



uOttawa

L'Université canadienne
Canada's university

**FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES
ET POSTDOCTORALES**



**FACULTY OF GRADUATE AND
POSTDOCTORAL STUDIES**

Isabelle Robert

AUTEUR DE LA THÈSE / AUTHOR OF THESIS

M.Sc. (Médecine Cellulaire et Moléculaire)

GRADE / DEGREE

Département de Médecine Cellulaire et Moléculaire

FACULTÉ, ÉCOLE, DÉPARTEMENT / FACULTY, SCHOOL, DEPARTMENT

Régulation de la séquestration nucléolaire des protéines par la méthylation des arginines

TITRE DE LA THÈSE / TITLE OF THESIS

Stephen Lee

DIRECTEUR (DIRECTRICE) DE LA THÈSE / THESIS SUPERVISOR

CO-DIRECTEUR (CO-DIRECTRICE) DE LA THÈSE / THESIS CO-SUPERVISOR

Jocelyn Côté

Martin Pelchat

Gary W. Slater

Le Doyen de la Faculté des études supérieures et postdoctorales / Dean of the Faculty of Graduate and Postdoctoral Studies

**RÉGULATION DE LA SÉQUESTRATION
NUCLÉOLAIRE DES PROTÉINES PAR LA
MÉTHYLATION DES ARGININES**

Par :
Isabelle Robert

La soumission de cette thèse est une des exigences du programme de
maîtrise en sciences en médecine cellulaire et moléculaire.

Université d'Ottawa

11 décembre 2009

©Isabelle Robert, Ottawa, Canada, 2009



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-61342-9
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-61342-9

NOTICE:

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

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

AVIS:

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

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

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

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

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

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


Canada

RÉSUMÉ

La glycolyse anaérobie résulte en l'acidification du milieu extracellulaire et est associée à de multiples conditions physiologiques et pathologiques. La diminution du pH extracellulaire induit la détention de la protéine suppresseuse de tumeurs VHL, une molécule impliquée dans la dégradation du facteur induit par l'hypoxie (HIF), dans le nucléole jusqu'au dégagement des protons. Ce processus est contrôlé par le signal de détention nucléolaire régulée par H^+ (NoDS^{H+}). Nous avons observé que le NoDS^{H+} de VHL possède des arginines méthylées à pH neutre qui diminuent l'affinité nucléolaire. Lors de l'accumulation d'ions H^+ extracellulaires, la déméthylation des arginines du NoDS^{H+} induit la séquestration nucléolaire de VHL. Ce processus est réversé suite à la neutralisation du milieu acide par la reméthylation des arginines et le relâchement de VHL du nucléole. Cette découverte est le premier exemple de la réversibilité de la méthylation des arginines régulée par une constante physiologique et contrôlant un processus cellulaire, la séquestration nucléolaire.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures	v
Liste des abréviations.....	vi
Remerciements.....	viii
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
1.1 La production d'énergie et l'hypoxie.....	2
1.1.1 Le métabolisme aérobie du glucose.....	2
1.1.2 L'hypoxie et la glycolyse anaérobie.....	5
1.1.3 Les conséquences physiologiques de l'hypoxie.....	7
1.1.4 Les conséquences pathologiques de l'hypoxie.....	9
1.2 Le facteur de transcription induit par l'hypoxie.....	10
1.2.1 Le complexe HIF et sa fonction.....	10
1.2.2 La régulation de la stabilité de HIF par l'oxygène.....	11
1.3 La protéine suppresseuse de tumeurs von Hippel Lindau.....	14
1.3.1 La structure de VHL.....	14
1.3.2 Les fonctions et la distribution cellulaire de VHL.....	16
1.4 Le nucléole.....	17
1.4.1 Le nucléole: un sous-compartiment nucléaire.....	17
1.4.2 Les multiples fonctions du nucléole.....	18
1.5 La séquestration nucléolaire de VHL.....	21
1.5.1 La relocalisation et la détention de VHL dans le nucléole en acidose... ..	21
1.5.2 Le maintien de l'équilibre énergétique par VHL séquestrée dans le nucléole.....	24
1.5.3 Régulation de la détention nucléolaire de VHL par le motif NoDS ^{H+}	25
1.5.4 NoDS ^{H+} dans d'autres protéines.....	26
1.5.5 Les arginines du NoDS ^{H+} de VHL sont cruciales pour son activité.....	28
1.6 La méthylation.....	29
1.6.1 La méthylation: une modification post-traductionnelle.....	29
1.6.2 Les processus cellulaires régulés par la méthylation des arginines.....	30
1.6.3 Les enzymes responsables de la méthylation d'arginines.....	31
1.6.4 La réversibilité de la méthylation des arginines.....	34
1.7 Raisonnement.....	36
1.8 Hypothèse.....	37
1.9 Objectifs.....	38
CHAPITRE 2: MÉTHODES.....	40
2.1 Cellules.....	41
2.2 Culture cellulaire.....	41
2.3 Plasmides.....	42
2.4 Transfections.....	42
2.5 Traitements avec les drogues.....	43
2.6 Solubilité par Triton.....	43
2.7 Isolation de nucléoles par gradients de sucrose.....	44
2.8 Immunoprécipitation.....	45

2.9 Western	45
2.10 Coloration à l'argent.....	47
2.11 Spectrométrie de masse.....	47
2.12 Peptides	48
2.13 Microinjections	49
2.14 Imagerie de fluorescence sur cellules vivantes	49
CHAPITRE 3: RÉSULTATS.....	50
3.1. Les inhibiteurs de méthylation affectent la cinétique de la séquestration nucléolaire de VHL et du NoDS ^{H+} VHL.....	51
3.2 Les arginines de VHL et du NoDS ^{H+} VHL sont méthylées en conditions neutres	57
3.3 En conditions acides, les arginines de VHL et du NoDS ^{H+} VHL sont non-méthylées.....	64
3.4 Des groupes méthyles sont perdus de la protéine endogène Hsc 70 suivant l'acidification extracellulaire	66
3.5 La séquestration nucléolaire du NoDS ^{H+} VHL est affectée par l'état de méthylation de ses arginines.	71
3.6 La substitution des arginines du NoDS ^{H+} VHL pour des résidus citrullines empêche la séquestration nucléolaire.	75
3.7 Les inhibiteurs de méthylation empêchent la sortie nucléolaire de VHL.	78
3.8 Les arginines du NoDS ^{H+} VHL sont reméthylées après la neutralisation du milieu acide.	80
CHAPITRE 4: DISCUSSION	83
4.1 Résumé des découvertes majeures.....	84
4.2 Une forme de méthylation régule la séquestration nucléolaire.....	85
4.3 Des groupes méthyles sont retirés des arginines de VHL et du NoDS ^{H+} VHL suite à l'acidification extracellulaire.....	88
4.4 différences entre les résultats avec l'anticorps SYM11 et la spectrométrie de masse	90
4.5 Une seconde protéine pourvue d'un motif NoDS ^{H+} démontre une perte de groupes méthyles en acidose.....	92
4.6 l'affinité du motif NoDS ^{H+} VHL pour le nucléole est augmentée par des arginines non-méthylées.....	94
4.7 La déméthylation des arginines du NoDS ^{H+} VHL induit la détention nucléolaire en acidose	96
4.8 Les arginines du motif NoDS ^{H+} VHL sont reméthylées suite au dégagement des ions H ⁺ extracellulaires.	97
4.9 Modèle de régulation de la séquestration nucléolaire par la méthylation et déméthylation des arginines du motif NoDS ^{H+}	99
4.10 Les enzymes régulant la méthylation et déméthylation des arginines du motif NoDS ^{H+}	102
4.11 Étapes futures.....	105
4.12 Conclusion	109
CHAPITRE 5: RÉFÉRENCES	110

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Le métabolisme aérobie du glucose.	1
Figure 2: Le métabolisme anaérobie du glucose.....	1
Figure 3: Le complexe HIF et la régulation de sa stabilité.	1
Figure 4: La structure, la formation du complexe et la localisation cellulaire de la protéine suppresseuse de tumeurs von Hippel Lindau (VHL).	1
Figure 5: La détention nucléolaire de VHL en acidose et la régulation de HIF- α	1
Figure 6: Le motif NoDS ^{H+} et l'importance des arginines.	1
Figure 7: Les réactions de méthylation des arginines par les enzymes PRMT.	1
Figure 8: Les réactions de déimination, déméthylimination et déméthylation des arginines.	1
Figure 9: La rapidité de la séquestration nucléolaire de VHL et du NoDS ^{H+} VHL en acidose est augmentée par le traitement avec des inhibiteurs de méthylation. .	1
Figure 10: VHL est reconnue par un anticorps spécifique aux arginines symétriquement diméthylées en conditions neutres.	1
Figure 11: Flag-NoDS ^{H+} VHL-PK-GFP est capturée par le nucléole en conditions acidiques.	1
Figure 12: Les trois arginines contenues dans le NoDS ^{H+} VHL sont méthylées en conditions neutres.	1
Figure 13: VHL n'est pas reconnue par l'anticorps spécifique aux arginines symétriquement diméthylées en conditions acidiques.	1
Figure 14: Le NoDS ^{H+} VHL contient des arginines non-méthylées en conditions acidiques.	1
Figure 15: Le NoDS ^{H+} de Hsc70 perd trois groupes méthyles lorsque les cellules sont transférées de conditions neutres à acidiques.	1
Figure 16: La séquestration nucléolaire du NoDS ^{H+} VHL est augmentée avec des arginines non-méthylées.	1
Figure 17: La séquestration nucléolaire du NoDS ^{H+} VHL est empêchée lorsque les arginines sont substituées pour des citrullines.	1
Figure 18: La sortie de VHL du nucléole après la neutralisation du milieu acide est empêchée par le traitement avec des inhibiteurs de méthylation.....	1
Figure 19: Les trois arginines du NoDS ^{H+} de VHL sont méthylées après la neutralisation du milieu acide.	1
Figure 20: Modèle du cycle de méthylation et déméthylation des arginines du motif NoDS ^{H+} en fonction de la concentration en ions H ⁺ extracellulaires.	1

LISTE DES ABRÉVIATIONS

acétyl-CoA	acétyl-coenzyme A
aDMA	arginine asymétriquement diméthylée
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNr	acide désoxyribonucléique ribosomal
AdoHcy	S-adénosylhomocystéine
AdoMet	S-adénosylméthionine
AdOx	adénosine périodate oxydé
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
ARN pol I	ARN polymérase I
ARN pol II	ARN polymérase II
ARN pol III	ARN polymérase III
ATP	adénosine triphosphate
BCA	acide bicinchoninique
bHLH	basique hélice-boucle-hélice
CARM1	arginine méthyltransférase co-activateur-associé 1
Cdc14	protéine du cycle de division cellulaire 14
CF	centres fibrillaires
CFD	composantes fibrillaires denses
CG	composantes granulaires
chx	cycloheximide
DNA pol δ p125	sous-unité catalytique p125 de l'ADN polymérase delta
DMSO	diméthylsulfoxyde
DTT	dithiothréitol
eIF2B α	sous-unité alpha du facteur du démarrage de la traduction eIF2B
EPO	érythropoïétine
FAD ⁺	flavine adénine dinucléotide
FADH ₂	flavine adénine dinucléotide réduit
FLIP	perte de fluorescence au cours d'un photoblanchiment local
GFP	protéine fluorescente verte
Glut-1	transporteur de glucose 1
GTP	guanosine triphosphate
HIF	facteur induit par l'hypoxie
HIF- α	sous-unité alpha du facteur induit par l'hypoxie
HIF- β	sous-unité beta du facteur induit par l'hypoxie
HRE	élément de réponse à l'hypoxie
Hsc70	protéine de choc thermique constitutive 70
JMJD6	protéine contenant un domaine Jumonji 6

LC/MS-MS	chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LDH	lactate déshydrogénase
MALDI-TOF-MS	spectrométrie de masse par désorption-ionisation laser assistée par matrice – temps de vol
Mdm2	protéine murine double minute 2
MMA	arginine monométhylée
MS	spectrométrie de masse
MTA	5'-(methylthio)adénosine
NAD ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NES	signal d'exportation nucléaire
NLS	signal de localisation nucléaire
NoDS ^{H+}	signal de détention nucléolaire régulée par H ⁺
NoLS	signal de localisation nucléolaire
ODDD	domaine de dégradation dépendant de l'oxygène
PADI4	peptidylarginine déaminase 4
PBS	tampon phosphate salin
PHD	HIF prolyles hydroxylases
PK	pyruvate kinase
PRMT	protéine arginine méthyltransférase
ref	force centrifuge relative
Rho	rhodamine
sDMA	arginine symétriquement diméthylée
SDS	dodécyl-sulfate de sodium
snoRNP	petite ribonucléoprotéine nucléolaire
SPT5	facteur d'élongation transcriptionnelle
STAD	domaine d'arginines permettant le ciblage sous-nucléaire
STHD	domaine hydrophobique permettant le ciblage sous-nucléaire
TAD	domaine de transactivation
TBS	tampon Tris salin
TCA	cycle des acides tricarboxyliques
TD-NEM	motif d'export nucléaire dépendant de la transcription
TFIID	sous-unité 1 du facteur de transcription général
TIF-1A	facteur de transcription spécifique à l'ARN pol I
VEGF	facteur de croissance vasculaire endothéliale
VHL	protéine suppresseuse de tumeurs von Hippel Lindau

REMERCIEMENTS

J'aimerais en premier lieu dire un grand merci à Dr. Stephen Lee pour son expertise, son talent, sa bonne humeur et sa passion pour la science ainsi que pour les nombreuses heures consacrées à la discussion de mon projet. J'aimerais remercier Dr. Mireille Khacho pour toute son aide dans la planification des expériences, dans l'exécution de certaines de celles-ci et dans l'analyse des résultats obtenues lors de cette étude ainsi que pour son sourire et sa patience. J'aimerais également remercier tous les autres membres du laboratoire de Dr. Lee soient Josianne Payette, Aleksandra Franovic, Joshua Dias, Luis Rivero Lopez, Dr. Chet Holterman et Dr. Timothy Audas pour leur aide et leurs conseils. Je remercie les membres de mon comité de maîtrise, Dr. Jocelyn Côté, Dr. David Lohnes et Dr. Ruth Slack, pour leur temps et leurs précieux commentaires. Cette étude a été financée par des fonds octroyés à Dr. Lee provenant des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) ainsi que par ma bourse d'études supérieures du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) et ma bourse d'excellence de l'Université d'Ottawa.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1 LA PRODUCTION D'ÉNERGIE ET L'HYPOXIE

1.1.1 Le métabolisme aérobie du glucose

Afin d'assurer leur survie, leur développement et leur reproduction, les organismes doivent constamment se procurer de l'énergie au moyen de l'alimentation. L'extraction de l'énergie des aliments se fait grâce au catabolisme des métabolites complexes tels que les protéines, les lipides et les polysaccharides. La digestion permet la dégradation enzymatique des composés organiques polymériques en molécules monomériques, comme les acides aminés, les acides gras et les sucres, qui sont ensuite généralement relâchées dans le sang. Le glucose, un sucre composé de six carbones, est le carburant le plus couramment utilisé par les cellules d'organismes multicellulaires complexes pour la production d'énergie. La dégradation du glucose permet aux cellules d'extraire l'énergie emmagasinée dans les liaisons chimiques de ce monomère. Le catabolisme du glucose se fait en deux grandes étapes soient la glycolyse et la respiration cellulaire.

La première étape de la dégradation du glucose est la glycolyse. La glycolyse ne requiert pas d'oxygène moléculaire et peut donc se produire en conditions où la quantité d'oxygène est faible. Suite au transport du glucose du sang vers la cellule grâce aux transporteurs de glucose, une série de dix réactions enzymatiques prenant place dans le cytoplasme permet la production d'énergie par la transformation d'une molécule de glucose en 2 molécules de pyruvate composées de trois carbones (Figure 1A). Cette séquence de réactions permet la production nette de deux molécules d'adénosine triphosphate (ATP) et la réduction de deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) en NADH. L'ATP est le transporteur d'énergie le plus important

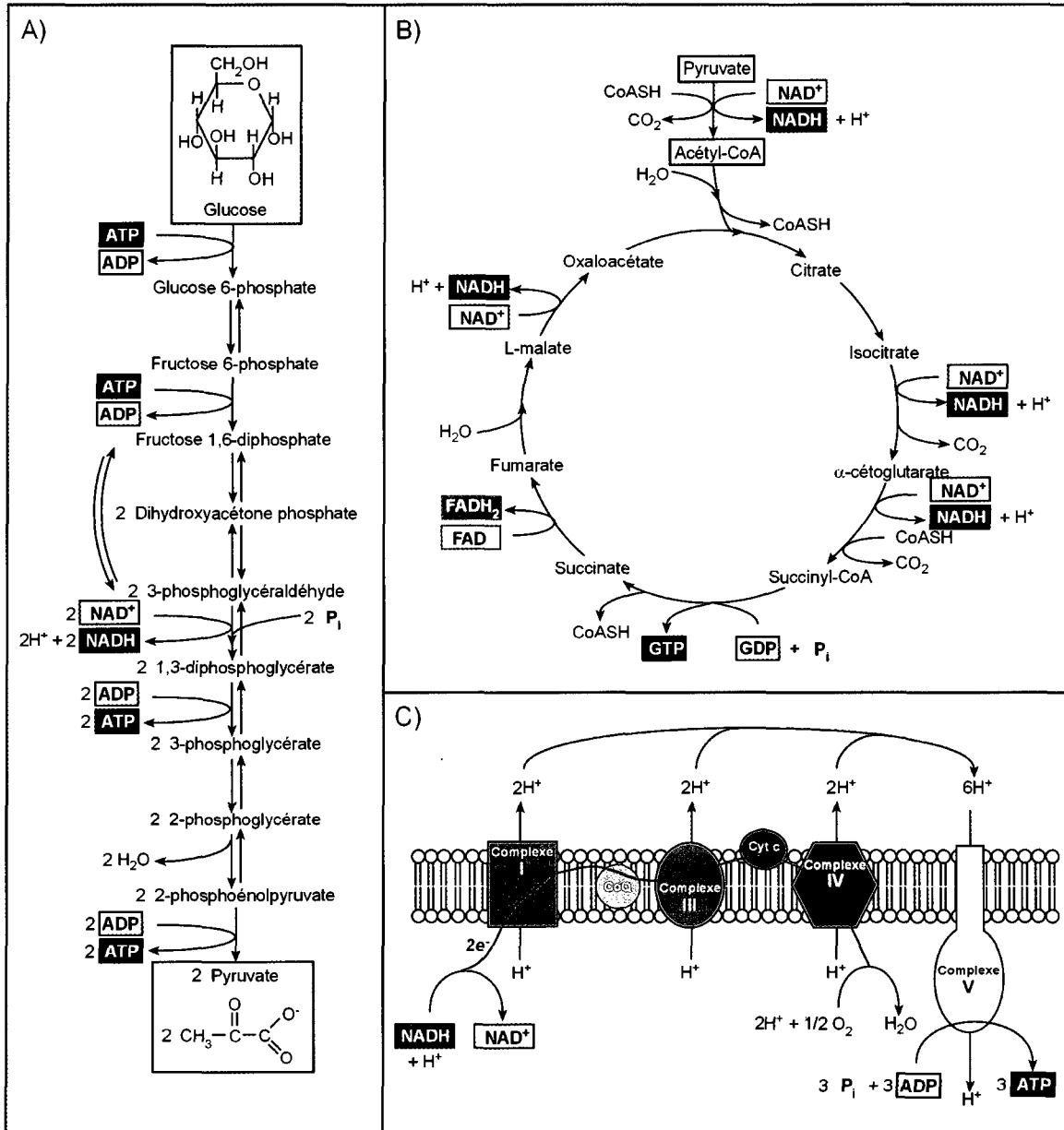


Figure 1: Le métabolisme aérobie du glucose.

En conditions aérobie, le catabolisme du glucose permet la production d'énergie en deux grandes étapes soient la glycolyse et la respiration cellulaire. **(A)** La glycolyse dégrade une molécule de glucose en 2 molécules de pyruvate et permet la production nette de deux molécules d'adénosine triphosphate (ATP) et de deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH). La respiration cellulaire se divise en trois phases soient la décarboxylation du pyruvate, le cycle de l'acide citrique et la phosphorylation oxydative. **(B)** La décarboxylation oxydative du pyruvate produit l'acétyl-CoA, le substrat du cycle de l'acide citrique qui produit une molécule de guanosine triphosphate (GTP), trois molécules de NADH et une molécule de flavine adénine dinucléotide réduit (FADH₂). **(C)** La phosphorylation oxydative permet la production de trois molécules d'ATP pour chaque molécule de NADH et de deux molécules d'ATP pour chaque molécule de FADH₂.

des cellules et le NADH est un transporteur d'électrons riches en énergie.

La respiration cellulaire est la deuxième étape du processus de dégradation du glucose qui a lieu dans la mitochondrie. Cette étape nécessite des molécules d'oxygène et permet d'extraire efficacement une grande quantité d'énergie du glucose. La respiration cellulaire se divise en trois phases soient la décarboxylation du pyruvate, le cycle de l'acide citrique (cycle des acides tricarboxyliques (TCA) ou cycle de Krebs) et la phosphorylation oxydative. Tout d'abord, le produit de la glycolyse, le pyruvate, passe du cytosol à la mitochondrie. Durant la première phase de la respiration cellulaire, une molécule d'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) est produite grâce à la décarboxylation oxydative du pyruvate (Figure 1B). L'acétyl-CoA est le substrat de la deuxième phase de la respiration cellulaire soit le cycle de l'acide citrique. Huit enzymes différentes sont impliquées dans le cycle de Krebs et les réactions organiques catalysées par celles-ci permettent la formation d'une molécule de guanosine triphosphate (GTP) et la réduction de trois molécules de NAD^+ en NADH et d'une molécule de flavine adénine dinucléotide (FAD^+) en FADH_2 (Figure 1B). La dernière phase de la respiration cellulaire est la phosphorylation oxydative qui permet la formation de plusieurs molécules d'ATP. Les transporteurs d'électrons riches en énergie NADH et FADH_2 , produits lors de la glycolyse et du cycle de l'acide citrique, sont relocalisés dans la membrane interne mitochondriale. À cet endroit, la réoxydation du NADH et du FADH_2 en NAD^+ et FAD^+ respectivement permet de libérer leurs électrons qui sont transférés sur la chaîne de transport des électrons. Les électrons se déplacent le long de la chaîne pour produire, avec des molécules d'oxygène et des protons, des molécules d'eau et d'ATP (Figure 1C). Chaque molécule de NADH permet la production de trois molécules d'ATP tandis que deux ATP

sont formées pour chaque molécule de FADH_2 . En conditions aérobiques, le catabolisme d'une molécule de glucose par la glycolyse et la respiration cellulaire permet de produire un total de 36 molécules d'ATP.

