokinase plasminogen activator receptor; VEGF, vascular endothelial growth factor) (Rankin et Giaccia, 2008).

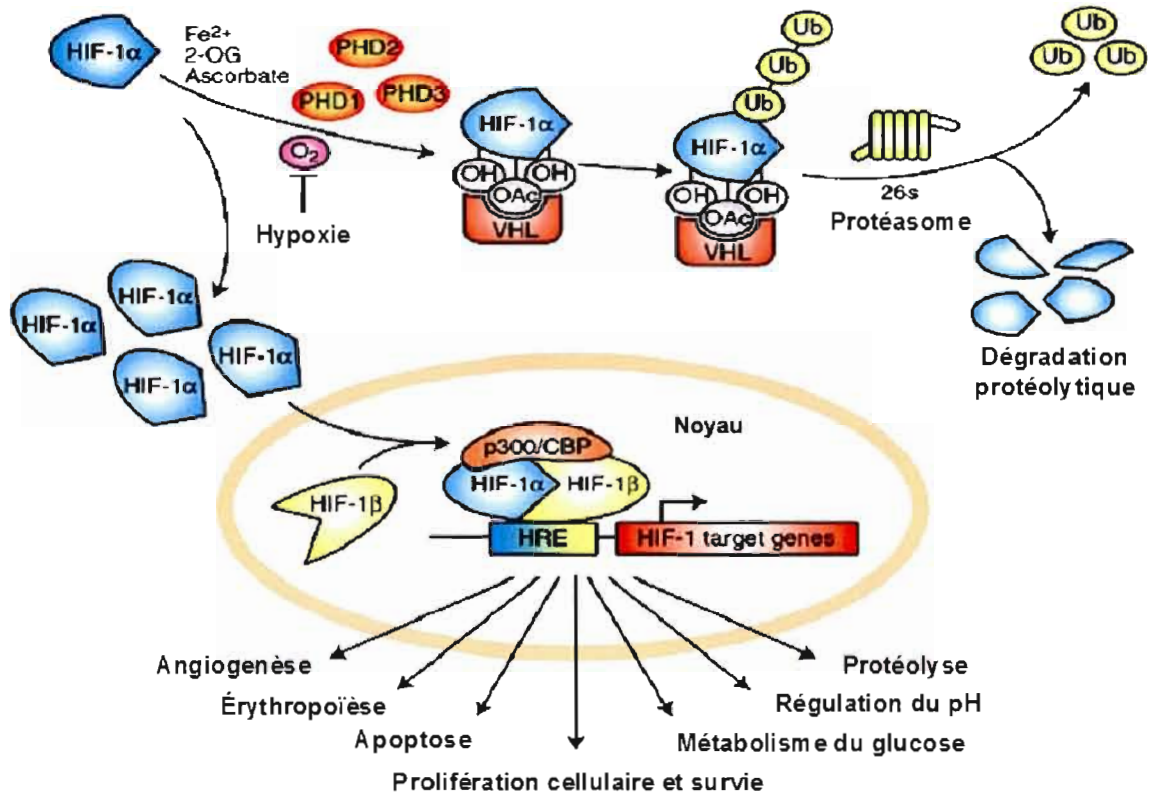


Figure 4 : Représentation schématique de la régulation de HIF-1 α . La dégradation de HIF-1 α est modulée grâce à l'action d'un type d'enzyme bien précis : les prolyl hydroxylases (PHD). En effet, l'hydroxylation de deux prolines du domaine ODD (« oxygen-dependent domain ») de HIF-1 α permet la liaison de pVHL (« Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein »). Conséquemment, ce complexe sera reconnu par la E3 ubiquitine ligase qui, comme son nom l'indique, polyubiquitine le complexe HIF-1 α -pVHL pour le rediriger vers sa destination ultime soit la destruction via le protéasome. Toutefois, en hypoxie la dégradation de HIF-1 α est inhibée ce qui permet la formation de HIF-1, un facteur de transcription hétérodimérique qui en se liant au HRE (« Hypoxia-response elements ») permet l'induction d'une grande variété de gènes (Carroll et Ashcroft, 2005).

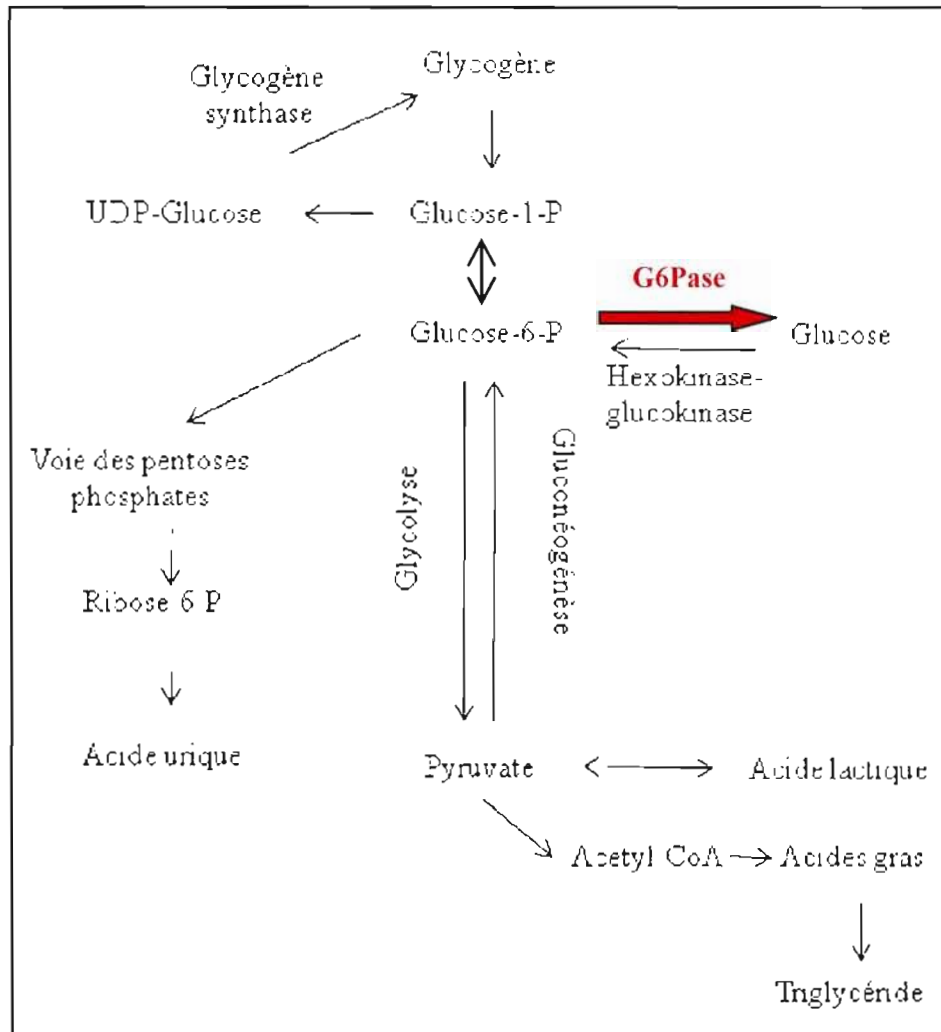


Figure 5 : Métabolisme du glucose. Le glucose peut être phosphorylé par une glucokinase (hexokinase) pour produire le glucose-6-phosphate. Par la suite, ce composé peut être stocké sous forme de glycogène via la gluconéogénèse ou à l'inverse, être transformé en pyruvate par la glycolyse, afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP.

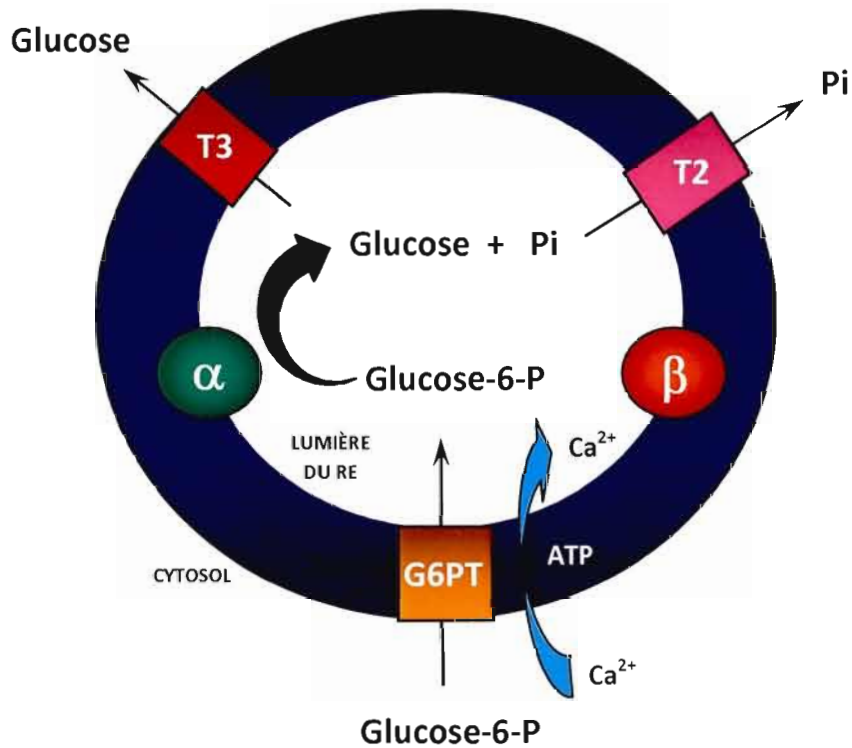


Figure 6 : Représentation schématique du système G6Pase localisé dans la membrane du RE. Le complexe Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) est composé de cinq protéines, soit trois translocases et deux phosphatases α et β . Le système G6Pase permet l'hydrolyse du glucose-6-phosphate (G6P) en glucose et en phosphate inorganique (Pi) par la sous-unité G6Pase- α (G6PC-1), qui est majoritairement active. Par la suite, les translocases T2 et T3 permettent le transport des produits de l'hydrolyse dans le cytosol. Puisque la plupart des sucres ne peuvent traverser la membrane du réticulum endoplasmique (RE), cette réaction d'hydrolyse est donc limitée par le transporteur de glucose-6-phosphate T1 (G6PT) qui permet d'importer le G6P du cytosol au RE. De plus, G6PT contribuerait également à la régulation de l'homéostasie du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire via une réaction ATP-dépendante permettant sa séquestration à l'intérieure du RE.

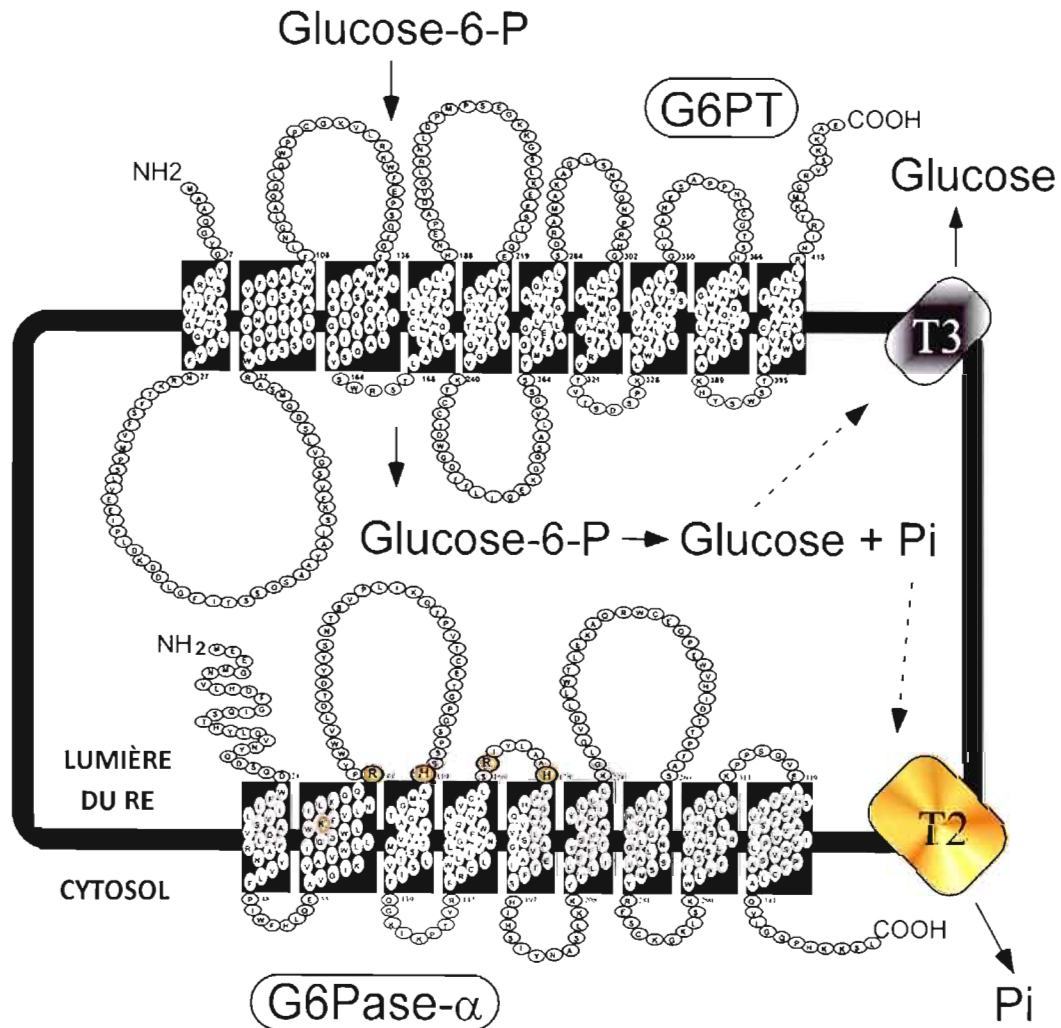


Figure 7 : Structure moléculaire de G6PT ainsi que de G6Pase- α du système G6Pase. La protéine G6PT possède 9 boucles extramembranaires et 10 domaines transmembranaires. De plus, les deux extrémités C- et N-terminales se trouvent du côté cytosolique du RE (Chou et Mansfield, 2007).

