

HIF1 α est une nouvelle cible du facteur de transcription MITF

Implication de la cascade AMPc-MITF-HIF1 α dans le développement des mélanomes

Roser Buscà, Edurne Berra, Jacques Pouysségur, Robert Ballotti

R. Buscà, R. Ballotti : Inserm U.597, Biologie et physiopathologie des cellules mélanocytaires, Équipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer (2001), Faculté de Médecine, 28, avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France.
E. Berra, J. Pouysségur : CNRS UMR 6543, Équipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer (2003), Centre Antoine Lacassagne, 33, avenue de Valombrose, 06107 Nice, France.
Roser.Busca@unice.fr

> Les mélanocytes, situés dans la couche basale de l'épiderme, dérivent des cellules de la crête neurale et sont responsables de la synthèse des pigments et de leur transfert vers les kératinocytes épidermiques, permettant ainsi d'obtenir une couleur uniforme de la peau. L' α -MSH (*α -melanocyte stimulating hormone*) est l'un des principaux facteurs sécrétés par les kératinocytes en réponse aux rayons UV de la lumière solaire. Ce facteur interagit avec le récepteur spécifique des mélanocytes (MC1R) et stimule la voie de signalisation intracellulaire dépendante de l'AMP cyclique (AMPc).

Depuis plusieurs années, notre équipe de recherche étudie de façon extensive la signalisation liée à l'action de l'AMPc sur le mélanocyte et a démontré le rôle essentiel de cette molécule dans le processus de pigmentation [1]. Nous avons pu montrer que l'AMPc régule différentes fonctions mélanocytaires à travers l'activation spécifique de plusieurs voies de signalisation telles que la voie de la PI3K [2] et la cascade B-Raf-MAPK [3, 4]. Il est par ailleurs important de noter que des mutations activatrices de B-Raf ont été mises en évidence dans près de 70 % des mélanomes [5, 6].

Par ailleurs, nos travaux ont permis de montrer que l'AMP cyclique, via l'activation de la PKA et de CREB, augmente l'expression du facteur de transcription spécifique des mélanocytes MITF (*microphthalmia associated transcription factor*) [7]. MITF, un membre de la

famille bHLH, joue un rôle capital non seulement dans la synthèse de la mélanine, mais aussi dans le développement et la survie des mélanocytes [8, 9].

L'ensemble de nos données et celles de la littérature montrent que la voie de signalisation α -MSH/MC1R/AMPc a des effets pléiotropiques sur la différenciation, la croissance et la survie des mélanocytes. Afin d'analyser les événements moléculaires médiés par l' α -MSH et l'AMPc dans les mélanocytes, et de mieux comprendre l'implication de cette voie de signalisation dans le développement et l'évolution du mélanome, nous avons réalisé une analyse des gènes régulés par l'activation de la voie de l'AMPc dans les cellules mélanocytaires.

Résultats

En utilisant des biopuces à ADN [10], nous avons analysé les modifications du transcriptome de cellules de mélanome murin B16, après un traitement de 24 heures par la forskoline, un agent unanimement reconnu pour stimuler la concentration intracellulaire d'AMPc.

De façon intéressante, nous avons montré que l'AMPc stimule l'expression du gène *Hif1 α* (Figure 1A) qui code la sous-unité α du facteur de transcription HIF1 (HIF1 α), un régulateur essentiel de l'homéostasie de l'oxygène, et dont le rôle dans la progression tumorale a été démontré dans de nombreuses études [11]. Après dimérisation avec le

facteur HIF1 β , HIF1 α forme le complexe HIF1, qui se lie à une séquence consensus 5'-RCGTG-3' appelée HRE (*hypoxia responsive element*). HIF1 contrôle l'expression de plusieurs gènes impliqués dans différentes fonctions liées au développement cancéreux, telles que la survie cellulaire, l'angiogenèse, l'invasion tumorale (pour revue, voir [12]). Jusqu'à présent, il a été démontré que la stimulation, par l'hypoxie, de la protéine HIF1 α résultait principalement d'une stabilisation post-traductionnelle de la protéine, consécutive à l'inhibition de sa dégradation par le protéasome [13-15]. Notre travail a permis de mettre en évidence un tout nouveau mécanisme de régulation de HIF1 α dans des cellules de mélanomes stimulés par l'AMPc. Nous démontrons en effet que l'AMPc stimule l'expression de HIF1 α non pas au niveau post-traductionnel mais selon un processus purement transcriptionnel, et cela indépendamment de toute variation de pression d'O₂ (Figures 1A et 1B). Ce mécanisme conduit à une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine HIF1 α , permettant ainsi la formation de complexes HIF fonctionnels capables d'activer des gènes cibles connus tels que le gène angiogénique *Vegf*