1.1.2 L'hypoxie et la glycolyse anaérobique

Lorsque les quantités en oxygène moléculaire sont limitées, la respiration cellulaire ne peut pas se produire et donc les cellules dépendent de la glycolyse anaérobique pour la production d'énergie. En conditions normoxiques, l'air atmosphérique contient 21% d'oxygène alors qu'en conditions hypoxiques, le niveau d'oxygène atmosphérique diminue à aussi peu que 1%. Les cellules débutent la glycolyse anaérobique lorsque la concentration en oxygène diminue de 50 à 70% (Gladden, 2001; Mekhail *et al.*, 2004b). En conditions hypoxiques, la régénération du cofacteur limitant de la glycolyse, le NAD^+ , est assurée par la fermentation homolactique (Figure 2). L'oxydation du NADH est catalysée par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) et nécessite le produit de la glycolyse, le pyruvate. Cette réaction enzymatique produit le NAD^+ et l'acide lactique. Même si la glycolyse anaérobique est moins efficace que la respiration cellulaire en ne produisant que deux molécules d'ATP par molécule de glucose, elle a l'avantage de rester fonctionnelle en conditions hypoxiques. Louis Pasteur a observé que les levures consommaient plus rapidement le glucose en conditions hypoxiques et que le processus de fermentation était inhibé en conditions normoxiques, un phénomène nommé l'effet Pasteur (Racker, 1974). La molécule d'acide lactique, le produit de la fermentation, se dissocie entièrement en un anion lactate et en un proton qui sont expulsés de la cellule vers le milieu extracellulaire. L'accumulation d'ions

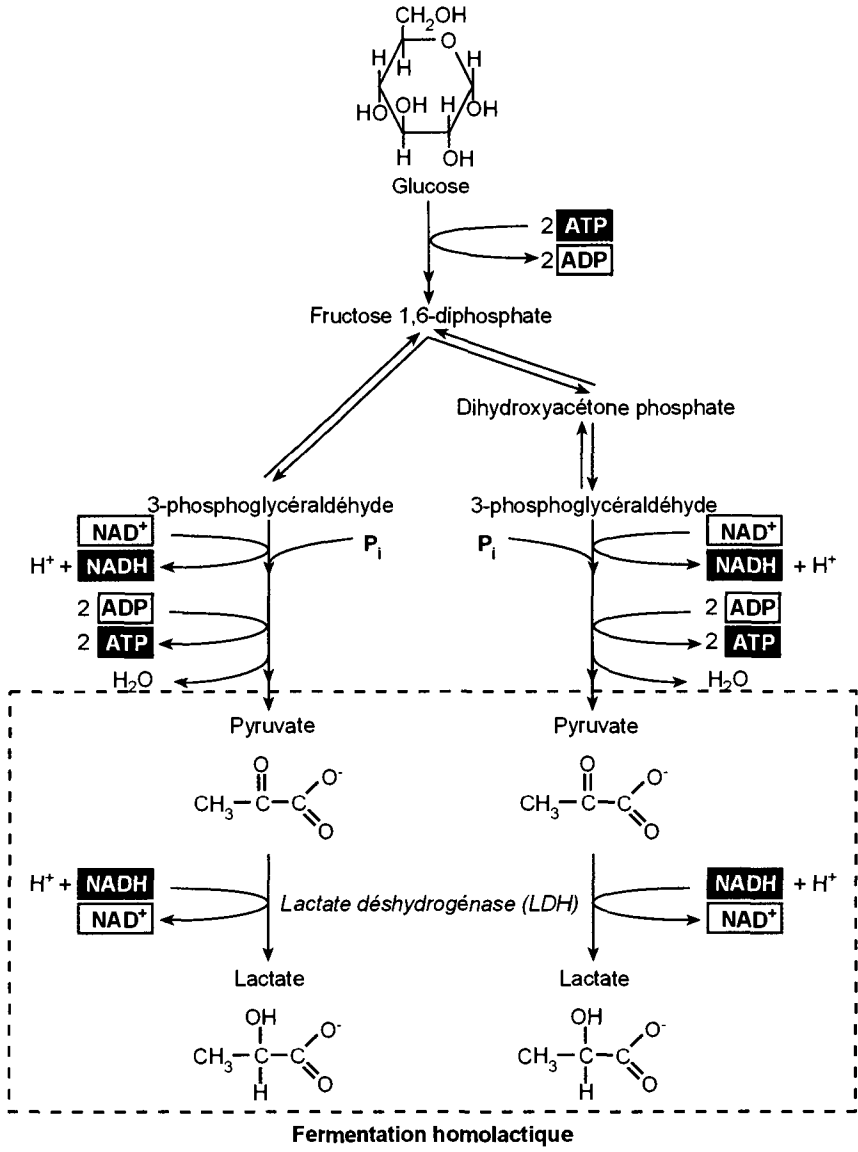


Figure 2: Le métabolisme anaérobique du glucose.

En conditions anérobiques, une molécule de glucose est catabolisée en deux molécules de pyruvate par la glycolyse. Par la suite, la fermentation homolactique du pyruvate en lactate par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) permet de régénérer le cofacteur limitant de la glycolyse, le NAD^+ . La glycolyse anaérobique permet la production nette de deux molécules d'ATP.

hydrogènes à l'extérieur de la cellule résulte en une acidification de l'environnement extracellulaire, un effet nommé l'acidose induite par l'hypoxie. La fermentation homolactique a été observée en conditions normoxiques par Otto Warburg dans les cellules cancéreuses (effet Warburg) ce qui résulte également en une diminution du pH extracellulaire (Warburg, 1956a; Warburg, 1956b).

1.1.3 Les conséquences physiologiques de l'hypoxie

Plusieurs conditions physiologiques et pathologiques sont associées à l'hypoxie. Une des conditions physiologiques les plus connues résultant en l'hypoxie est l'exercice musculaire. Lorsque l'activité musculaire est intense, la demande en énergie augmente dans les fibres formant le muscle. Par contre, le système cardiovasculaire est limité et il ne peut pas délivrer du sang frais et rempli d'oxygène assez rapidement et en grande quantité aux fibres musculaires. Ceci résulte en une diminution du niveau d'oxygène offert au muscle durant l'exercice. Dans ces conditions, les fibres sont donc forcées de synthétiser de l'ATP rapidement presque uniquement grâce à la glycolyse anaérobie (Gladden, 2001; Allen et Westerblad, 2004). Ce changement de métabolisme du glucose dans les fibres musculaires en contraction résulte en une accumulation d'acide lactique (Hill et Lupton, 1923; Hill *et al.*, 1924a; Hill *et al.*, 1924b; Hill *et al.*, 1924c; Gladden, 2001; Allen et Westerblad, 2004). Avant, la croyance était que l'accumulation d'acide lactique par les muscles provoquait une diminution de la performance musculaire, un phénomène appelé fatigue musculaire (Hill et Kupalov, 1929; Fabiato et Fabiato, 1978). Par contre, quelques études sont venues opposer cette croyance en démontrant que l'acidification par l'accumulation d'acide lactique ne cause pas la fatigue musculaire mais

plutôt protège les muscles contre ce phénomène (Nielsen *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2004).

Les premières étapes du développement embryonnaire chez les mammifères se font dans un environnement avec des concentrations en oxygène très faibles (Maltepe et Simon, 1998). La glycolyse anaérobie est le processus métabolique du glucose le plus utilisé par l'embryon au début de son développement avant la formation d'un système vasculaire capable de transporter l'oxygène et les nutriments provenant de la mère (Akazawa *et al.*, 1994; Maltepe et Simon, 1998). Les conditions hypoxiques auxquels est exposé l'embryon agissent comme un stimulus et activent l'expression des gènes responsables de la vascularisation (Maltepe et Simon, 1998). Suite à la formation du système vasculaire, l'embryon est exposé à des niveaux d'oxygène et de glucose plus élevés provenant de la circulation de la mère. La phosphorylation oxydative devient le processus métabolique du glucose le plus convenable à ce stade du développement (Akazawa *et al.*, 1994; Maltepe et Simon, 1998). La production d'énergie est plus efficace et plus importante ce qui augmente la vitesse de croissance de l'embryon (Maltepe et Simon, 1998). Des études ont démontré que le développement embryonnaire des mammifères est plus favorable dans un environnement d'environ 5% d'oxygène comparativement à 20% d'oxygène (Quinn et Harlow, 1978; Pabon *et al.*, 1989; Thompson *et al.*, 1990; Bernardi *et al.*, 1996). De plus, l'exposition d'un embryon à un environnement de 20% d'oxygène diminue le nombre de divisions cellulaires et affecte son développement. L'exposition à des conditions hypoxiques est donc cruciale pour le développement embryonnaire des mammifères.

1.1.4 Les conséquences pathologiques de l'hypoxie

Une des conditions pathologiques les plus étudiées où l'hypoxie est présente est le cancer. Les cellules cancéreuses sont fréquemment exposées à un environnement sans vascularisation et donc à une faible concentration en oxygène (Maltepe et Simon, 1998; Gatenby et Gillies, 2004; Gatenby et Gillies, 2007). Ces cellules s'adaptent à l'hypoxie en s'engageant dans la glycolyse anaérobie du glucose pour subvenir à leur besoin énergétique (Gatenby et Gillies, 2004). L'environnement hypoxique favorise les cellules capables de s'adapter à cette condition et dans lesquelles la voie glycolytique est augmentée. Même si les cellules sont par la suite exposées à une plus grande concentration en oxygène, la glycolyse du glucose persiste. La voie glycolytique est donc continuellement augmentée dans les cellules cancéreuses et permet l'adaptation aux conditions hypoxiques intermittentes. Ce phénotype glycolytique a été observé en premier par Otto Warburg qui avait remarqué que les tumeurs consommaient plus de glucose que les tissus normaux (Warburg, 1956a; Warburg, 1956b). La glycolyse aérobie du glucose, également appelé l'effet Warburg, est uniquement observée dans les cellules cancéreuses et est présente dans la plupart des cancers. En plus d'augmenter la glycolyse du glucose, le manque d'oxygène active l'expression des gènes impliqués dans la vascularisation pour stimuler la formation de vaisseaux sanguins autour de la tumeur (Maltepe et Simon, 1998). Ceci permettra le transport abondant du glucose nécessaire à la glycolyse et à la croissance des cellules cancéreuses et conséquemment de la tumeur. Le métabolisme glycolytique du glucose résulte en une accumulation d'acide lactique dans l'environnement tumoral (Warburg, 1956a; Warburg, 1956b; Gatenby et Gillies, 2004; Gatenby et Gillies, 2007). Il a été démontré que l'acidification du milieu

extracellulaire confère un avantage aux cellules cancéreuses en facilitant l'invasion (Gatenby et Gawlinski, 2003; Gatenby et Gillies, 2004; Smallbone *et al.*, 2005; Gatenby et Gillies, 2007). L'acidification du milieu tumoral induit la dégradation de la matrice extracellulaire, détruit les tissus normaux adjacents et stimule donc l'invasion et la migration des cellules cancéreuse ainsi que la métastase.

1.2 LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION INDUIT PAR L'HYPOXIE

1.2.1 Le complexe HIF et sa fonction

Le facteur induit par l'hypoxie (HIF) est un facteur de transcription jouant un rôle critique dans le maintien de l'homéostasie oxygénique de la cellule (Semenza, 1999). Lorsque le niveau d'oxygène diminue dans la cellule, HIF active la transcription de plus de 100 gènes codants pour des protéines impliquées dans les réponses cellulaires à l'hypoxie. Ces protéines incluent le facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) qui déclenche l'angiogénèse, l'érythropoïétine (EPO) qui stimule la production de globules rouges, le transporteur de glucose 1 (Glut-1) qui fait pénétrer le glucose dans la cellule et l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) qui produit le lactate et le NAD^+ avec les substrats NADH et pyruvate (Semenza *et al.*, 1991; Semenza et Wang, 1992; Iyer *et al.*, 1998; Semenza, 1999). HIF permet donc de maintenir l'homéostasie oxygénique en augmentant la livraison d'oxygène aux cellules (VEGF et EPO) et en permettant l'adaptation, au niveau métabolique, des cellules à la baisse d'oxygène (Glut-1 et LDH).

HIF est un hétérodimère composé des sous-unités alpha (HIF- α) et beta (HIF- β ou ARNT) (Hoffman *et al.*, 1991; Wang et Semenza, 1995). HIF- β est exprimé de manière continue dans la cellule. Par contre, le taux intracellulaire de HIF α varie en en

fonction de la concentration en oxygène (Semenza, 1999). En conditions normoxiques, HIF- α est dégradé par le protéasome mais en hypoxie, HIF- α est plutôt stabilisé. Quelques isoformes existent de la sous-unité alpha soient HIF1 α , HIF2 α et HIF3 α (Tian *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1998; Semenza, 1999). HIF-1 α et HIF-2 α sont les isoformes les plus étudiés et ils ont des gènes cibles communs ainsi que différents. Chaque sous-unité de HIF contient un domaine basique hélice-boucle-hélice (bHLH) qui permet la liaison à l'ADN (Hoffman *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1996a; Semenza, 1999) (Figure 3A). HIF contient également un domaine PAS (Per-ARNT-Sim) qui, avec le domaine bHLH, permet l'hétérodimérisation de HIF- α et β . La sous-unité alpha de HIF comporte deux signaux de localisation nucléaire (NLS), deux domaines de transactivation (TAD) et un domaine de régulation appelé domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODDD) (Jiang *et al.*, 1996a; Huang *et al.*, 1998; Kallio *et al.*, 1998; Semenza, 1999). Les TAD de HIF- α interagissent avec des co-activateurs pour induire la transcription des gènes cibles (Jiang *et al.*, 1996a; Kallio *et al.*, 1998; Semenza, 1999). La transcription est activée par la liaison de HIF sur l'ADN aux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) de séquence RCGTG (ou R est un G ou un A) se situant dans la région régulatrice des gènes (Semenza *et al.*, 1991; Semenza et Wang, 1992).

1.2.2 La régulation de la stabilité de HIF par l'oxygène

En conditions normoxiques, deux résidus prolines se retrouvant dans l'ODDD de HIF- α sont modifiées post-traductionnellement, soient hydroxylées, par les enzymes nommées HIF prolyles hydroxylases (PHD) (Huang *et al.*, 1998; Bruick et McKnight, 2001; Epstein *et al.*, 2001; Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001) (Figure 3B). Cette

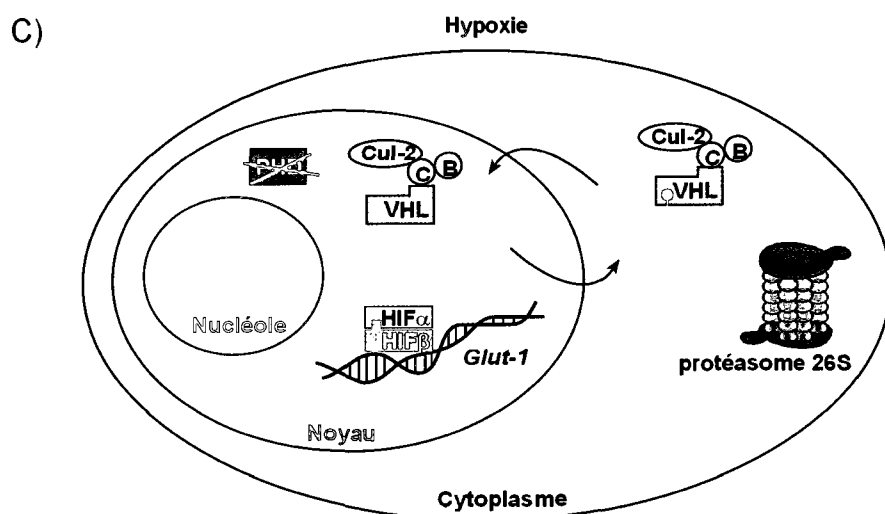
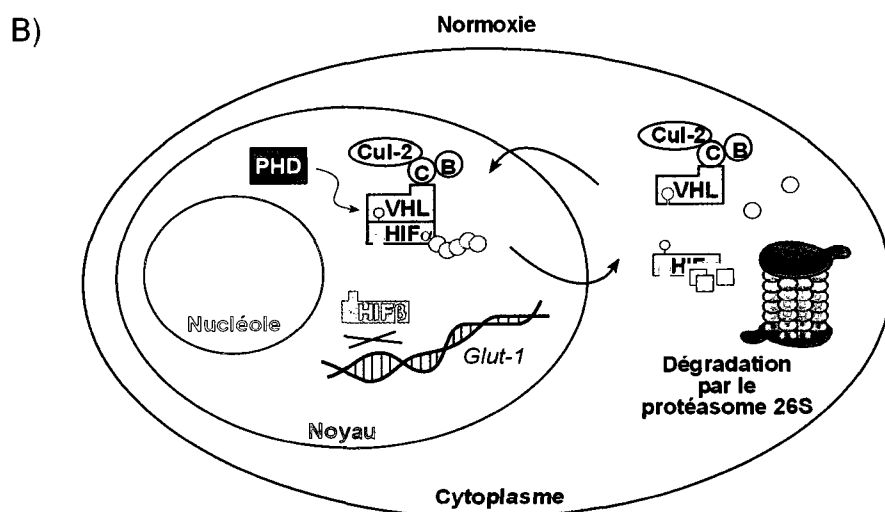
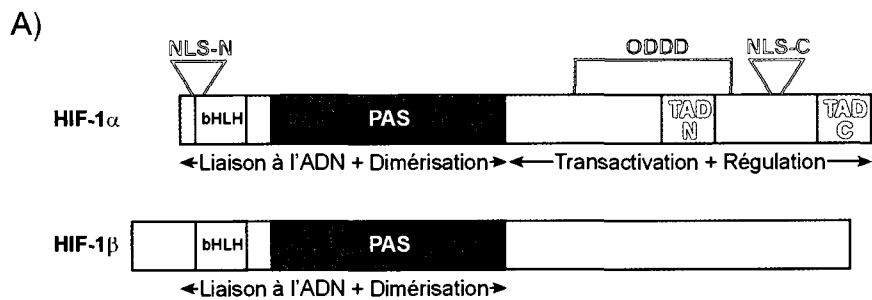


Figure 3: Le complexe HIF et la régulation de sa stabilité.

(A) Les sous-unités alpha et beta du facteur de transcription HIF sont présentées avec le domaine basique hélice-boucle-hélice (bHLH) ainsi que le domaine Per-ARNT-Sim (PAS). HIF- α contient également deux signaux de localisation nucléaire (NLS), deux domaines de transactivation (TAD) et un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODDD). (B) En conditions normoxiques, HIF- α est hydroxylé par les enzymes HIF prolyles hydroxylases (PHD). HIF- α hydroxylé est reconnu par la protéine suppresseuse de tumeurs von Hippel Lindau (VHL) du complexe VBC-Cul2. Des résidus ubiquitines sont ensuite ajoutés sur HIF- α par le complexe VBC-Cul2/ E3 ubiquitine ligase qui exporte le facteur dans le cytoplasme où HIF- α est dégradé par le protéasome 26S. (C) En conditions hypoxiques, les enzymes PHD sont inactives et HIF- α n'est pas hydroxylé ce qui résulte en une stabilisation et une accumulation du facteur. La dimérisation des deux sous-unités de HIF permet de former le facteur de transcription actif qui active la transcription des gènes induit par l'hypoxie.

réaction enzymatique peut seulement se produire en présence d'oxygène puisque les PHD utilisent l'oxygène moléculaire comme substrat pour former les groupes hydroxyles (Bruick et McKnight, 2001; Epstein *et al.*, 2001; Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001; Berra *et al.*, 2006; Kaelin et Ratcliffe, 2008). HIF- α dans l'état hydroxylé est reconnu par la protéine suppresseuse de tumeurs von Hippel Lindau (VHL) (Maxwell *et al.*, 1999; Ohh *et al.*, 2000; Tanimoto *et al.*, 2000; Min *et al.*, 2002). VHL est une des composantes d'un complexe nommé VBC-Cul2 qui forme une E3 ubiquitine ligase (Kibel *et al.*, 1995; Pause *et al.*, 1997; Lonergan *et al.*, 1998; Iwai *et al.*, 1999; Kamura *et al.*, 1999; Lisztwan *et al.*, 1999). Par la suite, le complexe VBC-Cul2 catalyse le transfert de plusieurs résidus ubiquitines sur HIF- α et exporte le facteur de transcription du noyau vers le cytoplasme où a lieu la dégradation de HIF- α par le protéasome 26S (Huang *et al.*, 1998; Maxwell *et al.*, 1999; Ohh *et al.*, 2000; Groulx et Lee, 2002; Khacho *et al.*, 2008b).

En conditions hypoxiques, HIF- α n'est pas hydroxylé par les enzymes PHD dû au manque d'oxygène moléculaire (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001) (Figure 3C). Ces enzymes sont inactivées habituellement lorsque le niveau d'oxygène est inférieur à 5% (Jiang *et al.*, 1996b; Berra *et al.*, 2006; Kaelin et Ratcliffe, 2008). Les PHD agissent donc comme des senseurs d'oxygène. Dans ces conditions, HIF- α est stabilisé, accumule dans la cellule et se dimérise avec HIF- β formant le facteur de transcription HIF actif. L'hétérodimère HIF se lie aux HRE et active la transcription des gènes cibles.

1.3 LA PROTÉINE SUPPRESSEUSE DE TUMEURS VON HIPPEL LINDAU

1.3.1 La structure de VHL

Le gène VHL se retrouve sur le chromosome 3p25 et contient trois exons (Seizinger *et al.*, 1988) (Figure 4A). Le gène VHL est transcrit en un ARN messager (ARNm) de 4.4 kb qui est exprimé dans toutes les cellules et les tissus humains testés à ce jour (Latif *et al.*, 1993; Los *et al.*, 1996). L'ARNm VHL produit une protéine de 213 acides aminés (Iliopoulos *et al.*, 1995). Un deuxième codon d'initiation se retrouve sur l'ARNm de VHL au codon 54 et produit une protéine de 160 acides aminés (Iliopoulos *et al.*, 1998; Schoenfeld *et al.*, 1998). Les deux isoformes de la protéine VHL ont des propriétés biochimiques similaires car ils s'associent aux mêmes protéines et accomplissent les mêmes fonctions. Les deux formes de la protéine VHL sont donc actifs et le terme général VHL sera employé pour représenter les deux isoformes (Iliopoulos *et al.*, 1998; Schoenfeld *et al.*, 1998).

La protéine VHL comporte deux domaines soient un domaine beta, codé par les exons 1 et 2, et un domaine alpha, codé par l'exon 3 (Stebbins *et al.*, 1999) (Figure 4A). Le domaine α permet l'association de VHL avec la protéine élongine C qui elle recrute les protéines élongine B, cullin-2 et Rbx1 (Duan *et al.*, 1995a; Duan *et al.*, 1995b; Kibel *et al.*, 1995; Pause *et al.*, 1997; Lonergan *et al.*, 1998; Iwai *et al.*, 1999; Kamura *et al.*, 1999; Lisztwan *et al.*, 1999; Stebbins *et al.*, 1999) (Figure 4B). L'interaction de VHL avec ces quatre protéines produit un complexe nommé VBC-Cul2 qui forme une E3 ubiquitine ligase (Iwai *et al.*, 1999). Le domaine β permet à VHL de s'associer à la sous-unité α du facteur HIF. Quatre liens hydrogènes et plusieurs interactions de van der Waals se forment entre les deux groupes hydroxyles retrouvés sur les deux prolines dans

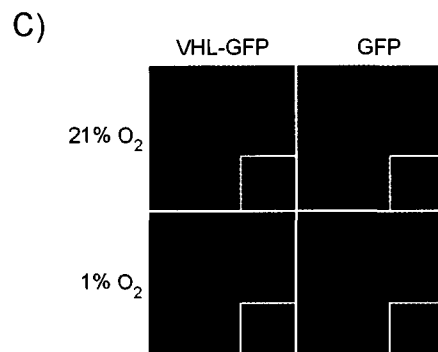
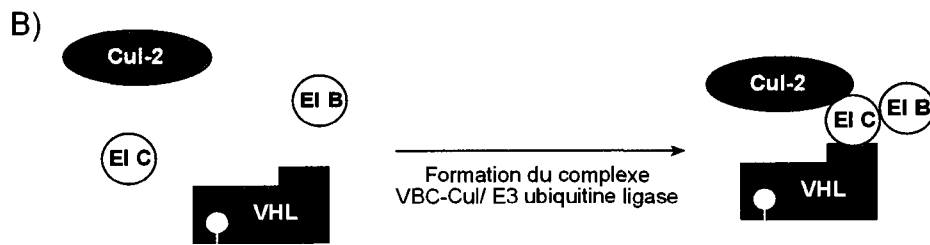
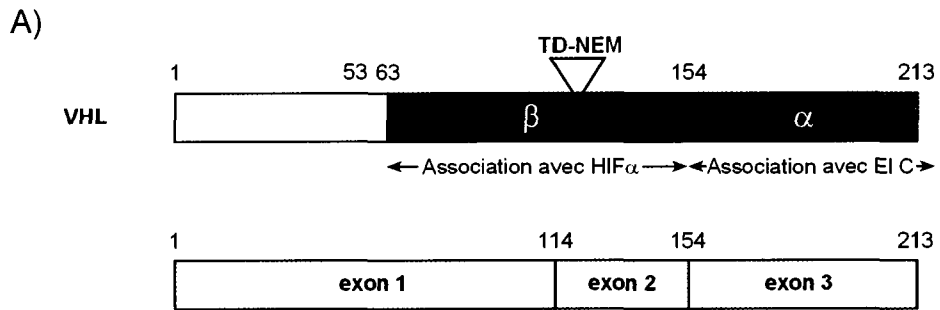


Figure 4: La structure, la formation du complexe et la localisation cellulaire de la protéine suppresseuse de tumeurs von Hippel Lindau (VHL).

