

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE DE LILLE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE-LILLE NORD DE FRANCE

N° d'ordre : 40166

THESE

présentée par

Marie-Estelle LOSFELD

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université en Science de la Vie et de la Santé

**Etude du rôle de la N-glycosylation dans la localisation
et les fonctions de la nucléoline humaine**

Directeur de thèse :

Dr Dominique LEGRAND

Soutenue le 15 décembre 2009 devant la commission d'examen

Président : Dr Joël MAZURIER (Directeur de Recherche CNRS, Lille)
Rapporteurs : Pr Markus AEBI (Professeur à l'ETH, Zürich)
Dr Véronique PILLER-MICHEL (Chargé de Recherche CNRS, Orléans)
Examineurs : Dr Jean-Paul BRIAND (Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg)
Dr François FOULQUIER (Chargé de Recherche CNRS, Lille)
Dr Dominique LEGRAND (Chargé de Recherche CNRS, Lille)

Ce travail a été réalisé sous la direction des Drs Dominique LEGRAND et Mathieu CARPENTIER, dans l'équipe de recherche « Régulation de la réaction inflammatoire et du cancer par les glycoconjugués » dirigée par le Dr Joël Mazurier, et au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS/USTL, dirigée par le Dr Jean-Claude MICHALSKI.

Il a bénéficié d'une allocation de Recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

*A mes parents,
A mes grands-parents.*

Remerciements

Je tiens avant toutes choses à remercier les personnes sans lesquelles ce travail n'aurait pas été possible.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury :

Monsieur le Docteur Joël MAZURIER,

Je vous remercie tout d'abord d'avoir accepté la présidence de ce jury et je vous suis très reconnaissante de m'avoir accueillie dans votre équipe.

Monsieur le Professeur Markus AEBI,

Merci de m'avoir fait l'honneur d'être le rapporteur de ma thèse, soyez sûr de ma gratitude.

Madame le Docteur Véronique PILLER-MICHEL,

Je vous remercie profondément pour le temps que vous avez accepté de me consacrer en étant le rapporteur de cette thèse.

Monsieur le Docteur Jean-Paul BRIAND,

Je tiens à vous exprimer mes sincères remerciements pour votre participation à ce jury et votre investissement dans l'élaboration d'HB-19.

Monsieur le Docteur François FOULQUIER,

Je tiens, tout d'abord, à te remercier d'avoir accepté de faire partie de ce jury, mais je te suis également reconnaissante pour tes conseils et ton aide dans la réalisation des expériences de microscopie.

Monsieur le Docteur Dominique LEGRAND,

Dominique, je ne te remercierais jamais assez pour cette aventure ! Je voudrais te dire ma profonde gratitude pour tes conseils, ton encadrement, ta confiance, ta disponibilité... Durant cette thèse, j'ai appris beaucoup à ton contact tant au niveau scientifique qu'au niveau humain. Je ne peux m'empêcher d'évoquer également ton humour qui m'a permis de rire même devant les obstacles. Sois assuré de mon amitié.

Monsieur le Docteur Mathieu CARPENTIER,

Mathieu, par où commencer ? Si ce n'est que par un grand merci pour ton chaleureux accueil, pour les séances de discussions matinales, pour ta bonne humeur...

Je tiens à remercier Bernadette CODDEVILLE, Laurent HELIOT, Ara HOVANESSIAN, Arnaud LEROY, Pascal MARIOT, Patricia NAGNAN-LE MEILLOUR, Christian SLOMMIANNY... pour leur collaboration fructueuse et pour m'avoir permis de me familiariser avec de nouvelles techniques.

A l'équipe du « 113 » Esthelle HOEDT, Christophe MARILLER, Monique BENAÏSSA, Annick PIERCE et Stéphan HARDIVILLE, je tiens à dire vous dire merci, en particulier pour la bonne humeur débordante (n'est-ce pas Esthelle ?), pour tout le soutien logistique (scientifique et culinaire) et le soutien moral (mais oui Christophe c'est à toi que je m'adresse !), pour l'apprentissage de la biologie moléculaire et les petites attentions de Monique, pour les séances sportives à la piscine avec Annick et pour la compagnie de Stéphan durant les pauses !

Au bureau des étudiants du « 115 », Audrey, Adeline, Fanny, merci d'avoir partager ces quelques mètres carrés de bonne humeur et de travail pendant ces quatre années...heureusement que cette pièce n'a ni yeux, ni oreilles... et même si ils ne font pas partie intégrante du bureau, encore un grand merci pour les doctorants des autres étages....

Merci à toutes les personnes du C9 pour les petites discussions au quotidien, je ne peux malheureusement pas tous vous citer, mais je ferais entre autres un petit clin d'œil à Elisabeth et Nadège.

A Aurélie MELCHIOR, ancienne voisine de bureau et surtout amie fidèle au labo comme dans la vie privée, je tiens à te remercier d'avoir été présente pour égayer mes journées grises mais également pour m'avoir fait garder les pieds sur terre les jours d'euphorie ! Merci à ma p'tite voix !

A Frédéric CHIRAT, je tiens à te faire part de ma profonde reconnaissance... Tu as été présent comme tu le dis si bien « dès mes premiers pas en science », et tu as su me supporter, me soutenir et me conseiller tout au long de ma croissance scientifique mais également dans la vie de tous les jours... Un grand merci pour ton amitié !

Je remercie tous mes amis qui m'ont soutenue fidèlement depuis de très nombreuses années, je parle évidemment de Nassir, Nora, et bien d'autres... Merci d'avoir supporté de m'entendre radoter des heures durant sur mes expériences, le labo, ma thèse... je sais que je suis envahissante !

Je ne peux bien sur pas finir mes remerciements sans évoquer ma famille. Je remercie de tout mon cœur mes parents qui m'ont toujours poussée à réaliser mes rêves, cela n'a pas dû être facile tous les jours d'avoir une petite fille de 8 ans qui veut devenir Marie Curie ! Vous m'avez encouragée, soutenue, supportée, bien plus qu'on ne peut l'imaginer ! Sans vous rien n'aurait été possible. Un grand merci à vous deux pour votre amour et votre tendresse. J'aurais enfin une pensée pour mes grands-parents qui auraient tant aimé être encore là aujourd'hui.

Résumé

La nucléoline est une protéine nucléolaire ubiquitaire, impliquée dans la régulation de la transcription, la croissance et la prolifération cellulaire. Elle est aussi décrite comme une protéine transitant entre le noyau, le cytoplasme, et la surface cellulaire où elle sert de récepteur pour divers ligands extracellulaires. Ses mécanismes d'expression à la surface cellulaire et ses rôles ne sont néanmoins pas clairement précisés. Curieusement, des formes N- et O-glycosylées de la nucléoline de surface et cytosolique ont été mises en évidence dans notre laboratoire. Cette glycosylation est atypique puisque la nucléoline ne possède aucune séquence signal permettant de la diriger vers la voie classique de sécrétion. Les N-glycanes étant localisés dans des domaines fonctionnels, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle ces glycanes pourraient modifier son trafic, ses propriétés d'interaction et ses fonctions. Dans ce travail, nous avons étudié si la nucléoline glycosylée possédait des fonctions spécifiques et dans quelle mesure le trafic et les interactions de la nucléoline pouvaient être modifiés par la N-glycosylation.

Premièrement, nous avons mis en évidence, en collaboration avec A. Hovanessian (UPR 2228 CNRS, Paris) et J.P. Briand (UPR 9021, Strasbourg), que la nucléoline de surface est exclusivement glycosylée, et que la glycosylation est essentielle à son expression de surface. Nous montrons que cette glycoprotéine possède une activité de signalisation intracellulaire mettant en œuvre le calcium comme messenger secondaire. Par cytofluorimétrie en flux sur des cellules T Jurkat chargées en sonde calcique fluorescente, nous avons démontré la génération de flux calciques induits par la fixation de HB-19 (pseudopeptide anti-VIH spécifique de la nucléoline) sur la nucléoline de surface. En présence de HB-19, une entrée rapide, réversible, spécifique et dose dépendante de calcium est induite. Les canaux ioniques impliqués sont des canaux SOC (Store operated channels). Ces résultats ont été confirmés, en collaboration avec P. Mariot (U800 INSERM), par des expériences d'imagerie calcique et de patch clamp sur les cellules cancéreuses de prostate PC3 et DU145. Nous postulons que, après fixation d'un ligand, la nucléoline de surface peut subir des changements de conformation ou d'association capables d'activer d'autres récepteurs impliqués dans les flux calciques et la signalisation cellulaire.

Deuxièmement, nous avons recherché le(s) rôle(s) de la glycosylation de la nucléoline dans ses propriétés d'interaction avec certains de ses ligands. Nous avons mis en place une stratégie pour produire des formes recombinantes de nucléoline, sans le domaine N-terminal, glycosylées ou non, en cellules d'insecte. Ces protéines ont été purifiées et leurs N-glycanes caractérisés. La structuration des protéines a été contrôlée par dichroïsme circulaire et fluorimétrie (coll. A. Leroy). Nous avons ensuite examiné la capacité des différents glycoformes de nucléoline à interagir avec elles-mêmes, mais aussi avec plusieurs de ses ligands: la lactoferrine, la laminine, l'ApoE, les ARN et les héparanes sulfates. Par Biacore et en électrophorèse, nous avons mis en évidence la capacité de la nucléoline à interagir avec elle-même en fonction de son état de glycosylation. Concernant l'interaction de la nucléoline avec ses ligands, la glycosylation semble moduler, ou non, cette interaction, en fonction de la nature du domaine de la nucléoline qui interagit. Nous en concluons que la glycosylation peut jouer un rôle important dans la modulation des interactions de la nucléoline avec elle-même et certains ligands, et donc, ses fonctions.

Enfin, en collaboration avec C. Slomianny (U800 INSERM) et L. Hélot (IRI), nous avons étudié le rôle de la glycosylation de la nucléoline dans son trafic. La cytofluorimétrie en flux et la microscopie confocale ont été utilisées pour étudier l'expression de surface et la localisation cellulaire de nucléolines recombinantes mutées, N-glycosylables ou non, par les cellules Hela. Nous avons démontré que seules les cellules qui expriment des formes glycosylables présentent la nucléoline à leur surface, confirmant que la glycosylation est essentielle à l'expression de surface. Nous mettons en évidence le transit de la nucléoline, indépendamment de sa capacité à être glycosylée, par les endosomes précoces et, de façon surprenante, (absence de peptide signal) dans le trans-Golgi.

En conclusion, nos travaux suggèrent que la nucléoline de surface possède des spécificités structurales (glycosylation et capacité d'association avec elle-même et ses ligands) qui, en plus de sa localisation membranaire, lui confèrent des fonctions différentes de ses isoformes nucléaires et cytoplasmiques. En particulier, elle semble capable, après fixation d'un ligand, d'induire des signaux intracellulaires utilisant le calcium comme messenger secondaire. Nos résultats suggèrent que la glycosylation est une modification essentielle de la molécule, non seulement pour son expression et sa distribution à la surface cellulaire, mais également pour ses fonctions.

Abstract

Nucleolin is a ubiquitous nucleolar protein involved in transcription regulation, cell growth and proliferation. It was also reported as a shuttle between nucleus, cytoplasm and cell surface, where it acts as a receptor for various extracellular ligands. However, the ways by which nucleolin is expressed at the cell surface are not well defined. Interestingly, N- and O-glycosylated nucleolin isoforms, both in cytosol and on the cell surface, have been previously evidenced in our laboratory. This glycosylation is atypical because nucleolin has no signal sequence to direct it to the classical secretion pathway. Since the N-glycans are located within functional domains, we postulated that glycans could change nucleolin trafficking, interactions and functions. In the present work, we investigated whether glycosylated nucleolin possesses specific functions, and in which extent N-glycosylation may modify the trafficking and functions of nucleolin.

First, in collaboration with A. Hovanessian (UPR 2228 CNRS, Paris) and J.P. Briand (UPR 9021, Strasbourg), we have evidenced that the only glycosylated nucleolin isoform is present on the cell surface, and that glycosylation is an absolute requirement for its expression on cells. We demonstrate that the surface glycoprotein can induce signals in cells with calcium as a secondary messenger. Through flow cytometry experiments using Jurkat T-cells loaded with a fluorescent calcium probe, we have shown that the binding of HB-19 (anti-HIV pseudopeptide, a specific nucleolin ligand) to surface nucleolin triggers calcium fluxes in cells. In the presence of HB-19, a rapid reversible and specific entry of calcium occurs in cells. The ion channels involved in this phenomenon are SOC (Store-Operated Channels) channels. These results were confirmed, in collaboration with P. Mariot (U800 INSERM), through calcium imaging and patch clamp experiments on cancerous prostate cells PC3 and DU145. We postulate that ligand binding to surface nucleolin may induce conformation or association changes of nucleolin able to activate other receptors involved in calcium cell signaling.

Second, we have investigated the role(s) of nucleolin glycosylation in its ligand interaction properties. We have designed a strategy to produce recombinant forms of nucleolin, glycosylated or not, in insect cells. These proteins were purified and their N-glycans were structurally characterized. The folding of the proteins was checked by circular dichroism and fluorimetry in collaboration with A. Leroy (UMR 8576 CNRS). We investigated the ability of the different nucleolin glycoforms to interact with themselves, but also with several previously-described nucleolin ligands: lactoferrin, laminin, ApoE, RNA, and heparan sulphates. Through Biacore and electrophoresis experiments, we show that nucleolin is able to interact with itself depending on its glycosylation state. Concerning the interaction of nucleolin with its ligands, we demonstrate that the glycosylation may modulate, or not, the interactions, depending on the nucleolin domains involved in the interaction. We conclude that glycosylation may play an important role in the modulation of the interactions of nucleolin with itself and with some of its ligands, and hence, in its functions.

Lastly, in collaboration with C. Slomianny (U800 INSERM) and L. Héliot (IRI), we have investigated the role of glycosylation of nucleolin in its cell trafficking. Confocal microscopy studies and cytofluorimetry experiments have been undertaken to determine the cell surface expression and cellular localization of recombinant nucleolins mutated within its N-glycosylation sites. We have demonstrated that only the cells which can express the glycosylated forms also express the nucleolin on their surface, thus confirming that glycosylation is essential for cell surface expression of nucleolin. We also demonstrate that nucleolin, whatever its ability to be glycosylated, passes through early endosomes and surprisingly (no signal peptide) in the trans-Golgi.

In conclusion, our work suggests that cell surface nucleolin possesses specific structural features (glycosylation and an ability to interact with itself and with ligands), in addition to its cell membrane localization, that give to the molecule functions quite different from those of its cytoplasmic and nuclear isoforms. It can indeed induce, after ligand binding, intracellular signals using calcium as a secondary messenger. Our results strongly suggest that glycosylation is an essential post-translational modification of the molecule, not only for its expression and distribution at the surface of cells but also, probably, for its functions.

Abréviations

2APB = 2-aminoethoxy diphenyl borate	MALDI-TOF = matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight
ADN = acide désoxyribonucléique	Man = mannose
ADNc = acide désoxyribonucléique complémentaire	MAPK = mitogen-activated protein kinase
AgNOR = Argyrophilic nucleolar organizer regions	MPF = maturation promoting factor
ApoE = apolipoprotéine E	NAD = nicotinamide adénine dinucléotide
ARE = AU-rich element	NES = nuclear exportation sequence
ARNm = acide ribonucléique messenger	Neu5Ac = acide N-acétylneuraminique
ARNr = acide ribonucléique ribosomal	NFT = neurofibrillary tangles
CD = cluster of differentiation	NGF = nerve growth factor
CMV = cytomegalovirus	NLS = nuclear localization sequence
CRAC = calcium release activated calcium	NRE = nucleolin recognition element
DAG = diacylglycérol	PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis
Dol = dolichol	PARP = poly (ADP-ribose) polymerase
ECM = evolutionary conserved motif	PDI = peptide disulfide isomérase
EGTA = ethylene glycol tetraacetic acid	PKC =protein kinase C
ERAD = endoplasmic reticulum associated protein degradation	PLC = phospholipase C
FPLC = fast protein liquid chromatography	PNGase = peptidyl N-glycosidase
Gal = galactose	PVDF = poly (vinylidene difluoride)
GAR = glycine arginine rich	RBD = RNA-binding domain
GC-MS = gaz chromatography- mass spectrometry	RNP = ribonucléoprotéine
GFP = green fluorescent protein	ROC = receptor operated channels
Glc =glucose	Scarf = skin calmodulin-related factor
GlcNAc = N-acétylglucosamine	SDS = sodium dodécyl sulfate
gp= glycoprotein	siRNA = small interfering RNA
GPI = glycosylphosphatidylinositol	snoRNA = small nucleolar RNA
GRO = guanidine-rich oligonucleotide	snoRNP = small nucleolar ribonucleoproteins
GST = glutathion-S-transférase	SOC = store-operated channels
GTPase = guanosine triphosphatase	SOCE = store-operated calcium entry
Hfb = heptafluorobutyrique	SRP = signal recognition particule
HMOI = high multiplicity of infection	TCR = T-cell receptor
HRP = horse radish peroxydase	UTR = untranslated region
IP3 = inositol 1, 4, 5- triphosphate	VEGF = vascular endothelial growth factor
LDL = low density lipoprotein	VIH =virus d'immunodéficience humaine
LRP = lipoprotein receptor-related protein	VOC = voltage operated channels

Sommaire

Table des matières

GENERALITES	1
1. INTRODUCTION GENERALE	1
2. LOCALISATION CELLULAIRE ET SYNTHÈSE DE LA NUCLEOLINE	2
2.1 Localisation cellulaire de la nucléoline	2
2.2 Variation de l'expression de la nucléoline.....	3
3. ORGANISATION GÉNÉRIQUE DE LA NUCLEOLINE	5
3.1 Le gène de la nucléoline : du règne végétal aux mammifères.....	5
3.2 Régulation génique de la nucléoline	6
4. STRUCTURE PROTÉIQUE DE LA NUCLEOLINE	7
4.1 Domaine N-terminal	8
4.2 Domaine central.....	8
4.3 Domaine C-terminal	9
4.4 Domaines d'interaction.....	9
4.5 Modifications post-traductionnelles de la nucléoline	10
4.5.1 Phosphorylation	10
4.5.1.1 Rôle de la phosphorylation par CKII	11
4.5.1.2 Rôle de la phosphorylation par cdc2	11

4.5.2	ADP-ribosylation	12
4.5.3	Méthylation	12
4.5.4	Protéolyse	13
4.5.5	Glycosylation	14
4.6	Particularités structurales de la nucléoline de surface	15
5.	LA NUCLEOLINE NUCLEAIRE ET CYTOSOLIQUE : TRAFIC ET FONCTIONS	16
5.1	Trafic nucléo-cytoplasmique de la nucléoline	16
5.2	Fonctions de la nucléoline nucléaire et cytosolique	16
5.2.1	Biogenèse des ribosomes	18
5.2.1.1	Rôle dans la synthèse des ARNr et leur reconnaissance spécifique	18
5.2.1.1.1	<i>Rôle dans la synthèse des ARNr</i>	18
5.2.1.1.2	<i>Rôle dans la maturation des ARNr</i>	19
5.2.1.1.3	<i>Reconnaissance des ARNr cibles de la nucléoline</i>	19
5.2.1.2	Transport et assemblage des particules pré-ribosomales	20
5.2.2	Nucléoline et prolifération	21
5.2.2.1	Nucléogénèse et embryogénèse	22
5.2.2.2	Nucléoline et facteurs de transcription	22
5.2.2.3	Effet anti-prolifératif de la nucléoline	23
5.2.3	Nucléoline et apoptose	23
5.2.3.1	Etat de dégradation de la nucléoline dans l'apoptose	23
5.2.3.2	Implication de la nucléoline dans la voie intrinsèque (Bcl-2)	24
5.2.3.3	Nucléoline et apoptose médiée par p53	25
5.3	Implication de la nucléoline dans les pathologies.....	25

5.3.1	Nucléoline et maladie d'Alzheimer	25
5.3.2	Nucléoline et cancer	26
6.	LA NUCLEOLINE DE SURFACE : EXPRESSION ET ROLES	27
6.1	Expression de la nucléoline à la surface cellulaire	27
6.2	Interactions et rôles de la nucléoline de surface	28
6.2.1	Interaction de la nucléoline avec des composants de la matrice extracellulaire	28
6.2.1.1	Nucléoline et protéoglycanes	28
6.2.1.2	Nucléoline et laminine	28
6.2.2	Interactions de la nucléoline avec des ligands solubles et des récepteurs membranaires	29
6.2.2.1	Nucléoline et apolipoprotéines	29
6.2.2.2	Nucléoline et midkine	30
6.2.2.3	Nucléoline et lactoferrine	32
6.2.2.4	Autres ligands de la nucléoline	34
6.2.2.4.1	<i>Récepteurs membranaires</i>	34
6.2.2.4.2	<i>Composants intracellulaires des voies d'activation</i>	35
6.2.2.4.3	<i>Molécules extracellulaires</i>	36
6.3	Implication de la nucléoline de surface dans les pathologies	36
6.3.1	Le VIH	36
6.3.1.1	Processus d'infection par le VIH	36
6.3.1.2	VIH et nucléoline	37
6.3.1.2.1	<i>Une molécule d'étude, le pseudopeptide mimétique de la gp 120 : HB-19</i>	38

6.3.1.2.2	<i>Rôles proposés pour la nucléoline dans les mécanismes d'infection du VIH</i>	40
6.3.2	Nucléoline, cancer et angiogenèse	40
6.3.3	La nucléoline dans les autres pathologies	42
7.	GLYCOSYLATION	43
7.1	Généralités sur la glycosylation	43
7.1.1	Définition	43
7.1.2	Structures glycaniques	44
7.1.3	Enzymes de synthèse	44
7.1.4	Voie de biosynthèse réticulaire des N-glycanes	45
7.1.4.1	Synthèse du précurseur	45
7.1.4.2	Contrôle qualité	46
7.1.5	Maturation golgienne et sécrétion	46
7.1.6	Rôles biologiques de la glycosylation	47
7.2	Cas particulier : la glycosylation de la nucléoline	51
7.2.1	Une glycosylation atypique	51
7.2.2	Voies hypothétiques de synthèse de la nucléoline	52
7.2.3	Rôles possibles de la N-glycosylation de la nucléoline	53
7.2.3.1	Rôles potentiels dans le trafic intracellulaire	53
7.2.3.2	Rôles potentiels dans les fonctions	54
7.2.4	Rôles possibles de la O-glycosylation de la nucléoline	54
8.	PROBLEMATIQUE & STRATEGIES	57

TRAVAUX PERSONNELS 60

CHAPITRE 1 : Etude de la capacité de la nucléoline de surface à induire des signaux intracellulaires 60

1. GENERALITES : LE CALCIUM, UN SECOND MESSAGER DANS LA TRANSMISSION DE SIGNAUX INTRACELLULAIRES 60

1.1 Mécanismes d'action du calcium dans la différenciation et l'activation cellulaire 60

1.1.1 Les différents canaux calciques de la cellule 61

1.1.2 Les méthodes d'étude des canaux calciques 62

2. BUTS POURSUIVIS ET RESULTATS OBTENUS 64

2.1 Buts poursuivis 64

2.2 Résultats obtenus 65

3. ARTICLE : THE CELL SURFACE EXPRESSED NUCLEOLIN IS A GLYCOPROTEIN THAT TRIGGERS CALCIUM ENTRY INTO MAMMALIAN CELLS 65

4. CONCLUSION ET DISCUSSION 79

CHAPITRE II : Etude de l'influence de la N-glycosylation sur les interactions et les fonctions de la nucléoline 81

1. PRODUCTION DE FORMES RECOMBINANTES DE NUCLEOLINE, GLYCOSYLEES OU NON 82

1.1. Biosynthèse et production 82

1.1.1. Système de production : baculovirus/cellules d'insecte 82

1.1.1.1.	Les baculovirus linéaires	82
1.1.1.2.	Cellules Sf9 et Hi-5	84
1.1.2.	Constructions plasmidiques	84
1.1.3.	Cinétique de production, rendement et purification des protéines	87
1.1.3.1.	Cinétique de production	87
1.1.3.2.	Purification par chromatographie d'échange d'ions	88
1.2.	Analyse de l'occupation des sites de N-glycosylation et caractérisation des glycanes	90
1.2.1.	Composition en monosaccharides	90
1.2.1.1.	Dérivés Hfb	90
1.2.1.2.	Immunodétection d'un core N-glycanique fucosylé	92
1.2.2.	Occupation des sites de N-glycosylation	93
1.3.	Analyse de la conformation des protéines recombinantes	95
1.3.1.	Dichroïsme circulaire	96
1.3.2.	Fluorimétrie	96
2.	ETUDE DES PROPRIETES D'INTERACTION DES DIFFERENTES GLYCOFORMES DE LA NUCLEOLINE	98
2.1.	Interactions intra- et intermoléculaires, oligomérisation, et agrégation des isoformes recombinantes de la nucléoline	98
2.1.1.	Etudes en électrophorèse PAGE	98
2.1.2.	Etudes en résonance plasmonique de surface	104
2.2.	Interactions des glycoformes recombinantes avec les ligands de la nucléoline	109
2.2.1.	Etude des interactions avec la lactoferrine	110

2.2.2.	Etude des interactions avec la laminine et l'ApoE	112
2.2.3.	Etude des interactions avec les héparanes sulfates	112
2.2.4.	Etude des interactions avec l'ARN	115
3.	CONCLUSION ET DISCUSSION	119
CHAPITRE 3 : Influence de la N-glycosylation de la nucléoline sur son trafic intracellulaire		
		123
1.	EXPRESSIONS STABLES ET TRANSITOIRES DES FORMES MUTEES DE LA NUCLEOLINE, N-GLYCOSYLABLES OU NON	123
1.1.	Constructions plasmidiques	123
1.1.1.	Nucléoline « pleine taille »	124
1.1.2.	Nucléoline sans sa séquence NLS	125
1.1.3.	Nucléoline sans sa séquence NLS ni son domaine N-terminal acide	125
1.2.	Surexpression des protéines en cellules humaines, par transfections ou co-transfections stables ou transitoires	129
2.	ETUDE DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DE LA NUCLEOLINE, EN RELATION AVEC SA CAPACITE A ETRE GLYCOSYLEE	129
2.1.	Influence de la glycosylation sur l'expression de surface de la nucléoline	130
2.2.	Etudes en microscopie confocale du trafic de la nucléoline, mutée ou non sur ses sites de N-glycosylation	133
2.2.1.	Etude des voies possibles de synthèse et de sécrétion de la nucléoline	133
2.2.1.1.	Réticulum endoplasmique	134

2.2.1.2. Golgi	134
2.2.2. Etude du processus de réinternalisation de la nucléoline de surface	142
2.2.2.1. Endocytose	142
2.2.2.2. Dégradation.....	143
3. CONCLUSION ET DISCUSSION	157

<u>CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION – PERSPECTIVES</u>	160
1. CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION	160
2. PERSPECTIVES	165
2.1.Caractérisation précise des mécanismes par lesquels la nucléoline de surface glycosylée exerce ses rôles de récepteur et de molécule de signalisation	165
2.2.La glycosylation de la nucléoline s’inscrit-elle dans un mécanisme commun à d’autres protéines intracellulaires?	166
2.3.Caractérisation et étude du rôle de la O-glycosylation de la nucléoline..	167

<u>APPENDICE TECHNIQUE</u>	169
1. CULTURE CELLULAIRE	169
1.1.Culture des cellules d’insecte Sf9 et High-Five	169
1.2.Culture des cellules humaines Hela et HEK-Flp 293	169

2. CONSTRUCTIONS ET TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	170
2.1.Constructions plasmidiques pour l'expression en cellules d'insecte	170
2.2.Constructions plasmidiques pour la surexpression en cellules de mammifère	172
2.3.Constructions plasmidiques pour l'expression dans <i>Pichia pastoris</i>	175
3. METHODES DE TRANSFECTION ET D'EXPRESSION DES PROTEINES RECOMBINANTES	176
3.1.Transfection, infection et production en cellules d'insecte	176
3.1.1. Transfection par le système baculovirus et amplification virale	176
3.1.2. Production en cellules d'insecte	177
3.2.Transfection, sélection et expression dans <i>Pichia pastoris</i>	177
3.3.Transfections stables et transitoires en cellules de mammifère	178
3.3.1. Transfection stable des cellules HEK-Flp 293	178
3.3.2. Transfection transitoire des cellules Hela	179
4. ANALYSES BIOCHIMIQUES ET STRUCTURALES DES PROTEINES RECOMBINANTES PRODUITES EN CELLULES D'INSECTE	180
4.1.Cinétique d'expression de la protéine NCT dans les cellules High-five en fonction de la durée d'infection par les baculovirus	180
4.2.Purification par chromatographie d'échange d'ions en FPLC des protéines recombinantes	181
4.3.Séparation des protéines en SDS-PAGE en présence ou absence de β -mercaptoéthanol	181

4.4.Séparation des protéines sur gels d'acrylamide (PAGE) en conditions non dénaturantes	182
4.5.Electrophorèse PAGE bidimensionnelle	182
4.6.Analyse de la glycosylation des protéines recombinantes	183
4.6.1. Analyse de la composition en monosaccharides des molécules recombinantes, après dérivation des sucres par l'heptafluorobutyrate ...	183
4.6.2. Détection des cores N-glycaniques fucosylés	184
4.6.3. Analyse des glycopeptides en spectrométrie de masse	184
4.7.Analyse de la conformation des protéines recombinantes	185
4.7.1. Dichroïsme circulaire	185
4.7.2. Fluorimétrie	185
5. ANALYSE DES INTERACTIONS DES PROTEINES RECOMBINANTES NCT, R1CT, R3CT ET RCT	186
5.1.Analyse par résonance plasmonique de surface	186
5.2.Co-immunoprécipitation des complexes formés entre les protéines recombinantes et leurs ligands	187
5.3.Mise en évidence, par détection différentielle de l'ARN libre, non retardé sur gel d'agarose, des complexes formés entre l'ARN NRE et les glycoformes NCT, R1CT, R3CT et RCT	189
5.4.Chromatographie sur colonne d'héparine	191
5.5.Expériences de retard sur gel en présence d'héparine	191
6. ANALYSE DE LA SUREXPRESSON DES DIFFERENTES FORMES DE NUCLEOLINE EN CELLULES DE MAMMIFERE	191
6.1.Plasmides et anticorps	191
6.2.Etude par cytofluorimétrie en flux de l'expression de la nucléoline à la surface des cellules Hela	192

6.3.Préparation des échantillons pour la microscopie de fluorescence .. 193

ANNEXE 194

Guinez C, **Losfeld ME**, Cacan R, Michalski JC, and Lefebvre T. (2006) "Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization." *Glycobiology* 16:22-8.

BIBLIOGRAPHIE 201

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Localisation cellulaire de la nucléoline	2
Figure 2: Schéma de l'organisation en domaine de la nucléoline humaine	7
Figure 3 : Domaines RBD1 et 2 en interaction avec une séquence d'ARN NRE (données de RMN, Allain <i>et al.</i> , 2000)	9
Figure 4 : Structure des N- et O-glycanes de l'isoforme glycosylée de la nucléoline humaine	15
Figure 5 : Rôles de la nucléoline dans le cycle cellulaire et la biogenèse des ribosomes (extrait de Srivastava et Pollard, 1999)	17
Figure 6 : Colocalisation de la midkine et de la nucléoline en spots distincts à la surface de cellules Hela (extrait de Said <i>et al.</i> , 2002)	31
Figure 7 : Colocalisation de la lactoferrine humaine avec la nucléoline à la surface des cellules MDA-MB231 et dans les voies de recyclage et de dégradation	33
Figure 8 : Formule chimique du pseudopeptide HB-19 (Destouches <i>et al.</i> , 2008)	38
Figure 9: Représentation schématique des structures N-glycaniques types retrouvées chez les cellules de mammifère	48
Figure 10 : Représentation schématique des structures O-glycaniques types retrouvées chez les cellules de mammifère	48
Figure 11: Cycle des dolichols et voie de synthèse du précurseur tétradéca-oligosaccharidique (extrait de R. D. Cummings et T.L. Doering)	49
Figure 12: Représentation schématique du précurseur tétradéca-oligosaccharidique des N-glycanes	49
Figure 13 : Cycle déglucosylation-reglucosylation de remise en conformation des protéines (extrait de la thèse d'I. Marchal)	50
Figure 14 : Voie de maturation golgienne (extrait de la thèse d'I. Marchal)	50
Figure 15 : Schéma représentant les voies hypothétiques empruntées par la nucléoline lors de sa sécrétion et de sa réinternalisation	56
Figure 16 : Rôle hypothétique de la N-glycosylation de la nucléoline dans l'interaction des domaines RBD1 et 2 avec les ARN	56

Figure 17 : Store operated calcium entry (SOCE) chez les cellules T (tiré de Feske <i>et al</i> , 2007)	61
Figure 18 : Structure du Fura-2	63
Figure 19 : Représentation schématique du processus de production de protéines recombinantes par le système baculovirus/cellules d'insecte.....	83
Figure 20 : Représentation schématique du vecteur pAcSecG2T et des constructions effectuées à partir de ce vecteur	85
Figure 21 : Schéma des différentes constructions utilisées lors de la production en cellules d'insecte et séquences protéiques des différentes formes de nucléoline recombinante produites	86
Figure 22 : Cinétique d'expression de la protéine NCT dans les cellules High-five en fonction de la durée d'infection par les baculovirus (expérience représentative)	87
Figure 23 : Purification en FPLC sur colonne S-Sepharose Fastflow des 4 protéines recombinantes (NCT, R1CT, R3CT et RCT) contenues dans 175 ml de surnageant de culture de cellules High-five après infection par des baculovirus recombinants	89
Figure 24 : SDS-PAGE des protéines recombinantes obtenues après purification sur colonne S-Sepharose Fastflow	89
Figure 25 : Spectres obtenus en GC-MS après dérivation par l'acide heptafluorobutyrique des glycanes des protéines recombinantes NCT et RCT	91
Figure 26 : Caractérisation de la présence de fucose sur le core N-glycanique des structures glycaniques des protéines recombinantes exprimées en cellules d'insecte	93
Figure 27 : Spectres MALDI-TOF des glycopeptides issus de la digestion trypsique des protéines NCT et RCT	94
Figure 28 : Spectres de dichroïsme circulaire obtenus sur 2 µM des quatre formes de nucléoline recombinante.....	97
Figure 29 : Spectres de fluorescence obtenus sur 2 µM des quatre formes de nucléoline recombinantes	97
Figure 30 : Migration des isoformes recombinantes de nucléoline en SDS-PAGE en absence d'agent réducteur	99
Figure 31 : Comparaison des migrations des protéines recombinantes sur gels PAGE en conditions non-dénaturante, en présence ou non d'agent réducteur	101

Figure 32: Vérification, par électrophorèse SDS-PAGE en présence de β -mercaptoéthanol, de l'intégrité des protéines recombinantes séparées en gel PAGE en conditions non dénaturantes	103
Figure 33 : Etude par résonance plasmonique de surface de la fixation des quatre formes de nucléoline recombinante sur elles-mêmes	106
Figure 34 : Représentation schématique et hypothétique de la structure des formes dérivées de la nucléoline NCT, R1CT, R3CT et RCT, en fonction de leur N-glycosylation .	108
Figure 35 : Etude par résonance plasmonique de surface de la fixation de la lactoferrine sur les quatre formes recombinantes de la nucléoline	111
Figure 36 : Profils d'élution de NCT et RCT chromatographiés en FPLC sur colonne d'héparine Hi-trap TM	114
Figure 37 : Retard sur gel PAGE en conditions non dénaturantes de l'héparine en présence des protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT	114
Figure 38 : Etude par résonance plasmonique de surface de la fixation des ARN NRE et NS sur NCT (A) et RCT (B)	117
Figure 39 : Mise en évidence, par détection différentielle de l'ARN libre, non retardé sur gel d'agarose, des complexes formés entre l'ARN NRE et les glycoformes NCT, R1CT, R3CT et RCT	118
Figure 40 : Schéma des constructions plasmidiques utilisées pour la surexpression de la nucléoline en cellules de mammifère (adapté de la notice Invitrogen)	124
Figure 41 : Schéma des constructions et séquences protéiques utilisées pour la surexpression en cellules de mammifère de la nucléoline pleine taille et de ses mutants de N-glycosylation	126
Figure 42 : Schéma des constructions et séquences protéiques utilisées pour la surexpression en cellules de mammifère de la nucléoline dans laquelle la séquence NLS bipartite a été mutée, et ses mutants de N-glycosylation	127
Figure 43 : Schéma des constructions et séquences protéiques utilisées pour la surexpression en cellules de mammifère de la nucléoline dépourvue de son domaine N-terminal et de sa séquence NLS, ainsi que ses mutants de N-glycosylation	128
Figure 44 : Etude par cytofluorimétrie en flux de l'expression de surface de la nucléoline « pleine taille », sans NLS, sur les cellules Hela co-transfectées transitoirement par Rab5-GFP, et les constructions plasmidiques NUC Δ NLS, RBD1 Δ NLS, RBD3 Δ NLS ou RBD3 Δ NLS (manipulation représentative de 3 expériences réalisées séparément)	132

Figure 45 : Etude de colocalisation de la BIP78 réticulaire avec la nucléoline « pleine taille » non mutée, marquée par le 3X-Flag (NUC) et surexprimée en cellules Hela 134

Figure 46 A : Etude de colocalisation de la β 1-4 galactosyltransférase trans-golgienne avec la nucléoline « pleine taille » non mutée (NUC) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1), son deuxième site N-glycosylable (RBD3) et sur ses deux sites simultanément (RBD13), et surexprimée en cellules Hela (cellules Hela Gal-T) 136

Figure 46 B : Etude de colocalisation de la β 1-4 galactosyltransférase trans-golgienne avec la nucléoline « pleine taille » non mutée (NUC) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1), son deuxième site N-glycosylable (RBD3) et sur ses deux sites simultanément (RBD13), et surexprimée en cellules Hela (cellules Hela Gal-T) – Grossissement numérique 3X 137

Figure 46 C : Etude de colocalisation de la β 1-4 galactosyltransférase trans-golgienne avec la nucléoline « pleine taille » sans sa séquence NLS, non mutée (NUC Δ NLS) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ NLS), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ NLS) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ NLS), et surexprimée en cellules Hela (cellules Hela Gal-T) 138

Figure 46 D : Etude de colocalisation de la β 1-4 galactosyltransférase trans-golgienne avec la nucléoline « pleine taille » sans sa séquence NLS, non mutée (NUC Δ NLS) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ NLS), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ NLS) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ NLS), et surexprimée en cellules Hela (cellules Hela Gal-T) - Grossissement numérique 3X 139

Figure 46 E : Etude de colocalisation de la β 1-4 galactosyltransférase trans-golgienne avec la nucléoline sans sa séquence NLS ni son domaine N-terminal acide, non mutée (NUC Δ Nterm) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ Nterm), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ Nterm) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ Nterm), et surexprimée en cellules Hela (cellules Hela Gal-T) 140

Figure 46 F : Etude de colocalisation de la β 1-4 galactosyltransférase trans-golgienne avec la nucléoline sans sa séquence NLS ni son domaine N-terminal acide, non mutée (NUC Δ Nterm) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ Nterm), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ Nterm) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ Nterm), et surexprimée en cellules Hela (cellules Hela Gal-T) - Grossissement numérique 3X 141

Figure 47 A : Etude de colocalisation de Rab5 avec la nucléoline « pleine taille » non mutée (NUC) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1), son deuxième site N-glycosylable (RBD3) et sur ses deux sites simultanément (RBD13), et surexprimée en cellules Hela 145

Figure 47 B : Etude de colocalisation de Rab5 avec la nucléoline « pleine taille » sans sa séquence NLS, non mutée (NUC Δ NLS) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ NLS), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ NLS) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ NLS), et surexprimée en cellules Hela 146

Figure 47 C : Etude de colocalisation de Rab5 avec la nucléoline sans sa séquence NLS ni son domaine N-terminal acide, non mutée (NUC Δ Nterm) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ Nterm), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ Nterm) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ Nterm), et surexprimée en cellules Hela 147

Figure 48 A : Etude de colocalisation de Rab5-Q79L avec la nucléoline « pleine taille » non mutée (NUC) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1), son deuxième site N-glycosylable (RBD3) et sur ses deux sites simultanément (RBD13), et surexprimée en cellules Hela 148

Figure 48 B : Etude de colocalisation de Rab5-Q79L avec la nucléoline « pleine taille » sans sa séquence NLS, non mutée (NUC Δ NLS) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ NLS), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ NLS) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ NLS), et surexprimée en cellules Hela 149

Figure 48 C : Etude de colocalisation de Rab5-Q79L avec la nucléoline sans sa séquence NLS ni son domaine N-terminal acide, non mutée (NUC Δ Nterm) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ Nterm), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ Nterm) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ Nterm), et surexprimée en cellules Hela 150

Figure 49 A : Etude de colocalisation de Rab7 avec la nucléoline « pleine taille » non mutée (NUC) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1), son deuxième site N-glycosylable (RBD3) et sur ses deux sites simultanément (RBD13), et surexprimée en cellules Hela 151

Figure 49 B : Etude de colocalisation de Rab7 avec la nucléoline « pleine taille » sans sa séquence NLS, non mutée (NUC Δ NLS) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ NLS), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ NLS) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ NLS), et surexprimée en cellules Hela 152

Figure 49 C : Etude de colocalisation de Rab7 avec la nucléoline sans sa séquence NLS ni son domaine N-terminal acide, non mutée (NUC Δ Nterm) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ Nterm), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ Nterm) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ Nterm), et surexprimée en cellules Hela 153

Figure 50 A : Etude de colocalisation de CD63 avec la nucléoline « pleine taille » non mutée (NUC) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1), son deuxième site N-

glycosylable (RBD3) et sur ses deux sites simultanément (RBD13), et surexprimée en cellules Hela 154

Figure 50 B : Etude de colocalisation de CD63 avec la nucléoline « pleine taille » sans sa séquence NLS, non mutée (NUC Δ NLS) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ NLS), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ NLS) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ NLS), et surexprimée en cellules Hela 155

Figure 50 C : Etude de colocalisation de CD63 avec la nucléoline sans sa séquence NLS ni son domaine N-terminal acide, non mutée (NUC Δ Nterm) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ Nterm), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ Nterm) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ Nterm), et surexprimée en cellules Hela 156

Figure 51 : Schéma du vecteur pPIC9K utilisé pour la surexpression de la nucléoline humaine dans *Pichia pastoris* (Invitrogen) 175

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1: Proportions en monosaccharides obtenues en GC-MS après dérivation par l'acide heptafluorobutyrique des glycanes des 4 protéines recombinantes NCT, R1CT, R3CT et RCT 92

Tableau 2 : Constantes de dissociation (Kd) et quantités maximales fixées (Rmax) calculées lors des interactions des protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT avec elles-mêmes 107

Tableau 3 : Constantes de dissociation moyennes mesurées par résonance plasmonique de surface lors des interactions entre la lactoferrine humaine et les protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT immobilisées sur un chip CM5 110

Tableau 4 : Amorces et vecteurs matrices utilisés permettant l'obtention des constructions plasmidiques pour l'expression en cellules d'insecte des isoformes, glycosylées ou non, dérivées de la nucléoline humaine 171

Tableau 5 : Amorces et vecteurs matrices utilisés permettant l'obtention des constructions plasmidiques pour l'expression en cellules de mammifère des isoformes, glycosylées ou non, de la nucléoline humaine 174

Tableau 6: Protéines et réactifs utilisés lors des différents essais de co-immunoprécipitation des complexes potentiellement formés entre les protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT, et leurs ligands 189

Publications et communications

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire de thèse ont fait l'objet des publications, communications orales et écrites suivantes :

Publications:

❖ **Losfeld ME**, El Khoury D, Mariot P, Carpentier M, Krust B, Briand JP, Mazurier J, Hovanessian AG and Legrand D. (2009) "The cell surface expressed nucleolin is a glycoprotein that triggers calcium entry into mammalian cells." *Exp. Cell Res.* 315:357-69.

❖ Guinez C, **Losfeld ME**, Cacan R, Michalski JC, and Lefebvre T. (2006) "Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization." *Glycobiology* 16:22-8. (visible en annexe)

Communications orales:

❖ 18th Joint meeting of Glycobiology, Lesquin France (2007) "*Involvement of glycosylation in nucleolin functions*". **Marie-Estelle Losfeld**, Mathieu Carpentier, Joël Mazurier and Dominique Legrand

❖ 8^{ème} journée André Verbert, Lille France (2008) « *La nucléoline de surface, une glycoprotéine qui induit l'entrée de calcium chez les cellules de mammifère.* » **Marie-Estelle Losfeld**, Mathieu Carpentier, Joël Mazurier et Dominique Legrand

Communications écrites:

❖ 8th lactoferrin congress, Nice France (2007) "*Nucleolin: an atypically-glycosylated receptor for lactoferrin at the surface of dividing cells.*" **Marie-Estelle Losfeld**, Mathieu Carpentier, Joël Mazurier and Dominique Legrand

❖ 34th FEBS Congress, Prague, République Tchèque (2009) "*The cell surface expressed nucleolin is a glycoprotein that triggers calcium entry into mammalian cells*" **Marie-Estelle Losfeld**, Diala El Khoury, Pascal Mariot, Mathieu Carpentier, Bernard Krust, Jean-Paul Briand, Joël Mazurier, Ara G. Hovanessian and Dominique Legrand

❖ 20th Joint meeting of Glycobiology, Cologne Allemagne (2009) "*Involvement of N-glycosylation in nucleolin interaction properties*" **Marie-Estelle Losfeld**, Mathieu Carpentier, Joël Mazurier and Dominique Legrand

Généralités

1. INTRODUCTION GENERALE

La nucléoline ou protéine C23 (Orrick *et al.*, 1973) est une protéine ubiquitaire, identifiée pour la première fois dans le nucléole de cellules hépatiques, où elle se localise essentiellement dans les régions fibrillaires et granulaires denses (Bugler *et al.*, 1982; Orrick *et al.*, 1973). La nucléoline peut ainsi représenter jusque 10% du pool de protéines nucléolaires dans les cellules en division (Bugler *et al.*, 1982)

Bien que la majeure partie de la nucléoline soit nucléaire, une fraction de la nucléoline est retrouvée au niveau du cytosol, mais aussi, de façon intéressante, au niveau de la surface cellulaire (Pfeifle et Anderer, 1983). Ces localisations multiples lui permettent d'exercer ses nombreuses fonctions dans toute la cellule, tant dans le noyau qu'à la surface cellulaire. Au niveau nucléaire, elle intervient principalement dans la biogenèse des ribosomes mais aussi dans des remaniements chromatiniens (Srivastava et Pollard, 1999). Au niveau du cytosol, elle sert au transport et à l'assemblage des particules ribosomales, et est impliquée dans l'apoptose (Pasternack *et al.*, 1991). Quant à la nucléoline de surface, elle peut servir de récepteur "navette" ou de co-récepteur à de nombreux ligands pour leur endocytose et leur adressage nucléaire (Legrand *et al.*, 2004; Said *et al.*, 2002)

La nucléoline est donc clairement une molécule multifonctionnelle dont tous les mécanismes d'action et les relations structure-fonctions sont encore loin d'être caractérisés. Nous nous proposons, au cours de ces Généralités, de présenter une revue exhaustive des connaissances acquises concernant cette molécule aux multiples facettes.

2. LOCALISATION CELLULAIRE ET SYNTHÈSE DE LA NUCLÉOLINE

2.1 Localisation cellulaire de la nucléoline

La nucléoline est une protéine ubiquitaire qui est retrouvée majoritairement dans le noyau, et plus particulièrement le nucléole (Borer *et al.*, 1989), mais qui est également retrouvée dans le cytoplasme et à la surface cellulaire (Figure 1, p.2).

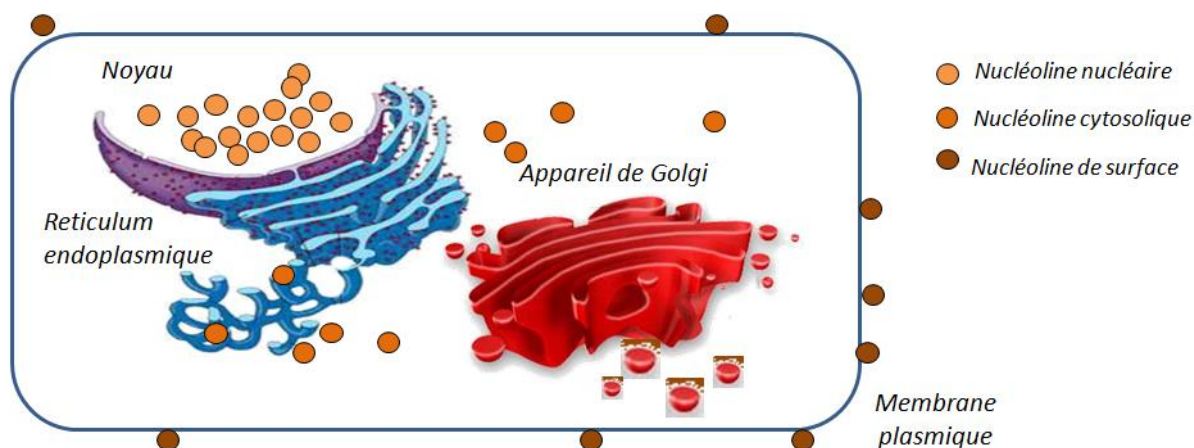


Figure 1 : Localisation cellulaire de la nucléoline

La localisation de la nucléoline intracellulaire a été étudiée par diverses méthodes de microscopie chez différents organismes tels que des plantes (Martin *et al.*, 1992), (Tong *et al.*, 1997) ou des cellules de mammifère : CHO (Escande *et al.*, 1985) et cellules hépatiques (Lischwe *et al.*, 1981). Dans tous ces organismes, la nucléoline est majoritairement retrouvée dans les régions fibrillaires du nucléole, tandis qu'elle est parfois retrouvée dans les régions granulaires. La localisation nucléaire de la nucléoline est expliquée par la présence d'une NLS (nuclear localization sequence) dans sa séquence.

Lors de la mitose, la nucléoline est retrouvée à la périphérie des chromosomes métaphasiques (Medina *et al.*, 1995). La localisation de la nucléoline est affectée par l'état de prolifération de la cellule, puisque nucMs1, homologue de la nucléoline chez la luzerne, voit sa localisation changer de manière dépendante du cycle cellulaire, et que son expression est induite lors de la phase G1 dans les cellules méristématiques racinaires

(Bogre *et al.*, 1996). En particulier, chez le pois, il existe un lien étroit entre la stimulation par la lumière et l'activation de certains phytochromes qui régulent la mitose et, en parallèle, l'expression de la nucléoline (Reichler *et al.*, 2001). Dans le même ordre d'idée, il a été observé que, chez des ovocytes de souris, la localisation de la nucléoline est dépendante du stade de développement embryonnaire (Borsuk *et al.*, 1996).

Les formes nucléaires et cytosoliques de la nucléoline sont des protéines identiques, possédant une même structure primaire mais des modifications post-traductionnelles différentes (généralités § 4.5, p.10). Elles transitent entre le noyau et le cytosol afin d'exercer des rôles distincts.

Bohrer *et al.* ont observé les premiers un trafic de la nucléoline entre le noyau et le cytoplasme (Borer *et al.*, 1989). La forme cytoplasmique de la nucléoline a été observée dans d'autres cas, par exemple chez des ovocytes de Xénope qui lors de leur maturation, relarguent une quantité importante de nucléoline hyperphosphorylée du noyau vers le cytoplasme (Messmer et Dreyer, 1993).

Enfin, au cours de la recherche de récepteurs potentiels des lipoprotéines, une forme de surface de la nucléoline a été mise en évidence (Semenkovich *et al.*, 1990). Depuis, de nombreuses études ont décrit d'autres ligands de la nucléoline de surface et ont confirmé son expression sur les cellules. Cependant, sa sécrétion et sa présentation à la surface restent mal connues : la nucléoline ne possède, en effet, aucune séquence d'adressage expliquant sa localisation à la surface cellulaire.

2.2 Variation de l'expression de la nucléoline

Comme expliqué dans le paragraphe précédent, la nucléoline possède différentes localisations lui permettant d'assurer diverses fonctions au sein de la cellule ; cette localisation varie en fonction de l'état de prolifération de la cellule et du taux d'expression de la nucléoline. Ce taux n'est, en effet, pas constant et semble varier en fonction des différents processus physiologiques.

Tout d'abord, la quantité de nucléoline observée dépend des phases du cycle cellulaire. En effet, l'étude de la variation d'expression de nucléoline selon les différentes phases du cycle cellulaire a permis de mettre en évidence que la nucléoline est en

quantité faible dans des cellules privées de sérum, et augmente lors de la stimulation du cycle cellulaire durant les transitions G0/G1 et G1/S et en phase S (Sirri *et al.*, 1997). Cette variation a été observée au niveau de plusieurs protéines AgNOR (argyrophilic nucleolar proteins), dont B23 et la nucléoline pour lesquelles les quantités sembleraient même en balance (Sirri *et al.*, 2000). Par ailleurs, il a été démontré, après synchronisation des cellules en phase G0 du cycle cellulaire des cellules par retrait du sérum du milieu de culture, que le taux de nucléoline restait stable. Cependant, lors de la reprise du cycle, le niveau d'expression de l'ARNm de la nucléoline augmente fortement, alors que le niveau d'expression protéique reste toujours stable. Il a été suggéré que la nucléoline pourrait interagir avec son propre ARNm, et ainsi autoréguler son expression (Kim et Srivastava, 2003).

De plus, Derenzini *et al.* ont montré que l'expression de la nucléoline était liée à l'état de prolifération (Derenzini *et al.*, 1995), puisque la coloration cytohistologique des protéines AgNOR *in situ* montre un changement quantitatif de la nucléoline et de la protéine B23 inversement proportionnel au temps de doublement de cellules cancéreuses humaines. Par ailleurs, la nucléoline serait impliquée dans la prolifération et la différenciation des cellules lymphocytaires (Mehes et Pajor, 1995), Mehes *et al.* ayant observé chez des cellules lymphocytaires que la quantité de nucléoline est augmentée en début de mitose puis décroît progressivement lors de la différenciation cellulaire. Ceci a été confirmé par le fait que, chez les cellules hématopoïétiques, la thrombopoïétine induit la synthèse de certaines protéines, et de l'ARNm de la nucléoline, permettant ainsi leur différenciation (Ito *et al.*, 2003).

D'autre part, la concentration de la nucléoline semble varier suite à l'action d'agents mitogènes ou tumoraux. Ainsi, des facteurs de croissance tels que le FGF-2, un mitogène, sont capables d'induire la production de la nucléoline, et donc d'activer la synthèse ribosomale (Bouche *et al.*, 1987). De même, dans les cellules tumorales, la concentration de la nucléoline se trouve très augmentée et serait liée à différents oncogènes. Il a été prouvé, par des techniques de microarrays que Myc régulait certains gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la croissance ou la différenciation (Coller *et al.*, 2000). Parmi ces gènes, ont été identifiés ceux de la nucléoline et de la fibrillarine, la régulation de la synthèse de la nucléoline pouvant elle-même moduler la biogenèse des ribosomes (Greasley *et al.*, 2000). Myc s'associerait directement à la nucléoline ainsi qu'à

Hsp 70 (Murakami *et al.*, 1991a; Murakami *et al.*, 1991b). De même, l'expression de l'ARNm de la nucléoline est corrélée à un autre oncogène v-Src, et est nécessaire à la progression du cycle cellulaire en phase G1 (Gillet *et al.*, 1993).

Enfin, l'importance de la surexpression de la nucléoline et de sa localisation nucléaire a été démontrée dans le contexte particulier d'une hépatectomie (Konishi *et al.*, 1995). Il a été démontré, que lors des premières heures après une hépatectomie partielle, il y avait une induction de l'expression de la nucléoline et de Hsp 70, ainsi qu'une redistribution nucléaire de ces protéines impliquées dans les étapes précoces de la régénération du foie. La nucléoline serait, par ailleurs, impliquée dans les premières étapes de la germination dentaire, où elle est retrouvée en grande quantité dans les cellules en prolifération, et elle serait régulée par la cytokine midkine (Xie *et al.*, 2007).

L'expression de la nucléoline de surface varie également en fonction de l'état de prolifération des cellules, puisque la forme de surface est essentiellement observée dans des cellules en phase exponentielle de croissance (Hovanessian *et al.*, 2000).

3. ORGANISATION GENIQUE DE LA NUCLEOLINE

3.1 Le gène de la nucléoline : du règne végétal aux mammifères

Le gène de la nucléoline est retrouvé aussi bien chez les végétaux que chez les eucaryotes unicellulaires, les insectes ou les mammifères. Pour cette raison, elle a été étudiée chez de nombreux modèles du règne végétal : par exemple *Arabidopsis* (Didier et Klee, 1992), ou l'Oignon (Martin *et al.*, 1992), et du règne animal : le Hamster (Lapeyre *et al.*, 1987), la Souris (Bourbon *et al.*, 1988a), le Xénope (Rankin *et al.*, 1993) ;(Heine *et al.*, 1993), le Poulet (Maridor et Nigg, 1990), la Carpe (Alvarez *et al.*, 2003) et, bien sûr, l'Homme (Orrick *et al.*, 1973).

L'organisation du gène de la nucléoline peut légèrement varier en fonction des espèces. Cependant, chez les mammifères, les rongeurs et l'Homme en particulier, on observe une organisation similaire en 14 exons et 13 introns. Il existe ainsi entre 84 et 96% d'homologie entre le Hamster, la Souris et d'autres rongeurs (Bourbon *et al.*, 1988).

Le gène de la nucléoline a tout d'abord été étudié sur des cellules de Hamster pour lequel un ADNc de 2,7 kbp a été cloné. L'existence chez la Souris d'une région codante s'étendant sur plus de 9 kbp séparés en 14 exons (Bourbon *et al.*, 1988) reste très conservée parmi les rongeurs (Bourbon et Amalric, 1990). D'autre part, chez ces animaux, il existe plusieurs sites d'initiation et chaque RNA-binding domain (RBD, voir généralités § 4.2) est codé par 2 exons indépendants (Bourbon *et al.*, 1988a).

Chez l'Homme, la nucléoline est issue d'une copie unique d'un gène situé sur le chromosome 2q12qter et formé de 14 exons et de 13 introns longs d'environ 11 kbp (Srivastava *et al.*, 1989; Srivastava *et al.*, 1990), dont deux codent pour 2 snoRNA (small nucleolar RNA) : U20 et U23. Les exons de la nucléoline ont des tailles comprises entre 87 et 478 bp, alors que les introns ont des tailles comprises entre 104 à 1164 bp. L'épissage entre les exons et les introns peut être de 3 types : de type O, c'est-à-dire à la fin d'un codon, pour l'intron 1 et 2 ; de type I, c'est-à-dire entre la 1^{ère} et la 2^{ème} base d'un codon, pour les introns 3, 4, 5, 7, 9, 11, et 13 ; et de type II, c'est-à-dire entre la 2^{ème} et 3^{ème} base d'un codon, pour les introns 6, 8, 10 et 12.

Contrairement aux rongeurs, il n'existe chez l'Homme qu'un seul site d'initiation de la transcription : une cytosine située 112 bp en amont du codon d'initiation de la traduction au milieu d'un îlot CpG. Par ailleurs, les éléments promoteurs de la nucléoline possèdent une TATA box atypique (GTTA), une CCAAT box pour 3 séquences complémentaires inverses et 2 séquences riches en base pyrimidine.

Enfin, le site de polyadénylation situé à l'extrémité 3' (classiquement AATAAA) apparaît absent chez l'Homme, et est légèrement modifié chez la Souris ou le Xénope.

3.2 Régulation génique de la nucléoline

Chez l'Homme, la séquence promotrice du gène et le premier intron possèdent plusieurs sites potentiels de fixation des facteurs de transcription Sp1, GCF, CRE-fos, AP-1 et AP-2, NF-1, ainsi que des séquences homologues à celles de fixation du récepteur au glucocorticoïdes, qui sont capables d'inhiber ou d'activer la transcription de la nucléoline.

D'autre part, l'extrémité 3'UTR du gène contient une région de 5 blocs homologues d'environ 100 bp, très conservée chez l'Homme, la Souris et le Hamster. Ceci laisse

supposer un rôle de l'extrémité 3'UTR dans la régulation du taux d'expression de l'ARNm de la nucléoline (Srivastava *et al.*, 1990).

4. STRUCTURE PROTEIQUE DE LA NUCLEOLINE

La nucléoline est une protéine ubiquitaire de 713 acides aminés, pour une masse théorique de 77 kDa. Bien que la nucléoline soit retrouvée chez des organismes très différents, certaines caractéristiques structurales sont fortement conservées, surtout au niveau des domaines d'interaction avec les acides nucléiques.

Divers homologues de la nucléoline des mammifères ont ainsi été décrits, telles que Nsr1 chez la levure (Lee *et al.*, 1991) dont le gène de 1707 bp code pour une protéine de 67 kDa contenant uniquement 2 RBD, ou bien encore pXomN1 chez le Xénope dont l'ADNc de 2,1 kbp code pour 526 acides aminés. Chez le Xénope, on observe que le domaine N-terminal est homologue à 42% de celui des mammifères, alors que le domaine C-terminal est homologue à 87% (Caizergues-Ferrer *et al.*, 1989).

L'étude de la séquence en acides aminés de la nucléoline humaine révèle une organisation structurale en trois domaines distincts caractérisés par leurs fonctions et leur composition en acides aminés (Figure 2, p.7).

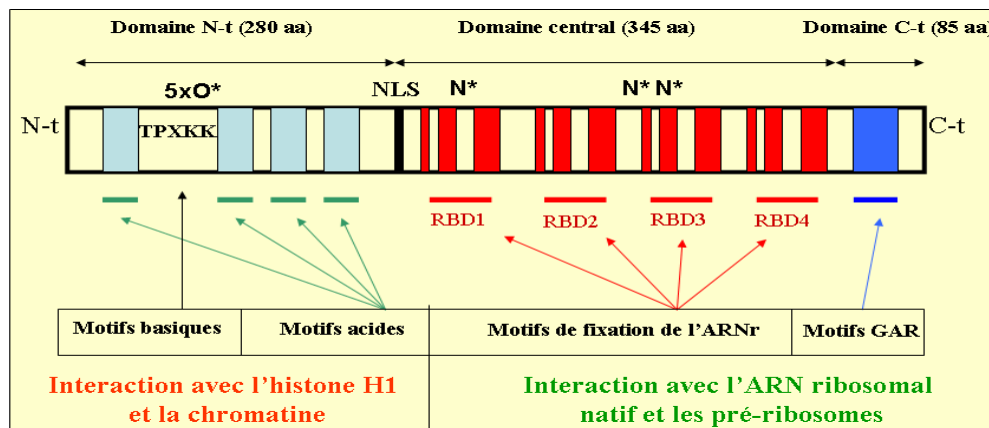


Figure 2: Schéma de l'organisation en domaine de la nucléoline humaine

Représentation des domaines N-terminal (N-t), central et C-terminal (C-t) de la nucléoline, et indication des motifs les composant et de leurs ligands intracellulaires majeurs ; les N* et les O* indiquent, respectivement, les sites potentiels de N- et de O-glycosylation (Carpentier *et al.*, 2005).

La nucléoline est ainsi composée d'un domaine N-terminal acide, d'un domaine central globulaire et d'un domaine C-terminal basique (Lapeyre *et al.*, 1986; Lapeyre *et al.*, 1987) qui lui confèrent la capacité d'interagir avec différents ligands, et donc d'effectuer de multiples fonctions.

4.1 Domaine N-terminal

Le domaine N-terminal de 280 acides aminés est fortement chargé négativement, la grande majorité des résidus étant de nature acide. Cette caractéristique, et donc la fixation moindre du SDS sur la protéine, permettent d'expliquer la masse électrophorétique apparente de 105 kDa estimée en SDS-PAGE (au lieu de 77 kDa). Le domaine N-terminal est essentiellement composé d'hélices α alternant des motifs acides et basiques TPXKK (Erard *et al.*, 1990; Erard *et al.*, 1988).

Le domaine N-terminal est séparé du domaine central globulaire de la nucléoline par une séquence NLS (nuclear localization sequence) bipartite (Schmidt-Zachmann et Nigg, 1993) qui permet sa localisation nucléaire (Creancier *et al.*, 1993). Aucune autre séquence d'adressage ou de sécrétion n'est retrouvée dans la nucléoline.

4.2 Domaine central

Le domaine central globulaire, de 345 acides aminés, est composé de 4 domaines de fixation aux ARN, appelés RNA-binding domains (RBD). Les RBD de la nucléoline sont composés de 80 à 90 acides aminés présentant une alternance de motifs hydrophiles et hydrophobes leur permettant d'interagir avec les structures tiges/boucles des ARN. Ces RBD possèdent deux types de séquences consensus RNP (ribonucléoprotéine) (Bugler *et al.*, 1987) notés RNP-1 ((R/K)G(F/Y)(G/A)(F/Y)VX(F/Y)) et RPN-2 ((L/I)(F/Y)(V/I)(G/K)(G/N)-L) (Serin *et al.*, 1997). La zone regroupant les domaines RBD1 et 2 est la seule partie de la nucléoline dont la structure exacte a été déterminée par RMN (Allain *et al.*, 2000a; Allain *et al.*, 2000b) (Figure 3, p.9).

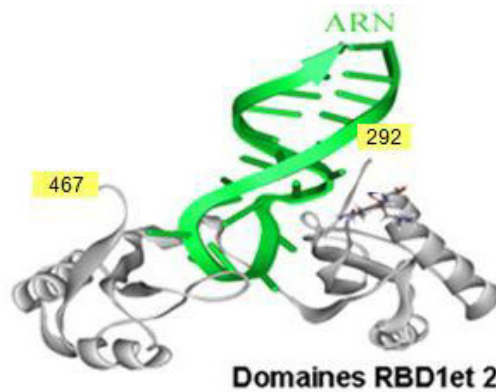


Figure 3 : Domaines RBD1 et 2 en interaction avec une séquence d'ARN NRE (données de RMN, Allain *et al.*, 2000)

4.3 Domaine C-terminal

Le domaine C-terminal de la nucléoline comporte 85 acides aminés où l'on retrouve de nombreux motifs « Glycin Arginin Rich » (GAR), riches en résidus d'arginine alternés avec des résidus de glycine et de phénylalanine.

4.4 Domaines d'interactions

La structure en domaines de la nucléoline lui permet d'interagir avec de nombreux ligands.

Dans le domaine N-terminal, les motifs TPXKK permettent d'établir des liaisons ioniques avec les histones H1 (Erard *et al.*, 1988), et d'interagir avec de nombreuses protéines ribosomales.

En ce qui concerne le domaine central, la présence d'un ou plusieurs RBD est retrouvée dans de nombreuses protéines jouant un rôle dans l'épissage et la maturation des pré ARNm, la traduction et la stabilité des ARNm (Dreyfuss *et al.*, 1993a). Les RBD interagissent avec différentes séquences d'ARN dont les ARN ribosomiaux (ARNr) (Ghisolfi *et al.*, 1990), l'ARNm de Bcl-2 (Sengupta *et al.*, 2004), des séquences d'ARN viral (Barrijal *et al.*, 1992; Izumi *et al.*, 2001), les séquences d'ARN de la rénine (Skalweit *et al.*, 2003), et l'ARNm de la bêta-globine (Jiang *et al.*, 2006). Enfin, le domaine central globulaire

intervient dans la fixation de la nucléoline à l'ADN sur les télomères TTAGGG, et peut également fixer l'ATP pour son activité ATPase. (Ginisty *et al.*, 1999).

Le domaine C-terminal de la nucléoline est impliqué, lui aussi, dans de nombreuses fonctions et interactions. Dans le cadre ces interactions, on retrouve des ligands tels que la gp120 du VIH (Said *et al.*, 2005), la lactoferrine (Legrand *et al.*, 2004), la midkine (Said *et al.*, 2002) et les protéines ribosomales (Bouvet *et al.*, 1998). Le domaine GAR de la nucléoline est également important lors de l'interaction de la nucléoline avec les ARNr, car même s'il n'est pas impliqué dans l'affinité ou la spécificité d'interaction avec les ARN, comme c'est le cas des RBD, il participe à la maturation des ARNr et empêche la formation de structures secondaires au sein des ARN (Ghisolfi *et al.*, 1992a) ; (Pellar et DiMario, 2003).

4.5 Modifications post-traductionnelles de la nucléoline

La nucléoline, comme la plupart des protéines, subit des modifications post-traductionnelles qui viennent moduler, activer et inhiber ses fonctions et son trafic intracellulaire. Plus précisément, elle subit la méthylation de ses arginines, l'ADP-ribosylation, la protéolyse, la phosphorylation et la glycosylation.

4.5.1 Phosphorylation

La nucléoline est phosphorylée par plusieurs enzymes, dont le rôle pourrait être de réguler sa localisation et ses fonctions. La phosphorylation de la nucléoline concerne principalement le domaine N-terminal de la protéine.

La nucléoline est phosphorylée par deux enzymes majeures : la caséine kinase NII (CKII) (Caizergues-Ferrer *et al.*, 1987; Schneider et Issinger, 1988) et la p34-cdc2 (cdc2) (Peter *et al.*, 1990). La phosphorylation par la CKII s'effectue sur des résidus de sérine au niveau de son domaine N-terminal acide. La kinase cdc2 phosphoryle la nucléoline au niveau des résidus de thréonine de ses motifs TPXKK, ce qui aurait un rôle au niveau de la mitose (Peter *et al.*, 1990).

Par ailleurs, la nucléoline peut enfin être phosphorylée par la PKC ξ (Zhou *et al.*, 1997) lors de la différenciation de cellules PC12 induite par le NGF, jouant un rôle dans la transduction de signaux.

La nucléoline de surface peut, quant à elle, être phosphorylée par l'ectoprotéine kinase (Jordan *et al.*, 1994).

4.5.1.1 Rôle de la phosphorylation par CKII

L'action de la CKII sur la nucléoline régulerait la transcription des ADNr (Belenguer *et al.*, 1989), puisqu'une augmentation d'expression de la kinase et de son activité sur la nucléoline augmente très fortement la transcription des ARNr. En contrepartie, la phosphorylation du domaine N-terminal de la nucléoline régule son interaction avec l'histone H1. (Erard *et al.*, 1988).

Par ailleurs, l'action de la CKII est corrélée au cycle cellulaire puisqu'en plus d'être très active lors de l'embryogenèse, elle est également importante lors de la prolifération cellulaire et décroît lors de l'arrêt du cycle (Schneider et Issinger, 1989). La phosphorylation par CKII a essentiellement lieu dans les cellules en croissance durant l'interphase, impliquant la translocation de la nucléoline du cytoplasme vers le noyau; la nucléoline serait alors impliquée dans l'organisation nucléolaire en phase G1. De plus, le FGF-2, facteur induisant la transition G1/S, peut, une fois dans le noyau, activer la transcription des ARNr en activant la CKII qui, à son tour, phosphoryle la nucléoline (Bouche *et al.*, 1994), et ce de façon directe (Bonnet *et al.*, 1996). D'autre part, la phosphorylation de la nucléoline par la CKII augmenterait l'affinité de protéases pour la nucléoline et la génération de deux fragments actifs de 30 et 72 kDa (Warrener et Petryshyn, 1991).

4.5.1.2 Rôle de la phosphorylation par cdc2

Le degré de phosphorylation de la protéine par cdc2 semble être en relation avec le degré de prolifération des cellules. A partir de peptides phosphorylés *in vitro* par cdc2 et mimant les domaines d'interaction de la nucléoline et de l'histone H1, Kharrat *et al.* ont démontré que le degré de phosphorylation intervient dans la structuration des peptides,

favorisant leur interaction et les rendant capables de modifier le degré de condensation de la chromatine (Kharrat *et al.*, 1991). L'hypothèse que la phosphorylation de la nucléoline par la p34-cdc2 kinase jouerait un rôle dans la réorganisation mitotique a été confirmée *in vitro* sur la levure par Gulli *et al.* avec gar2, l'homologue de la nucléoline chez cet organisme (Gulli *et al.*, 1997). Cependant, le MPF maturation promoting factor (p34-cdc2/cycline B) n'est pas essentiel pour le rôle de la nucléoline dans la nucléogénèse et sa localisation nucléolaire suite à la division cellulaire (Zhu *et al.*, 1999).

A l'inverse de la phosphorylation par la CKII, celle réalisée par la kinase cdc2 semble rediriger la nucléoline du noyau vers le cytoplasme (Schwab et Dreyer, 1997), car la nucléoline phosphorylée par p34-cdc2 est essentiellement cytoplasmique, tandis que la forme déphosphorylée est plutôt nucléaire. Cette localisation nucléaire est également augmentée par la phosphorylation par CKII.

Il existerait donc une balance entre les phosphorylations par CKII et cdc2, CKII agissant lors de l'interphase, et p34-cdc2 lors de la mitose en participant à la réorganisation de la chromatine nucléolaire (Belenguer *et al.*, 1990). L'ensemble de ces phosphorylations constitue donc un élément régulateur du trafic noyau-cytoplasme médié par la séquence NLS.

4.5.2 ADP-ribosylation

L'ADP-ribosylation est une modification qui consiste en l'ajout d'ADP-ribose sur un acide aminé à partir du NAD⁺. Cette modification de la nucléoline, décrite dans le noyau de cellules Hela (Leitinger et Wesierska-Gadek, 1993), pourrait avoir un rôle au niveau des interactions chromatiniennes. Dans la littérature, d'autres indices montrent une relation entre nucléoline et ADP-ribosylation. Par exemple, la nucléoline interagit avec la PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymérase 1) lors de l'apoptose de cellules de patients leucémiques (Mi *et al.*, 2003).

4.5.3 Méthylation

Le domaine C-terminal de la nucléoline, riche en résidus de glycine et d'arginine, peut être méthylé ou diméthylé sur les résidus d'arginine (Lapeyre *et al.*, 1986). La

diméthylation des arginines est rendue possible par le faible encombrement stérique des glycines environnantes (Lischwe *et al.*, 1985).

Tandis que la délétion du domaine GAR modifie la localisation de la nucléoline dans le nucléole, la mutation des arginines diméthylées ne modifie pas ses propriétés de localisation (Pellar et DiMario, 2003). Cette région interviendrait dans la déstabilisation des structures secondaires des ARN (Ghisolfi *et al.*, 1992a; Ghisolfi *et al.*, 1992b).

Des études réalisées à l'aide de peptides mimétiques de la région C-terminale de la nucléoline (ou d'autres protéines contenant un domaine GAR) montrent, d'une part, que ces peptides rentrent en compétition pour la méthylation *in vivo* dans des cellules PC12, et *in vitro* (Najbauer *et al.*, 1993). D'autre part, si ces peptides sont méthylés, voire diméthylés, l'interaction de la nucléoline avec les acides nucléiques semble modifiée. Le domaine GAR pourrait ainsi jouer un rôle sur la stabilité des complexes ARN /nucléoline (Raman *et al.*, 2001).

Par ailleurs, il est possible que la méthylation des arginines du domaine C-terminal puisse jouer un rôle dans l'export nucléaire de la nucléoline, tout comme pour hnRNP Np13p (Shen *et al.*, 1998).

4.5.4 Protéolyse

Lors de la publication de la séquence de l'ADNc de la nucléoline, Srivastava *et al.* ont décrit plusieurs sites de clivage dibasiques de la protéine (Srivastava *et al.*, 1989). Cependant, le clivage de la nucléoline ne se limite pas à ces sites, et certains fragments de nucléoline se sont révélés être actifs dans divers processus.

Il existerait en fait un lien entre le degré de phosphorylation de la nucléoline par la CKII et la génération de fragments de dégradation. Des fragments d'une masse moléculaire de 30 et 72 kDa, fortement phosphorylés, ont été observés (Warrener et Petryshyn, 1991).

Par ailleurs, la nucléoline possède une activité autoprotéolytique générant des fragments de 100, 70, 60, et 50 kDa (Chen *et al.*, 1991), et inhibée en cours de prolifération : son activité est maximale lorsque les cellules ne prolifèrent pas, et décroît lors de leur entrée en prolifération (Fang et Yeh, 1993).

Enfin, lors de l'apoptose, la nucléoline est clivée en fragments de 80 et 37 kDa

(Morimoto *et al.*, 2001); (Kito *et al.*, 2003), qui participent à l'activation des endonucléases. Ces fragments semblent issus soit de l'action de la caspase 3 (Brockstedt *et al.*, 1998), soit du granzyme A (Pasternack *et al.*, 1991) ; (Smyth *et al.*, 1994).

4.5.5 Glycosylation

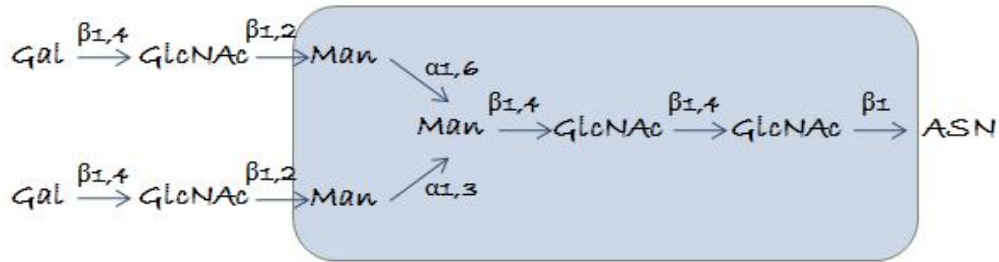
Sur la base de la séquence d'ADNc de la nucléoline, 3 sites potentiels de N-glycosylation ont été décrits sur la séquence de la nucléoline, au niveau des asparagines 317, 478 et 492 (Srivastava *et al.*, 1989).

Cependant, la preuve formelle de l'existence d'une isoforme glycosylée de la nucléoline n'a été apportée qu'en 2005 au sein de notre laboratoire (Carpentier *et al.*, 2005). La structure des glycanes de la nucléoline a été déterminée grâce aux techniques de reconnaissance lectinique, de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La nucléoline humaine cytosolique et de surface est glycosylée par 2 N-glycanes et 2 O-glycanes. Les 2 N-glycanes sont de types biantennés lactosaminiques asialylés (Figure 4, p.15), et sont localisés sur les asparagines 317 et 492, appartenant respectivement aux domaines RBD1 et RBD3. Les O-glycanes sont de types I sialylés (Figure 4, p.15) et localisées sur 5 sites potentiels de O-glycosylation parmi les motifs TPXKK du domaine N-terminal. La présence de O-glycanes fucosylés sur la nucléoline bovine a également été décrite très récemment (Aldi *et al.*, 2009).

Cependant, la glycosylation de la nucléoline est atypique puisqu'elle ne possède pas de séquence de reconnaissance de la particule SRP, ni aucune autre séquence lui permettant d'emprunter la voie de sécrétion classique.

Par ailleurs, la présence d'une modification post-traductionnelle telle que la glycosylation dans des sites fonctionnels, comme les RBD et les motifs TPXKK, laisse entrevoir la possibilité d'une régulation fonctionnelle de la nucléoline par ces modifications.

2 N-glycanes biantennés de type lactosaminique asialylé



2 O-glycanes de type I sialylé

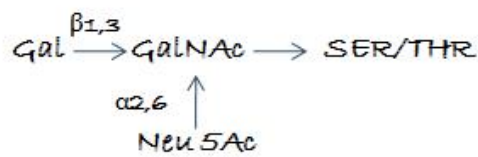


Figure 4 : Structure des N- et O-glycanes de l'isoforme glycosylée de la nucléoline humaine

Représentation schématique de l'assemblage des monosaccharides composant les 2 N-glycanes de type biantennés lactosaminique asialylés et les 2 O-glycanes sialylés de la nucléoline. La nomenclature utilisée est : Man= mannose ; GlcNAc= N-Acétyleglucosamine ; Gal= galactose ; GalNAc= N-Acétylegalactosamine ; Neu5Ac= acide sialique.

4.6 Particularités structurales de la nucléoline de surface

Comme nous l'avons décrit précédemment, la nucléoline de surface possède des modifications post-traductionnelles particulières comme la phosphorylation par l'ectoprotéine kinase et la glycosylation. Cependant, peu de choses sont connues concernant l'expression et la présentation de la nucléoline à la surface cellulaire. Hovanessian *et al.* ont montré, par microscopie confocale, que la nucléoline humaine est assemblée en clusters à la surface cellulaire en présence d'un anticorps reconnaissant la partie C-terminale de la protéine, alors qu'aucun assemblage n'est observé pour la nucléoline nucléaire (Hovanessian *et al.*, 2000). Ces assemblages de nucléoline semblent dépendants de l'intégrité du cytosquelette d'actine, puisqu'un inhibiteur de la polymérisation de l'actine augmente les clusters. De plus, la nucléoline de surface semble interagir avec les radeaux lipidiques pour sa présentation à la surface cellulaire (Nisole *et al.*, 2002a).

5. LA NUCLEOLINE NUCLEAIRE ET CYTOSOLIQUE : TRAFIC ET FONCTIONS

La nucléoline possède des formes nucléaires et cytosoliques dont le trafic et les fonctions sont essentiels pour la cellule.

5.1 Trafic nucléo-cytoplasmique de la nucléoline

La nucléoline transite entre le noyau et le cytoplasme. Ce trafic nucléo-cytoplasmique étant essentiel à certaines fonctions de la nucléoline, il est régulé par différents systèmes incluant les modifications post-traductionnelles décrites précédemment et la présence, comme d'autres protéines nucléaires, d'une séquence NLS (Schmidt-Zachmann et Nigg, 1993).

Xue *et al.* ont démontré que le domaine N-terminal de la nucléoline est nécessaire pour l'efficacité du trafic de la molécule, bien que ce domaine ne contienne pas de séquence d'export nucléaire NES (Xue et Melese, 1994). Par ailleurs, de même que sa séquence NLS bipartite, l'état de phosphorylation de la nucléoline semble essentiel à la régulation de son trafic nucléo-cytoplasmique (voir généralités § 4.5.1, p.10). La méthylation des arginines du domaine C-terminal est également très importante (voir généralités § 4.5.3, p.12).

5.2 Fonctions de la nucléoline nucléaire et cytosolique

La nucléoline est impliquée dans plusieurs étapes essentielles de la vie et la mort cellulaire. En effet, son expression et sa localisation sont corrélées aux étapes du cycle cellulaire : elle participe à la biogenèse des ribosomes, à la nucléogénèse et à l'action de facteurs de transcription (Figure 5, p.17). D'un autre côté, la nucléoline possède des activités anti- ou pro-apoptotiques en fonction de son état de dégradation et grâce à son interaction avec des facteurs tels que Bcl-2 ou p53.

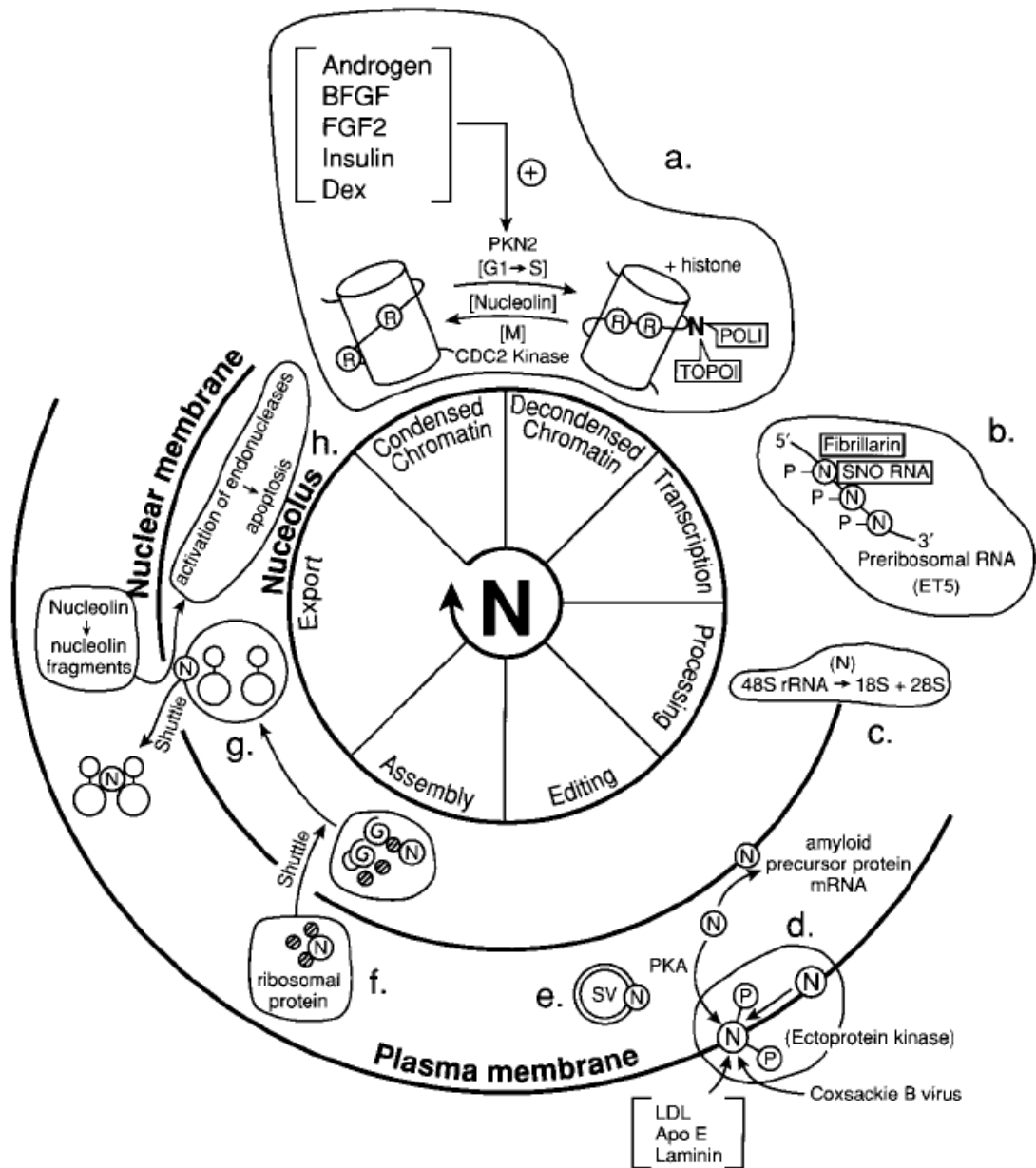


Figure 5 : Rôles de la nucléoline dans le cycle cellulaire et la biogenèse des ribosomes (extrait de Srivastava et Pollard, 1999)

- a) Condensation chromatinienne; b) Rôles dans la maturation des pré-ARN; c) Maturation de l'ARN 48S ;
- d) Fonctions à la surface cellulaire ; e) Vésicule d'excrétion ; f) Activités d'import des protéines ribosomales ;
- g) Activités d'export des particules pré-ribosomales ; h) Mort cellulaire et apoptose

5.2.1 Biogenèse des ribosomes

A l'origine, la nucléoline n'était perçue que comme une protéine fixant les ARN. Elle s'est cependant révélée intervenir à de nombreux niveaux dans la biogenèse des ribosomes, mais aussi dans l'organisation nucléolaire (Jordan, 1987).