Tableau I : *Inhibiteurs connus de G6PT* (Parker J.C., 2001; Lee et al., 2007).

Composé	IC ₅₀ (μM)
Phloretine	340
Pyridoxal phosphate	446
2-Hydroxy-5-nitrobenzaldehyde	338
Kodiastatine A	0,08
Acide chlorogénique	260
S-3438	0,2
S-4048	0,003
Thielavine	0,3-10
CJ-21,164	1,6
Mumbaïstatine	0,005
Analogue de la mumbaïstatine	2,5

CHAPITRE II

PRÉSENTATION DU PROJET

Hypothèse de travail

L'ensemble des nouvelles fonctions de G6PT dans divers types cellulaires, nous pousse à investiguer davantage les mécanismes qui peuvent en moduler l'expression. Altérer les fonctions et/ou l'expression de G6PT aurait un impact sur la survie cellulaire et, particulièrement pour les MSC, réguler leur participation au développement tumoral. De plus, une expression accrue de G6PT pourrait expliquer la résistance des différents types cellulaires contribuant au développement d'un cancer. Les effets d'un environnement faible en oxygène sur l'expression de G6PT sont inconnus et pourraient expliquer en partie la contribution et le recrutement des MSC au centre du foyer tumoral.

Objectif 1: Effet d'un environnement hypoxique sur l'expression génique de G6PT dans les MSC.

Premièrement, nous avons évalué l'expression génique de G6PT ainsi que des deux sous-unités catalytiques du système G6Pase dans les cellules souches mésenchymateuses de souris (MSC). Après avoir isolé l'ARN des MSC, de foie de souris (contrôle positif pour l'ensemble du système G6Pase : α , β et T) ainsi que de pancréas de souris (contrôle positif pour un des isoforme de la sous-unité α : IGRP), nous avons amplifié les différents gènes d'intérêt par RT-PCR. Nous avons découvert que G6PT est fortement exprimé dans les MSC, que les sous-unités catalytiques G6PC-2 (IGRP) et G6PC-3 (β) sont faiblement exprimées, et finalement, que l'expression de la principale sous-unité catalytique du système glucose-6-phosphatase, G6PC (α) est indétectable.

Par la suite, nous voulions savoir si un environnement hypoxique pouvait induire l'expression génique de G6PT dans les MSC. Pour parvenir à nos fins, nous avons recréé une atmosphère de culture se composant de 1,2% O₂, 5% CO₂, complété à l'azote, pour incuber les cellules. De plus, nous avons utilisé le chlorure de cobalt (CoCl₂), une molécule inhibant l'hydroxylation de HIF-1 α , empêchant ainsi sa dégradation, comme second inducteur de la voie de HIF-1. Par la suite, nous avons analysé nos échantillons par qPCR (ou PCR en temps

réel) pour les gènes suivant : G6PT, G6PC-3 (β), HIF-1 α , VEGF et MT1-MMP. L'environnement hypoxique ainsi que l'hypoxie artificielle recréée suite à un traitement au chlorure de cobalt (CoCl₂), induisent à la fois l'expression de G6PT, de VEGF, et de HIF-1 α , mais pas de G6PC-3 (β).

Objectif 2: Rôle de HIF-1 α , la sous-unité régulatrice sensible à l'oxygène de HIF-1, sur l'expression génique de G6PT.

Sachant que l'hypoxie induit l'expression génique de G6PT, nous voulions confirmer la piste à suivre en étudiant tout d'abord le promoteur de G6PT. L'analyse de la séquence promotrice du gène de G6PT révèle la présence de sites potentiels de liaison pour HIF-1 α et ARNT, connu aussi sous le nom de HIF-1 β . Devant ces évidences, nous avons décidé d'utiliser la technologie de l'ARN interférant (siRNA) pour bloquer l'expression génique de HIF-1 α en condition hypoxique. L'analyse par qPCR des échantillons nous démontre bien que le siRNA contre HIF-1 α , empêche l'induction de G6PT ainsi que de VEGF dans les MSC en conditions de cultures hypoxiques.

Finalement, pour renforcer notre étude, nous avons utilisé un modèle de MSC de souris exprimant constitutivement HIF-1 α sans toutefois la portion ODDD (« oxygen-dependent degradation domain »), essentielle pour sa dégradation. Nous avons confirmé la transfection par Western Blot ainsi que confirmé la liaison de HIF-1 sur le promoteur de G6PT par un test de retard de mobilité sur gel. Dans un deuxième temps, nous avons évalué par qPCR les différents niveaux d'expression de G6PT, G6PC-3 (β), HIF-1 α , VEGF et MT1-MMP, et nous avons observé une augmentation significative des niveaux endogènes de l'expression de G6PT dans les MSC-HIF-1 α confirmant nos observations en hypoxie.

Objectif 3: Ciblage des fonctions pro-survie de G6PT.

À ce stade, nous pouvons conclure à une modulation de G6PT par HIF-1 α , qui pour sa part, peut être modulé par une multitude de stimuli, comme entre autre l'hypoxie. Prenant en compte la littérature, les cellules ayant un niveau de G6PT élevé, seraient donc davantage en mode survie. Pour approfondir cet énoncé, nous avons dans un premier temps effectué un

test de migration cellulaire basal et avons constaté que les cellules MSC-HIF-1 α ont un plus fort potentiel migratoire.

Pour terminer, les cellules exprimant constitutivement HIF-1 α , donc possédant un niveau d'expression génique de G6PT supérieur, auraient une plus grande mobilité cellulaire ainsi qu'une plus grande résistance à l'apoptose. Pour confirmer l'indice de survie des cellules HIF-1 α , nous avons étudié, par Western Blot, la voie d'Akt, plus précisément phospho-Akt soit la forme active de la kinase qui permet la phosphorylation de Bad et ainsi sa dégradation. Lors de cette analyse, nous avons également utilisé un inhibiteur hautement spécifique de G6PT, un analogue des mumbaïstatins (AD4-015), qui permet d'observer la contribution de G6PT sur l'indice de survie. Les niveaux de P-Akt et de P-Erk sont plus élevés dans les cellules HIF-1 α , et le traitement de ces dernières avec l'inhibiteur de G6PT diminue le niveau de phosphorylation d'Akt.

Nous avons également étudié le niveau de nécrose et d'apoptose à l'aide de microscopie à fluorescence, et avons constaté que la viabilité des cellules possédant un niveau de G6PT plus élevé semble beaucoup plus affectée par l'inhibition de l'activité de G6PT. La protéine G6PT semble donc une cible thérapeutique intéressante pour l'ensemble de sa contribution à la survie cellulaire.

CHAPITRE III

ARTICLE

Evidence for transcriptional regulation of the glucose-6-phosphate transporter by HIF-1 α : Targeting G6PT with mumbaistatin analogs in hypoxic mesenchymal stromal cells

Simon Lord-Dufour¹, Ian B. Copland², Louis-Charles Levros Jr³, Martin Post⁴, Abhirup Das⁵, Chaitan Khosla⁵, Jacques Galipeau², Eric Rassart³ and Borhane Annabi^{1*}

¹Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre BIOMED, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada, ²Department of Medicine, Lady Davis Institute for Medical Research, Montreal, Quebec, Canada, ³Laboratoire de Biologie Moléculaire, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada, ⁴Lung Biology Research Program, The Hospital for Sick Children Research Institute, Toronto, Ontario, Canada, and ⁵Departments of Chemistry, Chemical Engineering and Biochemistry, Stanford University, Stanford California, USA

*To whom correspondence and reprint requests should be directed

Correspondence should be directed to: Borhane Annabi, Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8; Phone : (514) 987-3000 ext 7610; Fax : (514) 987-0246; E-mail : annabi.borhane@uqam.ca

Running title : Hypoxia induces G6PT expression

Key words : Mesenchymal stromal cells, hypoxia inducible factor-1 alpha, glucose-6-phosphate transporter, stem cell migration, brain tumor

Author contribution:

Lord-Dufour : Collection and assembly of data, data analysis, manuscript writing, Copland : Collection and assembly of data, manuscript writing, Levros Jr : Collection and assembly of data, Post : Collection and assembly of data, Das : Collection and assembly of data, Khosla : Data analysis, manuscript writing, Galipeau : Collection of data, Data analysis, manuscript writing, Rassart : Data analysis, manuscript writing, Annabi : Conception and design, data analysis, manuscript writing, financial support.

ABSTRACT

Mesenchymal stromal cells (MSC) markers are expressed on brain tumor-initiating cells involved in the development of hypoxic glioblastoma. Given that MSC can survive hypoxia and that the glucose-6-phosphate transporter (G6PT) provides metabolic control that contributes to MSC mobilization and survival, we investigated the effects of low oxygen (1.2% O₂) exposure on G6PT gene expression. We found that MSC significantly expressed G6PT and the glucose-6-phosphatase catalytic subunit β (G6PC-3), while expression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit α (G6PC) and the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (G6PC-2) gene expression was low to undetectable. Analysis of the G6PT promoter sequence revealed potential binding sites for the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) α and for the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and its dimerization partner, the AhR nuclear translocator (ARNT) AhR:ARNT. In agreement with this, hypoxia and the hypoxia mimetic cobalt chloride induced the expression of G6PT, vascular endothelial growth factor (VEGF) and HIF-1 α . Gene silencing of HIF-1 α prevented G6PT and VEGF induction in hypoxic MSC while generation of cells stably expressing HIF-1 α resulted in increased endogenous G6PT gene expression. A semi-synthetic analog of the polyketide mumbaistatin, a potent G6PT inhibitor, specifically reduced MSC-HIF-1 α cell survival. Collectively, our data suggest that G6PT may account for the metabolic flexibility that enables MSC to survive under conditions characterized by hypoxia and could be specifically targeted within developing tumors.

INTRODUCTION

Molecular markers associated with mesenchymal stromal cells (MSC) are thought to characterize the brain tumor-initiating cells involved in the development of glioblastoma, the most common and aggressive primary brain cancer (1). Given that glioblastoma are also highly hypoxic tumors (2), these findings suggest that a subset of primary glioblastoma may derive from transformed stem cells containing MSC-like properties and retaining partial phenotypic aspects of the MSC nature within the tumors' hypoxic environment. Bone marrow-derived MSC are a population of pluripotent adherent cells residing within the bone marrow microenvironment that can differentiate into many mesenchymal phenotypes (3, 4). Interestingly, the recruitment of MSC by experimental vascularizing tumors has resulted in the incorporation of MSC within the tumor architecture (5, 6), which implies that these cells must respond to tumor-derived growth factor cues (7, 8). More importantly, their potential contribution to tumor development also implies that MSC must adapt to the low oxygen environment and nutrient deprivation that characterizes hypoxic tumors.

MSC were recently demonstrated also to have the capacity to survive under conditions of ischemia and to resist hypoxic culture conditions (9). Furthermore, resistance of MSC to inhibition of mitochondrial respiration also indicates that MSC can survive in the absence of oxygen using both anaerobic ATP production and increased glycolysis (9). The control of glycolysis and of gluconeogenesis occurs primarily at the level of the interconversion of fructose-6-phosphate and fructose-1,6-bisphosphate under the action of phosphofructokinase-1 (PFK-1) and fructose-1,6-bisphosphatase (10). Increased glycolysis is essential for the survival and spread of cancer cells in low oxygen environment. Under these conditions, the key step in controlling the glycolytic rate involves PFK-1, whose activation is controlled by the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) complex (11). HIF-1 is a transcription factor that is induced during the adaptation of tumour cells to hypoxia, activating the transcription of genes which, in turn, regulate several biological processes including angiogenesis, cell proliferation and survival, glucose metabolism, pH regulation and migration (12). HIF-1 α , the oxygen-sensitive subunit of HIF-1, was shown to induce the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells and trigger processes involved

in tumor angiogenesis and invasion (13). It also regulates homing of marrow-derived progenitor cells to injured tissue (14). Whether alternate intracellular metabolic systems, such as the glucose-6-phosphatase (G6Pase) system, would enable MSC to survive under conditions of hypoxic stress and whether these systems would be regulated by the HIF-1 complex are currently unknown.

Recently, impaired chemotaxis was reported in bone marrow cells isolated from a G6PT deficient (G6PT^{-/-}) mouse (15, 16). In agreement with those reports, we have demonstrated that G6PT can regulate cell migration (17) as well as MSC chemotaxis and survival (18). In fact, since its discovery, G6PT has been shown to be responsible for G6P transport from the cytosol to the lumen of the endoplasmic reticulum (ER), therefore performing the rate-limiting step for G6P hydrolysis into glucose and inorganic phosphate by the G6Pase system. G6PT has been shown to integrate and regulate many metabolic functions such as glycemia, lipidemia, uricemia, and lactic acidemia (19). More importantly, its activity cannot be substituted as G6PT deficiencies lead to glycogen storage disease (GSD) type Ib characterized not only by disturbed glucose homeostasis but by severe myeloid dysfunctions (19). Beside MSC, G6PT is believed to play a role in neutrophil chemotaxis and calcium flux control (20-23), and in U87 glioma cell survival (24, 25). In turn, G6PT gene expression is regulated in response to adaptive metabolic changes involving glucose, insulin and cyclic AMP (26). In this study, we investigated whether transcription of G6PT could be further regulated under the control of hypoxia-responsive elements, and to what extent G6PT could promote MSC survival under hypoxic conditions.

MATERIALS AND METHODS

Materials: Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Cell culture media were obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibodies against HIF-1 α and PARP were from Chemicon (Temecula, CA). The polyclonal antibodies against phospho-Akt, phospho-Erk and GAPDH were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA).