(A) La protéine VHL est présentée avec le domaine alpha et le domaine beta qui permet l'association avec la sous-unité alpha du facteur de transcription HIF. Trois exons codent pour la protéine VHL de 213 acides aminés. (B) Le complexe VBC-Cul2/ E3 ubiquitine ligase se forme par l'association du domaine alpha de VHL avec la protéine élongine C (El C) qui s'associe ensuite avec la protéine élongine B (El B) et cullin-2 (Cul-2). (C) La protéine VHL présente une localisation cellulaire principalement cytoplasmique et nucléaire. VHL a été fusionnée à la protéine fluorescente verte (GFP). Des cellules MCF-7 ont été transfectées de manière transitoire avec VHL-GFP ou GFP, comme contrôle, et la localisation cellulaire de ces protéines a été déterminée par microscopie à fluorescence de GFP. Les encarts montrent l'ADN colorée au Hoechst.

le ODDD de HIF α en normoxie et quelques acides aminés du domaine β de VHL (Maxwell *et al.*, 1999; Ohh *et al.*, 2000; Tanimoto *et al.*, 2000; Min *et al.*, 2002).

1.3.2 Les fonctions et la distribution cellulaire de VHL

La protéine VHL est impliquée dans plusieurs processus cellulaires dont la stabilisation des microtubules et la ciliogénèse (Hergovich *et al.*, 2003; Lutz et Burk, 2006). De plus, VHL interagit avec la fibronectine et est nécessaire pour l'assemblage correct de la matrice extracellulaire (Ohh *et al.*, 1998). Par contre, la fonction première et la plus caractérisée de VHL est son rôle dans la reconnaissance, l'ubiquitination, l'exportation nucléaire et la dégradation de HIF- α en normoxie.

En conditions normoxiques et hypoxiques, la protéine VHL se retrouve principalement dans le compartiment cytoplasmique mais est également quelque peu localisée dans le noyau (Duan *et al.*, 1995a; Lee *et al.*, 1996; Los *et al.*, 1996) (Figure 4C). La localisation de VHL est affectée lorsque les cellules sont traitées avec des inhibiteurs de l'ARN polymérase II (ARN pol II) (Lee *et al.*, 1999). L'export nucléaire de VHL est aboli par l'arrêt de la transcription par l'ARN pol II ce qui cause une redistribution complète de la protéine dans le noyau (Lee *et al.*, 1999; Groulx *et al.*, 2000). VHL est donc une protéine dynamique qui fait la navette entre le cytoplasme et le noyau. Notre laboratoire a récemment identifié le code régulant l'exportation nucléaire de VHL nommé le motif d'export nucléaire dépendant de la transcription (TD-NEM) (Khacho *et al.*, 2008a; Khacho *et al.*, 2008b; Khacho et Lee, 2009) (Figure 4A). Le TD-NEM de VHL est codé par l'exon 2 et se retrouve dans le domaine β . L'exportation et l'importation nucléaire de VHL est essentiel pour le bon fonctionnement de la protéine.

L'inhibition de l'activité de l'ARN pol II en normoxie cause une augmentation de la stabilité de HIF- α puisque le facteur ne peut être exporté dans le cytoplasme suite à son ubiquitination et n'est donc pas dégradé (Groulx et Lee, 2002; Khacho *et al.*, 2008b).

1.4 LE NUCLÉOLE

1.4.1 Le nucléole: un sous-compartiment nucléaire

Le nucléole est la structure sous-nucléaire la plus prédominante dont la fonction première est la biogénèse des ribosomes (Dundr et Misteli, 2001; Lam *et al.*, 2005; Hernandez-Verdun, 2006; Boisvert *et al.*, 2007). La taille et le nombre de nucléoles varient selon le type cellulaire. Le nucléole est dépourvu de membrane et est une structure dynamique dont l'assemblage dépend de la transcription et du cycle cellulaire. Le nucléole se désassemble lorsque la cellule entre en mitose et lorsque la transcription est arrêtée. À la fin de la mitose, le nucléole s'assemble autour des groupes de gènes d'ADN ribosomal (ADNr) qui sont répétés en tandem. Ces répétitions d'ADNr sont 47 kb de long et il en existe environ 180 copies qui proviennent de cinq chromosomes. Sur ces chromosomes, les régions où sont regroupés les gènes des ARNr se nomment organisateurs nucléolaires chromosomiques. Ces derniers sont la base de la structure et de l'organisation des nucléoles.

Trois composantes ont été identifiées à l'intérieur du nucléole par microscopie électronique: les composantes granulaires (CG) dans lesquelles se retrouvent les centres fibrillaires (CF) entourés des composantes fibrillaires denses (CFD) (Dundr et Misteli, 2001; Lam *et al.*, 2005; Hernandez-Verdun, 2006; Boisvert *et al.*, 2007). Chacun des trois compartiments sous-nucléolaires a des fonctions distinctes et est le lieu d'une ou de

quelques étapes du processus de la biogénèse des sous-unités ribosomiques. Les protéines nucléolaires accumulent habituellement dans seulement un des trois compartiments sous-nucléolaires selon leurs rôles dans la synthèse des ribosomes.

Grâce à la possibilité d'isoler les nucléoles et aux techniques de spectrométrie de masse pour l'identification et l'analyse des protéines, plusieurs analyses protéomiques du nucléole ont été réalisées (Andersen *et al.*, 2002; Scherl *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2005). Ces analyses ont permis de définir le protéome nucléolaire avec l'identification de plus de 700 protéines co-purifiants avec les nucléoles. Environ 30% des protéines nucléolaires possèdent un rôle dans les différentes étapes de la production des ribosomes. Un certain nombre de protéines nucléolaires sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, la réplication et la réparation de l'ADN ainsi que la maturation des pré-ARNm. Le contenu protéique du nucléole est changeant et dynamique en fonction des conditions métaboliques (Andersen *et al.*, 2005). De plus, les protéines nucléolaires sont dynamiques et font la navette entre les compartiments cellulaires (Borer *et al.*, 1989; Phair et Misteli, 2000; Misteli, 2001; Lamond et Sleeman, 2003). Par exemple, la protéine fibrillarine démontre une localisation presque exclusivement nucléolaire. Par contre, à l'aide d'expérience de photoblanchiment, une étude a démontré qu'en fait la fibrillarine est une protéine très dynamique qui bouge rapidement à travers le nucléoplasme et qui s'associe et se dissocie d'avec le nucléole (Phair et Misteli, 2000).

1.4.2 Les multiples fonctions du nucléole

La fonction principale du nucléole est la production des sous-unités ribosomiques (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1991; Ginisty *et al.*, 1998; Fatica et Tollervey, 2002; Tschochner

et Hurt, 2003; Boisvert *et al.*, 2007). La synthèse des ribosomes est un processus qui comporte plusieurs étapes et qui demande beaucoup d'énergie. La première étape est la transcription des gènes d'ADNr par l'ARN pol I pour former un seul transcrit précurseur, l'ARNr 47S. La synthèse du pré-ARNr 47S a lieu à la jonction des CF et des CFD. Pour la formation complète d'un ribosome, les deux autres machineries transcriptionnelles sont nécessaires soient l'ARN pol II, pour la synthèse de l'ARNr 5S, et l'ARN pol III, pour la transcription des pré-ARNm des protéines ribosomiques. La deuxième étape est l'assemblage des pré-ARNr avec les protéines ribosomiques, les facteurs non-ribosomiques et les petites ribonucléoprotéines nucléolaires (snoRNP). Le transcrit initial pré-ARNr 47S est ensuite clivé pour former trois transcrits, les ARNr 28S, 18S et 5.8S, et des modifications post-transcriptionnelles sont ajoutées sur ces transcrits. Les étapes d'assemblage, de traitement et de modification des ARNr ont lieu principalement dans les CFD. La quatrième étape est la formation des deux sous-unités ribosomiques. L'ARNr 18S permet de former la petite sous-unité ribosomique tandis que les ARNr 28S, 5.8S et 5S sont incorporés pour former la grande sous-unité ribosomique. Plusieurs protéines ribosomiques s'associent alors spécifiquement avec une des deux sous-unités. La formation et l'assemblage des deux sous-unités ribosomiques ont lieu essentiellement dans les CG. L'étape finale de ce processus est l'exportation des deux sous-unités ribosomiques du noyau vers le cytoplasme. C'est dans le cytoplasme qu'a lieu les dernières conversions pour former les deux sous-unités ribosomiques matures ainsi que l'assemblage pour former un ribosome complet et fonctionnel.

Quelques études ont démontré que le nucléole avait un rôle dans la progression du cycle cellulaire. L'association de certaines protéines avec le nucléole à différentes étapes

du cycle cellulaire permet de contrôler leurs fonctions. Un exemple est la protéine du cycle de division cellulaire 14 (Cdc14), une phosphatase qui promeut la sortie de la mitose (Shou *et al.*, 1999; Visintin *et al.*, 1999; Visintin et Amon, 2000; Boisvert *et al.*, 2007). Durant l'interphase, la protéine Cdc14 est inactivée par son accumulation dans le nucléole ce qui prévient une sortie mitotique non-contrôlée. Au début de l'anaphase, Cdc14 est relâchée du nucléole pour devenir active et encourager la sortie de la mitose. Cette étude ainsi que quelques autres ont donc démontré que la séquestration nucléolaire permet de modifier la localisation cellulaire et de contrôler l'activité des protéines impliquée dans la progression du cycle cellulaire (Shou *et al.*, 1999; Visintin *et al.*, 1999; Visintin et Amon, 2000; Wong *et al.*, 2002; Khurts *et al.*, 2004; Boisvert *et al.*, 2007).

Le nucléole coordonne également certaines réponses cellulaires au stress en séquestrant ou relâchant des protéines suite au signal de stress. Un exemple est la protéine murine double minute 2 (Mdm2), une E3 ubiquitine ligase. En conditions normales, Mdm2 catalyse la dégradation protéasomale de la protéine suppresseuse de tumeurs p53. Par contre, en présence de signaux de stress cellulaires, Mdm2 est séquestrée dans le nucléole pour inhiber la dégradation de p53 (Tao et Levine, 1999; Weber *et al.*, 1999; Zhang et Xiong, 1999; Visintin et Amon, 2000; Weber *et al.*, 2000; Rubbi et Milner, 2003; Olson, 2004; Boisvert *et al.*, 2007). Dans ces conditions, les niveaux de p53 augmentent ce qui permet l'induction des réponses au stress telles que l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Une autre réponse cellulaire au stress régulée par le nucléole est la diminution de la transcription des gènes d'ADNr (Mayer *et al.*, 2005; Boisvert *et al.*, 2007). En conditions de stress, le facteur de transcription spécifique à l'ARN pol I TIF-1A est phosphorylé puis relocalisé du nucléole au nucléoplasme pour

inhiber la synthèse de l'ARNr. Ces études démontrent que le nucléole agit donc comme un senseur et un coordinateur des signaux de stress cellulaires.

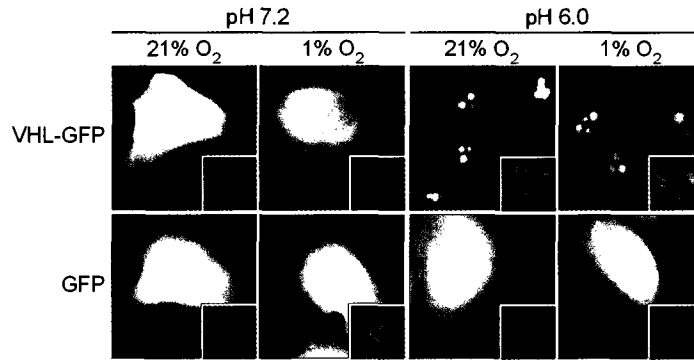
1.5 LA SÉQUESTRATION NUCLÉOLAIRE DE VHL

1.5.1 La relocalisation et la détention de VHL dans le nucléole en acidose

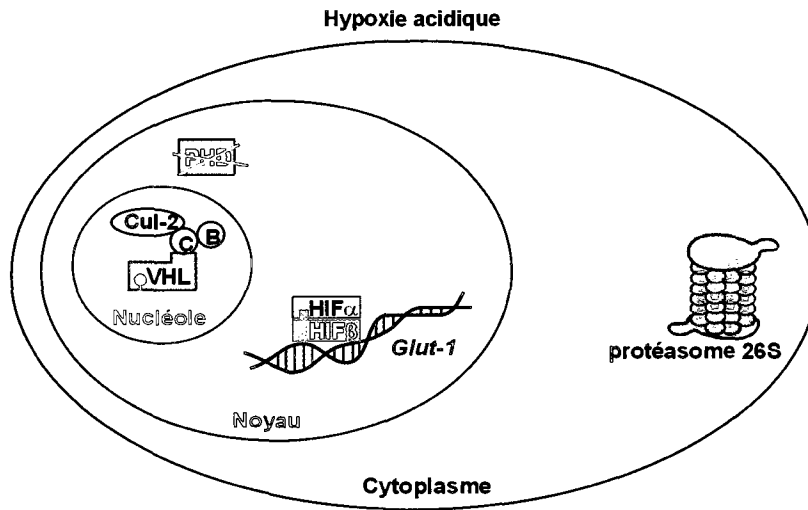
En conditions aérobiques, la protéine VHL démontre une localisation cellulaire principalement cytoplasmique, est très mobile et participe à la dégradation de HIF- α (Figure 5A). En conditions hypoxiques, VHL conserve sa localisation cellulaire et sa propriété dynamique mais HIF α n'est pas dégradé puisque les enzymes PHD sont inactivées (Figure 5A). En hypoxie, les cellules dépendent de la glycolyse anaérobie pour la production d'énergie. La fermentation homolactique qui s'ensuit résulte en une accumulation de protons dans le milieu extracellulaire et en une diminution du pH extracellulaire. Notre laboratoire a démontré que suite à une acidification du milieu extracellulaire, la protéine VHL est relocalisée vers un sous-compartiment nucléaire, le nucléole (Figure 5A) (Mekhail *et al.*, 2004a). La relocalisation nucléolaire de VHL se fait en deux étapes; VHL est d'abord relocalisée du cytoplasme, où la protéine est principalement localisée en conditions aérobiques, vers le noyau avant d'accumuler dans le nucléole (Mekhail *et al.*, 2005). Le pH extracellulaire nécessaire à la relocalisation nucléolaire de VHL varie entre 5.80 et 6.60 selon le type de cellule (Mekhail *et al.*, 2005).

À l'aide d'expériences de photoblanchiment, notre laboratoire a démontré que VHL ne perd pas seulement sa localisation cellulaire principalement cytoplasmique en conditions acidiqes en étant relocalisée dans le nucléole. VHL perd également ses

A)



B)



C)

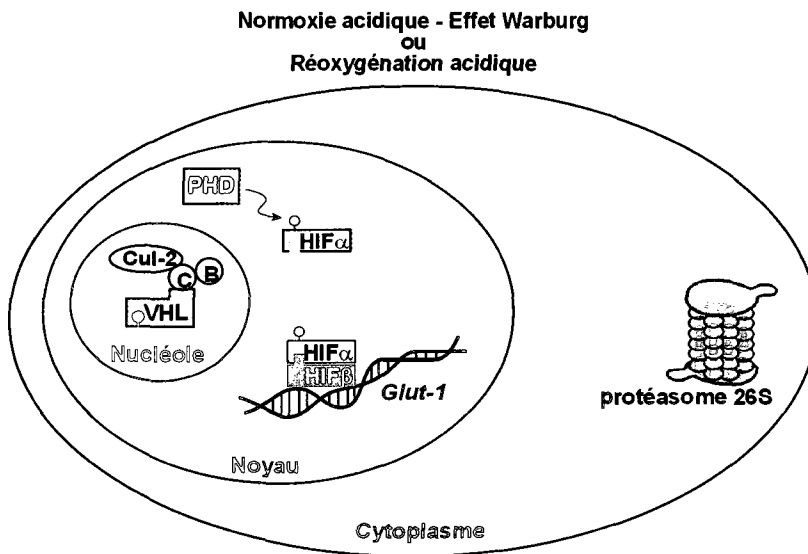


Figure 5: La détention nucléolaire de VHL en acidose et la régulation de HIF- α .

(A) En conditions acidiqes, la protéine VHL est relocalisée et séquestrée dans le nucléole. Des cellules MCF-7 ont été transfectées de manière transitoire avec VHL-GFP ou GFP, comme contrôle, et la localisation des protéines a été déterminée par microscopie à fluorescence de GFP. Les encarts montrent l'ADN coloré au Hoechst. **(B)** L'acidification du milieu extracellulaire en hypoxie induit la détention de VHL dans le nucléole. Dans ces conditions, HIF- α n'est pas hydroxylé ce qui résulte en sa stabilisation. HIF- α accumule dans la cellule, se dimérise avec HIF- β et la transcription des gènes induit par l'hypoxie est activée. **(C)** VHL est séquestrée dans le nucléole suite à la réoxygénation des cellules acidiqes ou lors de l'effet Warburg, soit l'acidification du milieu extracellulaire en normoxie. HIF- α est hydroxylé par les enzymes PHD mais la détention nucléolaire de VHL prévient l'ubiquitination et la dégradation protéasomale de HIF α . HIF- α est donc stabilisé et la dimérisation des deux sous-unités de HIF active la transcription des gènes cibles.

propriétés mobiles et dynamiques en étant capturée par le nucléole rendant VHL immobile et statique (Mekhail *et al.*, 2005). Ce changement dans la mobilité de VHL n'est pas observé dans les protéines nucléolaires, telles que fibrillarine et B23, qui se déplacent entre les compartiments cellulaires et qui sont mobiles et dynamiques même en acidose. En conditions acidiqes induites par l'hypoxie, HIF α n'est pas dégradé et la dimérisation des sous-unités alpha et beta de HIF permet la transcription de leurs gènes cibles (Mekhail *et al.*, 2004a; Mekhail *et al.*, 2004b) (Figure 5B).

Suite à une réoxygénation des cellules acidiqes, VHL reste détenue par le nucléole (Mekhail *et al.*, 2004a) (Figure 5A). La séquestration nucléolaire de VHL est aussi observée dans les cellules effectuant la fermentation homolactique en conditions normoxiqes et acidifiant leur milieu extracellulaire (Mekhail *et al.*, 2004a), phénomène connu sous le nom d'effet Warburg (Warburg, 1956a; Warburg, 1956b). Dans ces conditions, même si les enzymes PHD sont activées par la présence d'oxygène, HIF α n'est pas dégradé et la transcription des gènes induit par l'hypoxie est activée (Mekhail *et al.*, 2004a; Mekhail *et al.*, 2004b) (Figure 5C).

La détention nucléolaire de VHL est un phénomène réversible puisque la neutralisation du milieu acidiqes induit le relâchement de la protéine du nucléole (Mekhail *et al.*, 2004a; Mekhail *et al.*, 2005). VHL regagne sa localisation cellulaire cytoplasmique ainsi que sa propriété dynamique et récupère son rôle dans la dégradation de HIF- α (Mekhail *et al.*, 2004a; Mekhail *et al.*, 2004b; Mekhail *et al.*, 2005).

1.5.2 Le maintien de l'équilibre énergétique par VHL séquestrée dans le nucléole

En conditions aérobiques, la cellule produit l'énergie nécessaire aux nombreux processus cellulaires en dégradant des molécules de glucose par la glycolyse et la respiration cellulaire. Lorsque le niveau d'oxygène diminue, les cellules s'engagent dans la glycolyse anaérobie du glucose pour la production d'ATP. Les cellules essaient de s'adapter à ces conditions drastiques en augmentant le taux glycolytique pour maintenir leur équilibre énergétique nécessaire à leur survie. Par contre, en condition prolongée d'hypoxie, le niveau élevé de glycolyse anaérobie pour la production d'ATP ne peut pas compenser pour la perte de la respiration cellulaire et les cellules finissent par manquer d'énergie ce qui cause leur mort. Notre laboratoire a démontré que les cellules s'engageant dans la fermentation homolactique, résultant en l'accumulation d'ions H^+ extracellulaires, conservaient leur équilibre énergétique et assuraient leur survie en diminuant la demande énergétique pour correspondre à la production d'énergie limitée (Mekhail *et al.*, 2006). Cette observation est en accord avec l'idée que l'acidification du milieu extracellulaire protège les cellules exposées à des faibles quantités d'oxygène dans certaines conditions physiologiques et pathologiques telles que la contraction musculaire et le cancer. La diminution de la demande en énergie se fait en limitant la synthèse d'ARNr (Mekhail *et al.*, 2006) qui est le processus cellulaire consommant le plus d'énergie, soit entre 50 et 80% de l'énergie totale cellulaire (Schmidt, 1999; Thomas, 2000; Holzel *et al.*, 2005). La restriction de la transcription de l'ADNr en acidose nécessite la séquestration nucléolaire de VHL et l'interaction de VHL avec l'ADNr (Mekhail *et al.*, 2006). Lorsque l'expression de la protéine VHL est restreinte, la demande énergétique n'est pas diminuée et la synthèse d'ARNr n'est pas limitée en

conditions acidiqes. Ces cellules n'ont pas bénéficié des effets positifs de l'acidose en conditions hypoxiques ce qui a causé un déséquilibre énergétique et la mort cellulaire (Mekhail *et al.*, 2006).

1.5.3 Régulation de la détention nucléolaire de VHL par le motif NoDS^{H+}

Plusieurs protéines dépendent de séquences peptidiques spécifiques et communes pour leur localisation vers des compartiments cellulaires délimités par une membrane telles que les signaux de localisation nucléaire et d'exportation nucléaire (NLS et NES respectivement) (Conti et Izaurralde, 2001; Kutay et Guttinger, 2005; Lee *et al.*, 2006). Il existe également des signaux avec quelques similarités localisant des protéines vers des compartiments sous-nucléaires dépourvus de membranes. Par contre, ces signaux ne présentent pas de séquences peptidiques spécifiques et communes. Par exemple, le signal de localisation nucléolaire (NoLS) peut varier en séquence de quelques acides aminés à plus d'une centaine de résidus selon les protéines (Weber *et al.*, 2000; Catez *et al.*, 2002; Hiscox, 2002).