La nucléoline est une protéine essentielle de la biogenèse des ribosomes et intervient dans de nombreuses étapes de ce processus (Figure 5, p.17). Elle est ainsi une protéine clef de la synthèse des ARNr avec lesquels elle interagit spécifiquement, de même qu'avec certaines protéines ribosomales. Suite à ces interactions, la nucléoline sert de protéine cargo : grâce à son trafic nucléo-cytoplasmique finement régulé par phosphorylation et, en emmenant les ARNr et les protéines ribosomales jusque dans le cytoplasme, elle participe également à l'assemblage des particules ribosomales (Tuteja et Tuteja, 1998).

5.2.1.1 Rôle dans la synthèse des ARNr et leur reconnaissance spécifique

La nucléoline a été détectée dans des régions fibrillaires denses du nucléole (Escande-Geraud *et al.*, 1985; Lischwe *et al.*, 1981) et sur pré-ARNr naissant (Ghisolfi-Nieto *et al.*, 1996; Herrera et Olson, 1986).

5.2.1.1.1 Rôle dans la synthèse des ARNr

Concernant la synthèse des ARNr, la nucléoline est active au niveau chromatinien lui-même, puisqu'une petite fraction de nucléoline est fixée fortement à la chromatine (Olson *et al.*, 1975). La nucléoline interagit avec l'histone H1 par l'intermédiaire de ses motifs N-terminaux TPXKK (Erard *et al.*, 1988), mais elle n'interagit pas avec le nucléosome et n'est pas retrouvée dans le complexe RNAPol1. L'interaction avec l'histone H1 aiderait ainsi à la décondensation chromatinienne. La nucléoline participerait donc à la décondensation chromatinienne de l'ADN nucléolaire en se fixant par son extrémité N-terminale dans des régions non-transcrites de l'ADNr, guidant ainsi l'accès de la topoisomérase I et de l'ARN polymérase I pour la transcription des ARNr (Erard *et al.*, 1988; Srivastava et Pollard, 1999).

L'intervention de la nucléoline dans la synthèse des ARNr serait également régulée par sa phosphorylation induite, par exemple, par des facteurs de croissance (Bonnet *et al.*, 1996; Bouche *et al.*, 1987) ; (Issinger *et al.*, 1988).

D'autre part, il a été montré que si la transcription des ARNr est bloquée, la nucléoline est relarguée des régions fibrillaires denses (Escande-Geraud *et al.*, 1985). La synthèse de la nucléoline et celle des ARNr sont corrélées (Meyuhas *et al.*, 1990), ce qui implique l'intervention de la nucléoline dans la transcription des ARNr. De même, les fragments de nucléoline formés pendant la prolifération pourraient avoir une activité propre lors de la transcription des ARNr. En présence d'histone et polyamines, le profil de dégradation de la nucléoline est, en effet, modifié (Suzuki *et al.*, 1993).

5.2.1.1.2 Rôle dans la maturation des ARNr

La nucléoline est impliquée dans la maturation des ARNr. Cela a été démontré chez la levure, où des homologues de la nucléoline (Nsr1p et Gar2) sont nécessaires à la maturation correcte des ARNr (Gulli *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1992). Ils interviennent aussi dans la synthèse des sous-unités 18S et 40S : gar2 a été ainsi défini comme un « assembleur » des particules pré-ribosomales (Sicard *et al.*, 1998). Ce phénomène est conservé au cours de l'évolution puisque, chez les vertébrés, la nucléoline intervient dans les premières étapes de la maturation des pré-ARNr (Ginisty *et al.*, 1998) qui a lieu pendant la synthèse même du pré-ARNr (Lazdins *et al.*, 1997).

La nucléoline intervient enfin lors de la maturation des ARNr en se fixant par son domaine central à l'extrémité 5' des régions non-transcrites ou 5'ETS des pré-ARNr (Kass *et al.*, 1987). De cette manière, elle participe à l'action de la fibrillarine et des snoRNP (small nucleolar ribonucleoproteins) pour la maturation des ARNr 18S, 28S et 5,8S (Azum-Gelade *et al.*, 1994).

5.2.1.1.3 Reconnaissance des ARNr cibles de la nucléoline

La nucléoline est donc capable de reconnaître et d'interagir spécifiquement avec les ARNr. La première observation faite par Olson *et al.* était que, *in vitro*, la nucléoline interagit préférentiellement avec des séquences d'acides nucléiques simple brin des

régions non transcrites (Olson *et al.*, 1983). Par la suite, il a été démontré que la nucléoline interagissait spécifiquement, par des séquences RNP (ribonucleoproteins) contenues dans ses domaines RBD (Bugler *et al.*, 1987), avec des séquences particulières des ARNr. Deux types principaux d'ARNr sont concernés : les NRE (nucleolin recognition element) (Serin *et al.*, 1997) et les ECM (evolutionary conserved motif) (Ginisty *et al.*, 2000).

Les NRE correspondent à une séquence spécifique U/GCCCGA formant de petites structures tige/boucle retrouvées tout au long des pré-ARNr. L'interaction de la nucléoline avec les séquences NRE nécessite l'intervention des domaines RBD1 et RBD2 (Allain *et al.*, 2000b; Bouvet *et al.*, 2001; Bouvet *et al.*, 1997). Les ECM, eux, sont des séquences situées en aval du site de clivage primaire des ARNr, et reconnues par les 4 domaines RBD de la nucléoline (Ginisty *et al.*, 2001; Ginisty *et al.*, 2000). L'interaction de la nucléoline avec les ARNr natifs permet à celle-ci de participer à leur condensation et packaging.

5.2.1.2 Transport et assemblage des particules pré-ribosomales

Outre son intervention dans la synthèse et la maturation des ARNr, la nucléoline participe également, en tant que navette nucléo-cytoplasmique, à l'import des protéines ribosomales dans le noyau, à l'assemblage puis à l'export des particules pré-ribosomales vers le cytoplasme, où elles seront assemblées en ribosomes fonctionnels (Borer *et al.*, 1989).

Le trafic nucléo-cytoplasmique de la nucléoline est très important pour la biogénèse des ribosomes (Borer *et al.*, 1989; Schmidt-Zachmann et Nigg, 1993), et nécessite d'être finement régulé.

Pour assurer ce trafic, la nucléoline interagit directement avec les protéines ribosomales (Bouvet *et al.*, 1998). La nucléoline serait donc une des premières protéines à interagir avec les différents composants des ribosomes, et serait impliquée dans les toutes premières étapes de l'assemblage des ribosomes (Reboud *et al.*, 1974). Son association avec les particules ribosomales a été démontrée *in vivo* (Bourbon *et al.*, 1983); elle

permettrait d'induire la formation de structures secondaires de séquences d'ARN (Sipos et Olson, 1991).

5.2.2 Nucléoline et prolifération

Comme nous l'avons vu au cours du chapitre précédent, la nucléoline joue un rôle clef dans la synthèse des ribosomes et, par extension, dans la prolifération cellulaire. Différents autres indices sont en faveur d'un rôle important de la nucléoline dans la prolifération. Parmi ces éléments, on relève son interaction avec l'histone H1 et son intervention dans la décondensation chromatinienne. En effet, en interagissant avec l'histone, la nucléoline peut modifier son interaction avec l'ADN et favoriser la transcription des ARNr en facilitant l'accès de la topoisomérase I et de l'ARN polymérase I (Srivastava et Pollard, 1999).

La nucléoline intervient, de façon plus ou moins directe, dans la prolifération cellulaire en agissant sur plusieurs de ses principaux acteurs. Par exemple, la nucléoline humaine et son homologue Nsr1 chez la levure interagissent respectivement avec la topoisomérase 1 humaine et celle de levure, et jouerait ainsi un rôle dans leur localisation (Edwards *et al.*, 2000). Par ailleurs, dans les cellules musculaires lisses du système vasculaire humain, l'urokinase, en se fixant sur son récepteur uPAR, induit la formation d'un complexe activateur de la mitose composé d'uPAR, de la caséine kinase II et de la nucléoline (Dumler *et al.*, 1999). Elle posséderait également des propriétés de répresseur transcriptionnel, d'ADN et ARN hélicase, et d'ATPase ADN-dépendante (Srivastava et Pollard, 1999).

Par ailleurs, il existe une corrélation entre l'état de dégradation de la nucléoline et le cycle cellulaire. D'une part, l'activité autoprotéolytique de la nucléoline peut être inhibée par des extraits nucléaires de cellules en prolifération (Chen *et al.*, 1991), ce qui démontre l'importance de son intégrité dans un contexte prolifératif (Fang et Yeh, 1993). D'autre part, NopA100, protéine homologue de la nucléoline chez les plantes, voit son expression augmentée en fonction des phases du cycle cellulaire parallèlement à son activité nucléolaire, alors que sa dégradation en fragments augmente à l'arrêt du cycle (Gonzalez-Camacho et Medina, 2004; Gonzalez-Camacho et Medina, 2006).

5.2.2.1 Nucléogénèse et embryogénèse

La nucléoline serait nécessaire à la nucléogénèse puisque son taux intracellulaire augmente très fortement lors de l'embryogénèse pendant la phase de gastrulation, durant laquelle le nucléole est reformé (Caizergues-Ferrer *et al.*, 1989). Le rôle de la nucléoline dans l'embryogénèse rejoint son rôle dans la biogénèse des ribosomes, un processus éminemment actif lors de la croissance de l'embryon.

5.2.2.2 Nucléoline et facteurs de transcription

La nucléoline est impliquée dans de nombreuses interactions avec des facteurs de transcriptions ou des oncogènes, leur permettant ainsi d'exercer leurs actions pro- ou antiprolifératives.

La nucléoline interagit directement, en effet, avec Myb et participe à sa régulation (Ying *et al.*, 2000). De même, elle interagit avec IRF-2 (interferon regulatory factor-2) acétylé, qui est un acteur de la croissance cellulaire (Masumi *et al.*, 2006), et K-Ras4B, une oncoprotéine qui nécessite une localisation nucléaire pour son activité. Si l'on diminue l'expression de la nucléoline par siRNA, on observe que l'activité de K-Ras4B est altérée, et la synthèse du facteur de transcription AP-1 empêchée (Birchenall-Roberts *et al.*, 2006).

La nucléoline interagit avec le domaine inhibiteur de la croissance cellulaire de Rb, un suppresseur de tumeur, lors de la phase G1. La théorie d'une activité dérégulée de la nucléoline par un déficit en Rb facilitant le processus tumoral a été émise (Grinstein *et al.*, 2006). Elle peut aussi s'associer à cJun de la même façon que Sp1, et ces complexes peuvent à leur tour se fixer sur des régions promotrices (Tsou *et al.*, 2008).

Enfin, en se fixant sur des promoteurs, la nucléoline joue un rôle dans la régulation de certains facteurs de transcription ou de protéines liées à la prolifération. La nucléoline a ainsi été décrite comme interagissant avec les promoteurs de nombreux facteurs de transcription tels que LR1, AGP, MAR ou certaines répétitions des télomères (Ginisty *et al.*, 1999). Dans les cellules hématopoïétiques murines, la nucléoline active l'expression de Bcl-2 et du CD34 endogène. Elle régulerait également l'expression du CD34 en se fixant

sur une séquence spécifique de la région promotrice du CD34 (Grinstein et Wernet, 2007).

5.2.2.3 Effet anti-prolifératif de la nucléoline

L'inhibition de la nucléoline ou, par extension, celle de ses partenaires, peut également avoir un effet anti-prolifératif. Ainsi, en utilisant des siRNA pour réduire l'expression de la nucléoline, Ugrinova *et al.* ont démontré qu'en l'absence de nucléoline, la cellule s'arrête en phase G2, et que le taux d'entrée en apoptose augmente. De plus, les cellules en mitose présentent un défaut de duplication du centrosome (Ugrinova *et al.*, 2007).

Par ailleurs, la nucléoline est capable d'interagir avec des séquences oligonucléotidiques riches en résidus de guanidine (GRO). La présence de GRO induit un effet anti-prolifératif chez les cellules cancéreuses en modulant la réplication de l'ADN par régulation de l'activité hélicase (Xu *et al.*, 2001).

5.2.3 Nucléoline et apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est une phase importante de la vie cellulaire. La nucléoline intervient également dans ce processus.

5.2.3.1 Etat de dégradation de la nucléoline dans l'apoptose

La relation entre apoptose et nucléoline s'observe, tout d'abord, au niveau de l'expression et la localisation de la nucléoline elle-même. Chez des cellules leucémiques apoptotiques, le niveau d'expression de la nucléoline diminue et sa localisation nucléaire est modifiée : elle est retrouvée au niveau de corps apoptotiques (Mi *et al.*, 2003). Cependant, chez des cellules HL-60 traitées par un inhibiteur de la topoisomérase 1 et en apoptose, la nucléoline contenue dans les fibres intermédiaires nucléaires semble quasi intacte (Martelli *et al.*, 1999; Martelli *et al.*, 2000).

Par ailleurs, Morimoto *et al.* ont montré que les protéines AgNOR, dont fait partie la nucléolin, habituellement localisées dans le noyau et dans le nucléole, sont relocalisées

lors de l'apoptose. Une de ces protéines de 110 kDa, la nucléoline, est clivée lors de l'apoptose de cellules de glandes salivaires en fragments de 80 et 37 kDa (Morimoto *et al.*, 2001) ; (Kito *et al.*, 2003). Les fragments de la nucléoline participent à l'activation des endonucléases lors du processus apoptotique des cellules cibles médié par les lymphocytes T cytotoxiques. Plusieurs protéases semblent pouvoir cliver la nucléoline. D'une part, dans une lignée de lymphome de Burkitt en apoptose, il a été en effet démontré que la nucléoline est retrouvée clivée, et qu'un inhibiteur de la caspase 3 inhibe cette protéolyse (Brockstedt *et al.*, 1998). D'autre part, le granzyme A, qui est une estérase à sérine, se fixe à la nucléoline et la clive *in vitro* et *in vivo* (Pasternack *et al.*, 1991) ; (Smyth *et al.*, 1994).

L'activité de la nucléoline semble également pouvoir être altérée. En effet, un stress génotoxique peut entraîner l'apoptose chez certaines cellules et induire une activité RNA-binding sur des structures tige/boucles de certaines protéines dont la nucléophosmine et la nucléoline (Yang *et al.*, 2002).

5.2.3.2 Implication de la nucléoline dans la voie intrinsèque (Bcl-2)

La nucléoline intervient au niveau de la voie intrinsèque de l'apoptose, voie qui implique la mitochondrie et les protéines de la famille de Bcl-2. De par son activité fixatrice des ARN, la nucléoline interagit avec un AU-rich element (ARE) de l'ARNm de Bcl-2, et participe ainsi à la stabilisation de ce facteur anti-apoptotique (Sengupta *et al.*, 2004). En utilisant un aptamère qui entre en compétition avec l'ARNm de Bcl-2 pour interagir avec la nucléoline, de même qu'en utilisant des siRNA contre la nucléoline, on observe une déstabilisation de l'ARNm de Bcl-2 (Soundararajan *et al.*, 2008). Tout comme certaines drogues, le taxol en particulier, l'acide trans-rétinoïque joue sur cette interaction en sous-régulant la nucléoline qui déstabilise alors l'ARNm de Bcl-2 pour induire l'apoptose (Otake *et al.*, 2005; Otake *et al.*, 2007).

A contrario, la surexpression pathologique de la nucléoline, dans le cas de leucémie chronique, induit la stabilisation de Bcl-2 (Otake *et al.*, 2007). La nucléoline agirait de concert avec Ebp1 afin de stabiliser cet ARNm (Bose *et al.*, 2006). L'interaction entre l'ARNm de Bcl-2 et la nucléoline intervient également au niveau protéique avec la forme phosphorylée de Bcl-2 dans le noyau lors de la mitose (Barboule *et al.*, 2005).

5.2.3 Nucléoline et apoptose médiée par p53

L'apoptose peut être induite par p53 suite à des lésions de l'ADN ou à des anomalies du cycle cellulaire. Là encore, la nucléoline participe à la régulation de ce suppresseur de tumeur clef. Elle agit tout d'abord au niveau de l'expression de p53 : suite à l'irradiation de cellules ayant entraîné des lésions de l'ADN, la nucléoline, tout comme la protéine RPL26, induit la transcription de la protéine p53 (Takagi *et al.*, 2005). Elle agit également de façon directe sur cet oncogène. En effet, la protéine p53 possède un domaine C-terminal contenant des « domaines de mort cellulaire » servant à former des complexes pro-apoptotiques. Dans des cellules saines, ce domaine est clivé juste avant le début de l'apoptose, et est transloqué du cytoplasme vers le noyau où il se fixe à la nucléoline (Pick *et al.*, 2006). Enfin, la nucléoline agit en freinant l'action des antagonistes de p53 comme Hdm-2, en empêchant son auto-ubiquitinylation et en réduisant son niveau d'expression protéique (Saxena *et al.*, 2006).

5.3 Implication de la nucléoline dans les pathologies

La nucléoline intervient, au niveau nucléaire, dans la régulation de la prolifération, la condensation de la chromatine ... Parfois, la dérégulation de ces processus correspond à une pathologie où la nucléoline peut jouer le rôle d'une protéine chaperonne ou régulatrice (Ugrinova *et al.*, 2007).

5.3.1 Nucléoline et maladie d'Alzheimer

Lors de la maladie d'Alzheimer, il y a synthèse de plaques neurofibrillaires (NFT) qui sont phosphorylées et forment un épitope TG3, contre lequel existent des anticorps monoclonaux. L'hyperphosphorylation de la nucléoline par la kinase cdc2 lors de cette pathologie crée les mêmes épitopes, reconnus par ces anticorps. Ce pool de nucléoline est retrouvé lors de la prophase, et associé aux chromosomes lors de la métaphase. Dans le cerveau, la nucléoline est un marqueur précoce des NFT (Dranovsky *et al.*, 2001). Par ailleurs, il a été observé que la p42IP4 spécifique du cerveau est surexprimée lors de la maladie d'Alzheimer, et que cette surexpression aurait pour conséquence une interaction

accrue de la p42IP4 avec la nucléoline (Reiser et Bernstein, 2004). Ces différents éléments suggèrent une intervention de la nucléoline dans certaines étapes de la maladie d'Alzheimer.

5.3.2 Nucléoline et cancer

La nucléoline étant très fortement liée au cycle cellulaire, à l'état de prolifération et à l'apoptose, il n'est pas étonnant de la retrouver impliquée dans certains processus cancéreux (Storck *et al.*, 2007) où les cellules en hyper-prolifération échappent à l'apoptose. Plusieurs études vont dans ce sens : ainsi, l'expression de la nucléoline est fortement augmentée dans les mélanomes (Mourmouras *et al.*, 2009) De plus, il a été démontré que, lors de cancers invasifs du sein, l'expression et la distribution de la nucléoline sont modifiées en fonction de la stimulation ou non des récepteurs aux œstrogènes (Masiuk *et al.*, 2007). Par ailleurs, le niveau de nucléoline et sa localisation semblent également perturbés dans les cellules leucémiques (Mi *et al.*, 2003). En effet, lors du traitement par radiothérapie, qui permet une entrée en force des cellules en apoptose, il a été observé une disparition quasi-totale de la nucléoline cytosolique et une relocalisation nucléaire pouvant être inhibée en présence d'un inhibiteur de la PARP. Ceci suggère un rôle important de la surexpression de la nucléoline, dans la prolifération et dans l'immortalité des cellules cancéreuses.

6. LA NUCLEOLINE DE SURFACE : EXPRESSION ET ROLES

6.1 Expression de la nucléoline à la surface cellulaire

L'expression de la nucléoline à la surface cellulaire a, pendant de nombreuses années, été considérée comme artéfactuelle. En effet, la présence d'une protéine nucléaire possédant une NLS et sans signal de sécrétion à la surface cellulaire est surprenante. Cependant, de nombreuses preuves de l'existence d'une isoforme de surface de la nucléoline ont été apportées. Tout d'abord, la nucléoline de surface s'est révélée être le récepteur ou co-récepteur de nombreuses molécules. Le premier exemple concerne la fixation des apolipoprotéines (Semenkovich *et al.*, 1990) (généralités § 6.2.2.1, p.29). D'autre part, en 1994, il a été démontré par marquage radioactif qu'une kinase présente à la surface cellulaire et ressemblant à la caséine kinase, l'ectoprotéine kinase, est capable de phosphoryler la nucléoline de surface (Jordan *et al.*, 1994). Enfin, Sorokina et Kleinman (1999) ont effectué le clonage d'une protéine, la nucléoline, fixant le calcium à la surface apicale des cellules tubulaires rénales (Sorokina et Kleinman, 1999).

Cependant, les fonctions exactes, les mécanismes d'expression à la surface cellulaire, l'association à la membrane et le trafic de la nucléoline sont encore mal connus, même si certains indices existent. Tout d'abord, la sécrétion de la nucléoline à la surface est dépendante du cycle cellulaire. La sécrétion de la nucléoline serait dépendante d'un trafic vésiculaire différent de la voie de sécrétion classique (Hovanessian *et al.*, 2000). La nucléoline de surface, une fois sécrétée, semble être associée aux lipid rafts où, suite à une interaction avec un ligand (Nisole *et al.*, 2002a), elle formerait des clusters sensibles au Triton X100. Cet assemblage est dépendant du cytosquelette d'actine puisque la cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, induit l'agrégation de la nucléoline de surface, mais serait indépendant des filaments intermédiaires et des microtubules (Hovanessian *et al.*, 2000). D'autre part, la réinternalisation de la nucléoline en présence de certains ligands semble être dépendante de vésicules formées en une quinzaine de minutes à 37°C, mais est inhibée à basse température, ce qui démontre une entrée selon un processus actif (Hovanessian *et al.*, 2000).

6.2 Interactions et rôles de la nucléoline de surface

La nucléoline cytosolique et celle de surface possèdent des rôles qui leur sont propres, et souvent très différents de ceux de la forme nucléolaire.

6.2.1 Interaction de la nucléoline avec des composants de la matrice extracellulaire

La nucléoline de surface interagit avec des éléments de la matrice extracellulaire tels que les protéoglycanes, de type héparane sulfate (Joo *et al.*, 2005), ou bien encore la laminine (Kleinman *et al.*, 1991).

6.2.1.1 Nucléoline et protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des molécules de la matrice extracellulaire qui interagissent avec de nombreuses protéines de la surface cellulaire. La question de l'interaction possible d'une protéine de surface telle que la nucléoline avec les protéoglycanes est inévitable. De nombreux indices semblent démontrer une interaction possible de la nucléoline avec les protéoglycanes : l'inhibition *in vitro* de la phosphorylation de la nucléoline par CKII par l'héparine (Caizergues-Ferrer *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1996) ; la modulation de l'interaction de la nucléoline avec certains de ses ligands comme la midkine (Take *et al.*, 1994) ou le facteur J, dont la fixation est dépendante des héparanes ou chondroïtanes sulfates (Larrucea *et al.*, 1999; Larrucea *et al.*, 1998) ; la purification de la nucléoline sur colonne d'héparine (Carpentier *et al.*, 2005) ; l'interaction de la nucléoline avec un glycosaminoglycane de type héparane sulfate, l'acharane sulfate, isolé de l'Escargot géant d'Afrique (Joo *et al.*, 2005).

6.2.1.2 Nucléoline et laminine

En 1991, Kleinman a décrit une protéine issue des cellules neuronales et cérébrales capable de se fixer sur la chaîne alpha de la laminine (un acteur de la croissance neuronale) et qui, après immunoprécipitation et séquençage, s'est révélée être la

nucléoline de surface (Kleinman *et al.*, 1991). Cette interaction a été caractérisée au niveau d'une séquence particulière de la chaîne alpha 1 de la laminine, la séquence IKVAV, suggérant ainsi un rôle de la nucléoline dans la différenciation et le maintien de tissus nerveux, et également un rôle de signalisation avec la matrice extracellulaire (Kibbey *et al.*, 1995).

Par ailleurs, des études ont montré un impact de l'expression de la laminine dans les cellules intestinales de rat sur la localisation intracellulaire de la nucléoline (Yu *et al.*, 1998). La présence de la laminine favoriserait la translocation de la nucléoline du cytoplasme vers le noyau. D'autre part, le knock down de la nucléoline nucléaire et de surface, par ARN interférence sur des cellules intestinales, tend à démontrer un rôle de l'interaction entre la nucléoline et la laminine dans la différenciation cellulaire et dans la transduction des signaux induit par la laminine 1 (Turck *et al.*, 2006).

6.2.2 Interactions de la nucléoline avec des ligands solubles et des récepteurs membranaires

La nucléoline peut interagir avec des ligands protéiques, ou non, tels que la cytokine midkine (Said *et al.*, 2002) et la lactoferrine (Legrand *et al.*, 2004), conduisant à leur internalisation par endocytose avec l'intervention de protéoglycanes, puis à leur ciblage nucléaire. La nucléoline aurait donc un rôle de navette entre la surface cellulaire et le noyau, mais participerait aussi à la transduction de signaux, grâce à des interactions possibles avec des récepteurs membranaires.

6.2.2.1 Nucléoline et apolipoprotéines

L'une des premières preuves de l'expression de la nucléoline à la surface cellulaire correspond à la description par Semenkovitch *et al.*, à partir de cellules d'hépatocarcinomes HepG2, d'une protéine fixant le LDL (et pas le HDL), mais qui n'est pas le récepteur spécifique du LDL. La séquence de cette protéine, qui fixe plus particulièrement les apolipoprotéines A et E, et ce même en présence d'EGTA et d'agents réducteurs, correspond à celle de la nucléoline (Semenkovich *et al.*, 1990). Elle a, à ce

titre, été définie comme un médiateur potentiel de la régulation extracellulaire d'évènements nucléaires, en jouant le rôle de « sensor nutritif » de la cellule. Ceci a été confirmé par une étude qui démontre l'altération de la nucléoline, ainsi que l'arrêt de la prolifération cellulaire, suite à l'exposition de cellules endothéliales HUVEC à un stress oxydatif en présence de LDL oxydé (Kinumi *et al.*, 2005).

6.2.2.2 Nucléoline et midkine

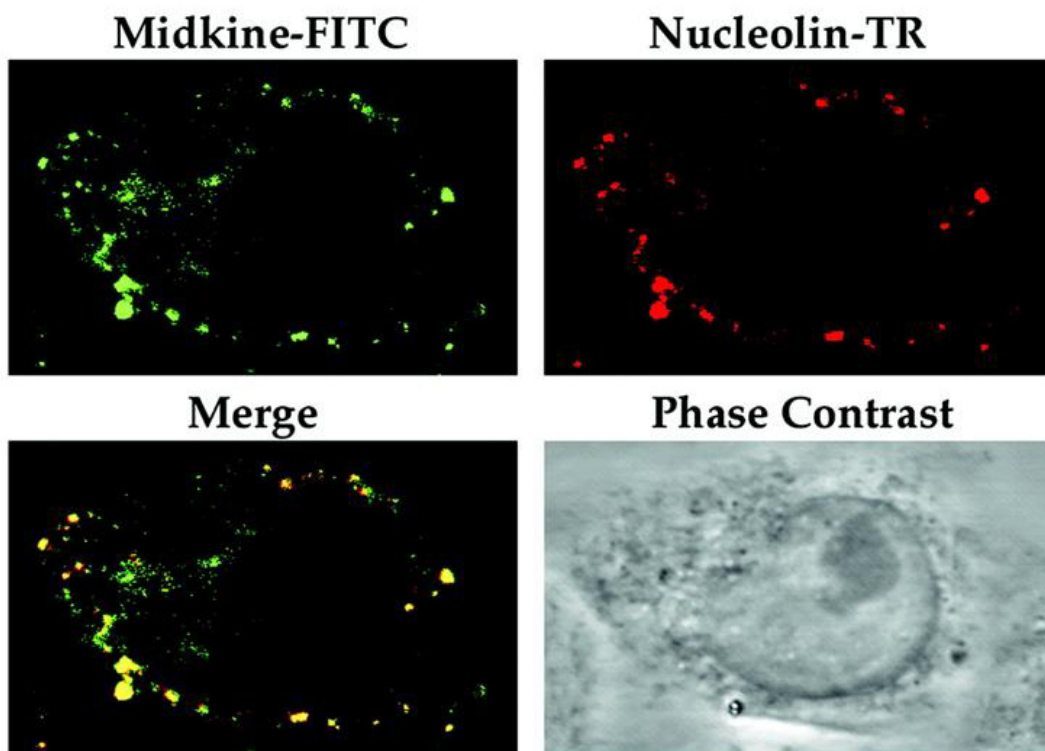
Tout comme les apolipoprotéines, la midkine se fixe sur le LRP (lipoprotein receptor-related protein) et sur la nucléoline de surface. Dans une étude de 2002, il été démontré que c'est le trafic nucléo-cytoplasmique de la nucléoline qui permet la translocation et le ciblage nucléaire de la midkine (Shibata *et al.*, 2002).

Le facteur de croissance midkine est une cytokine, dont l'ARNm est systématiquement exprimé chez les lymphocytes de donneurs sains, mais dont l'expression est fortement augmentée par activation des lymphocytes T par l'interleukine 2 ou l'interféron (Hovanessian, 2006). La forme protéique de la midkine possède une masse moléculaire de 13 kDa capable de fixer le facteur de croissance lié à l'héparine (HB-GAM) (Take *et al.*, 1994). Parmi les protéines fixant la midkine sur une colonne d'affinité, Take *et al.* ont mis en évidence une protéine d'environ 100 kDa qui s'est révélée être, après séquençage, la nucléoline. De même, HB-GAM qui possède 50% d'homologie avec la midkine est co-purifiée avec la nucléoline en présence d'héparine. La nucléoline pourrait aider à leur ciblage nucléaire (Zhou *et al.*, 1997). La midkine fixe la nucléoline comme un récepteur de basse affinité indépendant de la présence de protéoglycanes. En effet, la midkine possède 2 sites de fixation à la surface cellulaire, et seul le site de fixation de basse affinité est inhibé en présence d'un ligand spécifique du domaine C-terminal de la nucléoline (généralités HB-19 § 6.3.1.2.1, p.38). La fixation de la midkine sur le domaine C-terminal de la nucléoline a été confirmée par des essais de fixation en présence de différentes formes recombinantes de la nucléoline contenant ou non le domaine GAR de la nucléoline (Said *et al.*, 2002).

La midkine se fixe donc sur la nucléoline de surface et les héparanes sulfates, deux molécules impliquées dans l'attachement des particules virales du VIH (pour détails voir

généralités § 6.3.1, p.36). En rentrant en compétition avec le virus pour fixer la nucléoline et les protéoglycanes, la midkine inhibe ainsi l'infection par le VIH de façon dose-dépendante sur des cellules lymphocytaires (Callebaut *et al.*, 2001).

De manière intéressante, les études sur la midkine nous donnent des indices sur le trafic et la localisation de la nucléoline de surface. Par des études de microscopie confocale, Said *et al.* ont, en effet, révélé la colocalisation de la midkine et de la nucléoline au niveau de spots distincts à la surface cellulaire (Figure 6, p.31), ce qui laisse supposer l'existence de clusters de la nucléoline avec des protéines à ancrés GPI à la surface cellulaire. La nucléoline de surface pourrait donc être rassemblée au niveau des lipid rafts (Hovanessian, 2006).



Said, E. A. et al. J. Biol. Chem. 2002;277:37492-37502

Figure 6 : Colocalisation de la midkine et de la nucléoline en spots distincts à la surface de cellules Hela (extrait de Said *et al.*, 2002)

6.2.2.3 Nucléoline et lactoferrine

La lactoferrine est une protéine des fluides biologiques fixant le fer et jouant des rôles importants dans les mécanismes de défense de l'organisme (infections, cancer). La lactoferrine se fixe à la surface cellulaire, majoritairement grâce aux protéoglycanes, mais aussi, selon les types cellulaires, sur des récepteurs protéiques dont le LRP (lipoprotein receptor-related protein).

Dans notre laboratoire, Legrand *et al.* ont mis en évidence que la lactoferrine fait partie, tout comme la midkine, des ligands de surface de la nucléoline (Legrand *et al.*, 2004). Par des expériences de résonance plasmonique de surface, il a été démontré que cette interaction s'effectue avec une cinétique rapide et une affinité moyenne (Kd de l'ordre de 240 nM), et ce indépendamment des protéoglycanes. De façon surprenante, il a été prouvé que ce sont les deux lobes de la lactoferrine, et non sa région N-terminale basique habituellement engagée dans les interactions avec ses autres ligands, qui sont impliqués dans la fixation de la nucléoline. De plus, cette interaction semble avoir lieu sur le domaine C-terminal de la nucléoline, puisque HB-19, un pseudopeptide fixant spécifiquement ce domaine (cf généralités § 6.3.1.2.1, p.38), est capable d'entrer en compétition avec la lactoferrine pour fixer la nucléoline. Après sa fixation sur la nucléoline de surface des cellules cancéreuses mammaires, la lactoferrine est endocytée dans des vésicules contenant la nucléoline (Figure 7, p.33). La présence de protéoglycanes semble indispensable pour cette endocytose. La nucléoline participerait ainsi ultérieurement au ciblage nucléaire de la lactoferrine.

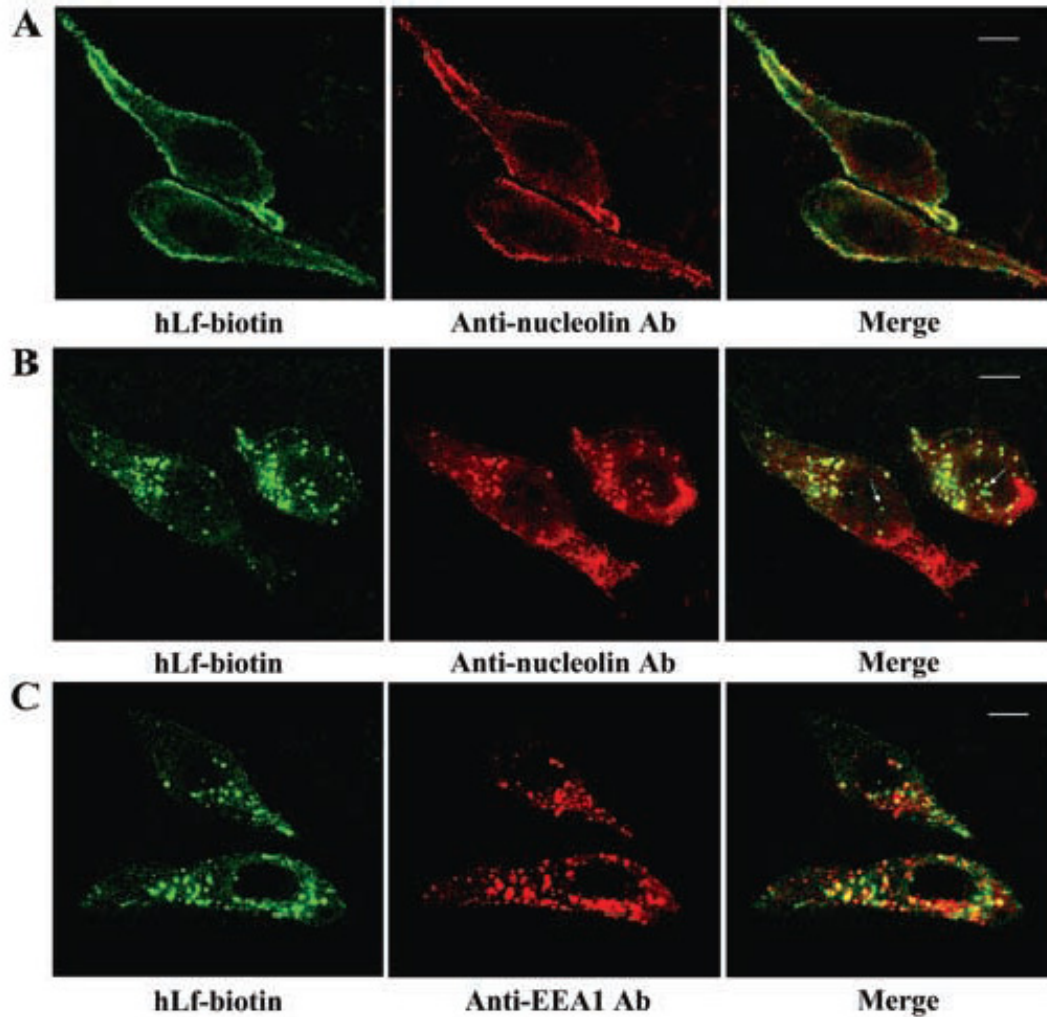


Figure 7 : Colocalisation de la lactoferrine humaine avec la nucléoline à la surface des cellules MDA-MB231 et dans les voies de recyclage et de dégradation

La lactoferrine biotinyllée est détectée par la streptavidine-FITC. La nucléoline et le marqueur de vésicule (EEA1) sont immunodétectés par un anticorps lié à l'Alexa fluor 546. (A) Fixation de la lactoferrine après 1 h à 15°C, (B) Endocytose de la lactoferrine et de la nucléoline après 2 h à 37°C, (C) Colocalisation, après 2 h à 37°C, de la lactoferrine avec EEA1, un marqueur spécifique des endosomes précoces.

6.2.2.4 Autres ligands de la nucléoline

La nucléoline est capable d'interagir avec de nombreuses autres molécules, la plupart étant des acteurs membranaires (récepteurs), ou intracellulaires des voies de signalisation.

6.2.2.4.1 Récepteurs membranaires

Un des récepteurs membranaires, la L-sélectine, participe à l'adhésion homotypique durant l'inflammation et l'hématopoïèse, et se fixe de manière spécifique sur les leucocytes. Par des expériences de chromatographie d'affinité et de spectrométrie de masse, Harms *et al.* ont montré que cette fixation faisait intervenir la nucléoline de surface (Harms *et al.*, 2001). Même si cela n'a pas été démontré, la L-sélectine étant une lectine, on peut imaginer que l'interaction avec la nucléoline de surface fait intervenir, au moins en partie, les glycanes de la nucléoline.

De même, la nucléoline sert de récepteur pour la P-sélectine, qui est une lectine de la même famille que la L-sélectine (Reyes-Reyes et Akiyama, 2008). En effet, les anticorps anti-nucléoline diminuent significativement la fixation de la P-sélectine à la surface cellulaire. La fixation de ce ligand semble induire l'agrégation de la nucléoline de surface, puis l'activation de voies de signalisation phospho-tyrosine dépendante.

Récemment, la nucléoline a été identifiée comme une nouvelle protéine capable d'interagir avec le récepteur ErbB, un récepteur à tyrosine kinase à domaine SH2 (Src Homology 2), qui, suite à l'interaction avec un ligand, subit une dimérisation à l'origine de l'induction d'une cascade de phosphorylation et l'activation de voies de signalisation (Di Segni *et al.*, 2008). L'interaction entre ErbB et la nucléoline s'effectue *via* le domaine C-terminal de la protéine (Farin *et al.*, 2009)

Il a également été démontré que les cellules macrophagiques sont capables de reconnaître les motifs sialyl-polylactosaminiques du CD43 des cellules ayant subi des dommages oxydatifs. Cette reconnaissance se ferait *via* l'intermédiaire de la nucléoline

de surface, puisque le blocage de la nucléoline inhibe cette reconnaissance, de même que le clivage des motifs polylactosaminiques. Cette reconnaissance induirait la mort par apoptose des cellules (Miki *et al.*, 2007) (Hirano *et al.*, 2005).

Enfin, chez des cellules prostatiques cancéreuses, la nucléoline de surface a été décrite comme le récepteur du HGF (Hepatocyte growth factor), ce qui a pour effet d'augmenter l'adhérence sur un substrat à base de laminine (Tate *et al.*, 2006).

6.2.2.4.2 Composants intracellulaires des voies d'activation

La nucléoline interagit avec de nombreux acteurs intracellulaires des voies de signalisation. Tout d'abord, la nucléoline a été décrite comme le substrat de la kinase PKC-zeta chez des cellules induites par le nerve growth factor (NGF). Ce facteur phosphoryle la nucléoline sur des résidus de tyrosine, ce qui indique que la nucléoline servirait de relais à la transduction d'un signal entre la surface et le noyau (Zhou *et al.*, 1997). De même, la nucléoline des lymphocytes est le substrat de la PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase) suite à l'activation en surface du CD21 (Barel *et al.*, 2001). Parallèlement, la nucléoline a été décrite comme le substrat de la tyrosine phosphatase-sigma durant le développement axonal, une phosphatase connue pour intervenir dans la croissance, la réparation et l'orientation axonale (Alete *et al.*, 2006). L'action de ces deux enzymes sur la nucléoline permet d'établir la participation de la nucléoline à des voies de signalisation intracellulaires.

La nucléoline semble également interagir avec un messager secondaire des voies d'activation, le calcium, ou avec ses partenaires. Extraite du foie de rat, la nucléoline a été décrite comme une protéine interagissant avec le calcium (Gilchrist *et al.*, 2002), et ce avec une capacité de 75 nmoles de Ca^{2+} /mg de protéine à une concentration de 1 mM de calcium. Par ailleurs, au cours de la purification de la nucléoline, il a été observé une augmentation de son activité autoprotéolytique en absence de calcium. Cependant, le rôle exact de l'interaction nucléoline/calcium n'a pas été défini. En outre, la nucléoline est capable d'interagir avec des protéines liant le calcium : c'est le cas, par exemple, de Scarf (skin calmodulin-related factor) qui est une protéine de la famille de la calmoduline et fixant le calcium (Hwang *et al.*, 2007). Suite à la perturbation du gradient de calcium,

l'expression de la nucléoline est réduite alors que celle de Scarf est augmentée. Ce phénomène pourrait avoir un rôle dans l'inhibition de la croissance et la différenciation des kératinocytes.

6.2.2.4.3 Molécules extracellulaires

Le facteur J est une glycoprotéine cationique possédant une activité inhibitrice des voies d'activation classique et alterne du complément ; il est également impliqué dans l'adhésion cellulaire. Cette adhésion aurait lieu par l'intermédiaire d'un récepteur : la nucléoline de surface. Après sa fixation sur la nucléoline et activation de voies de signalisation intracellulaires, le facteur J est internalisé (Larrucea *et al.*, 1999).

Enfin, la nucléoline de surface serait également capable de fixer des molécules ioniques par son domaine N-terminal acide, et en particulier l'oxalate de calcium à la surface des cellules de tubules rénaux (Sorokina *et al.*, 2004).

6.3 Implication de la nucléoline de surface dans les pathologies

6.3.1 Le VIH

6.3.1.1 Processus d'infection par le VIH

La capside du virus du VIH contient deux protéines majeures, la gp120 et la gp41, qui forment un complexe oligomérique à la surface de l'enveloppe virale. Le rôle de la gp120 est de reconnaître et de se fixer au CD4, le premier récepteur identifié du VIH à la surface cellulaire. La fixation entraînerait une modification de la conformation de la boucle V3 de la gp120, cette même boucle pouvant alors interagir avec un corécepteur membranaire (Wilkinson, 1996). Grâce à ces interactions, la gp 41, qui contient un peptide fusogénique amino-terminal, peut alors permettre la fusion de l'enveloppe avec la membrane des cellules CD4+ et donc l'infection virale. Parmi les corécepteurs identifiés, on dénombre la fusine (Feng *et al.*, 1996), le récepteur aux chimiokines CCR5

(Alkhatib *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996a; Dragic *et al.*, 1996) ou CCR3 (Choe *et al.*, 1996), et la nucléoline (Callebaut *et al.*, 1998). Les protéoglycanes sont également impliqués dans la reconnaissance et l'infection des cellules par le VIH, par exemple la famille des syndécans (Gallay, 2004).

6.3.1.2 VIH et nucléoline

De façon intéressante, il a été observé, chez des cellules infectées par le VIH, que les perturbations du cycle cellulaire entraîne une augmentation de l'activité de la p34cdc2 qui phosphoryle plus fortement la nucléoline. L'hyperphosphorylation de la nucléoline aurait pour conséquence une relocalisation extranucléaire accrue, ainsi qu'une augmentation de la nucléoline de surface (Galati *et al.*, 2003).

Outre son rôle lors de l'attachement viral, la nucléoline semble également être impliquée dans des étapes ultérieures du cycle répliatif. La nucléoline agirait aussi au niveau du bourgeonnement et du relarguage des virions néosynthétisés du VIH. En effet, la nucléoline interagirait avec des protéines gag impliquées dans le bourgeonnement viral et le signal de packaging psi (Ueno *et al.*, 2004).

Par ailleurs, comme mentionné dans le § 6.2.2.2, p.30 des généralités, la midkine utilise la nucléoline comme un récepteur de basse affinité, et se fixe aux héparanes sulfates qui constituent tous des co-récepteurs du VIH. Elle semblerait pouvoir inhiber l'infection par le VIH, de façon dose-dépendante, sur les lymphocytes T et les macrophages. Les particules de VIH rentreraient ainsi en compétition avec HB-19 (voir ci-après) et la midkine, pour s'adsorber à la surface de cellules, et pour interagir avec la nucléoline de surface ; l'interaction des particules de VIH avec la nucléoline de surface constituerait donc une étape nécessaire à l'attachement du VIH. (Callebaut *et al.*, 2001; Hovanessian, 2006; Said *et al.*, 2002). De la même façon que la midkine, la pléiotrophine, qui fixe la nucléoline de surface et les héparanes sulfates, est capable d'inhiber l'infection par le VIH (Said *et al.*, 2005).

6.3.1.2.1 Une molécule d'étude, le pseudopeptide mimétique de la gp 120 :

HB-19

De nombreux travaux ont été entrepris pour mieux comprendre le rôle éventuel de la nucléoline de surface dans l'ancrage et l'infection par le VIH. Une grande partie de ces travaux entrepris par l'équipe d'Ara Hovanesian ont été exécutés à partir d'un pseudopeptide synthétique qu'ils ont conçu à partir de la boucle V3 de la gp120. En effet, en utilisant un pseudopeptide mimétique de la boucle V3 de la gp 120, le 5[Kpsi(CH₂N)PR]-TASP, ou un anticorps dirigé contre la boucle V3, il est possible de bloquer la fixation du virus.

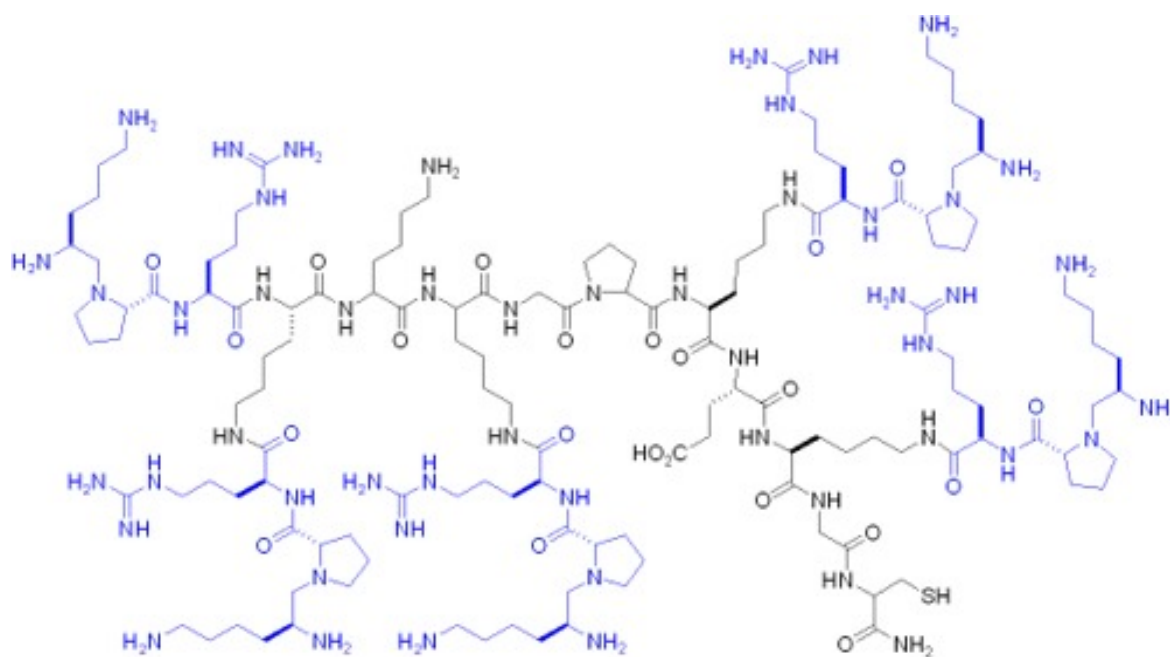


Figure 8 : Formule chimique du pseudopeptide HB-19 (Destouches *et al.*, 2008)

Le pseudopeptide 5[Kpsi(CH₂N)PR]-TASP se fixe sur une protéine d'environ 100 kDa à la surface cellulaire qui, après purification et microséquençage, s'est révélée être la nucléoline (Callebaut *et al.*, 1998). De plus, des essais de fixation de la nucléoline avec une gp120 recombinante ont montré une forte affinité entre ces protéines, du même

ordre que celle décrite entre la gp120 et le CD4 (Callebaut *et al.*, 1998). Ce pseudopeptide, également nommé HB-19, capable d'inhiber l'entrée du virus, est pentavalent : il possède 5 chaînes formées d'un tripeptide avec des liaisons réduites (Figure 8, p.38). En fixant spécifiquement la nucléoline de surface, il entrerait en compétition avec le virus sur ses points d'ancrage et inhiberait ainsi l'attachement du virus aux cellules CD4+, et ce, avec un taux d'inhibition de plus de 90% pour une concentration de 2 μ M sur des cellules macrophagiques. Cette inhibition est spécifique, puisqu'un pseudopeptide monovalent n'est pas capable d'interagir avec la nucléoline (Seddiki *et al.*, 1999).

Lorsque HB-19 est mis en compétition avec VIH sur des cellules permissives, à une concentration permettant l'inhibition de l'attachement du virus, HB-19 se fixe de façon irréversible sur la nucléoline de surface, ce qui mène à une diminution de l'expression de surface de la nucléoline, comme l'ont démontré des études de microscopie confocale (Nisole *et al.*, 1999). A contrario, un autre inhibiteur de l'infection par le VIH, le FGF-2 utilise les héparanes sulfates comme récepteur de basse affinité et empêche l'attachement du VIH aux cellules, mais il ne bloque pas la fixation de HB-19 à la nucléoline, ce qui tend à prouver que la fixation se fait de façon indépendante des héparanes sulfates (Nisole *et al.*, 1999; Nisole *et al.*, 2002a).

HB-19 pourrait être une drogue potentielle anti-VIH. Cependant, même si l'inhibition de l'attachement du VIH par HB-19 est dose-dépendante, son action ne peut être que préventive, puisqu'elle empêche la fixation, mais pas l'internalisation ni l'action du VIH internalisé (Nisole *et al.*, 2000) ; des tests d'incorporation *in vivo* chez des rats montrent que ce composé est préférentiellement incorporé dans les organes lymphoïdes (Krust *et al.*, 2001). Par ailleurs, cette drogue ne s'adresserait pas à toutes les cellules puisque le processus d'infection semble cellule- et souche-dépendant. En effet, l'infection des neurones par le VIH-1 ne semble pas suivre ce même procédé d'ancrage : les co-récepteurs tels que le CD4, la nucléoline ou le galactosylcéramide sont peu exprimés, et leur blocage n'inhibe pas l'infection, contrairement aux CCR5 et CXCR4 (Alvarez Losada *et al.*, 2002).

6.3.1.2.2 Rôles proposés pour la nucléoline dans les mécanismes d'infection du

VIH

Les processus de fixation des particules virales et de leur internalisation semblent dépendants de la présence de la nucléoline en clusters au niveau de radeaux lipidiques ou lipid rafts. D'une part, Nisole *et al.* ont montré que la fixation de HB-19 sur la nucléoline a lieu sur le domaine C-terminal et induit l'agrégation de la nucléoline de surface (Nisole *et al.*, 2002b). D'autre part, des études en microscopie confocale de fluorescence montrent une colocalisation de la pléïotrophine et de la nucléoline en clusters à la surface cellulaire. Après interaction, le complexe est internalisé *via* un processus température dépendant, donc actif, et indépendamment des protéoglycanes (Said *et al.*, 2005). De même, des agrégats de nucléoline présents à la surface cellulaire interagissent avec les particules virales au niveau de microdomaines membranaires riches en gangliosides et en protéines à ancre GPI dont le CD90 et le CD59, ce qui laisse entrevoir une importance des lipid rafts dans l'ancrage du virus et l'action de la nucléoline. Après ancrage du VIH à la membrane plasmique, la nucléoline de surface est incorporée au sein des lipid rafts, impliqués dans le processus de fusion virus-cellule. Par la suite, après entrée du VIH, la nucléoline de surface est internalisée dans le cytoplasme et retrouvée assemblée avec les complexes de transcription inverse (Nisole *et al.*, 2002a).

La nucléoline de surface semble donc intervenir de façon importante dans les processus d'attachement et d'entrée du virus et ferait, pour cela, intervenir des cofacteurs et les lipid rafts qui faciliteraient son internalisation, puis interviendraient dans la réplication et le bourgeonnement viral.

6.3.2 Nucléoline, cancer et angiogénèse

Une étape essentielle de l'oncogénèse est la vascularisation des tumeurs (Re et Cook, 2006). La nucléoline de surface semble intervenir dans l'oncogénèse à plusieurs niveaux, puisqu'elle sert de récepteur pour des facteurs de croissance impliqués dans la prolifération cellulaire, se retrouve surexprimée dans les cellules cancéreuses (Storck *et al.*, 2007), et intervient dans l'angiogénèse.

Tout d'abord, il a été décrit par Christian *et al.* (2003) que la nucléoline de surface est un marqueur des cellules endothéliales tumorales lors de l'angiogenèse. En effet, un peptide désigné contre ces mêmes cellules, le peptide F3, possède pour cible spécifique le domaine N-terminal de la nucléoline de surface (Christian *et al.*, 2003).

Le rôle de la nucléoline dans l'angiogenèse restant mal connu, Huang *et al.* (2006) ont entrepris d'étudier l'effet du VEGF (vascular endothelial growth factor) sur l'activité de la nucléoline ; ils ont observé que le traitement des cellules endothéliales par le VEGF a pour effet une mobilisation de la nucléoline à la surface cellulaire. De plus, le blocage spécifique de la nucléoline inhibe la migration cellulaire et empêche la formation des capillaires. Enfin, ils ont mis en évidence que la chaîne lourde de la myosine 9 interagit avec la nucléoline, qui sert alors de pontage entre celle-ci et le cytosquelette (Huang *et al.*, 2006).

L'endostatine, un inhibiteur de l'angiogenèse, aurait pour récepteur la nucléoline de surface sur laquelle il se fixe avec une haute affinité. Le complexe nucléoline/endostatine serait ensuite internalisé et conduit jusqu'au noyau où l'endostatine aurait pour effet d'inhiber la phosphorylation de la nucléoline, et ainsi d'abolir son action dans la prolifération cellulaire (Shi *et al.*, 2007). D'autres études sur les cellules endothéliales ont montré que la nucléoline de surface, suite à la fixation d'un anticorps anti-nucléoline, aurait un effet pro-apoptotique des cellules cancéreuses. En effet, après fixation de l'anticorps, le taux d'ARNm de Bcl-2, déstabilisé en l'absence de nucléoline, diminue, ce qui aurait pour effet d'induire l'apoptose (Fogal *et al.*, 2009). La nucléoline constituerait donc une cible thérapeutique pour diminuer l'angiogenèse dans les tumeurs.

L'équipe d'Hovanessian a également étudié l'importance de la nucléoline dans la croissance et l'angiogenèse des cellules tumorales. En utilisant le pseudopeptide HB-19 (cf généralités § 6.3.1.2.1, p.38) dirigé spécifiquement contre la nucléoline de surface, ils ont démontré *in vitro* et *in vivo* (chez des embryons de poulet et des souris avec xénogreffes) que le traitement par HB-19 diminuait, voire supprimait, la croissance tumorale et l'angiogenèse. Cet effet anti-tumoral de HB-19 serait directement relié au blocage et à la sous-régulation de la nucléoline de surface, sans toutefois modifier l'activité de la nucléoline nucléaire, ce qui laisse entrevoir que la nucléoline est une

nouvelle cible thérapeutique, et qu'HB-19 serait une nouvelle drogue anticancéreuse (Destouches *et al.*, 2008).

D'autres composés pour lutter contre le cancer, et ayant pour cible la nucléoline, ont été étudiés. Parmi eux, un oligonucléotide riche en guanine, l'AS1411, capable de former des quadruplex d'oligonucléotides et de fixer des protéines comme la nucléoline, aurait un effet anti-cancéreux. Il est actuellement utilisé en essais cliniques de phase II (Bates *et al.*, 2009).

6.3.3 La nucléoline dans les autres pathologies

La nucléoline sert de récepteur ou de point d'ancrage pour des bactéries et d'autres virus que le VIH, et par là même, facilite leur adhérence et leur pouvoir infectieux.

Ainsi, Barel *et al.* (2008) ont mis en évidence chez des cellules monocytaires THP1, une interaction entre le facteur d'élongation Tu de *Francisella tularensis* et la nucléoline de surface (Barel *et al.*, 2008). Cette bactérie responsable de la tularémie se fixerait sur les cellules immunitaires *via* le domaine C-terminal de la nucléoline avant d'entrer dans la cellule et de l'infecter.

A la surface des cellules HEp-2, la nucléoline interagit également avec une affinité importante avec plusieurs facteurs de la bactérie entérohémorragique *E. coli* O157:H7 dont des adhésines : les intimines alpha, beta et gamma (Sinclair et O'Brien, 2004) ; (Sinclair et O'Brien, 2002). Sur les cellules intestinales, l'interaction est réalisée avec les pili de type IV (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2007).

La nucléoline sert aussi d'ancrage à des virus tels que le HPIV3 (Human parainfluenza virus type3) lors de l'infection des cellules épithéliales pulmonaires (Bose *et al.*, 2004), ainsi qu'aux virus coxsackie B (6 sérotypes), alors qu'elle ne fixe pas le virus Sendaï ou les poliovirus (de Verdugo *et al.*, 1995).

Enfin, la nucléoline et ses anticorps ont été retrouvés en quantité importante dans des maladies systémiques dont les scléroses et le lupus érythémateux (Deng *et al.*, 1996b).

7. GLYCOSYLATION

7.1 Généralités sur la glycosylation

7.1.1 Définition

De nombreuses modifications covalentes co- ou post-traductionnelles ont lieu lors de la synthèse des protéines. L'une des plus fréquemment rencontrées est la glycosylation. Les glycoprotéines résultent ainsi de l'association covalente d'un glycane sur la séquence protéique ; cette association peut s'effectuer soit *via* un atome d'oxygène pour la O-glycosylation, soit *via* un atome d'azote pour la N-glycosylation. L'assemblage des glycoprotéines N- et O- glycosylées est classiquement réalisé dans les compartiments du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi (Hirschberg et Snider, 1987).

La N-glycosylation consiste en l'établissement d'une liaison covalente entre le carbone anomérique d'un résidu de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et l'azote de la fonction amide d'un résidu d'asparagine. Les N-glycans sont toujours liés à un résidu d'asparagine au sein d'une séquence particulière aussi appelée *séquan* de formule Asn-X-Thr/Ser, X désignant n'importe quel acide aminé autre que la proline. Par contre, tous les sites potentiels de N-glycosylation ne sont pas nécessairement substitués. D'autres signaux dans la chaîne protéique ou le repliement de la protéine, et donc l'accessibilité des enzymes, semblent jouer un rôle dans l'occupation des sites de glycosylation. Il existe une microhétérogénéité des structures glycaniques puisqu'un même site de glycosylation d'une protéine peut recevoir plusieurs structures.

L'autre forme majeure de glycosylation est la O-glycosylation, pour laquelle la liaison sucre-protéine se fait *via* un acide aminé hydroxylé. La plus fréquente de ces modifications est la O-glycosylation dite de type mucine, qui est répandue dans tout le règne animal et dont l'existence a récemment été démontrée chez les plantes (Kishimoto *et al.*, 1999). La liaison se fait entre l'hydroxyle anomérique d'un résidu de α -N-acétylgalactosamine et l'hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine de la protéine.

Les protéines glycosylées sont en majorité sécrétées, membranaires ou résidentes de ces compartiments, ce qui implique qu'elles possèdent toutes une séquence signal gouvernant leur translocation vers le réticulum endoplasmique granulaire.

7.1.2 Structures glycaniques

Classiquement, trois types de structures N-glycaniques sont décrits chez les mammifères (Kornfeld et Sly, 1985) : le type oligomannosidique, le type hybride et le type complexe (Figure 9, p. 48). Ces trois types de glycanes possèdent un noyau commun appelé core, mais diffèrent par leurs extrémités non réductrices appelées antennes. On peut dénombrer jusque 5 antennes sur un même core glycanique. Les glycanes oligomannosidiques comportent des antennes constituées d'un enchaînement de mannoses. Les glycanes complexes, quant à eux, possèdent des antennes constituées de groupements (Gal β 1-4GlcNAc) également appelés groupements *N*-acétyllactosaminiques. Ces glycanes complexes peuvent ou non être agrémentés de sucres terminaux dits périphériques dont les acides sialiques, mais aussi des résidus de fucose ou de galactose. Enfin, les glycanes hybrides sont composés d'antennes de types oligomannosidique et complexe.

Les *O*-glycanes sont, quant à eux, formés de trois régions : le noyau, le squelette et la périphérie. Il existe 8 noyaux différents permettant la classification des *O*-glycanes, et deux types de squelettes, qui peuvent être linéaires ou ramifiés, et de longueurs très variées (Figure 10, p.48).

7.1.3 Enzymes de synthèse

Les glycosyltransférases sont les enzymes de synthèse permettant toutes les réactions de glycosylation (Kleene et Berger, 1993). Ce sont des protéines membranaires de type II, présentant un court domaine N-terminal cytoplasmique, un segment transmembranaire hydrophobe et un domaine C-terminal luminal, de forme globulaire, portant l'activité catalytique. Entre le domaine transmembranaire et la région catalytique, une région tige, encore appelée peptide de liaison ou *stem*, fait fonction d'espaceur et est

accessible à des protéases spécifiques qui génèrent des formes solubles. De plus, les glycosyltransférases possèdent une localisation très spécifique dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi (Colley, 1997), grâce à des signaux de rétention dont certains ont été localisés. Ces éléments sont déterminants pour la séquence en monosaccharides.

7.1.4 Voie de biosynthèse réticulaire des N-glycanes

7.1.4.1 Synthèse du précurseur

La biosynthèse des N-glycanes au niveau réticulaire est essentiellement caractérisée par le cycle des dolichols (Abeijon et Hirschberg, 1992), qui a été entièrement décortiqué chez la levure. La synthèse du précurseur glycanique transféré sur les protéines naissantes est le résultat d'une suite de réactions enzymatiques. Chaque étape est représentée par une enzyme particulière, correspondant chacune à un gène *ALG* chez la levure (Figure 11, p.49). Ces enzymes vont assembler des monosaccharides qui doivent d'abord être sous forme activée, c'est-à-dire sous forme de nucléotide-sucre ou de monosaccharide lié au dolichol. Les enzymes du réticulum endoplasmique granulaire ont pour substrat un monosaccharide lié à un lipide : le mannosyl phosphodolichol (Man-P-Dol) ou le glucosyl phosphodolichol (Glc-P-Dol), eux-mêmes formés respectivement à partir du GDP-mannose et de l'UDP-glucose. Dans le réticulum endoplasmique, les intermédiaires Man-P-Dol et Glc-P-Dol sont formés côté cytosol à partir du GDP-Man et de l'UDP-Glc, puis subissent une translocation (*flipflop*) vers le compartiment luminal.

Le tétradéca-oligosaccharide précurseur des N-glycanes, de structure $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Figure 12, p.49), commun à tous les eucaryotes, est assemblé sur une molécule de dolichol *via* une liaison pyrophosphate, avant d'être transféré en bloc sur une protéine en cours d'élongation (Hammond et Helenius, 1995; Kornfeld et Sly, 1985).

La première étape est la formation du dolicholpyrophospho-*N*-acétylglucosamine par une *N*-acétylglucosaminyl-1-phosphotransférase, et peut être inhibée par la tunicamycine. Le transfert sur la protéine est catalysé par un complexe enzymatique supramoléculaire, l'oligosaccharyltransférase.

7.1.4.2 Contrôle qualité

Après transfert du précurseur, l'action de la glucosidase I sur l'oligosaccharide fait entrer la protéine dans un cycle déglucosylation-reglucosylation (Hammond et Helenius, 1995) qui sert au contrôle de qualité de la mise en conformation de la protéine (Trombetta et Helenius, 1998). Les espèces de formule $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ sont reconnues par des chaperons moléculaires : la calnexine ou la calréticuline (Figure 13, p.50).

Cette interaction permet le recrutement d'enzymes intervenant dans la mise en conformation, comme la peptide disulfide isomérase (PDI), ou dans l'assemblage de sous-unités en complexes multimoléculaires. Une fois la protéine reconformée, le dernier résidu de glucose est clivé, lui permettant de poursuivre son trajet dans la voie de maturation vers l'appareil de Golgi. Si la protéine n'est toujours pas bien conformée, elle est reglucosylée et entre dans un deuxième cycle de mise en conformation. Après un certain nombre de cycles, les glycoprotéines dont la mise en conformation a échoué sont éliminées : elles sont transportées par rétrotranslocation vers le cytosol où ont lieu la déglycosylation puis la dégradation par le protéasome. Le glycane permet de distinguer une glycoprotéine qui a échoué à se mettre en conformation, d'une glycoprotéine nouvellement synthétisée qui n'a pas encore acquis sa conformation.

7.1.5 Maturation golgienne et sécrétion

Dans l'appareil de Golgi, les nucléotides-sucres sont pris en charge par des transporteurs spécifiques.

L'appareil de Golgi est divisé en saccules ou citernes à l'équipement enzymatique distinct. Tout au long de ces citernes, a lieu la maturation des *N*-glycanes formés dans le réticulum endoplasmique, mais aussi la biosynthèse des *O*-glycanes (Figure 14, p.50). Les glycoprotéines traversent successivement les compartiments *cis*, *médian* et *trans* de l'appareil de Golgi avant d'être sécrétées. L'addition des sucres périphériques, effectuée par des glycosyltransférases telles que des galactosyltransférases, des fucosyltransférases, des sialyltransférases, ou des sulfotransférases, prend place dans les

sacculés et le réseau *trans*-golgiens. Parmi ces enzymes, certaines peuvent agir à la fois sur des *N*- et des *O*-glycanes des glycoprotéines et des glycolipides (van Die *et al.*, 2000).

La maturation des *N*-glycanes de type complexe a été bien décrite (Schachter, 1991). Le nombre d'antennes est déterminé par l'addition d'une *N*-acétylglucosamine sur les mannoses du noyau, par des liaisons β 1,2 β 1,4 ou β 1,6, suite à l'action de différentes *N*-acétylglucosaminyltransférases (Schachter, 2000).

7.1.6 Rôles biologiques de la glycosylation

Les rôles des *N*-glycanes sont variés et difficiles à prédire. Pour la plupart, les glycanes servent :

- à la mise en conformation de la protéine,
- à la stabilité protéique par exemple en protégeant la protéine contre les protéases,
- de signaux pour le trafic des protéines,
- de molécules permettant la reconnaissance et l'interaction cellule-cellule ou pathogène,
- à la régulation de l'activité de certaines protéines.

Cependant, la plupart du temps, on ne peut pas attribuer un rôle à une structure précise, sauf dans le cas du mannose-6-phosphate qui dirige les protéines vers la dégradation. La glycosylation ou le défaut de glycosylation peut souvent être impliqué dans des pathologies comme la polysialylation retrouvée dans les cellules métastatiques cancéreuses ou les désordres congénitaux de glycosylation.

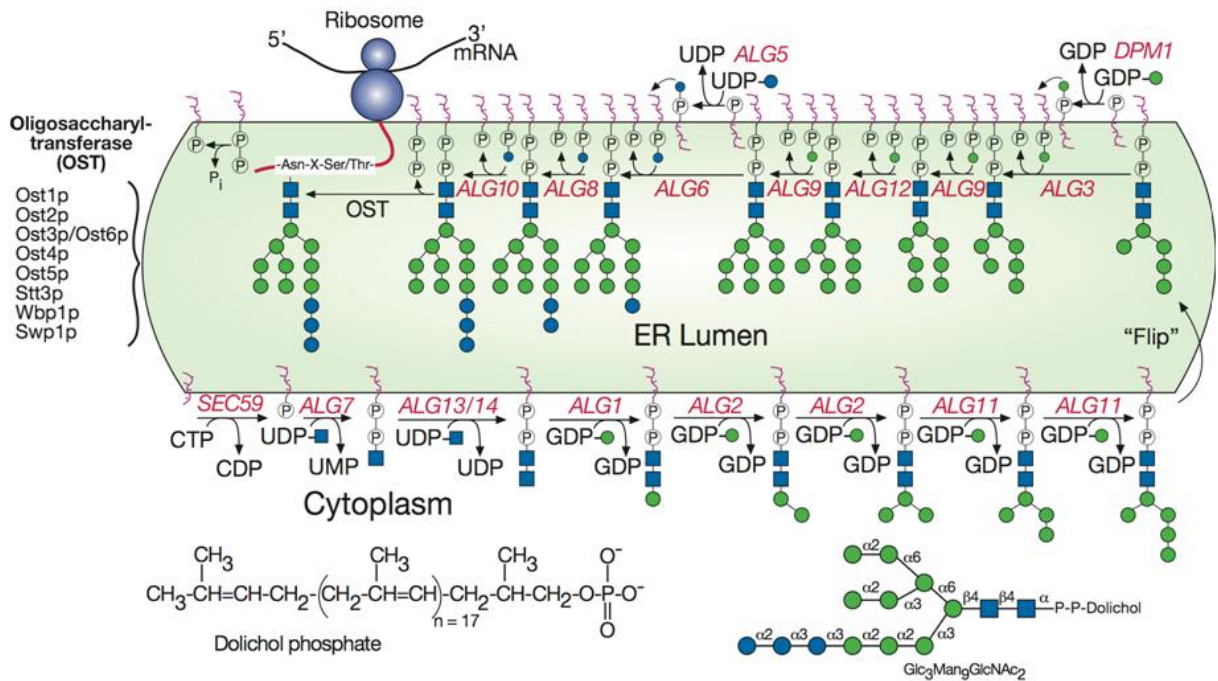


Figure 11: Cycle des dolichols et voie de synthèse du précurseur tétradéca-oligosaccharidique (extrait de R. D. Cummings et T.L. Doering)

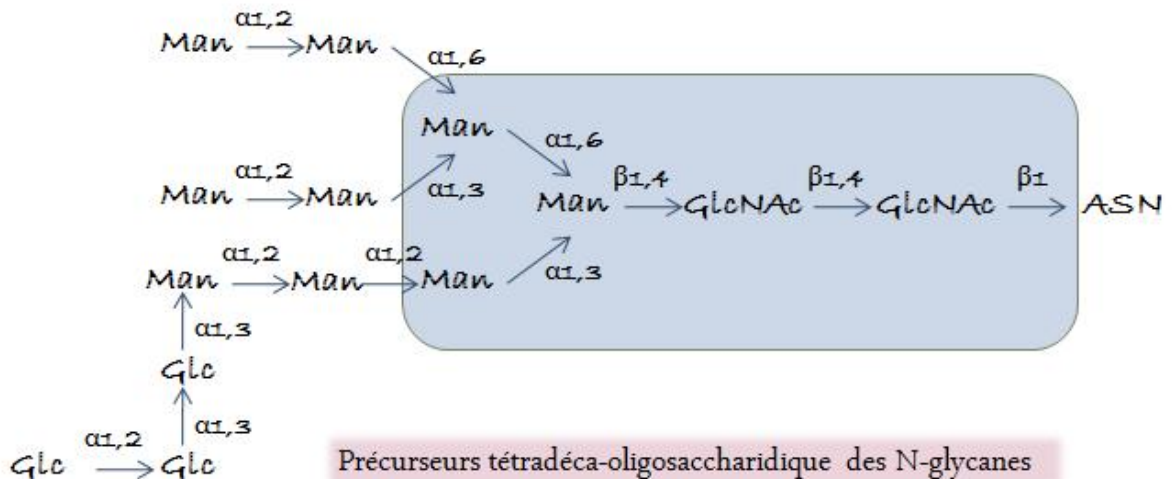


Figure 12: Représentation schématique du précurseur tétradéca-oligosaccharidique des N-glycanes

Les flèches représentent les liaisons osidiques. La nomenclature utilisée est la suivante : ASN=asparagine, GlcNAc= N-acétylglucosamine, Man= mannose, Glc= glucose

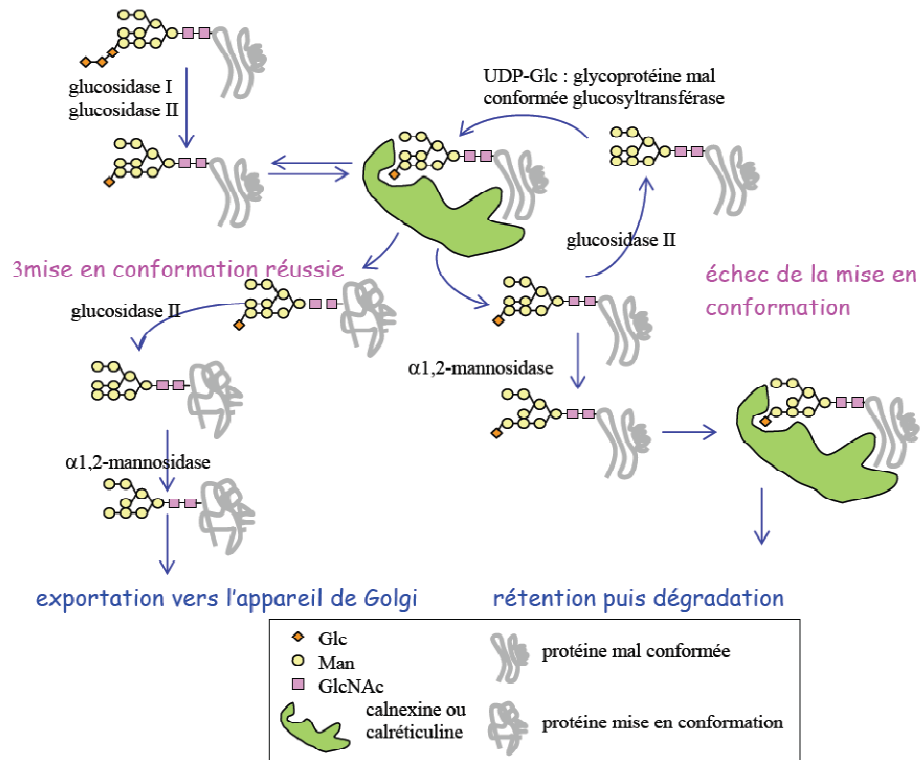


Figure 13 : Cycle déglucosylation-reglucosylation de remise en conformation des protéines (extrait de la thèse d'I. Marchal)

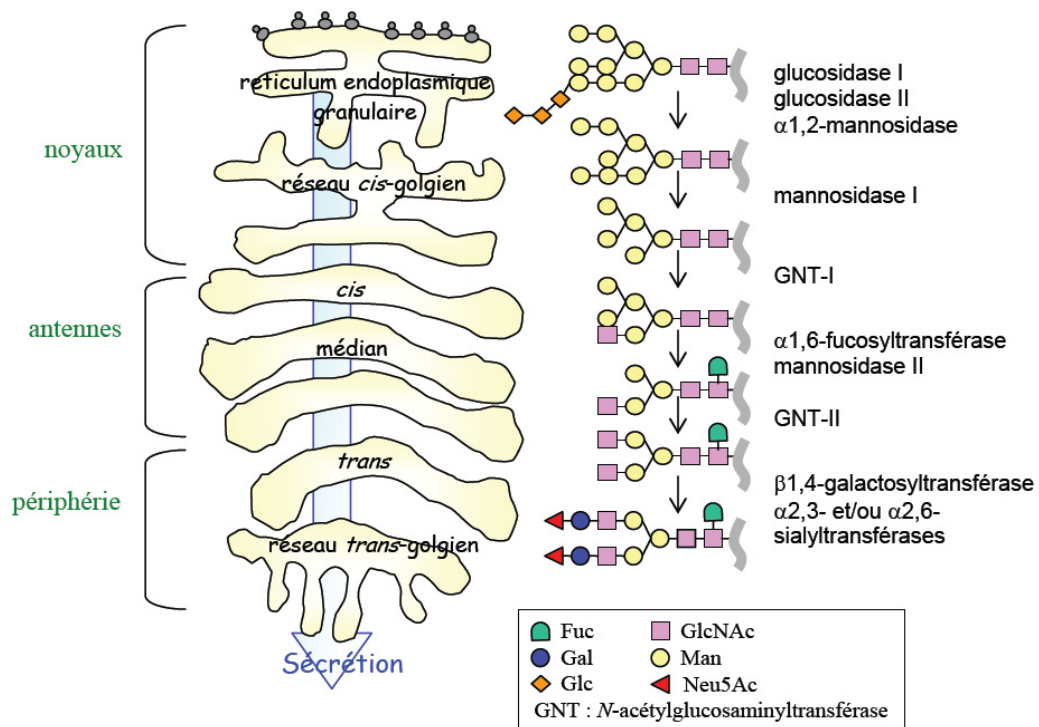


Figure 14 : Voie de maturation golgienne (extrait de la thèse d'I. Marchal)

7.2 Cas particulier : la glycosylation de la nucléoline

7.2.1 Une glycosylation atypique

L'origine de la glycosylation de la nucléoline et celle de sa sécrétion restent hypothétiques, puisqu'elle ne suit apparemment pas la voie de sécrétion classique. En effet, la nucléoline ne possède aucune séquence de fixation à la particule SRP, ni de séquence d'adressage expliquant sa localisation à la surface cellulaire. D'autre part, l'isoforme glycosylée de la nucléoline est exclusivement extra-nucléaire, mais possède tout de même une séquence NLS.

Le rôle de la glycosylation de la nucléoline est inconnu. Le premier rôle à envisager pour la *N*-glycosylation est un rôle dans la mise en conformation de la nucléoline, mais il a été démontré que la tunicamycine ne provoque pas d'agrégation de la nucléoline (Carpentier *et al.*, 2005).

Le cas de la nucléoline n'est cependant pas unique. En effet, il existe d'autres protéines ayant des localisations nucléaires et de surface tout en ayant, ou n'ayant pas une NLS et /ou une séquence signal de sécrétion. Arnoys et Wang énumèrent ainsi dans leur revue de 2007 plus de 80 protéines dans le même cas (Arnoys et Wang, 2007).

De même, l'existence de formes glycosylées atypiques a été retrouvée pour certaines protéines, parmi lesquelles :

- la pompe Na^+/K^+ , *N*-glycosylée au niveau de son domaine cytosolique. La structure glycanique précise n'est cependant pas déterminée (Pedemonte *et al.*, 1990).
- le facteur de transcription NFIC dans un stade précoce d'involution de la glande mammaire, *N*-glycosylé dans le noyau. Cette isoforme conserverait ses propriétés de translocation (Kane *et al.*, 2002).

A l'heure actuelle, il n'existe cependant pas d'explication à la présence de ces modifications.

7.2.2 Voies hypothétiques de synthèse de la nucléoline

La coexistence dans une cellule des formes glycosylées et non glycosylées d'une protéine possédant une NLS avec une localisation nucléaire, mais également cytosolique et de surface, semble assez contradictoire. En effet, comment une voie de synthèse classique pourrait expliquer la présence de ces différentes isoformes et, qui plus est, expliquer la coexistence, libres dans le cytosol, des formes glycosylées ou non.

Plusieurs hypothèses peuvent permettre d'expliquer la présence de la nucléoline glycosylée dans le cytosol et, par extension, à la surface cellulaire (Figure 15, p.56):

- La nucléoline pourrait être glycosylée dans les vésicules de sécrétion lors de sa sortie vers la membrane plasmique. Ceci impliquerait la présence d'une batterie de glycosyltransférases dans les vésicules de sécrétion,

- La nucléoline pourrait être sécrétée *via* un mécanisme d'exocytose dépendant de sa glycosylation, mais indépendant des voies réticulaires et golgiennes, puis réinternalisée avec son ligand, par exemple la cytokine midkine (Shibata *et al.*, 2002; Take *et al.*, 1994), et transloquée de sa vésicule d'endocytose vers le cytosol (Hovanessian *et al.*, 2000), comme pour la lactoferrine (Legrand *et al.*, 2004). La nucléoline glycosylée dans le cytosol pourrait être le reliquat de la réendocytose de la nucléoline de surface, elle-même glycosylée.

- La nucléoline pourrait être rétrotransloquée du réticulum endoplasmique vers le cytosol *via* le système ERAD mimant les protéines mal conformées suivant le mécanisme de dégradation dépendant de l'ubiquitine (Tsai *et al.*, 2002), ou bien encore comme le font certaines toxines telle que la ricine (Deeks *et al.*, 2002). Cette dernière hypothèse paraît cependant peu probable car, après sa rétrotranslocation, la ricine échappe au protéasome grâce à une teneur en lysine très faible qui n'est pas retrouvée chez la nucléoline.

Enfin, la nucléoline glycosylée serait synthétisée et exprimée à la surface cellulaire *via* la voie classique de sécrétion, cependant qu'elle serait déglycosylée pour former le pool nucléaire de la nucléoline, le pool cytosolique restant un mélange des formes glycosylées et non glycosylées.

7.2.3 Rôles possibles de la N-glycosylation de la nucléoline

7.2.3.1 Rôles potentiels dans le trafic intracellulaire

Le trafic intracellulaire de la nucléoline est mal connu. La nucléoline ne possédant qu'une séquence NLS dans sa séquence primaire, la diversité de ses localisations pourrait provenir de ses modifications post-traductionnelles. Les études précédentes sur l'ADP-ribosylation, la méthylation et la protéolyse ne semblent pas indiquer leur intervention. En revanche la phosphorylation est impliquée dans le trafic nucléocytoplasmique (Schwab et Dreyer, 1997). L'étude de la nucléoline laisse penser que la glycosylation pourrait réguler son trafic intracellulaire, puisque la forme glycosylée n'est retrouvée que dans certains compartiments cellulaires.

La N-glycosylation pourrait agir sur la localisation cytosolique et membranaire de la nucléoline à plusieurs niveaux :

- La N-glycosylation pourrait favoriser la sécrétion de la nucléoline à la surface des cellules
- La glycosylation modifierait la conformation de la nucléoline et/ou les interactions de la nucléoline avec des protéines de transport, rendant la séquence NLS inefficace,
- L'affinité différente pour les ARN induirait une nouvelle répartition de la nucléoline glycosylée.

D'autres exemples de protéines, où la glycosylation intervient à plus ou moins grande échelle dans son trafic, ont déjà été décrites. Ainsi, des études utilisant des inhibiteurs de glycosylation ont prouvé que, dans des cellules épithéliales intestinales, la N-glycosylation est impliquée dans l'adressage de la dipeptidylpeptidase IV à la face apicale des cellules alors que la N-glycosylation de la sucrase-isomaltase et de l'aminopeptidase N n'est pas requise (Alfalah *et al.*, 1999; Naim *et al.*, 1999). De même, chez la Carpe, la N-glycosylation de la « retinol-binding protein » est indispensable à sa translocation à travers la membrane du réticulum endoplasmique (Devirgiliis *et al.*, 2005).

7.2.3.2 Rôles potentiels dans les fonctions

Une particularité des *N*-glycanes de la nucléoline est leur présence au niveau des domaines RBD impliqués dans la fixation de séquences d'ARNr spécifiques : NRE et ECM (Bouvet *et al.*, 1997). On peut émettre comme hypothèse que l'encombrement stérique au niveau des domaines RBD1 et RBD3 de la nucléoline, créé par la présence des glycanes, est susceptible de modifier la capacité d'interaction de la nucléoline avec certains ARN ou d'autres ligands (Figure 16, p.56).

La *N*-glycosylation pourrait alors être le premier exemple de régulation fonctionnelle. D'autre part, la *N*-glycosylation de la nucléoline interviendrait en tant que mécanisme de régulation post-transcriptionnelle, puisque la forme glycosylée serait aussi incapable de se lier correctement aux ARNr et de remplir son rôle dans l'assemblage des ribosomes.

Par ailleurs, la *N*-glycosylation des protéines de surface module les signaux d'interaction de la cellule avec son environnement (autres cellules ou matrice extracellulaire), jouant ainsi un rôle dans la communication cellulaire, la prolifération ou la migration, comme c'est le cas pour les intégrines (Gu et Taniguchi, 2004). La glycosylation de la nucléoline de surface pourrait réguler ses fonctions de récepteur et de molécule interagissant avec des éléments de la matrice extracellulaire.

7.2.4 Rôles possibles de la O-glycosylation de la nucléoline

Une forme particulière de O-glycosylation : la O-N-acétylglucosaminylation est une glycosylation cytosolique et nucléaire réversible, en équilibre avec la balance phosphorylation / déphosphorylation (Iyer et Hart, 2003), et qui régule les fonctions et le trafic de nombreuses protéines. Bien que la présence de O-N-acétylglucosaminylation sur la nucléoline n'ait pas encore été précisément caractérisée (Carpentier *et al.*, 2005), il est possible d'imaginer que les deux O-glycanes, situés dans les motifs TPXKK de la région N-terminale de la nucléoline, soient impliqués de la même façon dans la régulation du trafic et des fonctions de la nucléoline.

En ce qui concerne le trafic, les O-glycanes se situant dans une région hautement phosphorylée de la nucléoline, et la phosphorylation de la nucléoline régulant son trafic nucléocytoplasmique (voir généralités § 4.5.1, p.10), il est possible que la O-glycosylation rentre en compétition avec la phosphorylation pour la ségrégation nucléaire et cytosolique de la protéine. Ceci est renforcé par le fait que la O-glycosylation est parfois capable d’agir comme un signal d’adressage des glycoprotéines vers la voie de sécrétion ou vers la face apicale des cellules épithéliales. Par exemple, l’inhibition de la O-glycosylation des mucines bloque la sécrétion des mucines (Hennebicq-Reig *et al.*, 1998; Huet *et al.*, 1995). De même, l’inhibition de la O-glycosylation provoque l’accumulation cytoplasmique de certaines protéines comme la dipeptidylpeptidase IV et MUC1, une glycoprotéine membranaire « mucin-like », qui devraient normalement être adressées à la face apicale des cellules épithéliales (Gouyer *et al.*, 2001; Huet *et al.*, 1998).