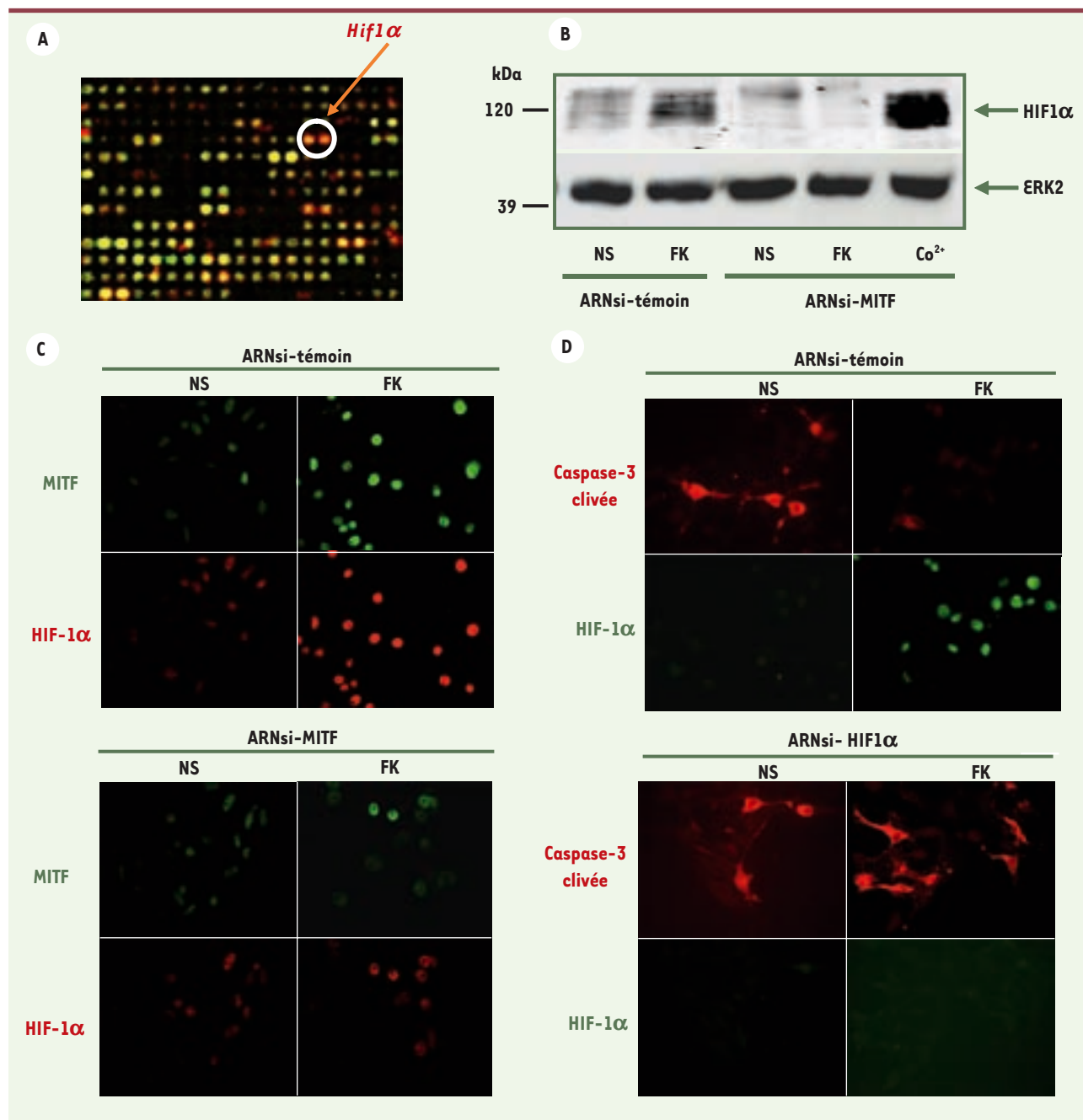


Figure 1. A. Exemple d'image d'une biopuce à ADN après analyse au scanner. Les ARNm des cellules non stimulées et stimulées par l'AMPc sont comparés et hybridés sur la même lame. Les spots rouges (en double) indiquent les gènes stimulés. La flèche montre les spots correspondant au gène *Hif1α* en réponse à l'action de l'AMPc. **B.** Analyses en *Western blot* de la protéine HIF1α provenant d'extraits de cellules de mélanome B16 après transfection par un ARNsi non pertinent (ARNsi-témoin) et un ARNsi agissant sur MITF (MITFsi). Les cellules sont soit non traitées (NS), soit traitées par la forskoline (FK) ou par du Cobalt (Co²⁺), utilisées comme témoin de l'induction de la protéine HIF1α. La détection de ERK2 montre une charge égale de chaque piste du gel. **C.** Étude en immunofluorescence de cellules de mélanome transfectées avec un ARNsi non actif (ARNsi-témoin) (en haut) et un ARNsi ciblant MITF (en bas). Les cellules sont soit non stimulées (NS), soit stimulées pendant 24 heures par la forskoline (FK) augmentant l'AMPc. L'expression de la protéine est détectée par un anticorps monoclonal primaire et un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine (FITC) (vert). HIF1α est marqué par un anticorps polyclonal et un anticorps secondaire conjugué au *Texas Red* (rouge) (barre : 20 μM). **D.