Une analyse par mutagénèse de la protéine VHL, réalisée par notre laboratoire, a permis d'identifier un fragment composé des acides aminés 100 à 130 de VHL ayant la capacité d'être relocalisé et détenu par le nucléole suite à une accumulation d'ions H⁺ extracellulaires (Mekhail *et al.*, 2005). Ce nouveau signal de localisation sous-nucléaire a été nommé le signal de détention nucléolaire régulée par H⁺ (NoDS^{H+}) (Mekhail *et al.*, 2005; Mekhail *et al.*, 2007). Une analyse plus poussée du NoDS^{H+} a permis d'identifier trois règles auxquelles le motif doit se conformer pour une activité optimale: 1- au moins un domaine d'arginines permettant le ciblage sous-nucléaire (STAD) de séquence

RR(I/L)X₃r où la dernière arginine a plutôt un rôle accessoire, 2- plus d'un domaine hydrophobique permettant le ciblage sous-nucléaire (STHD) composé de trois résidus soient L(φ/N)(V/L) et 3- le STAD doit se retrouver dans une région ayant une probabilité faible de désordre structurel (Mekhail *et al.*, 2007) (Figure 6A). Suite à une accumulation d'ions H⁺ extracellulaires, le code NoDS^{H+} est activé et contrôle la relocalisation et la détention de VHL dans le nucléole. Le NoDS^{H+} est inactivé par la neutralisation du milieu extracellulaire acide permettant ainsi le relâchement de VHL du nucléole et le regain de la localisation cellulaire cytoplasmique de VHL et de sa mobilité.

1.5.4 NoDS^{H+} dans d'autres protéines

Avec l'identification d'un nouveau signal de localisation sous-nucléaire spécifique, le NoDS^{H+}, notre laboratoire s'est questionné sur la possibilité que d'autres protéines que VHL pourraient contenir ce code et seraient séquestrées dans le nucléole en acide. À l'aide d'une recherche détaillée dans une banque de données, quelques protéines ayant un rôle primordial dans des métabolismes cellulaires de base ont été trouvées contenant un motif NoDS^{H+} (Mekhail *et al.*, 2007). Ces protéines incluent la sous-unité catalytique p125 de l'ADN polymérase delta (DNA pol δ p125), la sous-unité 1 du facteur de transcription général TFIID (TAF1), la sous-unité alpha du facteur du démarrage de la traduction eIF2B (eIF2Bα) et la protéine de choc thermique constitutive 70 (Hsc70). Ces quatre protéines ainsi que quelques autres ont en fait été relocalisées vers le nucléole suite à une accumulation d'ions H⁺ extracellulaires peu importe leurs localisations cellulaires en conditions aérobiques (Mekhail *et al.*, 2007; Dias, 2009). Ces

A)

NoDS⁺⁺: $\{[RR(I/L)X_3r(\text{probabilité faible de désordre structurel})]_{(n,n \geq 1)} + [L(\Phi/N)(L/M)]_{(n,n \geq 1)}\}$

B)

#	Fragments et mutations	Séquence en acides aminés	Localisation nucléolaire	% détenu dans le nucléole
1	107-113	AARRIHSYR	-	NA
2	138-137	LLVNQTELFV	-	NA
3	107-113 + 128-137	AARRIHSYRLLVNQTELFV	+	75%
4	107-113, R107A + 128-137	AAARIHSYRLLVNQTELFV	+	56%
5	107-113, R108A + 128-137	AAARIHSYRLLVNQTELFV	+	54%
6	107-113, I109A + 128-137	AARRAHSYRLLVNQTELFV	+	55%
7	107-113, R113A + 138-137	AARRIHSYALLVNQTELFV	+	69%
8	106-122	GRRIHSYRGHLWLFDA	+	60%
9	106-122, G106A	ARRIHSYRGHLWLFDA	+	60%
10	106-122, Gs>As	ARRIHSYRAHLWLFDA	+	60%
11	106-122, R107A	GARIHSYRGHLWLFDA	+	45%
12	106-122, R108A	GRAIHSYRGHLWLFDA	+	43%
13	106-122, Y112A	GRRIHSARGHLWLFDA	+	58%
14	106-122, R113A	GRRIHSYAGHLWLFDA	+	55%
15	106-122, R108A-H110A	GRAIASYRGHLWLFDA	+	43%
16	106-122, F119A-R120A	GRRIHSYRGHLWLAADA	+	59%
17	106-122, GRR>As	AAAIHSYRGHLWLFDA	+	30%
18	106-122, L116A	GRRIHSYRGHAWLFDA	+	0%
19	106-122, LWL>As	GRRIHSYRGHAAAFDA	+	0%
20	106-122, LWL>As-R107A	GARIHSYRGHAAAFDA	-	NA
21	106-122, Rs>As	GAAIHSYAGHLWLFADA	-	NA
22	106-122, Rs>Ds	GDDIHSYDGHLLWLFDA	-	NA
23	106-122, Rs>Ks	GKKIHSYKGLWLFKDA	-	NA

Figure 6: Le motif NoDS^{H+} et l'importance des arginines.

(A) La constitution du signal de détention nucléolaire régulée par H⁺ (NoDS^{H+}) est présentée. (B) Une analyse des mutations a été effectuée sur des fragments de VHL où les arginines ont été substituées pour des alanines, des aspartates ou des lysines. Des cellules MCF-7 exprimant de manière transitoire les fragments de VHL avec les divers mutations fusionnés à la protéine fluorescente verte (GFP) ont été cultivées en hypoxie dans du milieu à pH 6.0. La localisation sous-cellulaire des fragments a été marquée + pour une localisation nucléolaire ou – pour une localisation non-nucléolaire. L'affinité des fragments pour le nucléole a été mesurée et est représentée en pourcentage de la fraction détenue dans le nucléole qui a été déterminée par une analyse de la perte de fluorescence au cours d'un photoblanchiment local (FLIP) (Mekhail *et al.*, 2007).

protéines sont également détenues de manière statique par le nucléole en acidose. Cette découverte suggère qu'en plus de la stabilisation de HIF α par la séquestration nucléolaire de VHL, d'autres mécanismes cellulaires, tels que la réplication de l'ADN, la transcription et la traduction, seraient contrôlés en acidose par la détention nucléolaire des protéines régulant ces processus de base. Plusieurs réponses cellulaires seraient donc déclenchées suite à l'acidification du milieu extracellulaire par la détention nucléolaire de protéines impliquées dans des processus cellulaires de base, possiblement pour diminuer la demande en énergie, conserver l'équilibre énergétique et assurer la survie.

1.5.5 Les arginines du NoDS^{H+} de VHL sont cruciales pour son activité

L'analyse mutationnelle de la protéine VHL, qui a permis d'identifier le motif NoDS^{H+}, a clairement démontré la grande importance des arginines du STAD pour une activité complète (Mekhail *et al.*, 2007). La figure 6B présente les principales mutations de certains acides aminés dans deux fragments de VHL qui ont permis de déterminer l'importance des arginines du STAD. La localisation sous-cellulaire des mutants a été marquée + pour une localisation nucléolaire ou – pour une localisation non-nucléolaire. La fraction des mutants détenus par le nucléole a été mesurée par une analyse de la perte de fluorescence au cours d'un photoblanchiment local (FLIP) et est représentée en pourcentage. Lorsque chacune des arginines ou une combinaison de deux arginines du STAD sont substituées pour une ou deux alanines respectivement, la relocalisation des mutants vers le nucléole n'est pas affectée, mais par contre leur détention nucléolaire est diminuée de 5 à 30% (mutants #4, 5, 7, 11, 12,14, 15 et 17). Lorsque toutes les arginines du STAD sont substituées pour des alanines, des aspartates ou des acides aminés de

même charge, soient les lysines, les mutants ne sont ni relocalisés, ni détenus dans le nucléole (mutant #21 à 23). Les arginines du STAD sont donc cruciales pour la séquestration du NoDS^{H+}VHL dans le nucléole et elles ne peuvent pas être changées pour aucun autre acide aminé.

1.6 LA MÉTHYLATION

1.6.1 La méthylation: une modification post-traductionnelle

Les modifications post-traductionnelles permettent de réguler certains processus cellulaires en affectant la stabilité, la localisation cellulaire et la fonction des protéines. La phosphorylation, l'acétylation, la méthylation et l'hydroxylation sont quelques-unes des nombreuses modifications post-traductionnelles possibles. La méthylation est l'ajout d'un groupe méthyle (-CH₃) sur un atome d'azote, d'oxygène, de carbone ou de soufre se retrouvant dans la chaîne latérale d'un acide aminé. La *N*-méthylation est l'ajout d'un groupe méthyle sur l'azote des acides aminés arginine, lysine, histidine, glutamine et asparagines. Un, deux ou trois groupes méthyles peuvent être ajoutés sur l'atome d'azote du groupe amine de la chaîne latérale de la lysine. Une arginine peut recevoir un ou deux groupes méthyles sur les atomes d'azote se retrouvant dans le groupe guanidinium de la chaîne latérale de cet acide aminé. Il y a deux formes d'arginines diméthylées soient asymétrique, lorsque les deux groupes méthyles se retrouvent sur le même atome d'azote, ou symétrique, lorsqu'un groupe méthyle est placé sur chacun des deux atomes d'azote. Les enzymes responsables de la *N*-méthylation des arginines et des lysines se nomment *N*-méthyltransférases. Ces dernières catalysent le transfert d'un groupe méthyle

provenant du substrat donneur nommé *S*-adénosylméthionine (AdoMet) à un atome d'azote de l'acide aminé.

1.6.2 Les processus cellulaires régulés par la méthylation des arginines

La méthylation des arginines possède une panoplie de fonctions biologiques en contrôlant la fonction des protéines. La méthylation des arginines possède un rôle important dans plusieurs étapes du métabolisme de l'ARN (Bedford et Richard, 2005; Boisvert *et al.*, 2005a; Pahlich *et al.*, 2006; Bedford et Clarke, 2009). Parmi celles-ci, les étapes d'initiation et d'élongation de la transcription d'une panoplie de gènes est régulée à la fois par la méthylation des arginines des histones et des protéines non-histones mais également par certaines enzymes responsables de la méthylation des arginines qui agissent comme des co-activateurs et co-répresseurs de la transcription (Chen *et al.*, 1999; Fabrizio *et al.*, 2002; Pal *et al.*, 2003; Pal *et al.*, 2004; Richard *et al.*, 2005; Ancelin *et al.*, 2006; Dacwag *et al.*, 2007; Ramon-Maiques *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2008; Kleinschmidt *et al.*, 2008; Lacroix *et al.*, 2008; Yadav *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008). Par exemple, la méthylation des arginines du facteur d'élongation transcriptionnelle SPT5 régule son interaction avec l'ARN pol II et contrôle donc l'étape d'élongation de la transcription (Kwak *et al.*, 2003).

La méthylation des arginines jouerait un rôle important dans le signal de dommage à l'ADN (Boisvert *et al.*, 2003; Charier *et al.*, 2004; Huyen *et al.*, 2004; Adams *et al.*, 2005; Bedford et Richard, 2005; Boisvert *et al.*, 2005b; Boisvert *et al.*, 2005d; Boisvert *et al.*, 2005e; El-Andalousi *et al.*, 2006; Pahlich *et al.*, 2006; El-Andalousi *et al.*, 2007; Dery *et al.*, 2008; Bedford et Clarke, 2009). La protéine 53BP1 est impliquée

dans la détection, le signal et la réparation des dommages à l'ADN et une étude a démontré que la diméthylation asymétrique des arginines de cette protéine est requise pour sa liaison à l'ADN (Charier *et al.*, 2004; Huyen *et al.*, 2004; Adams *et al.*, 2005; Boisvert *et al.*, 2005e). Une autre protéine impliquée dans le signal et la réponse des dommages à l'ADN, MRE11, contient des arginines asymétriquement diméthylées qui régulent l'activité enzymatique exonucléase de cette protéine (Boisvert *et al.*, 2003; Boisvert *et al.*, 2005c; Boisvert *et al.*, 2005b; Dery *et al.*, 2008).

La méthylation des arginines est impliquée dans la localisation nucléolaire et dans le transport nucléaire et cytoplasmique de certaines protéines (Najbauer *et al.*, 1993; Pintucci *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1998; Nichols *et al.*, 2000; Aoki *et al.*, 2002; Green *et al.*, 2002; Cote *et al.*, 2003; Lukong et Richard, 2004; Smith *et al.*, 2004; Bedford et Richard, 2005; Pahlich *et al.*, 2006; Iacovides *et al.*, 2007; Bedford et Clarke, 2009; Shin *et al.*, 2009). L'accumulation nucléaire de quelques protéines, telles que Sam68 et FGF2, et la localisation nucléolaire de la protéine ribosomique S3 nécessitent la méthylation des arginines (Pintucci *et al.*, 1996; Green *et al.*, 2002; Cote *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2009). Par contre, pour d'autres protéines, comme hnRNP, la méthylation des arginines est impliquée dans leur export nucléaire (Najbauer *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1998; Aoki *et al.*, 2002).

1.6.3 Les enzymes responsables de la méthylation d'arginines

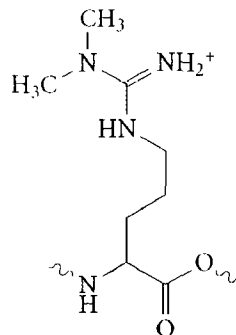
La formation des arginines monométhylées (MMA), symétriquement diméthylées (sDMA) et asymétriquement diméthylées (aDMA) est catalysée par une famille d'enzymes appelées protéines arginines méthyltransférases (PRMT) (Bedford et Richard,

2005; Boisvert *et al.*, 2005a; Pahlich *et al.*, 2006; Bedford, 2007; Bedford et Clarke, 2009). Un total de neuf PRMT ont été identifiées jusqu'à maintenant soient les PRMT1 à -9 (Pahlich *et al.*, 2006; Bedford et Clarke, 2009). Les PRMT sont classifiées en type I (PRMT1, -3, -4 ou CARM1, -6 et -8) ou type II (PRMT5 et -7) (Figure 7A) (Gary et Clarke, 1998; Bedford et Richard, 2005; Bedford et Clarke, 2009). L'activité des enzymes PRMT2 et -9 n'a pas encore été caractérisée (Bedford et Clarke, 2009). Les PRMT catalysent le transfert d'un groupe méthyle du substrat donneur *S*-adénylméthionine (AdoMet) à un atome d'azote se retrouvant dans le groupe guanidinium de la chaîne latérale de l'arginine pour former une arginine méthylée et *S*-adénylhomocystéine (AdoHcy) (Figure 7B) (Bedford et Richard, 2005). Les deux types d'enzymes PRMT catalysent la formation d'une MMA. Les PRMT de type I produisent des aDMA tandis que les PRMT de type II forment des sDMA. Les PRMT-1, -3 et -8 méthylent généralement des arginines entourées de un ou plusieurs résidus glycine, une séquence connue sous le nom de motif riche en glycines et arginines (GAR) (Najbauer *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1998; Frankel *et al.*, 2002). En plus des motifs GAR, la PRMT6 méthyle des arginines de quelques substrats particuliers (Frankel *et al.*, 2002; Boulanger *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2005; Sgarra *et al.*, 2006; El-Andalousi *et al.*, 2007; Guccione *et al.*, 2007; Hyllus *et al.*, 2007; Iberg *et al.*, 2008). La PRMT4 ou CARM1 quant à elle ne réalise pas la méthylation des motifs GAR mais méthyle plutôt des arginines de quelques substrats spécifiques et des arginines entourées de motifs PGM riches en prolines, glycines, méthionines et arginines se retrouvant dans les facteurs d'épissage (Bedford *et al.*, 1998; Lee et Bedford, 2002; Lee *et al.*, 2005a; Cheng *et al.*, 2007). La méthylation par les PRMT de type II, soient les PRMT5 et -7, s'effectue sur

A)

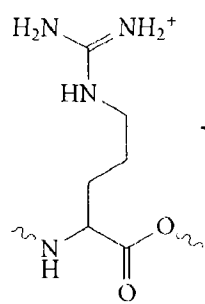
Type I PRMT: PRMT1
PRMT2
CARM1
PRMT6
PRMT8

Type II PRMT: PRMT5
PRMT7

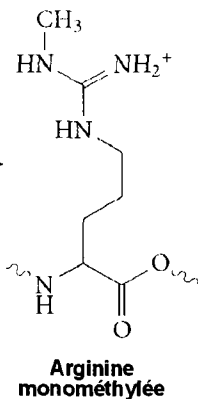
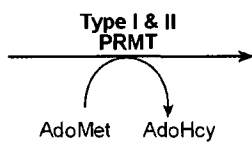


**Arginine
asymétriquement
diméthylée**

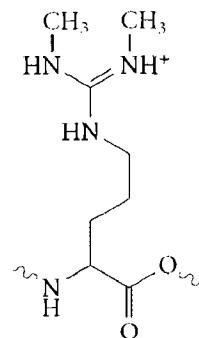
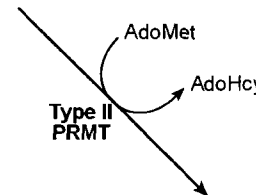
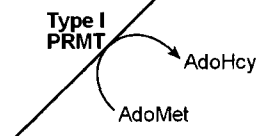
B)



Arginine



**Arginine
monométhylée**



**Arginine
symétriquement
diméthylée**

Figure 7: Les réactions de méthylation des arginines par les enzymes PRMT.

(A) La méthylation des arginine est catalysée par les enzymes protéine arginine méthyltransférase (PRMT) de types I et II et la liste de ces enzymes est présentée. (B) Les PRMT de type I et II catalyse l'ajout d'un groupe méthyle provenant du substrat donneur S-adénosylméthionine (AdoMet) sur un des deux atomes d'azote du groupe guanidinium d'une arginine pour former une arginine monométhylée et S-adénosylhomocystéine (AdoHcy). L'ajout d'un deuxième groupe méthyle sur le même atome d'azote produit une arginine asymétriquement diméthylées et est catalysé par les PRMT de type I. Lorsque le deuxième groupe méthyle est placé sur l'autre atome d'azote par les PRMT de type II, l'arginine est symétriquement diméthylée.

des arginines des motifs GAR ainsi que sur des résidus arginines isolés (Pollack *et al.*, 1999; Friesen *et al.*, 2001; Meister *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005b; Cheng *et al.*, 2007; Gonsalvez *et al.*, 2007; Neuenkirchen *et al.*, 2008). La PRMT5 peut également méthyler les arginines se retrouvant dans une région riche en motifs PGM (Cheng *et al.*, 2007).

1.6.4 La réversibilité de la méthylation des arginines

Pendant plus de trente ans, la croyance était que la méthylation était un processus enzymatique irréversible et statique, contrairement à la phosphorylation et l'acétylation qui sont des modifications post-traductionnelles réversibles (Bannister et Kouzarides, 2005; Klose *et al.*, 2006a; Pahlich *et al.*, 2006; Klose et Zhang, 2007; Shi et Whetstine, 2007; Bedford et Clarke, 2009). Cette croyance était basée sur des études démontrant que la demi-vie des histones était très similaire à celle des groupes méthyles sur les arginines et les lysines des histones et donc que les groupes méthyles étaient stables sur ces résidus (Byvoet *et al.*, 1972; Duerre et Lee, 1974). De plus, le fait qu'aucune enzyme déméthylase n'ait été identifiée appuyait l'idée que la méthylation était irréversible. C'est en 2004 que tout changea avec l'identification de la première enzyme déméthylase, LSD1, reversant la méthylation des lysines des histones (Shi *et al.*, 2004). La même année, une enzyme nommée peptidylarginine déaminase 4 (PADI4) a été identifiée convertissant les arginines monométhylées en résidus citrullines par une réaction de déméthylimination (Figure 8) (Cuthbert *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). PADI4 catalyse également une réaction de déimination transformant les arginines en citrullines (Cuthbert *et al.*, 2004; Raijmakers *et al.*, 2007). L'enzyme PADI4 bloque les réactions de méthylation sur les arginines et les MMA en convertissant ces résidus en citrullines

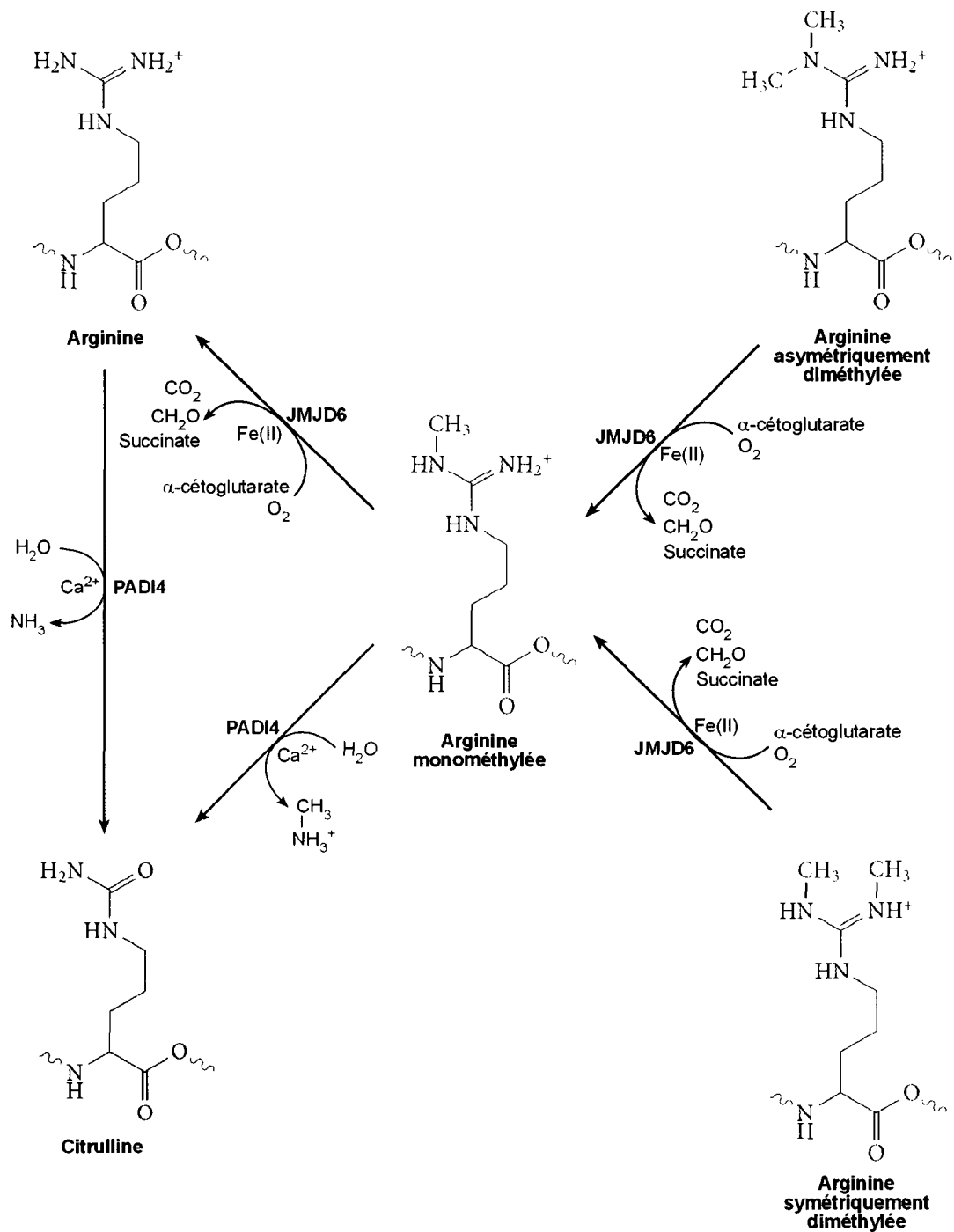


Figure 8: Les réactions de déimination, déméthylimination et déméthylation des arginines.

Une arginine peut être convertie en résidu citrulline par une réaction de déimination accomplie par l'enzyme peptidylarginine déiminase (PADI4). L'enzyme PADI4 catalyse également la réaction de déméthylimination sur une arginine monométhylée pour produire une citrulline. La protéine contenant un domaine Jumonji 6 (JMJD6) est une déméthylase catalysant le retrait d'un groupe méthyle des arginines méthylées.