Cell culture and experimental hypoxic conditions : Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) were isolated from the whole femur and tibia bone marrow of C57BL/6 female mice; cells were cultured and characterized as previously described (27). Analysis by flow cytometry, performed at passage 14, revealed that MSC expressed CD44 yet were negative for CD45, CD31, KDR/flk1 (VEGF-R2), flt-4 (VEGF-R3) and Tie2 (angiopoietin receptor) (data not shown). Cells were cultured in serum-free DMEM during drug treatment in order to approximate the pathophysiological conditions of low growth factors and nutrient availability such as that found within the hypoxic environment of developing tumors. Hypoxic conditions were attained by incubation of confluent cells in an anaerobic box. The oxygen was maintained at 1% by a compact gas oxygen controller Proox model 110 (Reming Bioinstruments Co., Redfield, NY) with a residual gas mixture composed of 94% N₂ and 5% CO₂.

cDNA construct generation and transduction of the MSC-HIF-1 α : The human full-length HIF-1 α cDNA construct was generously provided by Dr. Semenza (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA), and was used as a template for generating an HIF-1 α mutant which lacked its oxygen-dependent degradation domain (ODD₄₀₁₋₆₀₃). The deletion mutant (HIF-1 α Δ ODD) was constructed by overlap extension using PCR. The deletion was confirmed by DNA sequencing, and the 1.95 kb HIF-1 α Δ ODD cDNA was subcloned into pcDNA3.1. For generation of retroviral particles, the HIF-1 α Δ ODD construct was digested out of the pcDNA3.1 vector using BamHI and HpaI restriction enzymes and subcloned into

the multiple cloning site of the bicistronic retrovector Pires-GFP. 293-GP2 viral packaging cells were transfected with either the HIF-1 α Δ ODD-Pires-GFP or null-Pires-GFP plasmids and the viral supernatant was collected at 48 and 72 hours post-transfection. MSC were subjected to 8 rounds of viral transduction. Following viral transduction each GFP(+)MSC (AP2-MSC) and HIF-1 α - Δ ODD-GFP(+) MSC population were each subjected to high speed cell sorting (BD FACS Aria) to obtain polyclonal pooled clones of retrovirally-transfected MSC that were 100% GFP(+) and similar in regards to GFP signal intensity.

Immunoblotting procedures : Nuclear extracts from MSC or MSC-HIF-1 α were isolated using the NE-PER Nuclear and cytoplasmic extraction kit (Pierce, Rockford, IL) and proteins separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hr at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 Mm NaCl, 20 Mm Tris-HCl, Ph 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the anti-HIF-1 α primary antibody (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% BSA, followed by a 1 hr incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d'Urfée, QC).

Cell migration assay : MSC or MSC-HIF-1 α were trypsinized and seeded at 10^5 cells on 0.15% gelatin/PBS precoated Transwells (Corning/Costar; Acton, MA; 8- μ m pore size) assembled in 24-well Boyden chambers which were filled with 600 μ l of serum-free media. Cell migration was allowed to proceed for 6 hours at 37°C in 5% CO₂. Non-migrating cells that remained on the upper side of the Transwell filter were carefully removed with cotton swabs. Cells that had migrated to the lower side of the filters were fixed with 3.7% formaldehyde and stained with 0.1% crystal violet/20% MeOH and counted. The migration was quantified by analyzing at least ten random fields per filter for each independent experiment using the computer-assisted imaging software Northern Eclipse 6.0 (Empix Imaging Inc., Mississauga, ON).

Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR : Total RNA was extracted from MSC monolayers using TRIzol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using Iq SYBR Green Supermix (BIO-RAD, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Iq5 (BIO-RAD, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. All the QuantiTect primer sets were provided by QIAGEN (Valencia, CA) : Mm_Hif1a_1_SG QT01039542, Mm_Slc37a4_1_SG QT00124411, Mm_G6pc_1_SG (NM_008061) QT00114625, Mm_G6pc2_1_SG (NM_021331) QT00139461, Mm_G6pc3_1_SG (NM_175935) QT00104748. The relative quantities of target gene mRNA against an internal control, 18S ribosomal RNA, were measured by following a ΔC_T method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (ΔC_T) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of 18S ribosomal RNA were calculated by Iq5 Optical System Software version 2.0 (BIO-RAD, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta C_T}$.

Semi-quantitative RT-PCR analysis : One microgram of total RNA was used for first strand cDNA synthesis followed by specific gene product amplification with the One-Step RT-PCR kit (Invitrogen). Primers used were the same as for the qRT-PCR and were all derived from mouse sequences. GAPDH cDNA amplification was used as an internal house-keeping gene control. PCR conditions were optimized so that the gene products were examined at the exponential phase of their amplification and the products were resolved on 2.2% agarose gels containing 1 µg/ml ethidium bromide.

Transfection method and RNA interference : MSC were transiently transfected with 20 µM siRNA against HIF-1 α (Mm_Hif1a_1 HP siRNA, SI00193011) using HiPerFect (QIAGEN, CA). HIF-1 α -specific gene knockdown was evaluated by qRT-PCR as described above. Small interfering RNA against HIF-1 α and mismatch siRNA were synthesized by QIAGEN and annealed to form duplexes.

Morphological analysis of apoptotic and necrotic cells : To visualize nuclear morphology and chromatin condensation by fluorescence microscopy (18), cells were pretreated for 18 h with chlorogenic acid (CHL), the mumbaistatin analog (AD4-015), or with their respective vehicle (Ethanol or DMSO). Cells were stained with 0.06 mg/ml Hoechst (33258, blue fluorescence) for apoptotic cells or with 50 µg/ml propidium iodide (red fluorescence) for necrotic cells. Observations were made by fluorescence microscopy (Carl Zeiss Ltd, Montreal, QC, Canada) and photographs were taken with a digital camera (camera 3CCD, Sony DXC-950P, Empix Imaging Inc, Mississauga, ON). Images were analyzed by Northern Eclipse software. A minimum of 600 cells was counted per dish.

Electrophoretic Mobility Shift Assays : Fifty ng of sense oligonucleotide was 5'-end-labeled with T4 polynucleotide kinase and [γ -³²P]ATP and annealed with 200 ng of the complementary oligonucleotide. Nuclear extracts from growing MSC-HIF-1 α were prepared according to the method of Dignam *et al.* (28). Nuclear extracts were analyzed by gel shift assays as described previously (29). Thirty µg of nuclear extract were added to 0.8 ng of the labeled double-stranded oligonucleotide, and, after a 20-min incubation at room temperature, the mixture was run on a 6% acrylamide, non-denaturing gel in 0.5 \times TBE, at 150 V for 90 min. The dried gels were autoradiographed on Kodak X-Omat films. For competition assays, a 25-fold excess (20 ng) of cold double-stranded oligonucleotide was added before addition of the nuclear extract. The sense strand sequences of the oligonucleotides used are: HIF-1 α , CCG AGG CTA CGT GCG GCT TCT CTC G; NSC (unrelated sequence), CCA AAC AGG ATA TCT GTA ATA AGC AG.

RESULTS

Murine MSC strongly express the G6PT component of the glucose-6-phosphatase system. In order to confirm expression of the G6PT component in MSC, semi-quantitative RT-PCR was performed using total RNA extracted from mouse MSC, mouse liver, and from mouse pancreas. Measurement of the other 3 components of the G6Pase system: the glucose-6-phosphatase catalytic subunit α (G6PC), the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (G6PC-2), and the glucose-6-phosphatase catalytic subunit β (G6PC-3) was also performed. Compared to liver or pancreas, MSC significantly expressed G6PT. In contrast, G6PC and G6PC-3 were expressed at low to undetectable levels in MSC and pancreas in comparison to liver. As expected, G6PC-2 gene expression was clearly detected in pancreas, while its expression was very low in MSC and undetectable in liver (Fig.1). GAPDH served as an internal loading control and remained constant. In contrast to hepatocytes, which predominantly utilize α -ketoacids as fuel, MSC may presumably heavily depend on G6P for their energy needs.

Cobalt chloride-induced chemical hypoxia and hypoxic culture conditions regulate G6PT gene expression. MSC were serum-starved and cultured under hypoxic conditions (18 hours under 1.2% O₂) or treated with cobalt chloride (CoCl₂), a condition known to mimic hypoxic culture conditions. Total RNA was extracted and qRT-PCR performed as described in the Methods section. We found that hypoxia significantly induced HIF-1 α transcript levels in agreement with previous reports (30, 31), a mechanism that could involve Egr-1 transcriptional regulation of HIF-1 α (31). In support to that assumption, Egr-1 increase at the protein level during hypoxia was documented by us previously in MSC (32). Moreover, VEGF and G6PT gene expression were also induced, while G6PC-3 and membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) remained unchanged (Fig.2A, black bars). Treatment of the cells with CoCl₂ also triggered VEGF and G6PT gene expression, while expression of HIF-1 α , G6PC-3 and MT1-MMP remained unaffected (Fig.2A, grey bars). One can conclude that, in the case of CoCl₂ treatments, it's not the induction of HIF-1 α but the potential blockade of HIF-1 α degradation via prolyl hydroxylation and subsequent interaction with the VHL factor and targeting to proteasomal degradation that may additionally be in play in

G6PT regulation. These observations prompted us to analyze the murine G6PT gene promoter sequence for the presence of any hypoxia responsive elements (HRE) that could regulate its expression under low oxygen tension. We examined a DNA sequence of 1207 bp upstream of the ATG start codon (NCBI source NM_008063.2) and located on mouse chromosome 9 at location 44,205,182-44,211,045 (Fig.2B). A search for putative transcription factor binding sites was performed with PROMO 3.0 (<http://algggen.lsi.upc.es/>) using version 8.3 of the TRANSFAC database. A TATA box as well as several previously reported binding sites were found within the first 200 bp upstream of the ATG and included HNF1, HNF3, and C/EBP binding sites (33). The core consensus sequence of HRE that we searched for was (A/G)CGT(G/C)C and is denoted by asterisks (*) (34). We found one potential binding site for HIF-1, and two for AhR:Arnt (Fig.2B, boxed). This suggests that possible G6PT transcriptional regulation may occur in MSC upon hypoxic culture conditions. Whether HIF-1 α was involved in such G6PT gene regulation was next explored.

Gene silencing of HIF-1 α antagonizes the effects of hypoxia on G6PT gene expression. We used gene silencing strategies to down-regulate HIF-1 α gene expression and to assess its specific contribution to G6PT gene regulation under hypoxic culture conditions. MSC were transiently transfected with scrambled sequences (Mock) or with HIF-1 α siRNA as described in the Methods section. Cells were then cultured under normal or hypoxic culture conditions, total RNA was extracted and qRT-PCR was used to assess HIF-1 α , VEGF, and MT1-MMP gene expression. We found that HIF-1 α gene expression was efficiently reduced in siHIF-1 α -transfected cells (Fig.3A, black bars). VEGF gene expression was also reduced in siHIF-1 α -transfected cells, and the increase in VEGF expression under hypoxia was reduced by ~58% (Fig.3A, black bars). MT1-MMP gene expression in siHIF-1 α -transfected cells remained unaffected. G6PT gene expression was also measured in Mock-transfected (Fig.3B, open circles) and in siHIF-1 α - (closed circles) transfected cells that were subsequently cultured under hypoxic conditions (Fig.3B). While G6PT gene expression was transiently increased by hypoxia with a maximum expression at 10 hours in Mock cells, those cells where HIF-1 α gene expression was abrogated were unable to increase G6PT gene expression. Consequently, expression of HIF-1 α is required for G6PT transcriptional regulation upon hypoxia. Since silencing experiments of HIF-1 α by

themselves do not allow one to prove that HIF-1 α directly binds to the G6PT promoter, approaches such as chromatin immunoprecipitation assays will be needed. Although the cascade of events may still be indirect, we are confident to have experimentally demonstrated that HIF-1 α is a crucial intermediate in the sequence of events that regulate G6PT gene expression.

Constitutive expression of an oxygen-dependent degradation domain HIF-1 α mutant triggers G6PT gene expression. In order to recreate the hypoxic culture conditions that trigger HIF-1 α expression in MSC, we generated a deletion mutant of HIF-1 α (HIF-1 α Δ ODD) and stably transfected MSC as described in the Methods section. We found that MSC constitutively and stably expressing HIF-1 α Δ ODD (MSC-HIF-1 α) exhibited an increased intrinsic ability to migrate (Fig.4A). Such increased migratory potential has been documented previously (32) and, although speculative, may potentially involve autocrine regulation through hypoxia-regulated growth factors expression. This may provide efficient mobilization and adaptative behaviour of MSC to oxygen deprived environment. When total RNA was extracted from MSC or MSC-HIF-1 α , we found that HIF-1 α , VEGF, MT1-MMP, and G6PT gene expression were significantly increased in MSC-HIF-1 α cells (Fig.4B, black bars). In order to confirm that HIF-1 α could potentially directly interact with HRE sequences found within the G6PT promoter, we isolated nuclear extracts from MSC-HIF-1 α and showed that HIF-1 α protein was indeed constitutively present within the nuclear fraction of MSC-HIF-1 α while nuclear poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) expression remained constant (Fig.4C). Electrophoretic mobility assays were also performed in order to demonstrate that nuclear HIF-1 α interacted with radiolabeled oligonucleotides (Mhif-1) containing the HIF-1 α sequence found within the G6PT promoter. Incubation of the MSC-HIF-1 α nuclear extracts with those probes resulted in the formation of 3 complexes termed A, B, and C (Fig.4D, column 1). Complexes B and C binding to the probe was strongly diminished upon competition with a 25-fold excess of a cold unrelated non-specific competitor (NSC), suggesting these were non-specific binding. In contrast, complex A remained intense (Fig.4d, column 2) but completely disappeared with the same excess of the cold HIF-1 α specific competitor (SC) or in the presence of an HIF-1 α blocking antibody (Fig.4D, columns 3 and 4).