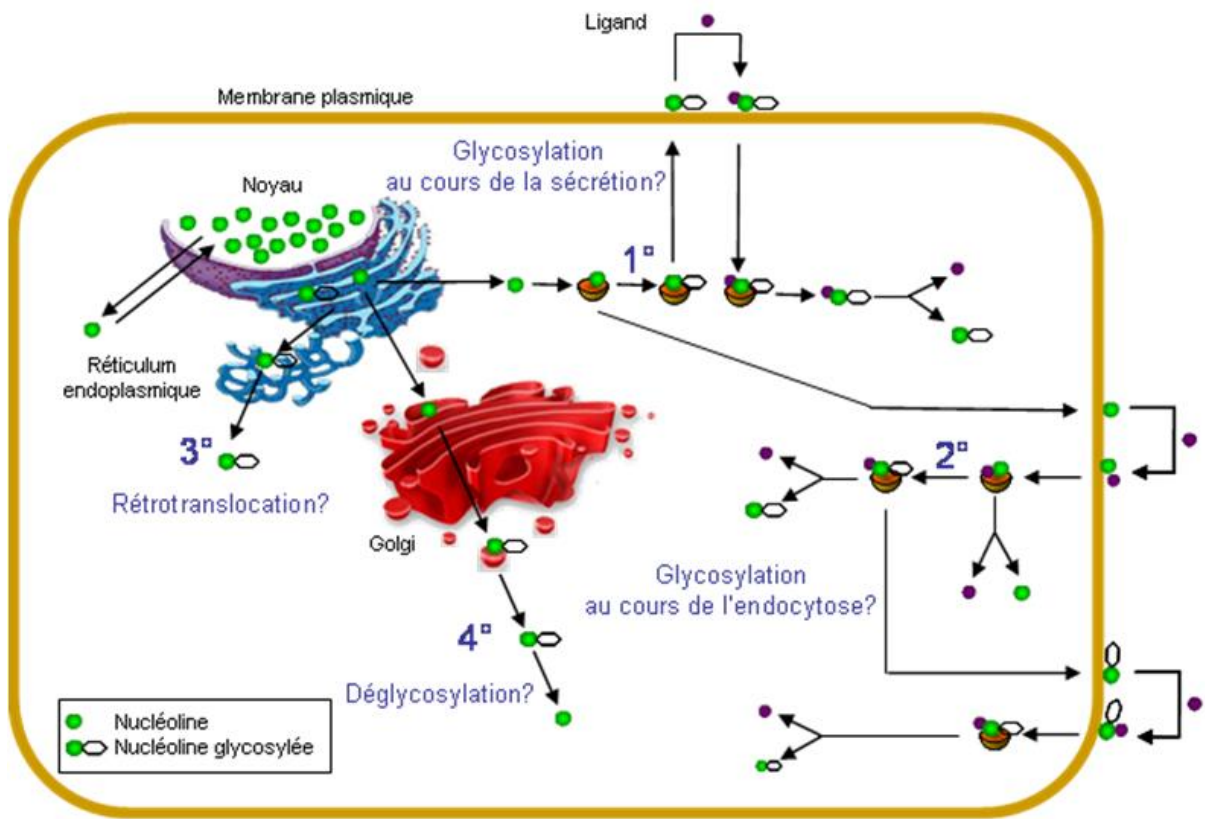


Figure 15 : Schéma représentant les voies hypothétiques empruntées par la nucléoline lors de sa sécrétion et de sa réinternalisation

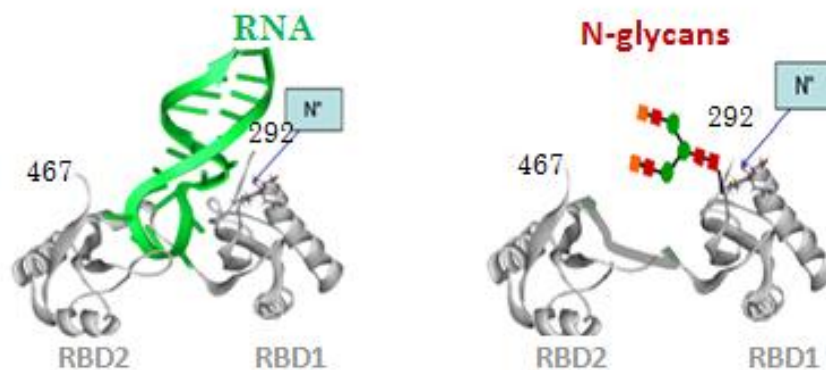


Figure 16 : Rôle hypothétique de la N-glycosylation de la nucléoline dans l'interaction des domaines RBD1 et 2 avec les ARN

Domaines RBD1 et 2 en interaction avec une séquence d'ARN NRE (données de RMN, Allain *et al.*, 2000), et représentation schématique possible de l'encombrement stérique occasionné par l'occupation du site de N-glycosylation (N).

8. PROBLEMATIQUE & STRATEGIES

L'expression d'une isoforme de la nucléoline à la surface des cellules reste, à ce jour, inexplicée. En effet, la présence sur les cellules d'une protéine nucléaire, possédant un signal de localisation nucléaire (NLS) mais pas de signal de sécrétion, est surprenante. Peu d'études sur la nucléoline de surface ont été entreprises, même si un regain d'intérêt est apparu, il y a quelques années, suite à son implication dans l'infection par le VIH et dans l'angiogenèse. De nombreuses questions, concernant l'expression de la nucléoline à la surface des cellules et les rôles propres qu'elle y joue, restent à élucider.

A cet égard, la découverte au Laboratoire d'une modification post-traductionnelle par glycosylation de la nucléoline donne de premiers indices concernant une spécificité structurale et fonctionnelle possible de la nucléoline de surface. Plusieurs autres études ont permis d'appréhender les mécanismes d'expression et d'action de la nucléoline de surface. En particulier, concernant l'adressage de la nucléoline à la surface cellulaire et sa fixation à la membrane plasmique, quelques hypothèses et conclusions ont été formulées (Hovanessian *et al.*, 2000). Par exemple, il semblerait que la fixation de la nucléoline à la surface cellulaire s'effectue plutôt par des interactions hydrophobes que par une présentation par les protéoglycanes, l'expression de la nucléoline à la surface de cellules CHO-618 dépourvues en protéoglycanes étant possible (cf généralités § 6.2.1.1, p.28). Par ailleurs, l'expression de la nucléoline à la surface serait dépendante d'un trafic vésiculaire (cf généralités § 6.1, p.27), et la molécule serait associée aux lipid rafts de la membrane.

Si l'on considère les localisations multiples de la nucléoline dans la cellule, alors qu'elle ne présente ni signal de sécrétion ou séquence de localisation dans sa séquence primaire, autre que la NLS, son trafic est très certainement atypique. L'origine de la glycosylation de la nucléoline, en particulier, n'est pas connue, puisque que la molécule ne possède pas de séquence signal lui permettant de suivre la voie classique de sécrétion (cf généralités § 7.2.1, p.51).

La glycosylation de la nucléoline étant spécifique des formes cytosoliques et de surface, nous avons émis l'hypothèse que cette modification pourrait influencer sur les fonctions de la nucléoline, voire être une condition indispensable à leur exercice, ainsi

que sur son trafic (cf généralités § 7.2.3, p.53 et 7.2.4, p.54). Cette hypothèse est appuyée par l'observation que les sites N- et O-glycosylables sont présents dans les domaines fonctionnels de la protéine.

J'ai consacré mes travaux à l'étude du rôle des N-glycanes de la nucléoline pour plusieurs raisons. La première concerne l'identification précise, réalisée précédemment (Carpentier *et al.*, 2005), des sites N-glycosylables de la molécule, au contraire des sites O-glycosylation présents dans des sites répétitifs TPXKK du domaine N-terminal acide. La seconde raison est la mise en évidence des sites de N-glycosylation à des endroits « stratégiques » de la molécule à la périphérie des sites de fixation des ARNr des domaines RBD1 et RBD3. Ces domaines RBD constituent, en outre, la seule structure de la nucléoline résolue par RMN (Allain *et al.*, 2000b). De plus, les voies « classiques » de N-glycosylation sont bien déterminées et certaines études ont déjà montré un rôle possible de la N-glycosylation dans la régulation du trafic intracellulaire (cf généralités § 7.2.3, p.53), mais également dans la modulation de certains signaux d'interaction de la cellule avec son environnement. La dernière raison est de nature purement technique : nos essais préliminaires ont démontré l'impossibilité d'exprimer, en quantité suffisante et non dégradée, la nucléoline « pleine taille », comprenant donc le domaine N-terminal acide et ses sites potentiels de O-glycosylation, dans les cellules d'insecte et dans *Pichia pastoris*.

Mes travaux de thèse ont donc eu pour objectif de répondre à plusieurs questions :

→ La nucléoline glycosylée de surface possède-t-elle des fonctions spécifiques, autres que celle de récepteur d'endocytose ou d'adhésion, précédemment décrit ?

→ Quel est l'impact éventuel de la N-glycosylation sur les interactions de la nucléoline avec ses partenaires et donc ses fonctions ?

→ Dans quelle mesure la capacité de la nucléoline à être glycosylée peut-elle modifier son trafic ?

Pour répondre à ces questions plusieurs stratégies ont été mises en oeuvre.

Dans un premier temps, en collaboration avec l'équipe d'Ara Hovanessian UPR 2228 CNRS, Paris, Jean-Paul Briand, UPR 9021 CNRS, Strasbourg, et P. Mariot, U800 INSERM, Villeneuve d'Ascq, nous avons effectué des études sur la capacité de la nucléoline de surface à induire des signaux intracellulaires. Ces études ont également permis de démontrer que la nucléoline est exclusivement sous sa forme glycosylée à la surface des cellules, et que la N-glycosylation est nécessaire pour son expression en surface. Dans ces études, le pseudopeptide anti-VIH HB-19, a été utilisé comme ligand spécifique de la nucléoline. Par des méthodes de cytofluorimétrie en flux, de microscopie et d'électrophysiologie (patch clamp), nous avons étudié les variations de concentrations calciques induites suite à la fixation de HB-19, sur la nucléoline de surface chez les cellules T Jurkat. Ces études ont donné lieu à la publication d'un article, paru en 2009, dans *Experimental Cell Research*.

Dans un deuxième volet d'étude, afin d'apprécier l'impact de la N-glycosylation dans la régulation des interactions de la nucléoline avec elle-même et ses ligands, nous avons mis au point la production de formes recombinantes de nucléoline, glycosylées ou non, en cellules d'insecte par un système baculovirus. Ce système a été choisi dans le but d'obtenir des quantités de protéines suffisantes pour des études d'interactions avec ses différents partenaires. Quatre protéines sécrétées ont été ainsi produites, correspondant à la nucléoline déletée de son domaine N-terminal, mutée ou non sur ses 2 sites N-glycosylables. Ces protéines ont été utilisées pour des études d'interaction de la nucléoline sur elle-même et différents partenaires dont son ARN NRE cible et des ligands protéiques tels que la lactoferrine, l'ApoE, la laminine et l'héparine.

Dans un troisième volet, afin d'étudier l'influence de la N-glycosylation sur le trafic intracellulaire de la nucléoline et son expression à la surface des cellules, nous avons mis en place un système de surexpression de la nucléoline recombinante ou de ses mutants de N-glycosylation en cellules de mammifère HEK et Hela, transfectées de manière stable ou transitoire. La nucléoline ainsi produite est fusionnée à l'étiquette 3X-flag, un marqueur permettant de la distinguer de la nucléoline endogène, et de permettre son suivi en microscopie confocale et en cytométrie en flux.

Les résultats de ces études sont présentés dans la partie suivante de ma thèse intitulée « Travaux personnels ».

Travaux
personnels

Chapitre 1

Etude de la capacité de la nucléoline
de surface à induire des signaux
intracellulaires

CHAPITRE 1 : Etude de la capacité de la nucléoline de surface à induire des signaux intracellulaires

1. GENERALITES : LE CALCIUM, UN SECOND MESSAGER DANS LA TRANSMISSION DE SIGNAUX INTRACELLULAIRES

1.1. Mécanismes d'action du calcium dans la différenciation et l'activation cellulaire

Le calcium est une molécule très importante dans de nombreux processus cellulaires, dans lesquels il sert fréquemment de second messager. Les flux calciques à l'intérieur de la cellule, qu'ils soient entrants ou sortants, permettent de relayer une information lors de la transduction d'un signal.

En ce qui concerne les cellules immunitaires, l'activité du calcium a été décrite dans les lymphocytes B et T, les cellules NK (Natural Killer), les cellules dendritiques et les monocytes/macrophages. Dans ces cellules, le calcium est impliqué dans des processus tels que l'activation et la différenciation cellulaires, ou possède des fonctions d'effecteurs comme la stabilisation de synapses entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes.

Les signaux calciques peuvent être de natures différentes selon les canaux impliqués, le sens du flux (entrant ou sortant) et leur origine (relargage à partir d'un stock intracellulaire ou entrée de calcium extracellulaire). Ces signaux peuvent donc conduire à des réponses différentes, à court ou à long terme.

Plus particulièrement, chez les lymphocytes T, l'activation du complexe TCR/CD3 est essentielle à la production d'interleukine 2, à la prolifération cellulaire, et au bon déroulement de la réponse immune médiée par ces cellules (Feske, 2007). Comme illustré sur la figure 17, p.61, le mécanisme d'induction d'un signal calcique par le complexe TCR/CD3 fait intervenir, après fixation d'un ligand, la phospholipase C (PLC) qui va cliver le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate afin d'obtenir de l'IP3 (inositol 1, 4, 5-

trisphosphate) et du DAG (diacylglycérol). L'IP3 va alors se fixer à son récepteur, qui est lui-même un canal perméable aux ions calciques, et entraîner le relargage des stocks de calcium réticulaires (Gardner, 1989). La diminution de la concentration de calcium réticulaire induit, *via* la protéine STIM1, l'activation de la voie SOCE (store-operated calcium entry), c'est-à-dire l'ouverture des canaux SOC (store-operated channels) de la membrane plasmique, représentés majoritairement par les canaux CRAC (Calcium-Release-Activated-Calcium). Ces canaux permettront alors l'entrée massive de calcium extra-cellulaire dans la cellule, ce qui déclenchera des voies d'activation et, à terme, la fixation sur le génome de différents facteurs de transcription impliqués dans l'activation cellulaire (NF- κ b, NFAT et CREB).

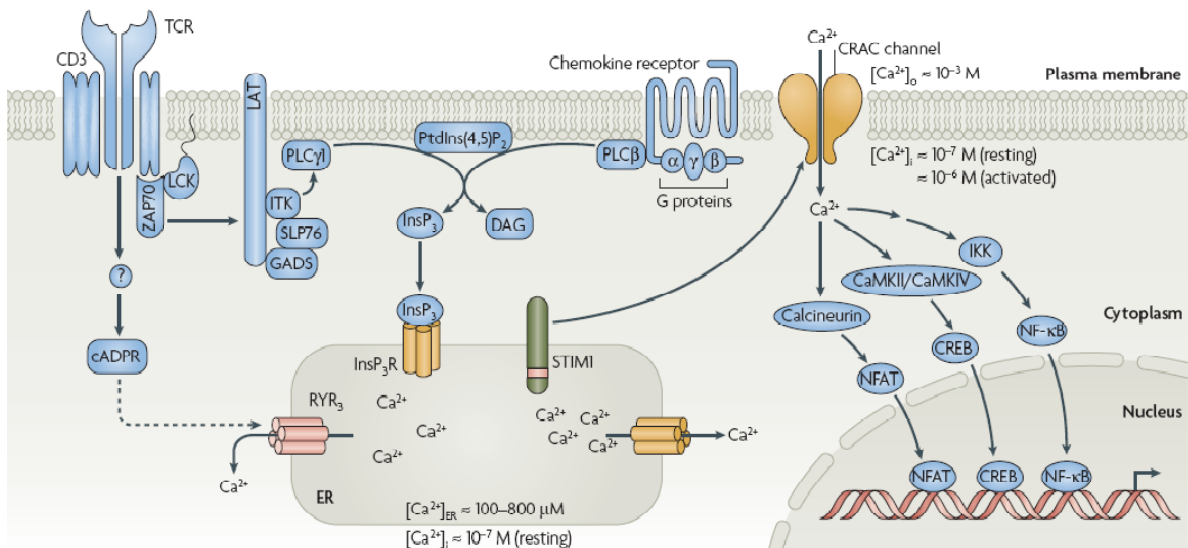


Figure 17 : Store operated calcium entry (SOCE) chez les cellules T (tiré de Feske *et al*, 2007)

Le schéma présente les différentes voies d'activation de flux calciques activables suite à la stimulation du TCR (T-cell receptor) ou des récepteurs des chimiokines.

1.1.1. Les différents canaux calciques de la cellule

Les flux calciques peuvent s'effectuer dans le sens du gradient de concentration en calcium ou à contre-sens. Ce transport de calcium nécessite l'intervention de protéines. Le calciosome, qui est l'ensemble des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique,

est constitué de transporteurs ou canaux assurant la diffusion facilitée ou le transport actif des ions. L'augmentation du niveau intracellulaire de calcium s'opère par les voies « Store-Operated Calcium Entry » (SOCE) et « Calcium-Release-Activated-Calcium » (Dreyfuss *et al.*, 1993). Parmi les canaux calciques, on distingue les Store-Operated Channels (SOC), les Voltage-Operated Channels (VOC), et les Receptor-Operated Channels (ROC). Les plus étudiés sont les SOC pour lesquels de nombreuses protéines ont été recensées, en particulier STIM1 et ORAI1.

1.1.2. Les méthodes d'étude des canaux calciques

L'étude des canaux calciques met classiquement en jeu des méthodes d'électrophysiologie et des méthodes d'imagerie dite « calcique ».

En électrophysiologie, la technique du « patch-clamp » est couramment utilisée. C'est une technique basée sur la propriété des pipettes en verre de coller aux membranes biologiques, formant ainsi une zone de très forte résistance qui isole électriquement la portion de membrane ("patch") présente sous la pipette. Plusieurs configurations peuvent être utilisées en patch clamp. Lorsque la pipette est collée sur la membrane, c'est la configuration cellule-attachée ("cell-attached"). Si l'on éloigne la pipette de la membrane on obtient la configuration "inside-out" avec la face interne de la membrane dans le bain. A partir de la configuration « cellule-attachée », on peut rompre la membrane sous la pipette par aspiration, et l'on obtient la configuration « cellule-entière » ("whole-cell") (réalisée dans cette étude) à partir de laquelle on peut réaliser un "outside-out" si l'on éloigne la pipette de la membrane. Le but de l'opération est ensuite de pouvoir mesurer des courants membranaires en imposant un potentiel de part et d'autre de la membrane (« voltage-clamp » – réalisé dans cette étude) ou de mesurer un potentiel membranaire en imposant un courant (« current-clamp »). Dans la configuration « cellule-entière », l'activité macroscopique de l'ensemble des courants cellulaires est mesurée : c'est celle de l'intégralité des canaux calciques de la membrane. L'identification des courants passant spécifiquement par les canaux calciques est réalisée grâce aux activateurs et inhibiteurs sélectifs de canaux calciques mentionnés ci-après.

Les méthodes d'imagerie calcique nécessitent l'utilisation de marqueurs spécifiques du calcium qui, une fois introduits dans les cellules, permettent de développer une fluorescence proportionnelle à la concentration intracellulaire en calcium. Les variations de fluorescence sont enregistrées, en temps-réel, par vidéo-microscopie. Une alternative à cette technique, utilisée dans cette étude, est l'utilisation de la cytofluorimétrie en flux pour la mesure des variations de fluorescence dans les cellules.

Les principales sondes calciques utilisées sont le Fura-2 (Figure 18, p.63), l'Indo-1 et le Fluo-4. Ces sondes sont dérivées des chélateurs de calcium. La liaison du calcium avec la sonde entraîne à la fois une variation de l'intensité de fluorescence, et un déplacement du spectre d'excitation (Fura-2) ou du spectre d'émission (Indo-1). La plupart des indicateurs fluorescents du Ca^{2+} sont des anions polycarboxylés imperméants, et ne peuvent donc être utilisés qu'après perméabilisation ou microinjection des cellules. Ces molécules ont été rendues perméantes en ajoutant un groupement acétométhylester (AM) qui sert à masquer les charges négatives sur les groupements carboxyles de la molécule, ce qui lui permet de passer à travers les membranes. L'activation de la sonde est réalisée par action des estérases endogènes.

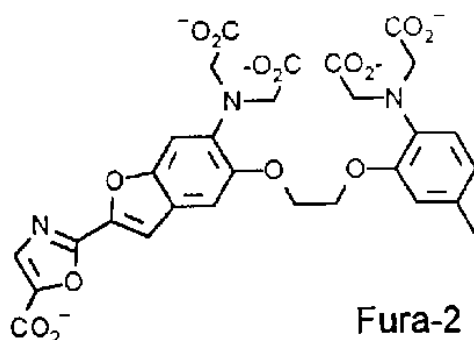


Figure 18 : Structure du Fura-2

Parmi les inhibiteurs courants des canaux calciques, on trouve le SKF-96365 et le 2-aminoethoxy diphenyl borate (2APB) qui sont des inhibiteurs de canaux CRAC, mais aussi le chlorure de cadmium qui est capable d'inhiber les canaux VOC. Cependant, aucun de

ces inhibiteurs n'est absolu et, dans certains cas (chlorure de cadmium, par exemple), leur spécificité pourra être dépendante de leur concentration.

2. BUTS POURSUIVIS ET RESULTATS OBTENUS

2.1. Buts poursuivis

Le mode de présentation de la nucléoline à la surface cellulaire reste inexpliqué car la molécule ne possède ni domaine transmembranaire hydrophobe, ni d'ancre GPI pour son ancrage à la membrane. On sait cependant qu'elle y exerce des fonctions de récepteur vis-à-vis d'un certain nombre de ligands associés à des activités de prolifération et de différenciation cellulaires, tumorigenèse, angiogenèse et inflammation (voir généralités, § 6.2.1, p.28 et 6.2.2, p.29). Pour certains de ces ligands tels que l'apoE, le facteur J, la midkine et la lactoferrine, l'interaction avec la nucléoline est suivie de leur internalisation dans la cellule et, éventuellement, de leur ciblage nucléaire (voir généralités, § 6.2.1, p.28), des évènements pouvant expliquer leur mode d'action et le rôle joué par la nucléoline. Cependant, pour d'autres ligands tels que la laminine et les sélectines P et L, l'endocytose pas été démontrée. Enfin, pour certains ligands tels que le facteur J, il a été suggéré que la transduction de signaux à travers la membrane plasmique fait suite à l'interaction avec la nucléoline de surface (voir généralités, § 6.2.2, p.29).

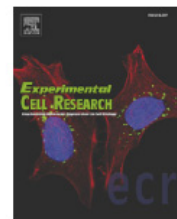
Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la possibilité que la nucléoline puisse servir de récepteur ou de co-récepteur à un ligand pour la transduction de signaux dans la cellule. Le modèle que nous avons choisi est le lymphocyte T sur lequel ont été précédemment mises en évidence les isoformes glycosylées de la nucléoline extra-cellulaire (Carpentier *et al.*, 2005). Nous nous sommes intéressés à la possibilité qu'aurait la nucléoline de générer des flux calciques intracellulaires dans le lymphocyte T, un évènement majeur dans le mécanisme d'activation de cette cellule, mais également dans d'autres cellules où ce mécanisme de transduction du signal tient une place importante (cellules cancéreuses de prostate).

2.2. Résultats obtenus

Les cellules Jurkat, une lignée de lymphoblastes T, ont été utilisées comme modèle cellulaire de lymphocytes T. Tout d'abord, en collaboration avec l'équipe du Dr. Ara Hovanesian (UPR2228 CNRS), par marquage métabolique, nous avons confirmé que la glycosylation est une spécificité structurale de la nucléoline exprimée à la surface des cellules. Nous démontrons ainsi que la nucléoline est exprimée exclusivement glycosylée à la surface des cellules. Par ailleurs, en utilisant la tunicamycine, un inhibiteur de la N-glycosylation, nous montrons que cette glycosylation est nécessaire à l'expression de la nucléoline à la surface cellulaire.

Sur les lymphocytes T, comme décrit ci-dessus et illustré dans la Figure 17, p.61, la fixation d'un antigène sur le TCR (T-cell Receptor) induit le relargage de calcium à partir des stocks de calcium intracellulaire, suivi d'une entrée du calcium extra-cellulaire dans la cellule et d'une élévation importante de la concentration en calcium intracellulaire. Nous avons étudié si un tel phénomène pouvait être induit par la fixation d'un ligand sur la nucléoline à la surface des cellules Jurkat. Le pseudopeptide HB-19 a été utilisé comme ligand spécifique dans nos expériences et nous avons démontré, par des expériences de cytofluorimétrie en flux, que la fixation d'HB-19 entraîne un flux transitoire de calcium chez les cellules Jurkat, comparable à celui observé pour le TCR, mais uniquement chez les cellules en prolifération et exprimant donc la nucléoline à leur surface. L'utilisation d'inhibiteurs de canaux calciques nous a permis de démontrer l'implication des canaux de type SOC dans ce processus. En collaboration avec Pascal Mariot, (U800 INSERM), nous avons confirmé ces observations sur des cellules cancéreuses prostatiques PC3 et DU145 par des expériences d'imagerie calcique et de patch-clamp. Cet article démontre pour la première fois, que la fixation d'un ligand sur la nucléoline de surface peut induire un signal calcique intracellulaire.

3. ARTICLE : THE CELL SURFACE EXPRESSED NUCLEOLIN IS A GLYCOPROTEIN THAT TRIGGERS CALCIUM ENTRY INTO MAMMALIAN CELLS

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

The cell surface expressed nucleolin is a glycoprotein that triggers calcium entry into mammalian cells

Marie-Estelle Losfeld^a, Diala El Khoury^b, Pascal Mariot^c, Mathieu Carpentier^a, Bernard Krust^b, Jean-Paul Briand^d, Joël Mazurier^a, Ara G. Hovanessian^b, Dominique Legrand^{a,*}

^aUnité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche n° 8576 du Centre National de la Recherche Scientifique, France

^bUnité Propre de Recherche n° 2228 du CNRS, Université Paris Descartes, 45, rue des Saints Pères, 75270 Paris Cedex 6, France

^cLaboratoire de Physiologie cellulaire, INSERM U800, Institut Fédératif de Recherche n° 147, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

^dUnité Propre de Recherche n° 9021 du CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, 67000 Strasbourg, France

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 19 September 2008

Revised version received

16 October 2008

Accepted 23 October 2008

Available online 6 November 2008

Keywords:

Surface nucleolin

HB-19 pseudopeptide

Glycosylation

Calcium flux

Calcium channels

ABSTRACT

Nucleolin is an ubiquitous nucleolar phosphoprotein involved in fundamental aspects of transcription regulation, cell proliferation and growth. It has also been described as a shuttling molecule between nucleus, cytosol and the cell surface. Several studies have demonstrated that surface nucleolin serves as a receptor for various extracellular ligands implicated in cell proliferation, differentiation, adhesion, mitogenesis and angiogenesis. Previously, we reported that nucleolin in the extranuclear cell compartment is a glycoprotein containing N- and O-glycans. In the present study, we show that glycosylation is an essential requirement for surface nucleolin expression, since it is prevented when cells are cultured in the presence of tunicamycin, an inhibitor of N-glycosylation. Accordingly, surface but not nuclear nucleolin is radioactively labeled upon metabolic labeling of cells with [³H]glucosamine. Besides its well-demonstrated role in the internalization of specific ligands, here we show that ligand binding to surface nucleolin could also induce Ca²⁺ entry into cells. Indeed, by flow cytometry, microscopy and patch-clamp experiments, we show that the HB-19 pseudopeptide, which binds specifically surface nucleolin, triggers rapid and intense membrane Ca²⁺ fluxes in various types of cells. The use of several drugs then indicated that Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE)-like channels are involved in the generation of these fluxes. Taken together, our findings suggest that binding of an extracellular ligand to surface nucleolin could be involved in the activation of signaling pathways by promoting Ca²⁺ entry into cells.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Nucleolin (C23) is a multifunctional RNA- and protein-binding protein ubiquitously expressed in exponentially growing eukaryotic cells. It is involved in fundamental aspects of transcription, cell proliferation and growth. Nucleolin is found at several locations

in cells: in the nucleolus it controls many aspects of DNA and RNA metabolism; in the cytoplasm it shuttles proteins into the nucleus and provides a posttranscriptional regulation of strategic mRNAs; and on the cell surface where it serves as an attachment protein for several ligands from growth factors to virus particles [1–4]. Nucleolin contains three main structural domains: N-terminal

* Corresponding author. Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université des Sciences et Technologies de Lille, UMR CNRS 8576, IFR 147, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France. Fax: +33 320436555.

E-mail address: dominique.legrand@univ-lille1.fr (D. Legrand).

region containing several long stretches of acidic residues; central globular domain containing four RNA binding sites; C-terminal domain containing nine repeats of the tripeptide arginine–glycine–glycine (RGG or GAR domain) [5]. Surface and cytoplasmic nucleolin are differentiated from nuclear nucleolin by a slight shift in their isoelectric point, which could reflect glycosylation of surface/cytoplasmic nucleolin [4,6]. Moreover, surface/cytoplasmic nucleolin is differentially regulated compared to its nuclear counterpart, since marked reduction of surface/cytoplasmic nucleolin occurs without any apparent effect on the level or nucleolar localization of nuclear nucleolin [7]. Both nuclear and surface nucleolin are phosphorylated; nuclear nucleolin is phosphorylated by casein kinase 2 (CKII) at interphase and by cell-cycle control CDC2 kinase during mitosis, whereas surface nucleolin is phosphorylated by casein kinase-like ecto-protein kinase [5,8]. In different types of cells, the expression of surface nucleolin is closely associated with cell proliferation [4]. Nucleolin mRNA is systematically detectable in peripheral blood lymphocytes of healthy individuals, and *in vitro* stimulation of cells leads to an enhanced expression of nucleolin mRNA and surface nucleolin [9–11].

During the last 10 years, considerable progress has been achieved on the characterization of surface nucleolin using the HB-19 pseudopeptide, which is a potent antagonist that binds the RGG domain of nucleolin [12]. HB-19 binds cells specifically and forms a stable complex with the cell-surface expressed nucleolin before internalization of the complex by an active process [7,12–15]. In spite of the fact that nucleolin does not have a hydrophobic transmembrane domain for anchorage in the plasma membrane, cross-linking of surface nucleolin with a specific monoclonal antibody results in its clustering in the plasma membrane. This clustering occurs at the external side of the plasma membrane and is dependent on the existence of an intracellular intact actin cytoskeleton [4]. An actin-based motor protein, the nonmuscle myosin heavy chain 9, could serve as a physical linker between surface nucleolin and actin [16]. Upon stimulation of cell proliferation, cytoplasmic nucleolin is translocated to the surface through a temperature-dependent but unconventional secretory pathway [4]. Surface nucleolin serves as a low affinity receptor for HIV-1 and various growth factors that interact with the RGG domain of nucleolin, such as midkine, pleiotrophin, and lactoferrin [15,17–20]. Binding of these ligands results in clustering of cell-surface nucleolin in lipid raft membrane microdomains before endocytosis of the ligand–nucleolin complex by an active process. Accordingly, surface nucleolin could shuttle ligands between the cell surface and the nucleus thus acting as a mediator for the extracellular regulation of nuclear events [19,21,22].

Since the first report of surface expression of nucleolin in hepatocarcinoma cells [23], emerging evidences suggest that cell-surface nucleolin is implicated in cell proliferation, tumor cell growth and angiogenesis. The enhanced expression of surface nucleolin is observed *in vitro* and *in vivo* in lymphoid organs containing activated lymphocytes, on the surface of tumor and endothelial cells, or in angiogenic endothelial cells within the tumor vasculature [7,11,24]. Among surface nucleolin-binding growth factors and proteins, midkine and pleiotrophin can transform cells, whereas on endothelial cells they exert both mitogenic and angiogenic effects [25]. Urokinase that also binds the RGG domain of nucleolin is implicated in mechanisms regulating pericellular proteolysis, cell-surface adhesion, and mitogenesis [22,26]. Other surface nucleolin-binding proteins such as laminin-

1, factor J, L- and P-selectins, and hepatocyte growth factor that are involved in tumor development, induce cell differentiation, regulate cell adhesion, leukocyte trafficking, inflammation and angiogenesis [27–32]. The tumor homing peptide F3 that binds both endothelial and tumor cells is internalized *via* surface nucleolin, while endostatin that inhibits angiogenesis binds nucleolin on the surface of endothelial cells before translocation to the nucleus [11,33]. Consequently, the functional blockade or down-regulation of surface nucleolin in endothelial cells inhibits migration of endothelial cells and prevents capillary-tubule formation [16]. Taken together, these observations have indicated that cell-surface nucleolin represents a potential target to consider for the development of reagents in cancer therapy [34,35]. Consistent with this, we recently reported that the progression of established human breast tumor cell xenografts in the nude mice is markedly suppressed by targeting surface nucleolin with the HB-19 pseudopeptide that acts directly on both tumor and endothelial cells by blocking and down-regulating surface nucleolin [7].

Surface nucleolin has also been shown to serve the binding partner for receptor protein tyrosine phosphatase-sigma ectodomain in skeletal muscle [36], whereas the interaction of surface nucleolin with ErbB receptor tyrosine kinases that are associated with malignant transformation induces receptor dimerization, phosphorylation and to anchorage independent growth [37]. These results, the association of surface nucleolin expression with cell proliferation, and the capacity of nucleolin binding ligands to transform and differentiate cells [1,4,32,38], suggest that surface nucleolin might be implicated directly or indirectly in signal transduction events after interaction with various ligands. In order to test whether surface nucleolin could mediate signaling events, we investigated whether ligand binding to surface nucleolin could generate intracellular Ca^{2+} fluxes. For this purpose, we used Jurkat cells that can be activated by antigen or anti-CD3 antibody binding to the T-cell receptor (TCR), which lead to the activation of phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) and protein kinases, and trigger the release of Ca^{2+} from intracellular Ca^{2+} stores (reviewed in [39]).

Here we first confirmed that surface but not nuclear nucleolin is glycosylated in different types of cells consistent with our earlier findings [6]. By using tunicamycin, a N-glycosylation inhibitor, we show that surface expression of nucleolin is markedly reduced without apparent effect on cytoplasmic and nuclear nucleolin, thus indicating that glycosylation is an essential requirement for the expression of surface nucleolin. The glycosylation of surface nucleolin and its capacity to interact with a large spectrum of physiological ligands raise questions on its putative role(s) in cell physiology. For this reason, we investigated whether ligand binding to surface nucleolin could generate Ca^{2+} variations in cells and thus initiate signaling events. As a nucleolin ligand, we used HB-19 that binds the GAR domain of nucleolin and inhibits the binding of midkine, pleiotrophin and lactoferrin to cells [15,17–19]. Through flow cytometry kinetic experiments, we show that HB-19 induces high transitory Ca^{2+} membrane fluxes in Jurkat cells; comparable to those induced *via* TCR activation. The level of Ca^{2+} flux is elevated in proliferating cells that express increased levels of surface nucleolin. Studies with various Ca^{2+} channel inhibitors indicate that the activation process involves SOC-like channels rather than voltage-gated channels. These effects were confirmed on PC3 and DU145 prostate cancer cells using microscopy and patch-clamp experiments. This is the first report showing that ligand binding to surface nucleolin could trigger intracellular Ca^{2+} signaling.

Materials and methods

Cells

Jurkat (clone E6; T lymphocytes; acute T cell leukemia) and HuT 78 (cutaneous T lymphocytes) from the American Type Culture Collection (ATCC) were routinely grown at 37 °C in a humidified atmosphere under 5% CO₂ in RPMI-1640 medium (Gibco, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) containing 2 mM L-glutamine, 20 mM Hepes, and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Seromed, Poly-Labo, Strasbourg France). Cells were kept at logarithmic growth phase and used at a cell density of 6 × 10⁵/ml. Viability of the cells used for the cytometry experiments was >97%, as assessed by flux cytometry using a difluoroacetate staining assay. PC3 and DU145 prostate cancer cells were purchased from the ATCC and grown as recommended in RPMI-1640 (Biowhittaker, Fontenay-sous-Bois, France) supplemented with 10% FCS and 5 mM L-glutamine. Cells were routinely grown in 25 cm² flasks in a humidified atmosphere at 37 °C under 5% CO₂. For electrophysiological and imaging studies, cells were subcultured on glass coverslips in Petri dishes (Nunc, Thermo Fisher, Roskilde, Denmark) using trypsin treatment. The culture medium was then changed every 3 days.

Antibodies and dyes

The mouse anti-nucleolin monoclonal antibody was provided by Dr. J. S. Deng. Polyclonal antibodies against nucleolin were prepared in the laboratory by immunizing rabbits with a recombinant glycosylated secreted protein obtained by a baculovirus system and corresponding to residues 293 to 706 (N-terminal domain-deleted nucleolin) of human nucleolin. These antibodies were found to recognize specifically both glycosylated and non-glycosylated 293–706 proteins corresponding to the C-terminus of nucleolin and Jurkat cell-isolated nucleolin, either by Western blotting or by immunoprecipitation (data not shown). After ammonium sulfate precipitation (at 33% saturation) of the rabbit immune serum, anti-nucleolin polyclonal antibodies reacted with one single band, i.e. nucleolin, and they were consistently used for the detection of cell surface nucleolin by flow cytometry. FITC-conjugated swine anti-rabbit IgG polyclonal antibodies were from Dako (Glostrup, Denmark). The Fluo-4-AM dye "Fluoro-pure grade" was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

Peptide constructs

The HB-19 pseudopeptide 5[Kψ(CH₂N)PR]-TASP, for 5[Lysψ(CH₂N)Pro-Arg]-template-assembled synthetic peptide, binds specifically surface nucleolin and blocks its function. The template in HB-19, presents pentavalently the tripeptide [Kψ(CH₂N)PR] where (CH₂N) represents a reduced peptide bond between lysine and proline residues. The synthesis of HB-19, biotinylated HB-19 (HB-19/Btn; for the recovery of surface nucleolin) and control peptides 5[RPN]-TASP and 5[KER]-TASP were synthesized as described previously using solid phase peptide methodology [10,12,14,15]. The synthetic F3 peptide (AKVKDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAKK) is a tumor-homing peptide corresponding to the 34 amino acid fragment of a high mobility group protein, HMG2N [11,17]. All peptides were obtained at a high purity (>95%), and their integrity was

controlled by matrix-associated laser desorption ionization-time-of-flight analysis.

Preparation of cytoplasmic and nuclear extracts

Cells washed in phosphate-buffered saline (PBS) were lysed in buffer E (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM β-mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail (Sigma) and 0.5% Triton X-100) and the nuclei were pelleted by centrifugation (1000 g for 5 min). For the preparation of nuclear extracts, the nuclear pellet was disrupted in buffer I (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM KCl, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 5 mM β-mercaptoethanol, aprotinin (1000 U/ml), 1% Triton X-100, and 20% glycerol). The nucleus-free supernatants and the nuclear extracts were then centrifuged at 12,000 g for 10 min, and the supernatants were stored at -20 °C. Aliquots of crude cell extracts were diluted in 2-fold concentrated electrophoresis sample buffer containing SDS, heated and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) [15,40].

Purification of the cell-surface-expressed nucleolin

Two days after passaging, Jurkat and HuT 78 cells in suspension (5 × 10⁵ cells/ml) or subconfluent PC3 cells (about 5 × 10⁶ cells/75 cm² flask) were incubated (45 min, 20 °C) with 5 μM of HB-19/Btn. After washing extensively in PBS containing 1 mM EDTA (PBS-EDTA), nucleus-free cell extracts were prepared in lysis buffer E. The complex formed between cell-surface expressed nucleolin and HB-19/Btn was isolated by purification of the extracts using NeutrAvidin agarose (100 μl; Pierce Biotechnology) in PBS-EDTA. After 3 h at 6 °C, the avidin-agarose samples were washed extensively with PBS-EDTA. The purified surface nucleolin was eluted in the electrophoresis sample buffer containing SDS and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The presence of nucleolin was then revealed by immunoblotting using mAb D3 against nucleolin as described before [12,15].

Metabolic labeling of cells with [³H]glucosamine

Jurkat cells (25 × 10⁶ cells at 5 × 10⁵ cells/ml) were cultured for 24 h in RPMI-1640 medium containing 1% FCS (dialyzed against glucose-free DMEM medium). Cells were then suspended in 50 ml of glucose-free DMEM medium (5 × 10⁵ cells/ml) containing 10% dialyzed-FCS and cultured for 2 h before resuspending in 5 ml of the same culture medium (5 × 10⁶ cells/ml) in the presence of 100 μCi/ml of D-[1,6-³H]glucosamine (1.26 TBq/mmol; GE Healthcare, U.K.). After 3 h of incubation, cells were incubated (30 min, 20 °C) with 5 μM of HB-19/Btn for the recovery of surface nucleolin before preparation of cytoplasmic and nuclear extracts. Cytoplasmic extracts were purified using avidin-agarose to recover surface nucleolin, whereas nuclear extracts were purified by affinity chromatography using HB-19/Btn-avidin-agarose [13].

Flow cytometry analyses of Ca²⁺ fluxes in Jurkat cells

Flow cytometry analyses of Ca²⁺ fluxes in Jurkat cells were performed according to the technique of Partiseti et al. [41] but with slight modifications. Briefly, exponentially growing cells (4–6 × 10⁵ cells/ml) were pelleted at 150 g for 5 min. The cell pellet was

resuspended at a density of 10^6 cells/ml of RPMI containing 1% (w/v) BSA and 5 μ M Fluo-4-AM (Fluo-4-AcetoxyMethyl ester) (Molecular Probes, OR, USA) and dispatched up into 5 ml Falcon cytometry tubes (5×10^5 cells/tube) for 45 min at 37 °C in the dark. Fluo-4-AM is a lipophilic Ca^{2+} indicator able to penetrate through the cytoplasmic membrane and to be hydrolyzed by intracellular esterases in Fluo-4, a hydrophilic dye emitting green fluorescence at 530 nm when excited at 488 nm and in complex with Ca^{2+} . In some experiments, 5 μ M HB-19 was added into the above-mentioned incubation mixture. Dye-treated cells were then pelleted at 150 g for 5 min and resuspended in 100 ml of RPMI containing 1% BSA just prior to FACS analysis.

FACS analysis of Ca^{2+} fluxes was performed on a Becton-Dickinson FACSCalibur flow cytometer (Le-Pont-de-Claix, France). Immediately after addition of 400 μ l RPMI with 1% BSA containing inductors and/or drugs at various concentrations (as specified in the legends to figures) to the 100 μ l cell suspensions, cells were submitted to cytometry analysis. 20,000 cells were collected by the cytometer every 15 s for 5 min in the dark (flow switch set to medium position). In all kinetic studies, the green fluorescence parameters (FL1) of a total of about 400,000 cells (events) were recorded. Data are expressed in graphs as the mean intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) of cells collected every 15 s during the first 180 s and then every 30 s. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was calculated according to the formula $[\text{Ca}^{2+}]_i = (K_{app}(M - M_{min})) / (M_{max} - M)$ where M_{min} is the minimal fluorescence intensity obtained by incubating cells in the presence of 2 mM EGTA, M_{max} is the maximal fluorescence intensity obtained by incubating cells with 2 μ M ionomycin (Sigma) and K_{app} is the affinity constant of Fluo-4-AM for Ca^{2+} ($K_{app} = 345$ nM, as specified by the manufacturer). The results are expressed either as data from a single representative flow cytometry kinetic graph from a series of 3–6 experiments or as histograms of the maximal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by HB-19 and anti-CD3 antibodies at 90 and 120 s, respectively. The basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measured at 90 s in cells incubated with medium without inductor is shown. Data presented are means \pm standard errors of 3–6 independent experiments.

Flow cytometry detection of surface nucleolin on Jurkat cells

Flow cytometry analysis of surface nucleolin on Jurkat cells was performed by pelleting exponentially growing cells ($4\text{--}6 \times 10^5$ cells/ml) at 150 g for 5 min. The cell pellet (5×10^5 cells) was washed twice with RPMI containing 1% (w/v) BSA and resuspended at a density of 10^6 cells/ml in 500 μ l RPMI containing 1% (w/v) BSA and a 1:500 dilution of purified anti-nucleolin rabbit polyclonal antibodies for 30 min at room temperature. The control sample was prepared by incubating cells with a 1:500 dilution of non-immune rabbit antibodies. After 3 washes with RPMI containing 1% (w/v) BSA, cells were incubated with a 1:100 dilution of FITC-conjugated swine anti-rabbit IgG polyclonal antibodies (Dako) for 20 min at room temperature, washed twice in RPMI containing 1% (w/v) BSA and analyzed by flow cytometry.

Fura-2 imaging of intracellular Ca^{2+} in PC3 and DU145 cells

Fluorescence measurement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in prostate cancer cells was carried out in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) containing 142 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 0.34 mM NaH_2PO_4 , 0.44 mM KH_2PO_4 , 10 mM HEPES and 5.6 mM glucose. The osmolarity and pH of external solutions were adjusted to 310 mOsm

L^{-1} and 7.4, respectively. Cytosolic Ca^{2+} concentration was measured using Fura-2-AM-loaded cells. PC3 and DU145 cells were loaded for 45 min at room temperature with 2 μ M Fura-2-AM prepared in HBSS and subsequently washed three times with the same dye-free solution. The coverslip was then transferred into a perfusion chamber on an Olympus IX70 microscope equipped for fluorescence. Fluorescence was alternatively excited at 340 and 380 nm with a monochromator (Polychrome IV, TILL Photonics GmbH, Planegg, Germany) and was captured after filtration through a longpass filter (510 nm) by a MicroMax 5 MHz CCD camera (Princeton Instruments, Evry, France). Acquisition and analysis were performed with the Metafluor 4.5 software (Universal Imaging Corp., West Chester, PA, USA). The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was derived from the ratio of the fluorescence intensities for each of the excitation wavelengths (F340/F380) and from the equation of [42]. All recordings were carried out at room temperature. Reagents (HB-19 or control peptides) were added *via* a puffing pipette placed nearby the cells.

Patch-clamp experiments on PC3 cells

Patch-clamp recordings were performed in the whole-cell configuration [43] using a RK-300 patch-clamp amplifier (Biologic, Grenoble, France). The patch-clamp amplifier was driven by the Pulse 9.1 software (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany) as described elsewhere [44]. To measure HB-19-activated cationic currents, bath medium contained 140 mM NaCl, 6 mM CsCl, 10 mM TEA-Cl, 10 mM HEPES, 5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 and 5 mM glucose and patch-pipettes were filled with a solution containing 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, 3 mM MgCl_2 and 2 mM EGTA.

Results

Expression of surface nucleolin in lymphoblastoid and epithelial tumor cells

Nucleolin is a 110 kDa protein present in the nucleus, cytoplasm, and at the cell surface (Fig. 1). Several observations have demonstrated that HB-19 is a specific antagonist of surface-expressed nucleolin by binding to the C-terminal RGG domain [12,15,17–19]. HB-19 presents pentavalently the tripeptide $\text{K}\psi(\text{CH}_2\text{N})\text{PR}$ in which the reduced peptide bond provides high stability against serum proteases. The binding of HB-19 to surface nucleolin is specific and is independent of the expression of cell-surface heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. Furthermore, cross-linking of cell surface bound HB-19 results in clustering of surface nucleolin and its colocalization with the pseudopeptide. This ligand-dependent clustering of nucleolin confirms that surface nucleolin is the target of HB-19. Following binding and forming a stable complex with surface nucleolin, HB-19 is internalized at 37 °C but at 20 °C it remains attached to the cell surface indicating that internalization is an active process [4,12,15].

Surface nucleolin can be isolated conveniently by the capacity of HB-19 to form a stable and an irreversible complex with it [15]. Consequently, incubation of cells with biotinylated HB-19 (HB-19/Btn) followed by purification of cytoplasmic extracts using avidin-agarose provides an efficient method for monitoring surface nucleolin expression. For example in human lymphoblastoid HuT 78 and Jurkat cells and in epithelial PC3 prostate cancer cells, HB-19 binds surface nucleolin in a dose-dependent manner with

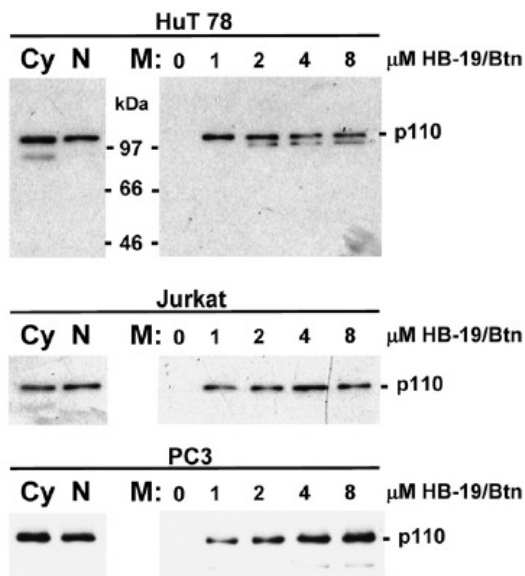


Fig. 1 – Surface nucleolin is expressed in different types of cells. HuT 78, Jurkat and PC3 cells were incubated in the absence (lanes 0) or presence of 1, 2, 4, and 8 μM HB-19/Btn (lanes 1, 2, 4, and 8) at 20 °C for 45 min before preparation of cytoplasmic extracts and purification of surface nucleolin using avidin-agarose (referred by the letter M for membrane) as described in Materials and methods. Cytoplasmic and nuclear extracts (lanes Cy and N, respectively) were also prepared from control untreated cells. Samples of crude cytoplasmic and nuclear extracts (material corresponding to 5×10^5 cells) and surface nucleolin (material purified from extracts of 5×10^6 cells) were analyzed by immunoblotting using mAb D3 against human nucleolin. The position of molecular weight markers is shown. On the right, p110 shows the 110 kDa undegraded nucleolin. Sections corresponding to the level of nucleolin are presented in the case of Jurkat and PC3 cells.

maximum binding occurring at concentrations 1, 2, 4 and 8 μM , respectively (Fig. 1). The reduction of surface nucleolin at higher concentrations of HB-19 in HuT 78 and Jurkat cells is due to degradation that occurs in some types of cells, which could be observed here by the presence of a faster migrating band in the case of HuT 78 cells. When bound to HB-19, the conformation of nucleolin might be more susceptible to degradation by cell surface proteases. Partial degradation of the 110 kDa nucleolin band is also observed in cytoplasmic but not nuclear extracts from control untreated cells (Fig. 1, lanes Cy and N), and the degree of degradation varies between different cell types. The fact that degradation of nucleolin mainly occurs at the cell surface of some types of cells suggest the implication of extracellular matrix proteases rather than the consequence of a self cleaving activity as previously reported [45].

N-glycosylation is an essential requirement for nucleolin expression at the cell surface

The presence of glycosylated extranuclear forms of nucleolin was previously detected [6]. We have studied here whether N-

glycosylation may affect nucleolin expression at the surface of cells. For this purpose, Jurkat, HuT 78 and PC3 cells were stimulated with fresh medium containing 10% FCS and cultured for 5 h in the presence of 2 and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of tunicamycin, an inhibitor of N-glycosylation. Control and tunicamycin-treated cells were then incubated with HB-19/Btn for the recovery of surface nucleolin. Tunicamycin treatment resulted in a marked reduction of surface nucleolin in the absence of any apparent effect on the level of nucleolin that was detectable in the cytoplasmic extracts of the different cell types studied (Fig. 2). As N-glycosylation is primarily a co-translational process that occurs during translocation of the nascent protein to endoplasmic reticulum [46], our results suggest that nucleolin is synthesized normally in the presence of tunicamycin but its transport to the cell surface is prevented because of an inhibitory effect on N-glycan incorporation in the newly synthesized protein. Consistent with this, inhibition of protein synthesis by cycloheximide results in a marked reduction of both cytoplasmic (data not shown) and surface nucleolin [4]. Further evidence for N-glycosylation of surface nucleolin was provided by metabolic labeling cells with [^3H]-glucosamine before recovery of surface nucleolin using HB-

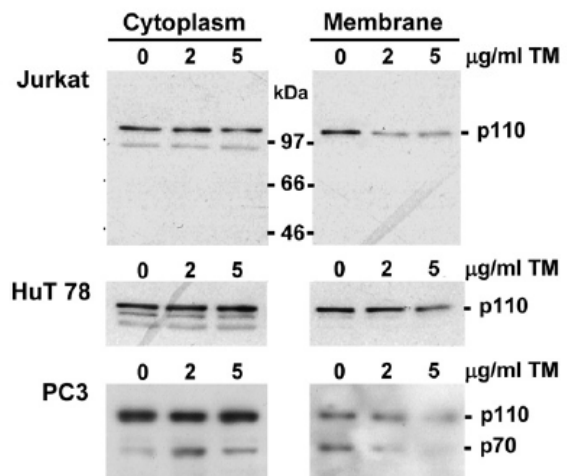


Fig. 2 – Inhibition of N-glycosylation decreases surface nucleolin expression in cells. Jurkat, HuT 78, and PC3 cells in the absence (lanes 0) or presence of 2 and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of tunicamycin (lanes 2 and 5) were cultured for 5 h before incubation (20 °C, 45 min) with 5 μM HB-19/Btn. Cytoplasmic extracts were then purified using avidin-agarose as described in Materials and methods. Samples of crude cytoplasmic extracts (material corresponding to 5×10^5 Jurkat and HuT 78 cells, and 2×10^5 PC3 cells) and surface nucleolin (material purified from extracts of 5×10^6 Jurkat and HuT 78 cells, and 2×10^6 PC3 cells) were analyzed by immunoblotting using mAb D3 against human nucleolin. The position of molecular weight markers is indicated. On the right, p110 shows the 110 kDa undegraded nucleolin. Sections corresponding to the level of nucleolin are presented in the case of HuT 78 and PC3 cells. The p70 band in section PC3 shows a partial cleavage product observed in this experiment, which has been reported previously as one of the major degradation products of nucleolin [76].

19/Btn. Fig. 3 (lanes M) shows a major [^3H]-glucosamine-labeled 110 kDa protein which is identified as nucleolin by immunoblotting with the anti-nucleolin antibody. Other slower and faster migrating labeled-bands could represent surface nucleolin associated proteins. Indeed, nucleolin exists in a 500-kDa complex containing several proteins whose identity is under investigation (A.G. Hovanessian and B. Krust, unpublished results). Whatever is the case, our results show that surface but not nuclear nucleolin incorporates [^3H]-glucosamine, since no labeling of nuclear nucleolin is observed in the purified preparation by affinity chromatography using HB-19/Btn-avidin-agarose (Fig. 3, lanes N). Taken together, our results indicate that surface nucleolin is a glycosylated protein in various types of cells, and that N-linked glycosylation is an essential requirement for its expression at the cell surface. Previously, it has been reported that cytoplasmic nucleolin is translocated to the surface through a temperature-dependent but unconventional secretory pathway [4]. This latter and the fact that tunicamycin treatment has no apparent effect on the level of cytoplasmic nucleolin (Fig. 2), the reduced levels of surface nucleolin are most likely due to the lack of translocation of the unglycosylated protein to the surface.

HB-19 binding to surface nucleolin triggers Ca^{2+} fluxes in Jurkat cells

In resting T-cells, a steep gradient in Ca^{2+} concentrations exists between the extracellular space and the cytoplasm, and similarly between the cytoplasm and the ER lumen (reviewed in [39]). During activation of the T-cell receptor/CD3 complex, this gradient is strongly disrupted by the so-called Store-Operated Calcium Entry (SOCE) process. For example, following binding of mitogenic anti-CD3 antibodies to the TCR and within seconds, Ca^{2+} is first released from channels of the ER and enters massively through the CRAC channels of the plasma membrane. This phenomenon can be clearly shown in Fig. 4A where a Ca^{2+} flux was induced 30 s after

anti-CD3 binding to cells, thus raising the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from 0.25 μM to about 0.9 μM within 120 s. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ then slowly decreased by 40% within about 2 min. This kinetic is typical to data from the literature. As shown in the fluorescence histograms at various times of the kinetic (Fig. 4B), all cells underwent simultaneous activation by anti-CD3 antibodies. Incubation with ionomycin, a Ca^{2+} ionophore isolated from *Streptomyces globobatus* and used as a positive control, triggered an immediate and massive increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Interestingly, when cells were incubated with 5 μM HB-19, variations of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were also initiated after a lag of 30 s reaching a maximal mean concentration of about 0.35 μM within 90 and 120 s after HB-19 incubation (Fig. 4A). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eventually slowly decreased below the initial resting level at 4 min after addition of HB-19. In the absence of inductor (RPMI control), no clear variation could be seen. In fact, as shown in the fluorescence histograms of the kinetic of induction by HB-19, these $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations only affect 25–30% of cells, but in a quite similar extent to anti-CD3-stimulated cells (Fig. 4C). These results clearly indicate that a subpopulation of HB-19-incubated cells undergoes $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations in a rather similar way to TCR-activated cells, although with slightly faster kinetics.

Since a slow but significant decrease of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ occurred in cells incubated with HB-19 after 300 s (Fig. 4A), we have investigated the effect of a 45 min pre-incubation of cells with HB-19 on their ability to increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ upon anti-CD3 and ionomycin stimulations. As shown in Fig. 4A, at the beginning of the recording, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of HB-19-treated cells was about half than that of non-treated Jurkat cells. However, pre-incubation of cells with HB-19 had no significant effect on the extent of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations triggered by either anti-CD3 antibodies or ionomycin. These results confirm that the increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by HB-19 in Jurkat cells is followed by a gradual decrease of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ but, most importantly, that these effects do not interfere with Ca^{2+} fluxes generated by TCR activation or ionomycin treatment.

HB-19-induced Ca^{2+} fluxes triggered in proliferating Jurkat cells are associated with surface nucleolin expression

Since HB-19 is a specific ligand of nucleolin, the above-presented results strongly suggest that surface nucleolin bound to HB-19 may trigger Ca^{2+} signals in cells. An important observation is that, unlike TCR-activated cells, only a subpopulation of cells exhibit $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations following HB-19 incubation. Interestingly, as shown by flow cytometry in Fig. 5A, the HB-19-sensitive cells are located in the upper-right area of the main cell region of the forward scatter (FSC)/side scatter (SSC) dot plot. This particular region, usually characterized as containing proliferating cells (data not shown), also corresponds to cells expressing increased levels of nucleolin on their surface (Fig. 5B). Lastly, the importance of the proliferating state of cells on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations induced by HB-19 was confirmed through experiments with starved Jurkat allowed to grow in standard culture medium for different periods of time. A clear increase of HB-19-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations was associated with an increased number of HB-19 activated cells (histogram data not shown) as a function of cell proliferation. After 7 h of culture in fresh 10% FCS-supplemented media, the mean $[\text{Ca}^{2+}]_i$ value of HB-19-induced cells reached $0.35 \pm 0.03 \mu\text{M}$ whereas that of HB-19-induced cells kept under starving conditions ($0.13 \pm 0.02 \mu\text{M}$) (time 0) was not significantly different from HB-19-non-induced cells

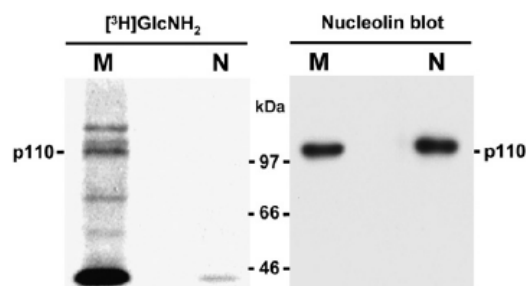


Fig. 3 – Surface but not nuclear nucleolin is metabolically labeled with [^3H]-glucosamine. Jurkat cells were metabolically labeled (3 h, 37 $^{\circ}\text{C}$) with D-[1,6- ^3H]glucosamine before incubation (45 min, 20 $^{\circ}\text{C}$) with 5 μM HB-19/Btn (Materials and methods). Cytoplasmic extracts were then purified using avidin-agarose in order to recover surface nucleolin (lanes M), whereas nuclear extracts were purified by affinity chromatography using HB-19/Btn-avidin-agarose in order to recover nuclear nucleolin (lanes N). Samples of surface and nuclear nucleolin (material purified from extracts of 10×10^6 cells) were analyzed by fluorography (left panel) and immunoblotting using mAb D3 against human nucleolin (right panel).

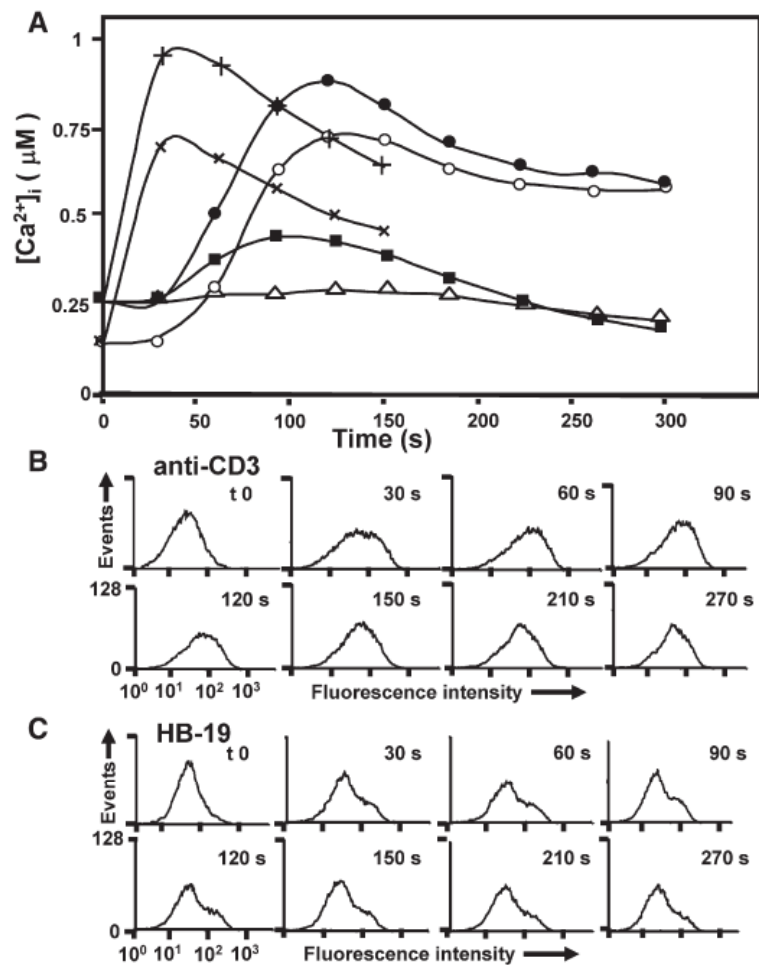


Fig. 4 – Flow cytometry kinetic analysis of $[Ca^{2+}]_i$ variations induced by HB-19 in Jurkat cells. As described in Materials and methods, exponentially-growing Jurkat cells were incubated for 45 min at 37 °C with 5 μM Fluo-4-AM, a specific intracellular Ca^{2+} probe, and then incubated with RPMI containing 1% BSA and: 2 μM ionomycin (+), 0.5 $\mu g/ml$ purified anti-human CD3 mouse antibodies (●) (ImmunoTech), 5 μM HB-19 (■) or no compound (Δ). In some experiments, the cells were simultaneously incubated with 5 μM HB-19 and 5 μM Fluo-4-AM at 37 °C for 45 min prior to incubation with 0.5 $\mu g/ml$ anti-CD3 antibodies (O) or ionomycin (X). Immediately after incubation of the inducers, cell fluorescence (FL1), converted on the graph as $[Ca^{2+}]_i$ in μM , was analyzed by flow cytometry during 300 s (Materials and methods). The graph in (A) shows kinetic data from a representative experiment of a series of 3 separate experiments. FL1 histograms recorded at times 0, 30, 60, 90, 120, 150, 210 and 270 s from the data shown in (A) are represented for anti-CD3 (B) and HB-19 (C) inductions.

(Fig. 5C). On the other hand, the $[Ca^{2+}]_i$ variations triggered by anti-CD3 antibodies in cells were independent of the cell proliferation state (Fig. 5C). Taken together, these results indicate that HB-19 increases $[Ca^{2+}]_i$ in Jurkat cells and that this effect is correlated (or associated) with the state of cell proliferation and expression of surface nucleolin.

In order to demonstrate the specificity of HB-19 induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in Jurkat cells, we tested whether this observed effect is concentration dependent and saturable. We also tested two types of control peptides: HB-19 analogous pseudopeptides, 5[KER]-TASP and 5[RPN]-TASP, which manifest at least 100-fold lower activity compared to HB-19 [14,47]; the tumor-homing F3 peptide that selectively binds to surface nucleolin on endothelial cells [11]. The interaction of the F3 peptide with nucleolin appears to be with

the N-terminal acidic domain of nucleolin in contrast to the HB-19 pseudopeptide that binds the C-terminal GAR domain [11,15]. As shown in Fig. 6, HB-19 induced a dose-dependent effect on $[Ca^{2+}]_i$ variations reaching a saturation at 5 μM . On the other hand, with 5 μM concentration of 5[KER]-TASP and 5[RPN]-TASP or the F3 peptide there was a very weak effect on $[Ca^{2+}]_i$ variations in Jurkat cells. These results confirm the specificity of HB-19 in the induction of intracellular Ca^{2+} fluxes in Jurkat cells.

HB-19-induced variations of $[Ca^{2+}]_i$ in Jurkat cells are related to plasma membrane Ca^{2+} channels

$[Ca^{2+}]_i$ variations in cells mainly result from the SOCE system through the SOC channels. In lymphocytes, a first step of Ca^{2+}

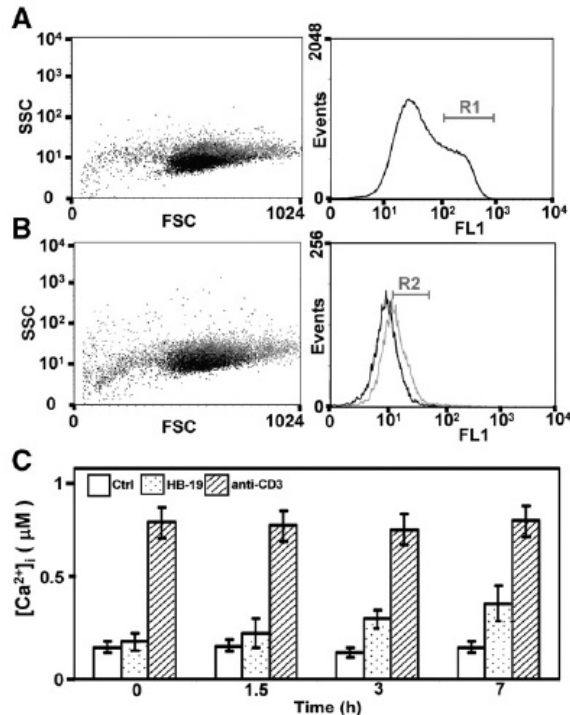


Fig. 5 – Flow cytometry experiments showing that $[Ca^{2+}]_i$ variations induced by HB-19 in Jurkat cells are associated with nucleolin expression in proliferating cells. (A) Representative FSC/SSC dot plot (left) and green fluorescence (FL1) histogram (right) of Jurkat cells incubated with 5 μ M Fluo-4-AM and activated with 5 μ M HB-19 are shown. In this experiment, events were collected during 300 s after addition of HB-19 as described in Materials and methods, and both dot plot and histogram display cell events collected between times 60 and 120 s of the kinetic. The FL1 histogram (right) shows a region (R1) set to fit the cells undergoing $[Ca^{2+}]_i$ changes. Cells corresponding to R1 are dotted in grey in the left dot plot. (B) FSC/SSC dot plot (left) and green fluorescence (FL1) histogram (right) of a fraction of the Jurkat cells used in the experiment displayed in (A) but immunostained with either anti-nucleolin rabbit polyclonal antibodies (grey peak in the histogram) or non-immune rabbit antibodies (black peak in the histogram). In the histogram, a region (R2) is set to fit cells expressing the highest levels of surface nucleolin. These cells are dotted in grey on the left dot plot. (C) The histogram shows the $[Ca^{2+}]_i$ variations of Jurkat cells starved overnight in RPMI containing 1% FCS and allowed to proliferate in fresh 10% FCS-containing RPMI during the times indicated on the histogram. After Fluo-4-AM loading, the cells were incubated with RPMI containing HB-19 or anti-CD3 antibodies and analyzed by flow cytometry. The maximal $[Ca^{2+}]_i$ recorded at 90 and 120 s after HB-19 and anti-CD3 antibodies inductions, respectively, are represented. The basal $[Ca^{2+}]_i$ of cells incubated with RPMI without inductor was measured at 90 s (Ctrl). Data presented are means \pm standard errors of 3 independent experiments (statistical analysis was Student's *t* test, $P < 0.01$).

release into the cytosol is from the ER, immediately followed by an entry of extracellular Ca^{2+} through the CRAC channels (reviewed in [39]). In addition to SOC channels, other Ca^{2+} release and influx pathways have been described including L-type voltage-gated Ca^{2+} channels and ATP binding, Ca^{2+} -permeable P2X receptors. Here we provide experimental evidence to show that HB-19-surface nucleolin induced $[Ca^{2+}]_i$ variations depend on the availability of Ca^{2+} in the extracellular compartment, and is inhibited by some Ca^{2+} channel blockers.

In order to evaluate the participation of the cytoplasmic membrane Ca^{2+} channels in the $[Ca^{2+}]_i$ variations observed in HB-19-stimulated lymphocytes, we have investigated the effect of Ca^{2+} chelation by EGTA in the extracellular medium. As shown in Fig. 7, the presence of 2 mM EGTA almost totally abrogated the HB-19-induced Ca^{2+} fluxes in Jurkat cells whereas it strongly decreased, by about 60%, the $[Ca^{2+}]_i$ variation induced by the anti-CD3 antibodies. This result clearly indicates that the $[Ca^{2+}]_i$ variations triggered by HB-19 depend on exogenous Ca^{2+} availability and points out the plasma membrane Ca^{2+} channels as directly involved in the phenomenon.

The evidence that plasma membrane Ca^{2+} channels are the principal actors of the HB-19-induced Ca^{2+} fluxes in Jurkat cells addresses the question of their nature. Basically, membrane Ca^{2+} channels on cells may belong to the SOC family, the Receptor-Operated Channels (ROC) or the Voltage-Operated Channels (VOC) family. Therefore, we studied the effects of two SOC channel antagonists, 2-aminoethoxy diphenyl borate (2APB) and SKF-96365,

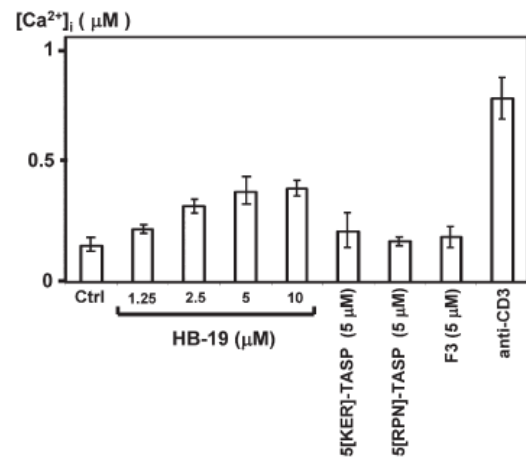


Fig. 6 – Effects of HB-19 concentration and control peptide analogs on the $[Ca^{2+}]_i$ variations induced in Jurkat cells. The histogram shows the $[Ca^{2+}]_i$ of proliferating Fluo-4-AM-loaded Jurkat cells incubated, as specified in Materials and methods, with increasing concentrations of HB-19 (1.25, 2.5, 5 and 10 μ M) or 5 μ M of pseudopeptides KER and RPN (for 5[KER]-TASP and 5[RPN]-TASP, respectively), or the F3 peptide. The maximal $[Ca^{2+}]_i$ recorded at 90 s after the addition of inducers are represented. The basal $[Ca^{2+}]_i$ of cells incubated with RPMI without inductor (Ctrl) and the maximal $[Ca^{2+}]_i$ of cells induced with anti-CD3 antibodies (a-CD3) were recorded at times 90 and 120 s of the kinetics, respectively. They are represented on the histogram. Data presented are means \pm standard errors of 3–4 independent experiments (statistical analysis was Student's *t* test, $P < 0.01$).

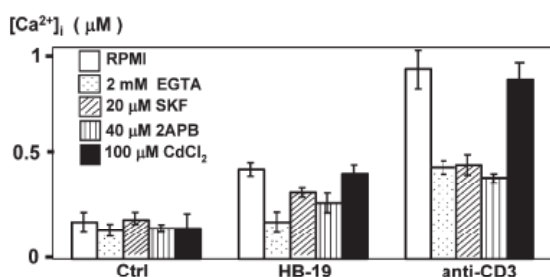


Fig. 7 – Effect of extracellular Ca^{2+} chelation by EGTA and Ca^{2+} -channel blockers on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations induced by HB-19 in Jurkat cells. Exponentially-growing Jurkat cells were incubated for 45 min at 37°C with $5\ \mu\text{M}$ Fluo-4-AM and then incubated with RPMI or HBSS, as described in Materials and methods, containing 1% BSA and: $5\ \mu\text{M}$ HB-19, $0.5\ \mu\text{g/ml}$ purified anti-human CD3 mouse antibodies or no inductor (Ctrl). The histogram shows the maximal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of induced cells incubated with RPMI without blocker (RPMI control) or RPMI with $2\ \text{mM}$ EGTA, a Ca^{2+} chelator, $20\ \mu\text{M}$ SKF-96365 and $40\ \mu\text{M}$ 2-aminoethoxy diphenyl borate (2APB), two CRAC channel blockers, and $100\ \mu\text{M}$ CdCl_2 , a voltage-dependent channel blocker. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were recorded after 90 and 120 s of HB-19 and anti-CD3 antibodies inductions, respectively. The basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of cells incubated with RPMI without inductor was measured at 90 s (Ctrl). Data presented are means \pm standard errors of 3 independent experiments (statistical analysis was Student's *t* test, $P < 0.01$).

and CdCl_2 at a concentration ($100\ \mu\text{M}$) that inhibits the VOC channels. Interestingly, CdCl_2 exerted no significant effect on HB-19-induced cells or on anti-CD3-induced cells that were used as a positive control (Fig. 7). On the other hand, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations stimulated by both inducers were significantly decreased in cells incubated with either $20\ \mu\text{M}$ SKF-96365 or $40\ \mu\text{M}$ 2APB (Fig. 7). These results indicate that HB-19 triggered Ca^{2+} entry into Jurkat cells is mainly mediated if not totally by SOC channels in the plasma membrane. HB-19-induced Ca^{2+} entry into cells could thus use activation pathways of the SOCE system triggered directly or indirectly *via* surface nucleolin.

Fura-2 Ca^{2+} imaging and patch-clamp recording of Ca^{2+} currents in prostate cancer cells

Since nucleolin is ubiquitously expressed in mammalian cells, we carried out Ca^{2+} measurements of cytosolic free Ca^{2+} concentrations using Fura-2-AM as a Ca^{2+} -sensitive dye in two different cell lines of prostate cancer cells, PC3 and DU145. In both cell lines, basal Ca^{2+} levels were stable at low values in the absence of HB-19 ($139 \pm 3\ \text{nM}$, $n = 155$ PC3 cells; $44 \pm 1\ \text{nM}$, $n = 65$ DU145 cells). As illustrated in Fig. 8, when HB-19 was applied for a few seconds onto PC3 cells, it reversibly induced a rapid cytosolic Ca^{2+} increase in cells. 67% of the tested cells responded simultaneously to HB-19 although with different extents. On the average, cytosolic Ca^{2+} reached a peak value of $265 \pm 16\ \text{nM}$ ($n = 105$ out of 155) after a delay of $15 \pm 1\ \text{s}$, and after the transient peak a plateau or Ca^{2+} wave could be consistently observed (Fig. 8A). Similarly, HB-19 was able to raise cytosolic Ca^{2+} concentration in 18% of DU145 cells ($n = 12$ out of 65; Fig. 8B).

However, in DU145 cells, the Ca^{2+} response pattern was generally more complex than in PC3 cells, involving nonsimultaneous and multiple Ca^{2+} peaks. On the average, cytosolic Ca^{2+} reached a maximal value of $147 \pm 17\ \text{nM}$ ($n = 12$) in DU145 cells.

Patch-clamp experiments were performed in the whole-cell configuration to measure Ca^{2+} currents in PC3 cells. A typical experiment is presented in Fig. 9. In the absence of HB-19, whole-cell membrane current was stable but when HB-19 was perfused into the bath, an inward current (as measured at $-100\ \text{mV}$) developed within few seconds in 30% of the tested cells ($n = 7$ out of 21), which was subsequently blocked by 2APB ($50\ \mu\text{M}$). These results indicate that the HB-19-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations are not

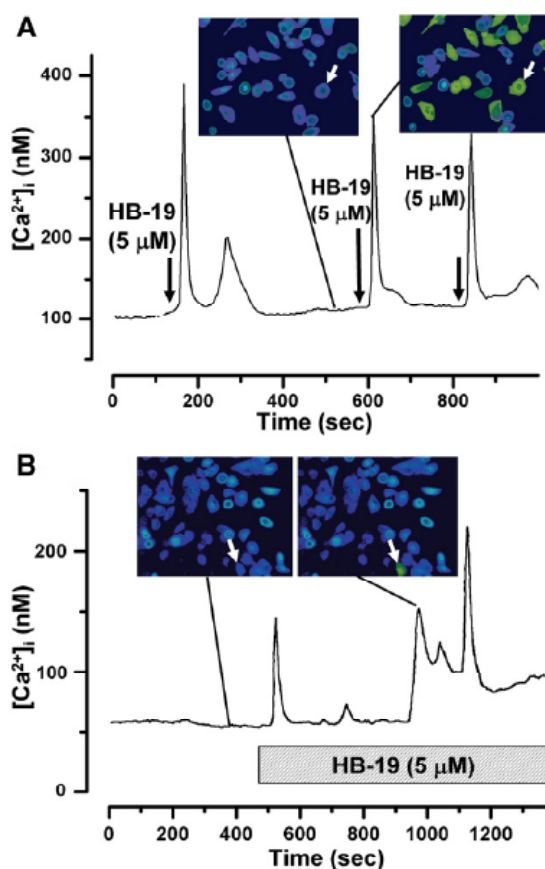


Fig. 8 – Fluorescence Ca^{2+} imaging on prostate cancer cells. Typical fluorescence Ca^{2+} measurements using Fura-2-AM in (A) PC3 and (B) DU145 cells. Cells were cultured, loaded with $2\ \mu\text{M}$ Fura-2-AM and analyzed as described in Materials and methods. The graph in (A) shows the variations of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in a single PC3 cell from cells onto which HB-19 ($5\ \mu\text{M}$) was puffed for 15 s (at times indicated by black arrows). The graph in (B) shows the variations of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in a single DU145 cell from cells onto which HB-19 ($5\ \mu\text{M}$) was puffed continuously (for the time indicated by the hatched box). The pictures shown in (A) and (B) are partial snapshots taken by the video camera at times indicated by bars. The white arrows indicate the single cells from which the variations of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were quantitated into graphs. The yellow color indicates increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

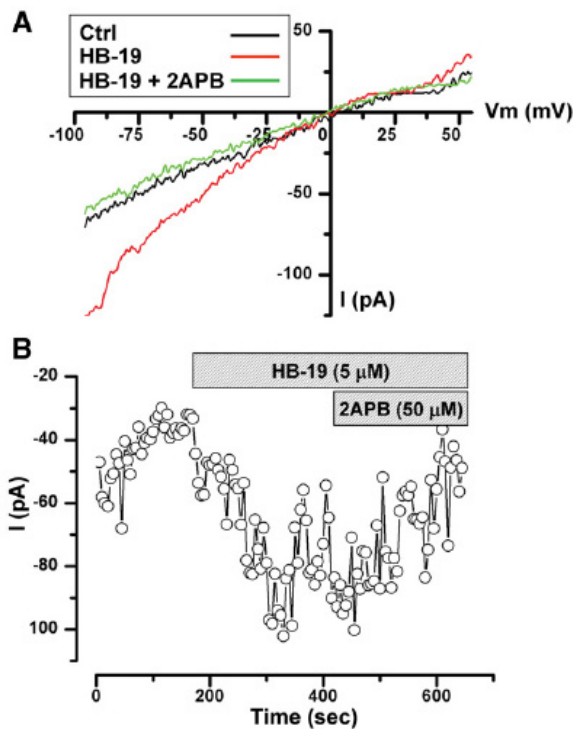


Fig. 9 – Patch-clamp on prostate cancer PC3 cells. Patch-clamp experiments were carried out in PC3 cells as described in Materials and methods. The figure shows results obtained from a representative PC3 cell. (A) Current/voltage relationship showing the development of an inward current at negative potential after the application of HB-19 (5 μM) and its inhibition by 2APB (50 μM), as compared to the control before HB-19 application (Ctrl). (B) Time-course of the membrane current at -100 mV after breaking into whole-cell configuration (Time 0) showing the development of the membrane current after the onset (3 min after breaking into whole-cell configuration) of HB-19 perfusion (5 μM). The figure shows the inhibitory effect of 2APB (50 μM) on the membrane current induced by HB-19. The hatched boxes indicate the times of application of HB-19 and 2APB.

restricted to T-cells but also applies to non-immune cells, although with apparently different kinetics. Furthermore, it could be noted that only a limited number of prostate cancer cells undergo HB-19-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations. At the light of the flow cytometry experiments with Jurkat cells (Fig. 5), it may be assumed that the proliferation state of prostate cancer cells and, hence the expression level of surface nucleolin, affect their ability to respond to HB-19. Finally, blocking of these $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations in the patch-clamp experiments in PC3 cells further supports the hypothesis that SOC channels are involved in the phenomenon.

Discussion

Nucleolin is a multifunctional protein whose functions in both cytosol and nucleus have been thoroughly investigated [1,2,5]. These

include essential metabolic processes, such as the organization of nucleolar chromatin [48], packaging of pre-RNA, rDNA transcription, transport and assembly of ribosomes, cytokinesis, apoptosis, immunoglobulin isotype switch recombination process [49], and regulatory activity of transcription factors such as Myb, the glucocorticoid receptor and KLF2 [50–55]. The presence of nucleolin at the surface of cells and the specific interaction of various ligands with it has raised many questions on the specificity of its structure [1,4,34], and more importantly, on its specific role(s) and function(s) in various types of cells. Consistent with our previous observation [6], here we demonstrate that surface nucleolin is N-linked glycosylated, which is an essential requirement for the expression of nucleolin on the cell surface. Moreover, we show for the first time that ligand binding to surface nucleolin triggers Ca^{2+} entry. We chose to work with the nucleolin antagonist HB-19 pseudopeptide [15], since all natural ligands of surface nucleolin may interact with one or more cell surface receptors in addition to nucleolin, which makes the interpretation of results difficult. Our results demonstrate that HB-19 but not control peptides could induce transitory high Ca^{2+} membrane fluxes in proliferating Jurkat T-cells that express surface nucleolin. These effects were also demonstrated in prostate cancer cells through microscopy and patch-clamp experiments, thus suggesting that activation of Ca^{2+} fluxes by HB-19 could concern different types of cells expressing surface nucleolin. In view of these results, its implication in tumor growth and angiogenesis, its capacity to bind viruses, bacteria, and diverse range of physiological ligands including low density lipoproteins [13,20,23,34,40,56–58], it is plausible to suggest that surface nucleolin could function as a scavenger receptor [59]. Consequently, the binding of ligands to surface nucleolin might generate, directly or indirectly, a wide spectrum of physiological events that regulate different metabolic processes.

The mechanisms by which ligand binding to surface nucleolin may have a biological impact on the physiology of cells are still to be clarified. In some cases, ligand binding is followed by the internalization of the ligand/nucleolin complex into cells and nuclear localization of the ligand [4,19,21,22,60]. Consequently, it was hypothesized that a shuttling mechanism of the ligand/nucleolin complex from the cell surface to the cytosol and/or to the nucleus might regulate nuclear events [1]. Although it is quite conceivable that the nuclear import of certain ligands, such as lactoferrin [19] or midkine [21], may influence nuclear functions, the putative roles of many other nucleolin ligands such as ApoE or ApoB lipoproteins [23] remain obscure. Furthermore, some ligands either belong to the extracellular matrix or are integral membrane molecules of cells that cannot be endocytosed. Indeed, Ca^{2+} ions function as a universal second messenger in virtually all eukaryotic cells and participate in the regulation of cell differentiation, gene transcription and effector functions. The capacity of HB-19 to trigger $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations in T-cells, in a similar extent to that induced by TCR stimulation with anti-CD3 antibodies, is consistent with the activation of signaling pathways in response to ligand binding to surface nucleolin without making use of its shuttling and internalizing properties. Until now, the ability of nucleolin to interact with extracellular ligands, to internalize and, in some cases, to direct them to the nucleus has been thoroughly demonstrated. Independent of its shuttling and internalizing properties, our results indicate that surface nucleolin may also be involved in the activation of signaling pathways by promoting Ca^{2+} entry into the cells.

Direct signaling properties of surface nucleolin were formerly hypothesized by Larrucea et al. [29,38]. They reported that whereas free factor J is internalized and localized in the cytoplasm and nucleus of cells, plastic-immobilized factor J induces tyrosine phosphorylation of several intracellular proteins in Jurkat cells, with a similar pattern to that induced by fibronectin. Another ligand of surface nucleolin, laminin-1 induces intestinal cell differentiation through the activation of the p38 MAP kinase pathway although the involvement of the β -1 integrin was also suggested [32,61]. We have demonstrated that surface nucleolin represents, in addition to the sulfated chains of proteoglycans, the major, if not exclusive, lactoferrin-binding site on mammalian cells [19]. Similarly to factor J, lactoferrin is internalized in human breast cancer cells and partially targeted to the nucleus [19], whereas in Jurkat cells it stimulates the MAP kinase [62]. Since MAP kinase can be activated by Ca^{2+} -dependent pathway [63], it can be postulated that the activation of MAP kinase by lactoferrin in Jurkat cells is the consequence of its binding to surface nucleolin. In support to this assertion, lactoferrin and HB-19 compete for common binding sites on nucleolin, i.e. the C-terminal GAR domain of the protein [15,19,64]. Interestingly, the GAR domain of surface nucleolin is also the binding region of midkine, pleiotrophin, lactoferrin, and urokinase [17–19,22]. Consequently, it is plausible to suggest that the binding of “natural ligands” to surface nucleolin might generate signals into cells in a similar way to HB-19. In strong support to this, P-selectin binding to human colon carcinoma cells was shown recently to induce tyrosine phosphorylation of surface nucleolin and formation of a signaling complex containing nucleolin, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) and p38 MAPK [30]. It is worthwhile here to mention that cytosolic nucleolin has also been associated in signaling pathways leading to cell activation. Nucleolin was indeed reported as a target of kinases such as CK2 [65,66] and PKC-zeta [67] in response to activation of cells by the fibroblast growth factor-2 and nerve growth factor, respectively. Furthermore, nucleolin was found to be associated with the cytoplasmic tails of the CD3 epsilon [68] and CD28 [69] molecules in T lymphocytes, and thus could play an important role in T-cell activation. Alternatively, nucleolin could stabilize interleukin-2 mRNA during T-cell activation [70].