(Cuthbert *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). De plus, la diméthylation des arginines bloque les réactions de déméthylimination et déimination et la production de résidus citrullines par PADI4 (Cuthbert *et al.*, 2004). Même si PADI4 n'est pas une déméthylase d'arginines, cette enzyme régule l'expression génique en contrôlant la méthylation et la citrullination des arginines des histones (Cuthbert *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Deux ans plus tard, plusieurs études ont identifiées une famille d'enzymes, les protéines Jumonji C, déméthylant les lysines des histones (Cloos *et al.*, 2006; Fodor *et al.*, 2006; Klose *et al.*, 2006b; Tsukada *et al.*, 2006; Whetstine *et al.*, 2006; Yamane *et al.*, 2006). Par la suite, la première déméthylase d'arginine, nommée la protéine contenant un domaine Jumonji 6 (JMJD6), a été découverte (Chang *et al.*, 2007). JMJD6 déméthyle l'arginine 2 de l'histone 3 (H3R2) et l'arginine 3 de l'histone 4 (H4R3) et catalyse la déméthylation des arginine monométhylées ainsi que diméthylées (Figure 8). Par contre, l'activité déméthylase de JMJD6 est remise en question par la récente découverte démontrant que JMJD6 effectue plutôt l'hydroxylation des lysines (Webby *et al.*, 2009).

1.7 RAISONNEMENT

En acidose, le code NoDS^{H+} est activé déclenchant la séquestration nucléolaire de VHL. Suite à la neutralisation du milieu acide, le NoDS^{H+} est inactivé provoquant le relâchement de VHL du nucléole. Le motif NoDS^{H+} est retrouvé dans quelques protéines impliquées dans des processus cellulaires de bases, telles que DNA pol δ p125 et Hsc70, et active leur détention nucléolaire en acidose (Mekhail *et al.*, 2007). Le motif NoDS^{H+} contient un domaine STAD riche en arginines. Les arginines du STAD sont cruciales et ne peuvent pas être substituées pour tout autre acide aminé sans entraîner la perte de la

fonction du NoDS^{H+} de VHL. Comme le NoDS^{H+}, d'autres signaux de localisation nucléolaire contiennent des séquences riches en résidus arginines (Siomi *et al.*, 1988; Dang et Lee, 1989; Cochrane *et al.*, 1990; Moroianu et Riordan, 1994; Weber *et al.*, 2000; Catez *et al.*, 2002; Hiscox, 2002; Pellar et DiMario, 2003). Contrairement au NoDS^{H+}, la substitution des arginines dans certains de ces signaux de localisation nucléolaire pour des acides aminés de même charge, soient les lysines, n'affecte pas leur fonction (Pellar et DiMario, 2003). Ces observations suggèrent que les arginines du NoDS^{H+} pourraient posséder un rôle indépendant de leur charge positive dans la séquestration nucléolaire. Certaines études ont démontré que la localisation nucléolaire de protéines était contrôlée par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et la méthylation d'arginines (Catez *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2009). De plus, la méthylation des arginines régule le transport et la localisation cytoplasmique et nucléaire de certaines protéines (Pintucci *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1998; Aoki *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2004; Bedford et Richard, 2005; Pahlich *et al.*, 2006; Bedford et Clarke, 2009). Vu l'importance des résidus arginines dans le motif NoDS^{H+} et l'implication de la méthylation dans la localisation cellulaire de protéines, nous suggérons que l'activité du code NoDS^{H+} est contrôlée par la méthylation des arginines.

1.8 HYPOTHÈSE

La méthylation des arginines du motif NoDS^{H+} contrôle l'activité du code et la séquestration nucléolaire des protéines selon la concentration en ions H⁺ extracellulaires.

1.9 OBJECTIFS

Objectif #1: Examiner le rôle de la méthylation dans la séquestration nucléolaire du NoDS^{H+} et de VHL.

La localisation cellulaire et la séquestration nucléolaire de la protéine VHL et du motif NoDS^{H+} de VHL fusionnés à GFP seront suivies par microscopie de fluorescence dans des cellules vivantes traitées avec des inhibiteurs de méthylation dans différentes conditions d'oxygène et de pH.

Objectif #2: Analyser l'état de méthylation des arginines du NoDS^{H+} en conditions neutres et acidiques.

Par western, la reconnaissance de différents anticorps spécifiques aux arginines méthylées pour la protéine VHL sera comparée en conditions neutres et acidiques. De plus, l'état de méthylation des arginines du NoDS^{H+} de VHL ainsi que d'une deuxième protéine, Hsc70, sera déterminé en conditions neutres et acidiques par spectrométrie de masse.

Objectif #3: Déterminer l'effet de l'état de méthylation des arginines sur l'affinité du NoDS^{H+} pour le nucléole.

La séquestration nucléolaire de différents peptides du NoDS^{H+} de VHL avec des états de méthylation des arginines variés et des substitutions des arginines sera étudiée. Les peptides seront micro-injectés dans des cellules vivantes pour suivre leur localisation cellulaire par microscopie. De plus, l'affinité des peptides pour le nucléole sera examinée *in vitro* par des mesures d'absorbance.

Objectif #4: Investiguer l'état et le rôle de la méthylation des arginines du NoDS^{H+} après la neutralisation du milieu acide et le relâchement nucléolaire.

Par spectrométrie de masse, le statut de méthylation des arginines du NoDS^{H+} de VHL sera examiné suite à la neutralisation du milieu extracellulaire acide. Le rôle de la méthylation dans le relâchement nucléolaire de la protéine VHL sera étudié avec l'utilisation d'inhibiteurs de méthylation.

CHAPITRE 2: MÉTHODES

2.1 CELLULES

Les cellules MCF-7 ont été obtenues d'American Type Culture Collection (Manassas, VA).

2.2 CULTURE CELLULAIRE

Les cellules ont été maintenues dans du milieu Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) complété avec du sérum foetal bovin à 5% volume/volume (v/v) et de la pénicilline-streptomycine à 1% v/v dans un environnement à 37°C et à 5% CO₂. Les cellules cultivées en hypoxie ont été incubées dans une chambre hypoxique à 37°C sous une atmosphère à 1% O₂, 5% CO₂ et balancée au N₂. Pour les expériences d'acidose de courte durée, les cellules ont été cultivées en hypoxie jusqu'à 4 heures dans du milieu neutre à pH 7.2 ou acide à pH 6.0. Le milieu neutre se compose de DMEM complété avec du sérum foetal bovin à 5% v/v et de la pénicilline-streptomycine à 1% v/v. Le milieu acide est du DMEM sans tampon ajustée à pH 6.0 avec du HCl. Pour les expériences d'acidose de longue durée, les cellules ont été cultivées en hypoxie pendant 22 heures dans du milieu standard à pH 7.2 ou dans du milieu permettant l'acidose induite par l'hypoxie à pH 6.0 (Mekhail *et al.*, 2004a). Ces milieux sont du DMEM sans tampon complétés avec du sérum foetal bovin à 5% v/v et avec de la pénicilline-streptomycine à 1% v/v. Du NaHCO₃ à une concentration finale de 44mM a été ajouté aux milieux et le pH a été ajusté avec du HCl à 7.2 pour le milieu standard ou à 6.0 pour le milieu permettant l'acidose induite par l'hypoxie. De l'air a été incorporé aux deux milieux à température de la pièce pour que le pH se stabilise à 7.2. Le pH du milieu permettant

l'acidose induite par l'hypoxie est lentement revenu au pH original de 6.0 en hypoxie sur une durée de 22 heures alors que le pH du milieu standard est resté à 7.2.

2.3 PLASMIDES

Le NoDS^{H+} de VHL, le fragment de VHL endogène constitué des acides aminés 100 à 130 ainsi que VHL humain pleine longueur ont été clonés dans pcDNA3.1 entre le marqueur Flag en position N-terminale et la protéine fluorescente verte (GFP) en C-terminale comme décrit précédemment (Lee *et al.*, 1999; Bonicalzi *et al.*, 2001; Groulx et Lee, 2002; Mekhail *et al.*, 2005; Mekhail *et al.*, 2007). PK-GFP consiste de pyruvate kinase (PK) et de GFP en position C-terminale (Groulx *et al.*, 2000). F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP a été généré en insérant le NoDS^{H+} de VHL dans F-PK-GFP entre le marqueur Flag en position N-terminale et PK en utilisant les sites de restriction Apa1 et Xho1. F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP-NLS a été généré en insérant le NoDS^{H+} de VHL entre le marqueur Flag en position N-terminale et PK en utilisant les sites de restriction Apa1 et Xho1 dans F-PK-GFP-NLS qui contient un signal de localisation nucléaire (NLS) provenant de l'antigène large T du simian virus 40 (Groulx *et al.*, 2000). Le domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODDD) de HIF1- α des acides nucléiques 967 à 1800 a été cloné dans F-NoDS^{H+}VHL-GFP entre le NoDS^{H+}VHL et GFP en position C-terminale en utilisant le site de restriction Xho1.

2.4 TRANSFECTIONS

Les cellules MCF-7 ont été transfectées de manière transitoire en utilisant le réactif de transfection Effectene (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Les cellules transfectées ont été cultivées pendant 24 heures en conditions standards avant d'effectuer

des traitements. La population de cellules MCF-7 exprimant de manière stable F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP a été générée en transfectant des cellules MCF-7 avec F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP avec le réactif de transfection Effectene suivi d'une sélection avec l'agent G418.

2.5 TRAITEMENTS AVEC LES DROGUES

Aux endroits indiquées, les cellules ont été traitées à 37°C avec l'inhibiteur de traduction cycloheximide (chx: Sigma, St-Louis, MO) à une concentration finale de 100 mg/mL, avec les inhibiteurs de méthylation 5'-(methylthio)adénosine (MTA: Sigma) et adénosine périodate oxydé (AdOx: Sigma) à des concentrations finales de 100mM et 10mM respectivement ou avec le contrôle diméthylsulfoxyde (DMSO).

2.6 SOLUBILITÉ PAR TRITON

Les expériences de solubilité par Triton ont été réalisées comme précédemment décrites (Mekhail *et al.*, 2007). Les cellules ont été récoltées puis resuspendues dans du tampon de transport à 4°C contenant du HEPES à 20mM, de l'acétate de potassium à 110mM, de l'acétate de sodium à 5mM, de l'acétate de magnésium à 2mM, du EGTA à 1mM, du dithiothréitol (DTT) à 2mM ainsi que les inhibiteurs de protéases leupeptine à 2 µg/mL, aprotinine à 2 µg/mL et pepstatine A à 1 µg/mL qui ont été ajoutées à la solution juste avant l'utilisation. Les cellules ont été laissées sur glace pour équilibrées pendant 1 minute avant d'ajouter le détergent Triton-X à 1% v/v. La perméabilisation a été suivie par microscopie de fluorescence avec le colorant Hoechst 33258 (Sigma) qui colore seulement l'ADN des cellules perméabilisées. Les cellules ont ensuite été centrifugées pour séparer la fraction Triton-X insoluble de la fraction Triton-X soluble. Les deux

fractions ont ensuite été lysées à une concentration finale de 5% sodium dodécyl sulfate (SDS) dans du tampon phosphate salin (PBS) 1X afin d'obtenir des volumes finals égaux pour les deux fractions.

2.7 ISOLATION DE NUCLÉOLES PAR GRADIENTS DE SUCROSE

Les nucléoles de cellules MCF-7 ont été isolés comme précédemment décrit (Andersen *et al.*, 2002; Mekhail *et al.*, 2007). Environ 8×10^7 cellules MCF-7 ont été recueillies par trypsinisation, lavées quelques fois dans du 1X PBS puis incubées sur glace pendant 6 minutes dans une solution hypotonique à 4°C contenant du Hepes à 10mM, du $MgCl_2$ à 1.2mM, du DTT à 0.5 mM. Les cellules ont ensuite été homogénéisées sur glace à l'aide d'un homogénéiseur de Dounce jusqu'à ce qu'environ 90% des cellules soient lysées tout en gardant les noyaux intacts. Le lysat cellulaire a été centrifugé à 300 forces centrifuges relatives (rcf) pendant 7 minutes à 4°C. Le culot de centrifugation, qui se compose principalement de noyaux, a été resuspendu dans une solution contenant du sucrose à 0,25M et du $MgCl_2$ à 10mM (solution S1) avant d'être déposé sur une deuxième solution contenant du sucrose à 0,35M et du $MgCl_2$ à 0.5mM (solution S2). Le tout a été centrifugé à 2000 rcf pour 7 minutes à 4°C. Le culot, constitué maintenant de noyaux purs, a été resuspendu dans la solution S2. Les noyaux ont ensuite été soniqués sur glace 8 fois pendant 20 secondes avec des intervalles de 20 secondes entre chaque sonication à l'aide d'un sonicateur 3000 ultrasonic liquid processor (Misonix Inc., Farmingdale, NY) réglé au niveau 1.0 ou 6W. Le matériel soniqué a été déposé sur une solution contenant du sucrose à 0,88M et du $MgCl_2$ à 0,5mM (solution S3) et le tout a été centrifugé à 3100 rcf pendant 15 minutes à 4°C. Le culot de

centrifugation composé de nucléoles a été lavé avec la solution S2 puis centrifugé à 2000 rcf pendant 7 minutes. Le culot qui contient maintenant les nucléoles purs a été resuspendu dans la solution S2 pour être conservé à -80°C. La pureté des nucléoles isolés a été évaluée par microscopie en lumière et par western à l'aide d'anticorps spécifiques pour des protéines nucléolaires telles que fibrillarine et cytoplasmiques telles que Hsp60.

2.8 IMMUNOPRÉCIPITATION

Les cellules MCF-7 exprimant de manière stable ou transitoire F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP, F-VHL-GFP ou F-100-130VHL-GFP ont été lysées dans du tampon de lyse contenant du Igepal CA620 à 0,5%, du NaCl à 100mM, du Tris-HCl (pH 7,6) à 20mM, du MgCl₂ à 5mM et du orthovanadate de sodium à 1mM ainsi que les inhibiteurs de protéases leupeptine à 2 µg/mL, aprotinine à 2 µg/mL et pepstatine A à 1 µg/mL qui ont été ajoutées à la solution juste avant l'utilisation. Les lysats cellulaires ont ensuite été incubés avec des billes protéine G-agarose préfixées de l'épitope Flag M2 (Sigma), prélavées quelques fois avec du tampon Tris salin (TBS) 1X, en rotation pour toute la nuit à 4°C. Les billes ont ensuite été lavées quatre fois avec du 1X TBS puis éluées avec des peptides Flag (Sigma).

2.9 WESTERN

Pour les lysats cellulaires totaux, les cellules ont été lavées quelques fois avec du 1X PBS puis lysées avec une solution de 5% SDS dans du 1X PBS. L'ADN a été brisée en passant le lysat quelques fois à travers une aiguille de 19 gauge. La concentration en protéines des lysats cellulaires a été déterminée par la méthode de l'acide bicinchoninique

(BCA) (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL). Les échantillons ont été séparés sur des gels de polyacrylamide contenant du SDS puis transférés sur des membranes de polyvinylidène difluoride (PVDF). Les membranes ont été bloquées dans une solution de lait écrémé à 5% poids/volume dans du 1X PBS contenant du Tween 20 à 0,2% v/v puis incubées avec les anticorps primaires suivants: les anticorps monoclonaux de souris anti-Flag M2 (Sigma), anti-Hsp60 (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI) ou anti-Hsc70 (Abcam, Cambridge, MA), les anticorps polyclonaux de lapin anti-fibrillarine (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-SYM10 et anti-SYM11 reconnaissant les arginines symétriquement diméthylées ou anti-ASYM24 reconnaissant les arginines asymétriquement diméthylées (reçus de Dr. Jocelyn Côté, Université d'Ottawa, Ottawa ON) ainsi que l'anticorps polyclonal de poulet anti-GFP (AVES Lab Inc., Tigard, OR). Les membranes ont ensuite été lavées quelques fois avec du 1X PBS contenant du Tween 20 à 0,2% v/v puis sondées avec les anticorps secondaires de souris (GE Healthcare Biosciences Corp., Piscataway, NJ), de lapin (Chemicon International, Temecula, CA) ou de poulet (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) conjugués à la peroxidase de raifort. Les membranes ont été lavées quelques fois avec du 1X PBS contenant du Tween 20 à 0,2% v/v avant la détection en utilisant le réactif à chimiluminescence Western Lightning Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA).

2.10 COLORATION À L'ARGENT

Les produits d'immunoprécipitations ont été séparés sur des gels de polyacrylamide contenant du SDS puis colorés à l'argent selon le protocole du manufacturier (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).

2.11 SPECTROMÉTRIE DE MASSE

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS) a été réalisée par Dr. Rulin Zhang de WEMB Biochem Inc. (Toronto, ON, Canada). Les protéines de fusion F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP immunoprécipitées ont été extraites des gels colorés à l'argent puis digérées avec les enzymes chymotrypsine et GluC dans du tampon Tris (pH 8.1) à 20mM pour toute la nuit à 30°C. Les produits digérés ont été nettoyés à l'aide de colonnes C18 ZipTip. La solution de peptides obtenue a ensuite été purifiée par chromatographie liquide en phase inverse. Par la suite, les peptides purifiés ont été ionisés par électronebuliseur pour former des ions désolvatés et chargés positivement avant d'être analysés par spectrométrie de masse en tandem (Graves et Haystead, 2002). Une première spectrométrie de masse a permis d'analyser individuellement les masses des peptides en solution avant de choisir un groupe d'ions ayant un ratio masse/charge (m/e) supérieur à un certain nombre pour la prochaine étape. Un ion peptide spécifique a été sélectionné du groupe d'ions isolé de l'étape précédente puis a été fragmenté en plus petits peptides dans la chambre à collision. Les fragments du peptide dont la charge se situe à l'extrémité N-terminale sont des ions b tandis que les fragments dont la charge se situe à l'extrémité C-terminale sont des ions y. Une deuxième spectrométrie de masse a permis

d'analyser le ratio m/e des fragments du peptide. Les résultats de fragmentation des peptides ont été rassemblés à l'aide du système LCQ Deca XP (ThermoFinnigan, CA, USA) et d'un gradient d'acide acétique à 0,1% dans de l'eau (solution A) et d'acide acétique à 0,1% dans de l'acétonitrile (solution B) sur un temps de 90 minutes. Les résultats préliminaires ont été traités avec le logiciel Bioworks version 3.1. La spectrométrie de masse en tandem a permis de déduire la séquence en acide aminés d'un certain peptide en générant une série de fragments dont la masse diffère par un seul acide aminé (Graves et Haystead, 2002). De plus, cette technique a permis de déterminer la présence de modification post-traductionnelle sur un acide aminé en comparant la masse d'un acide aminé nu à celle d'un acide aminé avec une certaine modification post-traductionnelle. Par exemple, une arginine nue possède une masse moléculaire de 174.20 tandis qu'une arginine monométhylée possède une masse moléculaire de 188.2265 soit la masse d'une arginine de 174.20 additionné à la masse d'un groupe méthyle de 14.0265.

La spectrométrie de masse par désorption-ionisation laser assistée par matrice – par temps de vol (MALDI-TOF-MS) a été réalisée par Dr. Dan Mamelak de Custom Biologics (Mississauga, ON, Canada). Les protéines endogènes Hsc70 ont été extraites des gels colorés à l'argent puis digérées avec l'enzyme LysC avant d'être analysées par MALDI-TOF-MS.

2.12 PEPTIDES

Les peptides ont été synthétisés par W. M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory (New Haven, CT). Tous les peptides sont d'une longueur de 21

résidus et contiennent un groupement COOH libre à leur extrémité C-terminale ainsi que le marqueur fluorescent rhodamine (Rho) à leur extrémité N-terminale.

2.13 MICROINJECTIONS

Les peptides ont été dilués dans l'eau à une concentration finale de 100µg/mL puis introduits aux extrémités d'aiguilles Femtotips II (Eppendorf Inc., Mississauga, ON, Canada). Les cellules ont été cultivées dans des plats de culture de 35mm contenant une base recouverte de verre (MatTek Corporation, Ashland, MA) avant d'être microinjectées vivantes avec les peptides à 150hPa (0.5s) à l'aide d'un système Eppendorf semi-automatisé équipé d'un microinjecteur Femtojet, d'un micromanipulateur 5171 (Eppendorf Inc.) et d'un microscope Zeiss Axiovert S100 (Carl Zeiss Microimaging Inc., Thornwood, NY).

2.14 IMAGERIE DE FLUORESCENCE SUR CELLULES VIVANTES

Les cellules ont été cultivées dans des plats de culture de 35mm contenant une base en verre (MatTek Corporation). Les cellules vivantes microinjectées avec les peptides fusionnés à la rhodamine ou exprimant de manière transitoire des protéines de fusion marquées avec GFP ont été visualisées à l'aide d'un microscope Axiovert S100TV (Carl Zeiss Microimaging Inc.) équipé d'un objectif 1.2 C-Apochromat à immersion d'eau de puissance 40X. Les images ont été visualisées à l'aide d'une caméra digitale à dispositif de transfert de charge (Empix, Mississauga, ON, Canada) et du logiciel Northern Eclipse (Empix). L'ADN a été colorée au Hoechst 33342 (Sigma).

CHAPITRE 3: RÉSULTATS

3.1. LES INHIBITEURS DE MÉTHYLATION AFFECTENT LA CINÉTIQUE DE LA SÉQUESTRATION NUCLÉOLAIRE DE VHL ET DU NoDS^{H+}VHL

Dans cette étude, nous sommes intéressés à examiner le mécanisme de détention nucléolaire des protéines contenant un motif NoDS^{H+} suite à l'acidification du milieu extracellulaire. Nous croyons que la méthylation des arginines du NoDS^{H+} est impliquée dans la régulation de l'activité du code et dans la détention nucléolaires des protéines. Pour réaliser cette étude, nous avons travaillé avec la protéine VHL et avec un NoDS^{H+} provenant de VHL. Le NoDS^{H+} de VHL a été reconstitué à sa plus petite forme, c'est-à-dire que tous les acides aminés superflus n'étant pas nécessaires à l'activité du code ont été retirés. Le NoDS^{H+} reconstitué de VHL contient le STAD N-terminal de la protéine, se composant des acides aminés 107 à 113 de VHL (RRIHSYR), qui a été fusionné à deux STHDs, se situant entre les résidus 128 et 137 de la protéine (LLVNQTELFV) (Figure 6B mutant #3).

Pour tester notre hypothèse, nous avons comme première expérience examiné les effets d'inhiber la traduction des protéines sur la relocalisation nucléolaire de VHL et du NoDS^{H+}VHL. Cette expérience rapide et simple permettra de déterminer si les protéines VHL et NoDS^{H+} présentes lors de l'initiation de l'acidose sont celles relocalisées vers le nucléole ou si la synthèse de nouvelles protéines est nécessaire pour la séquestration nucléolaire. Des cellules MCF-7 ont été transfectées de manière transitoire avec VHL ou le NoDS^{H+} reconstitué de VHL qui sont tous deux fusionnés à la protéine fluorescente verte (GFP) pour suivre leur localisation cellulaire par microscopie de fluorescence sur cellules vivantes. Ces cellules ont été cultivées en hypoxie dans du média à pH 7.2 ou à pH 6.0 et traitées avec un inhibiteur de la traduction, la cycloheximide (chx). Nous avons

constaté que le traitement avec la cycloheximide n'a pas affecté la localisation cellulaire de VHL et du NoDS^{H+}VHL en conditions neutres et n'a pas empêché la séquestration nucléolaire de VHL ni du NoDS^{H+}VHL en conditions acides (Figure 9A). Ces résultats suggèrent que les protéines VHL et NoDS^{H+}VHL présentes avant le début de l'acidose sont celles séquestrées dans le nucléole et que ce ne sont pas des protéines VHL et NoDS^{H+}VHL nouvellement traduites suivant le début de l'acidose qui sont détenues dans le nucléole.