** Immunofluorescence des cellules B16 transfectées avec un ARNsi non pertinent (ARNsi-témoin) ou un ARNsi invalidant HIF1α ; les cellules ont ensuite été traitées par la staurosporine (1 μM) pendant 6 heures. La caspase-3 clivée est marquée par un anticorps conjugué au *Texas Red* (rouge) et la protéine HIF1α est détectée par un anticorps monoclonal et un anticorps secondaire conjugué au FITC (vert) (barre : 20 μM).

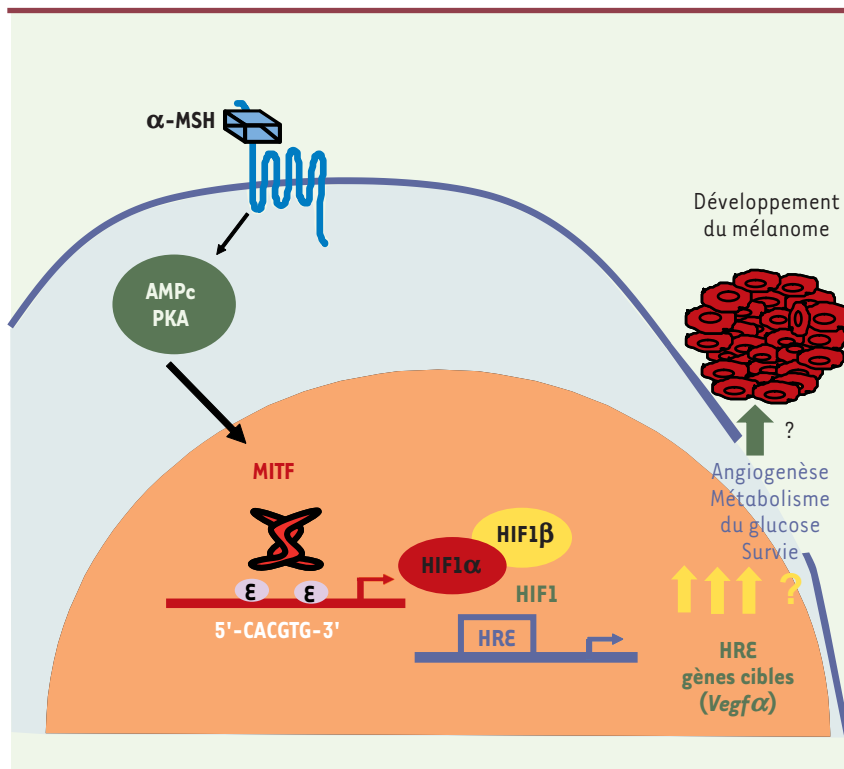


Figure 2. Modèle proposé résumant les mécanismes d'induction de HIF1 α par l'AMPc dans les cellules de mélanome. Le facteur α -MSH, en augmentant la voie de l'AMPc, augmente l'expression de MITF. MITF se lie et induit la transactivation du promoteur *Hif1 α* , et augmente ainsi l'expression du gène et de la protéine Hif1 α de façon spécifique dans la cellule de mélanome. HIF1 α se dimérise avec HIF1 β pour former le facteur de transcription HIF1, capable d'activer des gènes cibles comme *Vegf* et d'augmenter l'expression d'autres gènes impliqués dans la survie cellulaire et dans l'angiogenèse pour contribuer au développement des mélanomes.

(vascular endothelial growth factor). Par ailleurs, nous montrons également, grâce à cette étude, que cette induction de HIF1 α est spécifique des cellules mélanocytaires normales et transformées (mélanomes).