The mechanisms by which HB-19 binding to surface nucleolin induces Ca^{2+} signaling are far from being understood. Although nucleolin was reported to bind Ca^{2+} [71,72], and was shown to be involved in epidermal Ca^{2+} homeostasis [73] and renal tubule cell attachment [74], it is unlikely that Ca^{2+} binding to surface nucleolin participates in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations induced by HB-19. Our results suggest that the HB-19-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ variations are directly connected with channels of either the SOC or ROC families. In T-cells, SOCE through CRAC channels is the main mechanism to increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$. In the absence of sustained Ca^{2+} influx through CRAC channels, lymphocyte functions are severely compromised. CRAC channel opening is triggered by ligand binding to the TCR but also to other surface molecules such as G-protein-coupled chemokine receptors and co-stimulatory receptors (reviewed in [39]). Since surface nucleolin is neither an integral membrane protein nor a GPI-anchored molecule [4], a direct coupling to the activating pathways of PLC leading to production of InsP_3 and DAG and activation of the SOCE system is unlikely. We thus postulate that HB-19 binding to surface nucleolin may promote further interactions of nucleolin with one or more receptors on cells, which in turn could activate the SOCE system. A possibility would

be that HB-19 either changes the conformation of surface nucleolin or modifies both distribution and accessibility of nucleolin on cells, thus allowing further interaction with membrane signaling molecules. Our results showing that anti-CD3 antibodies still induce Ca^{2+} fluxes in Jurkat cells pre-incubated with HB-19 are not in favor of a participation of the TCR in the phenomenon. This assertion is supported by the observation that PC3 cells, which do not express TCR nor CRAC channels, are also sensitive to HB-19. Finally, it is of interest to note that nucleolin at the cell surface exists in a 500-kDa complex containing several proteins whose identity is under investigation (A.G.H. and B.K., unpublished results). Consequently, the binding of HB-19 to surface nucleolin could also affect the organization of nucleolin-associated proteins in this 500-kDa complex and thus trigger various types of signaling events.

Future challenges will seek to elucidate the mechanisms by which ligand binding to surface nucleolin leads to cell activation and to identify the signaling nucleolin partners. In addition, the putative role of glycosylation in the role of surface nucleolin in the activation process needs to be investigated. As deduced from NMR data [75], the N-glycosylated sites of surface nucleolin are located in the vicinity of the RNA-binding domains (RBD) 1 and 2 of the protein and the O-glycosylated sites are located in the N-terminal domain [6]. It may thus be speculated that whereas glycosylation does not impede ligand binding to the GAR domain, it may influence the interactions of surface nucleolin with its signaling receptor partners.

In conclusion, our results demonstrate that surface nucleolin could trigger Ca^{2+} entry into mammalian cells, supposedly by acting on SOC channels and plasma membrane receptor partners. This finding highlights an important role of surface nucleolin and its ligands in the regulation of cell functions.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Université des Sciences et Technologies de Lille (Institut Fédératif de Recherche 147, Director: Dr. J. Mazurier), the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR n°8576, Director: Dr. J.-C. Michalski; UPR n°2228, Director: Ph. Djian), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U800, Director: Pr. N. Prevarskaya), and ‘Agence Nationale de la Recherche: Emergence et Maturation de projets de Biotechnologie à fort Potentiel de valorisation’ (ANR:EMBP) to A.G. Hovanessian/J.P. Briand. Diala El Khoury was supported in part by CNRS, Lebanon.

REFERENCES

- [1] M. Srivastava, H.B. Pollard, Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights, *FASEB J.* 13 (1999) 1911–1922.
- [2] F. Mongelard, P. Bouvet, Nucleolin: a multiFaceTed protein, *Trends Cell Biol.* 17 (2007) 80–86.
- [3] Y. Otake, S. Soundararajan, T.K. Sengupta, E.A. Kio, J.C. Smith, M. Pineda-Roman, R.K. Stuart, E.K. Spicer, D.J. Fernandes, Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA, *Blood* 109 (2007) 3069–3075.
- [4] A.G. Hovanessian, F. Puvion-Dutilleul, S. Nisole, J. Svab, E. Perret, J.S. Deng, B. Krust, The cell-surface-expressed nucleolin is

- associated with the actin cytoskeleton, *Exp. Cell Res.* 261 (2000) 312–328.
- [5] H. Ginisty, H. Sicard, B. Roger, P. Bouvet, Structure and functions of nucleolin, *J. Cell Science* 112 (1999) 761–772.
- [6] M. Carpentier, W. Morelle, B. Coddeville, A. Pons, M. Masson, J. Mazurier, D. Legrand, Nucleolin undergoes partial N- and O-glycosylations in the extranuclear cell compartment, *Biochemistry* 44 (2005) 5804–5814.
- [7] D. Destouches, D. El Khoury, Y. Hamma-Kourbali, B. Krust, P. Albanese, P. Katsoris, G. Guichard, J.P. Briand, J. Courty, A.G. Hovanessian, Suppression of tumor growth and angiogenesis by a specific antagonist of the cell-surface expressed nucleolin, *PLoS ONE* 3 (6) (2008) e2518.
- [8] P. Jordan, H. Heid, V. Kinzel, D. Kubler, Major cell surface-located protein substrates of an ecto-protein kinase are homologs of known nuclear proteins, *Biochemistry* 33 (1994) 14696–14706.
- [9] C.J. Westmark, J.S. Malter, Up-regulation of nucleolin mRNA and protein in peripheral blood mononuclear cells by extracellular-regulated kinase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 1119–1126.
- [10] C. Callebaut, S. Nisole, J.P. Briand, B. Krust, A.G. Hovanessian, Inhibition of HIV infection by the cytokine midkine, *Virology* 281 (2001) 248–264.
- [11] S. Christian, J. Pilch, M.E. Akerman, K. Porkka, P. Laakkonen, E. Ruoslahti, Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels, *J. Cell Biol.* 163 (2003) 871–878.
- [12] S. Nisole, B. Krust, C. Callebaut, G. Guichard, S. Muller, J.P. Briand, A.G. Hovanessian, The anti-HIV pseudopeptide HB-19 forms a complex with the cell-surface expressed nucleolin independent of heparan sulfate proteoglycans, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 27875–27884.
- [13] C. Callebaut, J. Blanco, N. Benkirane, B. Krust, E. Jacotot, G. Guichard, N. Seddiki, J. Svab, E. Dam, S. Muller, J.P. Briand, A.G. Hovanessian, Identification of V3 loop-binding proteins as potential receptors implicated in the binding of HIV particles to CD4⁺ cells, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 21988–21997.
- [14] S. Nisole, B. Krust, E. Dam, A. Blanco, N. Seddiki, S. Loaec, C. Callebaut, G. Guichard, S. Muller, J.P. Briand, A.G. Hovanessian, The HB-19 pseudopeptide 5[Kψ(CH₂N)PR]-TASP inhibits attachment of T-lymphocyte- and macrophage-tropic HIV to permissive cells, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16 (2000) 237–249.
- [15] S. Nisole, E.A. Said, C. Mische, M.C. Prevost, B. Krust, P. Bouvet, A. Bianco, J.P. Briand, A.G. Hovanessian, The anti-HIV pentameric pseudopeptide HB-19 binds the C-terminal end of nucleolin and prevents anchorage of virus particles in the plasma membrane of target cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 20877–20886.
- [16] Y. Huang, H. Shi, Z.H.X. Song, S. Yuan, Y. Luo, The angiogenesis function of nucleolin is mediated by vascular endothelial growth factor and nonmuscle myosin, *Blood* 107 (2006) 3564–3571.
- [17] A.E. Said, B. Krust, S. Nisole, J.P. Briand, A.G. Hovanessian, The anti-HIV cytokine midkine binds the cell-surface-expressed nucleolin as a low affinity receptor, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 37492–37502.
- [18] E.A. Said, J. Courty, J. Svab, J. Delbé, B. Krust, A.G. Hovanessian, Pleiotrophin inhibits HIV infection by binding the cell surface expressed nucleolin, *FEBS J.* 272 (2005) 4646–4659.
- [19] D. Legrand, K. Vigie, E.A. Said, E. Ellass, M. Masson, M.C. Slomianny, M. Carpentier, J.P. Briand, J. Mazurier, A.G. Hovanessian, Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 303–317.
- [20] A.G. Hovanessian, Midkine is a cytokine that inhibits HIV infection by binding to the cell surface expressed nucleolin, *Cell Res.* 16 (2006) 174–181.
- [21] Y. Shibata, T. Muramatsu, M. Hirai, M. Inui, T. Kimura, H. Saito, L.M. McCormack, G. Bu, K. Kadomatsu, Nuclear targeting by the growth factor midkine, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 6788–6796.
- [22] V. Stepanova, T. Lebedeva, A. Kuo, S. Yarovoi, S. Tkachuk, S. Zaitsev, K. Bdeir, I. Dumler, M.S. Marks, Y. Parfyonova, V.A. Tkachuk, A.A. Higazi, D.B. Cines, Nuclear translocation of urokinase-type plasminogen activator, *Blood* (in press).
- [23] C.F. Semenkovich, R.E.J. Ostlund, M.O. Olson, J.W. Yang, A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoproteins specifically is nucleolin, *Biochemistry* 29 (1990) 9708–9713.
- [24] B. Krust, R. Vienet, A. Cardona, C. Rougeot, E. Jacotot, C. Callebaut, G. Guichard, J.P. Briand, J.M. Grognet, A.G. Hovanessian, L. Edelman, The anti-HIV pentameric pseudopeptide HB-19 is preferentially taken up in vivo by lymphoid organs where it forms a complex with nucleolin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 14090–14095.
- [25] K. Kadomatsu, T. Muramatsu, Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer, *Cancer Lett.* 204 (2004) 127–143.
- [26] I. Dumler, V. Stepanova, U. Jerke, O.A. Mayboroda, F. Vogel, P. Bouvet, V. Thachuk, H. Haller, D.C. Gulba, Urokinase-induced mitogenesis is mediated by casein kinase 2 and nucleolin, *Current Biology* 9 (1999) 1468–1476.
- [27] G. Harms, R. Kraft, G. Grelle, B. Volz, J. Dernedde, R. Tauber, Identification of nucleolin as a new L-selectin ligand, *Biochem. J.* 360 (2001) 531–538.
- [28] H.K. Kleinman, B.S. Weeks, F.B. Cannon, T.M. Sweeney, G.C. Sephel, B. Clement, M. Zain, M.O.J. Olson, M. Jucker, B.A. Burrous, Identification of a 110-kDa nonintegrin cell surface laminin-binding protein which recognizes an A chain neurite-promoting peptide, *Arch. Biochem. Biophys.* 290 (1991) 320–325.
- [29] S. Larrucea, C. Gonzalez-Rubio, R. Cambrono, B. Ballou, P. Bonay, E. Lopez-Granados, P. Bouver, M. Fontan, M. Fresno, M. Lopez-Trascasa, Cellular adhesion mediated by factor J, a complement inhibitor. Evidence for nucleolin involvement, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 31718–31725.
- [30] E.M. Reyes-Reyes, S.K. Akiyama, Cell-surface nucleolin is a signal transducing P-selectin binding protein for human colon carcinoma cells, *Exp. Cell Res.* 314 (2008) 2212–2223.
- [31] A. Tate, S. Isotani, M.J. Bradley, R.A. Sikes, R. Davis, L.W. Chung, M. Edlund, Met-independent hepatocyte growth factor-mediated regulation of cell adhesion in human prostate cancer cells, *BMC Cancer* (2006) 197–212.
- [32] N. Turck, O. Lefebvre, I. Gross, P. Gendry, M. Kedinger, P. Simon-Assmann, J.F. Launay, Effect of laminin-1 on intestinal cell differentiation involves inhibition of nuclear nucleolin, *J. Cell Physiol.* 206 (2006) 545–555.
- [33] H. Shi, Y. Huang, H. Zhou, X. Song, S. Yuan, Y. Fu, Y. Luo, Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin, *Blood* 110 (2007) 2899–2906.
- [34] S. Storck, M. Shukla, S. Dimitrov, P. Bouvet, Functions of the histone chaperone nucleolin in diseases, *Subcell. Biochem.* 41 (2007).
- [35] J. Folkman, Endostatin finds a new partner: nucleolin, *Blood* 110 (2007) 2786–2787.
- [36] D.E. Alete, M.E. Weeks, A.G. Hovanessian, M. Hawadle, A.W. Stoker, Cell surface nucleolin on developing muscle is a potential ligand for the axonal receptor protein tyrosine phosphatase-sigma, *FEBS J.* 273 (2006) 4668–4681.
- [37] A. Di Segni, K. Farin, R. Pinkas-Kramarski, Identification of nucleolin as new ErbB receptors-interacting protein, *PLoS ONE* 3 (6) (2008) e2310.
- [38] S. Larrucea, R. Cambrono, C. Gonzalez-Rubio, B. Fraile, C. Gamallo, G. Fontan, M. Lopez-Trascasa, Internalization of factor J and cellular signalization after factor J-cell interaction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266 (1999) 51–57.
- [39] S. Feske, Calcium signalling in lymphocyte activation and disease, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 690–702.
- [40] S. Nisole, B. Krust, A.G. Hovanessian, Anchorage of HIV on permissive cells leads to co-aggregation of viral particles with surface nucleolin at membrane raft microdomains, *Exp. Cell Res.* 276 (2002) 155–173.
- [41] M. Partiseti, F. Le Deist, C. Hivroz, A. Fischer, H. Korn, D. Choquet, The calcium current activated by T cell receptor and store

- depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 32327–32335.
- [42] G. Gryniewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien, A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3440–3450.
- [43] O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F.J. Sigworth, Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Arch.* 391 (1981) 85–100.
- [44] F. Gackiere, G. Bidaux, P. Lory, N. Prevarskaya, P. Mariot, A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium* 39 (2006) 357–366.
- [45] C.M. Chen, S.Y. Chiang, N.H. Yeh, Increased stability of nucleolin in proliferating cells by inhibition of its self-cleaving activity, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 7754–7758.
- [46] C.G. Glabe, J.A. Hanover, W.J. Lennarz, Glycosylation of ovalbumin nascent chains. The spatial relationship between translation and glycosylation, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 9236–9242.
- [47] C. Callebaut, E. Jacotot, G. Guichard, B. Krust, M.A. Rey-Cuille, D. Cointe, N. Benkirane, J. Blanco, S. Muller, J.P. Briand, A.G. Hovanessian, Inhibition of HIV infection by pseudopeptides blocking viral envelope glycoprotein-mediated membrane fusion and cell death, *Virology* 218 (1996) 181–192.
- [48] D. Angelov, V.A. Bondarenko, S. Almagro, H. Menoni, F. Mongelard, F. Hans, F. Mietton, V.M. Studitsky, A. Hamiche, S. Dimitrov, P. Bouvet, Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes, *EMBO J.* 25 (2006) 1669–1679.
- [49] L.A. Hanakahi, L.A. Dempsey, M.-J. Li, N. Maizels, Nucleolin is one component of the B-cell specific transcription factor family that regulates their activity, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 4152–4158.
- [50] G.G. Ying, P. Proost, J. van Damme, M. Bruschi, M. Introna, J. Golay, Nucleolin, a novel partner for the Myb transcription factor family that regulates their activity, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 4152–4158.
- [51] M. Schulz, S. Schneider, F. Lottspeich, R. Renkawitz, M. Eggert, Identification of nucleolin as a glucocorticoid receptor interacting protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (2001) 476–480.
- [52] J.P. Huddleson, N. Ahmad, J.B. Lingrel, Up-regulation of the KLF2 transcription factor by fluid shear stress requires nucleolin, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 15121–15128.
- [53] J.H. Tsou, K.Y. Chang, W.C. Wang, J.T. Tseng, W.C. Su, L.Y. Hung, W.C. Chang, B.K. Chen, Nucleolin regulates c-Jun/Sp1-dependent transcriptional activation of cPLA2(α) in phorbol ester-treated non-small cell lung cancer A549 cells, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 217–227.
- [54] A. Dambara, T. Morinaga, N. Fukuda, Y. Yamakawa, T. Kato, A. Enomoto, N. Asai, Y. Murakumo, S. Matsuo, M. Takahashi, Nucleolin modulates the subcellular localization of GDNF-inducible zinc finger protein 1 and its roles in transcription and cell proliferation, *Exp. Cell Res.* 313 (2007) 3755–3766.
- [55] S. Samuel, J.C. Twizere, K.K. Beifuss, L.R. Bernstein, Nucleolin binds specifically to an AP-1 DNA sequence and represses AP1-dependent transactivation of the matrix metalloproteinase-13 gene, *Mol. Carcinog.* 47 (2008) 34–46.
- [56] U.R. De Verdugo, H.C. Selinkgra, M. Huber, B. Kramer, J. Kellermann, P.H. Hofschneider, R. Kandolf, Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotypes of Coxsackie B viruses, *J. Virol.* 69 (1995) 6751–6757.
- [57] J.F. Sinclair, A.D. O'Brien, Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-γ of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 2876–2885.
- [58] J.F. Sinclair, A.D. O'Brien, Intimin types α, β, and γ bind to nucleolin with equivalent affinity but lower avidity than to the translocated intimin receptor, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 33751–33758.
- [59] A. Pluddemann, C. Neyen, S. Gordon, Macrophage scavenger receptor and host-derived ligands, *Methods* 43 (2007) 207–217.
- [60] J.-S. Deng, B. Baillou, J.K. Hofmeister, Internalization of anti-nucleolin antibody into viable HEp-2 cells, *Mol. Biol. Rep.* 23 (1996) 191–195.
- [61] D. Yu, M.Z. Schwartz, R. Petryshyn, Effect of laminin on the nuclear localization of nucleolin in rat intestinal epithelial IEC-6 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247 (1998) 186–192.
- [62] I. Dhennin-Duthille, M. Masson, E. Damiens, C. Fillebeen, G. Spik, J. Mazurier, Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line, *J. Cell. Biochem.* 79 (2000) 583–593.
- [63] T.S. Chao, K.L. Byron, K.M. Lee, M. Villereal, M.R. Rosner, Activation of MAP kinases by calcium-dependent and calcium-independent pathways. Stimulation by thapsigargin and epidermal growth factor, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 19876–19883.
- [64] G.J. Pellar, P.J. DiMario, Deletion and site-specific mutagenesis of nucleolin's carboxy GAR domain, *Chromosoma* 111 (2003) 461–469.
- [65] D. Li, G. Dobrowolska, E.G. Krebs, The physical association of casein kinase 2 with nucleolin, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 15662–15668.
- [66] H. Bonnet, O. Filhol, I. Truchet, P. Brethenou, C. Cochet, F. Amalric, G. Bouche, Fibroblast growth factor-2 binds to the regulatory beta subunit of CK2 and directly stimulates CK2 activity toward nucleolin, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 24781–24787.
- [67] G. Zhou, M.L. Seibenhener, M.W. Wooten, Nucleolin is a protein kinase C-ζ substrate. Connection between cell surface signaling and nucleus in PC12 cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 31130–31137.
- [68] D. Gil, D. Gutierrez, B. Alarcon, Intracellular redistribution of nucleolin upon interaction with the CD3ε chain of the T cell receptor complex, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 11174–11179.
- [69] A. Matsumoto, H. Dobashi, H. Ohnishi, T. Tanaka, Y. Kubota, A. Kitanaka, H. Ishida, M. Tokuda, M. Waki, A. Kubo, T. Ishida, Tyrosine phosphorylation of a novel 100-kDa protein coupled to CD28 in resting human T cells is enhanced by a signal through TCR/CD3 complex, *Microbiol. Immunol.* 47 (2003) 63–69.
- [70] C.Y. Chen, R. Gherzi, J.S. Andersen, G. Gaietta, K. Jurchott, H.D. Royer, M. Mann, M. Karin, Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation, *Genes Dev.* 14 (2000) 1236–1248.
- [71] E.A. Sorokina, J.G. Kleinman, Cloning and preliminary characterization of a calcium-binding protein closely related to nucleolin on the apical surface of inner medullary collecting duct cells, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 27491–27496.
- [72] J.S. Gilchrist, B. Abrenica, P.J. DiMario, M.P. Czubyrt, G.N. Pierce, Nucleolin is a calcium-binding protein, *J. Cell. Biochem.* 85 (2002) 268–278.
- [73] J. Hwang, A. Kalinin, M. Hwang, D.E. Anderson, M.J. Kim, O. Stojadinovic, M. Tomic-Canic, S.H. Lee, M.I. Morasso, Role of Scarf and its binding target proteins in epidermal calcium homeostasis, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 18645–18653.
- [74] E.A. Sorokina, J.A. Wesson, J.G. Kleinman, An acidic peptide sequence of nucleolin-related protein can mediate the attachment of calcium oxalate to renal tubule cells, *J. Am. Soc. Nephrol.* 15 (2004) 2057–2065.
- [75] F.H. Allain, D.E. Gilbert, P. Bouvet, J. Feigon, Solution structure of the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and NMR study of the interaction with its RNA target, *J. Mol. Biol.* 303 (2000) 227–241.
- [76] S.-H. Fang, N.-H. Yeh, The self-cleaving activity of nucleolin determines its molecular dynamics in relation to cell proliferation, *Exp. Cell Res.* 208 (1993) 48–53.

4. CONCLUSION ET DISCUSSION

La présence de nucléoline à la surface cellulaire et son rôle de récepteur pour des ligands très différents, nous ont amené à nous interroger sur sa spécificité structurale et, surtout, fonctionnelle. Nous avons pu ici démontrer que la nucléoline de surface est exclusivement glycosylée et que cette glycosylation est essentielle à son expression à la surface cellulaire. Par ailleurs, nous avons pu montrer que la fixation d'un ligand (HB-19) sur la nucléoline de surface pouvait induire une entrée de calcium dans la cellule. Ce flux calcique est transitoire, spécifique, et se produit dans des types cellulaires aussi différents que les cellules T et les cellules cancéreuses de prostate.

Ces résultats suggèrent que la fixation d'un ligand sur la nucléoline de surface peut entraîner, de façon directe ou indirecte, des réponses physiologiques. Cependant, les mécanismes exacts par lesquels la nucléoline induit des signaux dans la cellule restent à déterminer. En effet, certains des ligands sont internalisés suite à leur interaction avec la nucléoline, alors que certains ne le sont pas. D'un côté, la nucléoline jouerait le rôle de protéine cargo entre la surface et le cytosol ou le noyau, où le complexe récepteur/ligand exercerait son rôle de régulation. D'un autre côté, la nucléoline interagirait avec certains ligands, parfois non endocytés car faisant partie intégrante de la matrice extracellulaire, et induirait des flux calciques servant de second messager pour induire des voies de signalisation intracellulaires. Dans le cas d'HB-19, les variations de concentration en calcium intracellulaire observées sont importantes et comparables à celles induites par le complexe TCR/CD3 pour l'activation de voies de signalisation en réponse à la fixation d'un ligand.

La possibilité que la nucléoline soit capable de relayer un signal avait déjà été suggérée dans la littérature. En particulier, la nucléoline cytosolique a été décrite comme intervenant dans la transduction de signaux, l'activation et la différenciation cellulaire, par phosphorylation de certains de ses résidus de tyrosine (Barel *et al.*, 2001). De même, la nucléoline de surface interagit avec le facteur J immobilisé sur phase solide et induirait la phosphorylation des tyrosines de protéines intracellulaires (Larrucea *et al.*, 1999). La laminine1, qui interagit elle aussi avec la nucléoline de surface, participerait à la différenciation cellulaire par activation de la voie p38MAPK (Turck *et al.*, 2006). Enfin, l'interaction entre la lactoferrine et la nucléoline, précédemment décrite dans le

Laboratoire, pourrait également avoir pour conséquence l'activation de la voie MAPK. En effet, d'une part, la nucléoline a été décrite comme le récepteur majeur de la lactoferrine (Legrand *et al.*, 2004) et, d'autre part, la lactoferrine a été décrite comme capable d'activer la voie MAPK chez les cellules Jurkat (Dhennin-Duthille *et al.*, 2000). Il se pourrait donc que les ligands naturels de la nucléoline aient un effet inducteur comparable à celui de HB-19 lors de leur liaison à la nucléoline.

Le mécanisme exact par lequel la nucléoline de surface induit des flux calciques intracellulaires n'est pas encore défini. Nos résultats indiquent que HB-19 induit une variation de calcium en agissant sur les canaux de la famille SOC. Chez les cellules T, en particulier, les canaux CRAC sont essentiels au fonctionnement des cellules, et nécessitent l'intervention du TCR et de récepteurs couplés aux protéines G, capables d'activer la phospholipase C (PLC) (Figure 17, p.61). Comme la nucléoline n'est ni une protéine transmembranaire ni une protéine à ancrage GPI, une interaction directe avec la PLC est, à priori, impossible. Nous émettons l'hypothèse que la fixation d'un ligand, tel qu'HB-19, puisse induire l'interaction de la nucléoline avec un autre récepteur à la surface membranaire, lui-même capable d'activer le système SOCE. Cette interaction entre la nucléoline et un autre récepteur pourrait être due soit à un changement de conformation de la nucléoline de surface, soit à une modification de la distribution de la nucléoline à la surface. Cette dernière théorie semble en accord avec certaines expériences en cours dans le laboratoire d'Ara Hovanesian montrant l'existence de complexes supramoléculaires de plus de 500 kDa contenant la nucléoline de surface (communication personnelle).

Enfin, le mécanisme exact et l'implication de la glycosylation dans ce processus restent à déterminer. En effet, comme nous le verrons dans le chapitre 2, la glycosylation pourrait influencer l'interaction de la nucléoline sur elle-même ou avec d'autres ligands.

Chapitre 2

Etude de l'influence de la
N-glycosylation sur les interactions
et fonctions de la nucléoline

CHAPITRE II : Etude de l'influence de la N-glycosylation sur les interactions et les fonctions de la nucléoline

La nucléoline de surface a pour particularité structurale, par rapport à la nucléoline nucléaire, d'être glycosylée. De plus, elle possède des ligands et des fonctions qui lui sont propres. La première question posée, à laquelle nous avons essayé de répondre dans ce chapitre, est la suivante : est-ce que la présence de N-glycanes dans des domaines fonctionnels tels que les RBD, est susceptible de déterminer, moduler, ou modifier la spécificité d'interaction, et par extension les fonctions, de la nucléoline de surface ?

Pour répondre à cette question, en raison de l'impossibilité d'obtenir des quantités suffisantes de l'isoforme glycosylée de la nucléoline à partir d'extraits cellulaires, nous avons envisagé de produire une nucléoline recombinante sécrétée et glycosylée.

Dans une première approche nous avons voulu produire une nucléoline « pleine taille ». Nous avons pour cela effectué des essais de production en cellules d'insectes en présence ou non d'une étiquette GST, mais également en cellules de levure *Pichia pastoris*. Les essais de production dans *Pichia pastoris* ont été réalisés en collaboration avec P. Nagnan-le Meillour (UMR 8576 CNRS). Dans le premier système de production (cellules d'insecte), l'activité autoprotéolytique de la nucléoline n'a pas permis de produire la nucléoline pleine taille, mais uniquement des fragments de 30 et 60 kDa. Dans le second système (*P. pastoris*), nous avons pu produire une nucléoline pleine taille non dégradée, vraisemblablement en raison du pH acide du milieu de culture, mais en beaucoup trop faible quantité pour envisager sa purification et des études d'interaction. Ces essais s'étant révélés infructueux, nous avons élaboré une stratégie de production de la nucléoline dépourvue de son domaine N-terminal, contenant les quatre RBD et le domaine C-terminal, qui est connu dans la littérature pour être un fragment stable de la nucléoline. De plus, l'absence du domaine N-terminal nous a permis de nous affranchir de l'éventuelle influence de la O-glycosylation dans notre étude.

1. PRODUCTION DE FORMES RECOMBINANTES DE NUCLEOLINE, GLYCOSYLEES OU NON

La production de nucléoline recombinante a pour avantage de permettre de contrôler l'état de glycosylation de la protéine produite grâce à la mutation spécifique des sites de N-glycosylation. Les différentes formes de nucléoline recombinantes ainsi produites ont permis d'étudier les relations structures/fonctions de la nucléoline en fonction de son état de N-glycosylation.

1.1. Biosynthèse et production

1.1.1. Système de production : baculovirus/cellules d'insecte

Pour produire la nucléoline recombinante, nous avons choisi le modèle baculovirus/cellules d'insecte qui a l'intérêt d'être rapide et simple à mettre en place, avec un bon rendement de production. Il a également surtout l'avantage de respecter l'occupation des sites de N-glycosylation, même s'il ne permet pas d'obtenir des N-glycanes de type complexe.

1.1.1.1. Les baculovirus linéaires

Les baculovirus sont des virus infectant les arthropodes ; ils sont constitués d'un génome circulaire encapsidé. La production de protéines recombinantes consiste à insérer le gène d'intérêt dans des particules virales, généralement à la place du gène de la polyhédrine, et à faire exprimer la protéine issue de ce gène, en même temps que les autres protéines virales, lors du cycle naturel d'infection (Figure 19, p.83). Parmi les différents systèmes permettant la production en cellules d'insecte, nous avons choisi un système utilisant un ADN viral linéarisé. Ce système consiste à co-transfecter un baculovirus linéarisé au niveau d'un gène tardif, et un plasmide contenant le gène d'intérêt. Cette technique permet d'éviter les faux positifs, puisque seuls les baculovirus ayant réussi leur recombinaison avec le vecteur de transfert et donc à se recirculariser,

peuvent infecter les cellules d'insecte. Après co-transfection et recombinaison entre le plasmide avec le baculovirus, les cellules infectées produisent la protéine d'intérêt.

Le baculovirus utilisé dans notre étude est le BD baculogold bright linearized baculovirus DNA (BD Biosciences). Ce baculovirus contient, en plus des gènes viraux, la séquence codante pour la GFP (Green Fluorescent Protein), ce qui permet de contrôler le niveau d'infection des cellules par microscopie de fluorescence ou cytométrie en flux.

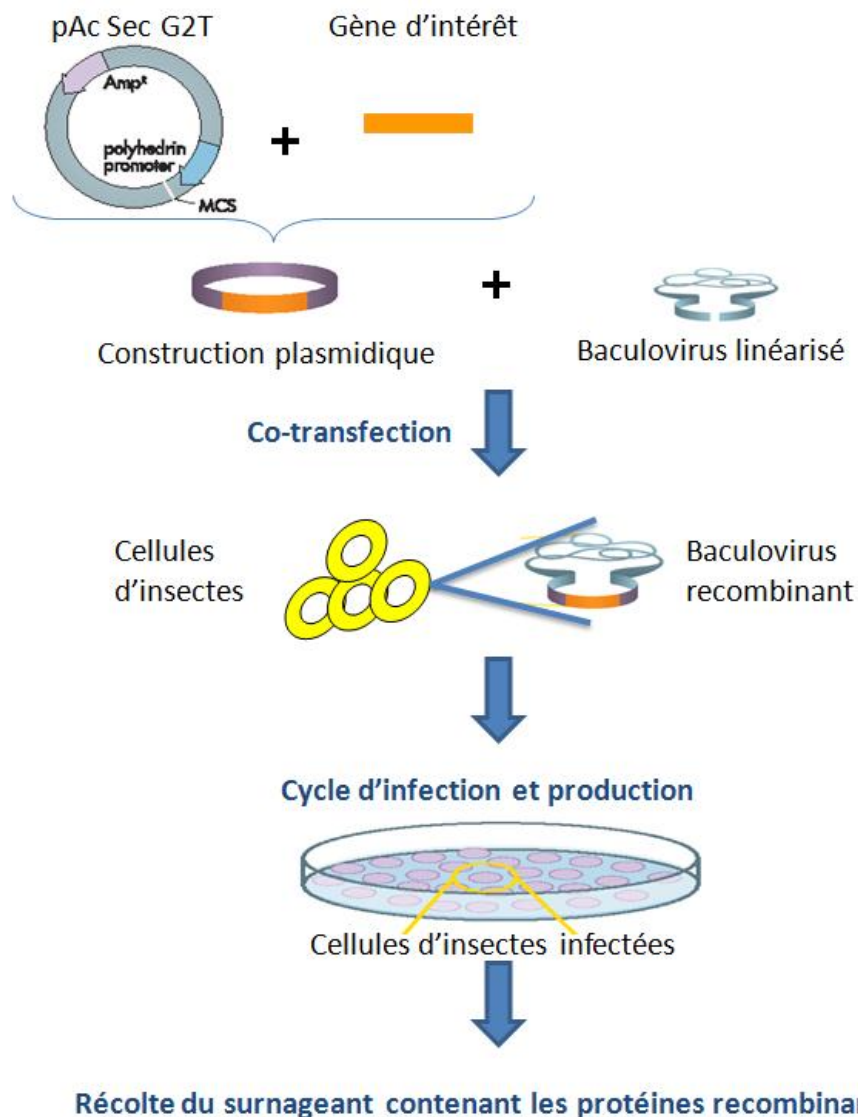


Figure 19 : Représentation schématique du processus de production de protéines recombinantes par le système baculovirus/cellules d'insecte

1.1.1.2. Cellules Sf9 et Hi-5

Dans le système baculovirus/cellules d'insecte, les cellules les plus couramment utilisées sont des cellules de lépidoptères. Parmi elles, on retrouve les Sf9 qui sont des cellules ovariennes issues de *Spodoptera frugiperda*, mais aussi les cellules High-five (BTI-TN-5B1-4) provenant de *Trichoplusia ni*. Lors de la production de la nucléoline, nous avons utilisé ces deux types cellulaires, chacun trouvant une utilisation spécifique dans le système d'expression. En effet, les Sf9 sont apparues, après évaluation du taux d'infection par cytofluorimétrie en flux, être mieux adaptées aux étapes d'amplification et de production des baculovirus recombinants. A contrario, les High-five infectées génèrent peu de particules virales mais présentent un rendement de production des protéines recombinantes jusque 5 fois supérieur au rendement de production des Sf9 (résultats non présentés ici).

1.1.2. Constructions plasmidiques

Afin de produire des formes recombinantes, glycosylées ou non, plusieurs constructions ont été réalisées. Elles ont toutes été conçues dans le plasmide pAcSecG2T qui contient la séquence du promoteur de la polyhédrine, une protéine de la capsid dont la synthèse est tardive lors du cycle de réplication, et la séquence du signal de sécrétion de la glycoprotéine p67, qui permet la sécrétion de la protéine recombinante dans le milieu de culture. Le plasmide commercial de chez Clontech a été modifié, puisque la séquence codant pour la glutathion-S-transférase (GST) a été retirée du plasmide. En effet, des premiers essais de production de nucléoline recombinante fusionnée à la GST en position N-terminale ont démontré l'incapacité de la protéine de fusion à se fixer sur colonne de Glutathion-agarose (résultats non montrés). Nous avons interprété ce résultat par une mise en conformation inadéquate de la GST, ou un masquage de son site d'interaction avec le glutathion, lorsqu'elle est fusionnée avec la nucléoline. La séquence de la GST a donc été délétée. Cette modification a été effectuée par mutagenèse dirigée afin d'insérer un site de restriction BamH1 en amont de la séquence de la GST. Ceci a permis, par simple digestion enzymatique, de linéariser le plasmide en libérant un fragment d'environ 600 bp correspondant à la séquence de la GST.

La séquence codante des différentes formes de nucléoline a été insérée entre les sites de restrictions BamH1 et EcoR1 (Figure 20, p.85). Quatre types d'inserts ont été clonés ; ils commencent tous au codon correspondant à l'acide aminé 293 de la nucléoline. Les protéines produites correspondent donc à la nucléoline amputée de ses 292 premiers résidus d'acides aminés (domaine N-terminal). Les quatre protéines exprimées diffèrent par la mutation ou non des codons correspondant aux asparagines d'ancrage des N-glycanes (mutation Asparagine (N) -> Alanine (A)).

On distingue ainsi : la forme non mutée, potentiellement glycosylable sur ses 2 sites 317 et 492, appelée **NCT** ; la forme mutée sur le premier site de N-glycosylation (317), c'est-à-dire dans le domaine RBD1, appelée **R1CT** ; la forme mutée sur le deuxième site de N-glycosylation (492), c'est-à-dire dans le domaine RBD3, appelée **R3CT** ; et la forme mutée simultanément sur les deux sites de glycosylation, appelée **RCT**. Les séquences protéiques ainsi obtenues sont schématisées dans la figure 21.

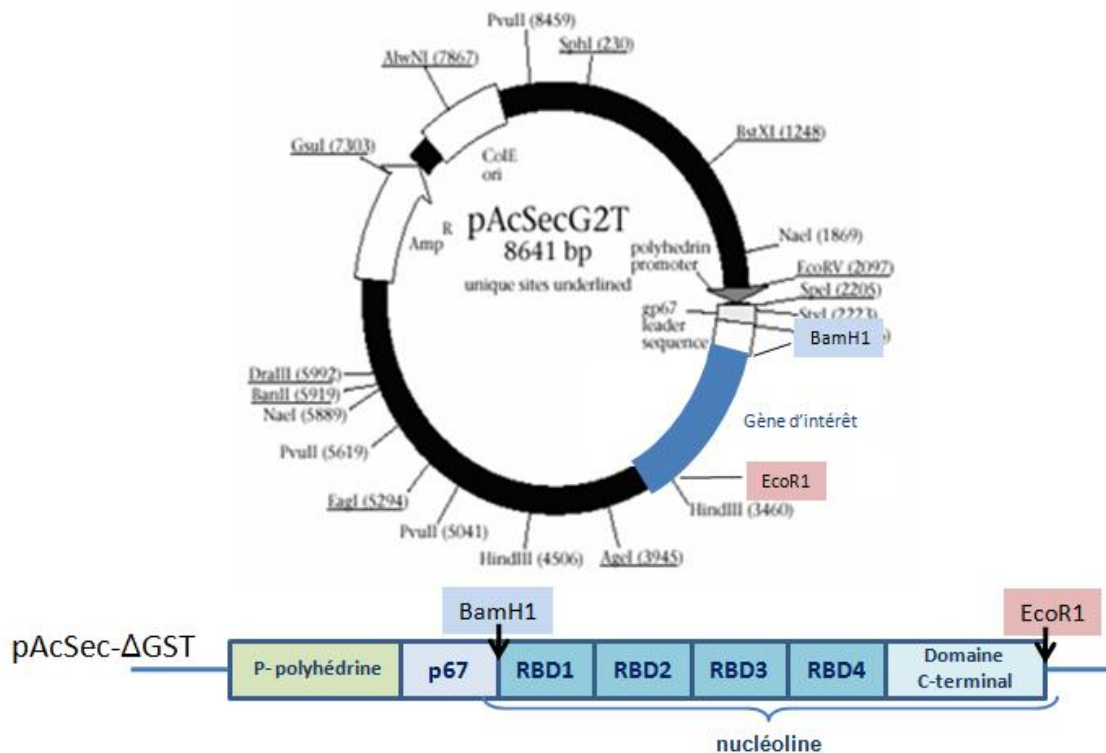


Figure 20 : Représentation schématique du vecteur pAcSecG2T et des constructions effectuées à partir de ce vecteur

Représentation des séquences codées par le vecteur pAcSecG2T non modifié, et schéma de la construction type, sans la séquence codant pour la glutathion-sulfo-transférase, mais contenant le promoteur de la polyhédrique (P polyhédrique) et la séquence de sécrétion de la glycoprotéine p67 (p67). Le gène d'intérêt a été cloné entre les sites de restriction BamH1 et EcoR1 du vecteur pAcSec-ΔGST obtenu.

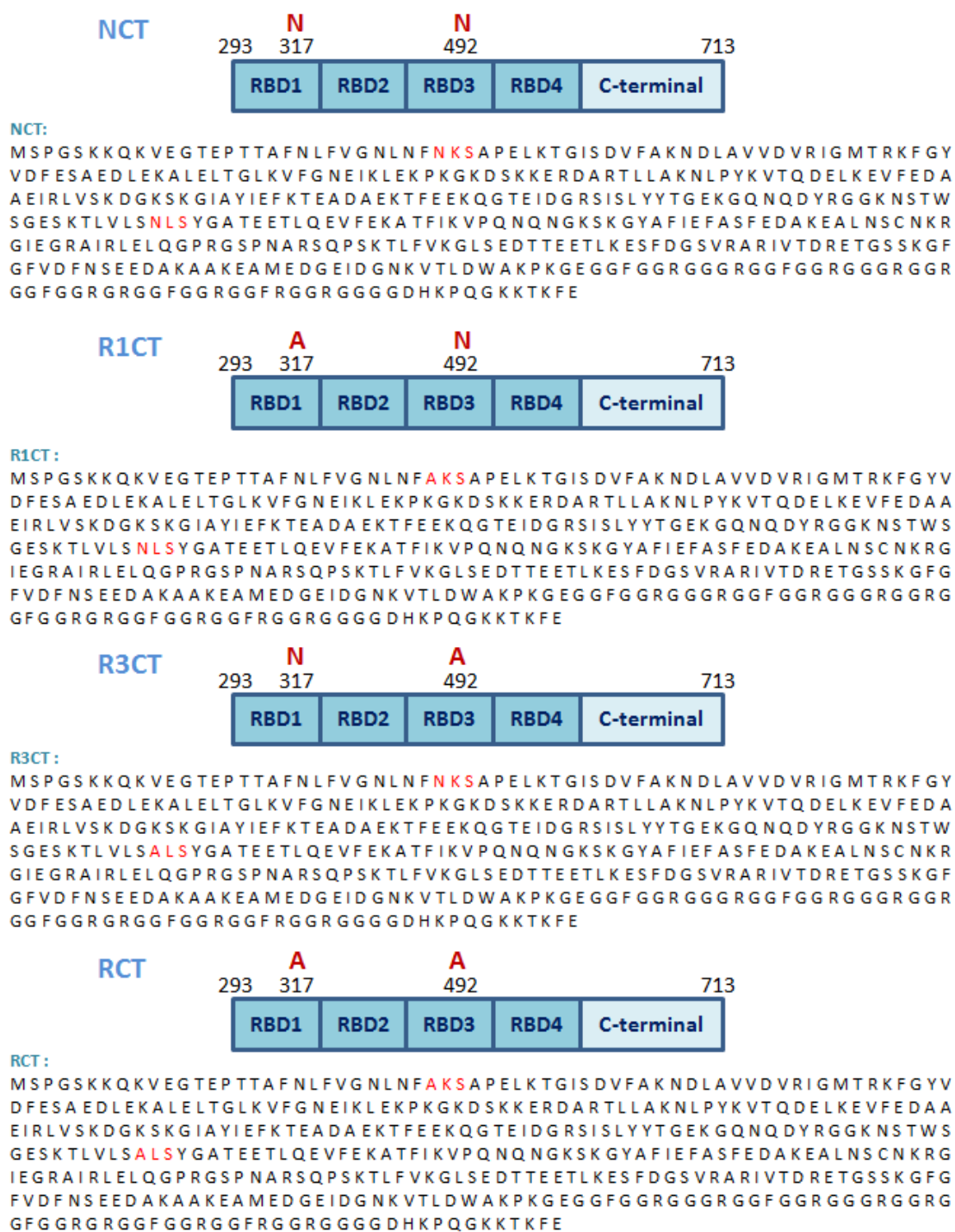


Figure 21 : Schéma des différentes constructions utilisées lors de la production en cellules d'insecte et séquences protéiques des différentes formes de nucléoline recombinante produites

Les 4 constructions ont été privées de la séquence codant pour le domaine N-terminal. Leurs séquences commencent donc à l'acide aminé 293 de la nucléoline native. Les sites de N-glycosylation sont indiqués en rouge sur les schémas et dans les séquences protéiques. Les résidus d'asparagine 317 et 492 sont mutés ou non en alanine selon les constructions.

1.1.3. Cinétique de production, rendement et purification des protéines

1.1.3.1. Cinétique de production

La production a donc été effectuée à partir de baculovirus recombinants amplifiés en cellules Sf9 jusqu'à obtention d'une suspension virale ayant un ratio d'infection de type HMOI (High Multiplicity Of Infection). Les baculovirus ont été inoculés aux cellules High-five afin de produire les protéines recombinantes dans le surnageant de culture. L'infection des cellules a été vérifiée par mesure en cytofluorimétrie en flux de l'expression de la GFP codée par le baculovirus circularisé. Une cinétique de production des cellules High-five a été réalisée afin de déterminer le temps nécessaire à l'obtention d'une quantité suffisante de protéine recombinante exempte de dégradation pour les analyses. Pour cela, les surnageants des cellules infectées ont été récupérés après 24, 48, 72, 96 et 120 h et analysés par SDS-PAGE.

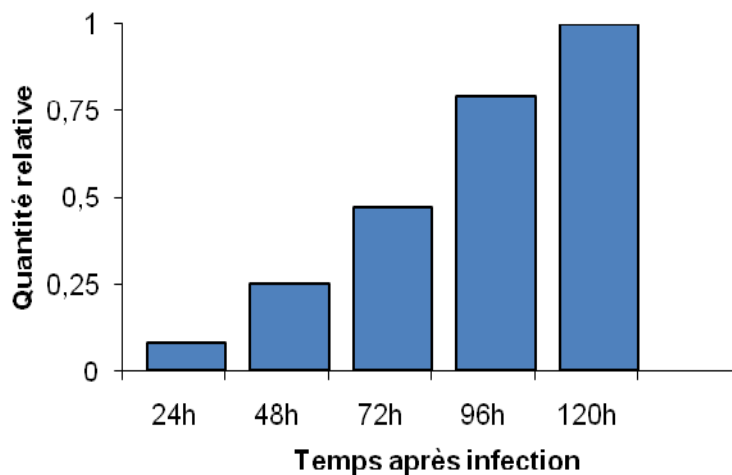


Figure 22 : Cinétique d'expression de la protéine NCT dans les cellules High-five en fonction de la durée d'infection par les baculovirus (expérience représentative)

Cinétique de production de la protéine NCT dans les cellules High-five, de 24 h à 120 h après infection. Les cellules ont été séparées du surnageant de culture par centrifugation. Les protéines de 100 µl des surnageants ont été séparées par SDS-PAGE. Après immunorévélation par l'anticorps anti-nucléoline, l'intensité de la bande correspondant à la protéine a été estimée par densitométrie (Quantity one, Biorad). La quantité maximale observée est posée égale à 1, et les autres quantités sont représentées par rapport à cette référence.

Comme le montre la figure 22, p.87, représentant la quantité relative de protéine recombinante N-glycosylée NCT produite en fonction du temps, la production, sans dégradation notable de la protéine de 50 kDa exprimée, croît régulièrement pendant les 5 jours suivant l'infection. Les rendements obtenus par cette méthode sont de l'ordre de 5 à 10 mg/L de surnageant (J5). Après 5 jours d'expression, la lyse accélérée des cellules entraîne une dégradation importante de la protéine exprimée.

1.1.3.2. Purification par chromatographie d'échange d'ions

Afin de purifier les protéines recombinantes, les milieux de culture contenant la nucléoline recombinante ont été récupérés, séparés des cellules par centrifugation, puis les surnageants ont été chromatographiés par échange d'ions en FPLC sur colonne de S-Sepharose Fastflow (Pharmacia). La Figure 23, p.89 présente les profils d'élution des protéines issues des surnageants de production, grâce à un gradient en NaCl de 0 à 1 M. On observe bien, pour chacune des formes mutantes de nucléoline produite, un pic individualisé élué entre 0,5 et 0,6 M de NaCl (indiqué par la flèche bleue sur la Figure 23, p89). Après purification, les fractions ont été concentrées et dialysées.

Lorsque les quatre protéines ainsi purifiées sont séparées par SDS-PAGE, une différence de migration électrophorétique peut être observée entre les formes glycosylables ou non des protéines recombinantes. Comme le montre le gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de la figure 24, p.89, les protéines possèdent des masses moléculaires différentes, dans l'ordre : NCT > R1CT > R3CT > RCT. Ces résultats tendent à confirmer la présence de glycanes qui modifieraient la masse moléculaire de la protéine et donc sa migration électrophorétique.

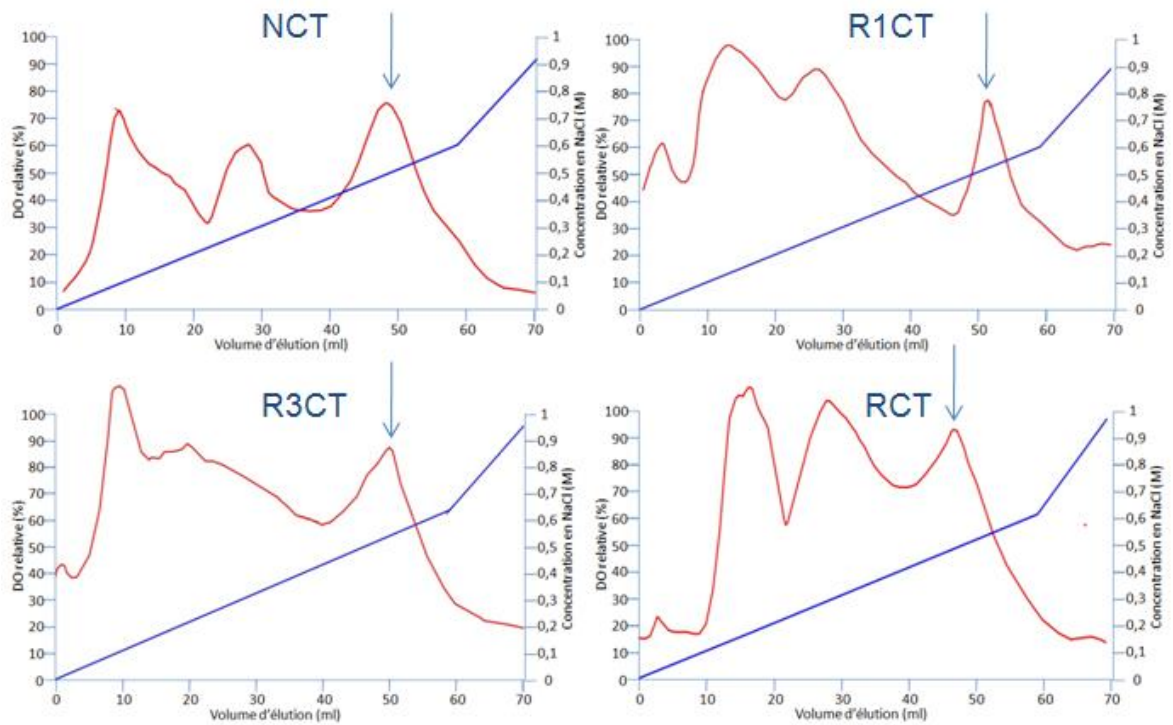


Figure 23 : Purification en FPLC sur colonne S-Sepharose Fastflow des 4 protéines recombinantes (NCT, R1CT, R3CT et RCT) contenues dans 175 ml de surnageant de culture de cellules High-five après infection par des baculovirus recombinants

175 ml de surnageant de culture ont été injectés sur une colonne de 10 ml de S-Sepharose Fastflow et les protéines ont été éluées par un gradient de NaCl de 0 à 1 M pendant 70 min à un débit de 1 ml/min. Les pics contenant les protéines recombinantes sont indiqués par des flèches bleues.

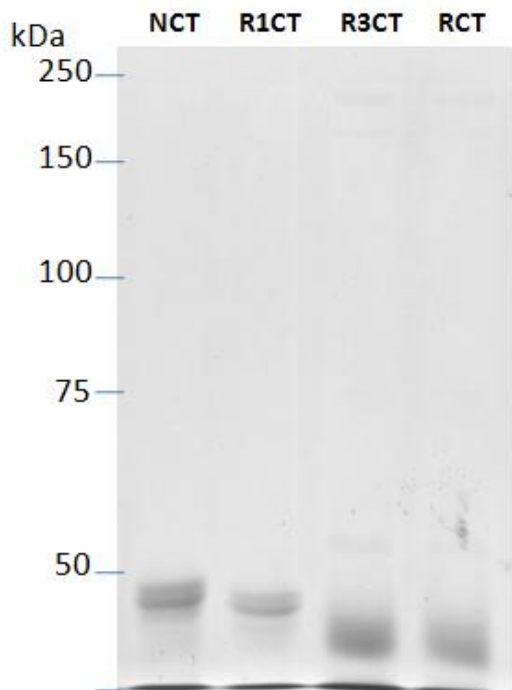


Figure 24 :

SDS-PAGE des protéines recombinantes obtenues après purification sur colonne S-Sepharose Fastflow

Les protéines (2 μ g) ont été séparées par SDS-PAGE (10%) en présence de beta-mercaptoéthanol. La coloration a été réalisée par le bleu de Coomassie.

1.2. Analyse de l'occupation des sites de N-glycosylation et caractérisation des glycanes

La différence de migration des différentes formes de nucléoline recombinante semble indiquer la présence de glycanes sur les formes glycosylables. Nous avons vérifié si l'occupation des sites de N-glycosylation était conforme à celle de la nucléoline glycosylée native ; la nature et la structure des glycanes présents sur les protéines ont été analysées.

1.2.1. Composition en monosaccharides

La méthode la plus utilisée pour déterminer la structure des N-glycanes est leur analyse par MALDI-TOF après leur libération de la protéine par action de la PNGase. Cependant, cette méthode s'est révélée inefficace, et ce probablement à cause de la présence d'un résidu de fucose sur le core N-glycanique, fréquemment retrouvé chez les protéines d'insecte (Hollister *et al.*, 2002).

1.2.1.1. Dérivés Hfb

La détermination de la composition en monosaccharides étant essentielle pour établir le type de structure N-glycanique portée par les protéines recombinantes, nous avons entrepris d'établir cette composition par une méthode qui consiste en une dérivation par l'acide heptafluorobutyrique (Hfb) des résidus glycaniques après méthanolyse. Les dérivés heptafluorobutyriques ainsi obtenus ont été analysés en GC-MS.

La figure 25, p.91 présente les spectres obtenus en GC-MS pour une forme glycosylée (NCT) et une forme non glycosylée (RCT). Sur le spectre obtenu pour NCT, on observe des pics absents du spectre obtenu pour RCT, qui correspondent aux monosaccharides présents sur NCT. Par comparaison, avec une injection étalon des dérivés Hfb des différents monosaccharides, il a été possible d'identifier la présence de mannose, fucose, et de N-acétylglucosamine sur les formes glycosylables de la nucléoline.

On peut observer, sur les deux spectres, la présence d'un pic majeur de glucose dû à une contamination par la membrane de PVDF (flèche bleue).

Les rapports molaires des différents monosaccharides présents ont été calculés en fonction de l'aire de chacun des pics, la quantité de glucosamine, issue du résidu de N-acétylglucosamine du point d'attache du N-glycane après coupure par méthanolyse du core N-glycanique, ayant été posée égale à 1. On obtient ainsi les proportions présentées dans le tableau 1, p.92. En comparant les données de la littérature, et si l'on considère les proportions de 3 mannoses, 1 fucose, 1 glucosamine et 1 N-acétylglucosamine, on peut émettre l'hypothèse d'une structure N-glycanique paucimannosidique fucosylée.

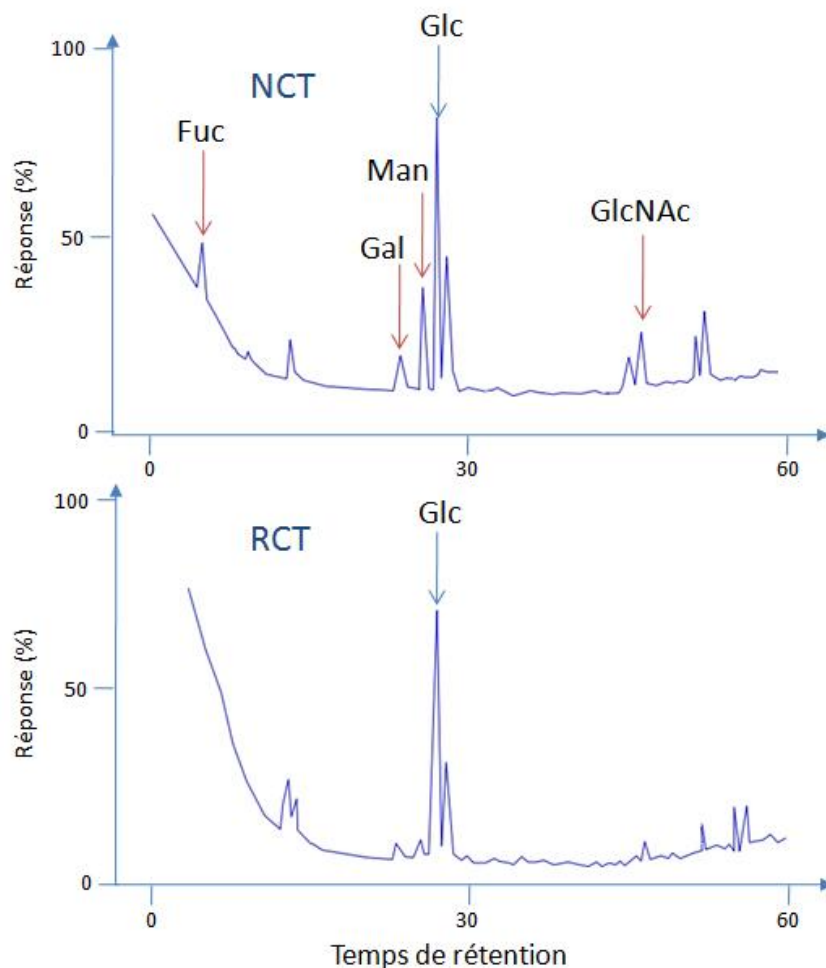


Figure 25 : Spectres obtenus en GC-MS après dérivation par l'acide heptafluorobutyrique des glycanes des protéines recombinantes NCT et RCT

monosaccharides	NCT	R1CT	R3CT	RCT
GlcNH ₂	1	1	1	0
Man	3	2,98	2,98	0
Fuc	0,8	0,91	0,91	0
GlcNAc	1,12	1,2	1,2	0

Tableau 1: Proportions en monosaccharides obtenues en GC-MS après dérivation par l'acide heptafluorobutyrique des glycanes des 4 protéines recombinantes NCT, R1CT, R3CT et RCT

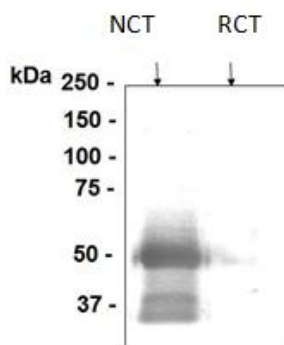
Un µg de chacune des protéines recombinantes a été séparé par SDS-PAGE et électrotransféré sur membrane de PVDF. Les bandes d'intérêt ont été excisées, soumises à méthanolyse et dérivées par l'heptafluorobutyrate avant analyse par GC-MS.

1.2.1.2. Immunodétection d'un core N-glycanique fucosylé

Afin de vérifier si la présence de fucose indique bien l'existence d'un core paucimannosidique fucosylé en α 1-3 sur la N-acétylglucosamine du point d'attache, nous avons séparé les protéines par SDS-PAGE et, après électrotransfert, nous avons effectué une immunodétection avec un anticorps anti-HRP (horse radish peroxydase) reconnaissant spécifiquement les cores N-glycaniques fucosylés (Kurosaka *et al.*, 1991). Les résultats de cette immunodétection, visibles sur la figure 26 (A), p.93, montrent bien une réaction de l'anticorps sur la protéine recombinante N-glycosylée NCT. La protéine RCT, non glycosylée, ne réagit pas avec l'anticorps.

Ces résultats et ceux obtenus par la méthode des dérivés Hfb, nous permettent de proposer un N-glycane paucimannosidique fucosylé comme structure des glycanes portés par les protéines recombinantes exprimées en cellules d'insecte (Figure 26 (B), p.93). Hormis la présence du fucose, la structure des glycanes des formes recombinantes de nucléoline est suffisamment proche de la structure des N-glycanes de la nucléoline endogène, pour constituer un encombrement stérique du même ordre, et donc permettre d'envisager l'étude de l'influence de l'occupation des sites par des N-glycanes sur les capacités d'interaction de la nucléoline.

(A) Immunodétection des cores N-glycaniques fucosylés



(B) Structure proposée pour les N-glycanes des protéines recombinantes

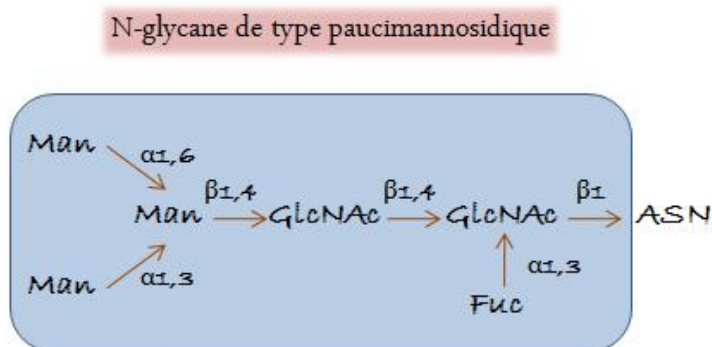


Figure 26 : Caractérisation de la présence de fucose sur le core N-glycanique des structures glycaniques des protéines recombinantes exprimées en cellules d'insecte.

(A) Vérification de la présence de cores N-glycaniques fucosylés. Les protéines recombinantes (2 μ g) ont été séparées par SDS-PAGE, électrotransférées sur nitrocellulose et immunorévélées par des anticorps anti-HRP, comme décrit dans l'appendice technique. (B) Schéma du glycane de type paucimannosidique fucosylé présent sur les formes recombinantes glycosylées de la nucléoline

1.2.2. Occupation des sites de N-glycosylation

Une fois établie la présence de N-glycanes sur les protéines recombinantes, nous avons entrepris de vérifier si l'occupation des sites de N-glycosylation correspondait bien à nos attentes : glycosylation de la protéine NCT sur les Asn 317 et 492, de la protéine R1CT sur l'Asn 492, de la protéine R3CT sur l'Asn 317, et absence de glycosylation de la protéine RCT. De même, nous avons voulu vérifier que le troisième site consensus de N-glycosylation porté par l'Asn 478, qui n'est pas occupé dans les isoformes glycosylées « naturelles » de la nucléoline humaine, ne l'est pas non plus sur les protéines recombinantes produites en cellules d'insecte.

A cette fin, une analyse des glycopeptides, issus de NCT et RCT, a été effectuée par spectrométrie de masse en collaboration avec B. Coddeville (UMR 8576 du CNRS). Les protéines recombinantes ont été soumises à une digestion trypsique et les glycopeptides ont été enrichis sur colonne de Sepharose 4B, puis soumis à une analyse par spectrométrie MALDI-TOF (Figure 27, p.94). Les pics des glycopeptides ont été attribués par calcul de la somme des masses théoriques des glycanes paucimannosidiques fucosylés et des masses des peptides issus de l'hydrolyse trypsique de la nucléoline obtenus par le logiciel Peptide mass (ExPASy).

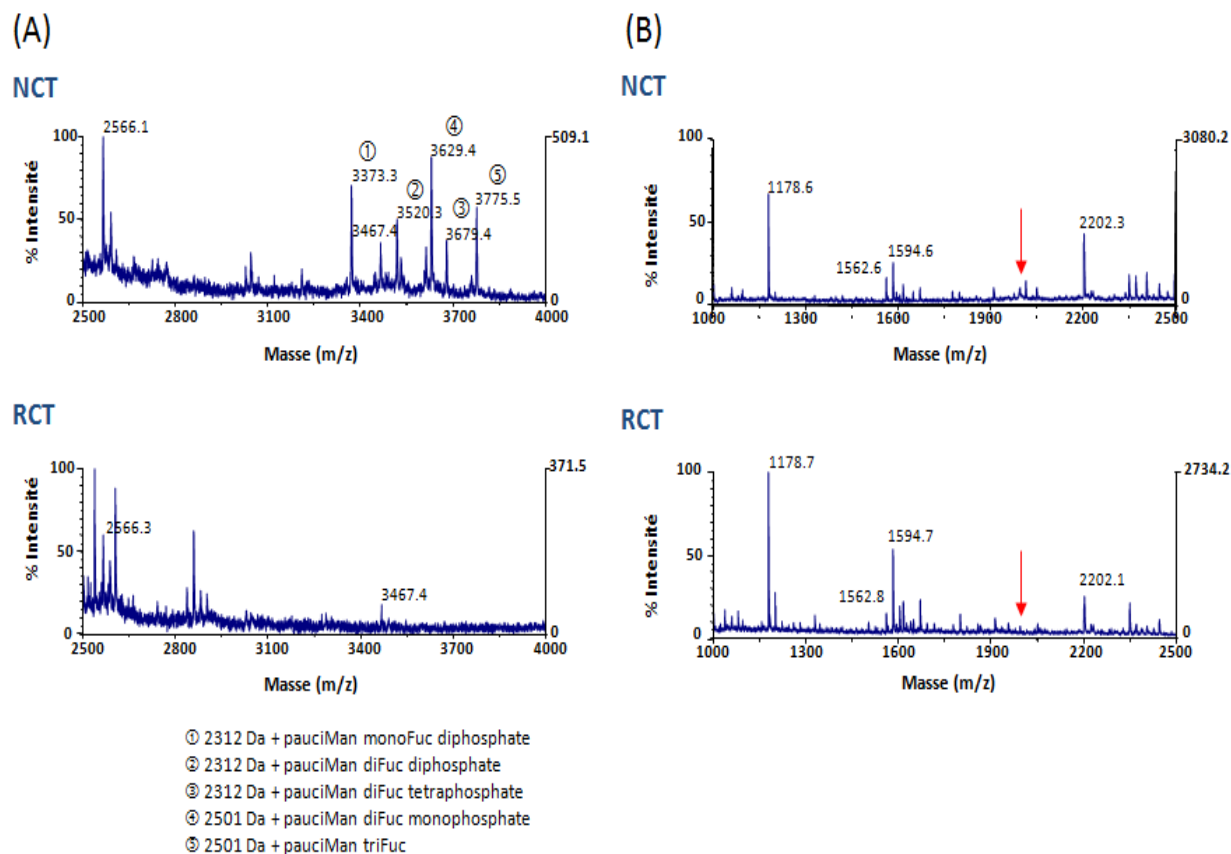


Figure 27 : Spectres MALDI-TOF des glycopeptides issus de la digestion trypsique des protéines NCT et RCT.

Après séparation par SDS-PAGE, les protéines colorées par le bleu de Coomassie ont été excisées et traitées par la trypsine. Les glycopeptides issus de la digestion ont été enrichis sur colonne de Sepharose 4B puis analysés en MALDI-TOF.

- (A) Les spectres issus des glycopeptides de NCT et RCT sont centrés dans la zone de masse 2500 à 4000 Da contenant les peptides potentiellement glycosylés sur les Asn 317 et 492.
- (B) Les spectres issus des glycopeptides de NCT et RCT sont centrés dans la zone de masse 1000 à 2500 Da contenant le peptide potentiellement glycosylé sur le troisième site potentiel de N-glycosylation Asn 478. Les flèches indiquent la position attendue du glycopeptide contenant le troisième site potentiel de N-glycosylation Asn 478.

Les spectres MALDI-TOF présentés sur la figure 27, p.94 ont permis d'établir la présence de glycanes sur les Asn 317 et 492 de la protéine glycosylée NCT, et leur absence sur le troisième site potentiel de N-glycosylation. En effet, on peut voir, en comparant les deux spectres du panel (A), que le spectre de la protéine NCT possède des pics à 3373, 3529, 3629, 3679 et 3775 Da, absents du spectre de la protéine RCT. Ces pics correspondent aux peptides de 2312 et 2501 Da contenant, respectivement, l'Asn 317 et 492, substitués par des glycanes paucimannosidiques fucosylés. Par contre, en observant le panel (B), on remarque l'absence de pic, aussi bien sur la forme NCT que RCT, dans la région correspondant à la masse éventuelle du glycopeptide 995 Da contenant l'Asn 478, à laquelle devrait s'ajouter une masse de 1061 à 1367 Da correspondant aux masses des glycanes retrouvés sur les autres sites N-glycosylés.

L'analyse de l'occupation des sites de N-glycosylation et la caractérisation des glycanes portés par les quatre protéines recombinantes produites en cellules d'insecte, ont permis de confirmer la présence de glycanes de type paucimannosidique fucosylé sur les Asn 317 et 492 de la protéine NCT, l'Asn 492 du R1CT, l'Asn 317 du R3CT et leur absence sur la protéine RCT. Le système de production de nucléoline recombinante par le système baculovirus/cellules d'insecte permet donc d'obtenir des protéines glycosylées propres à nos études d'interaction. Cependant, il a été nécessaire de vérifier que la mutation Asn -> Ala n'entraînait pas de modification structurale anormale des protéines mutées exprimées.

1.3. Analyse de la conformation des protéines recombinantes

En collaboration avec A. Leroy (UMR 8576 du CNRS), et afin de comparer l'état de conformation des protéines, deux techniques ont été utilisées : d'une part, le dichroïsme circulaire qui permet d'évaluer le taux d'hélicité des différentes protéines et, d'autre part, la fluorimétrie qui permet d'observer la proximité des acides aminés aromatiques entre eux.

1.3.1. Dichroïsme circulaire

Les protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT ont été analysées par dichroïsme circulaire. Comme le montre la figure 28, p.97, le spectre entre 210 et 220 nm montre des différences sensibles entre les protéines, ce qui indique des structures différentes. Cependant, il apparaît que ce ne sont pas les protéines mutées qui sont les moins structurées (hélicité supérieure), mais la forme doublement glycosylée NCT. La N-glycosylation simultanée des deux sites Asn 317 et 492 semble donc interférer avec la mise en conformation de la nucléoline.

1.3.2. Fluorimétrie

Le spectre de fluorescence des quatre formes de nucléoline recombinantes a été établi entre 300 et 440 nm. On peut observer, sur la figure 29, p.97 que le maximum de fluorescence, d'environ 355nm, est déplacé vers les longueurs d'ondes bleues (plus grandes longueurs d'onde) pour les formes NCT et R1CT, par rapport au maximum de fluorescence des formes R3CT et RCT, d'environ 345nm. Ce phénomène traduit un éloignement plus important des 2 résidus de tryptophane dans les formes NCT et R1CT que dans les formes R3CT et RCT.

En conclusion, les résultats obtenus en dichroïsme circulaire et en fluorimétrie indiquent que les mutations Asn -> Ala n'entraînent pas de déstructuration notable des protéines. Cependant, la présence de glycanes sur le site 492 semble modifier sensiblement la conformation, puisque la structure des formes NCT et R1CT semble plus relâchée que celles où le site n'est pas occupé (formes R3CT et RCT). Si l'on considère les résultats de dichroïsme circulaire (Figure 28, p.97), ce phénomène semble plus accusé sur la forme NCT où les deux sites sont glycosylés.

Les protéines recombinantes sont donc bien conformées et possèdent une N-glycosylation de type paucimannosidique fucosylé, permettant leur utilisation pour des études d'interaction avec différents ligands.

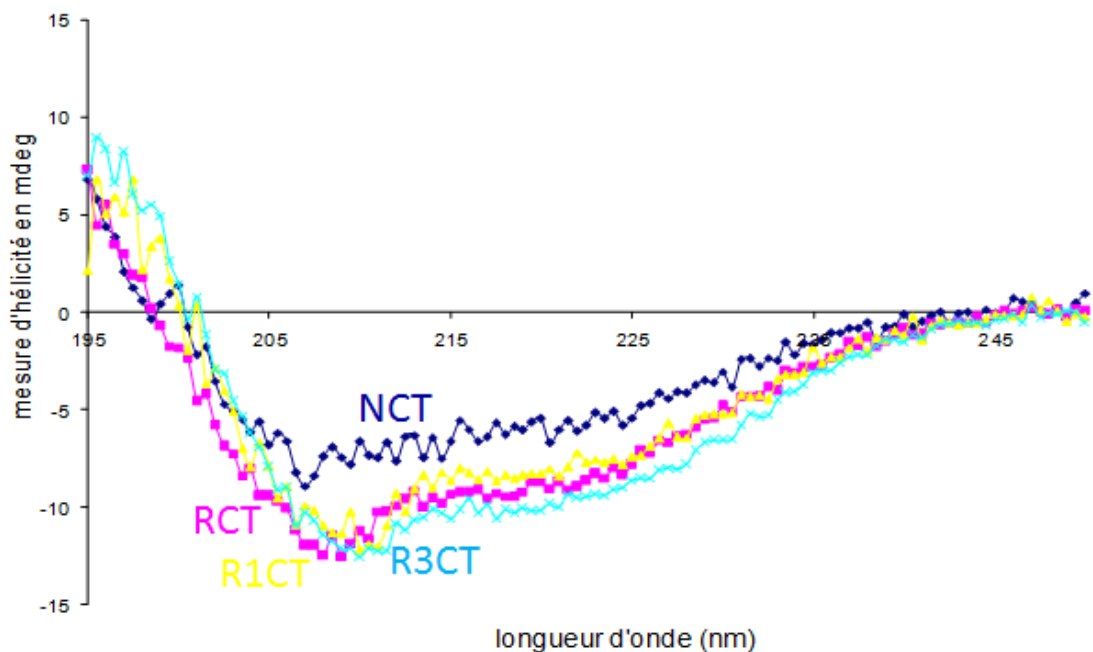


Figure 28 : Spectres de dichroïsme circulaire obtenus sur 2 μM des quatre formes de nucléoline recombinante

Les spectres ont été obtenus sur les protéines purifiées avec une cellule de 1 mm à 25°C, enregistrés entre 190 et 250 nm avec 1 nm de résolution et 0,5 s d'intervalle.

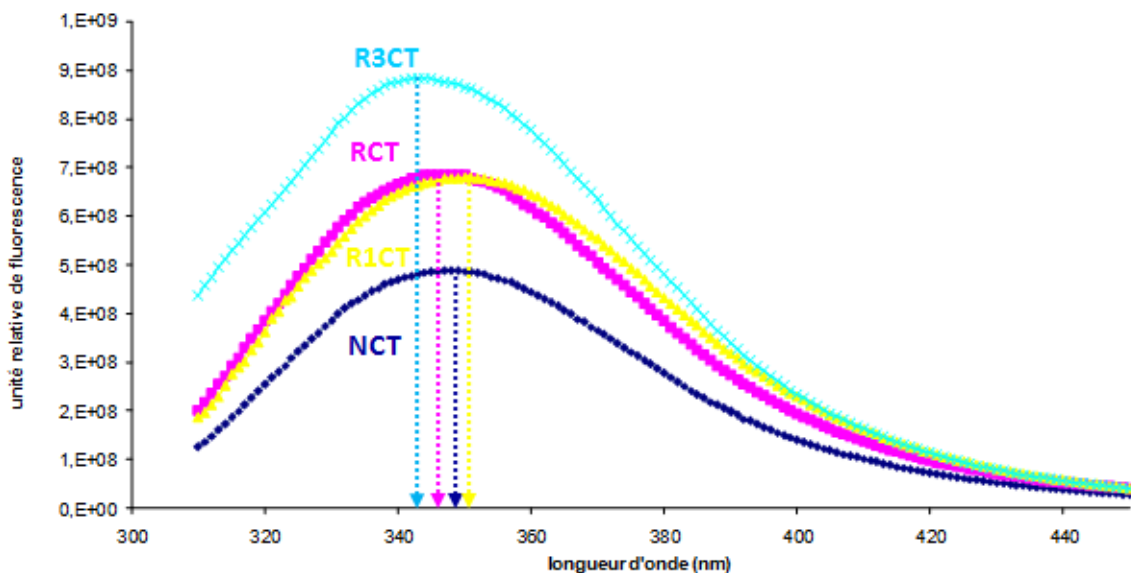


Figure 29 : Spectres de fluorescence obtenus sur 2 μM des quatre formes de nucléoline recombinantes

La fluorescence des cycles aromatiques des protéines a été enregistrée entre 300 et 450 nm.

2. ETUDE DES PROPRIETES D'INTERACTION DES DIFFERENTES GLYCOFORMES DE LA NUCLEOLINE

Les formes recombinantes de la nucléoline produites en cellules d'insecte étant conformées et glycosylées, elles ont été utilisées afin d'étudier dans quelle mesure la N-glycosylation de la nucléoline pouvait modifier ou moduler ses capacités d'interaction, d'une part avec certains de ses ligands naturels et, d'autre part, le cas échéant, avec elle-même. En effet, il pourrait y avoir une relation entre la spécificité structurale de la nucléoline de surface, sa glycosylation, et sa capacité à interagir avec des ligands différents de ceux de la nucléoline nucléaire. Par ailleurs, la capacité de la nucléoline à interagir avec elle-même et le rôle de la glycosylation dans celle-ci, sont intéressants à déterminer. En effet, les propriétés d'association de la nucléoline à la surface des cellules sont peu connues et, dans l'article présenté dans le chapitre 1, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la nucléoline serait capable, suite à une réorganisation conformationnelle ou une oligomérisation, d'induire des signaux calciques.

2.1. Interactions intra- et intermoléculaires, oligomérisation, et agrégation des isoformes recombinantes de la nucléoline

Dans un premier temps, la capacité de la nucléoline à s'oligomériser, de manière covalente ou non, a été étudiée. En particulier, en examinant la séquence protéique de la nucléoline humaine, on remarque l'existence d'une cystéine unique en position 542, et donc la possibilité de la formation d'un pont disulfure intermoléculaire. Des études ont été réalisées par électrophorèse PAGE et par résonance plasmonique de surface (Biacore).

2.1.1. Etudes en électrophorèse PAGE

Nous avons étudié l'effet d'un agent réducteur sur l'assemblage de la nucléoline et donc sur sa masse moléculaire apparente en SDS-PAGE. A cette fin, nous avons traité les protéines purifiées avec un tampon échantillon dépourvu du β -mercaptoéthanol, avant

leur séparation par SDS-PAGE. Comme le montre la figure 30, p.99, les protéines en présence de SDS, mais en absence de β -mercaptoéthanol, ont une migration électrophorétique modifiée, et présentent une hétérogénéité que n'avait pas révélée l'électrophorèse en SDS-PAGE en conditions dénaturantes (Figure 24, p89).

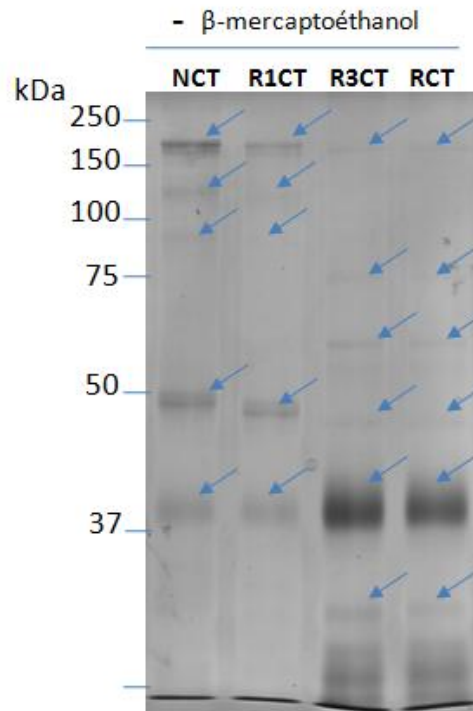


Figure 30 : Migration des isoformes recombinantes de nucléoline en SDS-PAGE en absence d'agent réducteur.

Trois μg de chaque protéine ont été séparés sur un gel SDS-PAGE (7,5%). Les flèches montrent la position des différentes bandes observées après coloration du gel au bleu de Coomassie.

Les protéines NCT et R1CT possèdent des profils de migration comparables, mais différents de ceux des protéines R3CT et RCT. Plus particulièrement, on observe de nombreuses bandes supplémentaires (flèches bleues) de masses supérieures ou inférieures à 50 kDa, la masse attendue des isoformes recombinantes. Une bande voisine de 50 kDa, de migration légèrement différente selon la protéine (NCT>R1CT>R3CT>RCT) et souvent dédoublée, est effectivement présente dans les pistes. Ces bandes sont semblables à celles obtenues en conditions dénaturantes (Figure 24, chapitre 2 § 1.1.3.2). En revanche, mise à part une bande de masse voisine de 90 kDa dans la piste NCT, aucune des masses observées ne semble correspondre à celle d'un dimère de protéine recombinante. Des bandes de 200 kDa sont même observées sur les pistes NCT et R1CT, alors que la formation de tétramères liés par des ponts disulfures est impossible, en

raison de la présence d'une cystéine unique sur chaque monomère. Plus remarquable encore est la présence d'une bande de masse légèrement inférieure à 40 kDa, en fait la bande majeure des protéines R3CT et RCT. Une telle hétérogénéité due à la seule absence d'agent réducteur n'est pas expliquée. Il apparaît cependant clairement, sans qu'un mécanisme puisse à l'heure actuelle être proposé, qu'un milieu réducteur soit nécessaire à la neutralisation d'interaction intra- et intermoléculaires, et ce même en présence de SDS.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu vérifier si la migration des différentes glycoformes était modifiée, en présence ou en absence de β -mercaptoéthanol, mais en conditions natives (sans SDS). Le pHi théorique des formes recombinantes de la nucléoline étant de 8,8, proche du pH couramment utilisé pour une électrophorèse dans ces conditions, nous avons effectué les électrophorèses PAGE sur gel vertical à pH 7,3. De plus, afin de visualiser la totalité des protéines migrant en conditions natives, vers la cathode ou vers l'anode, nous avons effectué une migration à pH 8,0 avec un système de dépôt horizontal sur la surface d'un mini-gel d'acrylamide (Système Phast-System). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 31, p.101. On y observe deux comportements électrophorétiques distincts entre, d'une part, les protéines NCT et R1CT et, d'autre part, les deux R3CT et RCT. En effet, les protéines R3CT et RCT migrent sous la forme d'une bande distincte, aux environs des 2/3 d'un gel réticulé à 7,5%, alors que NCT et R1CT sont visualisées sous la forme d'un « smear » (traînée) et d'une bande diffuse proche des puits de dépôt. Les quantités de protéine détectées dans les pistes NCT et R1CT sont sensiblement plus faibles qu'attendues, ce qui semble indiquer une absence partielle de migration des protéines. De façon intéressante, en présence de β -mercaptoéthanol, la migration des protéines NCT et R1CT est inchangée, tandis que R3CT et RCT migrent désormais très peu sur le gel, d'une manière comparable à celle des protéines NCT et R1CT. Une trace correspondant à la migration des protéines R3CT et RCT peut également être observée. L'électrophorèse à pH 8 sur mini-gels horizontaux confirme ces résultats et démontre, par l'absence de protéines migrant vers la cathode, que la différence de quantité de protéines détectée entre les couples NCT/R1CT et R3CT/RCT est probablement due à l'absence de migration d'une partie des protéines NCT et R1CT sur les gels, qui sont probablement agrégées et sont ensuite éliminées des puits de dépôts lors des étapes de coloration.

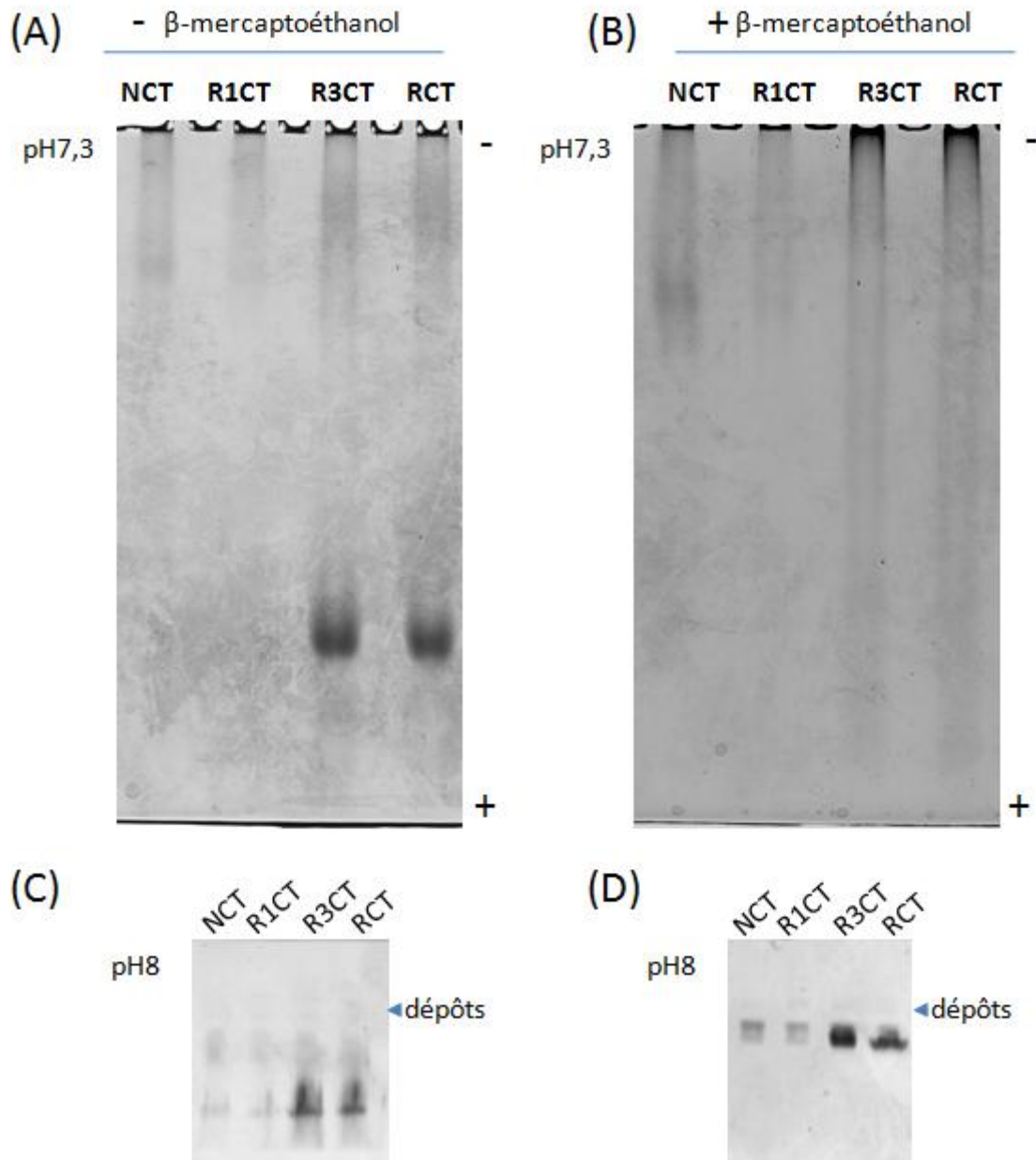


Figure 31 : Comparaison des migrations des protéines recombinantes sur gels PAGE en conditions non-dénaturantes, en présence ou non d'agent réducteur

Migration des protéines sur gels PAGE en conditions non-dénaturantes, en absence de β -mercaptoéthanol ((A) et (C)), ou en présence de β -mercaptoéthanol ((B) et (D)), réalisées à pH 7,3 sur système vertical ((A) et (B)), et à pH 8 sur système de mini-gel horizontal ((C) et (D)). Les protéines sont colorées au bleu de Coomassie. La ligne de dépôt des échantillons déposés à la surface des gels dans (C) et (D) est indiquée par une flèche. Sur les gels (A) et (B) sont déposés 10 μ g de chaque protéine, alors que sur les gels horizontaux (C) et (D) sont déposés 2 μ g de chaque protéine.