Puisque ce sont les protéines présentes avant l'initiation de l'acidose qui sont séquestrées dans le nucléole, nous pouvons envisager la possibilité que le motif NoDS^{H+} soit modifié au niveau post-traductionnel par la méthylation suite à l'accumulation d'ions H⁺ extracellulaires pour permettre la séquestration nucléolaire des protéines. Nous avons donc décidé de tester la possibilité que les arginines du NoDS^{H+}VHL soient méthylées pour permettre la séquestration nucléolaire. Des cellules MCF-7 exprimant de manière transitoire NoDS^{H+}VHL-GFP ont été soumises à un traitement avec un inhibiteur général de la méthylation, le 5'-(methylthio)adénosine (MTA). MTA est un produit de S- adénosylméthionine et lorsqu'il est en excès, MTA agit comme un puissant inhibiteur des réactions enzymatiques de méthylation (Williams-Ashman *et al.*, 1982; Avila *et al.*, 2004). Si la méthylation est une étape nécessaire pour accomplir la séquestration nucléolaire en acidose, alors le traitement avec l'inhibiteur de méthylation MTA devrait inhiber cette réaction. Par contre, si la détention nucléolaire nécessite le retrait de groupes méthyles, alors une accumulation du NoDS^{H+}VHL dans les nucléoles devrait être observée en conditions neutres. Les cellules ont été cultivées en hypoxie dans du média à pH 7.2 ou à pH 6.0 contenant de la cycloheximide et du MTA. Le traitement avec

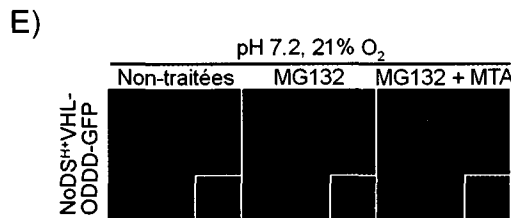
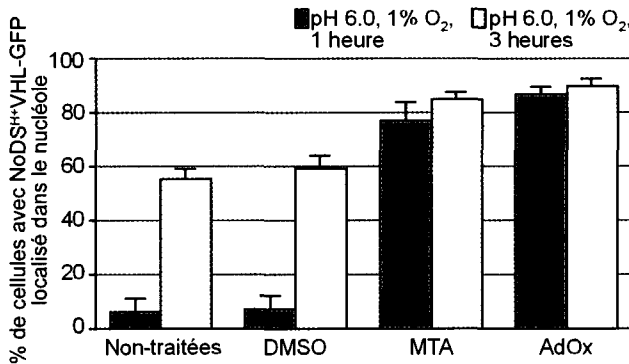
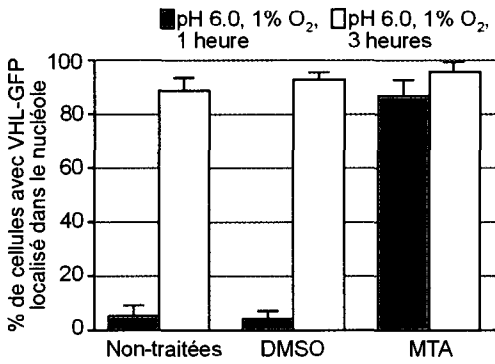
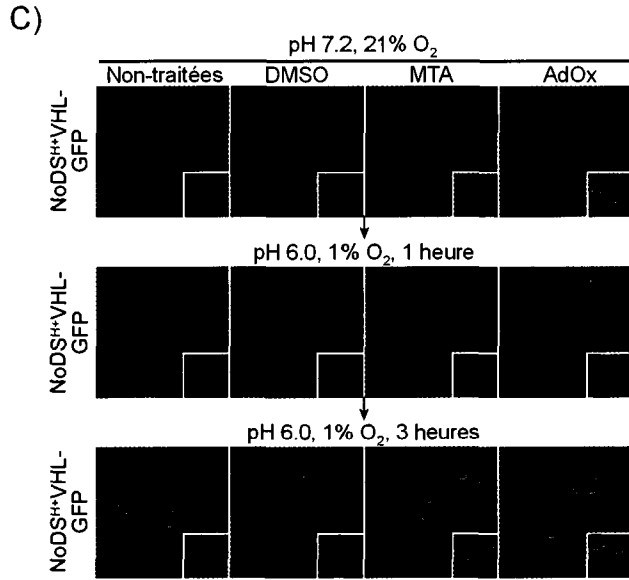
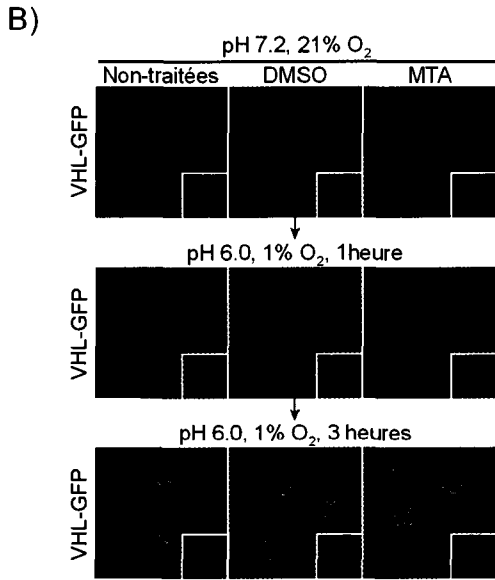
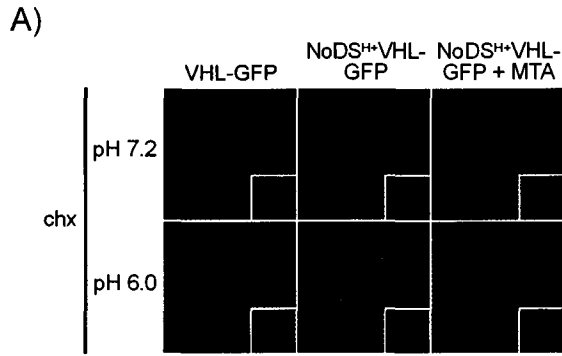


Figure 9: La rapidité de la séquestration nucléolaire de VHL et du NoDS^{H+}VHL en acidose est augmentée par le traitement avec des inhibiteurs de méthylation.

(A) Des cellules MCF-7 exprimant de façon transitoire VHL-GFP ou NoDS^{H+}VHL-GFP ont été cultivées pendant 4 heures en hypoxie dans du milieu à pH 7.2 ou à pH 6.0 contenant de la cycloheximide à une concentration de 100 µg/mL. Un ensemble de cellules MCF-7 exprimant NoDS^{H+}VHL-GFP a aussi été traité avec l'inhibiteur de méthylation 5'(methylthio)adénosine (MTA) à une concentration de 100 mM. La localisation des diverses protéines fusionnées à GFP a été déterminée par microscopie à fluorescence de GFP et les encarts montrent l'ADN colorée au Hoechst. Des cellules MCF-7 exprimant de manière transitoire VHL-GFP (B) ou NoDS^{H+}VHL-GFP (C) ont été cultivés en normoxie dans du milieu à pH 7.2 pour 2 heures et laissées non-traitées ou traitées avec les inhibiteurs de méthylation MTA à 100mM ou adénosine périodate oxydé (AdOx) à 10mM ou avec le contrôle diméthylsulfoxyde (DMSO). Les cellules ont ensuite été cultivées dans du milieu à pH 6.0 entre 1 et 3 heures et soumises au même traitement qu'avant soit non-traitées ou traitées avec MTA, AdOx ou DMSO. La localisation des protéines fusionnées à GFP a été déterminée par microscopie à fluorescence de GFP et les encarts montrent l'ADN colorée au Hoechst. Le pourcentage de cellules démontrant une localisation nucléolaire de VHL-GFP (B) ou NoDS^{H+}VHL-GFP (C) après 1 ou 3 heures en conditions acidiques a été mesuré en fonction du traitement soumis et est représenté graphiquement. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type de trois expériences indépendantes. (D) Le domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODDD) de la sous-unité alpha du facteur de transcription induit par l'hypoxie-1 (HIF-1 α) entre les acides aminés 1251 et 2084 a été fusionné au NoDS^{H+} de VHL et à GFP. (E) Des cellules MCF-7 exprimant de façon transitoire la protéine de fusion NoDS^{H+}VHL-ODDD-GFP ont été cultivées dans du milieu à pH 7.2 et traitées avec l'inhibiteur du protéasome MG132 à 10 µM pendant 3 heures pour activer l'accumulation de la protéine de fusion. Un ensemble de cellules MCF-7 exprimant NoDS^{H+}VHL-ODDD-GFP a aussi été traité avec MTA à 100 mM pendant 3 heures. La localisation de la protéine NoDS^{H+}VHL-ODDD-GFP a été déterminée par microscopie à fluorescence de GFP et les encarts montrent l'ADN colorée au Hoechst.

l'inhibiteur de méthylation MTA n'a pas empêché la séquestration nucléolaire du NoDS^{H+}VHL en conditions acides ce qui suggère que l'ajout de groupes méthyles n'est pas une réaction nécessaire pour accomplir la relocalisation dans le nucléole (Figure 9A). De plus, le traitement avec MTA n'a eu aucun effet sur la localisation cellulaire du NoDS^{H+}VHL en conditions neutres et donc l'inhibition de la méthylation n'a pas induit la détention nucléolaire de cette protéine (Figure 9A).

En effectuant les expériences à la section précédente, nous avons observé que le NoDS^{H+} de VHL en conditions acides était relocalisé dans le nucléole des cellules traitées avec l'inhibiteur de méthylation MTA avant les cellules non-traitées. Nous avons donc décidé d'investiguer cette surprenante observation en suivant la localisation cellulaire du NoDS^{H+}VHL dans des cellules traitées avec l'inhibiteur de méthylation à différents temps en acidose. Ceci nous donnerait des indications quant à l'implication possible de la méthylation dans le mécanisme de la séquestration nucléolaire. Des cellules MCF-7 exprimant de façon transitoire VHL-GFP ou NoDS^{H+}VHL-GFP ont été traitées pendant 2 heures en conditions neutres et normoxiques avec les inhibiteurs généraux de méthylation MTA ou adénosine périodate oxydé (AdOx). AdOx est un composé inhibant l'enzyme S-adénosyl-L-homocystéine hydrolase ce qui résulte en une accumulation de S-adenosyl-L-homocystéine, un produit inhibant les enzymes méthyltransférases (Lee *et al.*, 1977; Pahlich *et al.*, 2006). Ces cellules ont ensuite été transférées en conditions hypoxiques et acides avec le même traitement et la localisation cellulaire des protéines a été suivie au cours du temps. Nous avons remarqué qu'après une heure en acidose, VHL (Figure 9B) et le NoDS^{H+}VHL (Figure 9C) étaient localisés dans le nucléole de plus de 75% des cellules traitées avec les inhibiteurs de

méthylation MTA et AdOx. Par contre, moins de 10% des cellules non-traitées ou traitées avec le contrôle diméthylsulfoxyde (DMSO) démontraient une séquestration nucléolaire de VHL et de NoDS^{H+}VHL à ce temps. Dans ces cellules, il a fallu trois heures avant que l'on observe une importante détention nucléolaire des protéines (Figure 9B et C). Ces résultats suggèrent qu'en inhibant la méthylation, la vitesse de la séquestration nucléolaire du NoDS^{H+}VHL et de VHL est augmentée, passant de trois heures à une heure. Les inhibiteurs de méthylation MTA et AdOx sont généraux, c'est-à-dire qu'ils inhibent la méthylation de l'ADN et la méthylation des lysines et des arginines sur des protéines et des histones. Donc, nous ne pouvons tirer aucune conclusion quant au type de méthylation qui est impliqué dans le mécanisme de détention nucléolaire de VHL et du NoDS^{H+}VHL.

Les observations de l'expérience précédentes suggèrent que la méthylation serait impliquée dans la détention nucléolaire des protéines. Mais de manière surprenante, en inhibant la méthylation en conditions neutres, nous n'avons observé aucune accumulation du NoDS^{H+}VHL dans le nucléole (Figure 9A). Donc, comme prochaine étape, nous voulions créer un système nous permettant de contrôler la traduction et l'accumulation du NoDS^{H+}VHL en présence d'inhibiteurs de méthylation. Ceci empêcherait la méthylation du NoDS^{H+}VHL nouvellement synthétisé et nous procurerait un indice supplémentaire et plus précis de la possibilité que la méthylation au niveau des protéines soit impliquée dans la détention nucléolaire. La régulation de la sous-unité alpha du facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF) se fait au niveau de son domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODDD). En présence d'oxygène, deux résidus prolines présents dans le ODDD de HIF α sont hydroxylés par les enzymes HIF prolyle hydroxylases et

HIF α est dégradé par le protéasome. En hypoxie, la réaction d'hydroxylation est inhibée ce qui induit une accumulation de HIF α . Nous avons donc décidé d'utiliser ce système puissant régulant l'expression de HIF α pour induire l'accumulation du NoDS^{H+}VHL. L'ODDD de HIF1 α entre les acides aminés 1251 et 2084 a été fusionné au NoDS^{H+} de VHL et à GFP (Figure 9D). Pour observer la protéine de fusion NoDS^{H+}VHL-ODDD-GFP, les cellules MCF-7 exprimant de manière transitoire cette protéine doivent être traitées avec l'inhibiteur du protéasome MG132 pour induire son accumulation. La protéine NoDS^{H+}VHL-ODDD-GFP démontre une localisation cellulaire principalement cytoplasmique (Figure 9E). En absence de traitement, aucune trace de la protéine fusionnée à GFP est visible dans les cellules transfectées. Ceci suggère que notre système fonctionne parfaitement et qu'il permet de contrôler l'expression du NoDS^{H+}VHL. Des cellules MCF-7 exprimant de façon transitoire NoDS^{H+}VHL-ODDD-GFP ont été traitées à pH 7.2 avec MG132, pour induire l'accumulation, et MTA, pour inhiber la méthylation. Nous avons observé dans ces conditions une localisation exclusivement nucléolaire du NoDS^{H+}VHL fusionné au ODDD (Figure 9E). Ces résultats suggèrent qu'en inhibant la méthylation sur la protéine NoDS^{H+}VHL nouvellement synthétisée, la détention nucléolaire est permise. De plus, la séquence du NoDS^{H+}VHL contient trois arginines mais aucune lysine ce qui suggère que la méthylation serait au niveau d'une ou de plusieurs arginines du STAD du NoDS^{H+} de VHL. Ceci nous permet de spéculer qu'en conditions neutres, des arginines du NoDS^{H+}VHL sont méthylées suite à sa synthèse empêchant ainsi la relocalisation nucléolaire de la protéine. Mais en conditions acides, des groupes méthyles du NoDS^{H+}VHL sont enlevés pour permettre la détention nucléolaire.

3.2 LES ARGININES DE VHL ET DU NoDS^{H+}VHL SONT MÉTHYLÉES EN CONDITIONS NEUTRES

Comme prochaine étape, nous voulions déterminer si des arginines de VHL et du NoDS^{H+}VHL sont méthylées en conditions neutres. Pour ce faire, nous allons premièrement déterminer si la protéine VHL peut être reconnue par des anticorps spécifiques aux arginines méthylées. Nous avons donc immunoprécipité de cellules cultivées en conditions neutres et normoxiques deux protéines fusionnées à Flag soit GFP, comme contrôle, ou VHL-GFP. Par western, nous avons observé que F-VHL-GFP a été détecté par un anticorps spécifiques aux arginines symétriquement diméthylées nommée SYM11 (Figure 10A et B). Le contrôle F-GFP n'a pas été reconnu par l'anticorps SYM11 même à des niveaux d'expression très élevés (Figure 10B) ce qui suggère que l'anticorps est spécifique à VHL dans la protéine F-VHL-GFP. Nous avons aussi testé un anticorps spécifique aux arginines asymétriquement diméthylées (ASYM24) et un second anticorps spécifique aux arginines symétriquement diméthylées (SYM10). Aucun de ces deux anticorps n'a reconnu F-VHL-GFP ce qui suggère, encore plus, que l'anticorps SYM11 est spécifique à VHL. Ces résultats suggèrent que la protéine VHL contient des arginines qui sont symétriquement diméthylées.

VHL est une protéine de 213 acides aminés qui contient un total de 20 arginines dans sa séquence. VHL semble méthylée au niveau des arginines. Par contre, nous ne savons pas combien ni lesquelles des arginines de la protéine sont méthylées, ni si les arginines du STAD du NoDS^{H+} de VHL sont méthylées. Pour répondre à cette question, nous avons décidé d'utiliser un fragment de VHL endogène entre les acides aminés 100 et 130 (Figure 10C). Ce fragment contient un STAD (RRIHSYR) et deux STHDs (LWL et

Figure 10: VHL est reconnue par un anticorps spécifique aux arginines symétriquement diméthylées en conditions neutres.

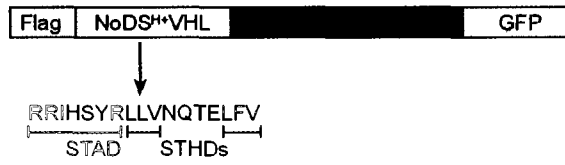
(A) Des cellules MCF-7 exprimant les adénovirus GFP ou VHL-GFP fusionnés à Flag ont été cultivées en normoxie dans du milieu à pH 7.2 puis récoltées et lysées. Les protéines fusionnées à Flag ont ensuite été immunoprécipitées du lysat cellulaire au moyen de billes protéine G-agarose préfixées de l'épitope Flag. Le tampon de lyse avec les billes Flag sert de contrôle négatif. Les produits des immunoprécipitations et un lysat cellulaire total (Lysat cell. total) ont été séparés sur un gel de polyacrylamide contenant du dodécyl-sulfate de sodium (SDS), transférés sur une membrane de PVDF puis marqués avec les anticorps suivants: SYM11 et SYM10, deux anticorps spécifiques aux arginines symétriquement diméthylées, ASYM 24, un anticorps spécifique aux arginines asymétriquement diméthylées et Flag. Les flèches indiquent la migration de F-VHL-GFP sur les membranes. **(B)** Des cellules MCF-7 infectées avec différentes quantités des adénovirus F-GFP ou F-VHL-GFP ont été cultivées en normoxie dans du milieu neutre avant d'être lysées. **(C)** La séquence en acides aminés d'un fragment de VHL constitué des acides aminés 100 à 130 avec le STAD souligné en rose, les deux STHDs en mauve et les quatre arginines présentées en rouge. **(D)** Des cellules MCF-7 exprimant les adénovirus F-GFP ou F-VHL-GFP ou exprimant de manière stable un fragment de VHL constitué des acides aminés 100 à 130 fusionné à Flag et GFP ont été cultivées en normoxie dans du milieu neutre avant d'être lysées. **(B et D)** Les immunoprécipitations ont été effectuées avec les billes Flag. Les produits des immunoprécipitations et un lysat cellulaire total ont été migrés sur un western et la membrane a été sondée avec les anticorps SYM11 et Flag.

LLV) et a la capacité d'être relocalisé et détenu dans le nucléole en conditions acidiqes. La séquence 100-130 de VHL est composée de quatre arginines, dont trois sont situées dans le STAD du NoDS^{H+}, ce qui nous permettra de restreindre les arginines possiblement méthylées. Par western, nous avons observé que le fragment 100-130 de VHL immunoprécipité de cellules maintenues en conditions neutres et normoxiques a été détecté par l'anticorps SYM11. Ces résultats suggèrent que des arginines présentes dans la séquence 100 à 130 de VHL sont symétriquement diméthylées. Il y a des bonnes chances qu'une ou plusieurs arginines du STAD du NoDS^{H+} soient méthylées, mais nous ne pouvons écarter la possibilité que la dernière arginine du fragment 100-130, qui est exclue du STAD, soit celle qui est diméthylée et détectée par l'anticorps SYM11.

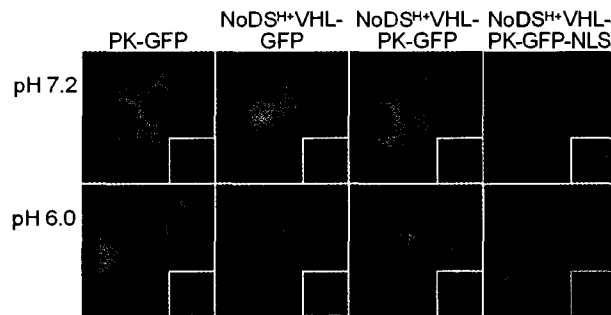
Dans la prochaine étape, nous voulions déterminer précisément si des arginines du STAD du NoDS^{H+} de VHL sont méthylées en conditions neutres en utilisant la spectrométrie de masse (MS). Pour ce faire, nous devons isoler une grande quantité de NoDS^{H+}VHL le plus pur possible. En conditions neutres, nous sommes capables de purifier VHL ou le NoDS^{H+}VHL simplement par immunoprécipitation. Par contre, nous avons essayé à maintes reprises d'isoler VHL et le NoDS^{H+}VHL du nucléole en conditions acidiqes par immunoprécipitation, mais toutes les tentatives ont été sans succès. VHL et le NoDS^{H+}VHL semble être liés très fortement au nucléole en acidose. Nous devons donc créer un système nous permettant de prévenir l'interaction du NoDS^{H+}VHL avec le nucléole en conditions acidiqes pour l'isoler. Ce même système serait utilisé pour purifier le NoDS^{H+}VHL en conditions neutres, pour garder toutes les données constantes entre les conditions où le pH varie.

Une manière de prévenir l'interaction entre le nucléole et le NoDS^{H+}VHL est d'exclure le NoDS^{H+}VHL du noyau et de le séquestrer dans le cytoplasme. Nous avons fusionné le NoDS^{H+}VHL avec une protéine exclusivement cytoplasmique qui ne diffuse pas librement entre le cytoplasme et le noyau, la pyruvate kinase (PK). Nous avons aussi fusionné le NoDS^{H+}VHL avec GFP et Flag (figure 11A). La protéine de fusion F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP démontre, comme prévu, une localisation entièrement cytoplasmique en conditions neutres et acides comme le contrôle PK-GFP dans des cellules exprimant de façon transitoire ces protéines de fusion (Figure 11B). Lorsqu'un signal de localisation nucléaire (NLS) est ajouté à F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP, la séquestration nucléolaire en acidose est restaurée ce qui suggère que PK n'intervient pas avec la fonction du NoDS^{H+}VHL (figure 11B). Nous avons aussi créé une expérience *in vitro* pour déterminer si la protéine F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP peut être détenue par le nucléole en acidose une fois que la membrane nucléaire, qui isole la protéine de fusion dans le cytoplasme, est rompue. Nous avons réalisé un fractionnement sous-cellulaire en utilisant le détergent Triton-X 100 qui permet de solubiliser la plupart des composantes cellulaires sauf les protéines nucléolaires qui se retrouvent donc dans la fraction insoluble. Des cellules MCF-7 exprimant de manière transitoire F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP ont été traitées avec Triton-X, suivi d'une période d'incubation pour permettre l'interaction entre les composantes cellulaires. La fraction soluble a été séparée de la fraction insoluble par centrifugation. La protéine de fusion F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP est présente dans la fraction insoluble en conditions acides, mais pas en conditions neutres, à un niveau assez important lorsque nous la comparons aux contrôles positifs F-NoDS^{H+}VHL-GFP et F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP-NLS (Figure 11C). Comme contrôle

A)



B)



C)

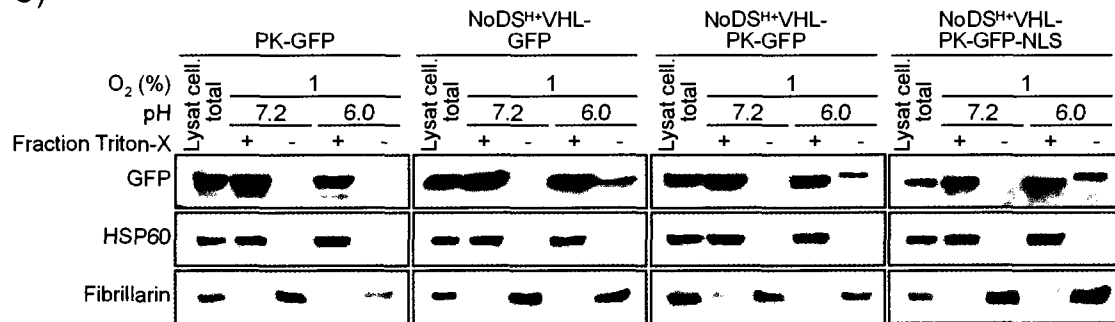


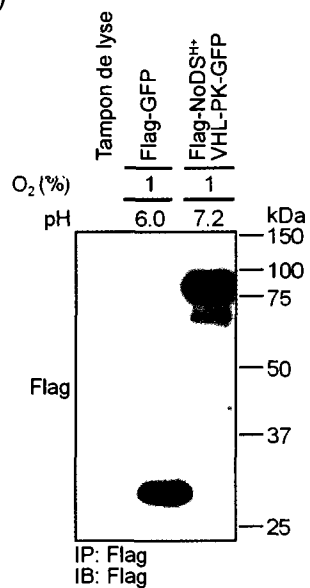
Figure 11: Flag-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP est capturée par le nucléole en conditions acidiqes.