A small molecule G6PT inhibitor specifically triggers cell death in MSC constitutively expressing HIF-1 α Δ ODD. Specific targeting of hypoxic cells such as those found within a tumor microenvironment is a difficult task to achieve. Since we have found that hypoxic MSC express high levels of G6PT, we hypothesized that these cells would be sensitive to G6PT inhibitors. We used chlorogenic acid (CHL), a natural product with weak G6PT inhibitory activity (35) and a more potent semi-synthetic polyketide analog (AD4-015) of a different natural product mumbaistatin (36) (Fig.5A). Dose-response curves for G6PT inhibition by AD4-015 in both rat liver microsomal assays as well as hepatocyte assays were reported earlier (36). In the microsomal assay, the IC₅₀ was 2.5 μ M, while in the cell-based assay, inhibition was only observed at 10-fold higher concentrations, a feature that is constant with all known G6PT inhibitors and is presumably a reflection of target access (see discussion in reference 36). Because that cell-based assay more accurately reflects our own MSC assays, we used a concentration of 25 μ M in the current assays. MSC and MSC-HIF-1 α were thus treated with 100 μ M CHL or 25 μ M AD4-015, and cell death assessed. We found that increased Hoechst staining (apoptosis) as well as PI staining (necrosis) was observed in treated MSC-HIF-1 α in comparison to MSC (Fig.5B). Cell death was not significantly induced by CHL, while AD4-015 triggered ~3-times more cell death in MSC-HIF-1 α (Fig.5C). In support to the prosurvival phenotype ascribed to MSC-HIF, their basal levels of phosphor-Akt and phosphor-Erk protein expression were found increased when compared to MSC (Fig.5D). Treatment of the cells with AD4-015 was found to specifically downregulate phosphor-Akt expression levels in MSC-HIF but not in MSC (Fig.5D) suggestive of targeted cell death induction in MSC-HIF. Altogether, these data suggest that small molecule inhibitors of G6PT may show selectivity in targeting hypoxic MSC.

DISCUSSION

Most commonly isolated from the bone marrow, MSC are multipotent adult stem cells with immunomodulatory effects and the ability to home to sites of injury. These properties, clearly useful for therapeutic purposes, may however be used by cancer cells for their own ends. Indeed, as the importance of the microenvironment and stroma to the evolution and progression of solid tumors has been revealed over the past few years, MSC which are the progenitors of stromal cells and fibroblasts have been found to interact with cancer cells (37). In fact, the homing of MSC to tumors is thought to be the earliest phenomenon of MSC-cancer interactions, as was recently reported in a mouse model where injected human MSC could be found preferentially migrating to implanted human melanoma tumors (5). Subsequently, studies have shown MSC homing to tumors and even to sites of metastasis (38). Furthermore, cotransplantation of MSC with melanoma cells in mice enhanced tumor engraftment and growth (39). These data are in agreement with our own observations that vascular progenitors derived from bone marrow stromal cells are recruited by tumors both *in vivo* and *in vitro* (7). Collectively, the sum of this evidence, in line with the increased ability of MSC to migrate under an atmosphere of low oxygen as is seen in the tumor microenvironment (32), suggests that MSC are active participants in the development of solid tumors.

The expression of a number of glycolytic isozymes (*e.g.* PFK-L, ALD-A, ALD-C, PGK-1, ENO-1, and LDH-A) has already been found to be induced by hypoxia in a tissue-specific manner (40, 41). Analysis of the *cis*-acting sequences of these genes has revealed that hypoxia-induced activation requires binding sites for HIF-1. All the above genes, together with G6PT, reflect the adaptative capacity of MSC to oxygen deprivation. Pharmacological targeting of G6PT functions, and hence inducing possible glucose deprivation conditions, should thus be deleterious to the hypoxic cell as denoted by our own data in Fig.5B and Fig.5D where cell death was specifically triggered. In this report, we have undertaken a detailed study to delineate the role of G6PT that could link metabolic and survival adaptation to hypoxia in MSC. Through the generation of an MSC-HIF-1 α stable cell line and through the use of siRNA gene silencing strategies, we also showed that HIF-1 α is involved in the

transcriptional regulation of G6PT. As a consequence, G6PT gene expression was increased by hypoxia supporting a prosurvival role for G6PT. In agreement with this observation, G6PT-deficient neutrophils isolated from GSD-1b mice are characterized by increased rates of apoptosis (42), possibly consequent to increased expression of ER stress-related, glucose-regulated proteins and protein disulfide isomerase (43, 44). These findings are thus in agreement with the ubiquitous expression and prosurvival functions of G6PT that were reported in glioma cells and in MSC (18, 24). Investigation of whether increased G6PT functions could potentially affect the glycolytic phenotype and make hypoxic MSC gluconeogenic must also be considered in the metabolic adaptation phenotype to hypoxia.

Alternate G6PT roles, distinct from its classical involvement in the G6Pase system, include ATP-mediated calcium sequestration in the ER lumen (45), activity as a G6P receptor/sensor (46), and supplying G6P to a ubiquitously expressed luminal glucose-6-phosphate dehydrogenase (47). One or more of these functions may also be responsible for crucial prosurvival processes including tumor cell proliferation, cell cycle division and extracellular matrix degradation. In fact, the observed increases in MSC-HIF of ERK phosphorylation and AKT phosphorylation correlate with the high migratory and prosurvival phenotype observed. Our current study thus supports these functions of the ubiquitously expressed G6PT in non-gluconeogenic tissues. Furthermore, the luminal hexose-6-phosphate dehydrogenase also provides reducing equivalents needed for several important reductases that protect the ER against damage by reactive oxygen species. Lack of protection may result in premature cell death through apoptosis.

In light of the role of G6PT in MSC biology that has been highlighted by our results, selective interference with G6PT functions and/or expression may be an attractive therapeutic approach to metabolic control of cancer cell growth or in preventing circulating cells from being recruited to contribute to tumor development. Indeed, gene silencing of G6PT has already been shown to suppress intracellular signaling that leads to calcium mobilization by sphingosine-1-phosphate (23), a potent bio-active lipid and inducer of MSC mobilization (27). Here, we further demonstrate that small molecule G6PT inhibitor AD4-015 can induce apoptosis and necrosis of hypoxic MSC (MSC-HIF-1 α) and that show high sustained endogenous G6PT gene expression. Noteworthy, treatment of MSC under hypoxic conditions

with AD4-015 did not result in any difference in cell death most probably because G6PT gene expression is transient, peaking at ~8 hours of hypoxia (Fig.3B). We believe that our MSC-HIF-1 α model better reflects the long term metabolic adaptation of the cells to hypoxia and highlights the specific contribution of HIF-1 α on G6PT gene expression. Altogether, this may provide some rationale for a potentially new therapeutic action against hypoxic cells embedded within tumors.

Since studies have so far been limited to a few types of cancers, it is still unknown how MSC interact with other cancers, if at all. Whether the animal models used accurately reflect what actually occurs within the hypoxic tumor setting remains to be established, because most *in vivo* experiments use high numbers of exogenously introduced MSC, an unlikely scenario in the endogenous state. Still, exogenously delivered human MSC were reported to specifically localize to human gliomas after intravascular delivery (6), which raises the possibility that endogenous MSC may be recruited into hypoxic gliomas during tumorigenesis and may contribute to the physiological growth of brain tumors *in situ*. Preliminary data from our own work also provides data demonstrating high G6PT expression within experimental hypoxic brain tumors (data not shown). Furthermore, tumor-derived MSC were recently isolated and characterized as CD133(-) cells, indicating that they were distinct from classic CD133(+) glioma cancer stem cells. These CD133(-)-MSC were more commonly isolated from high grade tumors than from low grade gliomas, supporting the hypothesis that tumor-derived MSC are involved in glioma progression from low to high grade (48). Accordingly, extremely low CD133(-) glioblastomes were found to show mesenchymal subclass-like gene expression profile, which has the worst clinical outcome (49).

In conclusion, our study reveals a potential metabolic adaptation of MSC to hypoxic conditions that enables MSC to survive under conditions characterized by low oxygen levels and glucose deprivation, such as is found within developing tumors. Such metabolic flexibility may, in part, be accounted for by the prosurvival functions of G6PT that would allow these MSC to contribute to tumor development. More importantly, hypoxic MSC that contribute to tumor development may also be selectively targeted by small molecules G6PT

inhibitors such as the semisynthetic polyketide derivative AD4-015, modeled after the natural product mumbaistatin.

ACKNOWLEDGMENTS

BA holds a Canada Research Chair in Molecular Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). This study was funded by a grant from the United States National Institutes of Health to CK (CA 77248), and by a grant of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to BA.

REFERENCES

1. Tso CL, Shintaku P, Chen J, et al. Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. **Mol Cancer Res.** 2006; 4:607-19.
2. Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, et al. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. **Neuro Oncol.** 2005; 7:134-53.
3. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science.** 1997; 276 :71-4.
4. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. The International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy.** 2005; 7:393-5.
5. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. **Cancer Res.** 2002; 62 :3603-8.
6. Nakamizo A, Marini F, Amano T, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. **Cancer Res.** 2005; 65:3307-18. Erratum in: **Cancer Res.** 2006; 66:5975.
7. Annabi B, Naud E, Lee YT, et al. Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors. **J Cell Biochem.** 2004; 91:146-58.
8. Birnbaum T, Roeder J, Schankin CJ, et al. Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. **J Neurooncol.** 2007; 83 :241-7.
9. Mylotte LA, Duffy AM, Murphy M, et al. Metabolic flexibility permits MSC survival in an ischemic environment. **Stem Cells.** 2008; 26:1325-36.
10. Hers HG. Mechanisms of blood glucose homeostasis. **J Inherit Metab Dis.** 1990; 13:395-410.
11. Bartrons R, Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. **J Bioenerg Biomembr.** 2007; 39:223-9.
12. Patiar S, Harris AL. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha as a cancer therapy target. **Endocr Relat Cancer.** 2006; 13 Suppl 1 :S61-75.
13. Du R, Lu KV, Petritsch C, et al. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. **Cancer Cell.** 2008; 13:206-20.
14. Ceradini DJ, Gurtner GC. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. **Trends Cardiovasc Med.** 2005; 15:57-63.

15. Kim SY, Nguyen AD, Gao JL, et al. Bone marrow-derived cells require a functional glucose 6-phosphate transporter for normal myeloid functions. **J Biol Chem.** 2006; 281:28794-801.
16. Yiu WH, Pan CJ, Allamarvdasht M, et al. Glucose-6-phosphate transporter gene therapy corrects metabolic and myeloid abnormalities in glycogen storage disease type Ib mice. **Gene Ther.** 2007; 14:219-26.
17. Belkaid A, Currie JC, Desgagnés J, et al. The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression. **Cancer Cell Int.** 2006; 6:7.
18. Currie JC, Fortier S, Sina A, et al. MT1-MMP down-regulates the glucose 6-phosphate transporter expression in marrow stromal cells: a molecular link between pro-MMP-2 activation, chemotaxis, and cell survival. **J Biol Chem.** 2007; 282:8142-9.
19. Chou JY, Matern D, Mansfield BC, et al. Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase complex. **Curr Mol Med.** 2002; 2:121-43.
20. Chen LY, Shieh JJ, Lin B, et al. Impaired glucose homeostasis, neutrophil trafficking and function in mice lacking the glucose-6-phosphate transporter. **Hum Mol Genet.** 2003; 12 :2547-58.
21. Leuzzi R, Bánhegyi G, Kardon T, et al. Inhibition of microsomal glucose-6-phosphate transport in human neutrophils results in apoptosis: a potential explanation for neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type Ib. **Blood.** 2003; 101:2381-7.
22. Cheung YY, Kim SY, Yiu WH, et al. Impaired neutrophil activity and increased susceptibility to bacterial infection in mice lacking glucose-6-phosphatase-beta. **J Clin Invest.** 2007; 117 :784-93.
23. Fortier S, Labelle D, Sina A, et al. Silencing of the MT1-MMP/ G6PT axis suppresses calcium mobilization by sphingosine-1-phosphate in glioblastoma cells. **FEBS Lett.** 2008; 582:799-804.
24. Belkaid A, Copland IB, Massillon D, et al. Silencing of the human microsomal glucose-6-phosphate translocase induces glioma cell death: potential new anticancer target for curcumin. **FEBS Lett.** 2006; 580:3746-52.
25. Belkaid A, Fortier S, Cao J, et al. Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new “bioswitch” function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. **Neoplasia.** 2007; 9 :332-40.
26. van de Werve G, Lange A, Newgard C, et al. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. **Eur J Biochem.** 2000; 267 :1533-49.
27. Meriane M, Duhamel S, Lejeune L, et al. Cooperation of matrix metalloproteinases with the RhoA/Rho kinase and mitogen-activated protein kinase kinase-1/extracellular signal-

- regulated kinase signaling pathways is required for the sphingosine-1-phosphate-induced mobilization of marrow-derived stromal cells. **Stem Cells**. 2006; 24:2557-65.
28. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. **Nucleic Acids Res**. 1983; 11:1475-89.
 29. Benson BA, Butler YX, Ackerman M, et al. A kinase/phosphatase system involving the protooncogene Lck is necessary for inducible modulation of Sob 1 during T cell activation. **Cell Immunol**. 1996; 170:245-50.
 30. Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, et al. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. **Mol Biol Cell**. 2007; 18:4691-7.
 31. Sperandio S, Fortin J, Sasik R, et al. The transcription factor Egr1 regulates the HIF-1alpha gene during hypoxia. **Mol Carcinog**. 2008 (in press)
 32. Annabi B, Lee YT, Turcotte S, et al. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. **Stem Cells**. 2003; 21:337-47.
 33. Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, et al. A molecular link between the common phenotypes of type 1 glycogen storage disease and HNF1alpha-null mice. **J Biol Chem**. 2001; 276 :7963-7.
 34. Kimura H, Weisz A, Ogura T, et al. Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. **J. Biol. Chem**. 2001; 276:2292-8.
 35. Hemmerle H, Burger HJ, Below P, et al. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. **J Med Chem**. 1997; 40:137-45.
 36. Lee TS, Das A, Khosla C. Structure-activity relationships of semisynthetic mumbaistatin analogs. **Bioorg Med Chem**. 2007; 15:5207-18.
 37. Yen BL, Yen ML. Mesenchymal Stem Cells and Cancer — for Better or for Worse? **Journal of Cancer Molecules** 2008; 4:5-9.
 38. Dwyer RM, Potter-Beirne SM, Harrington KA, et al. Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. **Clin Cancer Res**. 2007; 13 :5020-7.
 39. Djouad F, Ponce P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. **Blood**. 2003; 102:3837-44.
 40. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, et al. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. **J. Biol. Chem**. 1994; 269:23757-63.