De manière à vérifier si les protéines révélées sur les gels natifs correspondent bien à la protéine d'origine, non dégradée avant ou pendant sa migration sur les gels, nous avons réalisé une électrophorèse PAGE bidimensionnelle. Les protéines ont d'abord été séparées sur un gel natif en absence de β -mercaptoéthanol, comme décrit ci-dessus et illustré dans la figure 31 (A), p.101. Après coloration au bleu de Coomassie, les protéines présentes dans la bande de gel natif ont été soumises à une nouvelle migration sur gel SDS-PAGE en présence de β -mercaptoéthanol, afin de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire.

L'expérience a été effectuée uniquement sur les protéines NCT et RCT, dont les migrations sont représentatives de celles, respectivement, de R1CT et de R3CT. Comme le montrent les deux gels de la figure 32, p.103, toutes les protéines visibles séparées dans la première dimension migrent sous la forme de spots de masse moléculaire de 50 kDa, ce qui confirme que l'hétérogénéité de migration des protéines observée en conditions natives n'est pas en relation avec une différence de masse moléculaire et/ou une dégradation éventuelle des protéines soumises à l'électrophorèse.

L'ensemble de ces résultats, réalisés en conditions natives, comme ceux réalisés en présence de SDS, confirment et sans qu'il puisse être expliqué, un effet du β -mercaptoéthanol sur l'organisation intra- ou intermoléculaire des protéines étudiées. Cependant, en conditions natives, l'effet n'est notable que pour les protéines R3CT et RCT. Par ailleurs, il semble que l'occupation du site de N-glycosylation sur RBD3 modifie les propriétés d'interaction des protéines NCT et R1CT qui auraient ainsi tendance à interagir entre elles et/ou à former des agrégats.

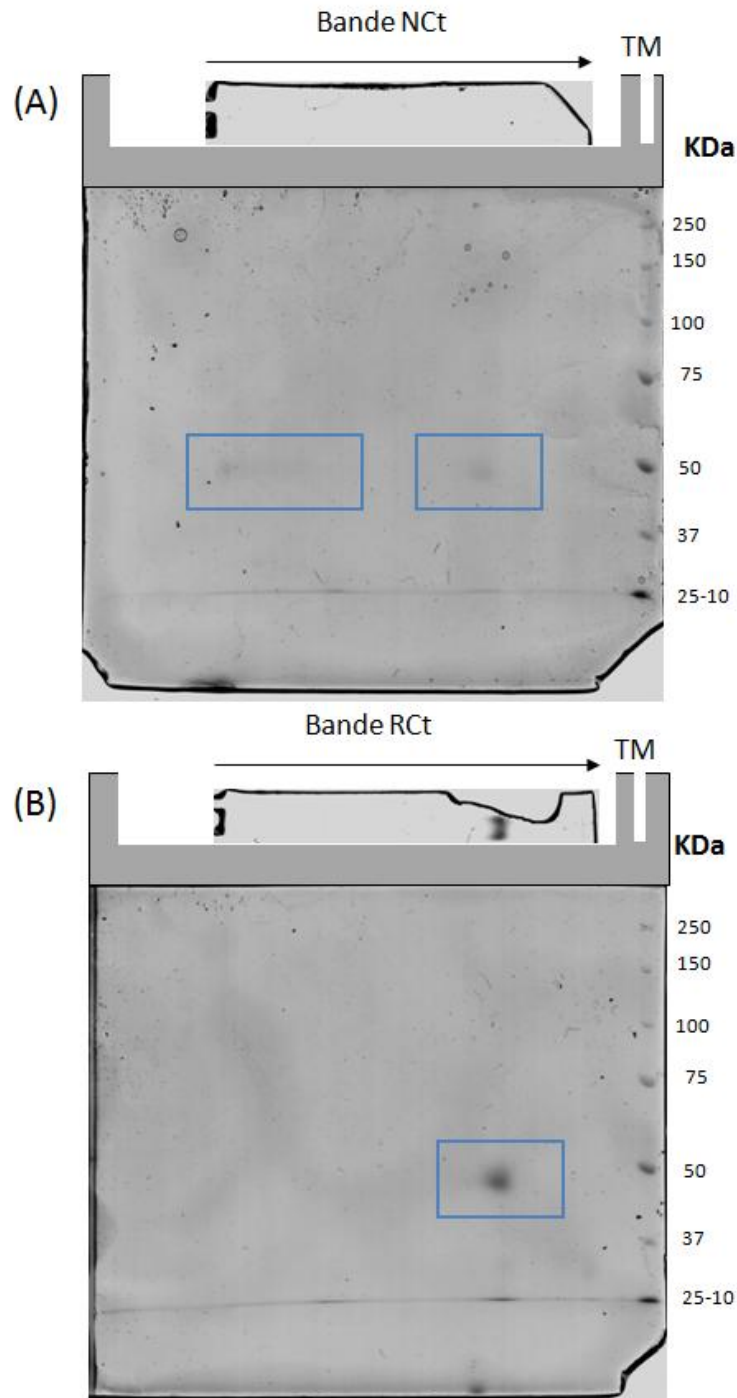


Figure 32: Vérification, par électrophorèse SDS-PAGE en présence de β -mercaptoéthanol, de l'intégrité des protéines recombinantes séparées en gel PAGE en conditions non dénaturantes L

Les bandes de gel déposées au sommet des gels SDS-PAGE, et traitées en présence de β -mercaptoéthanol, correspondent aux pistes NCT (A) et RCT (B) du gel de la figure 31 (A). Pour la seconde dimension, la migration est effectuée sur gel SDS-PAGE 7,5%. Les cadres bleus montrent la migration des protéines recombinantes sous la forme de spots de 50 kDa.

2.1.2. Etudes en résonance plasmonique de surface

Afin d'analyser les propriétés exactes d'interaction des protéines recombinantes, nous avons entrepris des études d'interaction par résonance plasmonique de surface (Biacore 3000). Nous avons, à cet effet, immobilisé les protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT sur un sensorchip CM5, et des concentrations de 0,5 à 4 μ M des protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT ont été présentées aux protéines immobilisées. La figure 33, p.106 montre les résultats provenant d'expériences représentatives de 3 séries d'expériences réalisées séparément et sur des sensorchips CM5 différents. Ne sont représentés sur cette figure que les sensorgrammes montrant l'interaction de chaque protéine sur elle-même. Les constantes de dissociation obtenues pour ces expériences sont indiquées dans la figure. Les constantes de dissociation (K_d), ainsi que les quantités fixées maximales (R_{max}) moyennes calculées pour chacune des interactions, y compris les interactions entre les différentes isoformes, sont présentées dans le tableau 2, p.107. On peut observer des interactions entre toutes les formes recombinantes dérivées de la nucléoline. On remarquera cependant que les interactions s'opèrent avec une affinité et des quantités fixées supérieures lorsque les protéines NCT et R1CT sont immobilisées, en particulier lorsque ces protéines interagissent avec elles-mêmes (K_d autour de 75 nM, R_{max} voisin de 300 RU), ceci en comparaison avec la protéine R3CT (K_d = 189 nM, R_{max} = 126 RU) et surtout la protéine RCT (K_d voisin de 9 μ M ; R_{max} non déterminable mais fixation inférieure à celles des autres protéines pour une concentration donnée en protéine présentée : voir sensorgramme RCT dans la Figure 33, p.106).

Les résultats indiquent donc que les protéines NCT et R1CT possèdent une capacité à interagir avec elles-mêmes, sensiblement plus importante que R3CT, et surtout RCT qui semble interagir avec lui-même avec une très faible affinité. Cette observation est de nature à expliquer les différences de comportement électrophorétique, voire d'agrégation, des protéines NCT et R1CT par rapport aux protéines R3CT et RCT.

L'ensemble de ces résultats suggère que la nucléoline, lorsqu'elle est N-glycosylée, est capable d'interagir avec elle-même et de s'oligomériser. Il est probable que ce phénomène d'oligomérisation entre en jeu lors de ses différentes fonctions à la surface cellulaire.

Afin d'expliquer les différences de comportement électrophorétique, ainsi que les capacités d'interaction différentes des deux couples NCT/R1CT et R3CT/RCT, nous émettons l'hypothèse que l'occupation des sites de N-glycosylation est susceptible de modifier sensiblement la conformation de la molécule.

Comme le montre la figure 34, p.108, la présence ou non de glycane(s) aurait pour effet de créer des structures tridimensionnelles plus ou moins relâchées de la nucléoline. De plus, cette hypothèse serait en accord avec les résultats obtenus en dichroïsme circulaire et en fluorimétrie (voir Figures 28 et 29, p.97). En effet, il est possible que la présence de glycane(s) intervienne, par son/leur caractère hydrophile, dans les forces d'attraction et de répulsion internes à la protéine. Par ailleurs, dans ces phénomènes, l'occupation ou non du site RBD3 par un glycane serait primordiale, puisqu'en considérant la séquence protéique proche de l'asparagine 492, on retrouve non seulement l'unique cystéine de la nucléoline, mais également un des deux résidus de tryptophane dont la fluorescence est mesurable en fluorimétrie. Cette observation est de nature à expliquer les différences observées en spectroscopie de fluorescence, en l'occurrence les shifts des maxima de fluorescence des couples de protéines NCT/R1CT et R3CT/RCT (Figure 29, p.97).

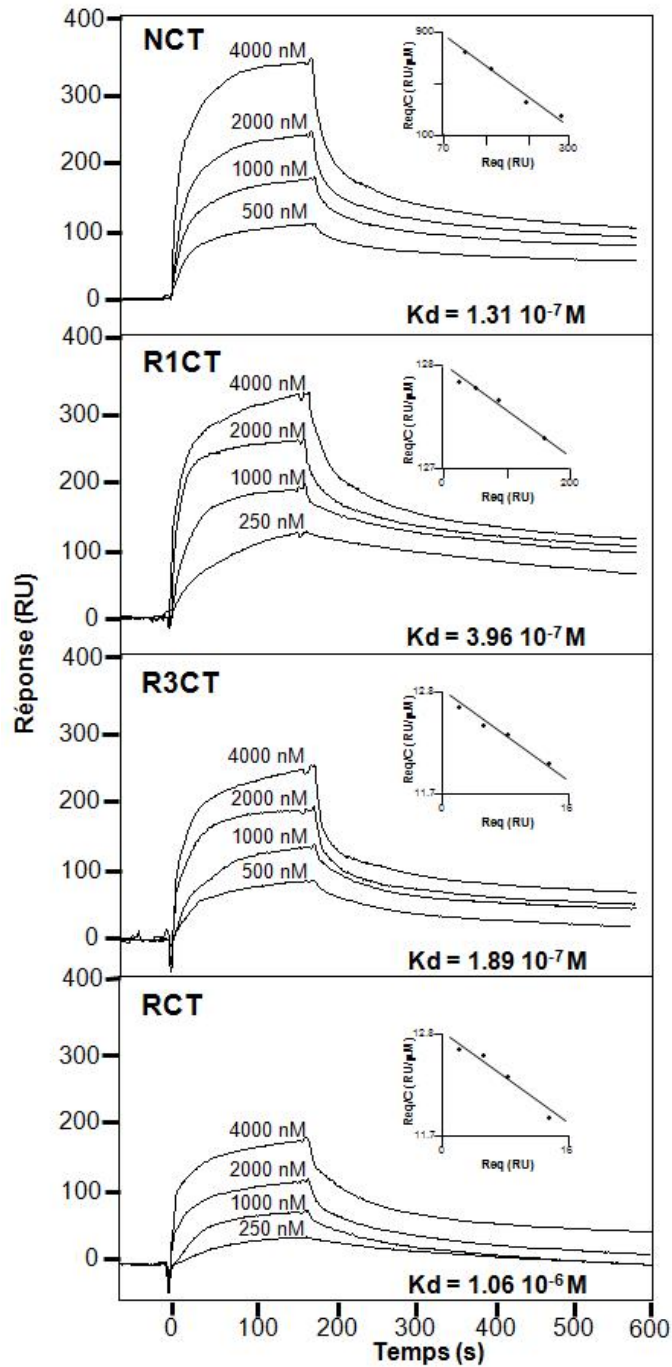


Figure 33 : Etude par résonance plasmonique de surface de la fixation des quatre formes de nucléoline recombinante sur elles-mêmes

Les sensorgrammes présentés sont représentatifs de 3 séries d'expériences utilisant des protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT immobilisées un sensorchip CM5 et sont obtenus par injection de 0,25 à 4 μM de chacune des protéines. Les graphes représentés en encart sont les représentations de Scatchard des données obtenues à l'équilibre. Les Kd estimés par le logiciel BiaEvaluation 3.1 sur le modèle de Langmuir 1 :1 sont indiqués dans la figure.

Kd (nM)	NCT	R1CT	R3CT	RCT
NCT	73,3	396	406,0	652,0
R1CT	202,0	76,5	313,0	1310,0
R3CT	74,0	115	189,0	440,0
RCT	149,0	101	253,0	9190,0

Rmax (RU)	NCT	R1CT	R3CT	RCT
NCT	304	376	287	588
R1CT	365	287	248	619
R3CT	195	154	126	234
RCT	154	112	105	892*

Tableau 2 : Constantes de dissociation (Kd) et quantités maximales fixées (Rmax) calculées lors des interactions des protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT avec elles-mêmes

Les valeurs présentées sont la moyenne des valeurs obtenues sur 3 séries d'expériences réalisées de manière similaire à celle présentée dans la figure 33. Les protéines R1CT, R1CT, R3CT et RCT, qui ont été immobilisées sur le sensorchip CM5, sont indiquées en gras (ligne horizontale) tandis que les mêmes protéines présentées en solution figurent verticalement sur les matrices. La valeur indiquée par des * (RCT) est à considérer comme inexacte en raison de la faible affinité des interactions, rendant son estimation/calcul discutable.

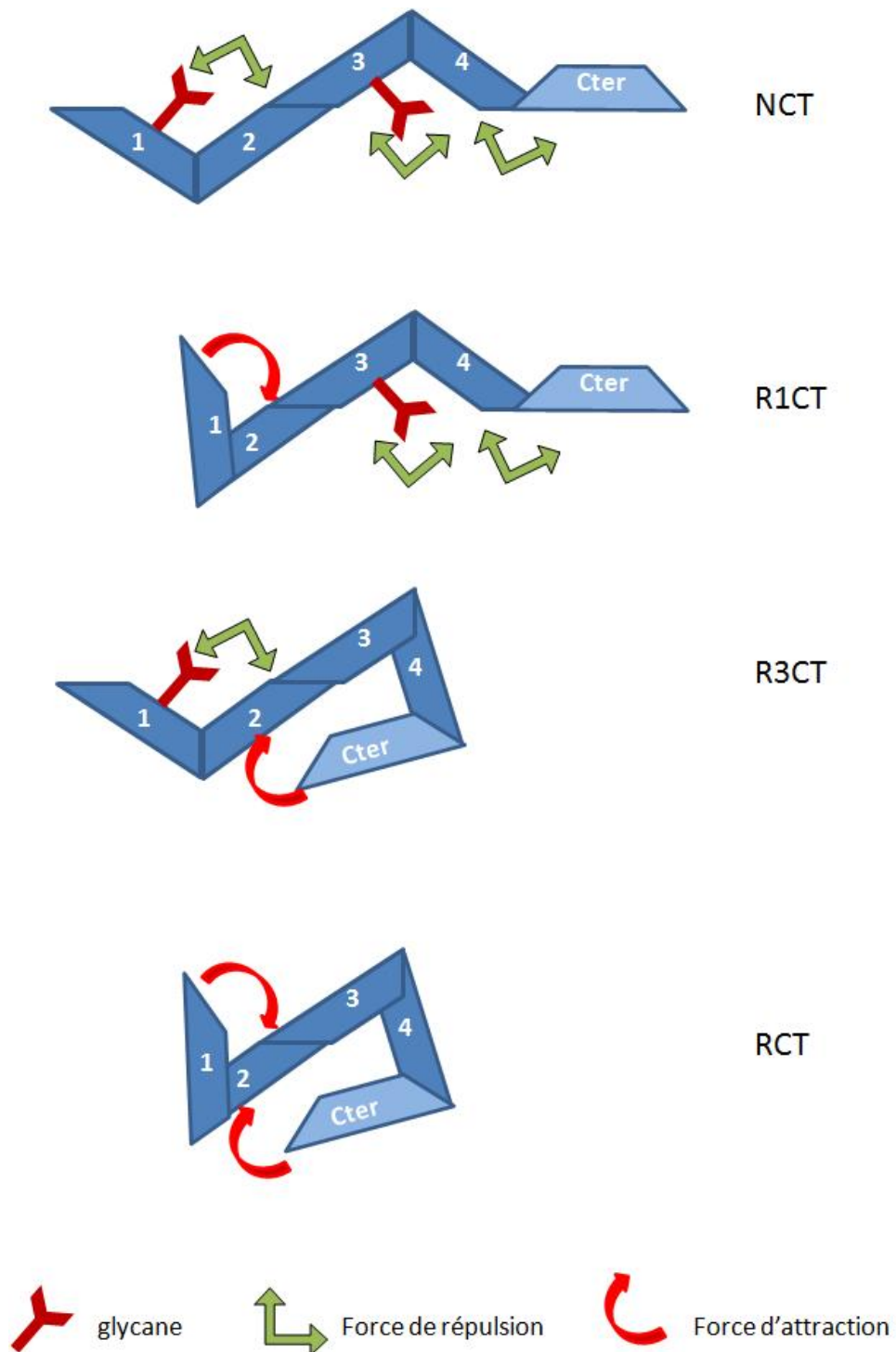


Figure 34 : Représentation schématique et hypothétique de la structure des formes dérivées de la nucléoline NCT, R1CT, R3CT et RCT, en fonction de leur N-glycosylation

Le schéma représente en bleu foncé les 4 domaines RBD1, RBD2, RBD3 et RBD4 (notés 1, 2, 3 et 4, respectivement) et en bleu clair, le domaine C-terminal. Les forces hypothétiques de répulsion et d'attraction des différents domaines, en fonction de la présence ou non de N-glycanes, sont indiquées sur le schéma.

2.2. Interactions des glycoformes recombinantes avec les ligands de la nucléoline

La nucléoline est capable d'interagir avec de nombreux ligands dont la plupart sont nucléaires ou cytosoliques, de nature nucléique (ADN, ARNr) ou protéique (histone H1, protéines ribosomales ...). La nucléoline de surface, quant à elle, interagit avec des ligands spécifiques solubles ou appartenant à la matrice extracellulaire (voir Généralités, paragraphe 6.2, p.28). Pour certains des ligands de la nucléoline, qu'elle soit intracellulaire ou de surface, les domaines d'interaction sont connus. C'est le cas du domaine N-terminal qui interagit avec l'histone H1, des domaines RBD qui interagissent avec des séquences cibles d'ARNr, ou encore le domaine RGG C-terminal qui interagit avec de nombreuses protéines (protéines ribosomales, lactoferrine, midkine...) (voir Généralités, paragraphe 4.4, p.9). Pour certains autres ligands (apo-E ou héparine, par exemple), le domaine d'interaction n'a pas été clairement identifié.

Nos études sur les différentes glycoformes recombinantes de la nucléoline indiquent que la N-glycosylation des domaines RBD1 et RBD3 interfère dans les propriétés d'interaction des protéines entre elles. Ces résultats suggèrent que les interactions de la nucléoline avec ses ligands pourraient également être modulées par la présence des N-glycanes. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la fixation de ligands susceptibles d'interagir avec les domaines présents dans les glycoformes recombinantes de la nucléoline (le domaine acide N-terminal de la nucléoline est absent des protéines recombinantes). La séquence d'ARN NRE et la lactoferrine ont été choisis comme ligands spécifiques, respectivement, des domaines RBD et du domaine C-terminal (Legrand *et al.*, 2004; Serin *et al.*, 1997). La laminine, l'apoE (protéine cationique) et les héparanes sulfates (polysaccharide anionique) qui sont des ligands majeurs de la nucléoline de surface, mais dont les sites de fixation sur la nucléoline ne sont pas connus, ont été choisis (Kleinman *et al.*, 1991; Semenkovich *et al.*, 1990). Selon la nature des ligands considérés, les interactions ont été étudiées par résonance plasmonique de surface, interaction en phase solide suivie d'une immunoprécipitation et/ou électrophorèse PAGE ou en agarose.

2.2.1. Etude des interactions avec la lactoferrine

De la même manière que pour l'étude des interactions de la nucléoline sur elle-même, les protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT ont été immobilisées sur un sensorchip CM5 et des concentrations variables de lactoferrine humaine (50 à 800 nM) ont été injectées. Les résultats obtenus, présentés dans la figure 35, p.111 et le tableau 3, p.110, montrent des paramètres de fixation de la lactoferrine sur NCT, R1CT, R3CT et RCT comparables, que les protéines soient glycosylées ou non, et ce avec une affinité de l'ordre de quelques dizaines de nM.

Kd (nM)	Lf
NCT	20,6 ± 11,5
R1CT	80,7 ± 16,8
R3CT	20,5 ± 3,5
RCT	52,8 ± 35,6

Tableau 3 : Constantes de dissociation moyennes, mesurées par résonance plasmonique de surface lors des interactions entre la lactoferrine humaine et les protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT immobilisées sur un chip CM5

Les constantes ont été estimées par le logiciel BiaEvaluation 3.1 sur le modèle de Langmuir 1:1. La moyenne a été calculée sur un ensemble de 2-3 expériences utilisant un chip CM5 différent et 3-4 concentrations de lactoferrine différentes par expérience.

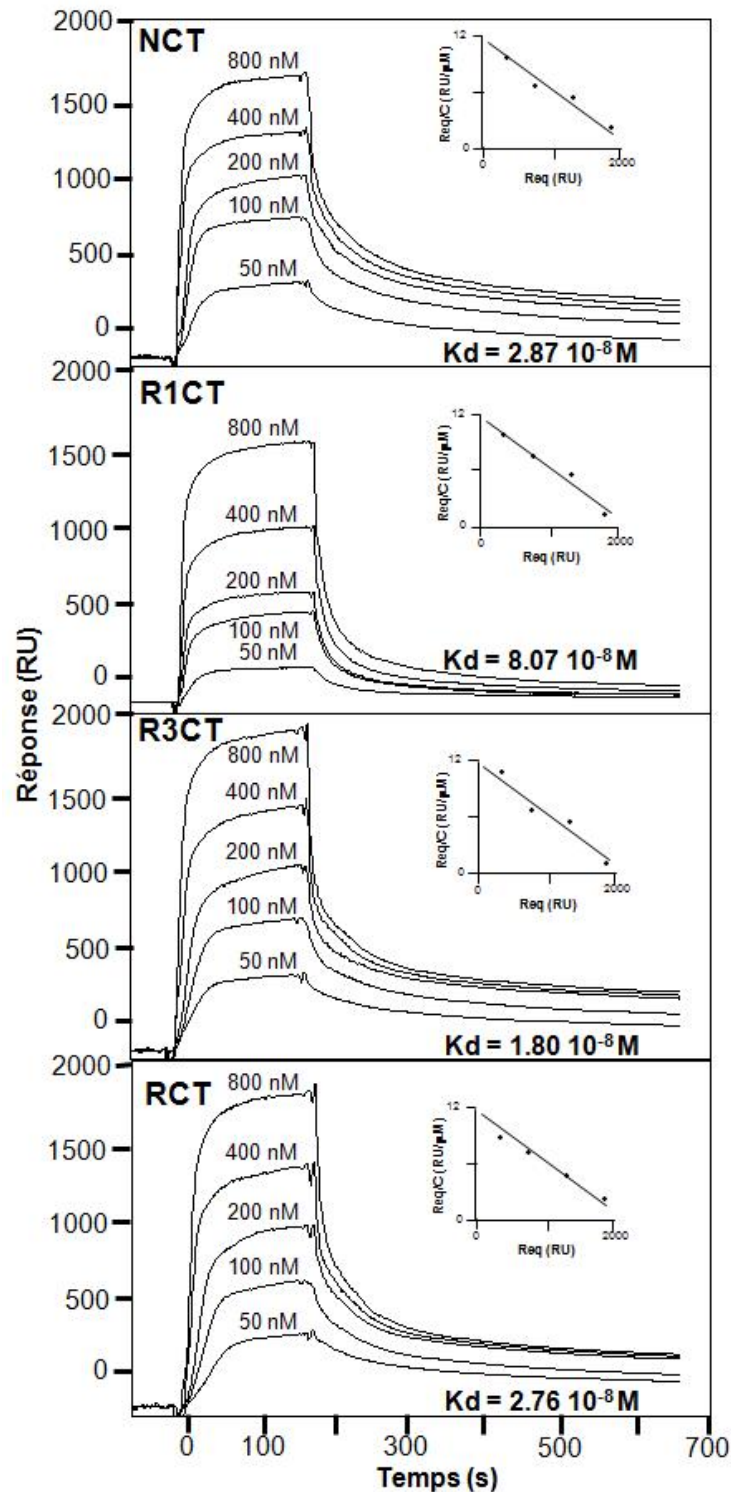


Figure 35 : Etude par résonance plasmonique de surface de la fixation de la lactoferrine sur les quatre formes recombinantes de la nucléoline

Les sensorgrammes présentés sont représentatifs de ceux obtenus à partir de 2-3 expériences utilisant un chip CM5 différent et 3-4 concentrations de lactoferrine différentes par expérience. Les graphes représentés en encart sont les représentations de Scatchard des données obtenues à l'équilibre. Les constantes ont été estimées par le logiciel BiaEvaluation 3.1 sur le modèle de Langmuir 1 :1.

2.2.2. Etude des interactions avec la laminine et l'ApoE

L'étude des interactions des protéines recombinantes avec la laminine et l'apoE a été réalisée par résonance plasmonique de surface et par technique d'immunoprécipitation des complexes formés.

Les résultats préliminaires obtenus (non présentés ici) montrent une absence d'interaction de l'apoE avec les quatre formes de protéines, aussi bien par résonance plasmonique de surface qu'en immunoprécipitation. Les protéines recombinantes que nous avons produites ne possédant pas le domaine N-terminal acide de la nucléoline native, nous émettons l'hypothèse que ce domaine serait impliqué dans l'interaction avec l'apoE, expliquant ainsi l'absence de fixation.

Concernant les études d'interaction des protéines recombinantes avec la laminine 1, aussi bien les expériences de résonance plasmonique de surface que celles d'immunoprécipitation ont montré une interaction avec les quatre protéines, ce qui démontre une interaction de la laminine 1 avec les deux tiers C-terminaux de la nucléoline. Nous avons cependant choisi de ne pas présenter ces résultats en raison d'un manque de reproductibilité, tant quantitatif que qualitatif, lors de nos expériences de mise en évidence des complexes formés. Nous attribuons ce problème à la très grande différence de masse moléculaire entre nos protéines recombinantes (50 kDa) et la laminine 1 (environ 800 kDa).

2.2.3. Etude des interactions avec les héparanes sulfates

La capacité de la nucléoline à interagir avec les glycosaminoglycanes sulfatés est avérée par l'utilisation, pour sa purification, de la chromatographie d'affinité sur une colonne d'héparine (Carpentier *et al.*, 2005 ; Bouvet *et al.*, 1998). Sa présentation à la surface des cellules est indépendante de la présence des protéoglycanes à la surface des cellules (Nisole *et al.*, 1999), mais des travaux récents ont montré qu'elle est capable d'interagir avec l'acharane sulfate, un des protéoglycanes de la matrice extra-cellulaire (Joo *et al.*, 2005).

Nous avons voulu étudier l'influence de la N-glycosylation sur la capacité de la nucléoline à interagir avec l'héparine. Comme le montre la figure 36, p.114, des études

réalisées lors de nos essais de purification des protéines recombinantes NCT et RCT sur colonne d'héparine Hi-Trap ont révélé une élution de la forme NCT glycosylée plus légèrement rapide que celle de la forme RCT non glycosylée (gradient de 0 à 1 M de NaCl).

Ces résultats préliminaires suggèrent une incidence de la N-glycosylation sur les propriétés de fixation de la nucléoline sur l'héparine.

Afin de confirmer l'effet de la N-glycosylation de la nucléoline sur sa capacité à interagir avec l'héparine, nous avons entrepris des expériences de retard sur gel sur les quatre glycoformes NCT, R1CT, R3CT et RCT. Pour cela, les protéines ont été mises en présence d'une quantité déterminée d'héparine, et les complexes formés ont été séparés sur un gel d'acrylamide en conditions non dénaturantes puis révélés au Bleu Azur, un colorant spécifique des polysaccharides. Comme on peut le voir sur la figure 37, p.114, on peut observer un retard de migration de l'héparine en présence des quatre protéines. Il existe ainsi, par rapport au contrôle sans protéine, des bandes de faible migration situées immédiatement sous les dépôts, ainsi sous la forme d'un « smear » (cadre bleu). Ce retard est plus prononcé pour les glycoformes R3CT et RCT que pour NCT et R1CT (bandes moins intenses). La quantité d'héparine libre visible dans chacune des pistes, nettement plus importante sur les pistes NCT et R1CT que sur les pistes R3CT et RCT, confirme ce résultat.

Ces résultats suggèrent que la nucléoline, glycosylée ou non, est capable d'interagir avec des glycosaminoglycanes sulfatés des protéoglycanes, et que cette interaction est modulée par la présence de N-glycanes. Ils démontrent ainsi que les sites de fixation de l'héparine sont présents dans les domaines RBD ou dans le domaine C-terminal de la nucléoline. Si l'on considère l'absence d'influence de la N-glycosylation sur la fixation de la lactoferrine qui, elle, se fixe sur le domaine C-terminal des protéines recombinantes, nous émettons l'hypothèse que l'héparine se fixe préférentiellement dans la région des domaines RBD.

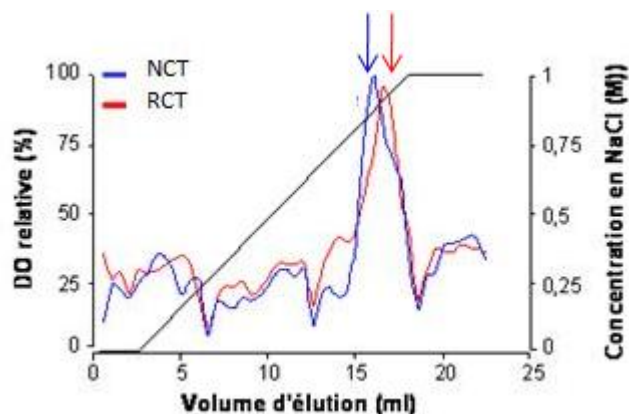


Figure 36 : Profils d'éluion de NCT et RCT chromatographiés en FPLC sur colonne d'héparine Hi-trap™

Comme décrit dans « Matériel et Méthodes », 20 µg de chacune des protéines sont injectés sur une colonne d'héparine Hi-Trap et élués par un gradient de NaCl de 0 à 1 M pendant 30 min à un débit de 0,5 ml/min. La densité optique relative, mesurée à 280 nm, est exprimée en pourcentage, le 100% correspondant au maximum d'absorbance du pic d'éluion de la protéine NCT. La flèche indique la position des pics d'éluion des protéines NCT et RCT.

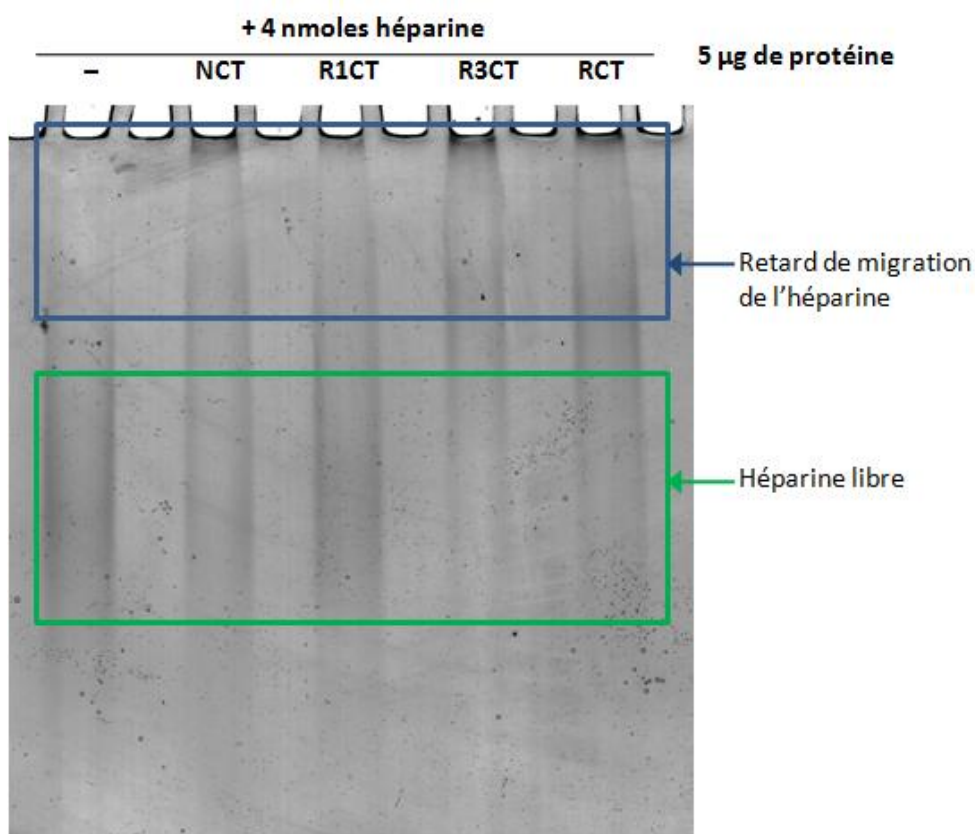


Figure 37 : Retard sur gel PAGE en conditions non dénaturantes de l'héparine en présence des protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT

Le gel PAGE à 10% en conditions non dénaturantes (voir « Matériel et Méthodes ») a été coloré au Bleu Azur afin de mettre en évidence l'héparine complexée ou libre.

2.2.4. Etude des interactions avec l'ARN

Les deux sites N-glycosylés étant localisés dans les domaines d'interactions avec les ARN (RBD1 et RBD3), nous avons voulu évaluer l'impact de la N-glycosylation sur leur reconnaissance d'une séquence d'ARN NRE (Serin *et al.*, 1997) spécifique de la nucléoline. Une séquence non spécifique (NS) a été utilisée comme contrôle (Bouvet *et al.*, 2001).

Des études préliminaires, réalisées lors de mon Master 2 Recherche, ont visé à vérifier la fonctionnalité des protéines NCT et RCT que nous venions de produire. Ces études ont été réalisées par résonance plasmonique de surface après immobilisation des protéines NCT ou RCT sur un sensorchip CM5 et injection de concentrations variables (1 à 20 μM) d'ARN NRE ou NS. L'immobilisation des protéines sur le sensorchip, plutôt que celle des acides nucléiques, n'est pas conventionnelle. Ce mode nous a été dicté par la quantité réduite de protéines recombinantes dont nous disposions alors.

Comme le montre la figure 38, p.117, une interaction avec la séquence NRE a été observée pour les deux protéines. La spécificité de cette interaction est confirmée par une interaction très faible, à concentration égale (5 μM), des protéines avec l'oligonucléotide NS. Les constantes de dissociation à l'équilibre (K_d) calculées pour les deux protéines sont très comparables, mais une affinité sensiblement supérieure a pu être enregistrée pour la forme glycosylée ($K_d = 4,9 \cdot 10^{-7} \text{ M}$), en comparaison de la forme non glycosylée ($K_d = 12,1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$).

Les faibles signaux obtenus lors de ces expériences, en raison de la faible masse moléculaire des ARN, nous ont conduits à envisager des expériences de résonance plasmonique de surface utilisant des sondes d'ARN marquées à la biotine, immobilisées sur un sensorchip SA (sensorchip commercial Biacore sur lequel est fixée covalamment de la streptavidine). Malheureusement, nous n'avons pas réussi à obtenir des résultats interprétables de ces expériences, en partie en raison d'une interaction non-spécifique substantielle de la protéine sur la surface du sensorchip SA.

Nous avons entrepris de mettre en évidence la fixation de l'ARN NRE sur les protéines recombinantes NCT, R1CT, R3CT et RCT, par une technique de retard sur gel ou EMSA (ElectroMobility Shift Assay), adaptée de la méthode de Rodgers *et al.* (Rodgers *et al.*, 2000). Son principe repose sur le fait qu'un complexe ADN-protéine ou ARN-protéine migrera moins vite dans un gel non-dénaturant qu'un ADN ou un ARN nu. Dans nos expériences, nous avons utilisé cette technique, non pas pour visualiser les complexes ARN-protéines, mais pour détecter l'ARN libre, non complexé à la protéine, et en déduire ainsi la formation de complexes en solution. Nous avons choisi ce mode de visualisation en raison des propriétés de migration très différentes des formes NCT, R1CT, R3CT et RCT en conditions non-dénaturantes (Figure 31, p.101). Les formes NCT et R1CT, en particulier, possèdent des migrations très hétérogènes et diffuses sur gel PAGE non dénaturant, migrations qui rendent très critique l'appréciation d'un retard éventuel de migration du complexe ARN/protéine. Dans nos expériences, nous avons utilisé les ARN NRE et NS, biotinylés ou non, qui après incubation avec les protéines recombinantes ont été séparés sur gel d'agarose et électrotransférés sur membrane de nylon. Les ARN biotinylés, reconnus par de l'avidine couplée à la peroxydase, ont ensuite été détectés par chemiluminescence. La figure 39, p.118 présente les résultats obtenus pour les quatre protéines.

Sur la figure 39, p.118, on peut observer, que toutes les protéines, qu'elle que soit leur état de N-glycosylation, fixent l'ARN NRE. En effet, l'ARN NRE libre n'est pas détecté dans les pistes où les protéines sont incubées avec l'ARN NRE dans un rapport 4 :1 (116 pmoles de protéine et 30,5 pmoles d'ARN NRE) ou même, à l'exception d'une trace détectée dans la piste 6 du NCT, dans un rapport 2 :1 (58 pmoles de protéine et 30,5 pmoles d'ARN NRE). Dans les rapports protéine/ARN inférieurs, l'ARN NRE libre devient clairement visible, mais dans des proportions qui diffèrent d'une protéine à l'autre. Par exemple, si l'on considère les pistes 3, 4 et 5 (5,8 ; 14,5 et 29 pmoles de protéine), on distingue pour NCT et R3CT une présence d'ARN libre supérieure à R1CT et RCT. Ce résultat est en faveur d'une complexion plus stable de l'ARN NRE avec R1CT et RCT, dont le site du domaine RBD1 n'est pas N-glycosylé, qu'avec NCT et R3CT dont le domaine RBD1 est N-glycosylé.

La spécificité de l'interaction, et sa réversibilité, est confirmée par le déplacement ou non de l'ARN NRE complexé à la protéine par, respectivement, les ARN NRE et NS non marqués. Ces résultats, quoique ne permettant pas d'estimer l'affinité des interactions, confirment que la présence d'un N-glycane dans le domaine d'interaction avec l'ARN NRE (RBD1) modifie la capacité de ce domaine à interagir avec l'ARN. Par ailleurs, ils suggèrent que les glycoformes recombinantes NCT, R1CT, R3CT et RCT, qui diffèrent de la nucléoline native par l'absence du domaine N-terminal, sont structurées et fonctionnelles pour la fixation des ARN.

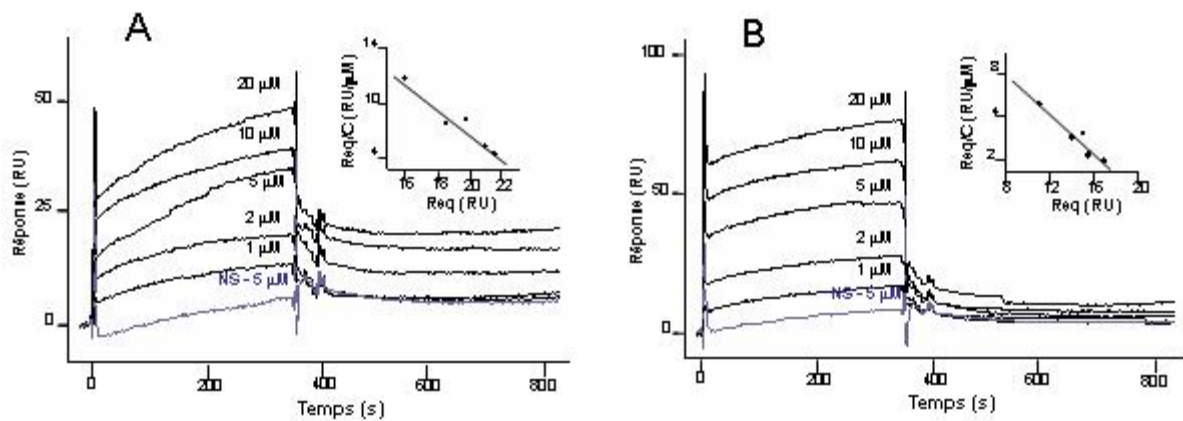


Figure 38 : Etude par résonance plasmonique de surface de la fixation des ARN NRE et NS sur NCT (A) et RCT (B)

Les expériences ont été réalisées comme décrit dans « Matériel et Méthodes ». Les sensorgrammes présentés sont représentatifs de ceux obtenus pour 2 à 3 injections des ARN sur le sensorchip CM5 et sont obtenus par injection de 1 à 5 μM des ARN NRE. Les courbes bleues (NS - 5 μM) correspondent à la fixation de 5 μM de l'oligonucléotide non spécifique. Les graphes représentés en encart sont les représentations de Scatchard des données obtenues à l'équilibre. Les constantes estimées par le logiciel BiaEvaluation 3.1 sur le modèle de Langmuir 1:1 sont : **A.** $K_d=4,9 \cdot 10^{-7}$ M ; $R_{max}=23$; $k_{on}= 769 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{off}= 3,8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ **B.** $K_d=12,1 \cdot 10^{-7}$ M ; $R_{max}=18$; $k_{on}= 1230 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{off}= 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

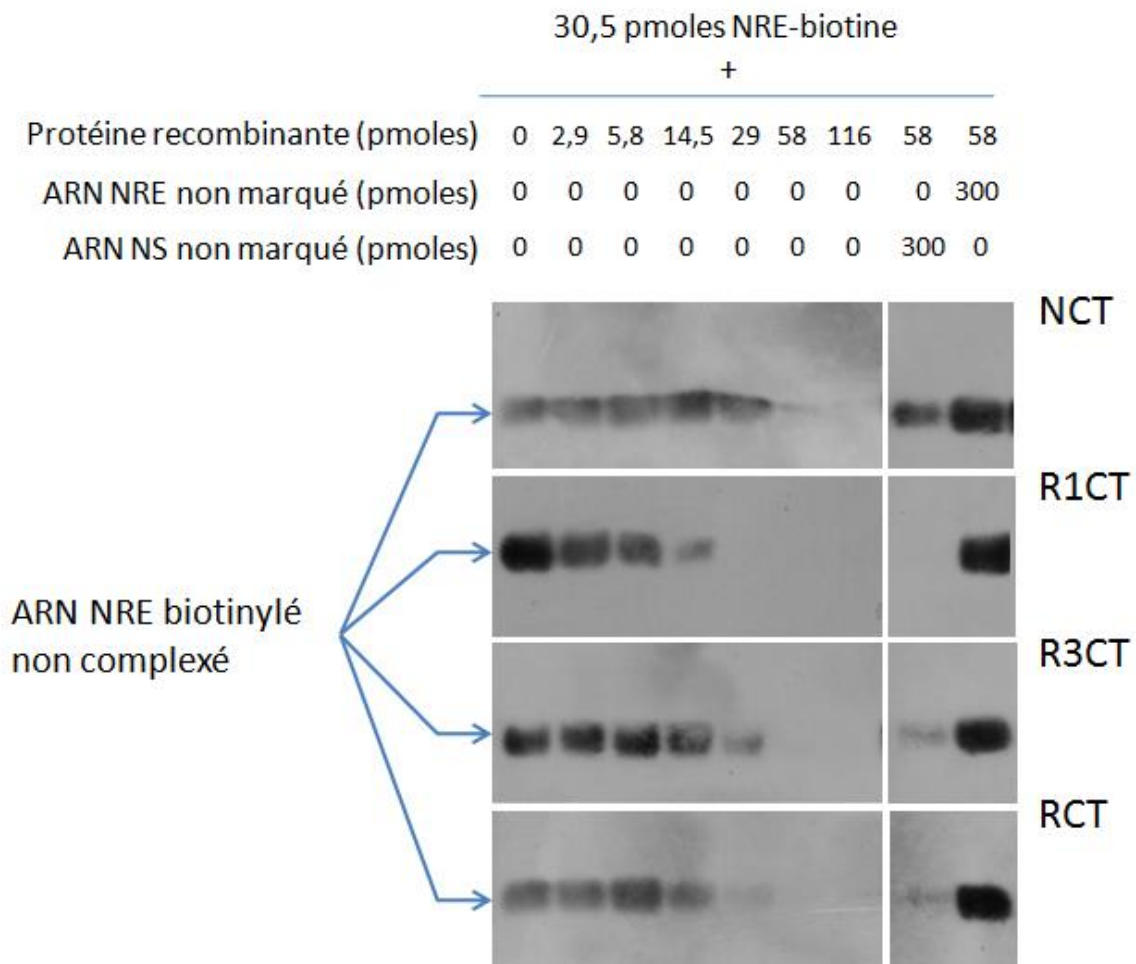


Figure 39 : Mise en évidence, par détection différentielle de l'ARN libre, non retardé sur gel d'agarose, des complexes formés entre l'ARN NRE et les glycoformes NCT, R1CT, R3CT et RCT

L'ARN NRE biotinylé non complexé aux protéines recombinantes, incubées aux quantités indiquées sur la figure, a été visualisé après migration sur gel d'agarose à 1,5%, électrotransfert sur membrane de nylon, reconnaissance par l'avidine-peroxydase et chemiluminescence (voir « Matériel et Méthodes »). Des contrôles de spécificité ont été réalisés en présence de 10 excès molaires (300 pmoles) d'ARN non marqués NS et NRE (les deux pistes de droite).

3. CONCLUSION ET DISCUSSION

Nos travaux ont démontré que la glycosylation est une caractéristique structurale importante de la nucléoline de surface, qui la différencie de la nucléoline nucléaire. Les rôles connus et supposés de la nucléoline de surface sont, en raison de sa localisation cellulaire, nécessairement très différents de ceux de la nucléoline nucléaire. En effet, la nucléoline de surface possède des ligands qui lui sont spécifiques, en relation avec son rôle présumé de récepteur sur la membrane cellulaire. Dans le chapitre 1, nous montrons que la nucléoline de surface interviendrait dans la transduction de signaux intracellulaires, un rôle inattendu pour une protéine de surface non membranaire. Pour l'explication de ce rôle, nous émettons l'hypothèse que, suite à la fixation d'un ligand, la nucléoline subirait une réorganisation à la surface des cellules lui permettant d'interagir avec d'autres récepteurs directement impliqués dans la transmission du signal.

Au cours des travaux réalisés dans ce chapitre, nous avons tenté de mettre en évidence une relation entre une spécificité structurale de la nucléoline de surface, la N-glycosylation, et son rôle spécifique de récepteur sur les cellules. Nous nous sommes plus précisément intéressés au rôle que pouvait jouer la N-glycosylation de la nucléoline dans ses interactions intermoléculaires, et avec certains de ses ligands.

Dans cette étude, nous avons tout d'abord conçu et produit des outils nous permettant d'étudier de façon précise l'impact de chacun des deux N-glycanes dans les interactions de la nucléoline. Afin de produire des protéines recombinantes N-glycosylées sécrétées, et ayant emprunté les voies « classiques » de synthèse des N-glycanes dans la cellule, nous avons fusionné un peptide signal à l'extrémité N-terminale de ces protéines. Des essais d'expression de la nucléoline « pleine taille » dans *Pichia pastoris* et dans les cellules d'insecte ne nous ont malheureusement pas permis de produire, en quantités suffisantes, une protéine intacte. La délétion du domaine N-terminal de la molécule, en revanche, a permis cette expression. Nous avons ainsi établi, en vue d'études différentielles, des constructions permettant l'expression de nucléoline privée de son domaine N-terminal, N-glycosylée sur ses deux sites, partiellement N-glycosylée ou non N-glycosylée. La production de protéines recombinantes en cellules d'insecte nous a permis d'obtenir des quantités propres à l'étude biochimique des caractéristiques de la

nucléoline et de ses interactions. En outre, le système baculovirus/cellules d'insecte a pour avantage de produire des protéines conformées possédant des N-glycanes de type paucimannosidiques, proches des glycanes retrouvés chez l'Homme, et avec un encombrement stérique du même ordre. La présence de telles structures sur les protéines et l'occupation des sites de N-glycosylation ont pu être vérifiées par spectrométrie de masse. Enfin, des études en SDS-PAGE, en dichroïsme circulaire et en spectrométrie de fluorescence, ont permis de contrôler la conformité structurale des (glyco) protéines exprimées. La fixation spécifique de l'ARN NRE cible de la nucléoline sur les protéines produites est un argument important et supplémentaire qui atteste de leur conformité structurale. Des différences dans le contenu en structures secondaires des isoformes produites ont cependant pu être observées. Nous en reparlerons ci-après.

Les études d'interaction menées dans ce chapitre suggèrent fortement que la nucléoline est capable d'interagir sur elle-même et que sa N-glycosylation modifie cette capacité. En effet, la forme N-glycosylée sur ses deux sites interagit sur elle-même avec une affinité 10 fois plus importante que la forme non glycosylée. Ceci est à mettre en relation avec les résultats que nous avons obtenus en PAGE, en dichroïsme circulaire et en spectrométrie de fluorescence, qui tendent à montrer que la conformation de la nucléoline est légèrement différente en fonction de son état de N-glycosylation. La N-glycosylation semble donc essentielle dans la capacité de la nucléoline à former des oligomères et à s'agréger. Cette propriété semble très importante d'un point de vue physiologique, puisque la nucléoline de surface est exclusivement glycosylée et qu'elle semble associée en complexe supramoléculaire au niveau des lipid rafts. De plus, cette capacité d'interaction pourrait être impliquée dans la fonctionnalité de la nucléoline à la surface cellulaire. En effet, dans les expériences réalisées sur la nucléoline de surface dans l'article du chapitre 1, nous avons démontré que, suite à la fixation d'un ligand sur la nucléoline, un signal calcique est induit dans la cellule, signal servant habituellement de messenger secondaire pour l'activation de voies de signalisation. La nucléoline de surface n'étant pas une protéine transmembranaire, nous avons émis l'hypothèse que la transduction du signal s'effectuerait, soit suite à un changement de conformation de la nucléoline, soit à une réorganisation de la nucléoline à la surface cellulaire. Les résultats des études d'interaction de la nucléoline sur elle-même sont en faveur de la deuxième

hypothèse. Il semble possible que la nucléoline glycosylée soit agrégée à la surface cellulaire, et que la fixation d'un ligand induise un déplacement de l'affinité de la nucléoline pour elle-même, participant ainsi à sa redistribution. Cette redistribution pourrait permettre l'interaction de la nucléoline avec d'autres molécules partenaires membranaires (récepteurs ?) capables d'activer les voies de signalisation.

L'influence que pourrait avoir la N-glycosylation dans les interactions de la nucléoline avec les ligands que nous avons étudiés est moins évidente. Nous montrons, en effet, que la fixation de la lactoferrine sur la nucléoline, et probablement celle de la laminine, ne sont pas modifiées par la présence des N-glycanes sur la nucléoline. Ce constat est en faveur du fait que cette modification post-traductionnelle n'est pas de nature à entraver la fixation des ligands naturels décrits pour la nucléoline de surface. Il est probable que la fixation des ligands sur le domaine N-terminal acide de la nucléoline (cas possible de l'apoE) n'est pas non plus affectée par la N-glycosylation des domaines RBD. Cette hypothèse reste néanmoins à confirmer. On peut cependant imaginer que la O-glycosylation du domaine N-terminal puisse interférer dans la fixation de ces ligands. Une gamme plus large de ligands serait néanmoins à étudier pour étayer cette affirmation.

Des différences dans la capacité d'interaction des isoformes de la nucléoline sont néanmoins à noter pour une cible nucléique spécifique de la nucléoline: l'ARN NRE, ainsi que pour une cible non-spécifique, l'héparine, qui est susceptible de mimer les chaînes de glycosaminoglycanes portés par les protéoglycanes de la surface cellulaire. Dans les deux cas, la fixation des ligands semble « gênée » par la présence des N-glycanes des protéines recombinantes. En ce qui concerne l'ARN NRE, la fixation d'un tel ligand sur la nucléoline à la surface de la cellule est improbable. On pourrait cependant émettre l'hypothèse qu'une modification, par N-glycosylation, de la capacité de la nucléoline à se fixer sur les acides nucléiques, et par là même à jouer son rôle dans le noyau, influencerait son trafic intracellulaire. En ce qui concerne l'héparine, nos résultats supportent l'hypothèse émise ci-dessus, selon laquelle la N-glycosylation de la nucléoline jouerait un rôle dans la distribution et l'organisation de la molécule à la surface des cellules, en diminuant ici sa possibilité d'interaction avec les chaînes sulfatées portées par les protéoglycanes.

Il convient cependant d'être prudent quant aux conclusions tirées de ces résultats car les protéines recombinantes produites en cellules d'insecte portent des N-glycanes de type paucimannosidique. Ces glycanes sont différents de ceux trouvés sur la nucléoline humaine native : la longueur des chaînes glycaniques et leur composition pourraient également jouer un rôle dans la régulation des interactions de la nucléoline, en particulier lorsqu'il s'agit de ligands saccharidiques comme les protéoglycanes. Pour palier à ce défaut, il conviendrait d'utiliser le même système de production baculovirus/cellules d'insecte en remplaçant les cellules Hi-Five classiques par des cellules Hi-Five mimics (Harrison and Jarvis, 2006). La partie du génome de ces cellules contenant les glycosyltransférases a été humanisé de manière à produire des antennes lactosaminiques, comme celles produites sur la nucléoline humaine.

Enfin, il conviendrait d'envisager l'étude de l'influence réelle de la N-glycosylation sur l'assemblage de la nucléoline à la surface cellulaire et des complexes de nucléoline retrouvés au niveau des lipids rafts. Pour réaliser ce genre d'étude, la surexpression de la nucléoline « pleine taille », glycosylée ou non en cellules de mammifère a été envisagée.

C'est dans cette optique qu'ont été réalisées les études d'expression à la surface et de trafic qui vont être présentées dans le chapitre 3.

Chapitre 3

Influence de la N-glycosylation de
la nucléoline sur son trafic
intracellulaire

CHAPITRE 3 : Influence de la N-glycosylation de la nucléoline sur son trafic intracellulaire

1. EXPRESSIONS STABLES ET TRANSITOIRES DES FORMES MUTEES DE LA NUCLEOLINE, N-GLYCOSYLABLE OU NON

Afin d'étudier l'expression de la nucléoline à la surface cellulaire, son trafic intracellulaire, ainsi que l'influence de sa capacité à être N-glycosylée sur ce trafic, nous avons entrepris de surexprimer la nucléoline et ses mutants de N-glycosylation en cellules de mammifère. La localisation des protéines, fusionnées à l'étiquette 3X-Flag, a été étudiée par microscopie de fluorescence et par cytofluorimétrie en flux.

1.1. Constructions plasmidiques

Toutes les constructions sont basées sur l'utilisation du plasmide pcDNA5/FRT/TO (Figure 40, p.124) qui permet la surexpression du gène d'intérêt sous l'action du promoteur CMV. Ce plasmide fait parti d'un système d'insertion ciblée du gène d'intérêt dans le génome de cellules commerciales HEK-Flp (Invitrogen). Ces cellules ont été modifiées afin de posséder un site de recombinaison bien caractérisé dans leur génome, permettant ainsi l'établissement de lignées stables homogènes.

Le plasmide pcDNA5/FRT/TO a été modifié de manière à y insérer, au niveau du site BamH1, la séquence codant pour l'étiquette 3X-Flag à l'extrémité 5' du gène d'intérêt. L'étiquette 3X-Flag a été choisie pour son caractère acide qui ne modifie pas le caractère ionique du domaine N-terminal de la nucléoline et pour sa haute spécificité de reconnaissance par l'anticorps commercial M2 (Invitrogen). La séquence codante de la nucléoline et ses variantes ont été ensuite clonées en phase entre le site Sfi1 (situé à l'extrémité 3' du 3X-Flag) et le site Not1 du site de polyclonage du vecteur.

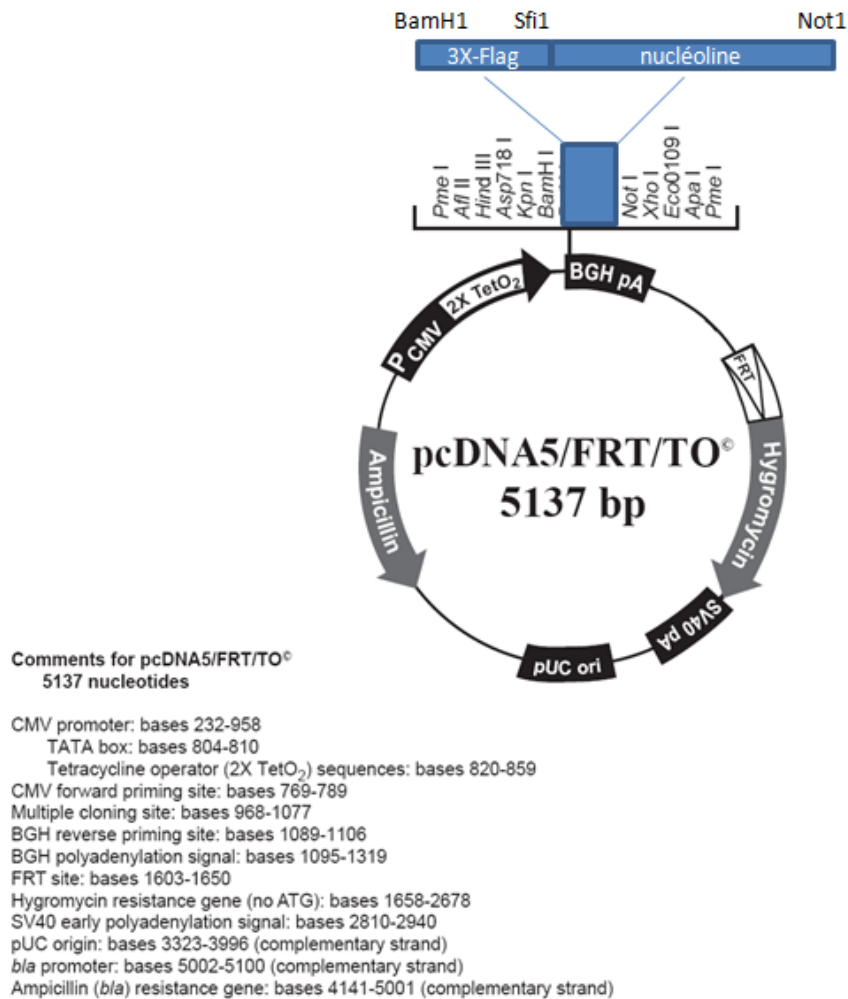


Figure 40 : Schéma des constructions plasmidiques utilisées pour la surexpression de la nucléoline en cellules de mammifère (adapté de la notice Invitrogen)

1.1.1. Nucléoline « pleine taille »

Les constructions établies pour l'expression de la nucléoline « pleine taille » sont schématisées dans la figure 41, p.126. Toutes les constructions ont été établies à partir de l'ADNc de la nucléoline, pour permettre l'expression de la protéine « pleine taille » de 713 acides aminés. Les quatre formes diffèrent par la mutation ou non des asparagines N-glycosylables 317 et 492 (mutation N->A). On distingue donc : la forme non mutée, glycosylable sur ses 2 sites (**NUC**); la forme mutée sur le premier site de N-glycosylation (**RBD1**); la forme mutée sur le deuxième site de N-glycosylation (**RBD3**); et la forme mutée sur les deux sites de glycosylation, et donc non glycosylable (**RBD13**). Les séquences protéiques de ces protéines sont représentées dans la figure 41, p.126.

1.1.2. Nucléoline sans sa séquence NLS

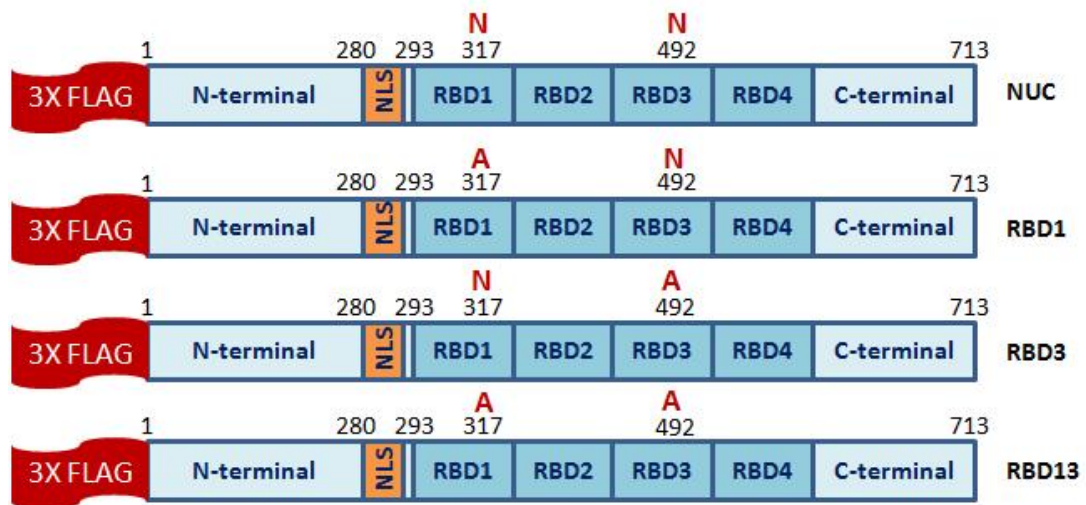
Quatre constructions alternatives, où la séquence NLS bipartite de la nucléoline a été mutée, ont été envisagées. En effet, la nucléoline étant essentiellement nucléaire, ces constructions ont pour avantage d'éviter son transport du cytosol vers le noyau des protéines issues de la surexpression, et donc d'augmenter le signal cytosolique et de surface par accumulation de la protéine. La mutation de la séquence NLS a été effectuée par PCR avec des amorces permettant le remplacement des résidus de lysine (visibles en orange sur la figure 42, p.127) par des résidus de glycine, tout en y insérant un site Sfi1 entre les deux parties de la NLS.

De la même façon que pour les protéines « pleine taille », les asparagines 317 et 492 ont été mutées, ou non, afin d'obtenir : la forme non-mutée, glycosylable sur ses 2 sites (**NUC Δ NLS**) ; la forme mutée sur le premier site de N-glycosylation, (**RBD1 Δ NLS**); la forme mutée sur le deuxième site de N-glycosylation, (**RBD3 Δ NLS**); et la forme mutée sur les deux sites de glycosylation, donc non glycosylable (**RBD13 Δ NLS**). Les séquences protéiques de ces protéines sont représentées dans la figure 42, p.127.

1.1.3. Nucléoline sans sa séquence NLS, ni son domaine N-terminal acide

A partir des constructions mutées sur la NLS, quatre autres constructions ont été produites par digestion enzymatique du plasmide par l'enzyme de restriction Sfi1, permettant d'ôter environ 900 bp codant pour le domaine N-terminal acide de la nucléoline.

Ces constructions, où le domaine N-terminal a été retiré, ont pour avantage de ne plus posséder les sites de O-glycosylation, les observations faites sont donc uniquement dépendantes de la N-glycosylation. De plus, ces constructions sont comparables à celles utilisées pour les études d'interaction, puisque leur séquence commence également au niveau de l'acide aminé 293. Les constructions sont visibles sur la figure 43, p.128.



3X-FLAG-DYKDH DGDYKDH DIDYKDDDDK

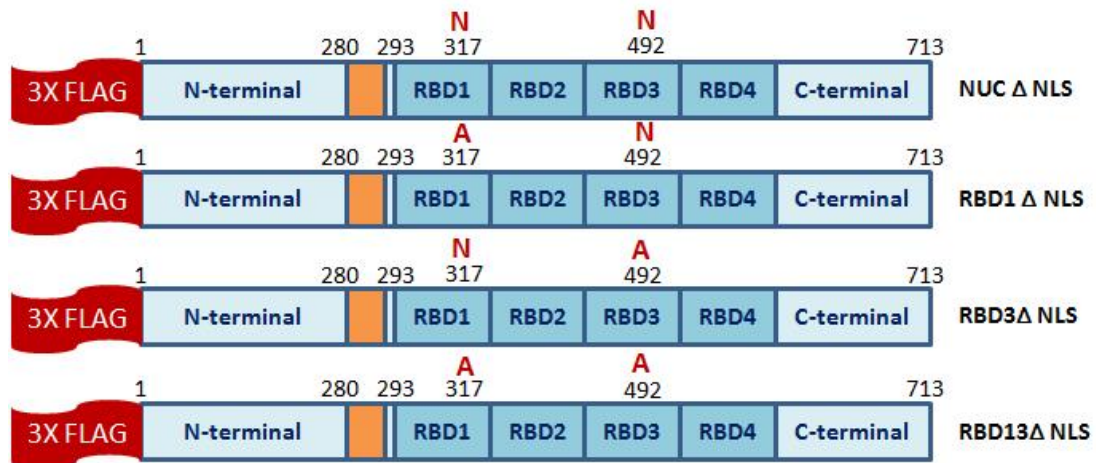
```

1VKLAKAGKNQGDPPKMAPPPKEVEEEDSEDEEMSEDEEDDSSGEEVVIPQK
KGKAAAATSARKVVVSPTKKVAVATPAKKA AVTPGKKAATPAKKT VTPAK
AVTTPGKKGATPGKALVATPGKKGA AIPAKGAKNGKNAKKEDSDEEEDDD
EEDEEDEDDEDEDEDEIEPAAMKAAAAAPASEDEDEDDEDDEDDDDDEE
DDSEEEAMETTPAKGKKA AKVVPVKAKNVAEDEDEEDEDDEDDEDDDED
EDDDDEDDEEEEEEEEEEPVKEAPGKRKKEMAKQKA APEAMSPGSKKQKVE
GTEPTTAFNLFVGNLNFN/AKSAPELKTGISDVFAKNDLAVVDVRIGMTRKFG
YVDFESAEDLEKALELTGLKVFGNEIKLEKPKGKDSKKERDARTLLAKNLPYK
VTQDELKEVFEDAAEIRLVSKDGKSKGIAYIEFKTEADA EKTFEKQGTEIDG
RSISLYYTGEKGQNDYRGGKNSTWSGESKTLVLSN/ALS YGATEETLQEVFE
KATFIKVPQNQNGKSKGYAFIEFASFEDA KEALNSCNKRGIEGRAIRLELQGP
RGSPNARSQPSKTLFVKGLSEDTTEETLKESFDG SVRARIVTDRETGSSKGF
FVDFNSEEDAKAAKEAMEDGEIDGNKVTLDWAKPKGEGGF GRRGGRRGGF
GRRGGRRGGRRGGFGRRGRGGFGRRGGFRGGRRGGGGDHPQGGKKT KFE
713

```

Figure 41 : Schéma des constructions et séquences protéiques utilisées pour la surexpression en cellules de mammifère de la nucléoline pleine taille et de ses mutants de N-glycosylation

Les 4 constructions ont été étiquetées par la séquence 3X-flag en amont du domaine N-terminal de la nucléoline. Les sites de glycosylation sont indiqués en rouge sur les schémas et dans les séquences protéiques. Les résidus d'asparagine 317 et 492 ont été mutés ou non en alanine selon les constructions. La séquence NLS bipartite apparaît en orange dans la séquence protéique.

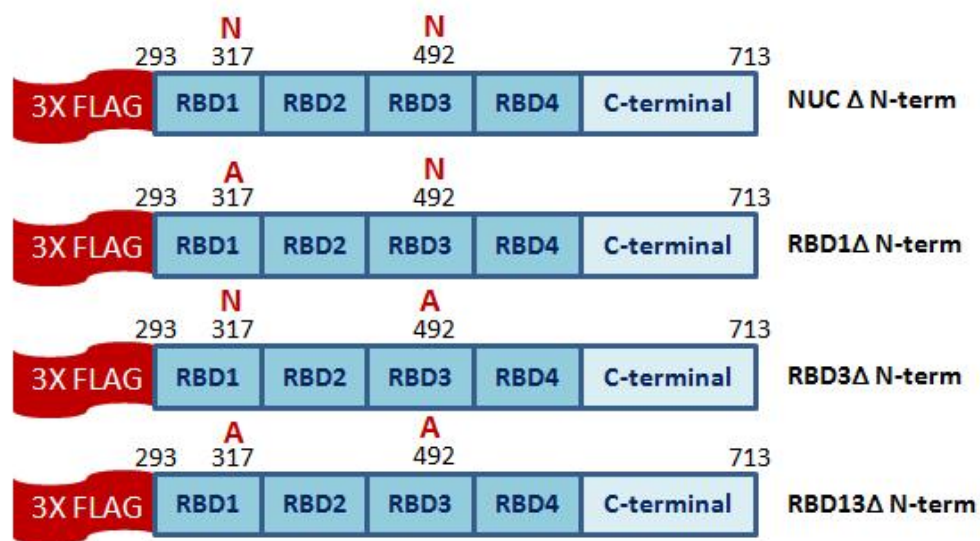


3X-FLAG-DYKDHHDGDKHD DIDYKDDDDK

1VKLAKAGKNQGDPKKMAPPPKEVEEDSEDEEMSEDEEDDSSGEEVVIPQK
 KGKKAAATSAKKVVVSPTKKVAVATPAKKA AVTPGKKAAATPAKKT VTPAK
 AVTTPGKKGATPGKALVATPGKKGAAIPAKGAKNGKNAKKEDSDEEEDDSS
 EDEEDEDDEDEDEIEPAAMKAAAAAPASEDEDEDDEDDEDDEDDDEE
 DDSEEEAMETTPAKGKKA AKVVPVKAKNVAEDEDEEDEDDEDDEDDDED
 EDDDEDDEEEEEEEEEEPVKEAPG **AMEA**EMAKQKA APEAMSPGS **QQQ**
 VEGTEPTTAFNLVGNLNF **N/A**KSAPELKTGISDVFAKNDLAVVDVRIGMTRK
 FGYVDFESAEDLEKALELTGLKVFGNEIKLEKPKGKDSK KERDARTLLAKNLP
 YKVTQDELKEVFEDAAEIRLVSKDGKSKGIAYIEFKTEADA EKT FEEKQGTEI
 DGRSISLYYTGEKGQNQDYRGGKNSTWSGESKTLVLS **N/A**LSYGATEETLQE
 VF EKATFIKVPQNQNGKSKGYAFIEFASFEDA KEALNSCNKRGI EGRAIRLEL
 QGPRGSPNARSQPSKTLFVKGLSEDTTEETLKE SFDG SVRARIVTDRETGSSK
 GFGFVDFNSEEDAKAAKEAMEDGEIDGNKVTLDWAKPKGEGGFGGRGGGR
 GFGFGRGGGRGGGRGGFGGRGRGGFGGRGGFRGGRRGGGGDHKPQ GKKT
 FE713

Figure 42 : Schéma des constructions et séquences protéiques utilisées pour la surexpression en cellules de mammifère de la nucléoline dans laquelle la séquence NLS bipartite a été mutée, et ses mutants de N-glycosylation

Les 4 constructions ont été étiquetées par la séquence du 3X-flag au niveau du domaine N-terminal de la nucléoline. Les sites de glycosylation sont indiqués en rouge sur les schémas et dans les séquences protéiques. Les résidus d'asparagine 317 et 492 sont mutés ou non en alanine selon les constructions. La séquence NLS bipartite mutée apparaît en orange dans la séquence protéique.



3X-FLAG-DYKDHG DYKDH DIDYKDDDDK

293 MSPGS **QQQQ** VEGTEPTTAFNLFVGNLNFN/AKSAPELKTGISDVFAKNDL
 AVVDVRIGMTRKFGYVDFESAEDLEKALELTGLKVFGNEIKLEKPKGKDSKKE
 RDARTLLAKNLPYKVTQDELKEVFEDAAEIRLVSKDGKSKGIAYIEFKTEADAE
 KTFEEKQGTEIDGRSISLYYTGEKGNQDYRGGKNSTWSGESKTLVLSN/ALSY
 GATEETLQEVFEKATFIKVPQNQNGKSKGYAFIEFASFEDAKEALNSCNKRG I
 EGRAIRLELQGPRGSPNARSQPSKTLFVKGLSEDTTEETLKESFDGSVRARIVT
 DRETGSSKGFVDFNSEEDAKAAKEAMEDGEIDGNKVTLDWAKPKGEGGF
 GGRGGGRGGFGGRGGGRGGGGFGGRGGGFRGGGGGGDHK
 PQGKKTKE 713

Figure 43 : Schéma des constructions et séquences protéiques utilisées pour la surexpression en cellules de mammifère de la nucléoline dépourvue de son domaine N-terminal et de sa séquence NLS, ainsi que ses mutants de N-glycosylation

Les 4 constructions ont été étiquetées par la séquence du 3X-flag au niveau du domaine N-terminal de la nucléoline. La séquence codant pour le domaine N-terminal a été déléetée et les séquences commencent donc à l'acide aminé 293 de la nucléoline native. Les sites de N-glycosylation sont indiqués en rouge sur les schémas et dans les séquences protéiques. Les résidus d'asparagine 317 et 492 sont mutés, ou non, en alanine selon les constructions.

1.2. Surexpression des protéines en cellules humaines, par transfections ou co-transfections stables ou transitoires

Les 12 constructions ainsi établies ont été utilisées pour transfecter, de façon stable ou transitoire, des cellules humaines en culture.

D'une part, les constructions ont été utilisées pour co-transfecter stablement les cellules HEK/Flp-In T-Rex (Invitrogen) avec le plasmide pOG44 codant pour la recombinase Flp. Ce système permet l'insertion ciblée du gène d'intérêt, dans le génome de la cellule hôte, entre les sites de recombinaison de la recombinase bactérienne Flp. La sélection clonale est réalisée par l'hygromycine car le site d'insertion possède une partie du gène de résistance à l'hygromycine, et le plasmide pcDNA5/FRT/TO l'autre partie, évitant ainsi les faux positifs. Douze lignées stables de HEK-Flp, portant les noms respectifs des douze constructions, ont ainsi été obtenues.

D'autre part, ces mêmes constructions ont été transfectées seules, ou co-transfectées avec des plasmides exprimant des marqueurs de compartiments cellulaires, dans les cellules Hela, afin de surexprimer transitoirement les protéines.

Les cellules ainsi transfectées ont été utilisées pour des études de trafic et d'expression de surface par cytofluorimétrie en flux et microscopie confocale de fluorescence.

2. ETUDE DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DE LA NUCLEOLINE, EN RELATION AVEC SA CAPACITE A ETRE GLYCOSYLEE

A l'exception de son trafic nucléo cytoplasmique, le trafic intracellulaire de la nucléoline est peu connu, et sa présence à la surface cellulaire reste à expliquer. Dans l'article présenté dans le chapitre 1, il a été démontré par des méthodes de marquage métabolique et l'utilisation de tunicamycine, un inhibiteur de N-glycosylation, que la N-glycosylation est essentielle à la sécrétion de la nucléoline. Cependant, la nucléoline ne possédant pas de peptide signal de sécrétion, son éventuel passage dans la voie classique de sécrétion n'est pas expliqué. De plus, l'influence de chacun des deux sites de N-glycosylation sur l'expression de surface de la nucléoline n'a pas été définie.

2.1. Influence de la N-glycosylation sur l'expression de surface de la nucléoline

Dans un premier temps, afin de confirmer les résultats obtenus par le marquage métabolique et la tunicamycine, et afin de déterminer si l'occupation d'un des deux sites de N-glycosylation, est spécifiquement requise pour l'expression de surface de la nucléoline, des expériences de cytofluorimétrie en flux ont été entreprises. Des cellules Hela ont été co-transfectées transitoirement par les quatre formes de la nucléoline pleine taille, mais sans NLS, et étiquetées par le 3X-flag (NUC Δ NLS, RBD1 Δ NLS, RBD3 Δ NLS, RBD13 Δ NLS), et par le marqueur Rab5-GFP.

Le marqueur Rab5-GFP a été co-transfecté dans les cellules Hela afin de servir de témoin de transfection. Seules les cellules transfectées présentant un déplacement de fluorescence dans le canal FL1 (vert) ont été analysées pour l'expression de nucléoline recombinante à leur surface (canal FL3 (rouge)). Deux méthodes de détection des protéines exprimées à la surface cellulaire ont été utilisées : l'immunodétection de l'étiquette 3X-Flag par l'anticorps M2 marqué au Cy3, et la fixation spécifique de HB-19 biotinylé sur le domaine C-terminal de la nucléoline, détecté ensuite par de l'avidine marquée à la phycoérythrine. Cependant, dans ce deuxième cas, la détection bien que plus sensible met en évidence à la fois la nucléoline endogène naturellement exprimée à la surface des cellules, et la nucléoline recombinante surexprimée par les cellules.

Comme le montre la figure 44-A, p.132, le déplacement de fluorescence des cellules transfectées par Rab5-GFP/RBD13 Δ NLS, comme celui des cellules témoins Rab5-GFP, est inexistant, ce qui démontre l'absence de la protéine recombinante non N-glycosylable étiquetée 3X-Flag à la surface des cellules. Par contre, un déplacement du pic de fluorescence peut être observé pour les cellules transfectées par Rab5-GFP/NUC Δ NLS, Rab5-GFP/RBD1 Δ NLS et Rab5-GFP/RBD3 Δ NLS par rapport aux cellules témoins. Ces déplacements démontrent que la nucléoline recombinante étiquetée 3X-Flag n'est exprimée à la surface des cellules que lorsque sa N-glycosylation est possible, sur chacun de ses sites ou sur les deux sites simultanément.

Ce résultat est confirmé, figure 44-B, p.132, par la fixation de HB-19 biotinylé à la surface des cellules transfectées. Les cellules témoins transfectées par Rab5-GFP seul

montrent un déplacement de fluorescence en relation avec la présence de nucléoline « endogène » à la surface des cellules, un déplacement très significativement inférieur à celui obtenu avec les cellules transfectées par Rab5-GFP/NUC Δ NLS, Rab5-GFP/RBD1 Δ NLS et Rab5-GFP/RBD3 Δ NLS. Ceci démontre clairement une augmentation du pool total de nucléoline de surface dans les cellules surexprimant une nucléoline recombinante dont la N-glycosylation est possible.

De manière intéressante, une quantité de nucléoline de surface sensiblement supérieure à celle des cellules témoins peut être observée pour les cellules transfectées par Rab5-GFP/RBD13 Δ NLS. A la lumière du résultat obtenu par immuno-révélation de la nucléoline étiquetée 3x-Flag (Figure 44-A), cette observation pourrait être interprétée comme une augmentation du pool de nucléoline « endogène » à la surface des cellules surexprimant une nucléoline recombinante non glycosylable. L'hypothèse selon laquelle la surexpression de nucléoline glycosylable ou non affecterait le « turn-over » de la nucléoline de surface peut être avancée.

En conclusion, les résultats confirment que la N-glycosylation est requise pour la sécrétion de la nucléoline, et montrent que la sécrétion n'est pas due à l'occupation d'un site de N-glycosylation en particulier.

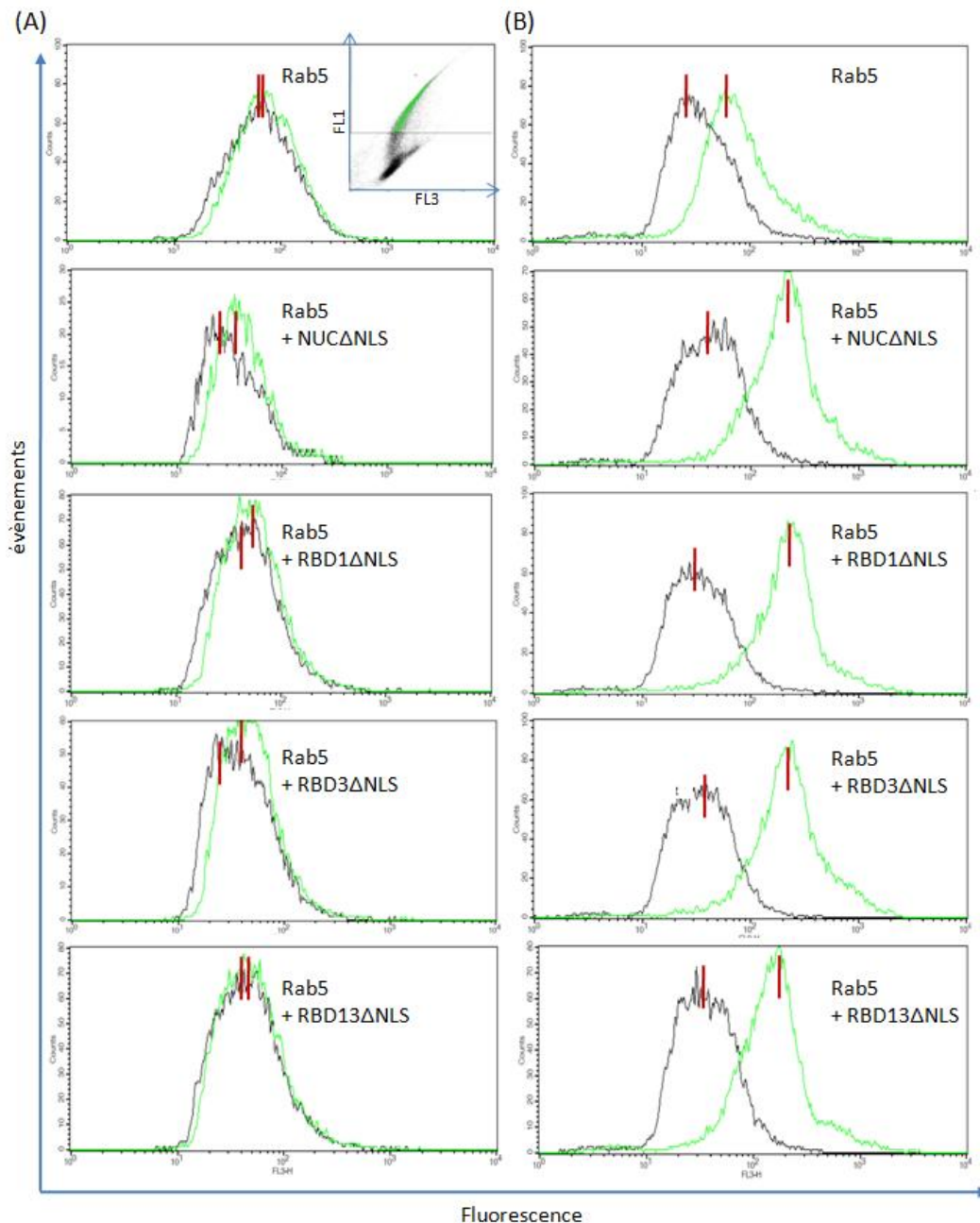


Figure 44 : Etude par cytofluorimétrie en flux de l'expression de surface de la nucléoline « pleine taille », sans NLS, sur les cellules Hela co-transfectées transitoirement par Rab5-GFP, et les constructions plasmidiques NUC Δ NLS, RBD1 Δ NLS, RBD3 Δ NLS ou RBD3 Δ NLS (manipulation représentative de 3 expériences réalisées séparément)

L'incubation des cellules et la mesure de l'expression de surface des protéines recombinantes ont été réalisées comme décrit dans l'appendice technique. Les protéines exprimées à la surface des cellules ont été reconnues par un anticorps marqué au Cy3 et dirigé contre l'étiquette 3X-Flag (A), ou par la fixation de HB19-biotinylé reconnue par de l'avidine marquée à la phycoérythrine (B). Les variations d'intensité de fluorescence sont enregistrées sur le canal FL1 (vert) et FL3 (Krust *et al.*, 2001). Les histogrammes présentent, en noir, les courbes de fluorescence des cellules contrôles et, en vert, les courbes de fluorescence des cellules marquées par Cy3 (A) ou par la phycoérythrine (B). Le dot-plot FL1/FL3, en haut et en encart, montre, en vert, la région des cellules exprimant Rab5-GFP et dont les évènements ont été analysés dans les histogrammes de fluorescence présentés. Dans les histogrammes, les barres rouges verticales indiquent la position du maximum moyen de fluorescence de chacun des pics.

2.2. Etudes en microscopie confocale du trafic de la nucléoline, mutée ou non sur ses sites de N-glycosylation

La N-glycosylation de la nucléoline est requise pour son expression à la surface cellulaire, et pourrait intervenir dans la demi-vie de la protéine. Nous avons entrepris d'étudier l'influence de la capacité de la nucléoline à être N-glycosylée sur son trafic intracellulaire. Dans ce but, nous avons transfecté des cellules Hela avec les différentes constructions plasmidiques décrites dans le chapitre 3 A, permettant l'expression de nucléoline recombinante mutée ou non au niveau d'un ou de deux de ses sites de N-glycosylation, « pleine taille » ou privée de son domaine N-terminal, ou de sa séquence NLS. Des expériences de colocalisation en microscopie confocale de fluorescence ont été réalisées sur des cellules co-transfectées avec des marqueurs des compartiments intracellulaires. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec C. Slomianny (U800 INSERM), L. Héliot (I.R.I CNRS) et F. Foulquier (UMR 8576 du CNRS).

2.2.1. Etude des voies possibles de synthèse et de sécrétion de la nucléoline

La N-glycosylation étant requise pour l'expression de la nucléoline à la surface cellulaire, nous avons voulu vérifier si la nucléoline était sécrétée ou non par la voie classique de sécrétion, c'est-à-dire si elle se retrouvait dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. A cette fin, des expériences de colocalisation en microscopie de fluorescence confocale ont été réalisées. Dans toutes les expériences, la nucléoline a été mise en évidence par la reconnaissance spécifique de l'étiquette 3X-Flag par l'anticorps primaire M2 marqué par le Cy3 (dont la longueur d'onde d'émission est centrée à 570 nm, c'est-à-dire dans le rouge). Les marqueurs des compartiments cellulaires étaient, quant à eux, soit fusionnés à la GFP, soit immunodétectés par un anticorps primaire spécifique du marqueur et un anticorps secondaire lié à l'Alexa 488 (dont la longueur d'onde d'émission est centrée à 488 nm, c'est-à-dire dans le vert). Toutes les expériences ont été effectuées sur des cellules fixées et perméabilisées.