Afin de mieux caractériser la régulation transcriptionnelle de HIF1 α , et compte tenu de la spécificité cellulaire de ce phénomène, nous avons étudié le rôle potentiel du facteur de transcription MITF dans ce mécanisme. En effet : (1) MITF est le facteur de transcription spécifique des mélanocytes ; et (2) des sites consensus de fixation pour MITF ont été mis en évidence dans la séquence promotrice de *Hif1 α* . Pour aborder cette question, nous avons utilisé différentes approches technologiques telles que des expériences : (1) d'immunoprécipitation de chromatine ou (2) de mesure de l'activité du promoteur de *Hif1 α* , après expression ectopique

de MITF. Nous avons ainsi montré que MITF interagit physiquement avec le promoteur de HIF1 α et stimule son activité. Par ailleurs, nous montrons également que la surexpression de MITF est suffisante pour augmenter l'expression d'ARNm de *Hif1 α* . Finalement, en utilisant une approche d'ARN interférents (ARNsi) permettant d'inhiber spécifiquement l'expression endogène de MITF, nous montrons de manière définitive que, dans des conditions physiologiques, MITF est bien le facteur de transcription impliqué dans l'induction de HIF1 α par l'AMPc dans les cellules mélanocytaires (Figure 1C). Comme nous l'avons discuté précédemment, la régulation de l'expression de HIF1 α par l'AMPc, d'une part, et par l'hypoxie, d'autre part, mettent en jeu deux mécanismes différents. Cette affirmation est confirmée par le fait que ces deux stimulus ont des effets additionnels sur le taux de protéine HIF1 α ,

et pourraient donc, selon les conditions environnementales, coopérer pour induire de fortes quantités de protéine HIF1 α .

En résumé, nous montrons dans cette étude que MITF agit comme un régulateur physiologique de la quantité de HIF1 α dans la cellule. Cette propriété permettrait de modifier le devenir des mélanocytes et des cellules de mélanome, et cela indépendamment de la pression d'oxygène.

Vegf étant un gène cible bien connu de HIF1 α , impliqué dans l'angiogenèse et la croissance tumorale, nous avons cherché à savoir si MITF et HIF1 α pouvaient stimuler l'expression de *Vegf* dans des cellules de mélanomes incubées en présence d'AMPc. Des analyses par PCR quantitative ont été effectuées après blocage de l'expression de MITF et de HIF1 α à l'aide des ARNsi respectifs. Nous avons constaté que la déplétion cellulaire de MITF ou de HIF1 α inhibe l'expression de *Vegf* induite par l'AMPc, montrant que, dans les cellules de mélanome, l'effet stimulateur de l'AMPc sur *Vegf* est bien médié par la cascade MITF-HIF1 α , et qu'un nouveau rôle angiogénique peut ainsi être attribué à MITF dans les mélanomes.

HIF1 α est impliqué dans le contrôle de l'expression d'un très grand nombre de gènes (plus de 60 gènes cibles directs ont été identifiés à ce jour), ce qui lui confère un rôle central dans la régulation de processus cellulaires tels que la prolifération, la motilité ou l'équilibre survie/mort des cellules [12, 16]. Pour mieux définir le rôle physiologique de l'induction de HIF1 α dans les mélanocytes, nous avons évalué son implication possible dans le processus de survie des cellules de mélanome. Pour cela nous avons induit le programme d'apoptose à l'aide de la staurosporine, et nous avons évalué les niveaux de caspase 3 clivée (un marqueur du processus apoptotique) dans ces conditions expérimentales. De façon intéressante, nous avons observé que l'AMPc inhibe la mort cellulaire induite par la staurosporine. En outre, en inhibant HIF1 α à l'aide d'ARNsi, nous montrons que ce facteur protège les cellules de la mort cellulaire induite par la staurosporine, démontrant ainsi que l'activation de la cascade MITF-HIF joue un rôle clé dans le maintien de la survie cellulaire dans notre modèle de mélanome (Figure 1D).