41. Ebert BL, Gleadle JM, O'rouke JF, et al. Isoenzyme-specific regulation of genes involved in energy metabolism by hypoxia: similarities with the regulation of erythropoietin. **Biochem. J.** 1996; 313:809–14.
42. Kuijpers TW, Maianski NA, Tool AT, et al. Apoptotic neutrophils in the circulation of patients with glycogen storage disease type 1b (GSD1b). **Blood.** 2003; 101:5021-4.
43. Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. **Trends Biochem Sci.** 2001; 26:504-10.
44. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. **Annu Rev Biochem.** 2005; 74 :739-89.
45. Chen PY, Csutora P, Veyna-Burke NA, et al. Glucose-6-phosphate and Ca²⁺ sequestration are mutually enhanced in microsomes from liver, brain, and heart. **Diabetes.** 1998; 47:874-81.
46. Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, et al. Inactivation of the glucose 6-phosphate transporter causes glycogen storage disease type 1b. **J Biol Chem.** 1999; 274:5532-6.
47. van Schaftingen E, Gerin I. The glucose-6-phosphatase system. **Biochem J.** 2002; 362:513-32.
48. Lang FF, Amano T, Hata N, et al. Tumor-derived mesenchymal stem cells in human gliomas: Isolation and biological effects. Proceedings from the 2008 Annual AACR meeting, San Diego, USA
49. Joo KM, Kim SY, Kim MH, et al. CD133-negative glioblastoma cancer stem cells represent the 'mesenchymal' subclass of glioblastoma. Proceedings from the 2008 Annual AACR meeting, San Diego, USA
50. Messeguer X, Escudero R, Farré D, et al. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. **Bioinformatics.** 2002; 18:333-4.
51. Farré D, Roset R, Huerta M, et al. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. **Nucleic Acids Res.** 2003; 31:3651-3.

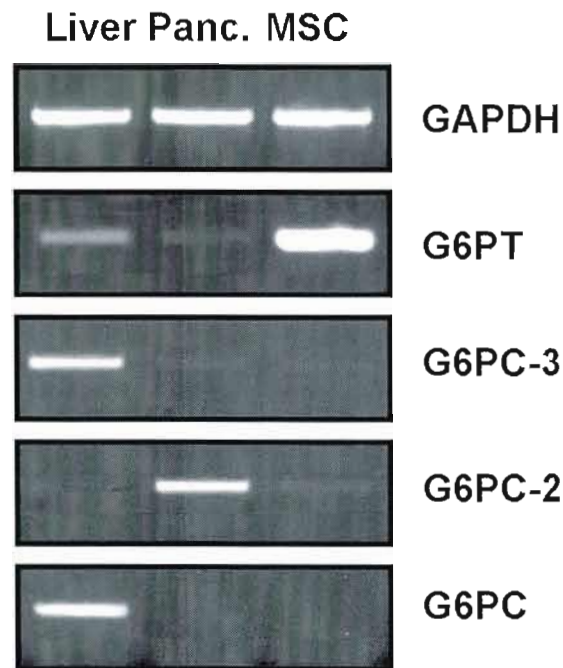
Fig.1

Fig.1: Murine MSC strongly express the G6PT component of the glucose-6-phosphatase system. Total RNA was extracted from mouse MSC, mouse liver, and from mouse pancreas as described in the Methods section. cDNA synthesis and semi-quantitative RT-PCR were performed to assess gene expression of the glucose-6-phosphate transporter (G6PT), the glucose-6-phosphatase catalytic subunit α (G6PC), the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (G6PC-2), and the glucose-6-phosphatase catalytic subunit β (G6PC-3).

Fig.2

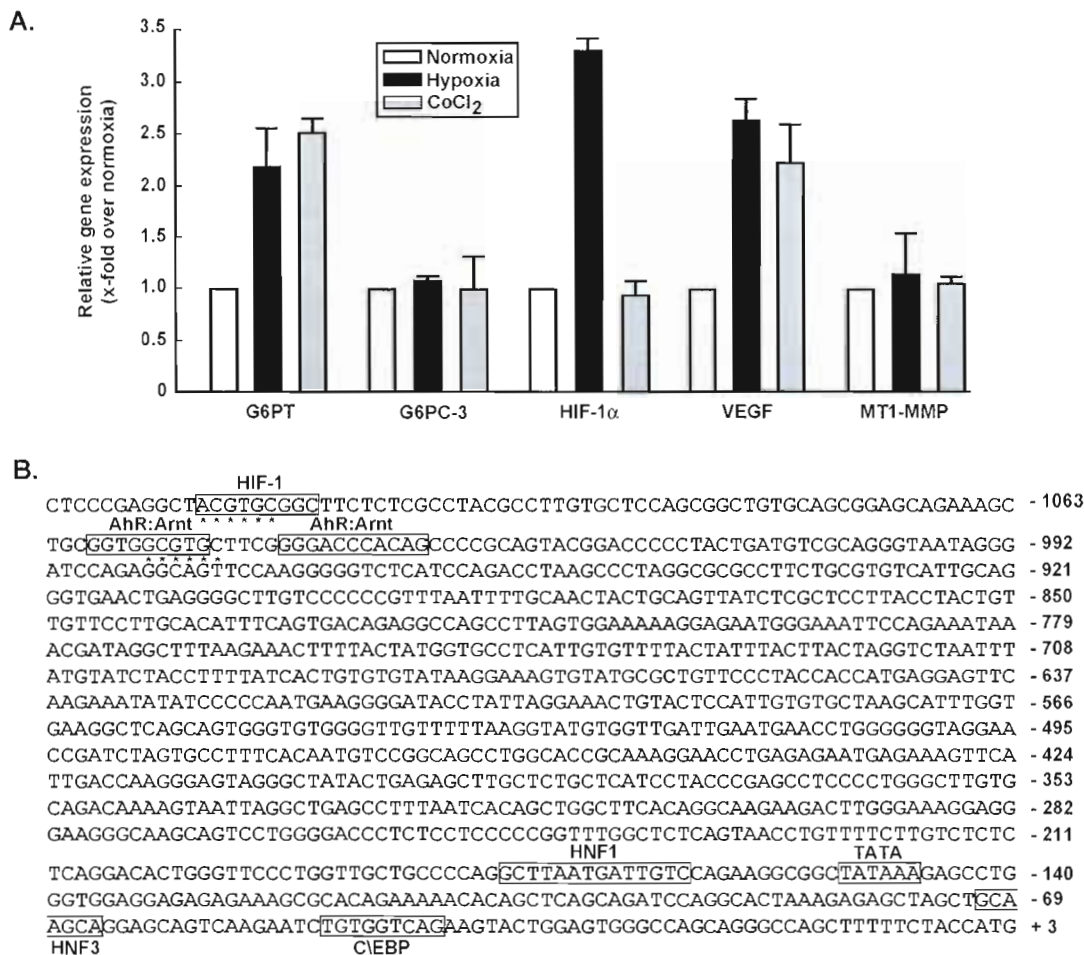


Fig.2: Cobalt chloride-induced chemical hypoxia and hypoxic culture conditions regulate G6PT gene expression. (A) Sub-confluent MSC were serum-starved and cultured under normoxic (5% CO₂ and 95% air; white box), or hypoxic (1% O₂, 5% CO₂, and 94% N₂; black box) conditions, or treated with 100 μ M CoCl₂ (grey box) for 18 hours. Total RNA was extracted and qRT-PCR performed in order to assess the G6PT, G6PC-3 HIF-1 α , VEGF, and MT1-MMP gene expression levels. (B) A 1133 bp sequence upstream of the ATG coding sequence of the murine G6PT gene promoter sequence was analyzed (NCBI source NM_008063.2), and located on mouse chromosome 9 at location 44,205,182-44,211,045. The core consensus sequence of the hypoxia responsive elements (A_nG)CGT(G_nC)C is denoted by asterisks (*, 50, 51). Sequences of a TATA box (-152/-147) and potential binding sites for HIF-1 (-1122/-1114), AhR:Arnt (-1059/-1051 and -1045/-1035), HNF1 (-177/-164), HNF3 (-71/-65), and C/EBP (-48/-40) are boxed.

Fig.3

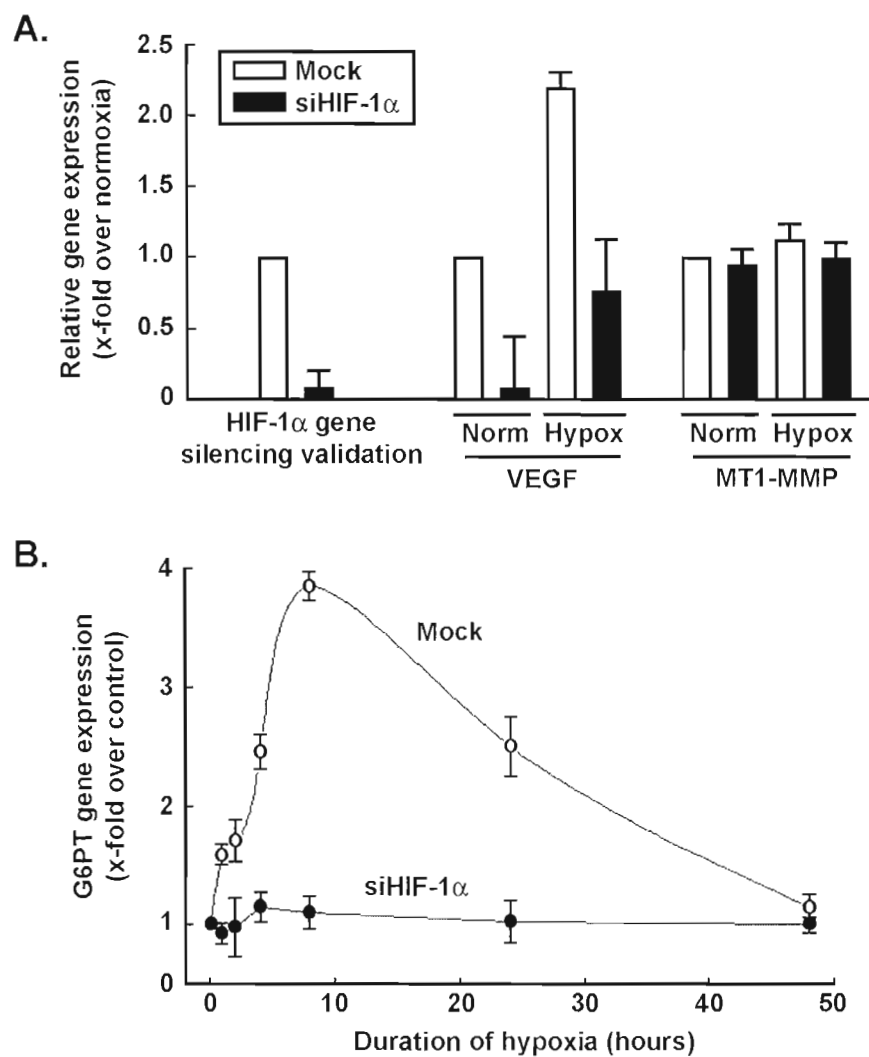


Fig.3: Gene silencing of HIF-1 α antagonizes the effects of hypoxia on G6PT gene expression. (A) MSC were transiently transfected with scrambled sequences (Mock, white bars) or HIF-1 α siRNA (black bars) as described in the Methods section. Cells were then cultured under normal or hypoxic culture conditions, total RNA was extracted and qRT-PCR was used to assess HIF-1 α , VEGF, and MT1-MMP gene expression as described in Fig.2. (B) G6PT gene expression was assessed by qRT-PCR in Mock-transfected (open circles) and in siHIF-1 α - (closed circles) transfected cells that were subsequently cultured under hypoxic conditions.