2.2.1.1. Réticulum endoplasmique

Dans un premier temps, nous avons recherché une localisation éventuelle de la nucléoline recombinante, lors de sa synthèse, dans le réticulum endoplasmique des cellules Hela. A cette fin, nous avons transfecté les cellules par les différentes constructions plasmidiques codant pour les différentes isoformes de la nucléoline, et nous avons détecté spécifiquement la nucléoline étiquetée par le 3X-Flag et la protéine BIP 78, qui est une protéine chaperonne localisée dans le réticulum endoplasmique. Comme le montre la Figure 45, p.134, la nucléoline apparaît localisée de manière plus diffuse que la BIP78 et ne semble pas réellement colocaliser avec cette dernière. Ces résultats sont également observés sur toutes les autres isoformes de nucléoline exprimées dans les mêmes conditions (résultats non présentés ici).

La nucléoline ne semble donc pas transiter par le réticulum endoplasmique ou, du moins, ne semble pas s'y accumuler. Pour confirmer ce résultat, il serait nécessaire d'utiliser des drogues permettant l'accumulation des protéines dans le réticulum endoplasmique.

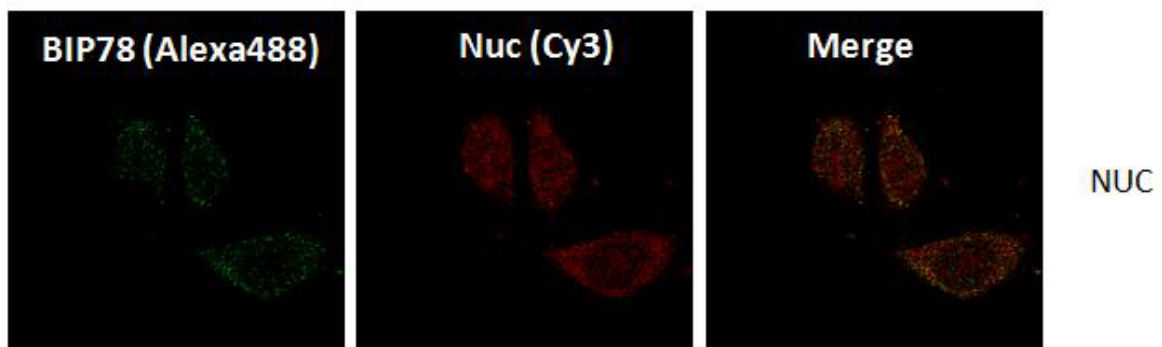


Figure 45 : Etude de colocalisation de la BIP78 réticulaire avec la nucléoline « pleine taille » non mutée, marquée par le 3X-Flag (NUC), et surexprimée en cellules Hela

La BIP 78 réticulaire est immunodétectée grâce à un anticorps anti-BIP78 reconnu par un anticorps secondaire lié à l'Alexa 488 permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. La nucléoline est immunodétectée par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre la séquence 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert.

2.2.1.2. Golgi

La présence de la nucléoline dans le Golgi, le compartiment où s'effectue la N-glycosylation « classique » des protéines, a été recherchée. Les différentes isoformes de

nucléoline recombinantes ont été transfectées dans des cellules Hela GalT. Les cellules Hela GalT sont des cellules Hela qui expriment stablement la β 1-4 galactosyltransférase trans-Golgienne fusionnée à la GFP. Ces cellules possèdent donc un trans-Golgi marqué par une fluorescence verte. Les planches de microscopie présentées dans les Figures 46 A, B, C, D, E et F, p.136 à 141, montrent les résultats ainsi obtenus avec différents niveaux d'agrandissement. On peut observer pour toutes les constructions, sur les photos zoomées ou non, une localisation de la nucléoline dans le cytoplasme, mais également dans les citernes golgiennes (couleur jaune dans les superpositions (Merge)).

La nucléoline transiterait donc par les citernes trans-golgiennes et ceci, indépendamment de la présence de ses sites de N-glycosylation, mais également de l'intégrité de sa séquence NLS et de la présence de son domaine N-terminal acide. Cependant, il reste à déterminer s'il s'agit d'un transport antérograde lors de la synthèse de la nucléoline (nécessitant alors un transport préalable par le réticulum endoplasmique), ou bien s'il s'agit d'un transport rétrograde vers le Golgi, suite à la fusion de vésicules contenant la nucléoline.

TRANS GOLGI

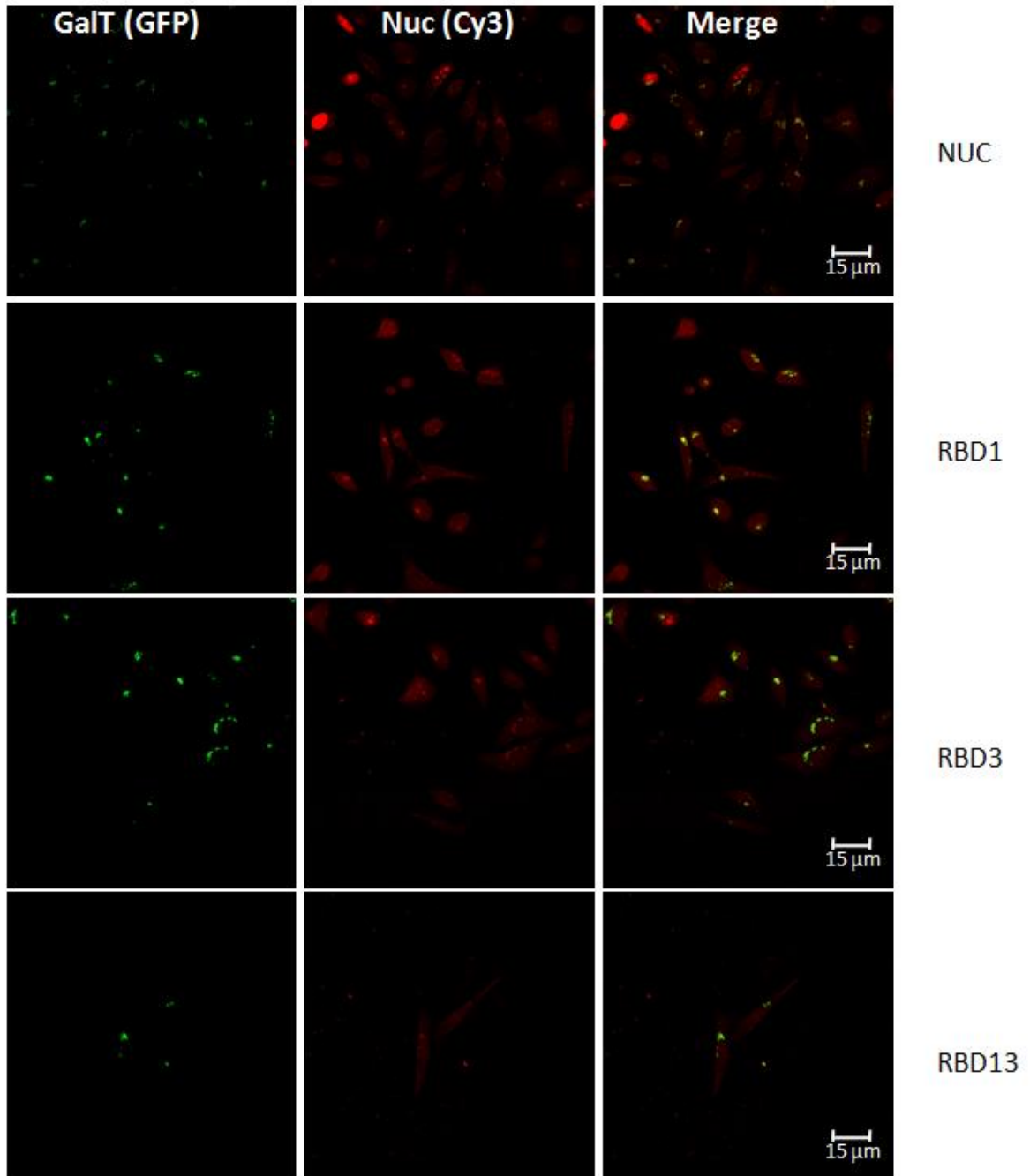


Figure 46 A : Etude de colocalisation de la β 1-4 galactosyltransférase trans-golgienne avec la nucléoline « pleine taille » non mutée (NUC) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1), son deuxième site N-glycosylable (RBD3) et sur ses deux sites simultanément (RBD13), et surexprimée en cellules Hela (cellules Hela Gal-T)

La β 1-4 galactosyltransférase trans-Golgienne fusionnée à la GFP est exprimée stablement dans des cellules Hela (appelée GalT) permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X sans zoom numérique appliqué.

TRANS GOLGI ZOOM3

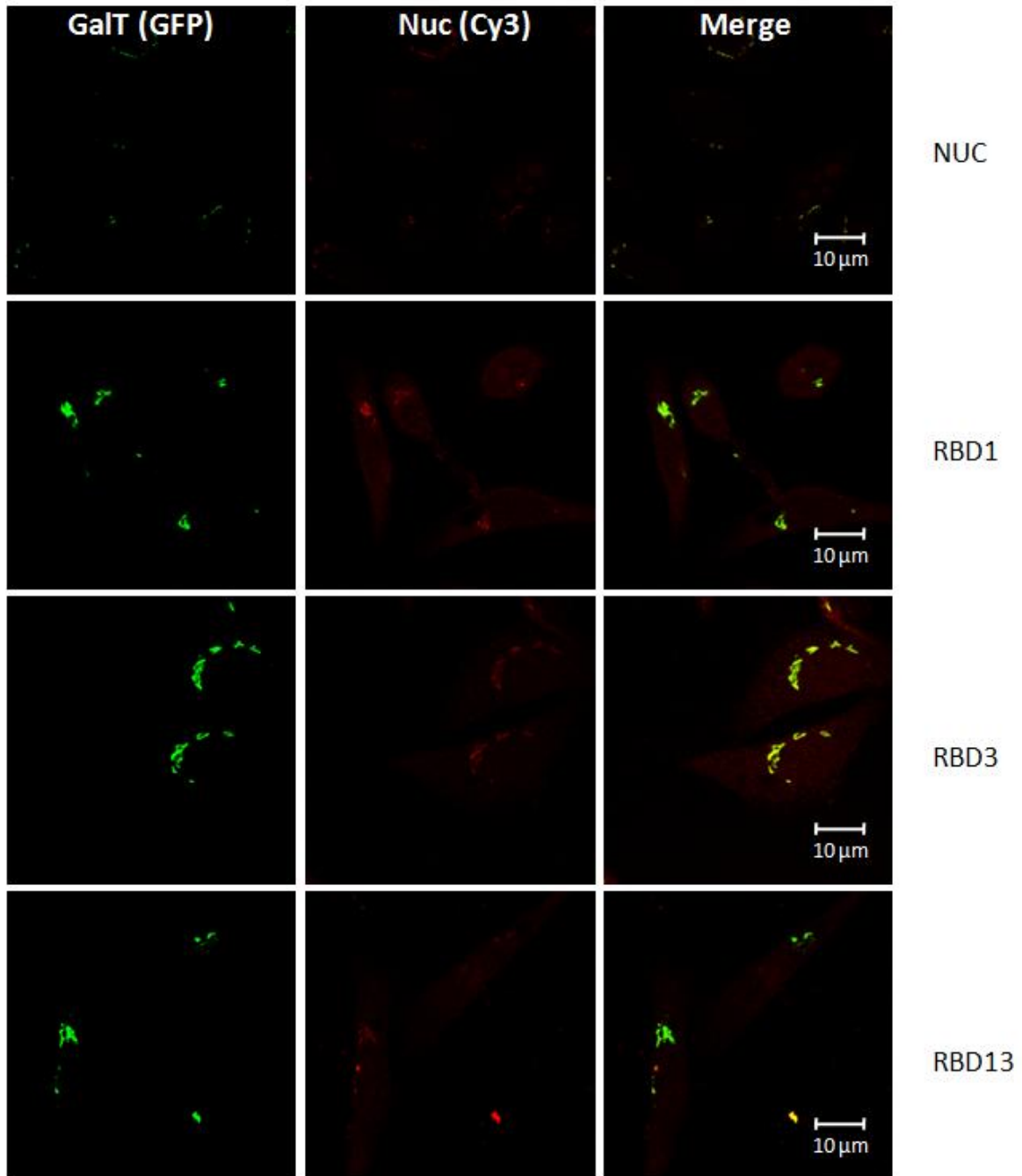


Figure 46 B : Etude de colocalisation de la β 1-4 galactosyltransférase trans-golgienne avec la nucléoline « pleine taille » non mutée (NUC) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1), son deuxième site N-glycosylable (RBD3) et sur ses deux sites simultanément (RBD13), et surexprimée en cellules Hela (cellules Hela Gal-T) – Grossissement numérique 3X

La β 1-4 galactosyltransférase trans-Golgienne fusionnée à la GFP est exprimée stablement dans des cellules Hela (appelée GalT) permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X et zoomées numériquement 3 fois.

TRANS GOLGI

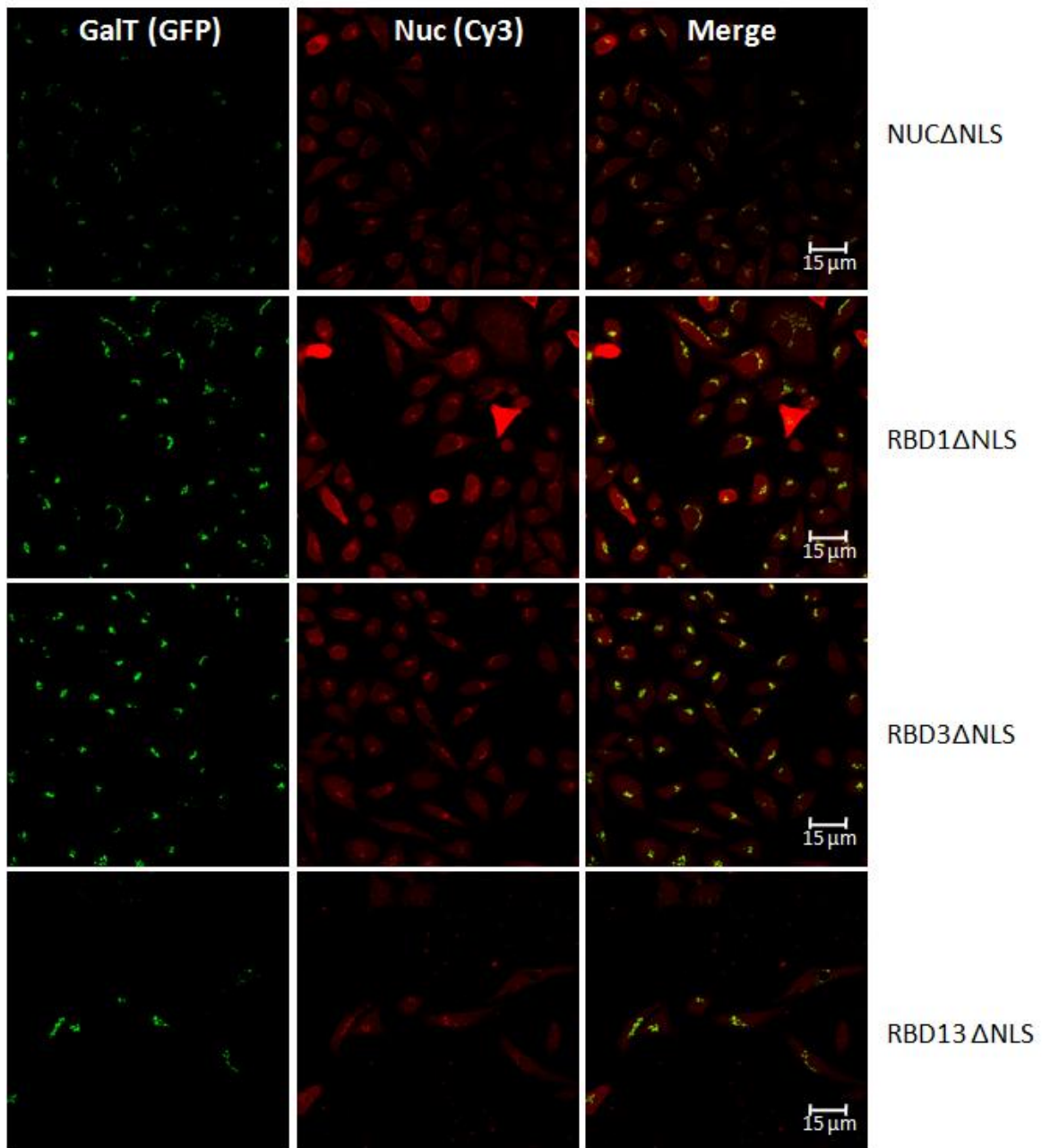


Figure 46 C : Etude de colocalisation de la β 1-4 galactosyltransférase trans-golgienne avec la nucléoline « pleine taille » sans sa séquence NLS, non mutée (NUC Δ NLS) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ NLS), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ NLS) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ NLS), et surexprimée en cellules HeLa (cellules HeLa Gal-T)

La β 1-4 galactosyltransférase trans-Golgienne fusionnée à la GFP est exprimée stablement dans des cellules HeLa (appelée GalT) permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X sans zoom numérique appliqué.

TRANS GOLGI ZOOM3

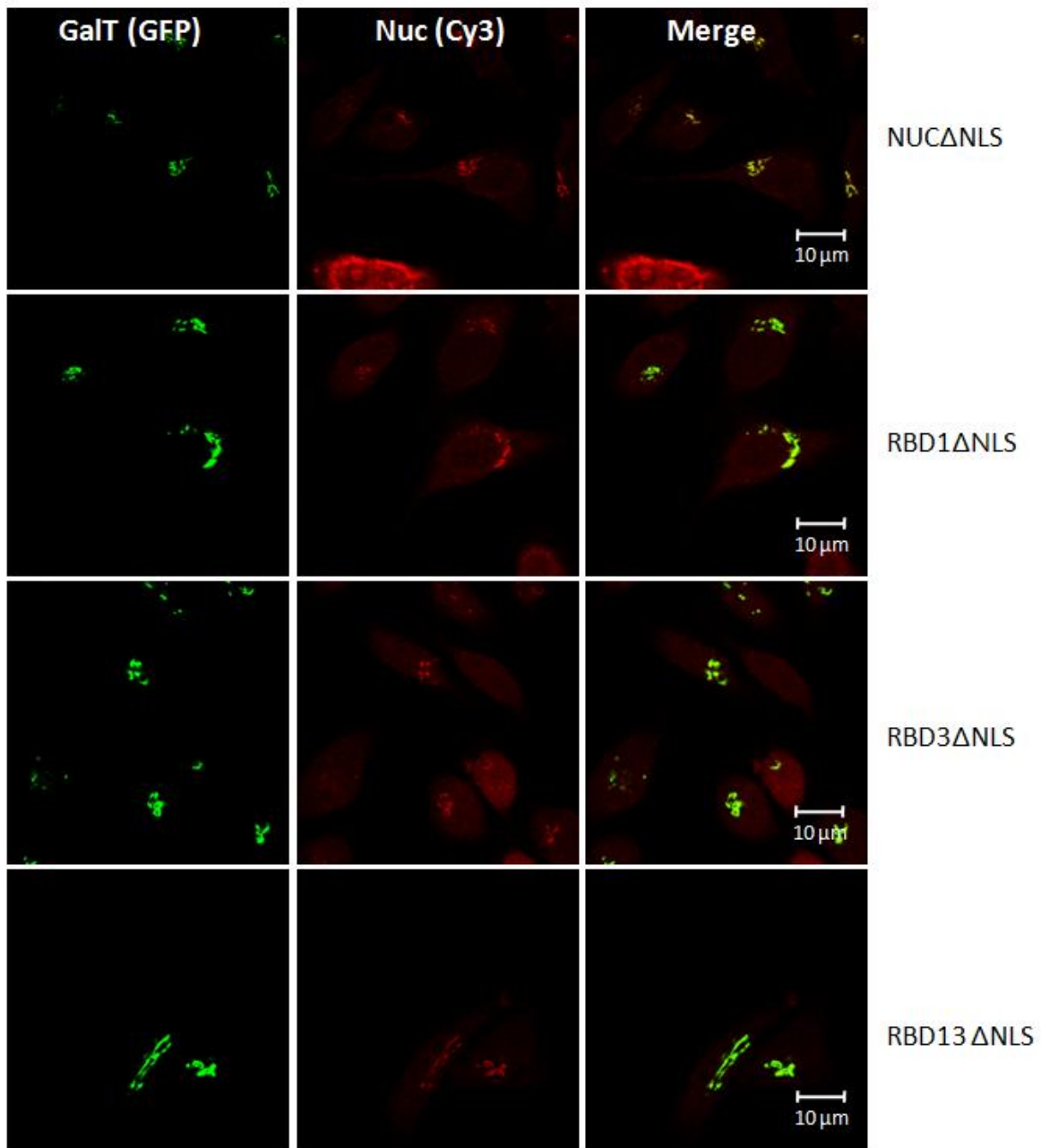


Figure 46 D : Etude de colocalisation de la β 1-4 galactosyltransférase trans-golgienne avec la nucléoline « pleine taille » sans sa séquence NLS, non mutée (NUC Δ NLS) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ NLS), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ NLS) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ NLS), et surexprimée en cellules Hela (cellules Hela Gal-T) - Grossissement numérique 3X

La β 1-4 galactosyltransférase trans-Golgienne fusionnée à la GFP est exprimée stablement dans des cellules Hela (appelée GalT) permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X et zoomées numériquement 3 fois.

TRANS GOLGI

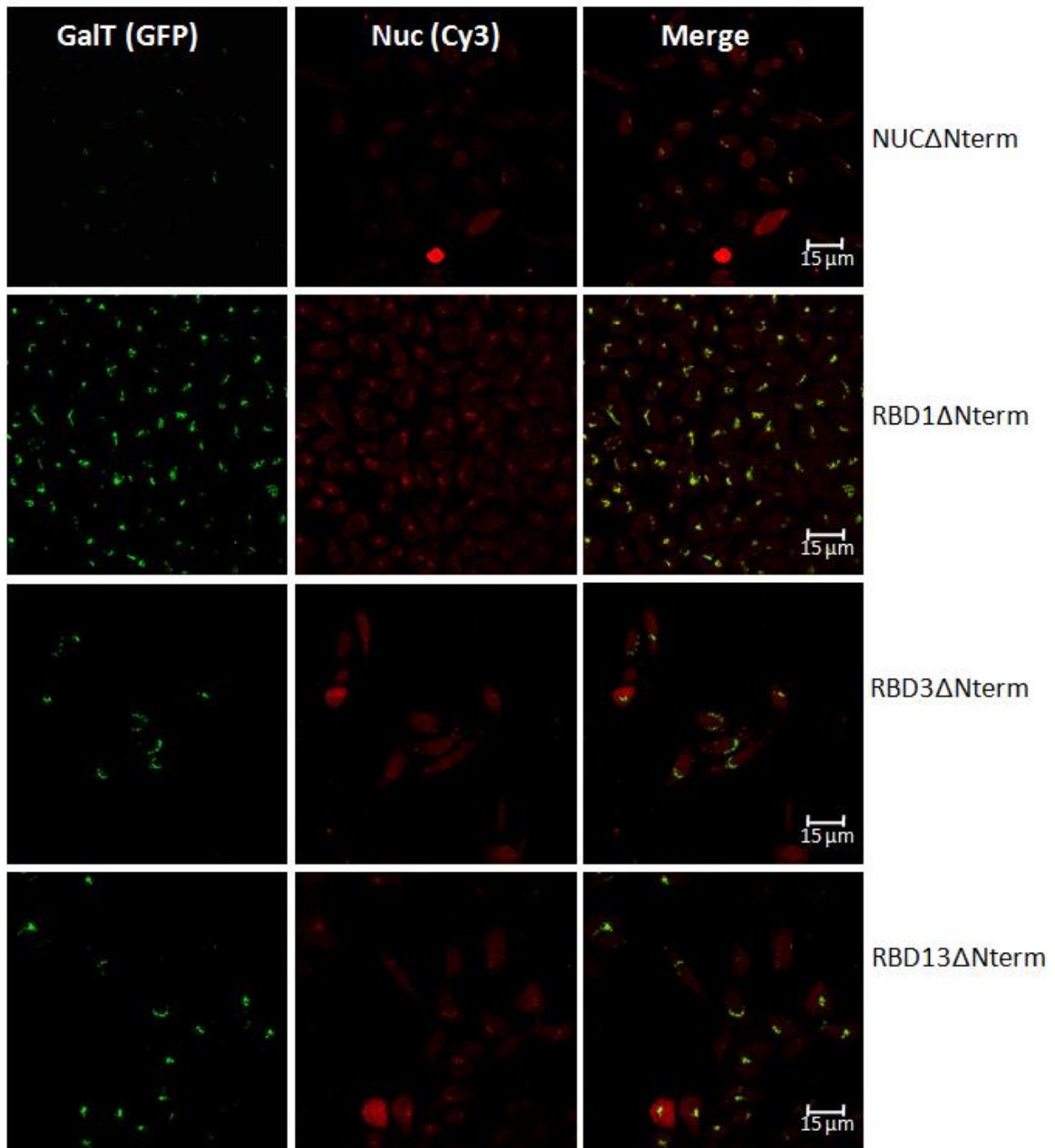


Figure 46 E : Etude de colocalisation de la β 1-4 galactosyltransférase trans-golgienne avec la nucléoline sans sa séquence NLS ni son domaine N-terminal acide, non mutée (NUC Δ Nterm) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ Nterm), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ Nterm) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ Nterm), et surexprimée en cellules Hela (cellules Hela Gal-T)

La β 1-4 galactosyltransférase trans-Golgienne fusionnée à la GFP est exprimée stablement dans des cellules Hela (appelée GalT) permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X sans zoom numérique appliqué.

TRANS GOLGI ZOOM3

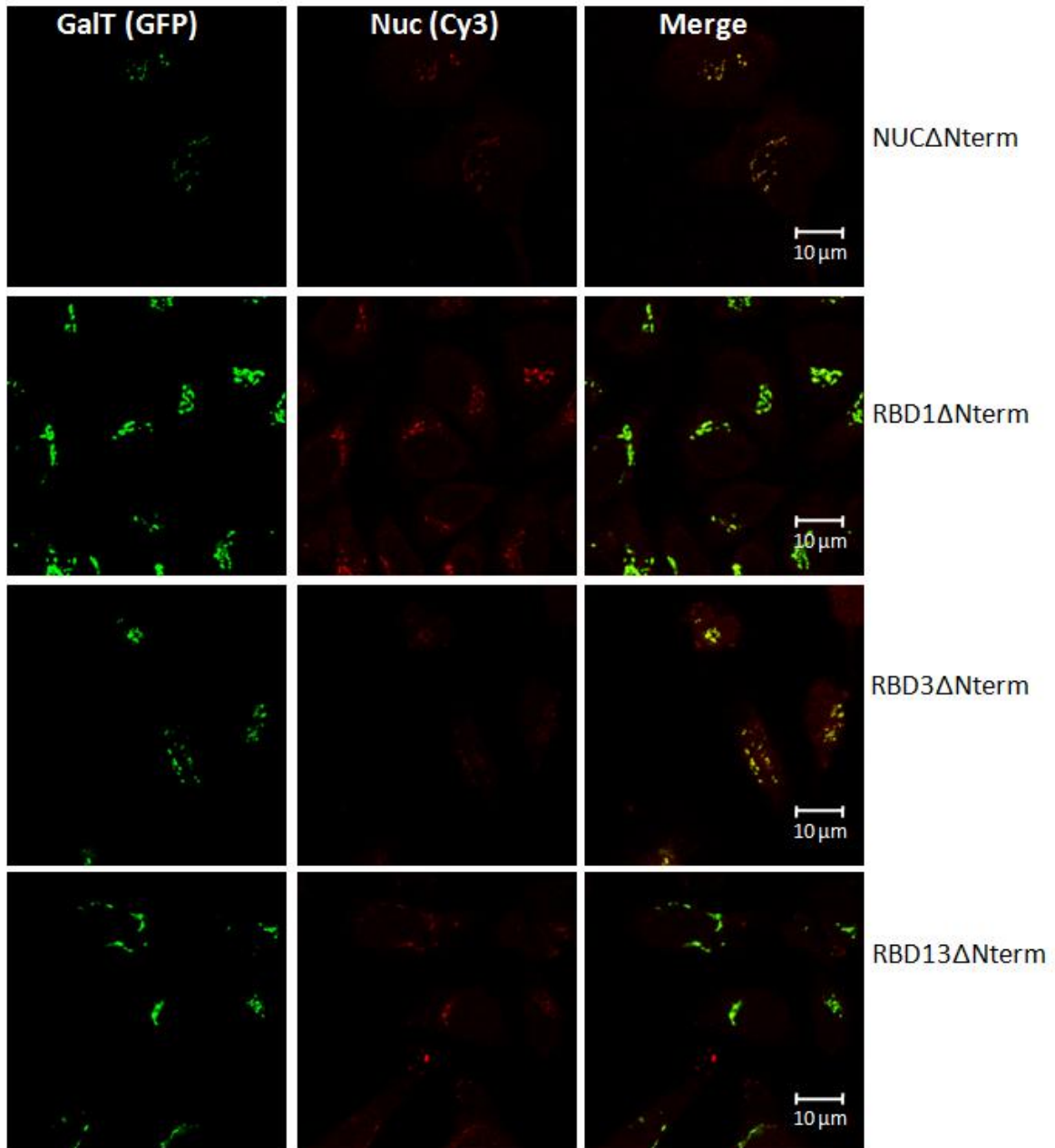


Figure 46 F: Etude de colocalisation de la β 1-4 galactosyltransférase trans-golgienne avec la nucléoline sans sa séquence NLS ni son domaine N-terminal acide, non mutée (NUC Δ Nterm) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ Nterm), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ Nterm) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ Nterm), et surexprimée en cellules HeLa (cellules HeLa Gal-T) - Grossissement numérique 3X

La β 1-4 galactosyltransférase trans-Golgienne fusionnée à la GFP est exprimée stablement dans des cellules HeLa (appelée GalT) permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X et zoomées numériquement 3 fois

2.2.2. Etude du processus de réinternalisation de la nucléoline de surface

La nucléoline de surface a été décrite pour interagir avec certains ligands, comme la lactoferrine ou la midkine, pour lesquels elle participe au processus d'endocytose. Afin de déterminer quel type de vésicules participe à la réinternalisation de la nucléoline, et quel est le devenir de la nucléoline de surface une fois internalisée, des expériences de colocalisation en microscopie confocale de fluorescence ont été entreprises. Les marqueurs cellulaires utilisés ont été visualisés par immunodétection par surexpression du marqueur lié à la GFP.

2.2.2.1. Endocytose

Selon la littérature, la nucléoline serait capable d'interagir avec certains protéoglycanes, des molécules parfois impliquées, telles CD44 et le syndécan-1, dans l'internalisation de protéines (Wilsie *et al.*, 2006). Nous avons donc recherché, dans un premier temps et par immunodétection, une colocalisation éventuelle de CD44V3 et du syndécan-1 avec les isoformes de nucléoline surexprimées dans les cellules Hela. Aucune colocalisation avec ces marqueurs n'a été observée (résultats non présentés).

Dans une deuxième approche, un plasmide codant pour la protéine Rab5 liée à la GFP a été cotransfecté transitoirement en cellules Hela avec les 12 constructions exprimant les différentes formes de nucléoline. La protéine Rab5 est une petite GTPase qui contrôle la dynamique de l'internalisation par les endosomes. Comme le montrent les figures 47 A, B et C, p.145 à 147, les différentes formes de nucléoline ont des localisations diffuses à travers la cellule, dont certaines semblent communes avec le marqueur Rab5, ce qui laisse supposer la présence de la nucléoline dans certaines vésicules d'endocytose.

De façon à confirmer ce résultat, et à préciser la nature des endosomes concernés, nous avons effectué la même expérience mais en présence d'un mutant dominant négatif de Rab5 (Rab5-Q79L) lié à la GFP. Rab5-Q79L cible spécifiquement les endosomes précoces en permettant le blocage du passage de l'endosome précoce à l'endosome tardif. Il se produit donc une accumulation des protéines dans les vésicules précoces

d'endocytose. Les figures 48 A, B et C, p.148 à 150 présentent les résultats obtenus où l'on observe une colocalisation massive de la nucléoline recombinante avec Rab5-Q79L et les endosomes précoces, ceci quelque soient les constructions plasmidiques utilisées pour transférer les cellules.

Il apparaît donc que la majorité de la nucléoline, quelle que soit sa capacité à être N-glycosylée, et malgré le fait seule la forme glycosylée soit exprimée à la surface des cellules (cf Chapitre 3 § 2.1, p.130), passe par les endosomes précoces et ce quelque soit son état de glycosylation. Par ailleurs, ce trafic semble indépendant de la présence du domaine N-terminal acide de la nucléoline.

Nous avons, de même, voulu établir la colocalisation de la nucléoline avec les endosomes tardifs. Dans ce but, nous avons cotransfecté les 12 constructions exprimant la nucléoline mutée ou non avec le marqueur Rab7 lié à la GFP. Les résultats obtenus sont visibles sur les figures 49 A, B et C, p.151 à 153. On peut y observer une colocalisation possible dans certaines cellules, visible en jaune sur les superpositions. Cependant, ce marquage n'est pas systématique. Il semble ainsi possible qu'une partie de la nucléoline présente dans les endosomes précoces soit dirigée vers les endosomes tardifs, tandis qu'une autre partie suivrait une destinée différente.

La nucléoline recombinante produite dans les cellules Hela subirait donc, après son expression à la surface, une réinternalisation ou une ségrégation *via* les endosomes précoces et quelquefois tardifs (marqués respectivement par Rab5, Rab5-Q79L et Rab7).

2.2.2.2. Dégradation

Afin de préciser le processus de recyclage suivi par la nucléoline, nous avons tenté d'identifier le compartiment où s'effectue la dégradation de la nucléoline recombinante surexprimée dans les cellules Hela. Un premier essai de colocalisation avec le protéasome s'est révélé infructueux (données non présentées). Par contre, des expériences de colocalisation ont été effectuées après transfection du plasmide codant pour la protéine CD63 fusionnée à la GFP, un marqueur spécifique des lysosomes.

Sur les figures 50 A, B et C, p.154 à 156, on peut voir une colocalisation fortement marquée en jaune sur les superpositions, des différentes isoformes de nucléoline recombinante exprimée.

ENDOSOMES

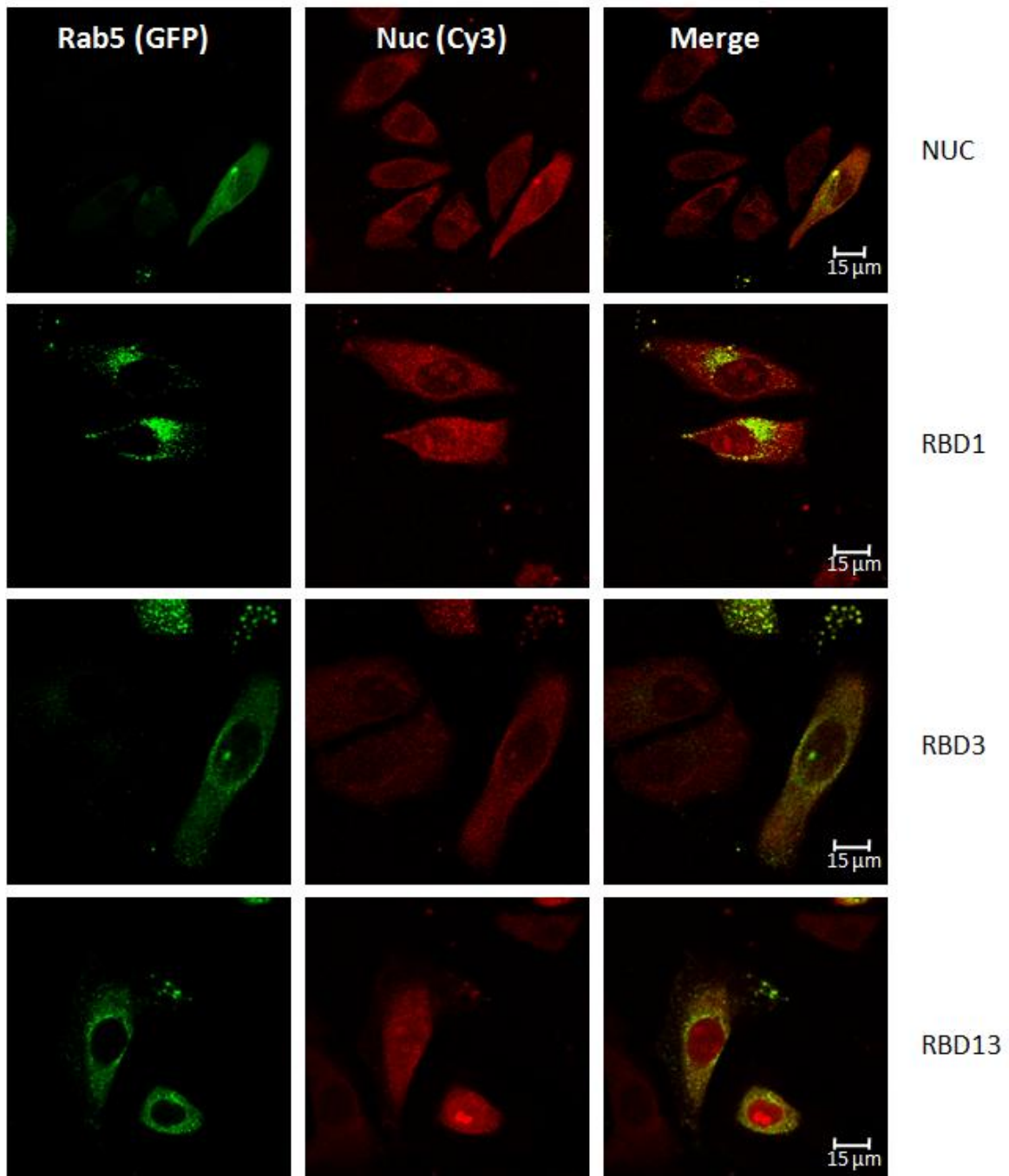


Figure 47 A : Etude de colocalisation de Rab5 avec la nucléoline « pleine taille » non mutée (NUC) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1), son deuxième site N-glycosylable (RBD3) et sur ses deux sites simultanément (RBD13), et surexprimée en cellules HeLa

La protéine Rab5 est surexprimée fusionnée à la GFP permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X sans zoom numérique appliqué.

ENDOSOMES

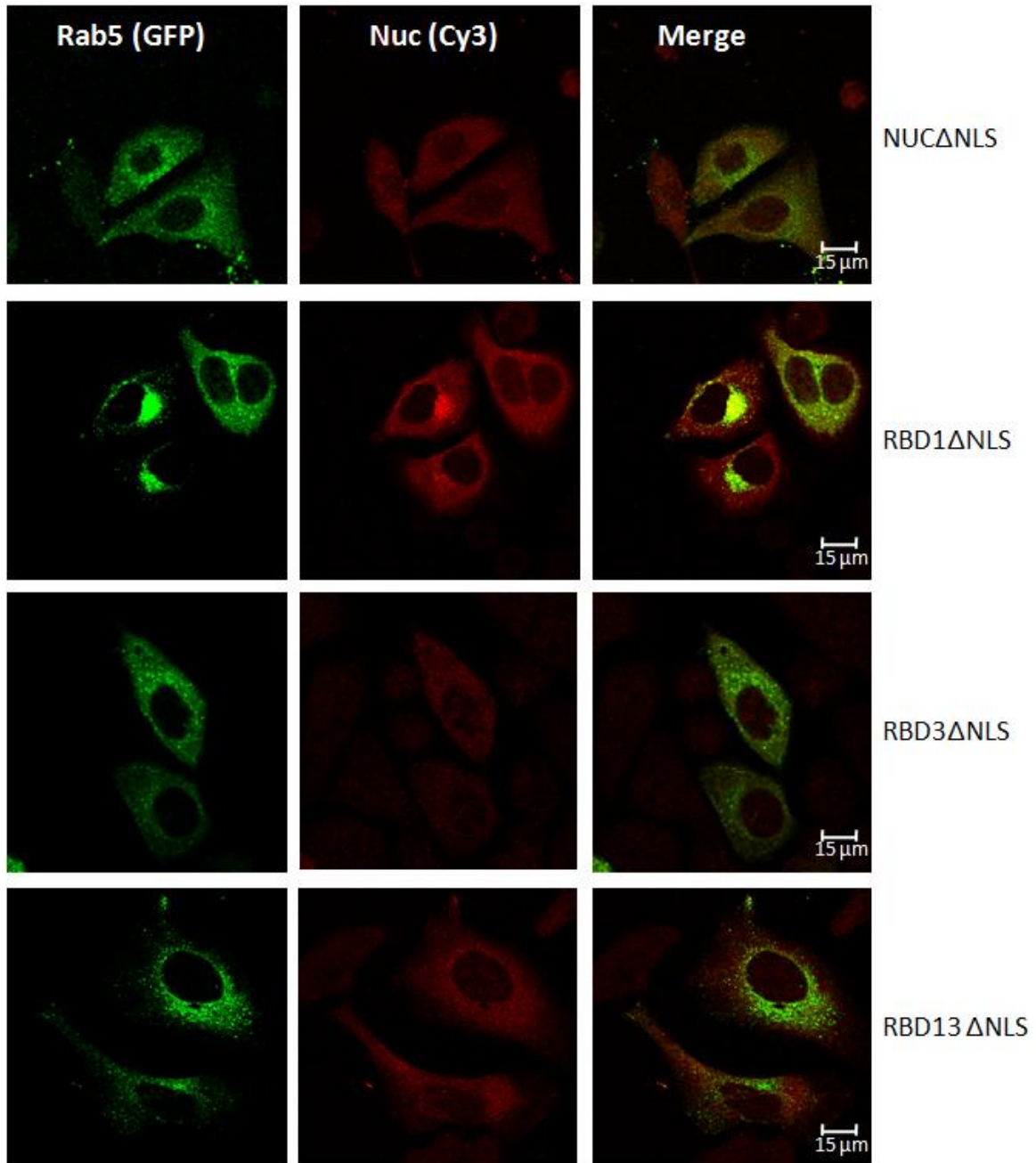


Figure 47 B : Etude de colocalisation de Rab5 avec la nucléoline « pleine taille » sans sa séquence NLS, non mutée (NUCΔNLS) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1ΔNLS), son deuxième site N-glycosylable (RBD3ΔNLS) et sur ses deux sites simultanément (RBD13ΔNLS), et surexprimée en cellules Hela

La protéine Rab5 est surexprimée fusionnée à la GFP permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X sans zoom numérique appliqué.

ENDOSOMES

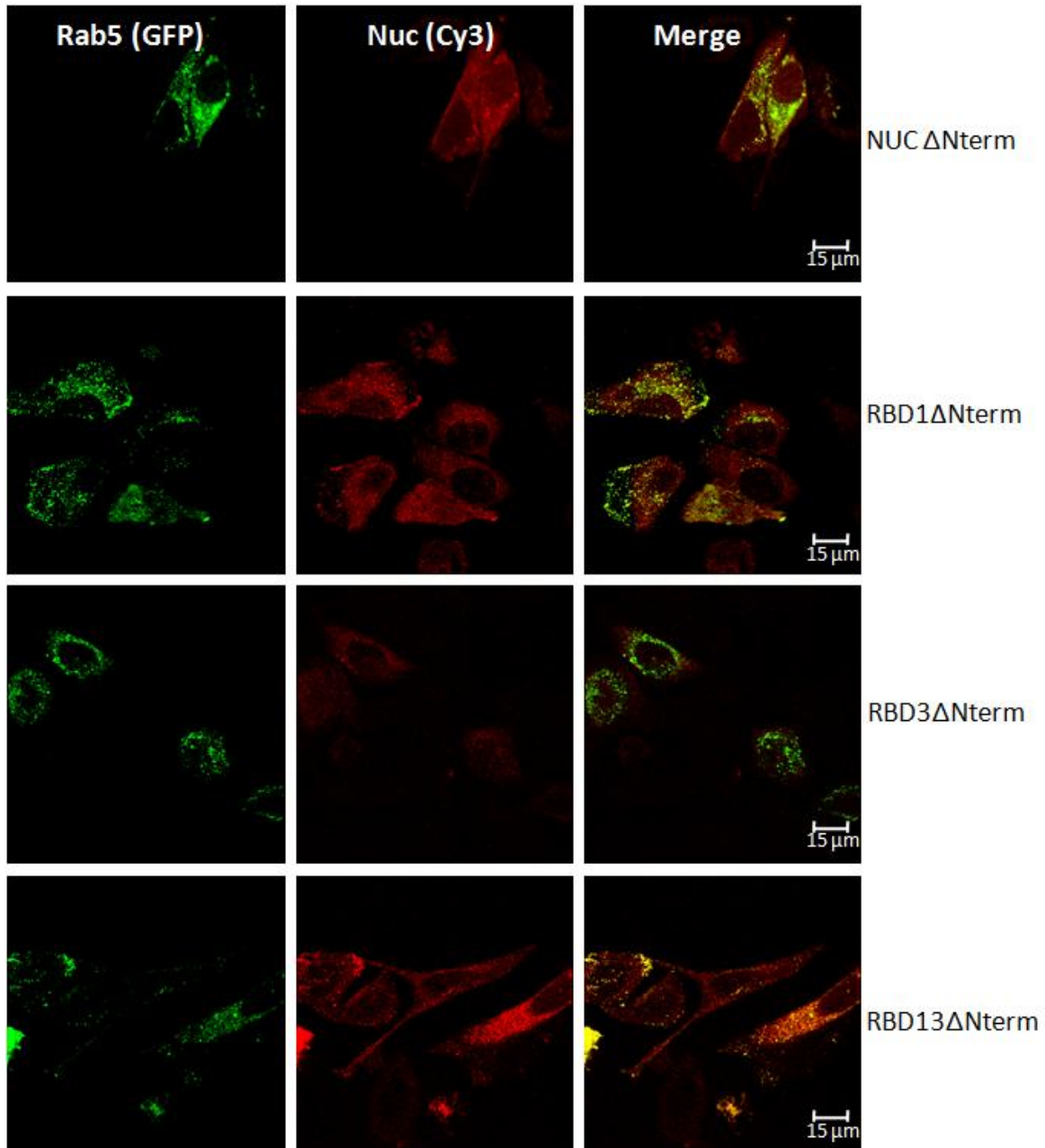


Figure 47 C : Etude de colocalisation de Rab5 avec la nucléoline sans sa séquence NLS ni son domaine N-terminal acide, non mutée (NUCΔNterm) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1ΔNterm), son deuxième site N-glycosylable (RBD3ΔNterm) et sur ses deux sites simultanément (RBD13ΔNterm), et surexprimée en cellules Hela

La protéine Rab5 est surexprimée fusionnée à la GFP permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X sans zoom numérique appliqué.

ENDOSOMES PRECOCES

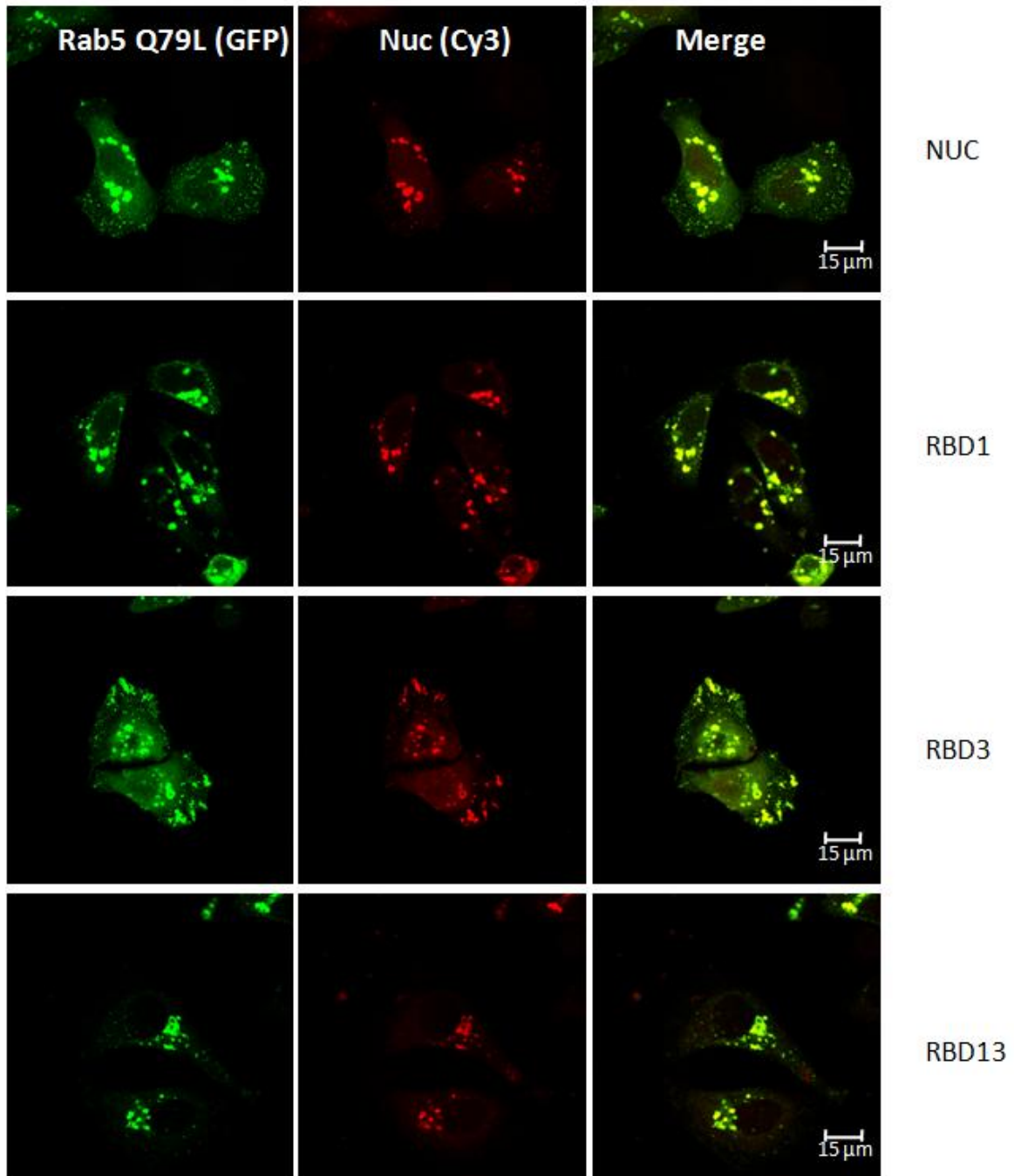


Figure 48 A : Etude de colocalisation de Rab5-Q79L avec la nucléoline « pleine taille » non mutée (NUC) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1), son deuxième site N-glycosylable (RBD3) et sur ses deux sites simultanément (RBD13), et surexprimée en cellules Hela

La protéine Rab5-Q79L est surexprimée fusionnée à la GFP permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X sans zoom numérique appliqué.

ENDOSOMES PRECOCES

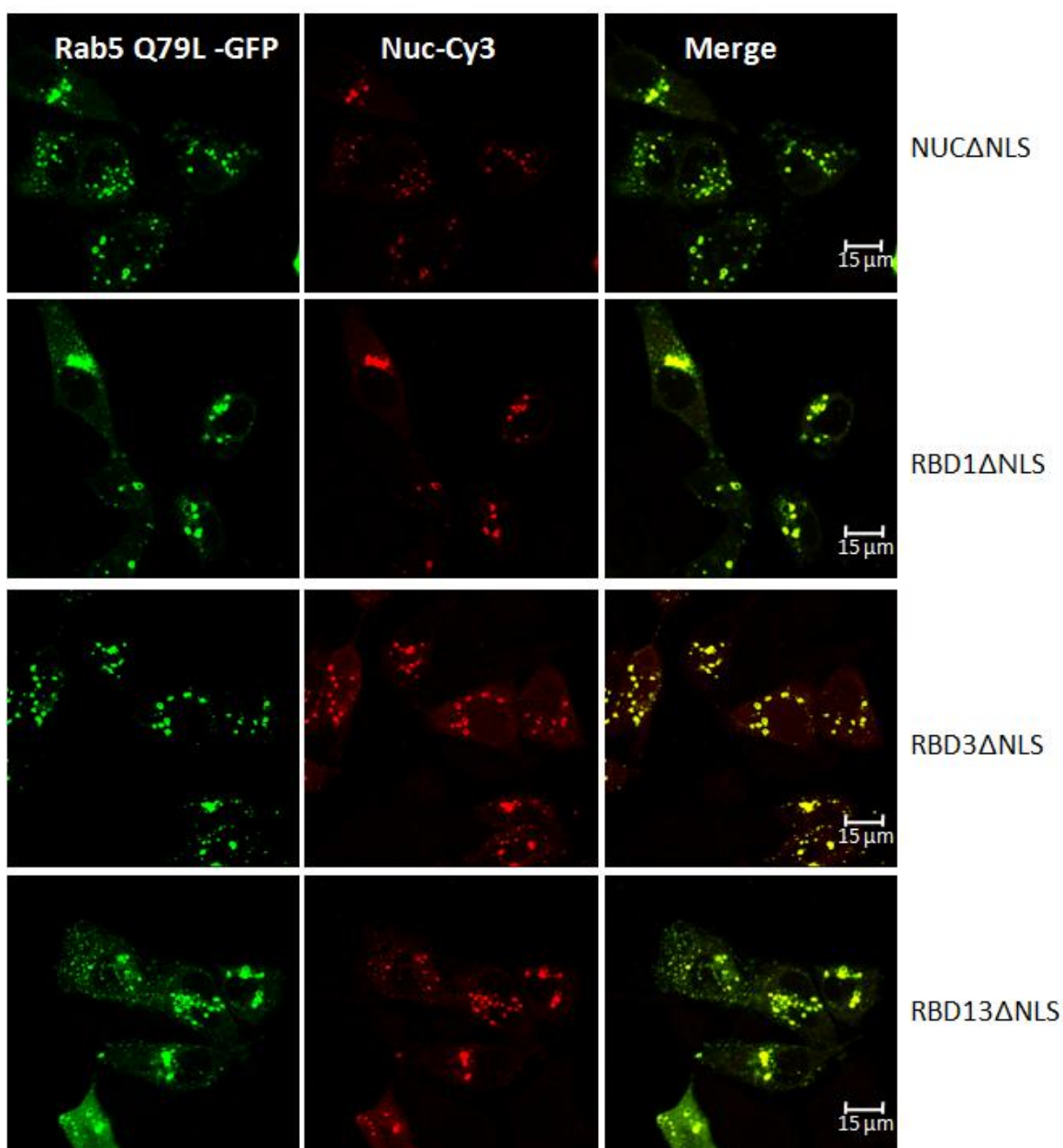


Figure 48 B : Etude de colocalisation de Rab5-Q79L avec la nucléoline « pleine taille » sans sa séquence NLS, non mutée (NUCΔNLS) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1ΔNLS), son deuxième site N-glycosylable (RBD3ΔNLS) et sur ses deux sites simultanément (RBD13ΔNLS), et surexprimée en cellules Hela

La protéine Rab5-Q79L est surexprimée fusionnée à la GFP permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X sans zoom numérique appliqué.

ENDOSOMES PRECOCES

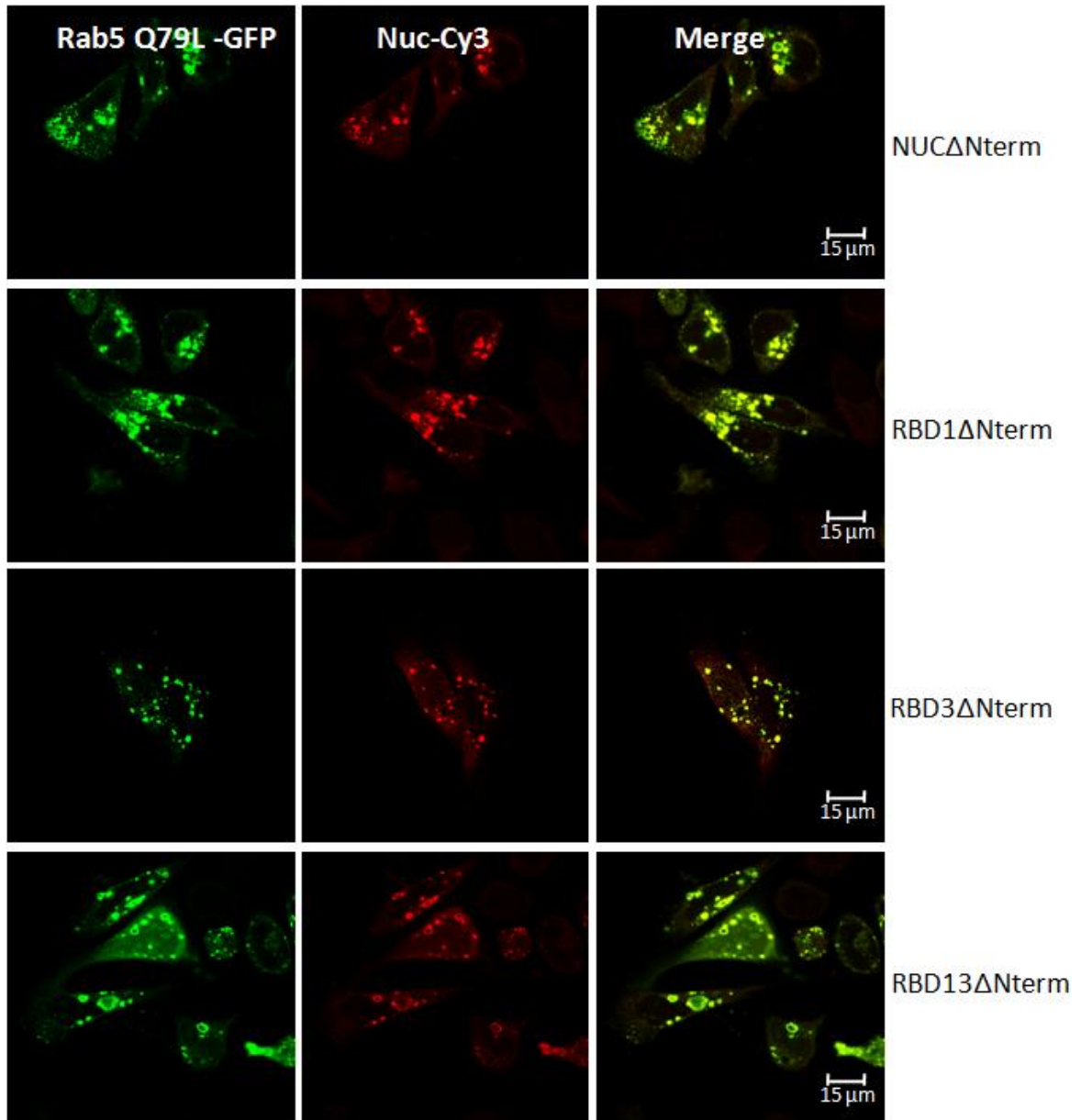


Figure 48 C : Etude de colocalisation de Rab5-Q79L avec la nucléoline sans sa séquence NLS ni son domaine N-terminal acide, non mutée (NUCΔNterm) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (R1ΔNterm), son deuxième site N-glycosylable (R3ΔNterm) et sur ses deux sites simultanément (R13ΔNterm), et surexprimée en cellules Hela

La protéine Rab5-Q79L est surexprimée fusionnée à la GFP permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X sans zoom numérique appliqué.

ENDOSOMES TARDIFS

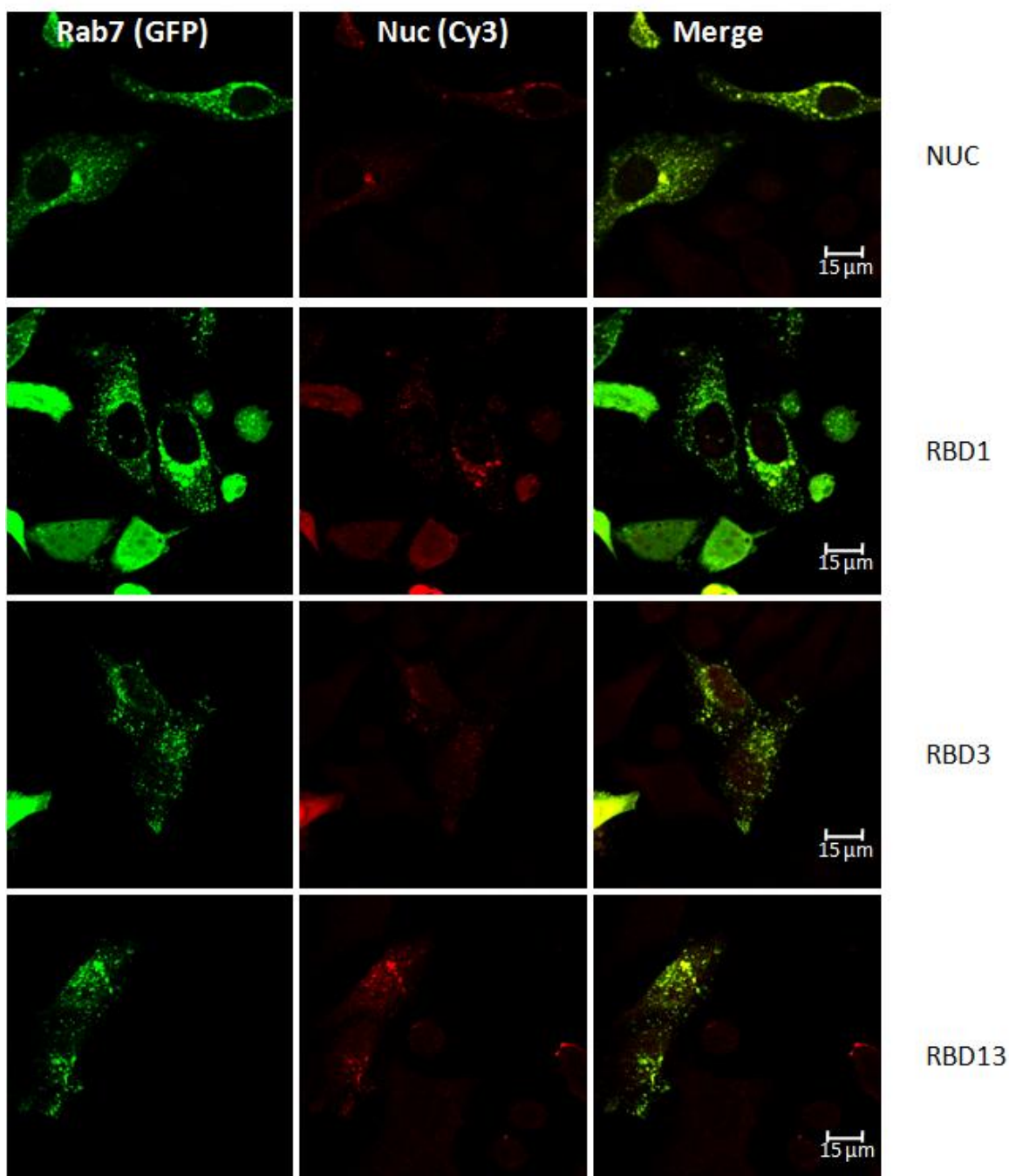


Figure 49 A : Etude de colocalisation de Rab7 avec la nucléoline « pleine taille » non mutée (NUC) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1), son deuxième site N-glycosylable (RBD3) et sur ses deux sites simultanément (RBD13), et surexprimée en cellules Hela

La protéine Rab7 est surexprimée fusionnée à la GFP permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodéetectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X sans zoom numérique appliqué.

ENDOSOMES TARDIFS

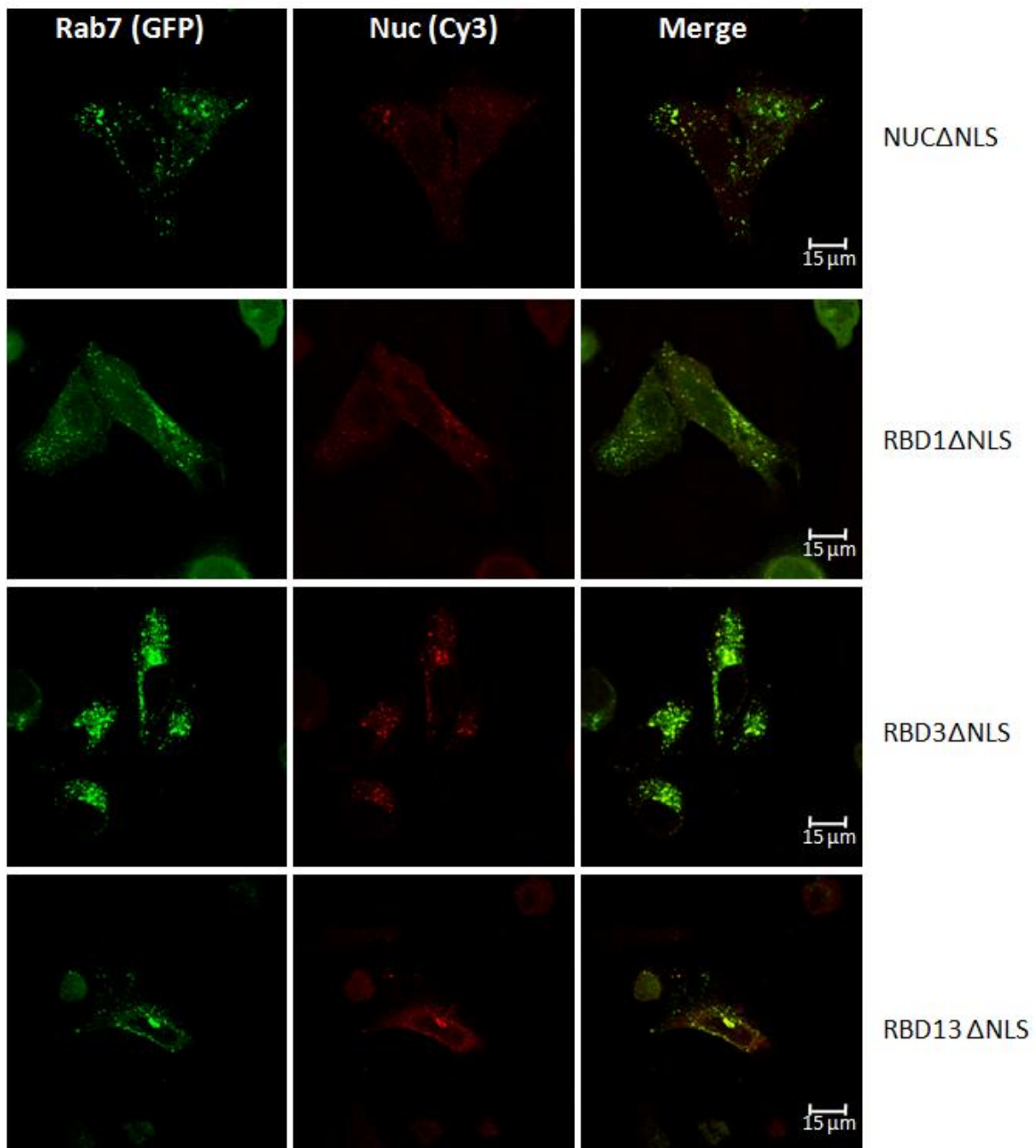


Figure 49 B : Etude de colocalisation de Rab7 avec la nucléoline « pleine taille » sans sa séquence NLS, non mutée (NUCΔNLS) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1ΔNLS), son deuxième site N-glycosylable (RBD3ΔNLS) et sur ses deux sites simultanément (RBD13ΔNLS), et surexprimée en cellules Hela

La protéine Rab7 est surexprimée fusionnée à la GFP permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X sans zoom numérique appliqué.

ENDOSOMESTARDIFS

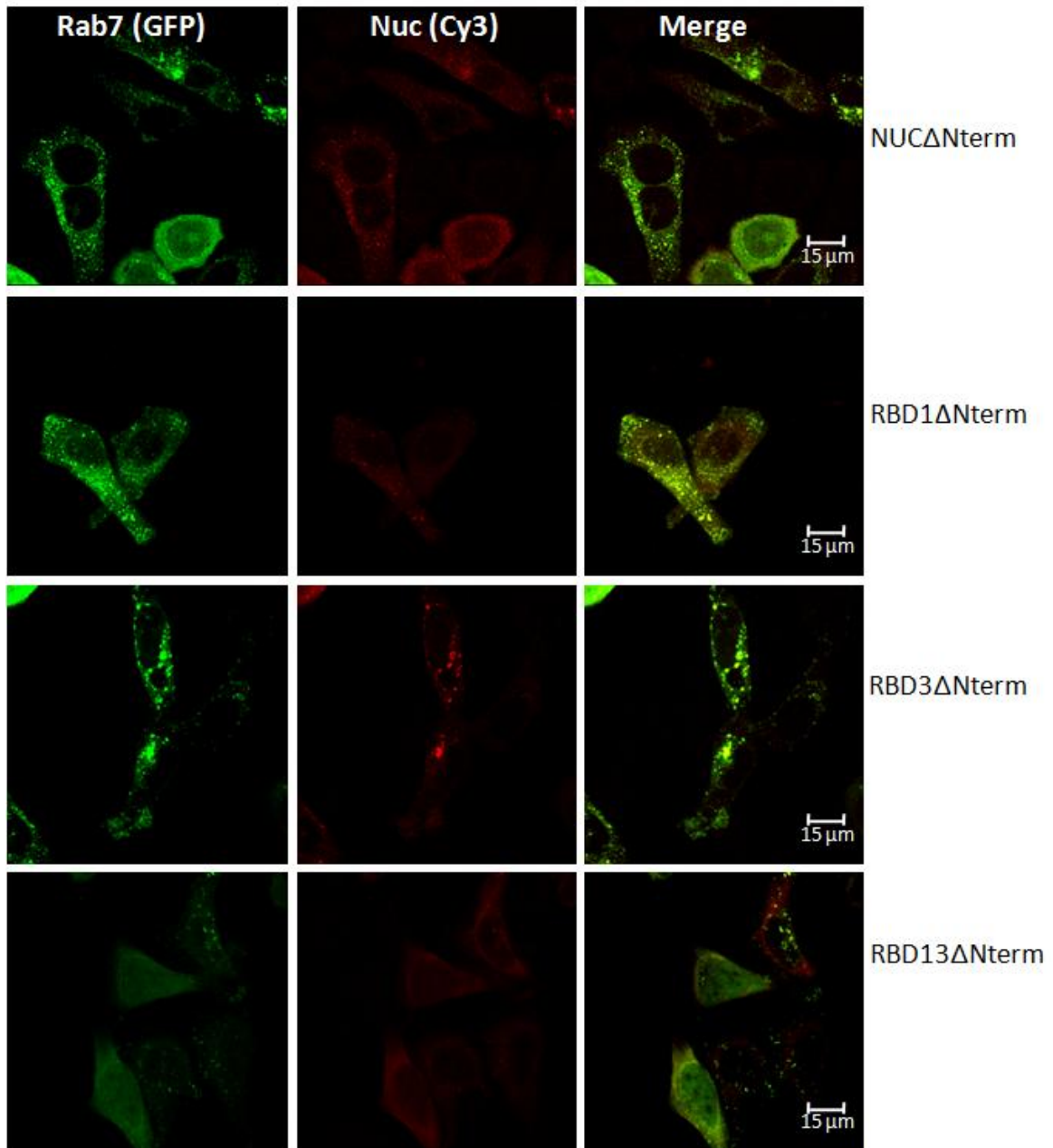


Figure 49 C : Etude de colocalisation de Rab7 avec la nucléoline sans sa séquence NLS ni son domaine N-terminal acide, non mutée (NUC Δ Nterm) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1 Δ Nterm), son deuxième site N-glycosylable (RBD3 Δ Nterm) et sur ses deux sites simultanément (RBD13 Δ Nterm), et surexprimée en cellules Hela

La protéine Rab7 est surexprimée fusionnée à la GFP permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X sans zoom numérique appliqué.

LYSOSOMES

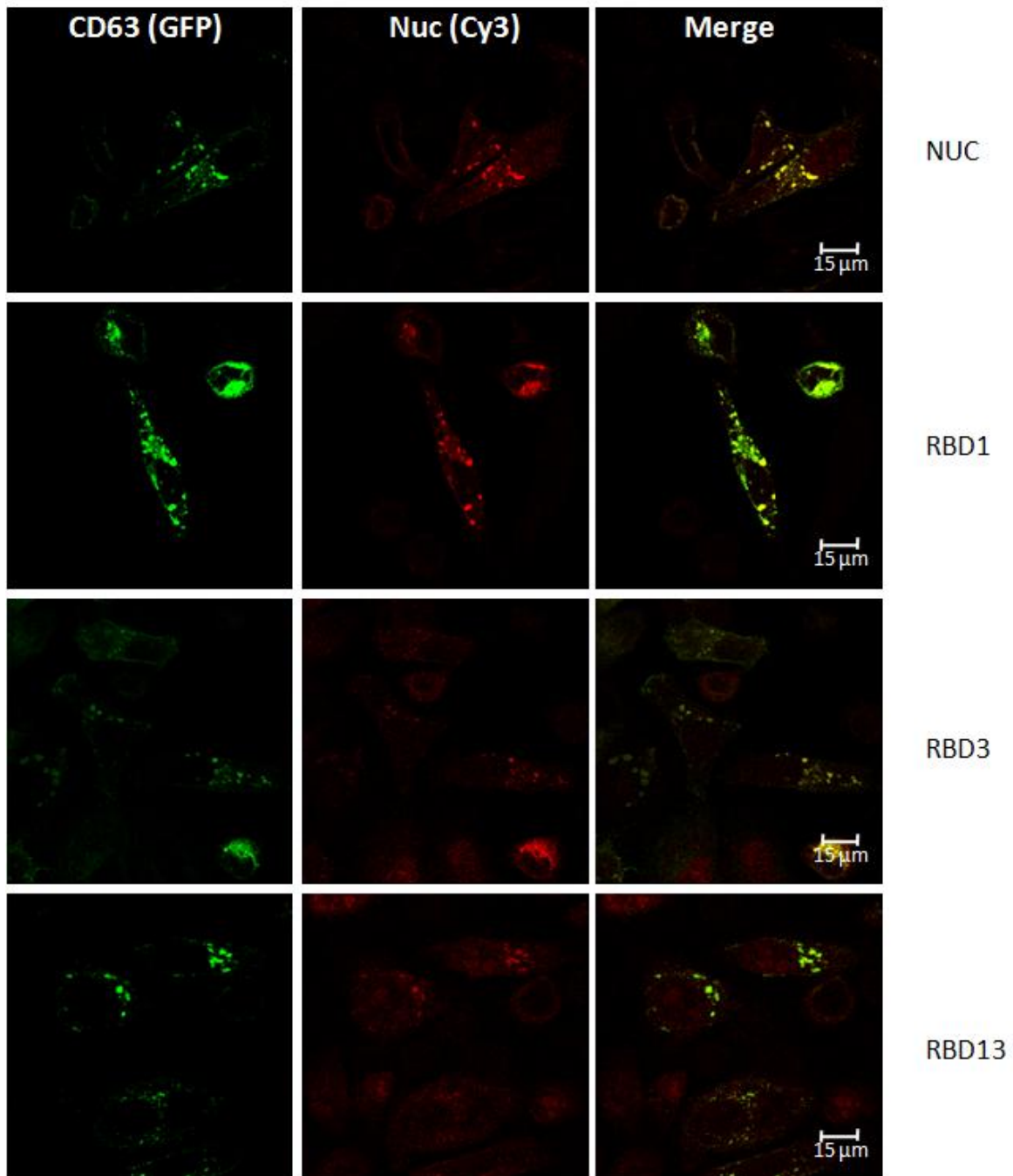


Figure 50 A : Etude de colocalisation de CD63 avec la nucléoline « pleine taille » non mutée (NUC) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1), son deuxième site N-glycosylable (RBD3) et sur ses deux sites simultanément (RBD13), et surexprimée en cellules HeLa

La protéine CD63 est surexprimée fusionnée à la GFP permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X sans zoom numérique appliqué.

LYSOSOMES

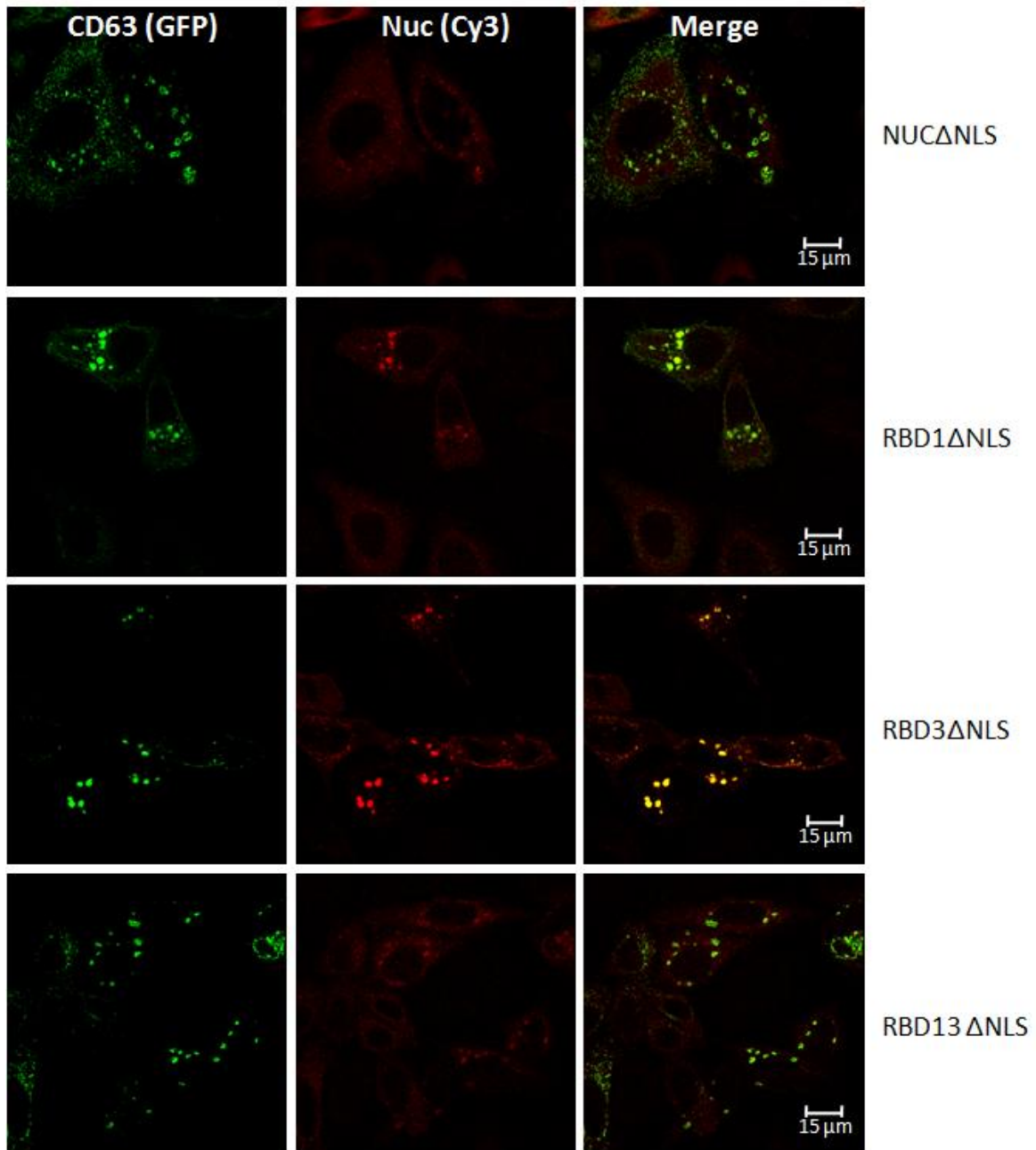


Figure 50 B : Etude de colocalisation de CD63 avec la nucléoline « pleine taille » sans sa séquence NLS, non mutée (NUCΔNLS) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1ΔNLS), son deuxième site N-glycosylable (RBD3ΔNLS) et sur ses deux sites simultanément (RBD13ΔNLS), et surexprimée en cellules Hela

La protéine CD63 est surexprimée fusionnée à la GFP permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X sans zoom numérique appliqué.

LYSOSOMES

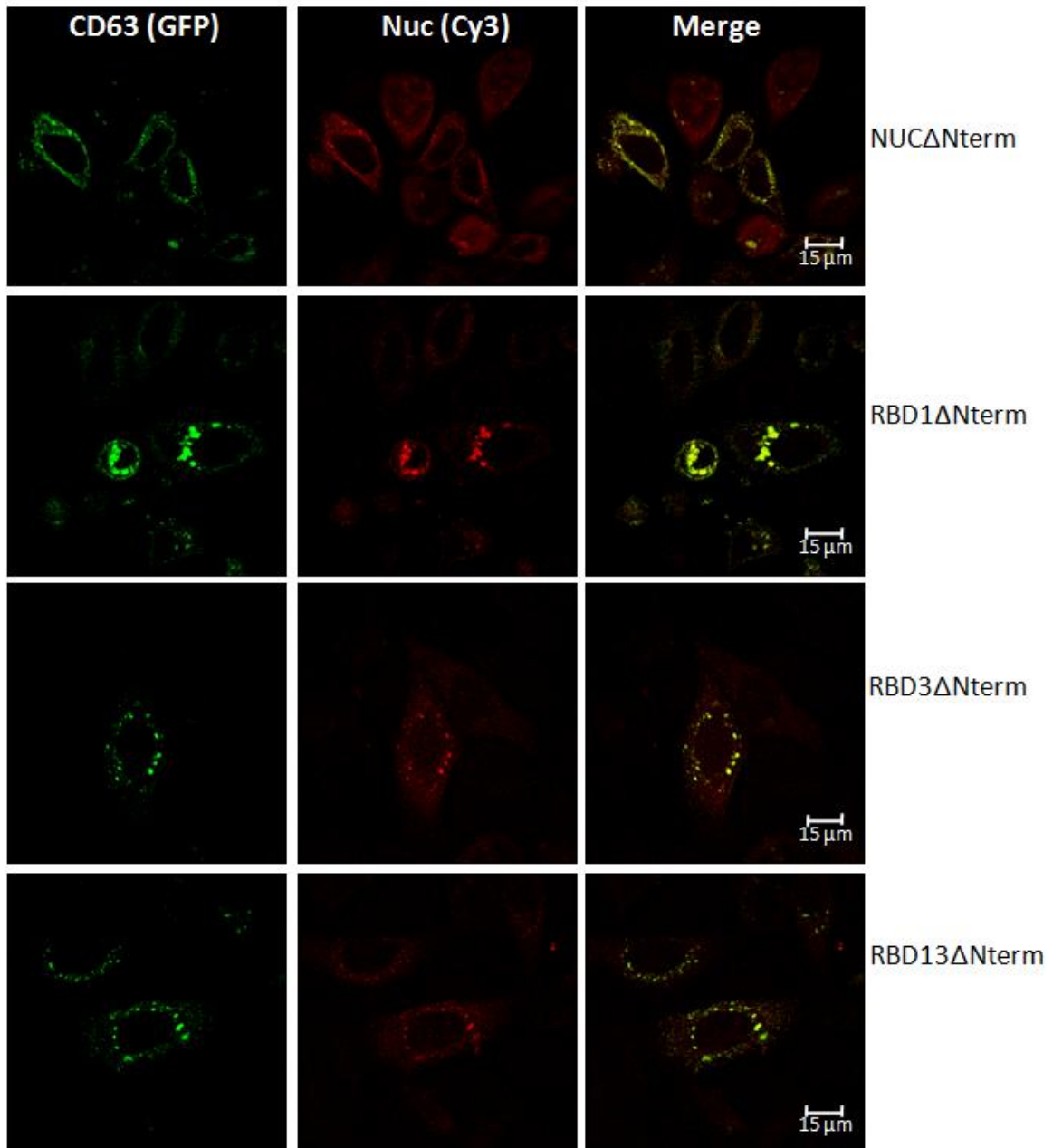


Figure 50 C : Etude de colocalisation de CD63 avec la nucléoline sans sa séquence NLS ni son domaine N-terminal acide, non mutée (NUCΔNterm) ou mutée sur son premier site N-glycosylable (RBD1ΔNterm), son deuxième site N-glycosylable (RBD3ΔNterm) et sur ses deux sites simultanément (RBD13ΔNterm), et surexprimée en cellules Hela

La protéine CD63 est surexprimée fusionnée à la GFP permettant sa détection dans les longueurs d'ondes vertes. Les différentes constructions de nucléoline sont immunodétectées par l'anticorps M2-Cy3 dirigé contre le 3X-Flag, le Cy3 émettant dans les longueurs d'ondes rouges. Le Merge présente les superpositions des images obtenues en Rouge et en Vert. Les images sont obtenues avec un objectif 63X sans zoom numérique appliqué.

3. CONCLUSION ET DISCUSSION

A l'exception du trafic nucléo-cytoplasmique de la nucléoline, peu de choses sont connues sur le trafic et les localisations de la nucléoline. Tandis que la localisation nucléaire de la nucléoline s'explique par l'existence d'une séquence NLS dans la molécule, il est admis que des modifications post-traductionnelles, principalement la phosphorylation, permettent de réguler son trafic nucléo-cytoplasmique.

Au cours du travail présenté dans ce chapitre, nous avons cherché à définir les voies d'expression de la nucléoline à la surface cellulaire, et à mettre en évidence le rôle éventuel joué par la N-glycosylation dans l'expression et le trafic intracellulaire de la molécule. En effet, nous avons montré dans le chapitre 1 que la glycosylation de la nucléoline est requise pour son expression à la surface, et que la nucléoline de surface possède des rôles spécifiques de transduction de signal, en relation certaine avec ses rôles de récepteur pour de nombreux ligands à la surface des cellules. Par ailleurs, les études d'interactions menées dans le chapitre 2 ont démontré que la nucléoline est capable d'interagir sur elle-même, et que sa N-glycosylation modifie sa capacité à former des oligomères ou à s'agrèger. Sur la base de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la N-glycosylation jouerait un rôle dans l'agrégation, la présentation de la nucléoline à la surface cellulaire et son organisation à la surface. L'influence de la N-glycosylation de la nucléoline de surface sur son interaction avec ses ligands s'exercerait donc plutôt sur les propriétés de redistribution de la nucléoline à la surface cellulaire que sur ses propriétés de fixation des ligands.

Dans le chapitre 3 de nos résultats, afin de déterminer l'influence de la capacité de la nucléoline à être N-glycosylée sur son expression à la surface cellulaire et sur son trafic intracellulaire, nous avons établi un panel de 12 constructions plasmidiques permettant la surexpression de diverses formes mutées de la nucléoline étiquetée par le 3X-Flag. Les molécules exprimées diffèrent par la mutation ou non de la séquence NLS, la délétion du domaine N-terminal acide, et leur capacité à être N-glycosylables sur les deux sites, partiellement N-glycosylables ou non N-glycosylables. Ce système de surexpression en cellules de mammifère nous a permis de suivre les protéines étiquetées de façon spécifique, indépendamment de la nucléoline endogène.