À ce jour, le rôle de MITF dans la survie et le développement des précurseurs mélanocytaires est bien documenté. Toutefois, l'action de ce facteur sur la croissance et la survie des méla-



nocytes matures ainsi que sur celles des cellules de mélanome demeure controversé. Des travaux récents de la littérature suggèrent que MITF et HIF1 α pourraient induire des réponses cellulaires opposées, en agissant soit comme des facteurs de survie et de prolifération, soit en exerçant un rôle inhibiteur sur ces processus. Nous pouvons à présent proposer que le *switch* entre l'activité de « pro-survie » et celle contrôlant l'inhibition de la croissance pourrait être dicté par le contexte cellulaire, à savoir les signaux extracellulaires, le microenvironnement, ou le type de mutation à l'origine de la transformation du mélanocyte en mélanome. Il est intéressant de signaler que, dans un travail récent, Garraway *et al.* [17] suggèrent que MITF pourrait être un oncogène spécifique du mélanome, nécessaire au développement cancéreux et à la prolifération tumorale. Ces auteurs proposent également que MITF soit la cible d'une amplification génique spécifique du mélanome, et démontrent que l'expression ectopique de MITF, associée à la mutation B-Raf (l'une des mutations le plus souvent retrouvée dans des cellules de mélanome) est capable d'induire la transformation des mélanocytes humains primaires. Dans notre cas, l'AMPc pourrait, par l'intermédiaire de MITF, constituer un signal susceptible d'influencer l'équilibre vers la survie, et probablement vers l'angiogenèse et la prolifération du mélanome.

Conclusions

Nos résultats montrent que le facteur de transcription MITF, spécifique du mélanocyte, con-

trôle l'expression de HIF1 α , établissant ainsi un nouveau lien entre MITF, la survie et la vascularisation du mélanome (Figure 2). Ces résultats ont fait récemment l'objet d'une publication dans le *Journal of Cell Biology* [18]. Si l'on tient compte de la plasticité fonctionnelle, à la fois de MITF et de HIF1 α , de futures études devraient permettre de mieux préciser le rôle de la cascade MITF-HIF1 α dans le développement du mélanome.

Enfin, le fait que l'on puisse chimiquement moduler cette cascade est un atout majeur, qui ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement du mélanome, l'un des cancers les plus agressifs et des plus métastatiques connus à ce jour. ♦

Hypoxia inducible factor 1 α is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells

RÉFÉRENCES

- Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* 2000 ; 13 : 60-9.
- Busca R, Bertolotto C, Ortonne JP, Ballotti R. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70(S6)-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 31824-30.
- Englaro W, Rezzonico R, Durand-Clément M, *et al.* Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 24315-20.
- Busca R, Abbe P, Mantoux F, *et al.* Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *EMBO J* 2000 ; 19 : 2900-10.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, *et al.* Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* 2002 ; 417 : 949-54.
- Goding CR. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev* 2000 ; 14 : 1712-28.
- Bertolotto C, Abbe P, Hemesath TJ, *et al.* Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol* 1998 ; 142 : 827-35.
- Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, *et al.* Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 1993 ; 74 : 395-404.
- Hughes MJ, Lingrel JB, Krakowski JM, Anderson KP. A helix-loop-helix transcription factor-like gene is located at the mi locus. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 20687-90.
- Moreilhon C, Gras D, Hologne C, *et al.* Live *Staphylococcus aureus* and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells. *Physiol Genom* 2005 ; 20 : 244-55.
- Semenza GL. Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. *Ann Intern Med* 2002 ; 41 : 79-83.
- Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003 ; 3 : 721-32.
- Berra E, Benizri E, Ginouves A, *et al.* HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J* 2003 ; 22 : 4082-90.
- Brahimi-Horn C, Berra E, Pouyssegur J. Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway. *Trends Cell Biol* 2001 ; 11 : S32-6.
- Brahimi-Horn C, Mazure CN, Pouyssegur J. Signaling via the hypoxia-inducible factor-1 α requires multiple post-translational modifications. *Cell Signal* 2005 ; 17 : 1-9.
- Semenza G. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathology. *Trends Mol Med* 2001 ; 8 : 345-50.
- Garraway L, Windlund H, Rubin M, *et al.* Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 2005 ; 436 : 117-22.
- Buscà R, Berra E, Gaggioli C, *et al.* Hypoxia inducible factor 1 α is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. *J Cell Biol* 2005 ; 170 : 49-59.

ISBN : 2-84254-105-7 248 pages

Bon de commande

À retourner à EDK, 10 Villa d'Orléans - 75014 PARIS
Tél. : 01 53 91 06 06 - Fax : 01 53 91 06 07 - E-mail : editorial@edk.fr

NOM : _____ Prénom : _____
Adresse : _____
Code postal : _____ Ville : _____
Pays : _____
Fonction : _____

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Trisomie 21** : 15 € + 3 € de port = **18 € TTC**
en _____ exemplaire, soit un total de _____ €

Par chèque, à l'ordre de EDK
 Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° _____ Signature : _____
Date d'expiration : _____