Fig.4

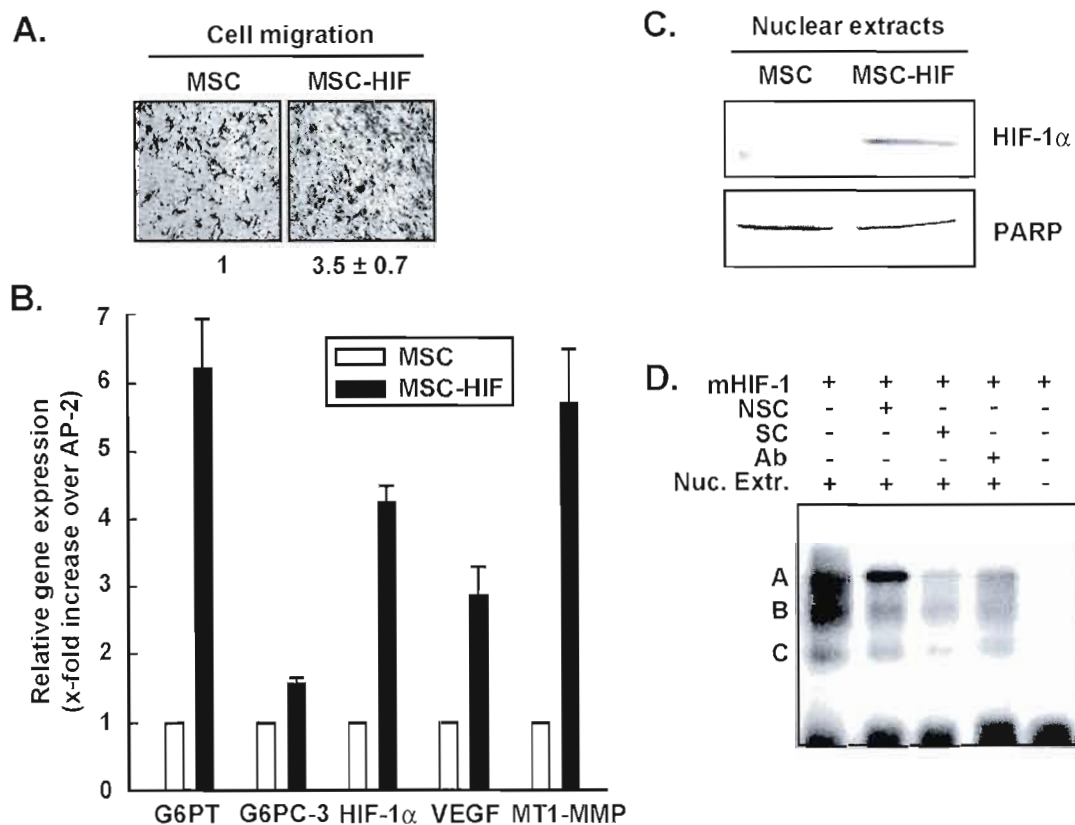


Fig.4: **Constitutive expression of an oxygen-dependent degradation domain HIF-1 α mutant triggers G6PT gene expression.** (A) Basal migration of MSC and MSC stably expressing a deletion mutant of HIF-1 α (HIF-1 α Δ ODD, MSC-HIF) was performed as described in the Methods section. (B) Total RNA was extracted from MSC (white bars) and MSC-HIF (black bars), and qRT-PCR performed to assess the gene expression levels of G6PT, G6PC-3, VEGF, HIF-1 α , and MT1-MMP. (C) Nuclear extracts were isolated from MSC and MSC-HIF and Western blotting performed to detect nuclear HIF-1 α or nuclear poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) expression. (D) Electrophoretic mobility assays were performed as described in the Methods section using nuclear extracts (Nuc. Extr.) isolated from MSC-HIF. NSC, cold unrelated non-specific competitor; SC, cold HIF-1 α specific competitor; Ab, HIF-1 α (1 μ g) blocking antibody.

Fig.5

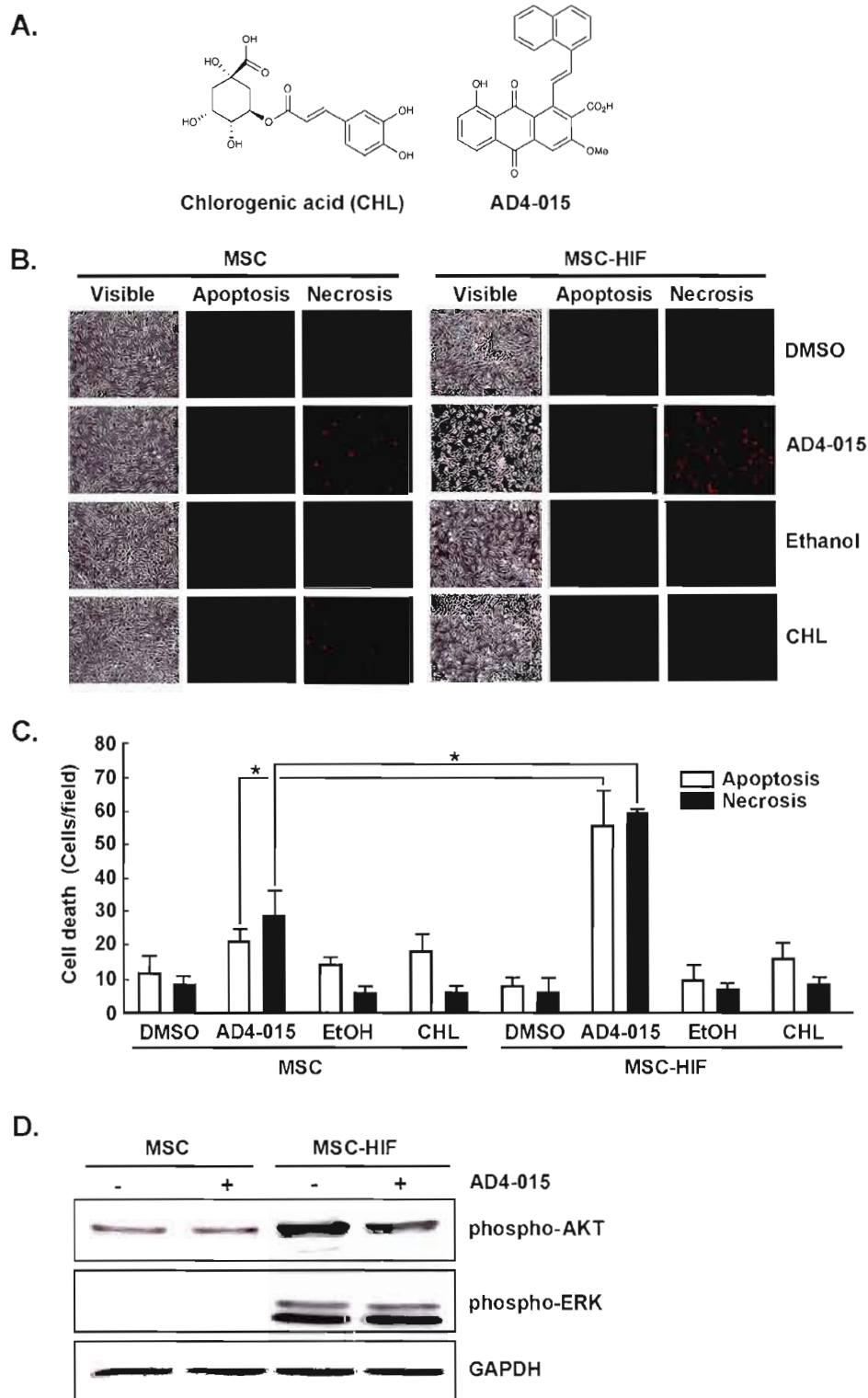


Fig.5 : The mumbaistatin analog and potent G6PT inhibitor AD4-015 specifically triggers cell death in MSC constitutively expressing HIF-1 α Δ ODD. (A) Chemical structures of chlorogenic acid (CHL) and mumbaistatin analog (AD4-015). (B) MSC or MSC-HIF were cultured under normoxic conditions then treated for 18 hrs with 25 μ M AD4-015 (or respective DMSO vehicle), or with 100 μ M CHL (or respective EtOH vehicle). Hoechst (apoptosis) and propidium iodide (necrosis/late apoptosis) cell labelling was then performed and visualised using fluorescence microscopy. (C) Quantification was performed by visual counting. The mean of 4 fields from 3 independent experiments is shown. Probability values of less than 0.05 were considered significant, and an asterisk (*) identifies such significance. (D) MSC and MSC-HIF were treated with AD4-015 as in (B) and lysates isolated. SDS-PAGE followed by immunodetection of phospho-Erk, phospho-Akt, or GAPDH was performed as described in the Methods section.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La plasticité métabolique des MSC fait d'elles d'excellents candidats pour de futures utilisations thérapeutiques. Paradoxalement, cette propriété pourrait également être exploitée par les cellules cancéreuses à leur propre fin. En effet, les MSC peuvent interagir directement avec les cellules cancéreuses (Yen et Yen, 2008). De plus, certaines études ont démontré que les MSC posséderaient la capacité de migrer jusqu'au site tumoral et même aux sites des métastases (Dwyer et al., 2007). Ces observations corrélerent bien avec nos résultats précédents où les MSC provenant de la moelle osseuse sont recrutées par les tumeurs *in vivo* et *in vitro* (Annabi et al., 2004). L'ensemble de ces résultats, en plus de la capacité des MSC à migrer dans un environnement faible en oxygène, tel que présent dans un microenvironnement tumoral, suggère que les MSC sont des participants actifs au développement des tumeurs solides.

Précédemment, nous avons mentionné que l'expression de plusieurs enzymes impliqués dans le métabolisme glucidique était augmentée en condition hypoxique (Semenza et al., 1994; Ebert et al., 1996). De plus, l'analyse de leurs séquences promotrices démontre l'existence de sites de liaison pour HIF-1. Comme l'ensemble de ces gènes, l'augmentation de la régulation de G6PT démontre bien la capacité des MSC à s'adapter à des conditions pauvres en oxygène. Cibler la fonction de G6PT via une approche pharmacologique provoquerait donc une situation similaire où il y aurait diminution de la disponibilité de glucose dans l'environnement, ce qui serait fatal pour des cellules qui sont en mode réponse à l'hypoxie puisqu'elles auraient déjà subi un changement au niveau de leur métabolisme énergétique tel que mentionné auparavant. En effet, nos résultats démontrent bien ce phénomène en Figure 5B et 5C du chapitre 3, où les cellules en conditions « pseudo hypoxiques » sont spécifiquement ciblées par le traitement avec un inhibiteur de G6PT (AD4-015 – analogue de la mumbaïstatine) et où la nécrose et l'apoptose sont induites. Toutefois, aucun résultat ne démontre une relation directe entre le niveau de glucose disponible, l'activité de G6PT et la prolifération des MSC. Par ailleurs, nous avons également démontré grâce à un modèle de MSC exprimant constitutivement HIF-1 α , ainsi qu'à l'aide

d'ARN interférant, que G6PT était régulé par HIF-1 α . Le fait que G6PT soit régulé à la hausse en conditions hypoxiques renforce donc la fonction pro-survie de G6PT, qui fut rapportée dans les glioblastomes (Belkaid et al., 2006) et les MSC (Currie et al., 2007).

La protéine G6PT possède plusieurs nouveaux rôles indépendants de ses fonctions classiques dans le système G6Pase, telle la séquestration ATP-dépendante du calcium à l'intérieur du RE (Chen et al., 1998), son action en tant que récepteur/senseur au G6P (Hiraiwa et al., 1999), ainsi que son action permettant de fournir le G6P nécessaire à la glucose-6-phosphate déshydrogénase luminale (van Schaftingen et Gerin, 2002). L'ensemble de ces rôles pourrait être responsable des divers processus pro-survie impliqués lors de la prolifération, la division cellulaire, et la dégradation de la matrice extracellulaire. En fait, l'augmentation de la phosphorylation de ERK et de AKT, observée dans nos cellules MSC-HIF-1 α concorde bien avec le fort potentiel migratoire ainsi que le phénotype pro-survie retrouvés dans la littérature ainsi que dans nos résultats antérieurs. Par ailleurs, nous avons démontré que ce phénotype propre aux cellules MSC-HIF-1 α corrèle avec une expression accrue de G6PT de façon endogène. Une inhibition de la protection conférée à ce type cellulaire pourrait donc se traduire par une mort prématurée des cellules. De plus, une analyse plus exhaustive du potentiel migratoire des MSC-HIF-1 α serait nécessaire, en présence de milieu conditionné de cellules cancéreuses tout en bloquant l'expression ou l'activité de G6PT, ceci pourrait donc nous renseigner sur la contribution de G6PT lors de la mobilisation des MSC en situation « pseudo tumorale ».

En observant bien les rôles connexes de G6PT dans la biologie des MSC qui furent d'ailleurs démontrés dans nos résultats, une inhibition sélective de l'expression ou de la fonction de G6PT pourrait ainsi justifier une action thérapeutique ciblant le contrôle métabolique de la croissance tumorale et dans la prévention du recrutement des MSC au foyer tumoral. Par ailleurs, il fut préalablement démontré qu'il était possible en inhibant l'expression de G6PT de supprimer la mobilisation de calcium intracellulaire par la sphingosine-1-phosphate (Fortier et al., 2008), un lipide bioactif présent dans le processus de mobilisation des MSC (Meriane et al., 2006). Spécifiquement, nous démontrons que l'inhibition de la fonction de G6PT par un dérivé de la mumbaïstatine (AD4-015) permettrait ainsi de cibler préférentiellement la mort des cellules possédant un niveau de G6PT élevé,

soit les MSC-HIF-1 α qui sont constamment en mode pro-survie. Ce type de modèle représente bien une adaptation à long terme des MSC à l'hypoxie, ce qui nous permet ainsi de souligner la contribution de HIF-1 α à l'expression génique de G6PT.

Puisque l'ensemble des études concernant la contribution des MSC au développement tumoral est limité, il est encore difficile d'expliquer comment les MSC interagissent avec les cellules cancéreuses et leur microenvironnement hypoxique. La mobilisation des cellules souches au foyer tumoral est toutefois bien réelle et fut clairement démontrée *in vivo* par un groupe de recherche qui observa la localisation spécifique des MSC injectées par voie intravasculaire au site d'implantation cérébrale des glioblastomes (Nakamizo et al., 2006). Ces observations renforcent ainsi le dogme de notre étude comme quoi il y aurait recrutement des MSC de façon endogène au site de développement tumoral et qu'elles pourraient ainsi participer directement au développement du cancer. Finalement, récemment une population de MSC dérivant d'une tumeur cérébrale fut isolée et caractérisée comme étant CD133(-), les MSC seraient donc une population cellulaire à part entière, différente des CSC CD133(+) retrouvées dans les glioblastomes (Lang et al., 2008). Ce postulat fut d'ailleurs confirmé par un second groupe qui caractérisa une population de cellules CD133(-) de glioblastomes et où ce type de cellule s'apparentait plus particulièrement au profil génétique de cellules mésenchymateuses (Joo et al., 2008).