Nous avons ainsi pu établir, par des méthodes de cytofluorimétrie en flux sur des cellules transfectées par les différentes constructions, et de façon cohérente avec les résultats obtenus dans le chapitre 1, que la glycosylation est requise et essentielle pour l'expression de la nucléoline à la surface cellulaire. Cependant, nous n'avons pas pu établir une prépondérance de la glycosylation d'un site de N-glycosylation par rapport à l'autre. Ce résultat laisse supposer que la nucléoline suit une voie unique de sécrétion, et que la ségrégation des formes sécrétées ou non se fait, de manière globale, sur la reconnaissance ou non d'une partie glycanique sur la nucléoline.

Les résultats préliminaires, obtenus en microscopie confocale sur des cellules Hela transfectées par les constructions des différentes formes de nucléoline, ont permis de préciser les voies de sécrétion et de recyclage empruntées par la nucléoline. Les expériences de colocalisation en microscopie confocale semblent indiquer que la nucléoline, au cours de sa synthèse ou de sa sécrétion, ou encore lors de sa ré-internalisation, transite par les citernes trans-golgiennes (colocalisation avec la β 1-4 galactosyltransférase golgienne). Cette localisation trans-golgienne est, de plus, indépendante de l'intégrité de la séquence NLS, des sites de N-glycosylation et de la présence du domaine N-terminal acide de la nucléoline. Cependant, la nucléoline ne semble pas transiter par le réticulum, ou du moins ne semble pas s'y accumuler. Il faudrait donc vérifier, grâce à des inhibiteurs du transport entre le réticulum endoplasmique et le Golgi, mais également du transport entre le Golgi et la surface cellulaire, si la nucléoline suit la voie de sécrétion classique malgré l'absence de séquence signal.

En ce qui concerne la ré-internalisation et le turn-over de la nucléoline de surface, nos résultats montrent sa colocalisation massive dans les endosomes précoces (colocalisation avec Rab5-Q79L). Une partie de la nucléoline présente dans les endosomes précoces semble être ensuite retrouvée dans les endosomes tardifs, puis dans les lysosomes. Il apparaît, cependant, qu'une partie de la nucléoline est redirigée dans d'autres compartiments cellulaires dont la nature reste à déterminer. Par ailleurs, les résultats obtenus montrent des localisations endosomales et lysosomales identiques pour les 12 formes de la nucléoline. Ces résultats laissent supposer que les facteurs différentiels entre les 12 protéines (présence ou non du domaine N-terminal, de la NLS ou

capacité de N-glycosylation) n'interviennent pas dans la ségrégation de la nucléoline dans les endosomes. Cependant, il est difficilement explicable que la nucléoline non N-glycosylable, et donc non exprimée à la surface (résultats du chapitre 1 et 3), soit ré-internalisée, tout comme la présence de la nucléoline dans le Golgi, mais pas dans le réticulum. Il apparaît donc que la nucléoline suit un trafic atypique. On peut émettre l'hypothèse selon laquelle toute la nucléoline produite se retrouverait à un moment de son existence dans les endosomes précoces, puis qu'une partie serait dirigée vers les endosomes tardifs, tandis que l'autre partie serait re-dirigée vers le trans-Golgi. Il existe, en effet, des protéines comme RhoBTB3 spécifiques du transport des endosomes vers le Golgi (Espinosa *et al.*, 2009). Il serait intéressant, à cet effet, de vérifier s'il existe une colocalisation de la nucléoline avec ce type de protéines. Enfin, on pourrait imaginer que la colocalisation de la nucléoline ne se fait pas sur la face membranaire interne, mais externe des endosomes. Ce pourrait être le cas, pour le moins, des formes non N-glycosylables qui n'ont pas pu être exprimées à la surface des cellules Hela. Afin de répondre à ces questions, des expériences de FRET (fluorescence resonance energy transmission) sont à envisager.

CONCLUSIÓN

CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION – PERSPECTIVES

1. CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION

La nucléoline est une protéine connue depuis plus de 30 ans, et dont la structure et les fonctions ont été très étudiées depuis. La littérature s'est longtemps concentrée sur la forme nucléaire de la nucléoline, en abondance dans la cellule, et qui s'est ainsi révélée être une protéine clef de nombreux processus comme la biogenèse des ribosomes. Depuis quelques années, un intérêt grandissant s'est porté sur une forme très minoritaire du pool total de nucléoline cellulaire : la nucléoline de surface. La nucléoline de surface a été mise en évidence comme récepteur ou co-récepteur de nombreuses molécules, et a été trouvée associée à diverses pathologies. Son implication dans la fixation et l'internalisation du VIH, sa surexpression dans le cancer et son rôle dans l'angiogénèse ont été à l'origine de cette émergence. Une meilleure compréhension des rôles qu'elle joue dans ces pathologies nécessite une meilleure définition de ses caractéristiques structurales, de son organisation et de son mode d'expression à la surface cellulaire caractérisation, et de ses fonctions. C'est dans cette démarche d'« étude des relations structure/fonctions » que s'inscrivent les travaux effectués durant ma thèse.

La structure de la nucléoline garde beaucoup de ses secrets : seule la conformation des domaines RBD1 et 2 est connue, par des études en RMN réalisées sur des protéines recombinantes exprimées chez *E. coli*. Aucune donnée cristallographique n'a pu être obtenue sur la protéine entière, native ou recombinante et l'organisation relative des 3 domaines N- et C-terminaux et du domaine central est inconnue. Ce manque de données structurales est attribué, en partie, ainsi que je l'ai expérimenté au cours de mes travaux, à la difficulté d'exprimer une nucléoline recombinante « pleine taille » en quantités suffisantes pour des études structurales. Il est causé également par la grande sensibilité de la nucléoline à la protéolyse et/ou à l'autoprotéolyse, qui rend difficile la purification quantitative de nucléoline intacte obtenue à partir de systèmes recombinants ou d'extraits de lignées cellulaires. Enfin, les multiples modifications post-traductionnelles de

la nucléoline, sa phosphorylation en particulier, introduisent une hétérogénéité dans la structure qui est peu compatible avec la cristallisation de la protéine et les études de cristallographie aux rayons X. La découverte, en 2005 par notre laboratoire, d'une isoforme N- et O-glycosylée de la nucléoline, spécifique du cytoplasme et de la surface cellulaire, a mis en évidence une spécificité structurale de la nucléoline extra-nucléaire. Cette découverte a permis d'émettre de nouvelles hypothèses, telle que celle où la glycosylation de la nucléoline pourrait jouer un rôle au niveau de son trafic intracellulaire et dans la régulation de ses fonctions. De manière intéressante, la N-glycosylation de la nucléoline s'effectue sur les seuls domaines de la nucléoline dont la structure est connue, les domaines RBD, et dont les propriétés de fixation des ARN ont été particulièrement bien étudiées. La présence des N-glycanes dans ces domaines « stratégiques » de la nucléoline, renforce l'idée selon laquelle ils pourraient jouer un rôle déterminant dans les fonctions de la molécule.

Au cours de cette thèse, mon travail de recherche a consisté en l'étude du rôle de la N-glycosylation dans le trafic et les fonctions de la nucléoline de surface. Plus précisément, mes travaux de thèse ont donc eu pour objectif de répondre à plusieurs questions :

- ✓ La nucléoline de surface, déjà décrite comme un récepteur d'endocytose et d'adhésion, possède-t-elle d'autres fonctions spécifiques?
- ✓ La N-glycosylation de la nucléoline a-t-elle une influence sur les interactions de la protéine avec ses partenaires et, par conséquent, ses fonctions ?
- ✓ Dans quelle mesure la capacité de la nucléoline à être N-glycosylée peut-elle modifier son trafic ?

Dans une première partie de mon travail, en collaboration avec l'équipe d'Ara Hovanessian (UPR 2228 CNRS, Paris), Jean-Paul Briand, (UPR 9021 CNRS, Strasbourg), et P. Mariot, (U800 INSERM, Villeneuve d'Ascq), j'ai démontré la capacité de la nucléoline de surface à induire des signaux intracellulaires. Dans ces études, le pseudopeptide anti-VIH

HB-19, a été utilisé comme ligand spécifique de la nucléoline. J'ai montré que la fixation d'un ligand sur la nucléoline de surface peut entraîner, de façon directe ou indirecte, l'entrée de calcium dans la cellule. Cependant, les mécanismes exacts par lesquels la nucléoline induit des signaux dans la cellule restent à déterminer : seule l'intervention des canaux SOC a pu être mise en évidence.

J'émetts, à cet effet, l'hypothèse que la fixation d'un ligand, puisse induire l'interaction de la nucléoline avec un autre récepteur à la surface membranaire, lui-même capable d'activer le système SOCE. Cette interaction entre la nucléoline et un autre récepteur pourrait être due soit à un changement de conformation de la nucléoline de surface, soit à une modification de la distribution de la nucléoline à la surface. Mes travaux sur la capacité de la nucléoline N-glycosylée d'interagir avec elle-même viennent étayer cette hypothèse.

En effet, dans le deuxième volet de mes études, j'ai tenté de mettre en évidence une relation entre une spécificité structurale de la nucléoline de surface, la N-glycosylation, et son rôle de récepteur sur les cellules, plus particulièrement sa capacité d'interaction avec elle-même et avec certains de ses ligands. Dans ce but, j'ai conçu et produit des outils me permettant d'étudier de façon précise l'impact de chacun des N-glycanes dans les interactions de la nucléoline. Les protéines ainsi exprimées par le système baculovirus/cellules d'insecte sont conformées et possèdent des N-glycanes de type paucimannosidiques, propres aux études d'interactions.

Mes études suggèrent que la nucléoline est capable d'interagir sur elle-même et que sa N-glycosylation modifie cette capacité. La N-glycosylation semble donc essentielle dans la capacité de la nucléoline à former des oligomères et à s'agréger. D'un point de vue physiologique, cette capacité permettrait d'expliquer la fonctionnalité de la nucléoline à la surface cellulaire. En effet, l'association de la nucléoline à la surface semble dépendante des lipid rafts auxquels elle semble associée en complexe supramoléculaire. Il semble possible que la nucléoline glycosylée soit agrégée à la surface cellulaire, et que la fixation d'un ligand induise un déplacement de l'affinité de la nucléoline pour elle-même, participant ainsi à sa redistribution. Cette redistribution

pourrait permettre l'activation des voies de signalisation. Par ailleurs, l'influence que pourrait avoir la N-glycosylation dans les interactions de la nucléoline avec les ligands que nous avons étudiés est moins marquée, cette modification post-traductionnelle ne semblant pas être capable de moduler, de manière significative, la fixation de ligands naturels de la nucléoline de surface, tout au moins de ceux utilisés dans mes études. Par contre, des différences ont été observées dans la capacité d'interaction de la nucléoline, en fonction de sa N-glycosylation, avec un ligand non spécifique, à priori, de la nucléoline de surface, l'héparine, ou un ligand spécifique de la nucléoline intracellulaire : l'ARN NRE. Dans le second cas, on pourrait émettre l'hypothèse que la N-glycosylation modifie la capacité de la nucléoline à se fixer sur les acides nucléiques, et favorise ainsi sa ségrégation dans la cellule et son trafic intracellulaire. Concernant l'héparine, un glycosaminoglycane sulfaté représentatif de ceux portés par les protéoglycanes de la surface cellulaire, mes résultats confirment l'hypothèse émise ci-dessus : la N-glycosylation de la nucléoline jouerait, en diminuant sa capacité d'interaction avec les protéoglycanes, un rôle dans la distribution et l'organisation de la protéine à la surface des cellules.

Dans une troisième et dernière partie de mes études, j'ai étudié l'influence de la N-glycosylation sur le trafic intracellulaire de la nucléoline et son expression à la surface des cellules.

Le trafic de la nucléoline demeure mal connu et, jusqu'à présent, seul son trafic nucléo-cytoplasmique et la régulation de ce trafic ont été définis. Si l'on considère les localisations multiples de la nucléoline dans la cellule, alors qu'elle ne présente ni signal de sécrétion ni séquence de localisation dans sa séquence primaire, autre que la NLS, on peut déduire que son trafic est très certainement atypique.

On sait de la littérature que la nucléoline possède un trafic vésiculaire permettant sa sécrétion, et qu'elle est ensuite associée aux lipid rafts de la membrane plasmique par des interactions hydrophobes (Hovanessian *et al.*, 2000). En collaboration avec l'équipe d'A. Hovanessian, par marquage métabolique et traitement des cellules à la tunicamycine, je démontre que la N-glycosylation est essentielle pour l'expression de la

nucléoline à la surface cellulaire (article présenté dans la première partie de notre travail). Ce résultat est confirmé par des études de cytofluorimétrie en flux sur des cellules surexprimant la nucléoline recombinante et ses mutants de N-glycosylation en cellules de mammifère.

En effet, afin d'étudier le trafic intracellulaire de la molécule et le rôle éventuel joué par la N-glycosylation dans ce trafic, j'ai conçu et utilisé un panel de 12 constructions plasmidiques permettant la surexpression de diverses formes mutées de la nucléoline fusionnées à l'étiquette 3X-Flag : avec ou sans NLS, avec ou sans domaine N-terminal, et N-glycosylables ou non. J'ai ainsi établi que la N-glycosylation est requise pour l'expression de la nucléoline à la surface cellulaire, mais sans prépondérance d'un site de N-glycosylation par rapport à l'autre. J'émetts donc l'hypothèse que la totalité du pool de nucléoline suit une voie unique de sécrétion, et que la ségrégation des formes sécrétées ou non se fait sur la reconnaissance ou la non reconnaissance d'une copule glycanique sur la nucléoline. Par ailleurs, j'ai établi que la nucléoline transite par les citernes trans-golgiennes et les endosomes précoces. Ce passage pourrait s'effectuer au cours de la synthèse, la sécrétion, ou encore la ré-internalisation de la nucléoline de surface, cependant, la nucléoline ne semble pas transiter par le réticulum, ou du moins ne semble pas s'y accumuler. Mes travaux ont également montré une colocalisation massive dans les endosomes précoces, indépendante de la présence ou non du domaine N-terminal, de la NLS ou de la capacité de N-glycosylation. On peut émettre l'hypothèse selon laquelle toute la nucléoline produite se retrouverait à un moment de son existence dans les endosomes précoces, une partie étant alors dirigée vers les endosomes tardifs, tandis que l'autre partie serait redirigée vers le trans-Golgi (Espinosa *et al.*, 2009).

La réalisation de ce projet a permis d'établir plus précisément le rôle de la glycosylation atypique de la nucléoline, et de mieux appréhender les modes de régulation du pool extranucléaire de la nucléoline. J'ai démontré que la nucléoline de surface glycosylée possède des fonctions de signalisation intracellulaire spécifiques, et j'ai mis en évidence l'importance de la N-glycosylation dans son expression à la surface et son organisation à la surface cellulaire, démontrant ainsi un nouvel aspect d'une régulation par N-glycosylation. Cependant, certains points restent à préciser ou déterminer.

2. PERSPECTIVES

2.1. Caractérisation précise des mécanismes par lesquels la nucléoline de surface glycosylée exerce ses rôles de récepteur et de molécule de signalisation

Nous avons démontré que la nucléoline de surface est capable d'induire des voies de signalisation, et ce vraisemblablement suite à une réorganisation de la nucléoline à la surface cellulaire. Il serait intéressant de préciser la nature des voies de signalisation concernées, et surtout d'étudier l'influence réelle de la N-glycosylation sur l'assemblage à la surface cellulaire de la nucléoline et des complexes de nucléoline retrouvés au niveau des lipid rafts. Le facteur limitant pour cette étude reste cependant encore le manque d'informations sur l'organisation structurale réelle de la protéine, en solution et, plus encore, à la surface membranaire des cellules.

Afin de valider nos conclusions et hypothèses concernant le rôle de la N-glycosylation dans les interactions de la nucléoline avec ses ligands, il serait utile d'élargir la gamme des ligands étudiés. En effet, à l'intérieur de la cellule, la nucléoline interagit avec de nombreuses protéines dont les protéines ribosomales, l'histone H1 ou la protéine B23, mais également avec les ARNr par des séquences spécifiques autres que les NRE, comme les ECM (evolutionary conserved motif), ou l'ARNm de Bcl-2. De même, à la surface cellulaire, elle interagit avec différents ligands solubles comme la cytokine midkine et des constituants de la membrane et de la matrice extra-cellulaire : L-sélectine, protéoglycanes, motifs polylactosaminyles des cellules Jurkat apoptotiques. L'étude des interactions de nos protéines recombinantes, glycosylées ou non, avec ces ligands pourrait être envisagée. Par ailleurs, pour ces études, une optimisation de notre système de production baculovirus/cellules d'insecte, visant à obtenir des protéines dont les N-glycanes sont identiques à ceux de la nucléoline humaine native, serait possible grâce à l'utilisation des cellules Hi-Five mimics (Harrison et Jarvis, 2006).

Pour appréhender le rôle de la N-glycosylation dans les interactions de la nucléoline avec ses ligands, il serait possible de réaliser une étude protéomique comparée des différents ligands de la nucléoline, glycosylée ou non, permettant d'identifier les ligands spécifiques de chacune des isoformes. Dans ce but, des colonnes d'affinité où seraient greffées les différentes isoformes glycosylées de la nucléoline recombinante pourraient être utilisées pour retenir sélectivement les ligands contenus dans des lysats cellulaires totaux. Les protéines retenues seraient alors séparées en électrophorèse bidimensionnelle (DIGE) et analysées en spectrométrie de masse. Sur le même principe, la technique de « ligand fishing » sur Biacore couplé à la spectrométrie de masse, pourrait être mise en oeuvre.

Les études de microscopie sont également à approfondir. Il serait intéressant de vérifier, grâce à des inhibiteurs du transport entre le réticulum endoplasmique et le Golgi, mais également du transport entre le Golgi et la surface cellulaire, si la nucléoline suit la voie de sécrétion classique malgré l'absence de séquence signal. De même, il serait intéressant de regarder s'il existe une colocalisation de la nucléoline avec des protéines permettant la fusion des endosomes précoces avec le Golgi. Des expériences de FRET (fluorescence resonance energy transmission) sont à envisager pour déterminer la face d'attachement de la nucléoline aux endosomes. Enfin, des expériences de fractionnement cellulaire et de chasse métabolique nous permettraient de confirmer nos résultats et de caractériser plus précisément les différents compartiments empruntés par la nucléoline lors de sa synthèse et sa sécrétion.

2.2. La glycosylation de la nucléoline s'inscrit-elle dans un mécanisme commun à d'autres protéines intracellulaires ?

La question se pose de savoir si la glycosylation atypique de la nucléoline est unique, ou si elle s'applique à d'autres protéines, décrites par Arnoys et Wang (Arnoys and Wang, 2007), dont le trafic est lui aussi atypique. Nous envisageons, à plus long terme, de rechercher si d'autres protéines cytosoliques peuvent être N-glycosylées. Dans ce but, la fraction cytosolique de cellules Jurkat, facilement cultivables à l'échelle

préparative, sera purifiée sur colonne de lectine immobilisée, (concanavaline A-Sepharose, par exemple). Les protéines retenues seront séparées par électrophorèse, puis identifiées par spectrométrie de masse (empreinte tryptique/ MALDI-TOF, MS-MS). Nous pourrions ainsi en conclure si la N-glycosylation de la nucléoline extranucléaire est un cas isolé ou si elle constitue une modification post-traductionnelle de certaines protéines cytosoliques et/ou nucléaires, qui n'aurait pas encore été décrites en raison de la très faible représentation des formes glycosylées. Le cas échéant, il serait intéressant de vérifier si cette glycosylation intervient lors du processus cellulaire normal ou lors d'un processus cancéreux.

Nous serons alors en mesure de préciser si la N-glycosylation cytosolique est un épiphénomène, ou s'il s'agit d'un autre système de modulation de la fonction et/ou du trafic de certaines protéines. En utilisant la nucléoline comme modèle, nous serons en mesure de décrire plus précisément ce modèle.

2.3. Caractérisation et étude du rôle de la O-glycosylation de la nucléoline.

Pour les raisons évoquées dans la partie « Problématique et Stratégies » de ce manuscrit (voir Généralités § 8, p.57), je me suis limitée à l'étude du rôle de la N-glycosylation dans les fonctions et le trafic de la nucléoline. Il serait très intéressant d'étudier également le(s) rôle(s) des deux O-glycosylations qui ont été mises en évidence dans les motifs basiques TPXKK de la région N-terminale, sans toutefois être localisées plus précisément (Carpentier *et al.*, 2005). Une étude bioinformatique a permis de localiser 5 sites potentiels de O-glycosylation sur les thréonines 83, 91, 104, 105, 112 dans le domaine N-terminal, parmi les motifs répétitifs TPXKK interagissant avec l'histone H1, suggérant un rôle éventuel de la O-glycosylation dans les fonctions de la nucléoline.

Dans un premier temps, afin de préciser la position des motifs O-glycosylés dans l'isoforme glycosylée, la position exacte des 2 O-glycanes sera déterminée par analyse des glycopeptides en spectrométrie de masse (coupures enzymatiques, MS-MS...). Dans un

deuxième temps, nous établirons des mutants des sites de O-glycosylation, que nous produirons en cellules de mammifère pour étudier le rôle de la O-glycosylation dans le trafic (modification des constructions de surexpression déjà existantes par mutation dirigée des sites de O-glycosylation), et son rôle dans les fonctions et interactions de la nucléoline (production par amplification génique).

Ces recherches pourront s'inscrire dans un projet à plus long terme où le rôle précis de la O-glycosylation sera déterminé et, surtout, dans lequel la O-glycosylation d'autres molécules cytosoliques au trafic « atypique » pourra être recherchée.

Appendice technique

APPENDICE TECHNIQUE

1. CULTURE CELLULAIRE

1.1. Culture des cellules d'insecte Sf9 et High-Five

Les cellules Sf9 sont des cellules ovariennes de lépidoptère, *Spodoptera frugiperda*, cultivées à 27°C dans du milieu Max-XP (BD Biosciences) complété avec 1% de sérum de veau foetal (SVF) (Cambrex), 2 mM de glutamine et 50 µg/ml de gentamycine.

Les cellules High-Five (BTI-TN-5B1-4) proviennent de cellules de *Trichoplusia ni* et sont cultivées à 27°C dans du milieu Express-Five (Cambrex) complété avec 20 mM de glutamine et 50 µg/ml de gentamycine. Les cellules sont divisées tous les deux jours par dilution au 1/3.

1.2. Culture des cellules humaines Hela et HEK-Flp 293

Les cellules Hela sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide et à 5% de CO₂ dans le milieu de croissance DMEM (Cambrex) complété avec 10% de SVF (Lonza), 2 mM de glutamine et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine. Les cellules sont divisées tous les 3 jours par dilution au 1/15.

Les cellules HEK-Flp 293 (Invitrogen) sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide et à 5% de CO₂ dans le milieu de croissance DMEM (Cambrex) complété avec 10% de SVF sans tétracycline (Clontech), 2 mM de glutamine et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine. Les cellules sont divisées tous les 3 jours par dilution au 1/5.

2. CONSTRUCTIONS ET TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

2.1. Constructions plasmidiques pour l'expression en cellules d'insecte

Afin d'obtenir les différents mutants protéiques, nous avons utilisé un vecteur de transfert dérivé de pAcSecG2T (Pharming), appelé pAcSec Δ GST, et quatre inserts codant pour la séquence de la nucléoline mutée ou non au niveau de ses sites de N-glycosylation, et privée de son domaine N-terminal. Le vecteur a été modifié par mutagenèse de pAcSecG2T afin d'introduire un site BamH1 en amont de la séquence de la GST et d'ôter celle-ci (le couple d'amorces est indiqué dans le Tableau 4, p.171). Le plasmide de transfert utilisé permet une lecture en phase des inserts codant pour la nucléoline avec la séquence de sécrétion de la gp67. La synthèse est placée sous le contrôle transcriptionnel du promoteur de la polyhédrine.

Au laboratoire, les ADNc de la nucléoline « pleine taille » native (NUC), ou mutée sur ses sites de N-glycosylation (RBD1, RBD3 et RBD13), ont été précédemment clonés dans le vecteur pTRE-HA (Clontech) entre les sites Sfi1 et Not1. La mutation des sites de glycosylation a été obtenue précédemment par mutagenèse des résidus d'asparagine 317 et 492 en résidus d'alanine par le kit Quickchange XL II (Stratagene).

Les différentes constructions ont été obtenues par la même stratégie qui consiste en l'insertion d'un site BamH1 soit sur le vecteur, soit sur l'insert d'intérêt, afin d'obtenir des extrémités cohésives, propres à leur ligation après hydrolyse par l'enzyme de restriction.

Les quatre types d'insert dépourvus de la séquence codant pour le domaine N-terminal ont été obtenus par insertion par mutagenèse d'un site BamH1 en aval de la séquence NLS de l'ADNc cloné préalablement au laboratoire dans les vecteurs pTRE-HA (le couple d'amorces est indiqué dans le Tableau 4, p.171). Les inserts ainsi obtenus sont :

- **NCT** obtenu à partir de NUC,
- **R1CT** obtenu à partir de RBD1,
- **R3CT** obtenu à partir de RBD3,
- **RCT** obtenu à partir de RBD13.

L'insertion du site BamH1 a été effectuée par mutagenèse dirigée suivant le protocole du kit Quickchange XL II (Stratagene). Des amorces spécifiques, détaillées dans le tableau 4, ont été utilisées pour amplifier 1 µg du vecteur matrice d'intérêt par l'ADN polymérase PfuUltra (Stratagene) lors d'une PCR de 18 cycles avec une température d'hybridation de 60°C, puis la matrice d'ADN méthylée est digérée par Dpn1. Des bactéries XL-10 compétentes sont alors transformées par choc thermique par le produit de PCR obtenu, puis mises en culture et sélectionnées sur boîtes LB/ampicilline (100 µg/ml). Les plasmides des colonies résistantes sont extraits par le kit QIAprep Spin miniprep (Qiagen). Les vecteurs obtenus sont hydrolysés séquentiellement par BamH1 et EcoR1, 2 h à 37°C. Les produits d'hydrolyses sont séparés sur gel d'agarose/TAE à 1% et l'ADN est extrait par le kit Gel extraction kit (Qiagen). La ligation de 100 ng de l'insert avec 150 ng de vecteur linéarisé est réalisée par la T4 DNA ligase (Invitrogen) selon un rapport molaire de 6:1 afin d'obtenir le construit désiré. Des bactéries XL-10 Gold compétentes sont transformées et sélectionnées comme décrit ci-dessus. L'ADN des clones résistants est extrait par le kit QIAprep Spin miniprep (Qiagen). Les constructions sont vérifiées par séquençage automatique de la totalité des inserts (Société Genoscreen, Lille).

Constructions	Vecteurs matrice	Couples d'amorces
pAcSecΔGST	pAcSecG2T	PACBAMHsens (5'-CCTTTGCGGATCTGATGTCCCCTGGATCCGC-3') PACBAMHreve (5'-GCACAAGGCCCTTAATTTCCAATAACCGGA-3')
NCT	pTREHA-NUC	BamH2sens
R1CT	pTREHA-RBD1	(5'-GCCAAACAGAAAGCAGCTCCTGGATCCAAGAAACAG-3')
R3CT	pTREHA-RBD3	BamH2reve
RCT	pTREHA-RBD13	(5'-GTGCCCTTCCACTTTCTGTTTCTTGGATCCAGGAGCTGCTTTC-3')

Tableau 4 : Amorces et vecteurs matrices utilisés permettant l'obtention des constructions plasmidiques pour l'expression en cellules d'insecte des isoformes, glycosylées ou non, dérivées de la nucléoline humaine.

2.2. Constructions plasmidiques pour la surexpression en cellules de mammifère

Afin d'obtenir les différentes constructions permettant la surexpression de la nucléoline en cellules de mammifère, nous avons utilisé le plasmide pcDNA5/FRT/TO dans lequel ont été insérés, entre les sites BamH1 et Not1 de son site de polyclonage, les inserts permettant l'expression de la nucléoline glycosylable sur ses 2 sites de N-glycosylation (**NUC**), glycosylable sur son deuxième site de N-glycosylation (**RBD1**), glycosylable sur son premier site de N-glycosylation (**RBD3**), ou non glycosylable sur ses deux sites de N-glycosylation (**RBD13**).

Les différentes constructions de la nucléoline « pleine taille » (pcDNA5-3XFlag NUC, pcDNA5-3XFlag RBD1, pcDNA5-3XFlag RBD3 et pcDNA5-3XFlag RBD13) ont été obtenues selon la même stratégie qui consiste en l'insertion d'une étiquette 3X-flag, suivie d'un site Sfi1, et contenue dans l'amorce en 5'. Ces inserts sont issus d'une amplification par PCR des vecteurs pTREHA obtenus précédemment au laboratoire en utilisant les amorces présentées dans le tableau 5, p.174. Le vecteur pcDNA5/FRT/TO et les inserts obtenus sont hydrolysés séquentiellement par BamH1 et Not1, 2 h à 37°C. La ligation de 100 ng de l'insert avec 150 ng de vecteur linéarisé est réalisée par la T4 DNA ligase (Invitrogen) selon un rapport molaire de 3:1, afin d'obtenir le construit désiré. Des bactéries XL-10 Gold compétentes sont transformées et sélectionnées comme décrit ci-dessus ; l'ADN des clones résistants est extrait par le kit QIAprep Spin miniprep (Qiagen).

Les quatre constructions comportant la nucléoline mutée sur sa séquence NLS (pcDNA5-3XFlag NUC Δ NLS, pcDNA5-3XFlag RBD1 Δ NLS, pcDNA5-3XFlag RBD3 Δ NLS et pcDNA5-3XFlag RBD13 Δ NLS) sont obtenues par amplification séquentielle des inserts préalablement clonés dans le vecteur pcDNA5/FRT/TO. La première partie de l'insert (correspondant au domaine N-terminal de la protéine) est amplifiée, entre le site Sfi1 (en amont de l'ATG) et la séquence NLS, par les amorces 3XFlagSfiSens et NUCNLSREVE. La seconde partie (correspondant aux deux tiers C-terminaux de la protéine) est amplifiée par PCR, entre la séquence NLS et le site Not1, par les amorces NUCNLSSENS et Reve4. Le vecteur pcDNA5-3Xflag et les inserts obtenus sont hydrolysés séquentiellement par Sfi1 et Not1, 2 h à 37°C. La ligation de 100 ng du premier insert avec 100 ng du second insert

et 150 ng de vecteur linéarisé est réalisée par la T4 DNA ligase (Invitrogen), selon un rapport molaire de 9:3:1, afin d'obtenir le construit désiré. Des bactéries XL-10 Gold compétentes sont transformées et sélectionnées comme décrit ci-dessus, l'ADN des clones résistants est extrait par le kit QIAprep Spin miniprep (Qiagen).

Les constructions pcDNA5-3XFlag NUC Δ Nterm, pcDNA5-3XFlag RBD1 Δ Nterm, pcDNA5-3XFlag RBD3 Δ Nterm et pcDNA5-3XFlag RBD13 Δ Nterm sont obtenues par hydrolyse enzymatique Sfi1 des vecteurs pcDNA5-3XFlag NUC Δ NLS, pcDNA5-3XFlag RBD1 Δ NLS, pcDNA5-3XFlag RBD3 Δ NLS et pcDNA5-3XFlag RBD13 Δ NLS libérant un fragment d'environ 600 bp. Les vecteurs ainsi linéarisés sont séparés sur gel d'agarose, extraits et réassociés comme décrit dans le paragraphe 2.1 de l'Appendice technique, p. 170. Après transformation et amplification, les constructions sont vérifiées par séquençage automatique intégral des inserts (Société Genoscreen).

Constructions	Vecteurs matrices	Couples d'amorces
pcDNA5-3XFlag NUC	pTREHA-NUC	SEQ3XNUC : (5'-GCTCGGATCCATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAA GATCATGACATCGATTA CAAGGATGACGATGACAAAGCTTGGGGCCATGGAGGCCATGGTGAAGCTCGCGAA-3')
pcDNA5-3XFlag RBD1	pTREHA-RBD1	Reve4 : (5'-CAAGGGTCCCCAAACTCACCC-3')
pcDNA5-3XFlag RBD3	pTREHA-RBD3	
pcDNA5-3XFlag RBD13	pTREHA-RBD13	
pcDNA5-3XFlag NUCΔNLS	pcDNA5-3XFlag NUC	Couple 1 : 3XFlag Sfisens :
pcDNA5-3XFlag RBD1ΔNLS	pcDNA5-3XFlag RBD1	(5'-CGATGACAAGCTTGGGGCCATGGAGGCCATGG-3')
pcDNA5-3XFlag RBD3ΔNLS	pcDNA5-3XFlag RBD3	NUCNLSREVE : (5'-GCCTCCACTTTGGCCTCCATGGCCTCAGGAGCTGCTTTCTGTTTGGCCATTTCTT- GCTGTTGTTGTCAGGTGCTTCTTTGACAGGC-3')
pcDNA5-3XFlag RBD13ΔNLS	pcDNA5-3XFlag RBD13	Couple 2 : NUCNLSSENS : (5'-GCCTGTCAAAGAAGCACCTGGACAAACAAAGCAAGAAATGGCCAAACAGAAA GCA- GCTCCTGAGGCCATGGAGGCCAAAGTGGAAAGGC-3')
		Reve4 : (5'-CAAGGGTCCCCAAACTCACCC-3')
		Rev4 : CAAGGGTCCCCAAACTCACCC

Tableau 5 : Amorces et vecteurs matrices utilisés permettant l'obtention des constructions plasmidiques pour l'expression en cellules de mammifère des isoformes, glycosylées ou non, de la nucléoline humaine

2.3. Constructions plasmidiques pour l'expression dans *Pichia pastoris*

Les constructions plasmidiques utilisées pour la production dans la levure *Pichia pastoris* ont été obtenues par insertion des séquences codant pour la nucléoline N-glycosylable sur ses deux sites, N-glycosylable sur un seul site, ou non N-glycosylable, dans le plasmide pPIC9K du kit Multi-Copy *Pichia* Expression Kit (Invitrogen). Le plasmide pPIC9K (Figure 51, p. 175) permet d'intégrer le gène d'intérêt au génome de la levure en aval du promoteur de l'oxydase alcoolique AOX1 inductible au méthanol. De plus, ce plasmide contient la séquence de sécrétion de l' α -factor en amont du site d'insertion du gène d'intérêt. Les ADNc de la nucléoline, mutée ou non sur ses sites de N-glycosylation, clonés préalablement dans le vecteur pTREHA sont amplifiés par PCR avec des amorces contenant les sites de restrictions *Sna*B1 et *Not*1 permettant l'insertion dans le site de polyclonage du vecteur pPIC9K. Les coupures enzymatiques, la ligation, la transformation bactérienne et l'amplification des plasmides sont effectuées de la même façon que celle décrite dans le paragraphe 2.1 de l'Appendice technique, p. 170. Après séquençage, les constructions sont utilisées pour transformer les levures (voir § 3.2 de l'Appendice technique, p.177).

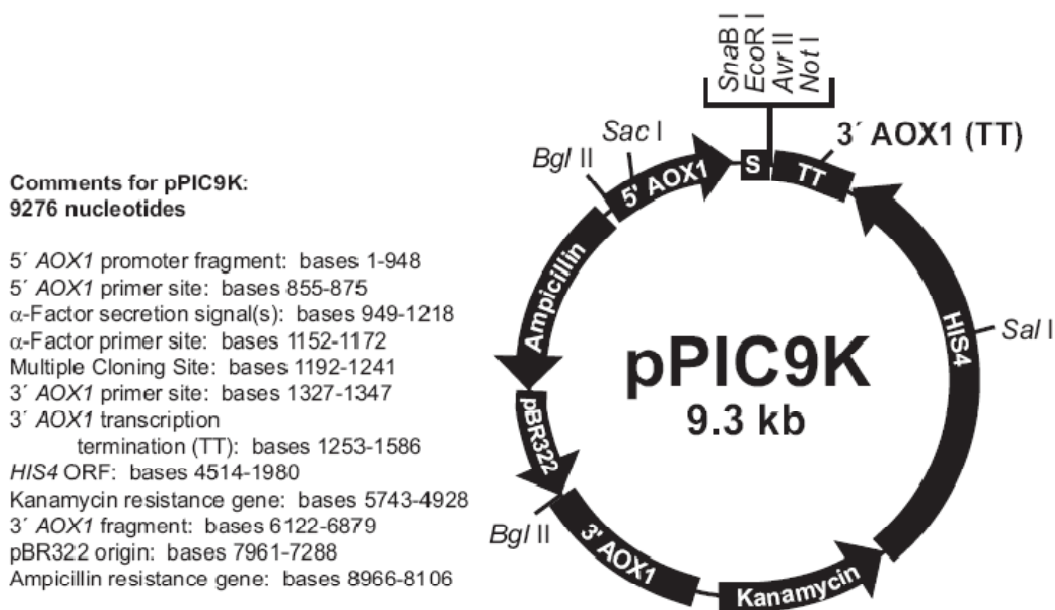


Figure 51 : Schéma du vecteur pPIC9K utilisé pour la surexpression de la nucléoline humaine dans *Pichia pastoris* (Invitrogen)

3. METHODES DE TRANSFECTION ET D'EXPRESSION DES PROTEINES RECOMBINANTES

3.1. Transfection, infection et production en cellules d'insecte

3.1.1. Transfection par le système baculovirus et amplification virale

Dans un premier temps, les cellules d'insecte sont co-transfectées par les constructions décrites ci-dessus et de l'ADN de baculovirus linéarisé. Dans la cellule, une recombinaison homologue des co-vecteurs contenant l'insert et de l'ADN viral linéarisé permet la recircularisation de l'ADN viral et l'obtention des baculovirus recombinants.

Le système baculovirus utilisé est le système BD BaculoGold™ Bright (Pharming) qui permet l'expression de la GFP dans les cellules d'insecte infectées après recombinaison de l'ADN viral linéarisé avec le vecteur de transfert. L'expression de cette GFP dans les cellules a été utilisée pour contrôler le niveau d'infection et d'expression des cellules par cytofluorimétrie en flux (FACScan - Becton-Dickinson, France). Pour chaque transfection, 500 ng du plasmide de transfert recombinant sont mis en présence de 100 ng de l'ADN viral linéarisé, puis additionnés de 5 µl de Flyfectin™ (OZ Biosciences), incubés à température ambiante 20 min dans un volume final de 1,5 ml de milieu Max XP sans sérum. Les 1,5 ml de liposomes obtenus sont déposés sur les cellules Sf9 d'un puits de 9 cm² à 60% de confluence. Les cellules sont ensuite incubées à 27°C et, après 5 h, le milieu de co-transfection est changé par du milieu Max-XP frais. Le surnageant des cellules transfectées contenant les baculovirus recombinants est récupéré après 5 jours. Les virus sont amplifiés par ajout de 1 ml de solution virale dans une boîte de cellules Sf9 de 25 cm² contenant 4 ml de milieu. Le surnageant d'amplification est récolté après 4 jours de culture à 27°C. Le surnageant récolté est centrifugé 5 min à 1000 g, puis stocké à 4°C quelques semaines et ensuite à -80°C. Ces surnageants, dont le titre en particules virales est élevé ($\geq 2 \times 10^5$ virus/µl), sont utilisés pour infecter les cellules High-Five à des fins d'expression des protéines recombinantes.

3.1.2. Production en cellules d'insecte

La production des protéines recombinantes est effectuée en cellules High-Five cultivées en boîtes de 175 cm². Les cellules sont infectées par ajout de 4% (v/v) de surnageant de culture à haute teneur en virus (>2.10⁵ virus/μl) dans le milieu de croissance de cellules à 70% de confluence. Les cellules sont cultivées pendant 5 jours, puis sont décollées dans leur milieu de culture. Le surnageant et le culot cellulaire sont alors séparés par centrifugation 10 min à 10000 g. Le surnageant est stocké à -20°C ou soumis immédiatement à la chromatographie sur échanges d'ions pour la purification de la protéine recombinante.

3.2. Transfection, sélection et expression dans *Pichia pastoris*

Nous avons utilisé les constructions obtenues dans le vecteur pPIC9K pour transformer la souche de levure GS 115 déficiente dans le gène *His4*, selon le protocole du kit Multi-Copy Pichia Expression Kit (Invitrogen). L'insertion dans le génome du gène d'intérêt se fait par l'intermédiaire d'un double « crossing over » au niveau du gène AOX1. Pour favoriser la recombinaison du vecteur contenant le gène d'intérêt et la partie du génome contenant le gène AOX1, 12 μg de vecteur ont été linéarisés par incubation 1 h 30 à 37°C avec l'enzyme Sac1 (Biolabs). En parallèle, des cellules GS115 ont été rendues compétentes. Brièvement, les cellules sont étalées sur un milieu gélosé YPD (extrait de levure 1% ; peptone 2% ; dextrose 2%). Une colonie isolée est remise en culture liquide dans 10 ml de YPD et incubée sous agitation 10 h à 29°C. La préculture ainsi obtenue sert à ensemercer 125 ml de YPD liquide, incubé sous agitation une nuit à 29°C. Lorsque la DO à 600 nm de la culture atteint 1,5, les cellules sont centrifugées 10 min à 3000 g. Le culot cellulaire est repris par 25 ml de YPD-Hepes, DTT 1 M et incubées 15 min à 30°C. Les cellules sont alors lavées 2 fois par 100 ml d'eau stérile. Puis, le culot est repris dans 5 ml de sorbitol 1 M, recentrifugé 10 min à 3000 g et repris dans 1,25 ml de sorbitol. Enfin, 80 μl des cellules sont électroporées en présence des vecteurs linéarisés dans un électroporateur Electro Cell Manipulator (BTX Electroporation system). Les cellules ainsi électroporées sont sélectionnées selon différents criblages. Le premier consiste en

l'étalement des levures sur un milieu gélosé MD (yeast nitrogen base 1,34% ; biotine 1/10000 ; dextrose 2%) et incubées 3 jours à 29°C. Le deuxième criblage consiste en un repiquage des colonies s'étant développées sur MD, sur un milieu YPD gélosé contenant différentes concentrations de généticine, à des fins de sélection des cellules résistantes à l'antibiotique. Après 3 jours à 29°C, les colonies obtenues sur les plus fortes doses de généticine sont remise en culture liquide 48 h à 29°C dans 10 ml de BMGY phosphate de potassium 100 mM, pH 6 ; extrait de levure 1 % ; peptone 2 % ; yeast nitrogen base 1,34 % ; biotine 1/10000 ; glycérol 1%). Puis, les cellules sont culottées et resuspendues dans 2 ml de BMM (phosphate de potassium 100 mM, pH 6 ; yeast nitrogen base 1,34 % ; biotine 1/10000 ; méthanol 0,5 %) et incubées 48 h à 29°C sous agitation. Après centrifugation, les surnageants sont analysés en SDS-PAGE afin de sélectionner les clones exprimant la protéine d'intérêt. Les cellules sont conservées dans du YPD, glycérol 15% à -80°C.

La production de masse des protéines recombinantes est effectuée après étalement de 2 µl de suspension cellulaire sur YPD gélosé incubé 48 h à 29°C. Après 2 jours, une colonie est utilisée pour ensemercer 10 ml de BMGY, et mise à incuber jusqu'à obtenir une DO à 600 nm de la culture entre 4 et 6. 200 µl de la pré-culture servent alors à ensemercer 200 ml de BMGY. Les 200 ml sont incubés 72 h à 29°C puis, lorsque la DO est comprise entre 40 et 60, les cellules sont centrifugées à 3000 g pendant 10 min, et resuspendues dans 200 ml de BMM avec de l'antifoam 289 (Sigma). La culture de 200 ml est incubée 4 jours à 29°C et induite par 1 ml de méthanol, ajouté chaque jour. Après 4 jours, les cultures sont centrifugées à 3000 g pendant 10 min, et les surnageants sont stockés à 4°C.

3.3. Transfections stables et transitoires en cellules de mammifère

3.3.1. Transfection stable des cellules HEK-Flp 293

Les 12 constructions décrites dans le chapitre 3 paragraphe 1 sont co-transfectées stablement avec le plasmide pOG44 (qui exprime la recombinase Flp) dans des cellules HEK-Flp 293 (Invitrogen). Les cellules HEK-Flp sont cultivées dans des boîtes de 25 cm²

jusqu'à 75% de confluence dans le milieu de croissance DMEM (Cambrex) complété avec 10% de SVF sans tétracycline (Clontech), 2 mM de glutamine et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine. Le milieu est remplacé par 1,5 ml de DMEM seul. Vingt µl de Dreamfect (OZ biosciences) sont incubés pendant 5 min dans 250 µl de milieu DMEM. Parallèlement, 5 µg de chaque plasmide à transférer sont incubés dans 250 µl de milieu DMEM. Les deux solutions sont ensuite mélangées et incubées 20 min à température ambiante. Les 500 µl de milieu de transfection sont ajoutés aux cellules d'une boîte de 25 cm² pendant 4 h à 37°C. Après 4 h, le milieu de transfection est remplacé par le milieu de croissance classique. Afin de sélectionner des populations cellulaires homogènes de cellules exprimant chaque forme mutée de la nucléoline, 48h après transfection, un sous-clonage a été effectué pendant une période de 6 semaines, en présence d'un milieu de croissance complété par 200 µg/ml d'hygromycine.

3.3.2. Transfection transitoire des cellules Hela

Les cellules Hela sont cultivées sur des lamelles rondes dans des plaques 6 puits jusqu'à 75% de confluence dans le milieu de croissance DMEM (Cambrex) complété avec 10% de SVF (Lonza), 2 mM de glutamine et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine, puis est remplacé par 800 µl de milieu OptiMEM (Gibco). Pour chaque puits, 6 µl de lipofectamine 2000 (Invitrogen) sont incubés 5 min dans 100 µl de milieu OptiMEM. Parallèlement, 1 µg de chaque plasmide à transférer est ajouté dans 100 µl de milieu OptiMEM. Puis, la lipofectamine est mélangée à la solution de plasmide et incubée 20 min à température ambiante. Les 200 µl de milieu de transfection sont ajoutés aux cellules pendant 4 h à 37°C. Après 4 h, le milieu de transfection est remplacé par le milieu de croissance classique.

4. ANALYSES BIOCHIMIQUES ET STRUCTURALES DES PROTEINES RECOMBINANTES PRODUITES EN CELLULES D'INSECTE

4.1. Cinétique d'expression de la protéine NCT dans les cellules High-five en fonction de la durée d'infection par les baculovirus

Les cellules High-Five sont infectées comme décrit précédemment. Les surnageants des cellules infectées sont récupérés 24, 48, 72, 96 et 120 h après infection. Puis, les surnageants (100 µl) sont mis en présence de tampon échantillon (3X) (Tris/HCl 100 mM, pH 6,8 ; dodecylsulfate de sodium (SDS) 6% (p/v) ; sucrose 30% (p/v) ; β-mercaptoéthanol 15% (v/v) ; bleu de bromophénol 0,015% (v/v)) et chauffés 10 min à 100°C.

Les protéines sont séparées, une nuit à 50 V, sur un gel de polyacrylamide (7,5%) contenant du SDS (SDS-PAGE). Elles sont ensuite électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose (Bioscience) durant 4 h 30 à 250 mA. La saturation de la membrane de nitrocellulose est effectuée pendant 2 h à température ambiante dans la solution de blocage (PBS, pH 7,5 ; sérumalbumine bovine (SAB) 3% (p/v); Tween 20 1% (v/v)). La membrane est incubée pendant une nuit à 4°C avec un anticorps monoclonal de souris anti-nucléoline humaine (C23 (MS-3): sc-8031– Santa Cruz Biotechnologies) dans le tampon de lavage (PBS, pH 7,5 ; Tween 20 0,1%; SAB 0,1%). Après chaque étape, la membrane est lavée 3 fois 5 min par ce même tampon. La membrane est incubée ensuite 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à l'HRP (horse radish peroxydase), dilué au 1/10000 (Amersham-Biosciences). Les bandes d'intérêt sont révélées par le kit de chemiluminescence ECL (Amersham-Biosciences). Après immunorévélation par l'anticorps anti-nucléoline, l'intensité de la bande correspondant à la protéine est estimée par densitométrie (Système Quantity one, Biorad). La quantité maximale observée est posée égale à 1, et les autres quantités sont représentées par rapport à cette référence.

4.2. Purification par chromatographie d'échange d'ions en FPLC des protéines recombinantes

La nucléoline recombinante est purifiée par chromatographie d'échange de cations en FPLC (Pharmacia). Les surnageants de production (175 ml) sont dilués 2 fois dans le tampon A (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 ; MgCl₂ 5 mM ; EDTA 0,1 mM ; Pefabloc (Roche) 1 mM) et additionnés de 5% (v/v) d'EDTA 100 mM et 2% (v/v) de NaOH 1 M, afin de fixer le pH à 7,5. Ils sont injectés sur une colonne de S-Sepharose Fastflow (Pharmacia) de 4 ml, équilibrée dans le tampon A. Le gel est lavé par 20 ml de tampon A, puis l'élution est effectuée en imposant un gradient de 0 à 60% en tampon B (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 ; MgCl₂ 5 mM ; EDTA 0,1 mM ; NaCl 1M ; Pefabloc 1 mM) pendant 60 min à un débit de 1 ml/min, puis de 60 à 100% de tampon B pendant 15 min à un débit de 1 ml/min. Les fractions protéiques obtenues sont concentrées par centrifugation (3000 g) sur des concentrateurs Vivaspin (Sartorius) à seuil de coupure de 10 kDa, et dialysées contre du bicarbonate d'ammonium 200 mM.

4.3. Séparation des protéines en SDS-PAGE en présence ou absence de β-mercaptoéthanol

Les protéines purifiées sont traitées pendant 10 min à 100°C en présence de tampon échantillon 3X avec β-mercaptoéthanol (Tris/HCl 100 mM, pH 6,8 ; dodecylsulfate de sodium (SDS) 6% (p/v) ; sucrose 30% (p/v) ; β-mercaptoéthanol 15% (v/v) ; bleu de bromophénol 0,015% (v/v)) ou sans β-mercaptoéthanol (Tris/HCl 100 mM, pH 6,8 ; dodecylsulfate de sodium (SDS) 6% (p/v) ; sucrose 30% (p/v) ; bleu de bromophénol 0,015% (v/v)). Les échantillons (généralement 3 µg de protéine/dépôt) sont alors séparés sur un gel SDS-PAGE 7,5% ou 10%. La migration est effectuée soit une nuit à 40 volts, soit 4-5 heures à 120 volts dans le tampon de course (Tris 25 mM /Glycine 0,192 M, pH 8,3, SDS 0,1%). Les protéines sont colorées par une solution de bleu de Coomassie (Bleu de Coomassie 0,25% ; méthanol 50% ; acide acétique 10%). Les gels sont décolorés en présence d'une solution d'éthanol 20% et acide acétique 7,5%.

4.4. Séparation des protéines sur gels d'acrylamide (PAGE) en conditions non dénaturantes

Les protéines sont analysées sur gels PAGE en conditions non dénaturantes à pH 7 ou 8,3, en présence ou absence de β -mercaptoéthanol.

Les gels PAGE à pH 7 verticaux (acrylamide/ bisacrylamide (30/1) 7,5 %, Tris/HCL 50 mM, pH 7,5 ; persulfate d'ammonium 1,5 %, riboflavine 0,004%, Temed 0,1%) ont été réalisés dans un système Protean II (Biorad) et soumis, après dépôt des protéines dans les puits (15 μ g de protéine dans 25 μ l du tampon de course additionné de 10% de glycérol, avec ou sans β -mercaptoéthanol 15%), à une électrophorèse de 14 heures à 40 volts dans un tampon de course Tris/diethylbarbiturate de sodium 50 mM, pH 7.

Les électrophorèses PAGE à pH 8,3 sur mini gels horizontaux ont été réalisées sur un appareil PhastSystem (Pharmacia/Ge Healthcare). Des blocs d'agarose servant de réservoir de tampon en contact direct avec les électrodes du système et les extrémités du mini-gel sont mis à incuber pendant une nuit dans du tampon Tris/glycine 25 mM, pH 8,3. Les blocs d'agarose sont disposés sur un Phastgel (Pharmacia/Ge Healthcare) réticulé à 7,5% et les protéines (2 μ g dans un volume final de 4 μ l de Tris/glycine 25 mM, pH 8,3, glycérol 10%, avec ou sans β -mercaptoéthanol 15%) sont déposées automatiquement par le système à la surface du gel. L'électrophorèse est réalisée pendant 60 minutes à 100 volts.

Les protéines sont colorées par une solution de Bleu de Coomassie (Bleu de Coomassie 0,25 % ; méthanol 50 % ; acide acétique 10 %) et le gel est décoloré en présence d'une solution d'éthanol 20 % et acide acétique 7,5 %.

4.5. Electrophorèse PAGE bidimensionnelle

Chaque protéine recombinante à analyser est déposée dans 2 puits (15 μ g de protéine/ dépôt) d'un gel PAGE en conditions non dénaturantes à pH 7 (voir protocole ci-dessus). Après migration, une des 2 pistes de migration est découpée et colorée au Bleu

de Coomassie pour servir de témoin de migration, tandis que la seconde piste est découpée, placée dans un tube Falcon de 15 ml rempli de 10 ml de tampon échantillon 3X (Tris/HCl 100 mM, pH 6,8 ; dodecylsulfate de sodium (SDS) 6% (p/v) ; sucrose 30% (p/v) ; β -mercaptoéthanol 15% (v/v) ; bleu de bromophénol 0,015% (v/v)) et mis dans un bain-marie bouillant pendant 30 min. La bande ainsi traitée est ensuite glissée à plat, entre les deux plaques, au sommet d'un gel SDS-PAGE à 7,5% de réticulation. Un puits est prévu pour le dépôt de 5 μ l d'un témoin de masse moléculaire Precision Plus Protein (Biorad). La migration est effectuée une nuit à 40 volts dans le tampon de course (Tris 25 mM /Glycine 0,192 M, pH 8,3 ; SDS 0,1%). Les protéines sont colorées par une solution de Bleu de Coomassie (Bleu de Coomassie 0,25% ; méthanol 50% ; acide acétique 10%) et le gel est décoloré en présence d'une solution d'éthanol 20 % et acide acétique 7,5 %.

4.6. Analyse de la glycosylation des protéines recombinantes

4.6.1. Analyse de la composition en monosaccharides des molécules recombinantes, après dérivation des sucres par l'heptafluorobutyrate

La composition en monosaccharides des protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT a été déterminée par GC-MS (Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry) après dérivation par l'heptafluorobutyrate (HFB). Pour cela, 2 μ g de chaque protéine ont été séparés par SDS-PAGE, électrotransférés sur membrane de poly (vinylidene difluoride) (PVDF) et colorés au Rouge Ponceau. Les bandes d'intérêt sont découpées, lavées 3 fois par 1 ml d'eau et 1 fois par 1 ml d'éthanol à 10% et séchées sous courant de N₂. Les membranes sont mises en présence de méthanol/HCl 0,5 M à 80°C durant 20 h, puis séchées sous courant de N₂. Les produits de méthanolyse sont dérivés pendant 10 min à 150°C, par 25 μ l d'HFB dans 200 μ l d'acétonitrile anhydre. Après évaporation sous courant de N₂ et reprise dans 50 μ l d'acétonitrile, 6 μ l de chaque échantillon sont injectés en GC-MS par un injecteur Ross (260°C) d'un chromatographe Carlo Erba GC 8000 équipé d'une colonne capillaire (Chrompack, France). Le programme de température commence à 90°C pendant 3 min, puis augmente de 5°C/min jusqu'à 260°C. La colonne est couplée à

un spectromètre de masse Finnigan Automass II. La quantification des différents constituants est effectuée grâce au logiciel Xcalibur (Finnigan, USA).

4.6.2. Détection des cores N-glycaniques fucosylés

Afin de détecter spécifiquement le corps N-glycanique fucosylé, 2 µg des protéines NCT et RCT sont séparés par SDS-PAGE (4 /7,5 %) et électrotransférés sur membrane de nitrocellulose. Les membranes sont saturées 2 h à température ambiante dans une solution de TBS (Tris/HCl 20 mM, pH 7,5 ; NaCl 0,145 M); lait 3% (p/v); Tween 20 1% (v/v). La membrane est incubée une nuit à 4°C avec un anticorps primaire anti-HRP (Sigma) dilué au 1/500 dans le TBS ; Tween 20 1% (v/v), puis incubée 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (Sigma) (Kurosaka *et al.*, 1991). La révélation est réalisée par mise en présence du substrat de la phosphatase alcaline, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitrobleu tetrazolium.

4.6.3. Analyse des glycopeptides en spectrométrie de masse

De façon à déterminer quels sont les peptides glycosylés présents sur les protéines recombinantes, les protéines NCT et RCT sont réduites, alkylées et digérées en solution par la trypsine, et les glycopeptides sont isolés et analysés.

L'étape de réduction est réalisée sur 100 µg de chaque protéine, auxquels sont ajoutés 25 µl de bicarbonate d'ammonium 50 mM, pH 8, et 5 µl de DTT 100 mM pendant 1 h à 37°C. Après refroidissement à température ambiante, les protéines sont alkylées par ajout de 6 µl d'iodoacétamide 200 mM pendant 1 h à 37°C et à l'abri de la lumière. Le processus d'alkylation est arrêté par 1 µl de DTT 100 mM pendant 20 min à 37°C. Les protéines réduites et alkylées sont alors digérées par ajout de 10 µl de trypsine et 2 µl de CaCl₂ à 37°C pendant 16 h. La réaction est arrêtée par 2 µl de TFA 5%.

Les glycopeptides ainsi obtenus sont enrichis par ajout de 15 µl de Sepharose-4B dans un mélange butanol/ éthanol/ eau (4/1/1, v/v). Après une incubation de 45 min, les échantillons sont ajoutés dans des microtubes Minisorb (Nunc), centrifugés à 11000 g,

lavés 2 fois par le mélange butanol/ éthanol/ eau, puis de nouveau incubés 30 min en présence de 300 µl d'éthanol à 50%. Le surnageant est séché sur verre sous courant d'N₂.

Pour l'analyse en MALDI-TOF (Voyager DE-STR) en mode linéaire ion-positif avec un voltage accélérant de 25 kV, l'échantillon est repris dans 5 µL de matrice 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB). Un µl de l'échantillon est déposé sur cible.

4.7. Analyse de la conformation des protéines recombinantes

4.7.1. Dichroïsme circulaire

Les analyses de dichroïsme circulaire (DC) ont été effectuées sur un spectropolarimètre Model CD6 Jobin Yvon, ISA (Longjumeau, France) avec une cellule en quartz de 1 mm à 25°C. Les protéines purifiées ont été concentrées à 5 µM dans du tampon phosphate 20 mM, pH 7,4. Le spectre DC a été enregistré entre des longueurs d'onde de 190 et 250 nm, avec une résolution de 0.5 nm et un temps d'intégration de 1 seconde. L'ellipticité θ mesurée directement est présentée généralement en m.deg ou en deg et l'ellipticité spécifique $[\theta]$ par résidu en deg.cm².dmol⁻¹ qui tient compte de la concentration de la molécule étudiée et du chemin optique de la cuvette utilisée, est calculé en appliquant la relation suivante:

$[\theta] = \theta \cdot (\text{MRW}) / 10 \cdot 1 \cdot c$, où θ est l'ellipticité mesurée en degré et observée à une longueur d'onde λ , où c est la concentration de la molécule en g/ml, et où MRW est la masse moléculaire moyenne des résidus (ici la masse de la protéine divisée par le nombre d'acides aminés de la molécule).

4.7.2. Fluorimétrie

La spectroscopie de fluorescence des résidus de tryptophane a été mesurée sur un spectrofluorimètre Fluoromax (Spex-Jobin Yvon-Horiba) à 25°C. Une longueur d'excitation de 280 nm et une largeur de fente de 4 nm ont été utilisées. Les protéines purifiées ont été concentrées à 5 µM dans du tampon phosphate 20 mM, pH 7,4.

5. ANALYSE DES INTERACTIONS DES PROTEINES RECOMBINANTES NCT, R1CT, R3CT ET RCT

5.1. Analyse par résonance plasmonique de surface

L'étude de l'interaction des protéines recombinantes, entre elles ou avec divers ligands, est effectuée par résonance plasmonique de surface (Biacore 3000). Les études ont été réalisées en utilisant un sensorchip CM5 permettant la fixation covalente des fonctions amines des protéines recombinante. Pour l'immobilisation, le sensorchip est équilibré à 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ dans du tampon HBS (Hepes/NaOH 10 mM, pH 7,4 ; NaCl 0,15 M ; EDTA 3 mM). Chacune des quatre cellules du sensorchip est traitée séquentiellement pour immobiliser les protéines. La surface du sensorchip est activée par le mélange N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC) et N-hydroxysuccinimide (NHS) du Amine Coupling Kit (Biacore) pendant 7 min (35 μl). Immédiatement après, la protéine recombinante en solution dans un tampon bicarbonate de sodium 50 mM, séchée sous vide puis remise en solution dans un tampon acétate de sodium 10 mM, pH 3,8, est injectée à une concentration de 1-3 μg de protéine/ml. Une quantité de 1000 ± 100 RU (Response ou Resonance Units) de protéine est immobilisée par cellule du sensorchip (cellules Fc2, Fc3 et Fc4). Les fonctions esters n'ayant pas réagi sont ensuite neutralisées par l'injection de 35 μl d'éthanolamine pendant 7 min. La première cellule (Fc1), servant de contrôle de fixation non spécifique, est activée par 70 μl du mélange EDC/NHS puis immédiatement neutralisée par 70 μl d'éthanolamine. Après lavages par une solution de NaCl 1M (10 μl), les analyses sont effectuées à 25°C, à un débit de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ en présence du tampon de course HBS.

En ce qui concerne l'étude des interactions des protéines recombinantes sur elles-mêmes, des échantillons de concentrations comprises entre 0,5 et 4 μM dans l'HBS sont injectées pendant 3 min à 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Un retour en tampon HBS seul est ensuite effectué pendant 10 min pour enregistrer la phase de dissociation des complexes formés. La « régénération » du ligand (molécule immobilisée), précédant une nouvelle injection de

l'analyte (molécule en solution), est réalisée par une ou plusieurs injections de 10 µl d'une solution de NaOH 20 mM, jusqu'au retour à la ligne de base.

Pour l'étude des interactions entre la lactoferrine et les protéines recombinantes immobilisées, des concentrations de 50 à 800 nM de lactoferrine humaine (préparée au laboratoire à partir de lait frais humain) sont injectées dans le tampon HBS pendant 3 min à un débit de 5 µl/min. L'étape de régénération est réalisée par une ou plusieurs injections de 10 µl d'une solution de NaCl 2 M, jusqu'au retour à la ligne de base.

Concernant les études d'interactions avec les ARN, deux séquences d'ARN décrites dans la littérature (Serin *et al.*, 1997) ont été synthétisées chimiquement (Eurogentec, Belgique), avec ou sans molécule de biotine greffée à l'extrémité 3'OH : une séquence NRE : (5'-AAAAAAGGCCGAAAUCCCGAAGUAGGCCAA-3') spécifique de la nucléoline et une séquence NS de taille équivalente : (5'-AAAAUAACUCCAUAUCAUGCACAGAAGAA-3') n'interagissant pas avec la nucléoline. Les analyses sont effectuées à 25°C, à un débit de 10 µl/min en présence du tampon de course Tris/HCl 20 mM, pH 7,4 ; MgCl₂ 4 mM ; KCl 200 mM; dithiothréitol 1 mM. Des concentrations variables d'ARN (1 à 20 µM) dans le tampon de course sont injectées pendant 6 min, tandis que la dissociation des complexes ARN/protéines est enregistrée pendant 10 min. La dissociation complète des complexes est réalisée par injection d'une solution de NaCl 2 M contenant 0,2% d'EDTA pendant 1 à 3 min. Toutes les solutions sont préparées en conditions « RNase-free », avec des réactifs neufs, de l'eau autoclavée à 125°C pendant 60 min et un traitement de la solution de NaCl 2M, EDTA 0,2 % au diethylpyrocarbonate (DEPC).

Les constantes sont évaluées selon le modèle de Langmuir 1:1 (logiciel BiaEvaluation 3.1).

5.2. Co-immunoprécipitation des complexes formés entre les protéines recombinantes et leurs ligands

Les co-immunoprécipitations ont été réalisées avec les protéines recombinantes NCT, R1CT, R3CT et RCT purifiées. Pour chaque protéine d'intérêt (lactoferrine humaine,

laminine1 (Millipore) et ApoE (Millipore)), 2 expériences parallèles ont été effectuées (voir Tableau 6, p. 189). La première expérience (appelée « type 1 » plus loin dans le texte) consiste en la précipitation des complexes potentiellement formés, par un anticorps monoclonal de souris anti-nucléoline (C23 Santacruz), la seconde expérience (appelée « type 2 » plus loin dans le texte) consiste en la précipitation des complexes potentiellement formés, par un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt (anticorps polyclonal de lapin anti-lactoferrine M90 préparé au laboratoire, anticorps polyclonal de lapin anti-laminine-1 (Euromedex) et anticorps polyclonal de chèvre anti-ApoE (Millipore)).

Tous les lavages et incubations sont effectués dans le tampon Net-2 (Tris/HCl 50 mM, pH 7,6 ; NaCl 150mM; Triton X100 0,05%). Entre chaque lavage et incubation, les billes sont centrifugées 5 min à 3000 g. Tout d'abord, les billes de protéine G-Sepharose (Ge healthcare) sont lavées 5 fois par 400 µl de tampon Net-2, puis incubées 2 h à 4°C avec 2 µl d'anticorps immunoprécipitant. Les billes sont alors lavées 4 fois par 400 µl de tampon. Un microgramme de chaque protéine est alors ajouté aux billes, et mis à incuber une nuit à 4 °C sur un agitateur rotatif. Après retrait des surnageants, les billes sont lavées 8 fois puis séchées et reprises dans 40 µl de tampon échantillon 1X sans β-mercaptoéthanol (pour ne pas rompre les ponts disulfures des immunoglobulines). Les échantillons sont alors séparés par SDS-PAGE et électrotransférés sur membrane de nitrocellulose. Les blots résultants des expériences de « type 1 » sont révélés par chemiluminescence ECL plus (GE Healthcare) après blocage de la membrane, incubation en présence d'anticorps anti-protéines d'intérêt (anticorps polyclonal de lapin anti-lactoferrine M90 1/20000, anticorps polyclonal de lapin anti-laminine-1 1/1000, anticorps polyclonal de chèvre anti-ApoE 1/2000), suivie d'une incubation avec l'anticorps secondaire adéquat. Les membranes résultant des expériences de « type 2 » sont incubées en présence d'anticorps anti-nucléoline C23 dilué au 1/500 une nuit à 4°C, puis incubées avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris dilué au 1/10000.

	1	2	3	4	5	6	7
Protéine G-sépharose (µL)	15	15	15	15	15	15	15
Nucléoline recombinante (µg)	NCT 1		NCT 1	R1CT 1	R3CT 1	RCT 1	
Ligand potentiel (µg)		1	1	1	1	1	
Expérience de « type 1 » Anticorps anti-nucléoline (µl)	2	2	2	2	2	2	

Tableau 6: Protéines et réactifs utilisés lors des différents essais de co-immunoprécipitation des complexes potentiellement formés entre les protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT, et leurs ligands.

5.3. Mise en évidence, par détection différentielle de l'ARN libre, non retardé sur gel d'agarose, des complexes formés entre l'ARN NRE et les glycoformes NCT, R1CT, R3CT et RCT

Une adaptation de la méthode de Rodgers J.T. *et al.* (2000) a été utilisée pour la mise en évidence de la fixation de la séquence d'ARN cible de la nucléoline (séquence NRE) sur les quatre protéines recombinantes dérivées de la nucléoline : NCT, R1CT, R3CT et RCT.

Cette technique est de type EMSA (ElectroMobility Shift Assay – ou retard sur gel). Son principe repose sur le fait qu'un complexe ADN- protéine ou ARN-protéine migrera moins vite dans un gel non-dénaturant qu'un ADN ou un ARN nu.

La technique EMSA utilisée dans nos expériences consiste en l'incubation d'une quantité fixe d'ARN RNE marqué à la biotine avec des quantités croissantes en protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT, suivie d'une migration du mélange sur gel d'agarose, puis d'un transfert des acides nucléiques sur membrane de nylon. La révélation est réalisée par chemiluminescence après reconnaissance des ARNs biotinylés avec de l'avidine couplée à

de la peroxydase. Des contrôles de spécificité sont réalisés en présence d'excès molaires d'ARN non marqués NRE et NS.

La formation des complexes ARN/protéines est réalisée dans un volume final de 25 μ l de tampon d'incubation (10 mM HEPES/KOH, pH 7.4, 5 % glycérol, 5 mM acétate de magnésium, 40 mM KCl et 1 mM dithiothréitol) contenant 30,5 pmoles d'ARN NRE biotinylé, en l'absence ou en la présence de 2,9 ; 5,8 ; 14,5 ; 29 ; 58 et 116 pmoles de chacune des protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT. Des témoins de réversibilité et de spécificité d'interaction ont été réalisés en incubant 30,5 pmoles d'ARN NRE biotinylé avec 58 pmoles de chacune des protéines NCT, R1CT, R3CT et RCT et 300 pmoles d'ARN NRE non marqué à la biotine ou d'ARN NS servant ici de témoin non-spécifique. Tous les tampons, y compris ceux utilisés pour les étapes d'électrophorèse et de transfert sur membrane de nylon, ont été réalisés en conditions « RNAse-free » avec des réactifs neufs et de l'eau stérile prête pour injection.

Les incubations sont réalisées pendant 20 min dans la glace dans des tubes Eppendorf de 200 μ l de qualité « PCR », puis déposées immédiatement dans les puits d'un gel d'agarose à 1,2 % dans du TBE 1X (épaisseur 3 mm). La migration est effectuée à 100 volts pendant 25 min dans du tampon TBE 0,5X. Le gel est immédiatement soumis à un électrotransfert sur membrane de Nylon Hybond XL (Amersham, France), dans un appareil Mini Trans-Blot (Biorad), en présence de TBE 1X, et pendant 30 min sous un courant de 100 mA (16-17 volts).

La membrane de nylon est séchée sous courant d'air puis les acides nucléiques sont fixés (cross-linking) par irradiation aux UV sur système Fluolink (Ankersmit, France) à 312 nm (1 Joule/cm²). Elle est ensuite incubée dans une solution de blocage (20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,1 % Tween 20, 1,5 % de lait écrémé en poudre) pendant 1 heure à température ambiante puis pendant 30 min dans la solution de blocage contenant de l'avidine D-peroxydase (Vector Laboratories, Angleterre) diluée au 1:10.000. La membrane est lavée trois fois 5 min dans la solution de blocage, rincée par de l'eau, puis révélée par autoradiographie avec le système ECL (GE Healthcare, Angleterre).

5.4. Chromatographie sur colonne d'héparine

La fixation sur héparine des protéines NCT et RCT en FPLC dans des conditions similaires à celles décrites précédemment pour la S-Sepharose Fastflow (voir paragraphe 4.2, p.181). 20 µg des protéines NCT et RCT sont diluées dans 1 ml de tampon A, injectées en FPLC sur une colonne Hi-trapTM Heparin (Amersham), puis soumises à un gradient de 0 à 100% de tampon B pendant 30 min à un débit de 0,5 ml/min.

5.5. Expériences de retard sur gel en présence d'héparine

Afin d'étudier les interactions entre les protéines recombinantes et l'héparine, des expériences de retard sur gel PAGE ont été effectués. Quatre µg d'héparine ont été incubés avec 0,4 nmoles de chaque protéine pendant 30 min à température ambiante dans un volume de 20 µl de tampon Tris/HCl 10 mM, pH 7,9 ; NaCl 150 mM ; KCl 50 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 0,5 mM. Cinq µL de glycérol sont rajoutés aux échantillons qui sont ensuite déposés sur un gel d'acrylamide à 10% de réticulation, en conditions non dénaturantes. La migration est effectuée pendant 3 h à 100 volts dans le tampon de migration : Tris/HCl 40 mM, pH 7,8 ; EDTA 1 mM). Le gel est ensuite coloré par une solution de bleu azur à 0,05% dans l'eau.

6. ANALYSE DE LA SUREXPRESSON DES DIFFERENTES FORMES DE NUCLEOLINE EN CELLULES DE MAMMIFERE

6.1. Plasmides et anticorps

Les plasmides permettant l'expression de Rab5-GFP, Rab5Q79L-GFP, Rab7-GFP et CD63-GFP ont été fournis par François FOULQUIER.

Les anticorps polyclonaux de lapin anti-BIP78 (Santacruz) sont utilisés au 1/100. Les anticorps polyclonaux de chèvre anti-syndécan1 (Santacruz) sont utilisés au 1/100. Les anticorps polyclonaux de lapin anti-CD44V3 (Chemicon) sont utilisés au 1/200.

6.2. Etude par cytofluorimétrie en flux de l'expression de la nucléoline à la surface des cellules Hela

Les expériences de cytofluorimétrie sont effectuées sur des cellules Hela co-transfectées transitoirement par le plasmide Rab5-GFP et un plasmide codant pour NUC Δ NLS, RBD1 Δ NLS, RBD3 Δ NLS, et RBD13 Δ NLS, comme décrit précédemment. Les cellules contrôles sont transfectées uniquement par le plasmide Rab5-GFP. Après 24 h, les cellules sont lavées par 2 ml de milieu DMEM contenant 10% de SVF, puis décollées par reflux à la pipette par une solution de PBS ; EDTA 0,1 M. Les cellules sont alors centrifugées 2 min à 1400 g, resuspendues dans 200 μ l de DMEM, et incubées 45 min à 37°C soit dans du milieu seul, soit avec l'anticorps M2-Cy3 (Sigma) dirigé contre le 3X-Flag (dilution au 1/100), soit avec 5 μ M d'HB-19 biotinylé (synthétisé et fourni par A. Hovanessian et J.P. Briand). Après 45 min, les cellules sont centrifugées 2 min à 1400 g, les surnageants sont éliminés, puis les cellules sont lavées par 200 μ l de DMEM et resuspendues dans 200 μ l de DMEM ; 10% SVF. Les cellules incubées avec l'anticorps M2-Cy3 sont analysées après ajout de 300 μ l de DMEM ; 10% SVF. Parallèlement, les cellules incubées avec 5 μ M d'HB-19 biotinylé sont incubées pendant 30 min avec de la streptavidine-phycoérythrine (Sigma) diluée au 1/200. Après 30 min, 300 μ l de DMEM ; 10% SVF sont ajoutées avant analyse.

L'analyse de la fluorescence des cellules est réalisée sur un cytofluorimètre en flux FACScan (Becton-Dickinson). La fluorescence verte est enregistrée sur le canal FL1 (530 nm) et la fluorescence rouge sur le canal FL3 (650 nm). Une région est préalablement définie en « dot-plot » sur les cellules dont l'intensité de fluorescence verte, très supérieure à l'autofluorescence des cellules non transfectées, atteste de l'efficacité de leur transformation par le plasmide contrôle Rab5-GFP. L'analyse de la fluorescence

rouge des cellules doublement transfectées est ensuite uniquement réalisée sur cette région, et visualisée sous la forme d'histogrammes d'intensité de fluorescence FL3.

6.3. Préparation des échantillons pour la microscopie de fluorescence

Après 24 h de transfection par les 12 constructions plasmidiques, comme décrit dans le chapitre 3 paragraphe 1, les cellules sont lavées 3 fois par une solution de PBS. Les cellules sont alors fixées par une solution de paraformaldéhyde 4% ; sucrose 4% dans le PBS à pH7,3, pendant 30 min à température ambiante, puis lavées 3 fois par une solution de PBS. Les lamelles avec les cellules fixées sont alors placées dans une chambre humide pour toutes les incubations suivantes. Les cellules sont perméabilisées par une solution de PBS contenant 0,5 % de triton-X100 pendant 5 min à température ambiante, lavées 3 fois par le PBS et incubées dans une solution de blocage (sérum non immun de chèvre 2% ; sérumalbumine bovine (fraction V) 2% ; gélatine 0,2% dans le PBS) durant 20 min à 4°C. Après 3 lavages au PBS, chaque lamelle est incubée une nuit à 4°C en présence de 100 µl d'anticorps primaire anti- 3Xflag (M2-Cy3) conjugué au Cy3 (Sigma) dilué au 1/1000, seul ou en mélange avec le deuxième anticorps primaire d'intérêt (si le marqueur de colocalisation nécessite une immuno-détection et n'est pas fusionné à la GFP). Les cellules sont lavées 3 fois par le PBS. Le cas échéant, les anticorps sont incubés avec un anticorps secondaire lié à l'Alexa 488 dilué au 1/2000. Après lavage au PBS, les lamelles sont montées sur lame avec 10 µl de Mowiol 4-88 (Dabco). Les lames sont séchées une nuit avant visualisation sur le microscope confocal Leica SP5 (plateforme imagerie IRI).

Annexe

Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization

Céline Guinez, Marie-Estelle Losfeld, René Cacan,
Jean-Claude Michalski, and Tony Lefebvre¹

UMR 8576/CNRS, Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, IFR 118,
Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Received on May 4, 2005; revised on September 7, 2005; accepted on
September 14, 2005

It is well-accepted that protein quality control (occurring either after protein synthesis or after cell damage) is mainly ensured by HSP, but the mechanism by which HSP decides whether the protein will be degraded or not is poorly understood. Within this framework, it has been hypothesized that *O*-GlcNAc, a cytosolic and nuclear-specific glycosylation whose functions remain unclear, could take a part in the protection of proteins against degradation by modifying both the proteins themselves and the proteasome. Because the synthesis of *O*-GlcNAc is tightly correlated to glucose metabolism and Hsp70 was endowed with GlcNAc-binding property, we studied the relationship between GlcNAc-binding activity of both Hsp70 and Hsc70 (the nucleocytoplasmic forms of HSP70 family) and glucose availability and utilization. We thus demonstrated that low glucose concentration, inhibition of glucose utilization with 2DG, or inhibition of glucose transport with CytB led to an increase of Hsp70 and Hsc70 lectin activities. Interestingly, the response of Hsp70 and Hsc70 lectin activities toward variations of glucose concentration appeared different: Hsp70 lost its lectin activity when glucose concentration was >5 mM (i.e., physiological glucose concentration) in contrast to Hsc70 that exhibited a maximal lectin activity for glucose concentration ~5 mM and at high glucose concentrations. This work also demonstrates that HSP70 does not regulate its GlcNAc-binding properties through its own *O*-GlcNAc glycosylation.

Key words: glucose/heat shock proteins/hexosamine biosynthetic pathway/lectin/*O*-GlcNAc

Introduction

Members of the 70-kDa heat shock proteins family (HSP70) have been demonstrated to be GlcNAc-binding lectins (Lefebvre *et al.*, 2001; Guinez *et al.*, 2004). The new concept of lectin-chaperone has arisen from growing evidences that the cytosolic and nuclear-specific glycosylation *O*-linked *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) could act as a protective signal against proteasomal degradation. Beyond

the myriad of proteins that are *O*-GlcNAc glycosylated, proteasome is itself modified with this atypical glycosylation (Sumegi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Zachara and Hart, 2004) and moreover can be regulated by this post-translational modification (Zhang *et al.*, 2003; Zachara and Hart, 2004). *O*-GlcNAc was first described by Torres and Hart (1984) and, rapidly, it appeared that this glycosylation was enriched in the cytosolic and nuclear compartments and that it was not static (as classical *N*- and *O*-glycosylation) but highly dynamic. Even more, it can counteract the effect of phosphorylation at the same or at adjacent sites in a reciprocal manner (for review, see Kamemura and Hart, 2003). Despite these exciting features, roles of *O*-GlcNAc remain elusive. Nevertheless and as mentioned above, it appears probable that *O*-GlcNAc could act as a protective signal against proteasomal degradation. One of the precursor works in the field was that of Han and Kudlow (1997) showing that when cultured cells were glucose deprived or stimulated by cyclic-adenosine 5'-monophosphate, the transcription factor Sp1 was hypoglycosylated leading to its rapid degradation. This degradation was sensitive to *N*-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal (LLnL) and lactacystin suggesting a proteasomal degradation. Treatment of cells with glucosamine or glucose protected Sp1 against degradation. Later, it has been proposed that *O*-GlcNAc glycosylation of a site found within the PEST sequence of the beta-estrogen receptor could block protein degradation and thus play an opposite role to phosphorylation (in this context, it is well known that PEST sequence phosphorylation could activate degradation) (Cheng *et al.*, 2000). More recently, the cadherins-to-cytoskeleton connecting protein plakoglobin has been shown to be *O*-GlcNAc modified near a destruction box (Hatsell *et al.*, 2003).

Using a wide variety of stresses (hyperthermia, UVB, arsenite, ethanol, etc.), Zachara *et al.* (2004) demonstrated a quick increase of *O*-GlcNAc content in the treated cells. Furthermore, when the level of *O*-GlcNAc was increased by using PUGNAc (an *O*-GlcNAcase inhibitor) or by transfecting COS7 cells with *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase (OGT), the thermo-tolerance of cells was increased in contrast to a reduction or a blockade of *O*-GlcNAc resulting in an increase of the sensitivity of cells to stress.

A few years ago, it has been established that *O*-GlcNAc was intimately linked to glucose metabolism (for review, see Wells *et al.*, 2003). About 2–5% of extracellular glucose could be used for *O*-GlcNAc modification of proteins through the hexosamine biosynthetic pathway (HBP). *O*-GlcNAc has been postulated to be a sensor implicated in insulin resistance and in the decrease of glucose uptake by cells. First, the hypothesis of a negative feedback of glucose

¹To whom correspondence should be addressed; e-mail:
tony.lefebvre@univ-lille1.fr

transport regulation by the flux of glucose through HBP was suggested in insulin target cells (Marshall *et al.*, 1991). Second, Robinson *et al.* (1993) have shown that when rat hemidiaphragms were incubated in glucosamine or in high glucose concentrations, glucose uptake decreased. Insulin-resistance effect and, consequently, glucose uptake decrease were correlated with a defect in GLUT4 plasma membrane glucose transporter (Cooksey *et al.*, 1999). It has also been shown that glucosamine-induced insulin resistance was accompanied by an increase of UDP-GlcNAc concentration (Rossetti *et al.*, 1995). Using transgenic overexpression of OGT, McClain *et al.* (2002) showed a type 2 diabetic phenotype. This observation suggested that insulin resistance and *O*-GlcNAc glycosylation are linked. In the same topic, incubation of rat epitrochlearis muscles with PUGNAc induced an increase in the *O*-GlcNAc level of proteins and a reduced glucose transport, suggesting that *O*-GlcNAc glycosylation of proteins can induce insulin resistance (Arias *et al.*, 2004). Taken together, these observations strongly support the pivotal role of *O*-GlcNAc in reduced glucose transport and insulin resistance through HBP. In this field, it must be noted that numerous proteins involved in the metabolism of glucose are themselves *O*-GlcNAc modified: casein-kinase II, glycogen synthase-kinase-3 (Lubas and Hanover, 2000), and insulin-receptor substrate-1 and 2 (Patti *et al.*, 1999).

Starting from the relation between glucose and *O*-GlcNAc and, since *O*-GlcNAc is a putative protector of proteins against proteasomal degradation, we previously demonstrated the existence of HSP70 lectin properties and we showed that 70-kDa heat shock protein (Hsp70), the cytosolic, and nuclear Hsp70 induced form were endowed with a GlcNAc-specific lectin activity (Guinez *et al.*, 2004). Intriguingly, this lectin activity increased with stress. We thus hypothesized that HSP70 lectin activity serves as protection of proteins via *O*-GlcNAc residues.

This article demonstrates the close relationship between HSP70 lectin properties and glucose status. Glucose deprivation, glucose transport inhibition, and inability to use glucose strongly modulate lectin activity. Against all expectations, modulation of the lectin property does not depend on a self-regulation of HSP70 by its own *O*-GlcNAc residues, because the addition of glucosamine in a glucose-depleted medium which restored the *O*-GlcNAc glycosylation of HSP70 did not abrogate its lectin activity. This last point was reinforced by the fact that *O*-GlcNAc deglycosylation of cell extract after beta-hexosaminidase treatment did not enhanced Hsp70 lectin property.

Results

Hsp70 and Hsc70 lectin activities are dependent upon glucose concentration

To test the hypothesis of a glucose concentration-dependent Hsp70/70-kDa heat shock cognate (Hsc70) lectin activity, HepG2 cells were grown on dishes in medium-containing various glucose concentrations. First, we used a broad range of glucose concentrations ranging from 0 to 100 mM. After cells lysis, proteins were run on a 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE),

electroblotted onto nitrocellulose, and stained with an anti-Hsp70 antibody either directly (ctrl) or after enrichment on GlcNAc-beads (GlcNAc-beads enr). After revelation by enhanced chemiluminescence (ECL) (Figure 1A, top panel), nitrocellulose sheet was stripped and stained with an anti-Hsc70 antibody (Figure 1A, bottom panel). The two chaperones possessed a lectin activity when cells were depleted in glucose (Glc, 0 mM), and when glucose concentration was increased to 12.5 mM, this lectin activity strongly decreased for both Hsp70 and Hsc70. On the other hand, when glucose concentration was increased from 12.5 to 100 mM, Hsc70 showed a lectin activity which progressively increased starting from 25 mM to be maximal at 75 mM of glucose, whereas Hsp70 did not show such an enhancement. Right panel of Figure 1A represents the *O*-GlcNAc pattern of the crude cellular protein extract for each glucose concentration condition. It should be pointed out that glycosylation was maximal between 50 and 100 mM of glucose. The same experiment was performed with moderate glucose concentrations, that is, between 0 and 12.5 mM

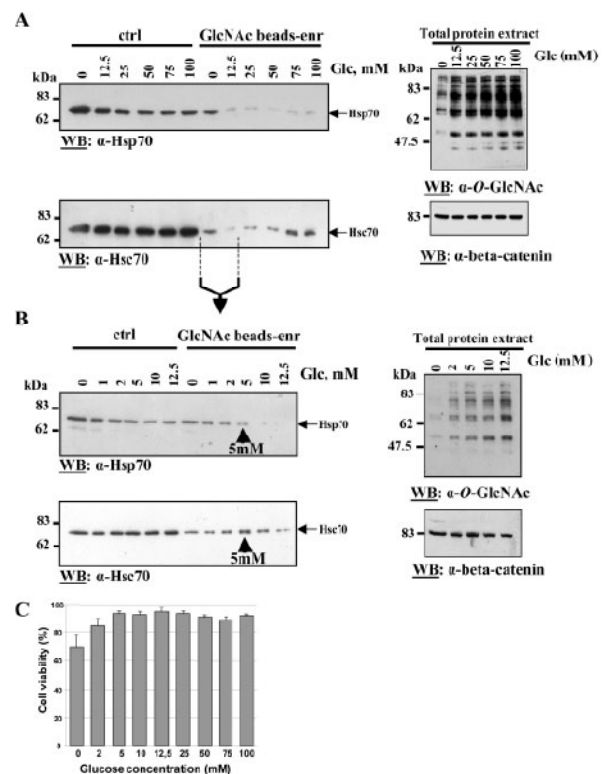


Fig. 1. Hsp70 and Hsc70 lectin activities are both dependent upon glucose concentration. HepG2 cells were cultured in a glucose-free medium with increasing glucose concentrations (0–100 mM in panel A and 0–12.5 mM in panel B). Hsp70 and Hsc70 were tested for their lectin activity against GlcNAc, as described under the *Materials and methods* section. The *O*-GlcNAc status of crude protein extracts is shown at the right of each figure. Anti-beta-catenin staining shows the equality of loading of each lane. Panel C represents cell viability after each condition of treatment (performed in triplicate). Ctrl, control of Hsp70 and Hsc70 proteins levels; WB, western blot.