(A) Le NoDS^{H+} de VHL été fusionné à la protéine pyruvate kinase (PK) qui présente une localisation entièrement cytoplasmique. Cette protéine de fusion NoDS^{H+}VHL-PK a par la suite été fusionnée à GFP et à Flag. La séquence en acides aminées du NoDS^{H+}VHL avec le STAD et les deux STHDs est présentée. (B et C) Des cellules MCF-7 exprimant de façon transitoire PK-GFP, Flag-NoDS^{H+}VHL-GFP, Flag-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP ou Flag-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP-NLS ont été cultivées pendant 22 heures en hypoxie dans du milieu standard à pH 7.2 ou dans du milieu permettant l'acidose induite par l'hypoxie à pH 6.0. (B) La localisation des diverses protéines fusionnées à GFP a été déterminée par microscopie à fluorescence de GFP et les encarts montrent l'ADN colorée au Hoechst. (C) Les cellules ont été traitées avec le détergent Triton-X 100 à 1% volume/volume et laissées incubées dans le Triton-X pour 20 minutes à 4°C. La fraction insoluble (fraction Triton-X -) a été séparée de la fraction soluble (fraction Triton-X +) par centrifugation et les deux fractions ont été lysées à une concentration finale de 5% SDS. Les fractions solubles et insolubles et un lysat cellulaire total ont été séparés sur un gel de polyacrylamide contenant du SDS et transférés sur une membrane de PVDF. Les protéines contenues dans la membrane ont ensuite été marquées avec l'anticorps GFP ainsi qu'avec les anticorps HSP60, qui est une protéine exclue du nucléole, et fibrillarine, qui est une protéine nucléolaire, pour déterminer la pureté des fractions solubles et insolubles.

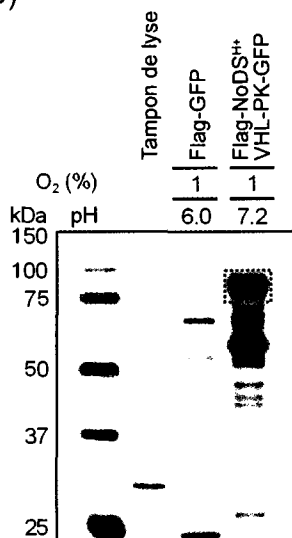
négatif, nous avons utilisé PK-GFP qui, comme prévu, n'est pas détectée dans la fraction insoluble en conditions acidiqes. Ces résultats suggèrent que la protéine de fusion F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP est séquestrée dans le cytoplasme, mais a la capacité d'être capturée par le nucléole en acidose une fois que la membrane nucléaire est rompue.

Maintenant que le système nous permettant d'isoler le NoDS^{H+}VHL est établi et caractérisé, nous pouvons analyser les arginines du NoDS^{H+}VHL par MS pour déterminer la présence de groupes méthyles sur celles-ci. Nous avons utilisé une technique couplant la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS) qui permet d'analyser chacun des acides aminés d'un peptide et de déterminer la présence de modifications post-traductionnelles sur ceux-ci. F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP a été immunoprécipitée en grande quantité de cellules MCF-7 exprimant de manière stable la protéine de fusion cultivées en hypoxie en conditions neutres et traitées avec de la cycloheximide. La bande correspondant à F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP a été extraite d'un gel de polyacrylamide contenant du dodécyl-sulfate de sodium (SDS) coloré à l'argent pour être analysée par LC/MS-MS (figure 12B). La protéine a été digérée avec les enzymes protéolytiques chymotrypsine et GluC pour générer des peptides de longueur adéquate pour la MS et contenant le STAD du NoDS^{H+}VHL. La solution de peptides a été résolue par chromatographie en phase liquide. Les peptides RRIHSYR et SYRLLVN ont ensuite été analysés par MS/MS (Figure 12C). Les résultats suggèrent que les trois arginines du STAD du NoDS^{H+}VHL contiennent chacune un groupe méthyle (R^{MMA}; arginine monométhylée) (Figure 12C et D). Aucune autre modification post-traductionnelle n'a été observée sur les acides aminés essentiels du STAD et des STHDs du NoDS^{H+}VHL. Ces résultats semblent suggérer que les arginines du STAD sont

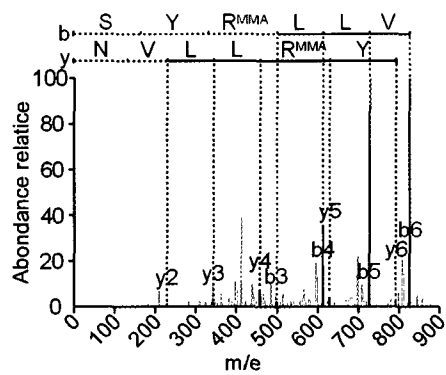
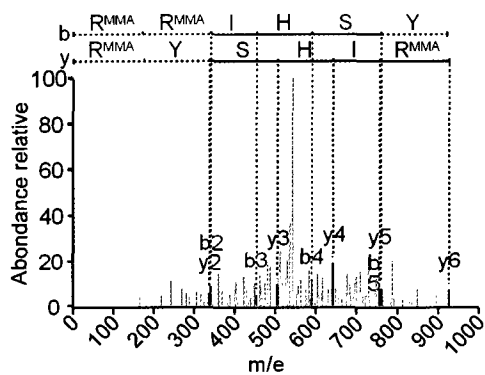
A)



B)



C)



D)

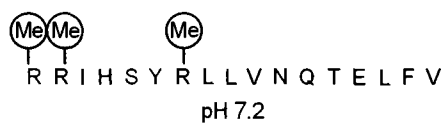


Figure 12: Les trois arginines contenues dans le NoDS^{H+}VHL sont méthylées en conditions neutres.

Des cellules MCF-7 exprimant l'adénovirus F-GFP ou exprimant de manière stable F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP ont été cultivées pendant 4 heures en hypoxie dans du milieu neutre contenant de la cycloheximide à 100 µg/mL, puis récoltées et lysées. Les immunoprécipitations ont été effectuées avec des billes Flag. Le tampon de lyse avec les billes Flag sert de contrôle négatif. **(A)** Les produits des immunoprécipitations ont été migrés sur un western et la membrane a été sondée avec l'anticorps Flag. **(B)** Les protéines ont été séparées sur un gel de polyacrylamide contenant du SDS et colorées à l'argent. La bande correspondant à F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP a été extraite du gel pour être analysée par spectrométrie de masse. **(C)** La protéine de fusion a été digérée avec les enzymes chymotrypsine et GluC puis la solution de peptides a été résolue par chromatographie en phase liquide (LC). Les peptides RRIHSYR et SYRLLVN ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse en tandem (MS-MS). **(C et D)** Les résultats de spectrométrie de masse suggèrent que les trois arginines du NoDS^{H+}VHL sont monométhylées (R^{MMA}) à pH 7.2. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de 22 peptides ainsi que par l'analyse de deux séries ioniques soient b et y. Des 22 peptides analysés, 14 peptides démontrent la présence de groupes méthyles sur les deux premières arginines et 8 autres peptides suggèrent que la dernière arginines est méthylée.

méthylées en conditions neutres possiblement pour empêcher la relocalisation nucléolaire du NoDS^{H+}VHL.

3.3 EN CONDITIONS ACIDIQUES, LES ARGININES DE VHL ET DU NoDS^{H+} VHL SONT NON-MÉTHYLÉES

Les résultats obtenus avec les expériences des anticorps spécifiques aux arginines méthylées (Figure 10) et de spectrométrie de masse (Figure 12) suggèrent que les arginines du motif NoDS^{H+}VHL sont méthylées en conditions neutres. Les expériences avec les inhibiteurs de méthylation (Figure 9) suggèrent, quant à elles, que des groupes méthyles seraient enlevés suite à l'acidification du milieu extracellulaire pour possiblement permettre la relocalisation nucléolaire des protéines. Dans cette section, nous sommes intéressés à déterminer l'état de méthylation des arginines de VHL et du NoDS^{H+}VHL en acidose.

Comme première expérience, nous avons employé l'anticorps SYM11, détectant les arginines symétriquement diméthylées, pour déterminer si VHL est dans un état méthylé ou non-méthylé en conditions acidiqes. F-VHL-GFP a été isolée de cellules MCF-7 cultivées en conditions normoxiques et neutres, hypoxiques et neutres ou hypoxiques et acidiqes. VHL a été reconnue par l'anticorps SYM11 en conditions neutres, comme observé précédemment, mais pas en conditions acidiqes (Figure 13). Ces résultats suggèrent que VHL se retrouve dans un état non-méthylé en acidose.

Comme prochaine étape, nous voulions utiliser la spectrométrie de masse pour déterminer clairement si les arginines du STAD du NoDS^{H+}VHL sont non-méthylées en acidose. Pour ce faire, nous avons utilisé le système F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP (Figure

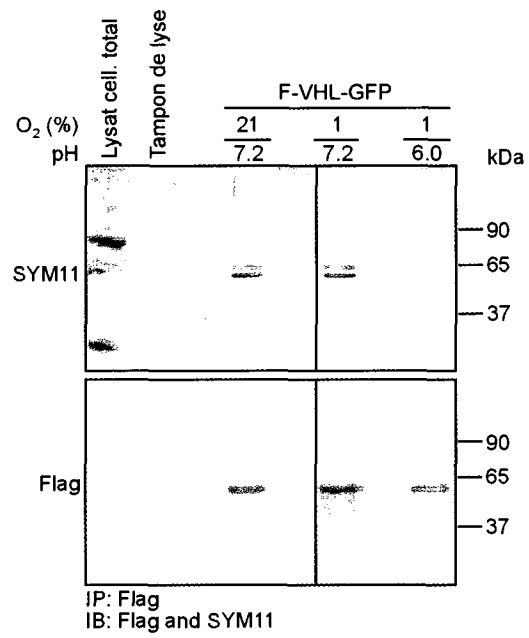


Figure 13: VHL n'est pas reconnue par l'anticorps spécifique aux arginines symétriquement diméthylées en conditions acidiques.

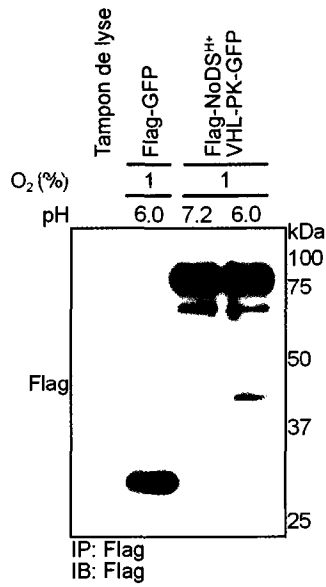
Des cellules MCF-7 exprimant l'adénovirus F-VHL-GFP ont été cultivées pendant 2.5 heures en normoxie ou en hypoxie dans du milieu à pH 7.2 ou à pH 6.0, puis récoltées et lysées. L'immunoprécipitation de F-VHL-GFP a été effectuée avec des billes préfixées de l'épitope Flag. Le tampon de lyse avec les billes Flag sert de contrôle négatif. Les produits des immunoprécipitations et un lysat cellulaire total (Lysat cell. total) ont été migrés sur un western et la membrane a été sondée avec les anticorps SYM11 et Flag.

11) et la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS), comme en conditions neutres (Figure 12). F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP a été immunoprécipitée de cellules exprimant de façon stable la protéine, cultivées en conditions hypoxiques et acidiqes et en présence de cycloheximide pour s'assurer que de nouvelles protéines pouvant être non-méthylées ne soient pas synthétisées. La bande correspondant à F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP a été extraite du gel coloré à l'argent (Figure 14B), puis la protéine a été digérée avec les enzymes chymotrypsine et GluC. Les peptides générés ont été analysés par LC/MS-MS (Figure 14C). Les résultats suggèrent que la dernière arginine du STAD du NoDS^{H+}VHL contient un groupe méthyle (Figure 14C et D). Par contre, aucun groupe méthyle n'a été détecté sur les deux premières arginines. De plus, comme à la figure 12, aucune modification post-traductionnelle n'a été observée sur tous les autres résidus du STAD et des STHDs du NoDS^{H+}VHL. Conjointement avec les résultats obtenus des expériences avec les inhibiteurs de méthylation (Figure 9), ces résultats de MS suggèrent que suite à une accumulation d'ions H⁺ extracellulaire, les deux premières arginines du STAD du NoDS^{H+}VHL sont déméthylées ou perdent leur groupe méthyle (Figure 14D) et permettent la séquestration nucléolaire du NoDS^{H+}VHL.

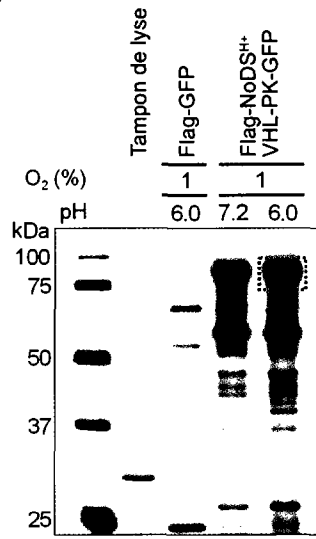
3.4 DES GROUPES MÉTHYLES SONT PERDUS DE LA PROTÉINE ENDOGÈNE HSC 70 SUIVANT L'ACIDIFICATION EXTRACELLULAIRE

Comme prochaine expérience, nous voulions confirmer les résultats de spectrométrie de masse obtenus avec le NoDS^{H+} reconstitué de VHL en analysant le NoDS^{H+} d'une protéine endogène par MS. Nous avons décidé de travailler avec la

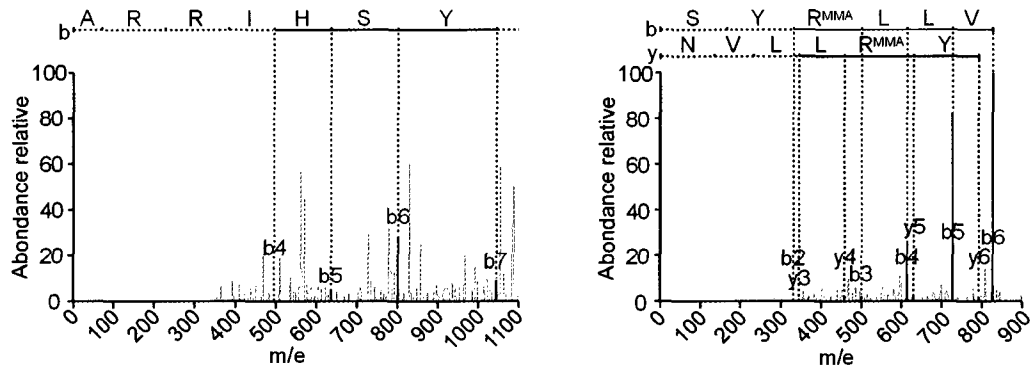
A)



B)



C)



D)

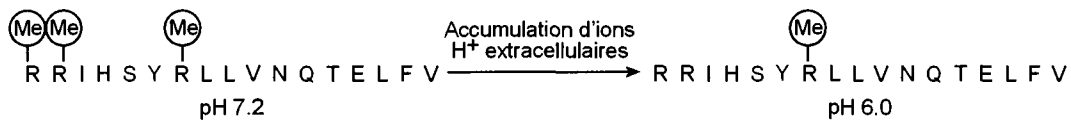


Figure 14: Le NoDS^{H+}VHL contient des arginines non-méthylées en conditions acidiqes.

Des cellules MCF-7 exprimant de manière stable F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP ou exprimant l'adénovirus F-GFP ont été cultivées en hypoxie pendant 4 heures dans du milieu à pH 7.2 ou à pH 6.0 contenant de la cycloheximide à 100 µg/mL, pour ensuite être récoltées et lysées. Les immunoprécipitations ont été effectuées avec des billes couplées à l'épitope Flag. Le contrôle négatif est le tampon de lyse avec les billes Flag. Les produits des immunoprécipitations ont été séparés sur un gel de polyacrylamide contenant du SDS, puis transférés sur une membrane et marqués avec l'anticorps Flag (A) ou colorés à l'argent (B). La bande correspondant à F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP à pH 6.0 a été extraite du gel pour analyser le NoDS^{H+}VHL de la protéine de fusion par spectrométrie de masse. (C) La protéine a été digérée avec les enzymes chymotrypsine et GluC, puis les peptides générés ont été analysés par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS). (C et D) Les spectres de masse obtenus suggèrent que les deux premières arginines du NoDS^{H+}VHL sont non-méthylées à pH 6.0, alors que la troisième arginine contient un groupe méthyle (R^{MMA}). Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de 11 peptides ainsi que par l'analyse de deux séries ioniques soient b et y. Des 11 peptides analysés, 3 peptides suggèrent que les deux premières arginines ne contiennent aucun groupe méthyles et 8 autres peptides démontrent que la dernière arginine est méthylée. Ces résultats et ceux présentés à la Figure 12 suggèrent qu'en conditions neutres, chacune des arginines du NoDS^{H+}VHL contiennent un groupe méthyles mais qu'après une accumulation d'ions H⁺ extracellulaires, les deux premières arginines du NoDS^{H+}VHL perdent leur groupe méthyle.

protéine de choc thermique constitutive 70 endogène (Hsc70) pour les raisons suivantes. Hsc70 contient un NoDS^{H+} composé d'un STAD (RRLRTAC) et de trois STHDs (deux LNV et LLL) (Figure 15A). Notre laboratoire a démontré que Hsc70 est séquestrée dans le nucléole suite à une diminution du pH extracellulaire (Mekhail *et al.*, 2007). De plus, Hsc70 se présente comme une bande singulière, forte et isolée à environ 70kDa lorsque les protéines de nucléoles purs isolés de cellules MCF-7 acidiqes sont séparées sur un gel de polyacrylamide contenant du SDS et colorées à l'argent (Mekhail *et al.*, 2007). À l'aide de cette technique, nous pourrions produire en grande quantité la protéine Hsc70 avec très peu de contamination par d'autres protéines pour l'analyser par MS. Malheureusement, nous ne pouvons pas employer cette technique pour isoler VHL et l'analyser par MS. VHL ne se présente pas comme une bande seule et isolée sur un gel coloré à l'argent dans la région des 30kDa puisqu'il y a trop de protéines présentes dans cette région du gel. VHL ne serait pas assez pur et il y aurait trop de contamination par d'autres protéines pour réaliser une analyse par MS.

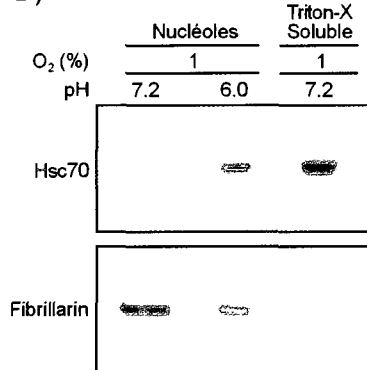
Nous avons isolé des nucléoles purs de cellules MCF-7 cultivées en hypoxie en conditions neutres et acidiqes en utilisant une technique établie par le groupe Lamond, qui combine la centrifugation par gradients de sucrose et la sonication (Andersen *et al.*, 2005). Nous avons aussi traité des cellules MCF-7 maintenues en conditions hypoxiques et neutres avec le détergent Triton-X 100 pour en isoler la fraction soluble. Nous avons détecté Hsc70 comme attendu dans les nucléoles isolés de cellules acidiqes et dans la fraction soluble isolée de cellules neutres, mais pas dans les nucléoles isolés de cellules neutres, par western (Figure 15B) et par coloration à l'argent des protéines (Figure 15C). Les deux bandes correspondant à Hsc70 en conditions neutres et acidiqes ont été

A)

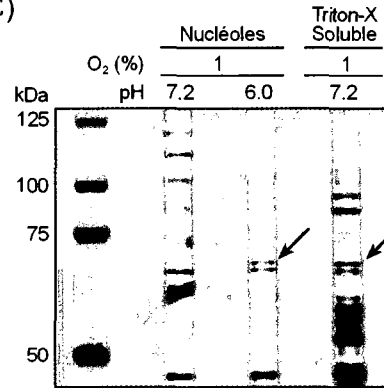
Séquence en acides aminés de Hsc70 :

140-NAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNVLRINEPTAAAIAYGLDKKVGAEARNVLI FDL
 200-GGGTFDVSILTI EDGI FEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFAEFKRKHKDI SENKRAV
 260-**RRRLRTACERAK**RRTLSSTQASIEIDSLYEIGIDFYTSITRARFEELNADLFRGILDPEKA
 320-LRDAKLDKSIHDI VL VGGSTRI PKI QKLLQDF FNGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAIL
 380-SGDKSENVQDLLLDVTPLSLGIETAGGVMVLIKRNTTIPTKQTFTTYSDNQPGVLI
 440-QVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPAPRGVPPQIEVTFDIDANGILNVS AVDKSTGKENK

B)

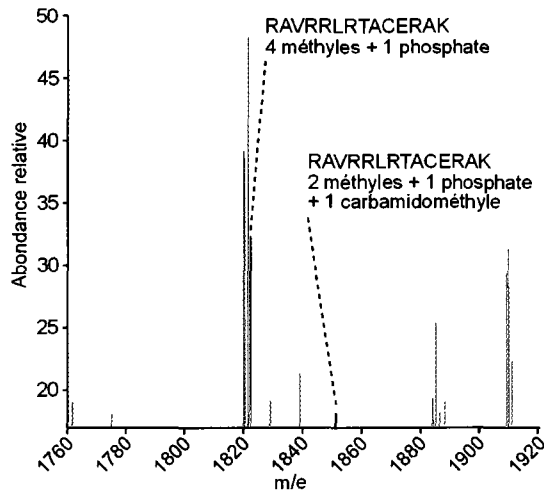


C)



D)

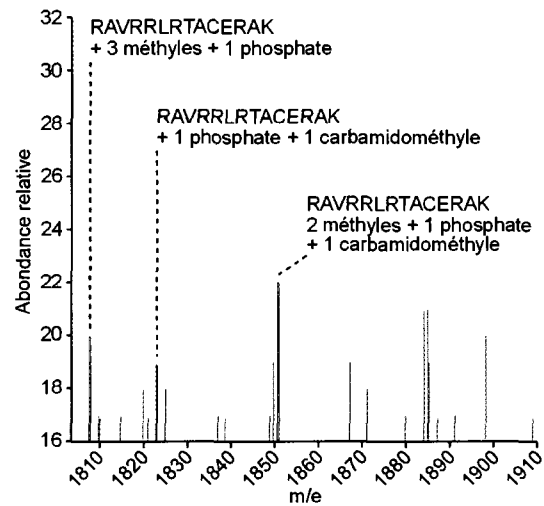
pH 7.2, 1% O₂



Modifications post-traductionnelles	m/e expérimentale	m/e théorique	Δ m/e
4 méthyles 1 phosphate	1822,0803	1822,0106	0,0697
2 méthyles 1 phosphate 1 carbamidométhyle	1850,9330	1851,0007	0,0677

E)

pH 6.0, 1% O₂



Modifications post-traductionnelles	m/e expérimentale	m/e théorique	Δ m/e
3 méthyles 1 phosphate	1807,9227	1807,9949	0,0722
1 phosphate 1 carbamidométhyle	1822,9665	1822,9694	0,0029
2 méthyles 1 phosphate 1 carbamidométhyle	1850,9413	1851,0007	0,0594

Figure 15: Le NoDS^{H+} de Hsc70 perd trois groupes méthyles lorsque les cellules sont transférées de conditions neutres à acidiqes.