D'autre part, les MSC sont également considérées en tant qu'outil très prometteur dans les approches de thérapies géniques, puisqu'elles possèdent une grande plasticité métabolique. En effet, les MSC ont un potentiel ostéogénique propre à leur phénotype ce qui fait d'elles un candidat idéal pour être recrutées lors de la formation de métastases osseuses. Certains chercheurs ont évalué la possibilité d'utiliser des MSC de souris *in vivo* pour libérer un antagoniste de l'urokinase activatrice du plasminogène (hATF) et ainsi inhiber la progression métastatique du cancer de la prostate dans les os, en plus de réparer les lésions osseuses (Fritz et al., 2008). Le plasminogène circule librement dans l'organisme sous forme zymogène et, lorsqu'il est clivé par une urokinase ou un activateur tissulaire du plasminogène, il se transforme en plasmine, une protéase à sérine (Myata et al., 1982). Leurs analyses démontrèrent une diminution de l'angiogénèse tumorale en plus d'une protection contre la dégradation osseuse dans les souris injectées avec les MSC-hATF (Fritz et al.,

2008). Ces recherches illustrent bien tout le potentiel thérapeutique anticancer de l'utilisation de MSC pour transporter différents types de molécules actives au site désiré. Il serait très intéressant d'observer le pourcentage d'efficacité de ces mêmes MSC-hATF surexprimant toutefois le gène de G6PT, la survie ainsi que la mobilité conférée aux MSC par G6PT pourraient ainsi optimiser leur usage en thérapie.

Puisque la protéine G6PT semble réguler beaucoup plus que le simple transport de G6P à l'intérieur du RE, l'utilisation de molécules inhibant soit la fonction ou l'expression de G6PT pourrait s'appliquer à plusieurs autres cibles. Afin d'approfondir les fonctions potentielles de G6PT, nous avons décidé d'observer l'impact d'un inhibiteur de G6PT sur l'angiogenèse tumorale. Il a été préalablement démontré que l'inhibition de l'angiogenèse tumorale est une stratégie efficace pour le traitement de glioblastomes (Tuettenberg et al., 2006). Donc pour approfondir nos recherches sur ce sujet, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de cellules endothéliales soit les HBMEC, des cellules endothéliales cérébrales qui permettent la formation de vaisseaux sanguins dans le processus angiogénique du développement de tumeurs cérébrales. Par la suite, nous avons évalué la formation de microtubule ou la tubulogenèse des cellules HBMEC en présence de l'inhibiteur de G6PT lors de deux expériences préliminaires. Premièrement, nous avons traité les cellules HBMEC que l'on avait préalablement ensemencées sur du matrigel, une substance mimant la matrice extracellulaire et sa composition chimique, avec des doses croissantes de l'inhibiteur de G6PT, et nous avons observé la formation de tubules. Nous avons découvert que l'inhibition de G6PT antagonisait la tubulogenèse de façon dose dépendante avec un IC_{50} approximatif de $7,67 \mu M$ (Figure 8). Pour confirmer que l'on assistait bien à un effet dû à la perte de fonction de G6PT nous avons utilisé la technologie de l'ARN interférant contre le gène de G6PT et avons répété l'expérience de tubulogenèse, encore une fois la formation de tubule par les HBMEC fut inhibée (Figure 9). La signalisation intracellulaire de ce processus reste néanmoins à être élucidée, toutefois l'effet est bien réel et on peut maintenant postuler que G6PT pourrait servir de cible thérapeutique contre le développement tumoral sous plusieurs angles, soit le recrutement des MSC, la survie des cellules cancéreuses et l'angiogenèse.

Pour terminer, une approche *in vivo* de la problématique du recrutement des MSC au foyer tumoral serait intéressante à envisager. En effet, l'injection intravasculaire des cellules

MSC-HIF-1 α qui expriment un fluorophore, dans des souris préalablement implantées avec des glioblastomes, nous permettrait grâce à un système d'imagerie, de les retracer et ainsi de corrélérer le niveau d'expression de G6PT à la mobilisation cellulaire *in vivo*, en plus d'évaluer l'impact de différents traitements anticancers sur ces cellules pro-survie. Toutefois, la même expérience mais faite cette fois-ci avec des MSC transfectées stablement avec un plasmide codant pour G6PT nous renseignerait davantage sur l'impact de G6PT, puisque les MSC-HIF-1 α expriment plusieurs autres gènes de survie. Ultimement, l'injection locale d'un inhibiteur de G6PT dans des souris implantées avec des glioblastomes, pourrait également nous renseigner sur l'incidence du développement tumoral, lorsque les fonctions de G6PT sont inhibées chez les cellules ciblées.

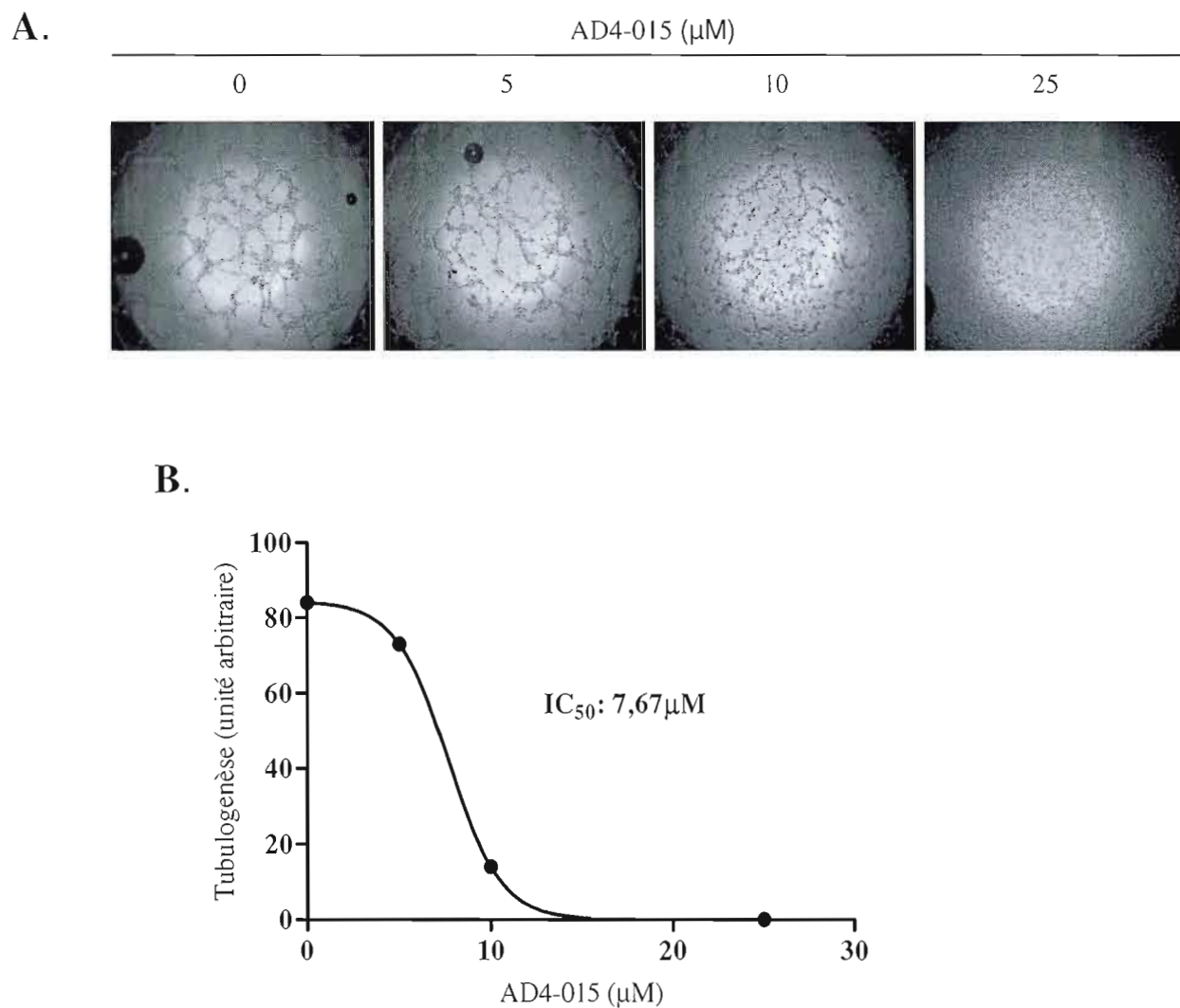
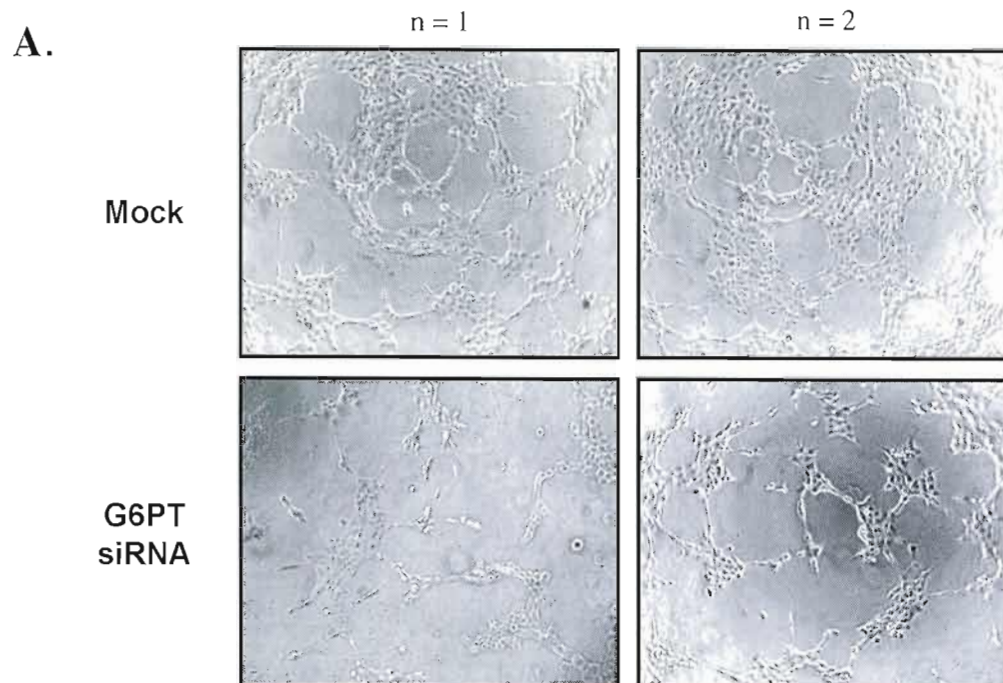


Figure 8 : Inhibition dose-dépendante de la tubulogènèse des HBMEC sur matrigel par le traitement des cellules avec un analogue de la mumbaïstatine ($n = 1$).



B.

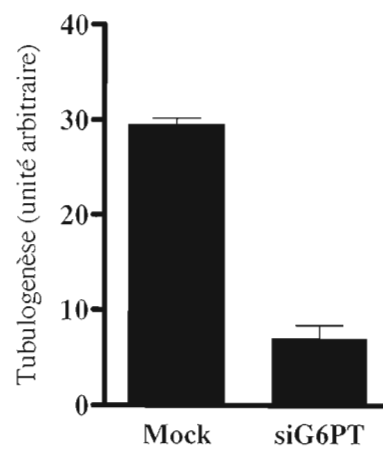


Figure 9 : Inhibition de la formation de tubules par les HBMEC sur matrigel via l'utilisation d'un ARN interférant contre G6PT.

CONCLUSION

Nous avons donc démontré qu'il est possible de moduler l'expression génique de G6PT via la stabilisation de la protéine HIF-1 α . De plus, nous avons documenté que les cellules souches mésenchymateuses exprimant constitutivement HIF-1 α , ont un potentiel migratoire ainsi qu'un indice de survie supérieurs. Nos résultats suggèrent donc un axe de régulation métabolique de G6PT dépendant de HIF-1 α . Cet axe contribuerait à la flexibilité métabolique caractérisant les MSC et leur permettant ainsi de survivre dans des conditions telles l'ischémie ou le développement tumoral, caractérisées par l'hypoxie et la privation en nutriments.

Les recherches entourant les cellules souches se multiplient et différentes approches thérapeutiques semblent émerger de ces observations. De la régénération tissulaire en passant par le transport de molécules actives, le potentiel des cellules souches est infini. Trouver une façon de contrôler l'ensemble de ces possibilités thérapeutiques, sera le prochain défi des générations futures. Par ailleurs, les études poursuivies par l'équipe du Dr Annabi sur les fonctions possibles de G6PT dans la modulation de la survie ainsi que de la mobilisation cellulaire redéfiniront inévitablement les rôles qui lui sont associés. Pour finir, il est nécessaire de poursuivre et de diversifier l'ensemble de nos recherches sur ces deux sujets afin de mieux comprendre le développement tumoral et ainsi mettre au point une thérapie efficace contre le cancer.

RÉFÉRENCES

- Airley R.E. et Mobasher A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy*. 2007. 53(4):233-56.
- Albini A. et Sporn MB, The tumeur microenvironnement as a target for chemoprevention. *Nat. Rev Cancer*. 2007. 7:139-47.
- Annabi B., Hiraiwa H., Mansfield B.C., Lei K.J., Ubagai T., Polymeropoulos M.H., Moses S. W., Parvari R., Hershkovitz E., Mandel H., Fryman M., Chou J.Y. The gene for glycogen-storage disease type 1b maps to chromosome 11q23. *Am J Hum Genet*. 1998. 62(2): 400-5.
- Annabi B., Naud E, Lee YT. Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors. *J Cell Biochem*. 2004. 91:1146-58.
- Appelhoff R.J., Tian Y.M., Raval R.R., Turley H., Harris A.L., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Gleadle J.M. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J. Biol. Chem*. 2004. 279:38458-65.
- Ashara T., Murohara T., Sullivan A. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997. 275:964-67.
- Belkaid A., Copland I.B., Massillon D., Annabi B. Silencing of the human microsomal glucose-6-phosphate translocase induces glioma cell death: potential new anticancer target for curcumin. *FEBS Lett*. 2006a. 580:3746-52.
- Belkaid A., Currie J.C., Desgagnés J., Annabi B. The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression. *Cancer Cell Int*. 2006b. 6:7.
- Belkaid A., Fortier S., Cao J., Annabi B. Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. *Neoplasia*. 2007. 9:332-40.
- Berra E., Benizri E., Ginouves A., Volmat V., Roux D., Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steadystate levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J*. 2003. 22:4082-90.