(Figure 1B). Hsp70 showed a progressive decrease in its lectin activity up to 5 mM glucose (top panel) in contrast to Hsc70 (bottom panel) which showed a maximal activity at 5 mM (i.e., physiological glucose concentration). Figure 1B, right panel, represents an anti-*O*-GlcNAc antibody (RL2) staining of control extracts. A progressive increase in *O*-GlcNAc proteins content can be observed with glucose increase. These first experiments clearly correlate glucose concentration to lectin activity of HSP70 and underline that Hsp70 and Hsc70 lectin activities were expressed in a different manner according to the glucose concentration.

Inhibition of glucose utilization or inhibition of glucose transport leads to an increase in Hsp70 lectin activity

To extend and reinforce the results described above and to strengthen the hypothesis that lectin activity of Hsp70 and Hsc70 are modulated by the glucose concentration, HepG2 cells were cultured either in presence of 2-deoxyglucose (2DG), a glucose analogue that perturbs utilization of glucose by competing interactions with proteins/enzymes using glucose as a substrate, or in presence of cytochalasin B (CytB), a glucose transporter inhibitor. Control experiments performed on total protein extracts showed a decrease in their *O*-GlcNAc content after staining with the anti-*O*-GlcNAc antibody (Figure 2A, for 2DG treatment, and Figure 2B, for CytB treatment, upper panels). In both cases, whatever the culture conditions (with/without glucose, with/without glucosamine, or at 42°C), Hsp70 and Hsc70 shared an increased GlcNAc-binding properties when 2DG or CytB were added to the culture medium (compare lanes 2 and 6 and lanes 10 and 14). These results showed that when glucose transport is inhibited by CytB or when glucose utilization was decreased by 2DG, GlcNAc lectin activities of HSP70 were enhanced, confirming the results presented in Figure 1 and demonstrating that lectin activities of Hsp70 and Hsc70 depend on glucose availability and utilization.

Hsp70 and Hsc70 do not regulate their GlcNAc-binding properties with their own O-GlcNAc glycosylation

Previously reported data suggested an opposite relationship between the *O*-GlcNAc modification of Hsp70 and its capability to recognize exogenous *O*-GlcNAc residues (Guinez *et al.*, 2004). In this report, we showed that in a glucose-free medium, Hsp70 was not *O*-GlcNAc modified but exhibited a high lectin activity toward *O*-GlcNAc, and in contrast in a normal culture medium (Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM] with 4.5 g L⁻¹ of glucose) Hsp70 was glycosylated but was practically devoid of GlcNAc-binding property. Thus, we hypothesized that Hsp70 *O*-GlcNAc modification could occur on the lectin site avoiding subsequent binding on GlcNAc beads. To tentatively answer this question, we artificially increased *O*-GlcNAc level by incubating cells in a glucose-free medium supplemented with 5 mM glucosamine. As mentioned under *Introduction*, glucosamine can directly enter the HBP without the need of glutamine : fructose 6-phosphate amido-transferase (GFAT), the key- and rate-limiting enzyme of HBP. In these conditions, a lectin activity was induced both for Hsp70 (compared with glucose-deprived

conditions but was lower to control, i.e., in presence of glucose) and for Hsc70 (the intensity of binding is more or less the same for the control and for the cell cultured in the presence of glucosamine), whereas the two chaperones were *O*-GlcNAc modified (Figure 3A, left panel for controls and right panel for GlcNAc-enriched and anti-*O*-GlcNAc antibody-enriched samples). This demonstrated that in these conditions, Hsp70 and Hsc70 lectin activities were dependent upon glucose deprivation and not dependent upon their own *O*-GlcNAc level. A second experiment invalidated this later hypothesis. HepG2 cells were exposed to a thermal stress for increasing periods (from 0 to 48 h). After cell lysis, GlcNAc-binding properties and glycosylation of Hsp70/Hsc70 were examined (Figure 3B). Both for Hsp70 and Hsc70, lectin properties and glycosylation reached maximal activities near 20 h: the time progress curves were similar for the lectin activity (left panel) and for the *O*-GlcNAc content (right panel) of Hsp70 and Hsc70. Figure 3C is a control of the *O*-GlcNAc glycosylation of total protein extract. This result reinforces the idea that Hsp70 and Hsc70 lectin properties are not regulated by their own *O*-GlcNAc modification. Finally, treatment of cell extracts with beta-hexosaminidase definitively confirmed these results, because after *O*-GlcNAc hydrolysis with beta-hexosaminidase treatment Hsp70 of cells cultured in normal conditions did not recover GlcNAc-binding property (Figure 4). Taken together, these results confirmed that HSP70 did not self-regulate their GlcNAc-binding properties with their own *O*-GlcNAc glycosylation.

Discussion

The serine/threonine *O*-GlcNAc modification is widely expressed in cytosolic and nuclear compartments of eukaryotes. It modifies numerous proteins implicated in transcriptional processes (including transcription factors and RNA polymerase II) (Yang *et al.*, 2002), metabolic enzymes (Cieniewski-Bernard *et al.*, 2004), nuclear pore proteins (Guinez *et al.*, 2005), and many other proteins. Despite the great interest brought to the study of *O*-GlcNAc, the exact functions played by this simple glycosylation remain unknown. In this work, we focused our interest on the relationship between utilization of glucose and Hsp70/Hsc70 lectin activities.

It has been demonstrated that a nonnegligible part of glucose that enters the cell was converted into UDP-GlcNAc (the donor of GlcNAc for OGT); the question arose to know whether cellular chaperones such as Hsp70 and Hsc70 were affected, particularly by their GlcNAc-binding activity, when glucose was limiting or in excess. To answer this question, HepG2 cells were cultured with increasing glucose concentrations ranging from 0 to 100 mM (4-fold the glucose concentration present in normal culture medium). Surprisingly, Hsp70 and Hsc70 lectin activities were differently affected (Figure 1A). Indeed, Hsp70 bound GlcNAc when cells were deprived in glucose, but lectin activity decreased after addition of glucose. In contrast, Hsc70 bound GlcNAc beads in glucose-deprived conditions but also for higher glucose concentrations (the optimal activity being between 75 and 100 mM of glucose). To

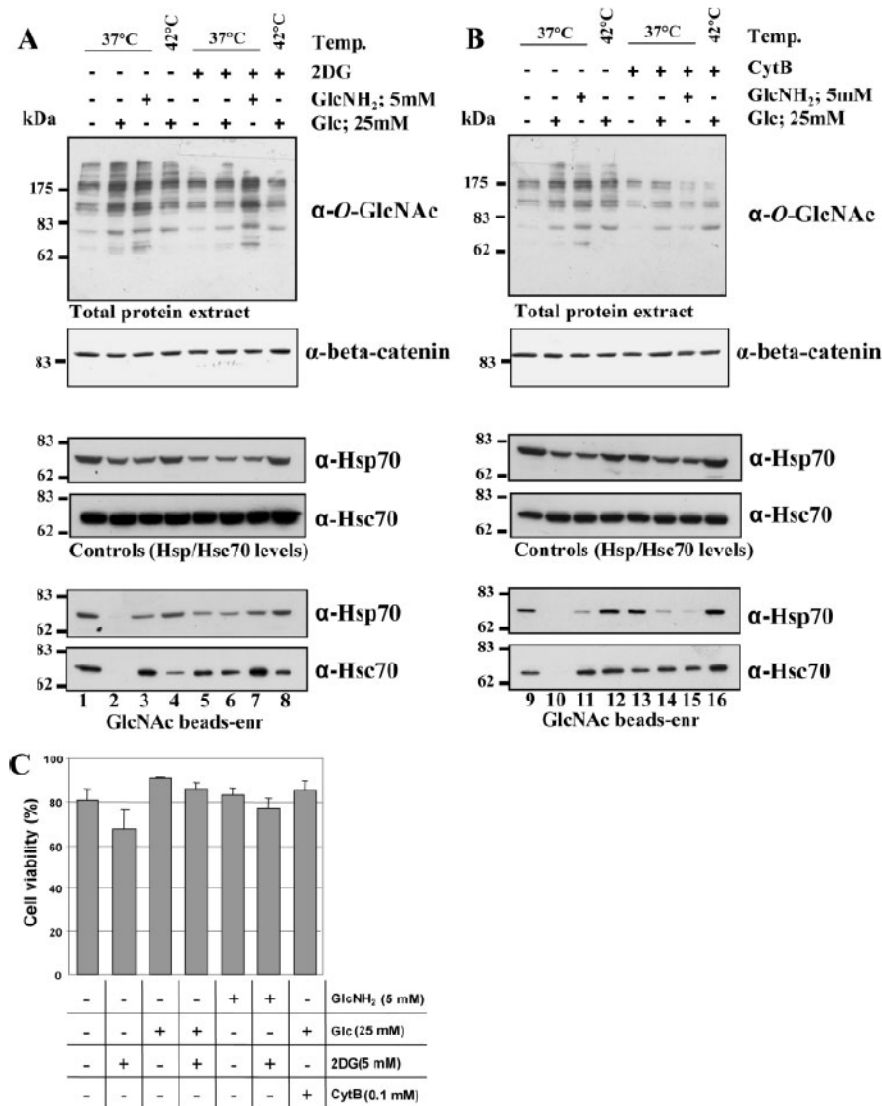


Fig. 2. Inhibition of glucose transport or inhibition of glucose use induce an increase of Hsp70/Hsc70 lectin activity. HepG2 cells were cultured in a classical medium (Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM]) with or without 2DG (5 mM), an inhibitor of glucose utilization and with or without CytB (0.1 mM), an inhibitor of glucose transport. **A** and **B** (top panels) indicate a decrease of *O*-GlcNAc glycosylation of proteins (controlled with the anti-*O*-GlcNAc antibody) with 2DG and CytB, respectively. In the middle panels, controls of Hsp70 and Hsc70 expression are shown. Lectin activities of Hsp70 and Hsc70 toward GlcNAc in the presence of 2DG and CytB are represented on the bottom panels. Anti-beta-catenin staining shows the equality of loading of each lane. Panel C represents cell viability after each condition of treatment (performed in triplicate). Panel A represents the 2DG experiment, and panel B represents the CytB experiment.

be more representative of physiological conditions, lower glucose concentrations were used (from 0 to 12.5 mM, i.e., half-fold the glucose concentration of a normal culture medium). In these conditions, the lectin activities of Hsp70 and Hsc70 were different. In contrast to Hsp70 which bound GlcNAc when glucose concentration was <5 mM, Hsc70 reached a maximal binding activity at 5 mM. In both cases, the key glucose concentration was 5 mM, that is, the physiological glucose concentration. We thus demonstrated that the two chaperones did not work similarly, according

to the glucose concentration. At low glucose concentration (<5 mM) owing to the stress, Hsp70 level and GlcNAc-binding activity are induced. When glucose concentration reaches a physiological or higher values (>5 mM), Hsp70 level decreases, and the lectin activity disappears in contrast to Hsc70 that shows an increasing lectin activity but at a constant protein expression level. Interestingly, the decrease of glucose concentration induced both a decrease in protein *O*-GlcNAc modification and an enhancement of Hsp70 lectin activity (Figure 1B, right panel); so a decrease

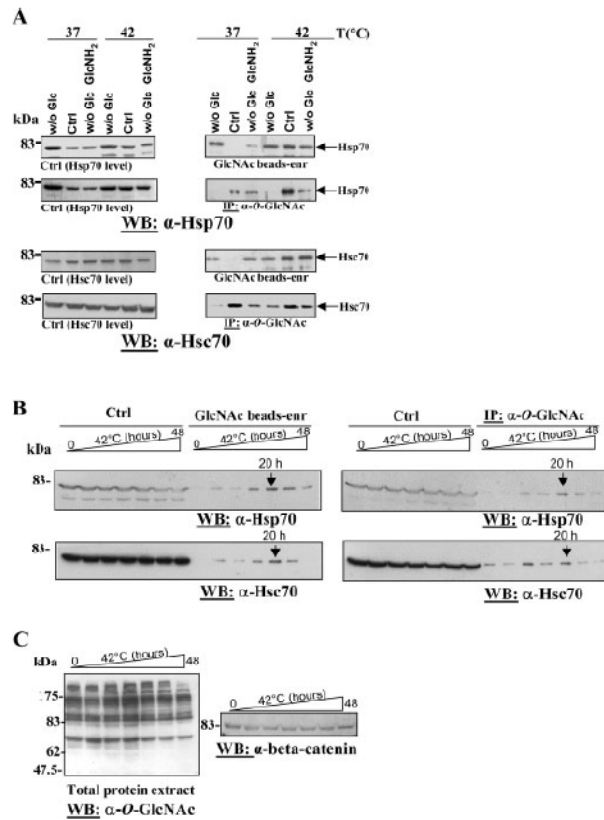


Fig. 3. Neither Hsp70 nor Hsc70 self-regulate their GlcNAc-binding property with their own *O*-GlcNAc glycosylation. HepG2 were cultured in presence of glucose (normal condition) or in absence of glucose, with and without 5 mM glucosamine. The lectin activity and the *O*-GlcNAc glycosylation of Hsp70 and Hsc70 were checked in these three conditions (A, control expression of Hsp70 and Hsc70 are shown in the left panel, and their binding properties and *O*-GlcNAc glycosylation are shown in the right panel). The second approach consisted in kinetic experiments: HepG2 cells were incubated at 42°C for increasing periods (from 0 to 48 h) to induce a thermal stress (panel B). The GlcNAc-binding properties (left panel) and *O*-GlcNAc glycosylation (right panel) of Hsp70 and Hsc70 were tested. The *O*-GlcNAc profile of the total extract protein during thermal stress is shown in panel C. Control of gel loading is shown with the anti-beta-catenin staining. Ctrl, control of Hsp70 and Hsc70 proteins levels; IP, immunoprecipitation; WB, western blot.

in *O*-GlcNAc glycosylation could be compensated by a higher capacity of Hsp70 to recognize *O*-GlcNAc-modified cellular proteins.

To drive further this relationship between glucose and Hsp70/Hsc70 lectin activity, we used two drugs that either enabled glucose utilization or its transport into the cell. In both cases, even in normal conditions, lectin activity of Hsp70 and Hsc70 increased, showing the importance of glucose entry and utilization in the regulation of Hsp70/Hsc70 lectin properties (Figure 2A and B). One explanation for this phenomenon could be that when glucose deprivation occurs, the enhancement of HSP70 lectin activity observed counteracts the decrease of *O*-GlcNAc modification of cellular proteins. This could re-equilibrate the misbalance between *O*-GlcNAc and GlcNAc-binding properties.

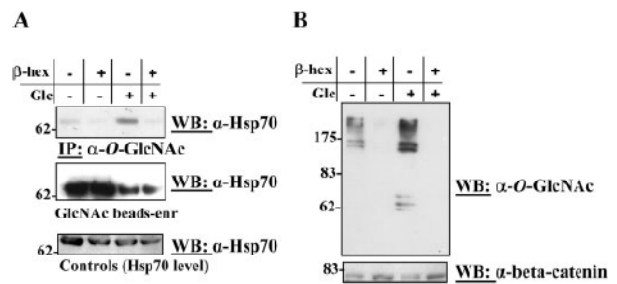


Fig. 4. Deglycosylation of Hsp70 did not induce an enhancement of its lectin activity. HepG2 cells extract were previously treated with beta-hexosaminidase before testing the lectin property of Hsp70. Experiments were performed either with cells cultured in normal medium (containing glucose) or in a glucose-depleted medium. After treatment, Hsp70 were enriched either with RL2 antibody to test their glycosylation or on GlcNAc beads to test their lectin property (panel A). Efficiency of deglycosylation is shown by staining of the total protein extract with the anti-*O*-GlcNAc antibody. Anti-beta-catenin shows the equality of loading of each lane (panel B). β-hex, beta-hexosaminidase; IP, immunoprecipitation; WB, western blot.

The possibility that HSP70 lectin properties are regulated with HSP70 *O*-GlcNAc-glycosylation was tested. It appeared attractive that HSP70 could self-regulate their GlcNAc-binding properties with their own *O*-GlcNAc glycosylation. Three points came to invalidate this hypothesis. First, when HepG2 cells were cultured in absence of glucose but with glucosamine (to by-pass the rate-limiting enzyme with the HBP-GFAT—thus allowing the synthesis of UDP-GlcNAc and the transfer of *O*-GlcNAc residues), Hsp70 and Hsc70 were glycosylated and were endowed with GlcNAc-binding properties. In these conditions, it seems that glucose depletion was critical for activating GlcNAc properties of chaperones independently from their *O*-GlcNAc glycosylation. The second approach was to follow the GlcNAc-binding activity and the glycosylation progression of Hsp70 and Hsc70 during stress. The stress inflicted to cells was a thermal one and not a glucose deprivation to maintain the formation of *O*-GlcNAc. In these conditions, we showed that the two features, that is, the *O*-GlcNAc glycosylation and the GlcNAc-binding property of both Hsp70 and Hsc70 evolved similarly along the stress period. This excludes an autoregulation of the chaperones with their own *O*-GlcNAc. Finally, after treatment of the total protein extract with beta-hexosaminidase, Hsp70 did not modify the lectin capacity. These observations indicate that the regulation of HSP70 lectin activity is mediated by something else than *O*-GlcNAc glycosylation. We can suppose that unidentified partners could modulate this property by interacting with chaperones. In this idea, the intervention of co-chaperones must be considered.

This article demonstrates the close relationship between the level of glucose and the lectin property of Hsp70 and Hsc70 toward GlcNAc residue. This phenomenon could be compared with the existing relationship between *O*-GlcNAc level and glucose concentration. The functions of such lectin activities are without any doubt in the protection of proteins against outer attacks. HSP are the guardian

of the cell integrity, and this new function could be an additive weapon to carry their mission through.

Materials and methods

Cell culture and treatments of cells

HepG2 cells were maintained in DMEM (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (v/v), 2 mM L-glutamine, 5 IU/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin at 37°C on a humidified atmosphere enriched with 5% CO₂. Cultures were carried out on dishes (diameter 100 mm) preliminarily treated with 0.1% porcine gelatine (Sigma-Aldrich, Lyon, France).

Before stress, cells were washed with 10 mL of glucose-depleted medium and incubated either in this medium (for the starvation condition) or in this medium supplemented with glucose (cell culture tested, Sigma-Aldrich) at low (1–12.5 mM) or at high (25–100 mM) concentrations. Glucose-free medium was also supplemented with 5 mM glucosamine (cell culture tested, Sigma-Aldrich) for 24 h. 2DG (Sigma-Aldrich) was used at a concentration of 5 mM and CytB (Sigma-Aldrich) at a concentration of 0.1 mM. Thermal stress was induced by incubation of the cells for 24 h at 42°C in a 5% CO₂-enriched atmosphere. For kinetic experiments, HepG2 were grown at 37°C and placed at 42°C from 0 to 48 h. Cell viability was determined by the Trypan blue exclusion method.

GlcNAc-binding proteins and O-GlcNAc-bearing proteins enrichment

HepG2 were first washed with 10 mL of cold phosphate-buffered saline (PBS, Gibco). Cells were lysed with a scrapper on ice either with a hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 15 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM MgCl₂, and proteases inhibitors, pH 7.2) for lectin activity studies or with a detergent-containing buffer (DB) (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (v/v), 0.5% sodium deoxycholate (w/v), 0.1% sodium dodecyl sulfate (w/v), and proteases inhibitors, pH 7.4) for the O-GlcNAc-content studies. Cellular extracts were centrifuged at 20,000 g for 30 min at 4°C. To test the lectin activity, supernatants were incubated with 30 µL of GlcNAc-coupled beads (*N*-acetyl-D-glucosamine immobilized on 6% beaded agarose with a spacer of five carbons, Sigma-Aldrich) at 4°C for 1 h. Beads were washed four times with binding buffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and proteases inhibitor, pH 7.4). Specificity of binding has been tested with different sugar-coupled beads and with free sugar in excess (Guinez *et al.*, 2004) and data not shown (glucose and GlcNAc). To study the O-GlcNAc glycosylation of proteins, immunoprecipitations with the anti-O-GlcNAc antibody (RL-2, Affinity Bioreagents, Golden, CO) were performed. RL-2 was added to a 1:250 final dilution, and cellular extracts were incubated at 4°C overnight. The bound proteins were then recovered after addition of protein G-Sepharose (Amersham Biosciences, Orsay, France) for 1 h at 4°C. Beads were gently centrifuged for 1 min and washed with the following buffers: DB; DB supplemented with 500 mM NaCl, DB/TNE (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], pH 7.4) in equal volume, and finally with TNE alone.

Beta-hexosaminidase treatment

HepG2 extracts were adjusted to pH 5.2 with 100 mM acetate and incubated with *Escherichia coli* recombinant beta-hexosaminidase (Calbiochem, San Diego, CA) for 24 h at 37°C.

SDS-PAGE, western blotting, and antibody staining

Samples were analyzed by 10% SDS-PAGE under reducing conditions, and proteins were electroblotted onto nitrocellulose sheet (Amersham Biosciences). Membranes were first saturated for 45 min with 5% non-fatty acid milk in Tris-buffered saline (TBS)-Tween buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween [v/v], pH 8.0). Rabbit anti-Hsp70 polyclonal antibodies were incubated for 1 h at a dilution of 1:150,000 (Stressgen Bioreagents, Victoria, British Columbia). RL-2 anti-O-GlcNAc monoclonal antibodies were incubated overnight at 4°C at a dilution of 1:1000. Membranes were then washed three times with TBS-Tween for 10 min and incubated with either an anti-rabbit or an anti-mouse horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies (Amersham Biosciences) at a dilution of 1:10,000 for 1 h. Three washes of 10 min each were performed with TBS-Tween, and the detection was carried out with ECL solution (Amersham Biosciences). Primary and secondary antibodies complexes were removed from the membranes with a stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 100 mM 2-mercaptoethanol, pH 6.5) for 30 min at 50°C, abundantly washed with TBS-Tween and reincubated with a rat anti-Hsc70 at a dilution of 1:1000 (Stressgen Bioreagents). Anti-rat secondary antibody labeled with horseradish peroxidase (Amersham Biosciences) was used at a dilution of 1:10,000 for 1 h. Polyclonal anti-beta-catenin was used at a dilution of 1:1000.

Acknowledgments

C.G. is a recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement. We thank le Centre National de la Recherche Scientifique and the University of Lille I. We are grateful to Dr. Anne Harduin-Leperc for the final reading of the manuscript and for English corrections.

Abbreviations

2DG, 2-deoxyglucose; CytB, cytochalasin B; HBP, hexosamine biosynthetic pathway; Hsc70, 70-kDa heat shock cognate; Hsp70, 70-kDa heat shock protein; HSP70, members of the 70-kDa heat shock proteins family; O-GlcNAc, O-linked *N*-acetylglucosamine; OGT, O-linked *N*-acetylglucosamine transferase; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBS, Tris-buffered saline.

References

- Arias, E.B., Kim, J., and Cartee, G.D. (2004) Prolonged incubation in PUGNAc results in increased protein O-linked glycosylation and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes*, **53**, 921–930.
- Cheng, X., Cole, R.N., Zaia, J., and Hart, G.W. (2000) Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry*, **39**, 11609–11620.

- Cieniewski-Bernard, C., Bastide, B., Lefebvre, T., Lemoine, J., Mounier, Y., and Michalski, J.-C. (2004) Identification of *O*-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 577–585.
- Cocksey, R.C., Hebert, L.F., Jr., Zhu, J.H., Wofford, P., Garvey, W.T., and McClain, D.A. (1999) Mechanism of hexosamine-induced insulin resistance in transgenic mice overexpressing glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase: decreased glucose transporter GLUT4 translocation and reversal by treatment with thiazolidinedione. *Endocrinology*, **140**, 1151–1157.
- Guinez, C., Lemoine, J., Michalski, J.C., and Lefebvre, T. (2004) 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards *O*-linked N-acetylglucosamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319**, 21–26.
- Guinez, C., Morelle, W., Michalski, J.-C., and Lefebvre, T. (2005) *O*-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **37**, 765–774.
- Han, I. and Kudlow, J.E. (1997) Reduced *O*-glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2550–2558.
- Hatsell, S., Medina, L., Merola, J., Haltiwanger, R., and Cowin, P. (2003) Plakoglobin is *O*-glycosylated close to the N-terminal destruction box. *J. Biol. Chem.*, **278**, 37745–37752.
- Kamemura, K. and Hart, G.W. (2003) Dynamic interplay between *O*-glycosylation and *O*-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **73**, 107–136.
- Lefebvre, T., Cieniewski, C., Lemoine, J., Guerardel, Y., Leroy, Y., Zanetta, J.P., and Michalski, J.C. (2001) Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem. J.*, **360**, 179–188.
- Lubas, W.A. and Hanover, J.A. (2000) Functional expression of *O*-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, **275**, 10983–10988.
- Marshall, S., Bacote, V., and Traxinger, R.R. (1991) Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4706–4712.
- McClain, D.A., Lubas, W.A., Cooksey, R.C., Hazel, M., Parker, G.J., Love, D.C., and Hanover, J.A. (2002) Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 10695–10699.
- Patil, M.E., Virkamäki, A., Landaker, E.J., Kahn, C.R., and Yki-Järvinen, H. (1999) Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes*, **48**, 1562–1571.
- Robinson, K.A., Sens, D.A., and Buse, M.G. (1993) Pre-exposure to glucosamine induces insulin resistance of glucose transport and glycogen synthesis in isolated rat skeletal muscles. Study of mechanisms in muscle and in rat-1 fibroblasts overexpressing the human insulin receptor. *Diabetes*, **42**, 1333–1346.
- Rossetti, L., Hawkins, M., Chen, W., Gindi, J., and Barzilai, N. (1995) In vivo glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycemic but not in hyperglycemic conscious rats. *J. Clin. Invest.*, **96**, 132–140.
- Sumegi, M., Hunyadi-Gulyas, E., Medzihradsky, K.F., and Udvardy, A. (2003) 26S proteasome subunits are *O*-linked N-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 1284–1289.
- Torres, C.R. and Hart, G.W. (1984) Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for *O*-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.*, **259**, 3308–3317.
- Wells, L., Vosseler, K., and Hart, G.W. (2003) A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 222–228.
- Yang, X., Zhang, F., and Kudlow, J.E. (2002) Recruitment of *O*-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein *O*-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell*, **110**, 69–80.
- Zachara, N.E. and Hart, G.W. (2004) *O*-GlcNAc modification: a nutritional sensor that modulates proteasome function. *Trends Cell. Biol.*, **14**, 218–221.
- Zachara, N.E., O'Donnell, N., Cheung, W.D., Mercer, J.J., Marth, J.D., and Hart, G.W. (2004) Dynamic *O*-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **279**, 30133–30142.
- Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D.B., Paterson, A.J., and Kudlow, J.E. (2003) *O*-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell*, **115**, 715–725.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Abeijon, C., and C.B. Hirschberg. 1992. Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci.* 17:32-6.
- Aldi, S., C. Della Giovampaola, R. Focarelli, A. Armini, M. Ziche, F. Finetti, and F. Rosati. 2009. A fucose-containing O-glycoepitope on bovine and human nucleolin. *Glycobiology.* 19:337-43.
- Alete, D.E., M.E. Weeks, A.G. Hovanessian, M. Hawadle, and A.W. Stoker. 2006. Cell surface nucleolin on developing muscle is a potential ligand for the axonal receptor protein tyrosine phosphatase-sigma. *FEBS J.* 273:4668-81.
- Alfalah, M., R. Jacob, U. Preuss, K.P. Zimmer, H. Naim, and H.Y. Naim. 1999. O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts. *Curr Biol.* 9:593-6.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, C.C. Broder, Y. Feng, P.E. Kennedy, P.M. Murphy, and E.A. Berger. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science.* 272:1955-8.
- Allain, F.H., P. Bouvet, T. Dieckmann, and J. Feigon. 2000. Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin. *EMBO J.* 19:6870-81.
- Allain, F.H., D.E. Gilbert, P. Bouvet, and J. Feigon. 2000. Solution structure of the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and NMR study of the interaction with its RNA target. *J Mol Biol.* 303:227-41.
- Alvarez Losada, S., C. Canto-Nogues, and M.A. Munoz-Fernandez. 2002. A new possible mechanism of human immunodeficiency virus type 1 infection of neural cells. *Neurobiol Dis.* 11:469-78.
- Alvarez, M., C. Quezada, C. Navarro, A. Molina, P. Bouvet, M. Krauskopf, and M.I. Vera. 2003. An increased expression of nucleolin is associated with a physiological nucleolar segregation. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:152-8.
- Arnoys, E.J., and J.L. Wang. 2007. Dual localization: proteins in extracellular and intracellular compartments. *Acta Histochem.* 109:89-110.
- Azum-Gelade, M.C., J. Noaillac-Depeyre, M. Caizergues-Ferrer, and N. Gas. 1994. Cell cycle redistribution of U3 snRNA and fibrillarin. Presence in the cytoplasmic

- nucleolus remnant and in the prenucleolar bodies at telophase. *J Cell Sci.* 107 (Pt 2):463-75.
- Barboule, N., I. Truchet, and A. Valette. 2005. Localization of phosphorylated forms of Bcl-2 in mitosis: co-localization with Ki-67 and nucleolin in nuclear structures and on mitotic chromosomes. *Cell Cycle.* 4:590-6.
- Barel, M., A.G. Hovanessian, K. Meibom, J.P. Briand, M. Dupuis, and A. Charbit. 2008. A novel receptor - ligand pathway for entry of *Francisella tularensis* in monocyte-like THP-1 cells: interaction between surface nucleolin and bacterial elongation factor Tu. *BMC Microbiol.* 8:145.
- Barel, M., M. Le Romancer, and R. Frade. 2001. Activation of the EBV/C3d receptor (CR2, CD21) on human B lymphocyte surface triggers tyrosine phosphorylation of the 95-kDa nucleolin and its interaction with phosphatidylinositol 3 kinase. *J Immunol.* 166:3167-73.
- Barrijal, S., M. Perros, Z. Gu, B.L. Avalosse, P. Belenguer, F. Amalric, and J. Rommelaere. 1992. Nucleolin forms a specific complex with a fragment of the viral (minus) strand of minute virus of mice DNA. *Nucleic Acids Res.* 20:5053-60.
- Bates, P.J., D.A. Laber, D.M. Miller, S.D. Thomas, and J.O. Trent. 2009. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp Mol Pathol.* 86:151-64.
- Belenguer, P., V. Baldin, C. Mathieu, H. Prats, M. Bensaid, G. Bouche, and F. Amalric. 1989. Protein kinase NII and the regulation of rDNA transcription in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 17:6625-36.
- Belenguer, P., M. Caizergues-Ferrer, J.C. Labbe, M. Doree, and F. Amalric. 1990. Mitosis-specific phosphorylation of nucleolin by p34cdc2 protein kinase. *Mol Cell Biol.* 10:3607-18.
- Birchenall-Roberts, M.C., T. Fu, S.G. Kim, Y.K. Huang, M. Dambach, J.H. Resau, and F.W. Ruscetti. 2006. K-Ras4B proteins are expressed in the nucleolus: Interaction with nucleolin. *Biochem Biophys Res Commun.* 348:540-9.
- Bogre, L., C. Jonak, M. Mink, I. Meskiene, J. Traas, D.T. Ha, I. Swoboda, C. Plank, E. Wagner, E. Heberle-Bors, and H. Hirt. 1996. Developmental and cell cycle regulation of alfalfa nucMs1, a plant homolog of the yeast Nsr1 and mammalian nucleolin. *Plant Cell.* 8:417-28.

- Bonnet, H., O. Filhol, I. Truchet, P. Brethenou, C. Cochet, F. Amalric, and G. Bouche. 1996. Fibroblast growth factor-2 binds to the regulatory beta subunit of CK2 and directly stimulates CK2 activity toward nucleolin. *J Biol Chem.* 271:24781-7.
- Borer, R.A., C.F. Lehner, H.M. Eppenberger, and E.A. Nigg. 1989. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell.* 56:379-90.
- Borggreffe, T., M. Wabl, A.T. Akhmedov, and R. Jessberger. 1998. A B-cell-specific DNA recombination complex. *J Biol Chem.* 273:17025-35.
- Borsuk, E., D. Vautier, M.S. Szollosi, D. Besombes, and P. Debey. 1996. Development-dependent localization of nuclear antigens in growing mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 43:376-86.
- Bose, S., M. Basu, and A.K. Banerjee. 2004. Role of nucleolin in human parainfluenza virus type 3 infection of human lung epithelial cells. *J Virol.* 78:8146-58.
- Bose, S.K., T.K. Sengupta, S. Bandyopadhyay, and E.K. Spicer. 2006. Identification of Ebp1 as a component of cytoplasmic bcl-2 mRNP (messenger ribonucleoprotein particle) complexes. *Biochem J.* 396:99-107.
- Bouche, G., V. Baldin, P. Belenguer, H. Prats, and F. Amalric. 1994. Activation of rDNA transcription by FGF-2: key role of protein kinase CKII. *Cell Mol Biol Res.* 40:547-54.
- Bouche, G., N. Gas, H. Prats, V. Baldin, J.P. Tauber, J. Teissie, and F. Amalric. 1987. Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0---G1 transition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:6770-4.
- Bourbon, H.M., and F. Amalric. 1990. Nucleolin gene organization in rodents: highly conserved sequences within three of the 13 introns. *Gene.* 88:187-96.
- Bourbon, H.M., B. Bugler, M. Caizergues-Ferrer, F. Amalric, and J.P. Zalta. 1983. Maturation of a 100 kDa protein associated with preribosomes in Chinese hamster ovary cells. *Mol Biol Rep.* 9:39-47.
- Bourbon, H.M., B. Lapeyre, and F. Amalric. 1988. Structure of the mouse nucleolin gene. The complete sequence reveals that each RNA binding domain is encoded by two independent exons. *J Mol Biol.* 200:627-38.
- Bourbon, H.M., M. Prudhomme, and F. Amalric. 1988. Sequence and structure of the nucleolin promoter in rodents: characterization of a strikingly conserved CpG island. *Gene.* 68:73-84.

- Bouvet, P., F.H. Allain, L.D. Finger, T. Dieckmann, and J. Feigon. 2001. Recognition of pre-formed and flexible elements of an RNA stem-loop by nucleolin. *J Mol Biol.* 309:763-75.
- Bouvet, P., J.J. Diaz, K. Kindbeiter, J.J. Madjar, and F. Amalric. 1998. Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J Biol Chem.* 273:19025-9.
- Bouvet, P., C. Jain, J.G. Belasco, F. Amalric, and M. Erard. 1997. RNA recognition by the joint action of two nucleolin RNA-binding domains: genetic analysis and structural modeling. *EMBO J.* 16:5235-46.
- Brockstedt, E., A. Rickers, S. Kostka, A. Laubersheimer, B. Dorken, B. Wittmann-Liebold, K. Bommert, and A. Otto. 1998. Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3. *J Biol Chem.* 273:28057-64.
- Bugler, B., H. Bourbon, B. Lapeyre, M.O. Wallace, J.H. Chang, F. Amalric, and M.O. Olson. 1987. RNA binding fragments from nucleolin contain the ribonucleoprotein consensus sequence. *J Biol Chem.* 262:10922-5.
- Bugler, B., M. Caizergues-Ferrer, G. Bouche, H. Bourbon, and F. Amalric. 1982. Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-kDa nucleolar protein. *Eur J Biochem.* 128:475-80.
- Caizergues-Ferrer, M., P. Belenguer, B. Lapeyre, F. Amalric, M.O. Wallace, and M.O. Olson. 1987. Phosphorylation of nucleolin by a nucleolar type NII protein kinase. *Biochemistry.* 26:7876-83.
- Caizergues-Ferrer, M., P. Mariottini, C. Curie, B. Lapeyre, N. Gas, F. Amalric, and F. Amaldi. 1989. Nucleolin from *Xenopus laevis*: cDNA cloning and expression during development. *Genes Dev.* 3:324-33.
- Callebaut, C., J. Blanco, N. Benkirane, B. Krust, E. Jacotot, G. Guichard, N. Seddiki, J. Svab, E. Dam, S. Muller, J.P. Briand, and A.G. Hovanessian. 1998. Identification of V3 loop-binding proteins as potential receptors implicated in the binding of HIV particles to CD4(+) cells. *J Biol Chem.* 273:21988-97.
- Callebaut, C., S. Nisole, J.P. Briand, B. Krust, and A.G. Hovanessian. 2001. Inhibition of HIV infection by the cytokine midkine. *Virology.* 281:248-64.
- Carpentier, M., W. Morelle, B. Coddeville, A. Pons, M. Masson, J. Mazurier, and D.

- Legrand. 2005. Nucleolin undergoes partial N- and O-glycosylations in the extranuclear cell compartment. *Biochemistry*. 44:5804-15.
- Chen, C.M., S.Y. Chiang, and N.H. Yeh. 1991. Increased stability of nucleolin in proliferating cells by inhibition of its self-cleaving activity. *J Biol Chem*. 266:7754-8.
- Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P.D. Ponath, L. Wu, C.R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski. 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*. 85:1135-48.
- Christian, S., J. Pilch, M.E. Akerman, K. Porkka, P. Laakkonen, and E. Ruoslahti. 2003. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J Cell Biol*. 163:871-8.
- Coller, H.A., C. Grandori, P. Tamayo, T. Colbert, E.S. Lander, R.N. Eisenman, and T.R. Golub. 2000. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:3260-5.
- Colley, K.J. 1997. Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. *Glycobiology*. 7:1-13.
- Creancier, L., H. Prats, C. Zanibellato, F. Amalric, and B. Bugler. 1993. Determination of the functional domains involved in nucleolar targeting of nucleolin. *Mol Biol Cell*. 4:1239-50.
- de Verdugo, U.R., H.C. Selinka, M. Huber, B. Kramer, J. Kellermann, P.H. Hofschneider, and R. Kandolf. 1995. Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotypes of coxsackie B viruses. *J Virol*. 69:6751-7.
- Deeks, E.D., J.P. Cook, P.J. Day, D.C. Smith, L.M. Roberts, and J.M. Lord. 2002. The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochemistry*. 41:3405-13.
- Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R.E. Sutton, C.M. Hill, C.B. Davis, S.C. Peiper, T.J. Schall, D.R. Littman, and N.R. Landau. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 381:661-6.
- Deng, J.S., B. Ballou, and J.K. Hofmeister. 1996. Internalization of anti-nucleolin antibody

- into viable HEp-2 cells. *Mol Biol Rep.* 23:191-5.
- Derenzini, M., V. Sirri, A. Pession, D. Trere, P. Roussel, R.L. Ochs, and D. Hernandez-Verdun. 1995. Quantitative changes of the two major AgNOR proteins, nucleolin and protein B23, related to stimulation of rDNA transcription. *Exp Cell Res.* 219:276-82.
- Destouches, D., D. El Khoury, Y. Hamma-Kourbali, B. Krust, P. Albanese, P. Katsoris, G. Guichard, J.P. Briand, J. Courty, and A.G. Hovanesian. 2008. Suppression of tumor growth and angiogenesis by a specific antagonist of the cell-surface expressed nucleolin. *PLoS ONE.* 3:e2518.
- Devirgiliis, C., S. Gaetani, M. Apreda, and D. Bellovino. 2005. Glycosylation is essential for translocation of carp retinol-binding protein across the endoplasmic reticulum membrane. *Biochem Biophys Res Commun.* 332:504-11.
- Dhennin-Duthille, I., M. Masson, E. Damiens, C. Fillebeen, G. Spik, and J. Mazurier. 2000. Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line. *J Cell Biochem.* 79:583-93.
- Di Segni, A., K. Farin, and R. Pinkas-Kramarski. 2008. Identification of nucleolin as new ErbB receptors- interacting protein. *PLoS ONE.* 3:e2310.
- Didier, D.K., and H.J. Klee. 1992. Identification of an Arabidopsis DNA-binding protein with homology to nucleolin. *Plant Mol Biol.* 18:977-9.
- Dragic, T., V. Litwin, G.P. Allaway, S.R. Martin, Y. Huang, K.A. Nagashima, C. Cayanan, P.J. Maddon, R.A. Koup, J.P. Moore, and W.A. Paxton. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature.* 381:667-73.
- Dranovsky, A., I. Vincent, L. Gregori, A. Schwarzman, D. Colflesh, J. Enghild, W. Strittmatter, P. Davies, and D. Goldgaber. 2001. Cdc2 phosphorylation of nucleolin demarcates mitotic stages and Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Aging.* 22:517-28.
- Dreyfuss, G., M.J. Matunis, S. Pinol-Roma, and C.G. Burd. 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem.* 62:289-321.
- Dreyfuss, G., B. Penicaut, J.A. Nicolas, D. Craciunescu, and P. Loiseau. 1993. Trypanocidal activity and platinum plasma kinetics of cis-Pt pentamidine iodide in *Trypanosoma brucei* sheep model. *Trop Med Parasitol.* 44:95-8.

- Dumler, I., V. Stepanova, U. Jerke, O.A. Mayboroda, F. Vogel, P. Bouvet, V. Tkachuk, H. Haller, and D.C. Gulba. 1999. Urokinase-induced mitogenesis is mediated by casein kinase 2 and nucleolin. *Curr Biol.* 9:1468-76.
- Edwards, T.K., A. Saleem, J.A. Shaman, T. Dennis, C. Gerigk, E. Oliveros, M.R. Gartenberg, and E.H. Rubin. 2000. Role for nucleolin/Nsr1 in the cellular localization of topoisomerase I. *J Biol Chem.* 275:36181-8.
- Erard, M., F. Lakhdar-Ghazal, and F. Amalric. 1990. Repeat peptide motifs which contain beta-turns and modulate DNA condensation in chromatin. *Eur J Biochem.* 191:19-26.
- Erard, M.S., P. Belenguer, M. Caizergues-Ferrer, A. Pantaloni, and F. Amalric. 1988. A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur J Biochem.* 175:525-30.
- Escande, M.L., N. Gas, and B.J. Stevens. 1985. Immunolocalization of the 100 K nucleolar protein in CHO cells. *Biol Cell.* 53:99-109.
- Escande-Geraud, M.L., M.C. Azum, J.L. Tichadou, and N. Gas. 1985. Correlation between rDNA transcription and distribution of a 100 kD nucleolar protein in CHO cells. *Exp Cell Res.* 161:353-63.
- Espinosa, E.J., M. Calero, K. Sridevi, and S.R. Pfeffer. 2009. RhoBTB3: a Rho GTPase-family ATPase required for endosome to Golgi transport. *Cell.* 137:938-48.
- Fang, S.H., and N.H. Yeh. 1993. The self-cleaving activity of nucleolin determines its molecular dynamics in relation to cell proliferation. *Exp Cell Res.* 208:48-53.
- Farin, K., A. Di Segni, A. Mor, and R. Pinkas-Kramarski. 2009. Structure-function analysis of nucleolin and ErbB receptors interactions. *PLoS ONE.* 4:e6128.
- Feng, Y., C.C. Broder, P.E. Kennedy, and E.A. Berger. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science.* 272:872-7.
- Feske, S. 2007. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol.* 7:690-702.
- Fogal, V., K.N. Sugahara, E. Ruoslahti, and S. Christian. 2009. Cell surface nucleolin antagonist causes endothelial cell apoptosis and normalization of tumor vasculature. *Angiogenesis.* 12:91-100.
- Galati, D., M. Paiardini, B. Cervasi, H. Albrecht, M. Bocchino, A. Costantini, M. Montroni,

- M. Magnani, G. Piedimonte, and G. Silvestri. 2003. Specific changes in the posttranslational regulation of nucleolin in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis.* 188:1483-91.
- Gallay, P. 2004. Syndecans and HIV-1 pathogenesis. *Microbes Infect.* 6:617-22.
- Gardner, P. 1989. Calcium and T lymphocyte activation. *Cell.* 59:15-20.
- Ghisolfi, L., G. Joseph, F. Amalric, and M. Erard. 1992. The glycine-rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA-helix-destabilizing properties. *J Biol Chem.* 267:2955-9.
- Ghisolfi, L., G. Joseph, M. Erard, J.M. Escoubas, C. Mathieu, and F. Amalric. 1990. Nucleolin--pre-rRNA interactions and preribosome assembly. *Mol Biol Rep.* 14:113-4.
- Ghisolfi, L., A. Kharrat, G. Joseph, F. Amalric, and M. Erard. 1992. Concerted activities of the RNA recognition and the glycine-rich C-terminal domains of nucleolin are required for efficient complex formation with pre-ribosomal RNA. *Eur J Biochem.* 209:541-8.
- Ghisolfi-Nieto, L., G. Joseph, F. Puvion-Dutilleul, F. Amalric, and P. Bouvet. 1996. Nucleolin is a sequence-specific RNA-binding protein: characterization of targets on pre-ribosomal RNA. *J Mol Biol.* 260:34-53.
- Gilchrist, J.S., B. Abrenica, P.J. DiMario, M.P. Czubryt, and G.N. Pierce. 2002. Nucleolin is a calcium-binding protein. *J Cell Biochem.* 85:268-78.
- Gillet, G., D. Michel, P. Crisanti, M. Guerin, Y. Herault, B. Pessac, G. Calothy, G. Brun, and M. Volovitch. 1993. Serum factors and v-src control two complementary mitogenic pathways in quail neuroretinal cells in culture. *Oncogene.* 8:565-74.
- Ginisty, H., F. Amalric, and P. Bouvet. 1998. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J.* 17:1476-86.
- Ginisty, H., F. Amalric, and P. Bouvet. 2001. Two different combinations of RNA-binding domains determine the RNA binding specificity of nucleolin. *J Biol Chem.* 276:14338-43.
- Ginisty, H., G. Serin, L. Ghisolfi-Nieto, B. Roger, V. Libante, F. Amalric, and P. Bouvet. 2000. Interaction of nucleolin with an evolutionarily conserved pre-ribosomal RNA sequence is required for the assembly of the primary processing complex. *J Biol Chem.* 275:18845-50.

- Ginisty, H., H. Sicard, B. Roger, and P. Bouvet. 1999. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci.* 112 (Pt 6):761-72.
- Gonzalez-Camacho, F., and F.J. Medina. 2004. Identification of specific plant nucleolar phosphoproteins in a functional proteomic analysis. *Proteomics.* 4:407-17.
- Gonzalez-Camacho, F., and F.J. Medina. 2006. The nucleolar structure and the activity of NopA100, a nucleolin-like protein, during the cell cycle in proliferating plant cells. *Histochem Cell Biol.* 125:139-53.
- Gouyer, V., E. Leteurtre, J.P. Zanetta, T. Lesuffleur, P. Delannoy, and G. Huet. 2001. Inhibition of the glycosylation and alteration in the intracellular trafficking of mucins and other glycoproteins by GalNAc α -O-bn in mucosal cell lines: an effect mediated through the intracellular synthesis of complex GalNAc α -O-bn oligosaccharides. *Front Biosci.* 6:D1235-44.
- Greasley, P.J., C. Bonnard, and B. Amati. 2000. Myc induces the nucleolin and BN51 genes: possible implications in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res.* 28:446-53.
- Grinstein, E., Y. Shan, L. Karawajew, P.J. Snijders, C.J. Meijer, H.D. Royer, and P. Wernet. 2006. Cell cycle-controlled interaction of nucleolin with the retinoblastoma protein and cancerous cell transformation. *J Biol Chem.* 281:22223-35.
- Grinstein, E., and P. Wernet. 2007. Cellular signaling in normal and cancerous stem cells. *Cell Signal.* 19:2428-33.
- Gulli, M.P., M. Faubladiere, H. Sicard, and M. Caizergues-Ferrer. 1997. Mitosis-specific phosphorylation of gar2, a fission yeast nucleolar protein structurally related to nucleolin. *Chromosoma.* 105:532-41.
- Gulli, M.P., J.P. Girard, D. Zabetakis, B. Lapeyre, T. Melese, and M. Caizergues-Ferrer. 1995. gar2 is a nucleolar protein from *Schizosaccharomyces pombe* required for 18S rRNA and 40S ribosomal subunit accumulation. *Nucleic Acids Res.* 23:1912-8.
- Hammond, C., and A. Helenius. 1995. Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 7:523-9.
- Harms, G., R. Kraft, G. Grelle, B. Volz, J. Dervedde, and R. Tauber. 2001. Identification of nucleolin as a new L-selectin ligand. *Biochem J.* 360:531-8.
- Harrison, R.L., and D.L. Jarvis. 2006. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins. *Adv Virus Res.* 68:159-91.

- Heine, M.A., M.L. Rankin, and P.J. DiMario. 1993. The Gly/Arg-rich (GAR) domain of *Xenopus* nucleolin facilitates in vitro nucleic acid binding and in vivo nucleolar localization. *Mol Biol Cell*. 4:1189-204.
- Hennebicq-Reig, S., T. Lesuffleur, C. Capon, C. De Bolos, I. Kim, O. Moreau, C. Richet, B. Hemon, M.A. Recchi, E. Maes, J.P. Aubert, F.X. Real, A. Zweibaum, P. Delannoy, P. Degand, and G. Huet. 1998. Permanent exposure of mucin-secreting HT-29 cells to benzyl-N-acetyl-alpha-D-galactosaminide induces abnormal O-glycosylation of mucins and inhibits constitutive and stimulated MUC5AC secretion. *Biochem J*. 334 (Pt 1):283-95.
- Herrera, A.H., and M.O. Olson. 1986. Association of protein C23 with rapidly labeled nucleolar RNA. *Biochemistry*. 25:6258-64.
- Hirano, K., Y. Miki, Y. Hirai, R. Sato, T. Itoh, A. Hayashi, M. Yamanaka, S. Eda, and M. Beppu. 2005. A multifunctional shuttling protein nucleolin is a macrophage receptor for apoptotic cells. *J Biol Chem*. 280:39284-93.
- Hirschberg, C.B., and M.D. Snider. 1987. Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem*. 56:63-87.
- Hollister, J., E. Grabenhorst, M. Nimtz, H. Conradt, and D.L. Jarvis. 2002. Engineering the protein N-glycosylation pathway in insect cells for production of biantennary, complex N-glycans. *Biochemistry*. 41:15093-104.
- Hovanessian, A.G. 2006. Midkine, a cytokine that inhibits HIV infection by binding to the cell surface expressed nucleolin. *Cell Res*. 16:174-81.
- Hovanessian, A.G., F. Puvion-Dutilleul, S. Nisole, J. Svab, E. Perret, J.S. Deng, and B. Krust. 2000. The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res*. 261:312-28.
- Huang, Y., H. Shi, H. Zhou, X. Song, S. Yuan, and Y. Luo. 2006. The angiogenic function of nucleolin is mediated by vascular endothelial growth factor and nonmuscle myosin. *Blood*. 107:3564-71.
- Huet, G., S. Hennebicq-Reig, C. de Bolos, F. Ulloa, T. Lesuffleur, A. Barbat, V. Carriere, I. Kim, F.X. Real, P. Delannoy, and A. Zweibaum. 1998. GalNAc-alpha-O-benzyl inhibits NeuAcalpha2-3 glycosylation and blocks the intracellular transport of apical glycoproteins and mucus in differentiated HT-29 cells. *J Cell Biol*. 141:1311-22.

- Huet, G., I. Kim, C. de Bolos, J.M. Lo-Guidice, O. Moreau, B. Hemon, C. Richet, P. Delannoy, F.X. Real, and P. Degand. 1995. Characterization of mucins and proteoglycans synthesized by a mucin-secreting HT-29 cell subpopulation. *J Cell Sci.* 108 (Pt 3):1275-85.
- Hwang, J., A. Kalinin, M. Hwang, D.E. Anderson, M.J. Kim, O. Stojadinovic, M. Tomic-Canic, S.H. Lee, and M.I. Morasso. 2007. Role of Scarf and its binding target proteins in epidermal calcium homeostasis. *J Biol Chem.* 282:18645-53.
- Issinger, O.G., T. Martin, W.W. Richter, M. Olson, and H. Fujiki. 1988. Hyperphosphorylation of N-60, a protein structurally and immunologically related to nucleolin after tumour-promoter treatment. *EMBO J.* 7:1621-6.
- Ito, T., M. Fujihara, A. Oda, S. Wakamoto, M. Yamaguchi, N. Komatsu, H. Miyazaki, H. Azuma, H. Ikeda, and K. Ikebuchi. 2003. Thrombopoietin upregulates nucleolin mRNA and protein in thrombopoietin-dependent megakaryocytic cell line, UT-7/TPO. *Mol Cell Biochem.* 247:75-82.
- Iyer, S.P., and G.W. Hart. 2003. Dynamic nuclear and cytoplasmic glycosylation: enzymes of O-GlcNAc cycling. *Biochemistry.* 42:2493-9.
- Izumi, R.E., B. Valdez, R. Banerjee, M. Srivastava, and A. Dasgupta. 2001. Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res.* 76:17-29.
- Jiang, Y., X.S. Xu, and J.E. Russell. 2006. A nucleolin-binding 3' untranslated region element stabilizes beta-globin mRNA in vivo. *Mol Cell Biol.* 26:2419-29.
- Joo, E.J., G.B. ten Dam, T.H. van Kuppevelt, T. Toida, R.J. Linhardt, and Y.S. Kim. 2005. Nucleolin: acharan sulfate-binding protein on the surface of cancer cells. *Glycobiology.* 15:1-9.
- Jordan, G. 1987. At the heart of the nucleolus. *Nature.* 329:489-90.
- Jordan, P., H. Heid, V. Kinzel, and D. Kubler. 1994. Major cell surface-located protein substrates of an ecto-protein kinase are homologs of known nuclear proteins. *Biochemistry.* 33:14696-706.
- Kane, R., J. Murtagh, D. Finlay, A. Marti, R. Jaggi, D. Blatchford, C. Wilde, and F. Martin. 2002. Transcription factor NFIC undergoes N-glycosylation during early mammary gland involution. *J Biol Chem.* 277:25893-903.
- Kass, S., N. Craig, and B. Sollner-Webb. 1987. Primary processing of mammalian rRNA

- involves two adjacent cleavages and is not species specific. *Mol Cell Biol.* 7:2891-8.
- Kharrat, A., J. Derancourt, M. Doree, F. Amalric, and M. Erard. 1991. Synergistic effect of histone H1 and nucleolin on chromatin condensation in mitosis: role of a phosphorylated heteromer. *Biochemistry.* 30:10329-36.
- Kibbey, M.C., B. Johnson, R. Petryshyn, M. Jucker, and H.K. Kleinman. 1995. A 110-kD nuclear shuttling protein, nucleolin, binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin-1. *J Neurosci Res.* 42:314-22.
- Kim, S.K., and M. Srivastava. 2003. Stability of Nucleolin protein as the basis for the differential expression of Nucleolin mRNA and protein during serum starvation. *DNA Cell Biol.* 22:171-8.
- Kinumi, T., Y. Ogawa, J. Kimata, Y. Saito, Y. Yoshida, and E. Niki. 2005. Proteomic characterization of oxidative dysfunction in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by exposure to oxidized LDL. *Free Radic Res.* 39:1335-44.
- Kishimoto, T., M. Watanabe, T. Mitsui, and H. Hori. 1999. Glutelin basic subunits have a mammalian mucin-type O-linked disaccharide side chain. *Arch Biochem Biophys.* 370:271-7.
- Kito, S., K. Shimizu, H. Okamura, K. Yoshida, H. Morimoto, M. Fujita, Y. Morimoto, T. Ohba, and T. Haneji. 2003. Cleavage of nucleolin and argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins in apoptosis-induced cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 300:950-6.
- Kleene, R., and E.G. Berger. 1993. The molecular and cell biology of glycosyltransferases. *Biochim Biophys Acta.* 1154:283-325.
- Kleinman, H.K., B.S. Weeks, F.B. Cannon, T.M. Sweeney, G.C. Sephel, B. Clement, M. Zain, M.O. Olson, M. Jucker, and B.A. Burrous. 1991. Identification of a 110-kDa nonintegrin cell surface laminin-binding protein which recognizes an A chain neurite-promoting peptide. *Arch Biochem Biophys.* 290:320-5.
- Konishi, T., Y. Karasaki, M. Nomoto, H. Ohmori, K. Shibata, T. Abe, K. Shimizu, H. Itoh, and K. Higashi. 1995. Induction of heat shock protein 70 and nucleolin and their intracellular distribution during early stage of liver regeneration. *J Biochem.* 117:1170-7.
- Kornfeld, S., and W.S. Sly. 1985. Lysosomal storage defects. *Hosp Pract (Off Ed).* 20:71-5, 78-82.

- Krust, B., R. Vienet, A. Cardona, C. Rougeot, E. Jacotot, C. Callebaut, G. Guichard, J.P. Briand, J.M. Grognet, A.G. Hovanessian, and L. Edelman. 2001. The anti-HIV pentameric pseudopeptide HB-19 is preferentially taken up in vivo by lymphoid organs where it forms a complex with nucleolin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:14090-5.
- Kurosaka, A., A. Yano, N. Itoh, Y. Kuroda, T. Nakagawa, and T. Kawasaki. 1991. The structure of a neural specific carbohydrate epitope of horseradish peroxidase recognized by anti-horseradish peroxidase antiserum. *J Biol Chem.* 266:4168-72.
- Lapeyre, B., F. Amalric, S.H. Ghaffari, S.V. Rao, T.S. Dumbbar, and M.O. Olson. 1986. Protein and cDNA sequence of a glycine-rich, dimethylarginine-containing region located near the carboxyl-terminal end of nucleolin (C23 and 100 kDa). *J Biol Chem.* 261:9167-73.
- Lapeyre, B., H. Bourbon, and F. Amalric. 1987. Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:1472-6.
- Larrucea, S., R. Cambroner, C. Gonzalez-Rubio, B. Fraile, C. Gamallo, G. Fontan, and M. Lopez-Trascasa. 1999. Internalization of factor J and cellular signalization after factor J-cell interaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 266:51-7.
- Larrucea, S., C. Gonzalez-Rubio, R. Cambroner, B. Ballou, P. Bonay, E. Lopez-Granados, P. Bouvet, G. Fontan, M. Fresno, and M. Lopez-Trascasa. 1998. Cellular adhesion mediated by factor J, a complement inhibitor. Evidence for nucleolin involvement. *J Biol Chem.* 273:31718-25.
- Lazdins, I.B., M. Delannoy, and B. Sollner-Webb. 1997. Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization. *Chromosoma.* 105:481-95.
- Lee, W.C., Z.X. Xue, and T. Melese. 1991. The NSR1 gene encodes a protein that specifically binds nuclear localization sequences and has two RNA recognition motifs. *J Cell Biol.* 113:1-12.
- Lee, W.C., D. Zabetakis, and T. Melese. 1992. NSR1 is required for pre-rRNA processing and for the proper maintenance of steady-state levels of ribosomal subunits. *Mol Cell Biol.* 12:3865-71.
- Legrand, D., K. Vigie, E.A. Said, E. Ellass, M. Masson, M.C. Slomianny, M. Carpentier, J.P.

- Briand, J. Mazurier, and A.G. Hovanessian. 2004. Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells. *Eur J Biochem.* 271:303-17.
- Leitinger, N., and J. Wesierska-Gadek. 1993. ADP-ribosylation of nucleolar proteins in HeLa tumor cells. *J Cell Biochem.* 52:153-8.
- Li, D., G. Dobrowolska, and E.G. Krebs. 1996. The physical association of casein kinase 2 with nucleolin. *J Biol Chem.* 271:15662-8.
- Lischwe, M.A., R.G. Cook, Y.S. Ahn, L.C. Yeoman, and H. Busch. 1985. Clustering of glycine and NG,NG-dimethylarginine in nucleolar protein C23. *Biochemistry.* 24:6025-8.
- Lischwe, M.A., R.L. Richards, R.K. Busch, and H. Busch. 1981. Localization of phosphoprotein C23 to nucleolar structures and to the nucleolus organizer regions. *Exp Cell Res.* 136:101-9.
- Maridor, G., and E.A. Nigg. 1990. cDNA sequences of chicken nucleolin/C23 and NO38/B23, two major nucleolar proteins. *Nucleic Acids Res.* 18:1286.
- Martelli, A.M., R. Bortul, F.O. Fackelmayer, P.L. Tazzari, R. Bareggi, P. Narducci, and M. Zweyer. 1999. Biochemical and morphological characterization of the nuclear matrix from apoptotic HL-60 cells. *J Cell Biochem.* 72:35-46.
- Martelli, A.M., I. Robuffo, R. Bortul, R.L. Ochs, F. Luchetti, L. Cocco, M. Zweyer, R. Bareggi, and E. Falcieri. 2000. Behavior of nucleolar proteins during the course of apoptosis in camptothecin-treated HL60 cells. *J Cell Biochem.* 78:264-77.
- Martin, M., L.F. Garcia-Fernandez, S.M. Diaz de la Espina, J. Noaillac-Depeyre, N. Gas, and F. Javier Medina. 1992. Identification and localization of a nucleolin homologue in onion nucleoli. *Exp Cell Res.* 199:74-84.
- Masiuk, M., E. Urasinska, and W. Domagala. 2007. Intranuclear nucleolin distribution during cell cycle progression in human invasive ductal breast carcinomas in relation to estrogen receptor status. *Anticancer Res.* 27:3957-62.
- Masumi, A., H. Fukazawa, T. Shimazu, M. Yoshida, K. Ozato, K. Komuro, and K. Yamaguchi. 2006. Nucleolin is involved in interferon regulatory factor-2-dependent transcriptional activation. *Oncogene.* 25:5113-24.
- Medina, F.J., A. Cerdido, and M.E. Fernandez-Gomez. 1995. Components of the nucleolar processing complex (Pre-rRNA, fibrillarin, and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. *Exp Cell Res.* 221:111-25.

- Mehes, G., and L. Pajor. 1995. Nucleolin and fibrillarin expression in stimulated lymphocytes and differentiating HL-60 cells. A flow cytometric assay. *Cell Prolif.* 28:329-36.
- Messmer, B., and C. Dreyer. 1993. Requirements for nuclear translocation and nucleolar accumulation of nucleolin of *Xenopus laevis*. *Eur J Cell Biol.* 61:369-82.
- Meyuhas, O., V. Baldin, G. Bouche, and F. Amalric. 1990. Glucocorticoids repress ribosome biosynthesis in lymphosarcoma cells by affecting gene expression at the level of transcription, posttranscription and translation. *Biochim Biophys Acta.* 1049:38-44.
- Mi, Y., S.D. Thomas, X. Xu, L.K. Casson, D.M. Miller, and P.J. Bates. 2003. Apoptosis in leukemia cells is accompanied by alterations in the levels and localization of nucleolin. *J Biol Chem.* 278:8572-9.
- Miki, Y., T. Tazawa, K. Hirano, H. Matsushima, S. Kumamoto, N. Hamasaki, T. Yamaguchi, and M. Beppu. 2007. Clearance of oxidized erythrocytes by macrophages: involvement of caspases in the generation of clearance signal at band 3 glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun.* 363:57-62.
- Morimoto, Y., S. Kito, T. Ohba, H. Morimoto, H. Okamura, and T. Haneji. 2001. Alteration of argyrophilic nucleolar organizer region associated (Ag-NOR) proteins in apoptosis-induced human salivary gland cells and human oral squamous carcinoma cells. *J Oral Pathol Med.* 30:193-9.
- Mourmouras, V., G. Cevenini, E. Cosci, M.C. Epistolato, M. Biagioli, L. Barbagli, P. Luzi, S. Mannucci, and C. Miracco. 2009. Nucleolin protein expression in cutaneous melanocytic lesions. *J Cutan Pathol.* 36:637-46.
- Murakami, T., H. Ohmori, S. Gotoh, T. Tsuda, R. Ohya, S. Akiya, and K. Higashi. 1991. Down modulation of N-myc, heat-shock protein 70, and nucleolin during the differentiation of human neuroblastoma cells. *J Biochem.* 110:146-50.
- Murakami, T., H. Ohmori, T. Tsuda, and K. Higashi. 1991. The effect of changes of N-myc products on the gene expression of heat-shock protein (hsp-70) and nucleolin during differentiation of neuroblastoma cells. *Prog Clin Biol Res.* 366:65-70.
- Naim, H.Y., G. Joberty, M. Alfalah, and R. Jacob. 1999. Temporal association of the N- and O-linked glycosylation events and their implication in the polarized sorting of intestinal brush border sucrase-isomaltase, aminopeptidase N, and dipeptidyl

- peptidase IV. *J Biol Chem.* 274:17961-7.
- Najbauer, J., B.A. Johnson, A.L. Young, and D.W. Aswad. 1993. Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. *J Biol Chem.* 268:10501-9.
- Nisole, S., B. Krust, C. Callebaut, G. Guichard, S. Muller, J.P. Briand, and A.G. Hovanessian. 1999. The anti-HIV pseudopeptide HB-19 forms a complex with the cell-surface-expressed nucleolin independent of heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem.* 274:27875-84.
- Nisole, S., B. Krust, E. Dam, A. Bianco, N. Seddiki, S. Loaec, C. Callebaut, G. Guichard, S. Muller, J.P. Briand, and A.G. Hovanessian. 2000. The HB-19 pseudopeptide 5[Kpsi(CH₂N)PR]-TASP inhibits attachment of T lymphocyte- and macrophage-tropic HIV to permissive cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 16:237-49.
- Nisole, S., B. Krust, and A.G. Hovanessian. 2002. Anchorage of HIV on permissive cells leads to coaggregation of viral particles with surface nucleolin at membrane raft microdomains. *Exp Cell Res.* 276:155-73.
- Nisole, S., E.A. Said, C. Mische, M.C. Prevost, B. Krust, P. Bouvet, A. Bianco, J.P. Briand, and A.G. Hovanessian. 2002. The anti-HIV pentameric pseudopeptide HB-19 binds the C-terminal end of nucleolin and prevents anchorage of virus particles in the plasma membrane of target cells. *J Biol Chem.* 277:20877-86.
- Olson, M.O., E.G. Ezrailson, K. Guetzow, and H. Busch. 1975. Localization and phosphorylation of nuclear, nucleolar and extranucleolar non-histone proteins of Novikoff hepatoma ascites cells. *J Mol Biol.* 97:611-9.
- Olson, M.O., Z.M. Rivers, B.A. Thompson, W.Y. Kao, and S.T. Case. 1983. Interaction of nucleolar phosphoprotein C23 with cloned segments of rat ribosomal deoxyribonucleic acid. *Biochemistry.* 22:3345-51.
- Orrick, L.R., M.O. Olson, and H. Busch. 1973. Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70:1316-20.
- Otake, Y., T.K. Sengupta, S. Bandyopadhyay, E.K. Spicer, and D.J. Fernandes. 2005. Retinoid-induced apoptosis in HL-60 cells is associated with nucleolin down-regulation and destabilization of Bcl-2 mRNA. *Mol Pharmacol.* 67:319-26.

- Otake, Y., S. Soundararajan, T.K. Sengupta, E.A. Kio, J.C. Smith, M. Pineda-Roman, R.K. Stuart, E.K. Spicer, and D.J. Fernandes. 2007. Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. *Blood*. 109:3069-75.
- Pasternack, M.S., K.J. Bleier, and T.N. McInerney. 1991. Granzyme A binding to target cell proteins. Granzyme A binds to and cleaves nucleolin in vitro. *J Biol Chem*. 266:14703-8.
- Pedemonte, C.H., G. Sachs, and J.H. Kaplan. 1990. An intrinsic membrane glycoprotein with cytosolically oriented n-linked sugars. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:9789-93.
- Pellar, G.J., and P.J. DiMario. 2003. Deletion and site-specific mutagenesis of nucleolin's carboxy GAR domain. *Chromosoma*. 111:461-9.
- Peter, M., J. Nakagawa, M. Doree, J.C. Labbe, and E.A. Nigg. 1990. Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell*. 60:791-801.
- Pfeifle, J., and F.A. Anderer. 1983. Localization of phosphoprotein PP 105 in cell lines of various species. *Biochem Biophys Res Commun*. 116:106-12.
- Pick, R., S. Badura, S. Bosser, and M. Zornig. 2006. Upon intracellular processing, the C-terminal death domain-containing fragment of the p53-inducible PIDD/LRDD protein translocates to the nucleoli and interacts with nucleolin. *Biochem Biophys Res Commun*. 349:1329-38.
- Raman, B., C. Guarnaccia, K. Nadassy, S. Zakhariev, A. Pintar, F. Zanuttin, D. Frigyes, C. Acatrinei, A. Vindigni, G. Pongor, and S. Pongor. 2001. N(omega)-arginine dimethylation modulates the interaction between a Gly/Arg-rich peptide from human nucleolin and nucleic acids. *Nucleic Acids Res*. 29:3377-84.
- Rankin, M.L., M.A. Heine, S. Xiao, M.D. LeBlanc, J.W. Nelson, and P.J. DiMario. 1993. A complete nucleolin cDNA sequence from *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res*. 21:169.
- Re, R.N., and J.L. Cook. 2006. An intracrine view of angiogenesis. *Bioessays*. 28:943-53.
- Reboud, J.P., A.M. Reboud, J.J. Madjar, and M. Buisson. 1974. Study of protein reactivity in rat liver ribosomes. Effect of RNA addition to autodigested ribosomes. *Acta Biol Med Ger*. 33:661-6.
- Reichler, S.A., J. Balk, M.E. Brown, K. Woodruff, G.B. Clark, and S.J. Roux. 2001. Light differentially regulates cell division and the mRNA abundance of pea nucleolin

- during de-etiolation. *Plant Physiol.* 125:339-50.
- Reiser, G., and H.G. Bernstein. 2004. Altered expression of protein p42IP4/centaurin- α 1 in Alzheimer's disease brains and possible interaction of p42IP4 with nucleolin. *Neuroreport.* 15:147-8.
- Reyes-Reyes, E.M., and S.K. Akiyama. 2008. Cell-surface nucleolin is a signal transducing P-selectin binding protein for human colon carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 314:2212-23.
- Rodgers, J.T., P. Patel, J.L. Hennes, S.L. Bolognia, and D.P. Mascotti. 2000. Use of biotin-labeled nucleic acids for protein purification and agarose-based chemiluminescent electromobility shift assays. *Anal Biochem.* 277:254-9.
- Said, E.A., J. Courty, J. Svab, J. Delbe, B. Krust, and A.G. Hovanessian. 2005. Pleiotrophin inhibits HIV infection by binding the cell surface-expressed nucleolin. *FEBS J.* 272:4646-59.
- Said, E.A., B. Krust, S. Nisole, J. Svab, J.P. Briand, and A.G. Hovanessian. 2002. The anti-HIV cytokine midkine binds the cell surface-expressed nucleolin as a low affinity receptor. *J Biol Chem.* 277:37492-502.
- Saxena, A., C.J. Rorie, D. Dimitrova, Y. Daniely, and J.A. Borowiec. 2006. Nucleolin inhibits Hdm2 by multiple pathways leading to p53 stabilization. *Oncogene.* 25:7274-88.
- Schachter, H. 1991. The 'yellow brick road' to branched complex N-glycans. *Glycobiology.* 1:453-61.
- Schachter, H. 2000. The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconj J.* 17:465-83.
- Schmidt-Zachmann, M.S., and E.A. Nigg. 1993. Protein localization to the nucleolus: a search for targeting domains in nucleolin. *J Cell Sci.* 105 (Pt 3):799-806.
- Schneider, H.R., and O.G. Issinger. 1988. Nucleolin (C23), a physiological substrate for casein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun.* 156:1390-7.
- Schneider, H.R., and O.G. Issinger. 1989. Growth-dependent modulation of casein kinase II and its substrate nucleolin in primary human cell cultures and HeLa cells. *Biochim Biophys Acta.* 1014:98-100.
- Schwab, M.S., and C. Dreyer. 1997. Protein phosphorylation sites regulate the function of the bipartite NLS of nucleolin. *Eur J Cell Biol.* 73:287-97.
- Seddiki, N., S. Nisole, B. Krust, C. Callebaut, G. Guichard, S. Muller, J.P. Briand, and A.G.

- Hovanessian. 1999. The V3 loop-mimicking pseudopeptide 5[Kpsi(CH2N)PR]-TASP inhibits HIV infection in primary macrophage cultures. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 15:381-90.
- Semenkovich, C.F., R.E. Ostlund, Jr., M.O. Olson, and J.W. Yang. 1990. A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoproteins specifically is nucleolin. *Biochemistry*. 29:9708-13.
- Sengupta, T.K., S. Bandyopadhyay, D.J. Fernandes, and E.K. Spicer. 2004. Identification of nucleolin as an AU-rich element binding protein involved in bcl-2 mRNA stabilization. *J Biol Chem*. 279:10855-63.
- Serin, G., G. Joseph, L. Ghisolfi, M. Bauzan, M. Erard, F. Amalric, and P. Bouvet. 1997. Two RNA-binding domains determine the RNA-binding specificity of nucleolin. *J Biol Chem*. 272:13109-16.
- Shen, E.C., M.F. Henry, V.H. Weiss, S.R. Valentini, P.A. Silver, and M.S. Lee. 1998. Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev*. 12:679-91.
- Shi, H., Y. Huang, H. Zhou, X. Song, S. Yuan, Y. Fu, and Y. Luo. 2007. Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin. *Blood*. 110:2899-906.
- Shibata, Y., T. Muramatsu, M. Hirai, T. Inui, T. Kimura, H. Saito, L.M. McCormick, G. Bu, and K. Kadomatsu. 2002. Nuclear targeting by the growth factor midkine. *Mol Cell Biol*. 22:6788-96.
- Sicard, H., M. Faubladiere, J. Noaillac-Depeyre, I. Leger-Silvestre, N. Gas, and M. Caizergues-Ferrer. 1998. The role of the *Schizosaccharomyces pombe* gar2 protein in nucleolar structure and function depends on the concerted action of its highly charged N terminus and its RNA-binding domains. *Mol Biol Cell*. 9:2011-23.
- Sinclair, J.F., and A.D. O'Brien. 2002. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem*. 277:2876-85.
- Sinclair, J.F., and A.D. O'Brien. 2004. Intimin types alpha, beta, and gamma bind to nucleolin with equivalent affinity but lower avidity than to the translocated intimin receptor. *J Biol Chem*. 279:33751-8.
- Sipos, K., and M.O. Olson. 1991. Nucleolin promotes secondary structure in ribosomal

- RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 177:673-8.
- Sirri, V., P. Roussel, M.C. Gendron, and D. Hernandez-Verdun. 1997. Amount of the two major Ag-NOR proteins, nucleolin, and protein B23 is cell-cycle dependent. *Cytometry.* 28:147-56.
- Sirri, V., P. Roussel, and D. Hernandez-Verdun. 2000. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron.* 31:121-6.
- Skalweit, A., A. Doller, A. Huth, T. Kahne, P.B. Persson, and B.J. Thiele. 2003. Posttranscriptional control of renin synthesis: identification of proteins interacting with renin mRNA 3'-untranslated region. *Circ Res.* 92:419-27.
- Smyth, M.J., K.A. Browne, K.Y. Thia, V.A. Apostolidis, M.H. Kershaw, and J.A. Trapani. 1994. Hypothesis: cytotoxic lymphocyte granule serine proteases activate target cell endonucleases to trigger apoptosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 21:67-70.
- Sorokina, E.A., and J.G. Kleinman. 1999. Cloning and preliminary characterization of a calcium-binding protein closely related to nucleolin on the apical surface of inner medullary collecting duct cells. *J Biol Chem.* 274:27491-6.
- Sorokina, E.A., J.A. Wesson, and J.G. Kleinman. 2004. An acidic peptide sequence of nucleolin-related protein can mediate the attachment of calcium oxalate to renal tubule cells. *J Am Soc Nephrol.* 15:2057-65.
- Soundararajan, S., W. Chen, E.K. Spicer, N. Courtenay-Luck, and D.J. Fernandes. 2008. The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 68:2358-65.
- Srivastava, M., P.J. Fleming, H.B. Pollard, and A.L. Burns. 1989. Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. *FEBS Lett.* 250:99-105.
- Srivastava, M., O.W. McBride, P.J. Fleming, H.B. Pollard, and A.L. Burns. 1990. Genomic organization and chromosomal localization of the human nucleolin gene. *J Biol Chem.* 265:14922-31.
- Srivastava, M., and H.B. Pollard. 1999. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J.* 13:1911-22.
- Storck, S., M. Shukla, S. Dimitrov, and P. Bouvet. 2007. Functions of the histone chaperone nucleolin in diseases. *Subcell Biochem.* 41:125-44.
- Suzuki, T., N. Suzuki, and T. Hosoya. 1993. Limited proteolysis of rat liver nucleolin by endogenous proteases: effects of polyamines and histones. *Biochem J.* 289 (Pt

- 1):109-15.
- Takagi, M., M.J. Absalon, K.G. McLure, and M.B. Kastan. 2005. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell*. 123:49-63.
- Take, M., J. Tsutsui, H. Obama, M. Ozawa, T. Nakayama, I. Maruyama, T. Arima, and T. Muramatsu. 1994. Identification of nucleolin as a binding protein for midkine (MK) and heparin-binding growth associated molecule (HB-GAM). *J Biochem*. 116:1063-8.
- Tate, A., S. Isotani, M.J. Bradley, R.A. Sikes, R. Davis, L.W. Chung, and M. Edlund. 2006. Met-Independent Hepatocyte Growth Factor-mediated regulation of cell adhesion in human prostate cancer cells. *BMC Cancer*. 6:197.
- Tong, C.G., S. Reichler, S. Blumenthal, J. Balk, H.L. Hsieh, and S.J. Roux. 1997. Light regulation of the abundance of mRNA encoding a nucleolin-like protein localized in the nucleoli of pea nuclei. *Plant Physiol*. 114:643-52.
- Trombetta, E.S., and A. Helenius. 1998. Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr Opin Struct Biol*. 8:587-92.
- Tsai, B., Y. Ye, and T.A. Rapoport. 2002. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:246-55.
- Tsou, J.H., K.Y. Chang, W.C. Wang, J.T. Tseng, W.C. Su, L.Y. Hung, W.C. Chang, and B.K. Chen. 2008. Nucleolin regulates c-Jun/Sp1-dependent transcriptional activation of cPLA2alpha in phorbol ester-treated non-small cell lung cancer A549 cells. *Nucleic Acids Res*. 36:217-27.
- Turck, N., O. Lefebvre, I. Gross, P. Gendry, M. Kedinger, P. Simon-Assmann, and J.F. Launay. 2006. Effect of laminin-1 on intestinal cell differentiation involves inhibition of nuclear nucleolin. *J Cell Physiol*. 206:545-55.
- Tuteja, R., and N. Tuteja. 1998. Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 33:407-36.
- Ueno, T., K. Tokunaga, H. Sawa, M. Maeda, J. Chiba, A. Kojima, H. Hasegawa, Y. Shoya, T. Sata, T. Kurata, and H. Takahashi. 2004. Nucleolin and the packaging signal, psi, promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiol Immunol*. 48:111-8.
- Ugrinova, I., K. Monier, C. Ivaldi, M. Thiry, S. Storck, F. Mongelard, and P. Bouvet. 2007.

- Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC Mol Biol.* 8:66.
- van Die, I., R.D. Cummings, A. van Tetering, C.H. Hokke, C.A. Koeleman, and D.H. van den Eijnden. 2000. Identification of a novel UDP-Glc:GlcNAc beta1-->4-glucosyltransferase in *Lymnaea stagnalis* that may be involved in the synthesis of complex-type oligosaccharide chains. *Glycobiology.* 10:263-71.
- Warrener, P., and R. Petryshyn. 1991. Phosphorylation and proteolytic degradation of nucleolin from 3T3-F442A cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 180:716-23.
- Wilkinson, D. 1996. Cofactors provide the entry keys. HIV-1. *Curr Biol.* 6:1051-3.
- Wilsie, L.C., A.M. Gonzales, and R.A. Orlando. 2006. Syndecan-1 mediates internalization of apoE-VLDL through a low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-independent, non-clathrin-mediated pathway. *Lipids Health Dis.* 5:23.
- Xicohtencatl-Cortes, J., V. Monteiro-Neto, M.A. Ledesma, D.M. Jordan, O. Francetic, J.B. Kaper, J.L. Puente, and J.A. Giron. 2007. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Invest.* 117:3519-29.
- Xie, M., I. Kobayashi, T. Kiyoshima, H. Yamaza, J.Y. Honda, K. Takahashi, N. Enoki, A. Akamine, and H. Sakai. 2007. Functional implication of nucleolin in the mouse first molar development. *J Biol Chem.* 282:23275-83.
- Xu, X., F. Hamhouyia, S.D. Thomas, T.J. Burke, A.C. Girvan, W.G. McGregor, J.O. Trent, D.M. Miller, and P.J. Bates. 2001. Inhibition of DNA replication and induction of S phase cell cycle arrest by G-rich oligonucleotides. *J Biol Chem.* 276:43221-30.
- Xue, Z., and T. Melese. 1994. Nucleolar proteins that bind NLSs: a role in nuclear import or ribosome biogenesis? *Trends Cell Biol.* 4:414-7.
- Yang, C., D.A. Maignel, and F. Carrier. 2002. Identification of nucleolin and nucleophosmin as genotoxic stress-responsive RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 30:2251-60.
- Ying, G.G., P. Proost, J. van Damme, M. Bruschi, M. Introna, and J. Golay. 2000. Nucleolin, a novel partner for the Myb transcription factor family that regulates their activity. *J Biol Chem.* 275:4152-8.
- Yu, D., M.Z. Schwartz, and R. Petryshyn. 1998. Effect of laminin on the nuclear localization of nucleolin in rat intestinal epithelial IEC-6 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 247:186-92.

- Zhou, G., M.L. Seibenhener, and M.W. Wooten. 1997. Nucleolin is a protein kinase C-zeta substrate. Connection between cell surface signaling and nucleus in PC12 cells. *J Biol Chem.* 272:31130-7.
- Zhu, Y., D. Lu, and P. DiMario. 1999. Nucleolin, defective for MPF phosphorylation, localizes normally during mitosis and nucleologenesis. *Histochem Cell Biol.* 111:477-87.

Résumé

La nucléoline est une protéine nucléolaire ubiquitaire, impliquée dans la régulation de la transcription, la croissance et la prolifération cellulaire. Elle est aussi décrite comme une protéine transitant entre le noyau, le cytoplasme, et la surface cellulaire où elle sert de récepteur pour divers ligands extracellulaires. Ses mécanismes d'expression à la surface cellulaire et ses rôles ne sont néanmoins pas clairement précisés. Curieusement, des formes N- et O-glycosylées de la nucléoline de surface et cytosolique ont été mises en évidence dans notre laboratoire. Cette glycosylation est atypique puisque la nucléoline ne possède aucune séquence signal permettant de la diriger vers la voie classique de sécrétion. Les N-glycanes étant localisés dans des domaines fonctionnels, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle ces glycanes pourraient modifier son trafic, ses propriétés d'interaction et ses fonctions. Dans ce travail, nous avons étudié si la nucléoline glycosylée possédait des fonctions spécifiques et dans quelle mesure le trafic et les interactions de la nucléoline pouvaient être modifiés par la N-glycosylation.

Premièrement, nous avons mis en évidence, en collaboration avec A. Hovanessian (UPR 2228 CNRS, Paris) et J.P. Briand (UPR 9021, Strasbourg), que la nucléoline de surface est exclusivement glycosylée, et que la glycosylation est essentielle à son expression de surface. Nous montrons que cette glycoprotéine possède une activité de signalisation intracellulaire mettant en œuvre le calcium comme messenger secondaire. Par cytofluorimétrie en flux sur des cellules T Jurkat chargées en sonde calcique fluorescente, nous avons démontré la génération de flux calciques induits par la fixation de HB-19 (pseudopeptide anti-VIH spécifique de la nucléoline) sur la nucléoline de surface. En présence de HB-19, une entrée rapide, réversible, spécifique et dose dépendante de calcium est induite. Les canaux ioniques impliqués sont des canaux SOC (Store operated channels). Ces résultats ont été confirmés, en collaboration avec P. Mariot (U800 INSERM), par des expériences d'imagerie calcique et de patch clamp sur les cellules cancéreuses de prostate PC3 et DU145. Nous postulons que, après fixation d'un ligand, la nucléoline de surface peut subir des changements de conformation ou d'association capables d'activer d'autres récepteurs impliqués dans les flux calciques et la signalisation cellulaire.

Deuxièmement, nous avons recherché le(s) rôle(s) de la glycosylation de la nucléoline dans ses propriétés d'interaction avec certains de ses ligands. Nous avons mis en place une stratégie pour produire des formes recombinantes de nucléoline, sans le domaine N-terminal, glycosylées ou non, en cellules d'insecte. Ces protéines ont été purifiées et leurs N-glycanes caractérisés. La structuration des protéines a été contrôlée par dichroïsme circulaire et fluorimétrie (coll. A. Leroy). Nous avons ensuite examiné la capacité des différents glycoformes de nucléoline à interagir avec elles-mêmes, mais aussi avec plusieurs de ses ligands: la lactoferrine, la laminine, l'ApoE, les ARN et les héparanes sulfates. Par Biacore et en électrophorèse, nous avons mis en évidence la capacité de la nucléoline à interagir avec elle-même en fonction de son état de glycosylation. Concernant l'interaction de la nucléoline avec ses ligands, la glycosylation semble moduler, ou non, cette interaction, en fonction de la nature du domaine de la nucléoline qui interagit. Nous en concluons que la glycosylation peut jouer un rôle important dans la modulation des interactions de la nucléoline avec elle-même et certains ligands, et donc, ses fonctions.

Enfin, en collaboration avec C. Slomianny (U800 INSERM) et L. Hélot (IRI), nous avons étudié le rôle de la glycosylation de la nucléoline dans son trafic. La cytofluorimétrie en flux et la microscopie confocale ont été utilisées pour étudier l'expression de surface et la localisation cellulaire de nucléolines recombinantes mutées, N-glycosylables ou non, par les cellules Hela. Nous avons démontré que seules les cellules qui expriment des formes glycosylables présentent la nucléoline à leur surface, confirmant que la glycosylation est essentielle à l'expression de surface. Nous mettons en évidence le transit de la nucléoline, indépendamment de sa capacité à être glycosylée, par les endosomes précoces et, de façon surprenante, (absence de peptide signal) dans le trans-Golgi.

En conclusion, nos travaux suggèrent que la nucléoline de surface possède des spécificités structurales (glycosylation et capacité d'association avec elle-même et ses ligands) qui, en plus de sa localisation membranaire, lui confèrent des fonctions différentes de ses isoformes nucléaires et cytoplasmiques. En particulier, elle semble capable, après fixation d'un ligand, d'induire des signaux intracellulaires utilisant le calcium comme messenger secondaire. Nos résultats suggèrent que la glycosylation est une modification essentielle de la molécule, non seulement pour son expression et sa distribution à la surface cellulaire, mais également pour ses fonctions.