- Bhatia M., Wang J.C., Kapp U., Bonnet D., Dick J.E. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci.* 1997. 94(10):5320-5.
- Bongso A. et Lee E.H. *Stem Cells : From Bench to Bedside.* World Scientific Publishing. 2005. National University of Singapore.
- Carmeliet P., et Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000. 407:249-57.
- Carroll V.A. et Ashcroft M. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Rev Mol Med.* 2005. 7(6):1-16.
- Ceradini D.J. et Gurtner G.C. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med.* 2005. 15:57-63.
- Chen P.Y., Csutora P., Veyna-Burke N.A. Glucose-6-phosphate and Ca²⁺ sequestration are mutually enhanced in microsomes from liver, brain, and heart. *Diabetes.* 1998. 47:874-81.
- Chen L.Y., Shieh J.J., Lin B. Impaired glucose homeostasis, neutrophil trafficking and function in mice lacking the glucose-6-phosphate transporter. *Hum Mol Genet.* 2003. 12:2547-58.
- Chou J.Y., Matern D., Mansfield B.C., Chen Y.-T. Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase complex. *Curr. Mol. Med.* 2002. 2:121-43.
- Chou J.Y. et Mansfield B.C. Gene therapy for type I glycogen storage disease. *Curr. Gene Ther.* 2007. 7(2):79-88.
- Chou J.Y., Mansfield, B.C. Glucose-6-phosphate transporter: the key to glycogen storage disease type Ib. Edition Kluwer Academic/Plenum. 2003. 191-205.
- Currie J.C., Fortier S., Sina A., Galipeau J., Cao J., Annabi B. MT1-MMP downregulates the glucose 6-phosphate transporter expression in marrow stromal cells: a molecular link between pro-MMP-2 activation, chemotaxis, and cell survival. *J Biol Chem.* 2007. 282:8142-9.
- Dvorakova J., Hrubá A., Velebný V., Kubala L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. *Cell Biol Int.* 2008.
- Dwyer R.M., Potter-Beirne S.M., Harrington K.A. Monocyte chemoattractant protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res.* 2007. 13:5020-7.
- Dykstra B. Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell Stem Cell.* 2007. 1(2): 218-29.

- Ebert B.L., Gleadle J.M., O'rourke J.F. Isoenzyme-specific regulation of genes involved in energy metabolism by hypoxia: similarities with the regulation of erythropoietin. *Biochem. J.* 1996. 313:809-14.
- Eckfeldt C.E., Mendenhall E.M., Verfaillie C.M. The Molecular Repertoire of the 'Almighty' Stem Cell. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2005. 6:726-37.
- Fortier S., Labelle D., Sina A., Moreau R., Annabi B. Silencing of the MT1-MMP/ G6PT axis suppresses calcium mobilization by sphingosine-1-phosphate in glioblastoma cells. *FEBS Lett.* 2008. 582:799-804.
- Foster J.D. et Nordlie R.C. The biochemistry and molecular biology of the glucose-6-phosphatase system. *Exp Biol. Med.* 2002. 227:601.
- Fox J.M., Chamberlain G., Ashton B.A., Middleton J., Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br.J. Haematol.* 2007. 137:491-502.
- Fritz V., Noël D., Bouquet C., Opolon P., Voide R., Apparailly F., Louis-Pence P., Bouffi C., Drissi H., Xie C., Perricaudet M., Müller R., Schwarz E., Jorgensen C. Antitumoral activity and osteogenic potential of mesenchymal stem cells expressing the urokinase-type plasminogen antagonist amino-terminal fragment in a murine model of osteolytic tumor. *Stem Cells.* 2008. 26(11):2981-90.
- Fukuda R., Zhang H., Kim J.W., Shimoda L., Dang C.V., Semenza G.L. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell.* 2007. 129:111-22.
- Gehling U.M., Ergun S., Schumacher U. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000. 95:3106-12.
- Gregory C.A., Prockop D.J., Spees J.L. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp. Cell Res.* 2005. 306:330-5.
- Hanahan D. et Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000. 100:57-70.
- Haspel R.L. et Miller K.B. Hematopoietic stem cells: source matters. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2008. 3(4):229-36.
- Herling A.W., Burger H., Schubert G., Hemmerle H., Schaefer H., Kramer W. Alterations of carbohydrate and lipid intermediary metabolism during inhibition of glucose-6-phosphatase in rats. *Eur J Pharmacol.* 1999. 386(1):75-82.
- Hickey M.M. et Simon M.C. Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Curr Top Dev Biol.* 2006. 76:217-57.
- Hiraiwa H., Pan C.J., Lin B. Inactivation of the glucose 6-phosphate transporter causes glycogen storage disease type 1b. *J Biol Chem.* 1999. 274:5532-6.

- Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M. The International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005. 7:393-5.
- Iliopoulos O., Levy A.P., Jiang C., Kaelin W.G.Jr., Goldberg M.A. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996. 93:10595-99.
- Iyer N.V., Kotch L.E., Agani F., Leung S.W., Laughner E., Wenger R.H., Gassmann M., Gearhart J.D., Lawler A.M., Yu A.Y., Semenza G.L. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 1998. 12:149-62.
- Jewell U.R., Kvietikova I., Scheid A., Bauer C., Wenger R.H., Gassmann M. Induction of HIF 1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* 2001. 15:1312-14.
- Jiang B.H., Semenza G.L., Bauer C., Marti H.H. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol.* 1996. 271:1172-80.
- Joo K.M., Kim S.Y., Jin X., Song S.Y., Kong D.S., Lee J.I., Jeon J.W., Kim M.H., Kang B.G., Jung Y., Jin J., Hong S.C., Park W.Y., Lee D.S., Kim H., Nam D. H. Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab Invest.* 2008. 88(8): 808-15.
- Joo K.M., Kim S.Y., Kim M.H. CD133-negative glioblastoma cancer stem cells represent the 'mesenchymal' subclass of glioblastoma. Proceedings from the 2008 Annual AACR meeting, San Diego, USA.
- Kaur B., Khwaja F.W., Severson E.A., Matheny S.L., Brat D.J., Van Meir E.G. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol.* 2005. 7:134-53.
- Kim J.W., Tchernyshyov I., Semenza G.L., Dang C.V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006a. 3:177-85.
- Kim S.Y., Nguyen A.D., Gao J.-L., Murphy P.M., Mansfield B.C., Chou J.Y. Bone-marrow derived cells require a functional glucose-6-phosphate transporter for normal myeloid functions. *J. Biol. Chem.* 2006b. 281:28794-801.
- Kramer W., Burger H. J., Arion W. J., Corsiero D., Girbig F., Weyland C., Hemmerle H., Petry S., Habermann P., Herling A. Identification of protein components of the microsomal glucose 6-phosphate transporter by photoaffinity labelling. *Biochem J.* 1999. 339(Pt 3): 629-38.
- Lang F.F., Amano T., Hata N. Tumor-derived mesenchymal stem cells in human gliomas: Isolation and biological effects. Proceedings from the 2008 Annual AACR meeting, San Diego, USA.

- Lee T.S., Das A., Khosla C. Structure-activity relationships of semisynthetic mumbaistatin analogs. *Bioorg Med Chem.* 2007. 1;15(15):5207-18.
- Lin B., Annabi B., Hiraiwa H., Pan C.J., Chou J.Y. Cloning and characterization of cDNAs encoding a candidate glycogen storage disease type Ib protein in rodents. *J Biol Chem.* 1998. 273(48): 31656-60.
- Liu R., Wang X., Chen G.Y. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med.* 2007. 2-7; 356:217-26.
- Marieb E.N. *Anatomie et physiologie humaine. Deuxième édition.* Canada, Édition du renouveau pédagogique. 1993.
- Meriane M., Duhamel S., Lejeune L. Cooperation of matrix metalloproteinases with the RhoA/Rho kinase and mitogen-activated protein kinase kinase-1/extracellular signal-regulated kinase signaling pathways is required for the sphingosine-1-phosphate-induced mobilization of marrow-derived stromal cells. *Stem Cells.* 2006. 24:2557-65.
- Miyata T., Iwanaga S., Sakata Y., Aoki N. Plasminogen Tochigi: inactive plasmin resulting from replacement of alanine-600 by threonine in the active site. *Proc Natl Acad Sci.* 1982. 79(20):6132-6.
- Mizrak D., Brittan M., Alison M.R. CD133: molecule of the moment. *J Pathol.* 2008. 214(1): 3-9.
- Murohara T., Ikeda H., Duan J. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularisation. *J Clin Invest.* 2000. 105:1527-36.
- Nakamizo A., Marini F., Amano T. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res.* 2005. 65:3307-18. Erratum in: *Cancer Res.* 2006. 66:5975.
- Osawa M. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science.* 1996. 273(5272):242-5.
- Ozen H. Glycogen storage diseases: new perspectives. *World J Gastroenterol.* 2007. 13(18): 2541-53.
- Pagé E.L., Robitaille G.A., Pouyssegur J., Richard D.E. Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms. *J. Biol. Chem.* 2002. 277:48403-409.
- Pagé E.L., Chan D.A., Giaccia A.J., Levine M., Richard D.E. Hypoxia-inducible Factor-1 α stabilisation in nonhypoxic conditions: Role of oxidation and intracellular ascorbate depletion. *Molec Biology of the cell.* 2008. 19:86-94.

- Parker J.C. Glucose-6-phosphate translocase as a target for the design of antidiabetic agents. *Drugs Fut.* 2001. 26(7): 687.
- Patiar S. et Harris A.L. Role of hypoxia-inducible factor-1 α as a cancer therapy target. *Endocr Relat Cancer.* 2006. 13 Suppl 1:61-75.
- Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000. 95:952-58.
- Pittenger M.F. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999. 284:143-47.
- Pouyssegur J., Dayan F., Mazure N.M. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature.* 2006. 441:437-43.
- Prockop D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997. 276:71-4.
- Quirici N., Soligo D., Caneva L., Servida F. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol.* 2001. 115:186-94.
- Rafii S. et Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularisation and regeneration. *Nat. Med.* 2003. 9:702-12.
- Ramakrishna N.V.S., Swamy K.H.S., Kumar E.K.S.V., Kushwaha M.M.S., Kota S., Raman D., Kruz M., Kogler H. Mumbaistatin, a process for its production and its use as a pharmaceutical. 1997. United States Patent: 6,297,043.
- Rankin E.B. et Giaccia A.J. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 2008. 15(4):678-85.
- Ravi R., Mookerjee B., Bhujwalla Z. M., Sutter C. H., Artemov D., Zeng Q., Dillehay L.E., Madan A., Semenza G. L., et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 2000. 14:34-44.
- Seiburg H.B., Cho R.H., Dykstra B., Uchida N., Eaves C.J., Muller-Seiburg C.E. The hematopoietic stem compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets. *Blood.* 2006. 107:2311-16.
- Semenza G.L., Roth P.H., Fang H.M. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 1994. 269:23757-63.
- Semenza G.L. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov.* 2007. 12:853-59.
- Semenza G.L. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Cancer Pathogenesis. *IUBMB Life.* 2008. 60(9):591-97.

- Shi Q., Rafii S., Wu M.H. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998. 92:362-67.
- Stoeltzing O., McCarty M.F., Wey J.S., Fan F., Liu W., Belcheva A., Bucana C.D., Semenza G.L., Ellis L.M. Role of hypoxia-inducible factor 1 α in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004. 96 :946–56.
- Studeny M., Marini F.C., Champlin R.E., Zompetta C., Fidler I.J., Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res.* 2002. 62:3603-8.
- Tso C.L., Shintaku P., Chen J. Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. *Mol Cancer Res.* 2006. 4:607-19.
- Tuettenberg J., Friedel C., Vajkoczy P. Angiogenesis in malignant glioma – a target for antitumor therapy? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2006. 59:181-93.
- Ulloa-Montoya F., Verfaillie C.M., Hu W.S. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng*, 2005. 100(1):12-27.
- Urbich C. et Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterisation and role in vascular biology. *Circ. Res.* 2004. 95:343-53.
- van der Werve G., Lange A., Newgard C., Mechin M.C., Li Y., Berteloot A. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. *Eur. J. Biochem.* 2000. 267:1533.
- van Schaftingen E. et Gerin I. The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J.* 2002. 362:513-32.
- Wang J.C. et Dick J.E. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol*, 2005. 15(9):494-501.
- Wartenberg M., Ling F.C., Muschen M., Klein F., Acker H., Gassmann M., Petrat K., Putz V., Hescheler J., Sauer H. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J.* 2003. 17:503-5.
- Weidemann A. et Johnson R.S. Biology of HIF-1 α . *Cell death and differentiation*, 2008. 15:621-27.
- Weinberg R.A. *The biology of cancer*. USA. Garland Science, Taylor & Francis group. 2007.
- Yen B.L. et Yen M.L. Mesenchymal Stem Cells and Cancer — for Better or for Worse? *Journal of Cancer Molecules* 2008. 4:5-9.

- Young H.E. Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals : I. Pluripotent mesenchymal stem cells. *Anat. Rec.* 2001a. 263:350-60.
- Young H.E. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat. Rec.* 2001b. 264:51-62.
- Zech N. Adult Stem Cell Manipulation and Possible Clinical Perspectives. *J. Reproduktionsmed. Endokrinol.* 2004. 1(2) :91-99.
- Zhang H., Gao P., Fukuda R., Kumar G., Krishnamachary B., Zeller K.I., Dang C.V., Semenza G.L. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell.* 2007. 11:407-20.
- Zhang H., Bosch-Marce M., Shimoda L.A., Tan Y.S., Baek J.H., Wesley J.B., Gonzalez F.J., Semenza G.L. Mitochondrial autophagy is a HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 2008. 283:10892-903.