(A) La séquence de la protéine de choc thermique constitutive 70 (Hsc70) entre les acides aminés 140 et 510 est présentée avec le STAD en rouge et les trois STHDs en mauve du NoDS^{H+} de Hsc70. (B et C) Des cellules MCF-7 ont été cultivés pendant 22 heures en hypoxie dans du milieu standard à pH 7.2 ou dans du milieu permettant l'acidose induite par l'hypoxie à pH 6.0. Des nucléoles purs ont été isolés de ces cellules à l'aide d'une technique combinant la centrifugation de gradients de sucrose et la sonication. Un ensemble de ces cellules a également été traité avec le détergent Triton-X 100 à 1% volume/volume pour en isoler par centrifugation la fraction soluble. Les nucléoles purs et la fraction soluble de Triton-X ont été lysés à une concentration finale de 5% SDS. (B) Les protéines ont été séparées sur un western et la membrane a été sondée avec les anticorps Hsc70 et fibrillarine, qui est une protéine nucléolaire. (C) Les protéines ont aussi été séparées sur un gel de polyacrylamide-SDS et colorées à l'argent. Les flèches montrent les bandes correspondant à la protéine endogène Hsc70 qui ont été extraites du gel pour être analysées par spectrométrie de masse. (D et E) La protéine Hsc70 a été digérée avec l'enzyme LysC et les peptides obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse par désorption-ionisation laser assistée par matrice - temps de vol (MALDI-TOF-MS). Les spectres de masse à pH 7.2 (D) ou à pH 6.0 (E) sont présentés dont les pics en rouge pourraient représenter le peptide RAVRRLTACERAK et les modifications post-traductionnelles indiquées. Les tableaux sous les spectres détaillent chacun des pics en rouge avec leurs valeurs m/e expérimentales et théoriques ainsi que la différence de ces deux valeurs m/e (Δ m/e).

extraites du gel coloré à l'argent pour être analysées par MS (Figure 15C). La protéine a été digérée avec l'enzyme protéolytique LysC pour générer un peptide contenant tous les résidus du STAD du NoDS^{H+} de Hsc70 (RAVRRLRTACERAK). Les peptides obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse de désorption-ionisation laser assistée par matrice - temps de vol (MALDI-TOF-MS). Les valeurs expérimentales des rapports masse/charge (m/e) des pics obtenues sur les spectres de masse ont été comparées aux valeurs théoriques m/e du peptide RAVRRLRTACERAK avec diverses modifications post-traductionnelles. Seuls les pics dont la différence entre les valeurs m/e expérimentales et théoriques est inférieure à 0,1 ont été retenus pour l'analyse.

En conditions neutres, deux pics sont présents sur le spectre à 1822,08 m/e et à 1850,9330 m/e. Le premier pic correspond possiblement au peptide RAVRRLRTACERAK avec les modifications post-traductionnelles 4 méthyles et 1 phosphate (Figure 15D). Le deuxième pic, à 1850,9330 m/e, est peut-être le même peptide RAVRRLRTACERAK mais avec les modifications 2 méthyles, 1 phosphate et 1 carbamidométhyle (Figure 15D). Ce peptide avec les mêmes modifications post-traductionnelles est également présent sur le spectre en conditions acidiqes à 1850,9413 (Figure 15E). Deux autres pics sont présents sur le spectre à pH 6.0 dont le premier, à 1807,9227 m/e, peut correspondre au peptide RAVRRLRTACERAK avec les modifications 3 méthyles et 1 phosphate. Le second, à 1822,967 m/e, est possiblement ce même peptide contenant 1 phosphate et 1 carbamidométhyle, mais aucun groupe méthyle (Figure 15E). Donc en conditions neutres, certains peptides RAVRRLRTACERAK contiennent 4 groupes méthyles alors que d'autres possèdent 2 groupes méthyles. En conditions acidiqes par contre, le peptide contient 0, 2 ou 3 groupes méthyles. Ces

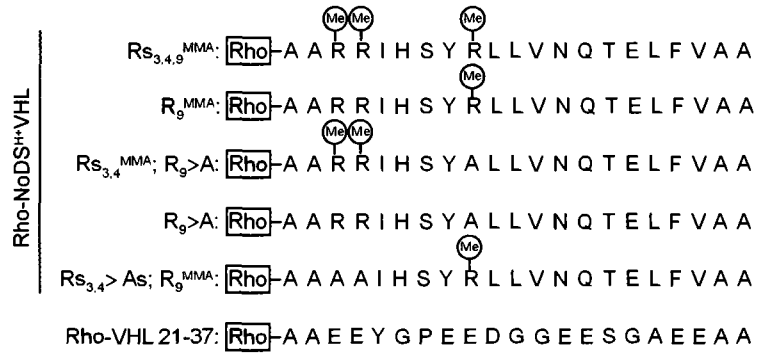
résultats semblent suggérer que certains groupes méthyles sont perdus sur le peptide RAVRRLRTACERAK en passant de conditions neutres à acidiqes. Si l'on considère que les autres modifications post-traductionnelles ne changent pas suite à l'accumulation d'ions H^+ extracellulaires, alors le peptide RAVRRLRTACERAK, pourvu du STAD du NoDS^{H+} de Hsc70 contenant 1 phosphate, perd 1 groupe méthyles, tandis que le peptide possédant 1 phosphate et 1 carbamidométhyle perd 2 méthyles. Par contre, la technique MALDI-TOF-MS est limitée et ne nous permet d'affirmer avec certitude que les pics observés correspondent au peptide RAVRRLRTACERAK avec les modifications post-traductionnelles suggérées. De plus, nous ne pouvons pas de déterminer auxquels des acides aminés les groupes méthyles appartiennent.

3.5 LA SÉQUESTRATION NUCLÉOLAIRE DU NoDS^{H+}VHL EST AFFECTÉE PAR L'ÉTAT DE MÉTHYLATION DE SES ARGININES.

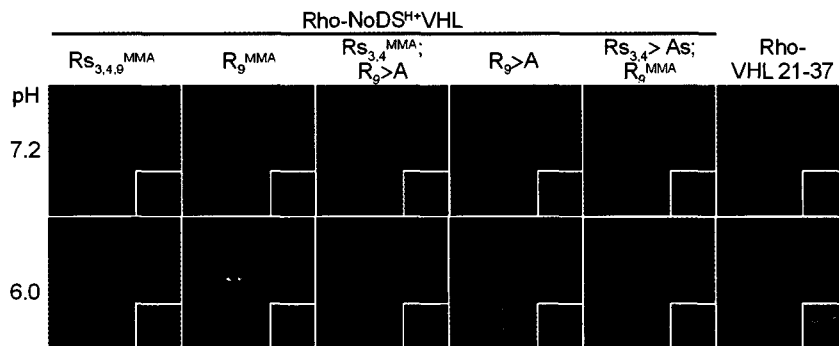
Comme prochaine étape, nous voulions examiner le rôle de la méthylation des arginines du STAD du NoDS^{H+}VHL dans la détention nucléolaire en acidose. Pour ce faire, nous avons utilisé des peptides synthétiques composés de la séquence en acides aminés du NoDS^{H+} reconstitué de VHL avec différent statut de méthylation des arginines et différentes mutations des arginines (Figure 16A). Pour les arginines méthylées, nous avons décidé de s'appuyer sur les résultats de MS et donc d'ajouter un groupe méthyle. Tous les peptides sont marqués avec la rhodamine (rho) à leur extrémité N-terminale.

Comme première expérience, nous avons micro-injecté les différents peptides à 4°C dans des cellules MCF-7 vivantes cultivées en hypoxie en conditions neutres ou acidiqes et la localisation *in vivo* des peptides a été suivie par microscopie de

A)



B)



C)

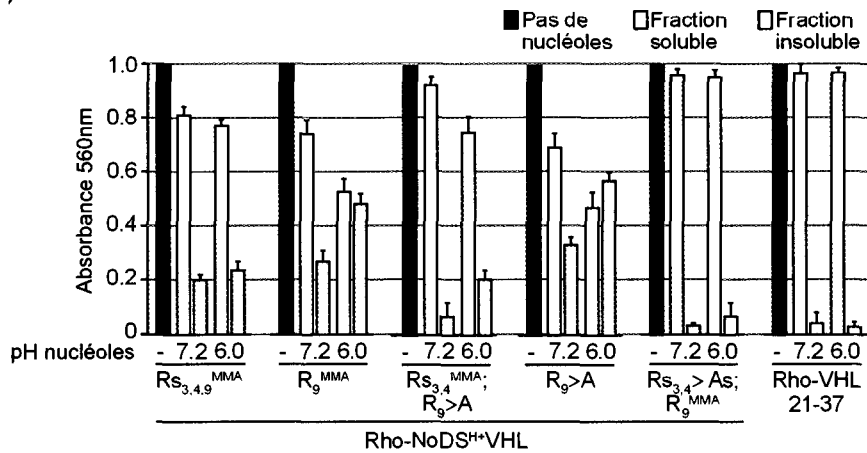


Figure 16: La séquestration nucléolaire du NoDS^{H+}VHL est augmentée avec des arginines non-méthylées.

(A) La séquence en acides aminés des peptides suivants est présentée: le NoDS^{H+}VHL avec des arginines monométhylées (NoDS^{H+}VHL R_{3,4,9}^{MMA}), avec les deux premières arginines non-méthylées et la troisième arginine monométhylée (NoDS^{H+}VHL R₉^{MMA}), avec les deux premières arginines monométhylées et la troisième arginine substituée pour une alanine (NoDS^{H+}VHL R_{3,4}^{MMA}; R₉>A), avec les deux premières arginines non-méthylées et la dernière arginine substituée pour une alanine (NoDS^{H+}VHL R₉>A) et avec les deux premières arginines substituées pour des alanines et la troisième arginine monométhylée (NoDS^{H+}VHL R_{3,4}>As; R₉^{MMA}). Le dernier peptide est composé d'une séquence aléatoire de VHL entre les acides aminés 21 et 37 (VHL 21-37) et sert de contrôle négatif. Tous les peptides sont fusionnés à la rhodamine (rho) à leur extrémité N-terminale. (B et C) Des cellules MCF-7 ont été cultivées en hypoxie pour 4 heures dans du milieu à pH 7.2 ou à pH 6.0. (B) Les divers peptides ont ensuite été micro-injectés dans le cytoplasme des cellules à 4°C. La localisation des peptides fusionnés à la rhodamine a été déterminée par microscopie à fluorescence et les encarts montrent l'ADN coloré au Hoechst. (C) Les cellules ont été traitées avec le détergent Triton-X 100 à 1% volume/volume pour en isoler par centrifugation les fractions insolubles. Ces fractions ont été resuspendues dans du tampon de lyse puis 1 µg des différents peptides a été ajouté à chacune des fractions. Le tout a été incubé à 4°C pendant 1 heure. La fraction insoluble a été séparée de la fraction soluble par centrifugation et les deux fractions ont été lysées à une concentration finale de 2% SDS. Les absorbances ont été mesurées à 560 nm et sont présentées graphiquement. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type de trois expériences indépendantes.

fluorescence (Figure 16B). Comme contrôle négatif, nous avons utilisé un peptide composé d'une séquence aléatoire de VHL entre les acides aminés 21 et 37 (Figure 16A). Ce peptide, Rho-VHL 21-37, présentait une localisation cytoplasmique et nucléaire dans les cellules maintenues en conditions neutres et acidiqes (Figure 16B). Tous les peptides NoDS^{H+}VHL présentait une localisation cytoplasmique et nucléaire en conditions neutres suggérant qu'ils ne peuvent pas être relocalisés dans le nucléole à pH 7.2. Le peptide NoDS^{H+}VHL avec les deux premières arginines substituées pour des alanines (NoDS^{H+}VHL R_{S3,4}>As; R₉^{MMA}) présentait également une localisation cytoplasmique et nucléaire en conditions acidiqes. Ceci appuie et confirme les résultats présentés à la figure 6B qui suggéraient que lorsque les arginines du STAD sont mutées pour des alanines, le NoDS^{H+}VHL n'est pas relocalisé dans le nucléole à pH 6.0 (Mekhail *et al.*, 2007). Les deux peptides NoDS^{H+}VHL avec les deux premières arginines monométhylées (NoDS^{H+}VHL R_{S3,4,9}^{MMA} et NoDS^{H+}VHL R_{S3,4}^{MMA}; R₉>A) présentait un signal principalement nucléaire avec une certaine accumulation nucléolaire en conditions acidiqes. Par contre, les deux peptides NoDS^{H+}VHL avec les deux premières arginines non-méthylées (NoDS^{H+}VHL R₉^{MMA} et NoDS^{H+}VHL R₉>A) démontraient une localisation fortement nucléolaire à pH 6.0. Ces résultats suggèrent que lorsque les arginines du STAD sont non-méthylées, le NoDS^{H+}VHL a une plus grande affinité pour le nucléole de cellules en conditions acidiqes que lorsque les arginines sont dans un état méthylé.

Pour vérifier les résultats observés par micro-injections, nous avons réalisé des expériences *in vitro* de capture des peptides NoDS^{H+}VHL par le nucléole. Nous avons premièrement isolé la fraction insoluble de Triton-X 100, contenant les composantes

cellulaires nucléolaires, de cellules MCF-7 cultivées en hypoxie en conditions neutres ou acidiqes. Cette fraction a été resuspendue dans du tampon de lyse avant d'y ajouter les différents peptides et le tout a été incubé à 4°C. La fraction insoluble a été isolée de la fraction soluble par centrifugation et l'absorbance des deux fractions a été mesurée à 560nm, qui correspond à la longueur d'onde de la rhodamine. Comme attendu, le contrôle négatif, le peptide Rho-VHL 21-37, et le peptide NoDS^{H+}VHL avec les deux premières arginines substituées pour des alanines (NoDS^{H+}VHL R_{3,4}>As; R₉^{MMA}) étaient très pauvrement capturés par le nucléole en conditions neutres et acidiqes avec des absorbances relatives inférieures à 0.1 (Figure 16C). Les deux peptides NoDS^{H+}VHL avec les deux premières arginines non-méthylées (NoDS^{H+}VHL R₉^{MMA} et NoDS^{H+}VHL R₉>A) étaient fortement capturés par les nucléoles à pH 6.0 (~ 0.5) et quelque peu capturés par les nucléoles à pH 7.2 (~0.3). Les deux peptides NoDS^{H+}VHL avec les deux premières arginines monométhylées (NoDS^{H+}VHL R_{3,4,9}^{MMA} et NoDS^{H+}VHL R_{3,4}^{MMA}; R₉>A) étaient légèrement capturés par les nucléoles en conditions neutres (0.1 à 0.2) et acidiqes (~0.2). Les expériences de micro-injections et de capture nucléolaire *in vitro* suggèrent que le NoDS^{H+}VHL avec des arginines nues au sein du STAD a une affinité accrue pour le nucléole en acidose contrairement au NoDS^{H+}VHL avec des arginines méthylées. Nous pouvons spéculer que la méthylation des arginines du STAD du NoDS^{H+}VHL permet de prévenir la relocalisation nucléolaire en conditions neutres, mais qu'après une acidification du milieu extracellulaire, la perte des groupes méthyles sur les arginines du NoDS^{H+}VHL induit la séquestration nucléolaire du NoDS^{H+}.

3.6 LA SUBSTITUTION DES ARGININES DU NoDS^{H+}VHL POUR DES RÉSIDUS CITRULLINES EMPÊCHE LA SÉQUESTRATION NUCLÉOLAIRE.

L'ensemble des résultats présentés dans les sections précédentes suggère que les deux premières arginines du NoDS^{H+} reconstitué de VHL perdent leur groupe méthyle lors de l'accumulation d'ions H⁺ extracellulaires afin d'augmenter l'affinité du NoDS^{H+} pour le nucléole. Jusqu'en 2002, la méthylation, contrairement à d'autres types de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation ou l'acétylation, était un processus que l'on croyait totalement irréversible et stable. En d'autres mots, la déméthylation ou le retrait de groupes méthyles sur des arginines méthylées serait une réaction impossible. La première réaction utilisant des arginines méthylées comme substrat a été identifiée en 2004 et elle se nomme la déméthylimination (Cuthbert *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Dans cette réaction enzymatique, les arginines monométhylées (mais pas les arginines diméthylées) sont converties en résidus citrullines (Figure 8). Les citrullines ont le même poids moléculaire que les arginines non-méthylées et donc la spectrométrie de masse ne permet pas de distinguer ces deux résidus. Il y a donc une possibilité que les arginines non-méthylées que nous avons observé sur le NoDS^{H+}VHL par LC/MS-MS à la figure 14 soient en fait des résidus citrullines.

Pour tester la possibilité que l'accumulation d'ions H⁺ extracellulaires active la déméthylimination des arginines monométhylées, nous avons testé l'affinité pour le nucléole d'un peptide NoDS^{H+}VHL où les deux premières arginines ont été substituées pour des citrullines (NoDS^{H+}VHL R_{S3,4}>Cits; R₉^{MMA}) (Figure 17A). Le peptide a été micro-injecté à 4°C dans des cellules MCF-7 vivantes cultivées en conditions hypoxiques et neutres ou hypoxiques et acides, comme à la figure 16. Le peptide constitué de

A)
 Rho-NoDS^{H+}VHL
 Rs_{3,4}> Cits; R₉^{MMA}: Rho-A A Cit Cit I H S Y Me R L L V N Q T E L F V A A

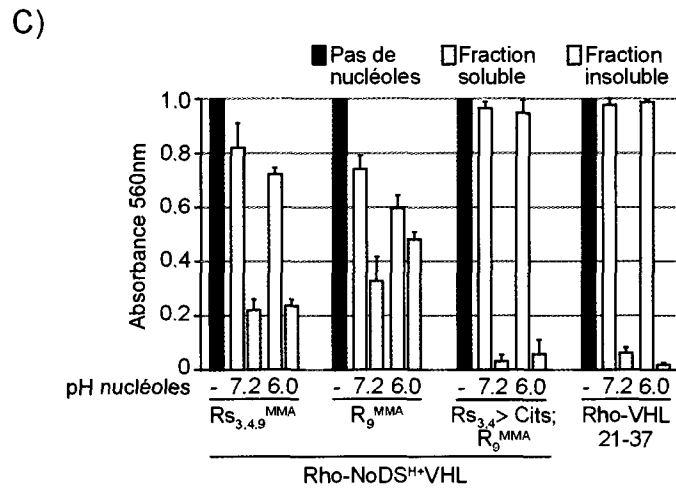
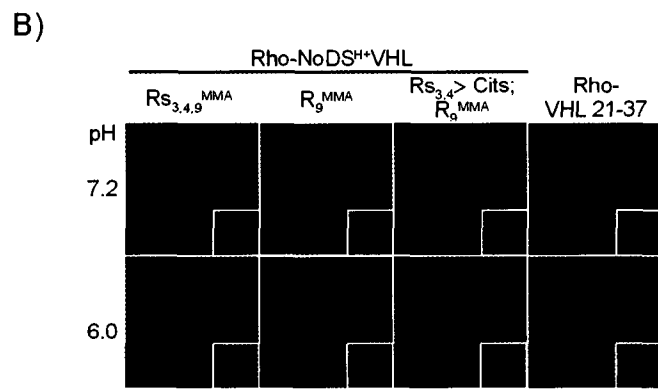


Figure 17: La séquestration nucléolaire du NoDS^{H+}VHL est empêchée lorsque les arginines sont substituées pour des citrullines.

(A) Le peptide R_{3,4}>Cits ; R₉^{MMA} est formé de la séquence en acides aminées du NoDS^{H+} de VHL avec les deux premières arginines substituées pour des citrullines (Cits) et la troisième arginine monométhylée (R^{MMA}). Ce peptide a été fusionné à la rhodamine (rho) à son extrémité N-terminale. (B et C) Des cellules MCF-7 ont été cultivées pendant 4 heures en hypoxie dans du milieu à pH 7.2 ou à pH 6.0. (B) Les différents peptides ont été micro-injectés dans le cytoplasme des cellules à 4°C. La localisation des peptides fusionnés à la rhodamine a été déterminée par microscopie à fluorescence et les encarts montrent l'ADN colorée au Hoechst. (C) Les cellules ont été traitées avec le détergent Triton-X 100 à 1% volume/volume pour en isoler les fractions insolubles par centrifugation qui ont ensuite été resuspendues dans du tampon de lyse. Les divers peptides (1µg) ont été ajoutés aux fractions insolubles resuspendues et le tout a incubé pendant 1 heure à 4°C. La fraction insoluble a été séparée de la fraction soluble par centrifugation et les deux fractions ont été lysées à une concentration finale de 2% SDS. Les absorbances ont été mesurées à 560 nm et sont présentées graphiquement. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type de trois expériences indépendantes.

citrullines présentait, comme le contrôle négatif Rho-VHL 21-37, une localisation cytoplasmique et nucléaire à pH 7.2 et 6.0, contrairement au peptide composé d'arginines nues (NoDS^{H+}VHL R₉^{MMA}) qui démontrait une localisation fortement nucléolaire à pH 6.0 (Figure 17B). Ces résultats suggèrent que le NoDS^{H+}VHL n'a pas d'affinité pour le nucléole lorsque les arginines sont remplacées pour des citrullines.

Nous avons ensuite réalisé des expériences de capture des peptides *in vitro* comme à la figure 16. Le peptide NoDS^{H+}VHL contenant des résidus citrullines et le peptide Rho-VHL 21-37 servant de contrôle négatif étaient très faiblement capturés par le nucléole à pH 7.2 et 6.0 (Figure 17C). L'absorbance relative de la fraction insoluble de ces deux peptides était inférieure à 0.1 dans les deux conditions, comparativement à la fraction insoluble à pH 6.0 du peptide NoDS^{H+}VHL avec des arginines nues qui avait un absorbance relative d'environ 0.45. Puisque la substitution des arginines non-méthylées pour des résidus citrullines ne permet pas de conserver l'affinité du NoDS^{H+}VHL pour le nucléole, nous pouvons croire que la séquestration nucléolaire, suite à une accumulation d'ions H⁺ extracellulaires, requiert des arginines nues et intactes aux deux premiers résidus du STAD du NoDS^{H+}VHL. Il est donc peu probable que les arginines monométhylées soient déméthylées en acidose. Nous pouvons donc envisagé la possibilité que les deux premières arginines méthylées du NoDS^{H+} VHL soient déméthylées lors de l'accumulation d'ions H⁺ extracellulaires pour produire des arginines nues afin d'induire la détention nucléolaire.

3.7 LES INHIBITEURS DE MÉTHYLATION EMPÊCHENT LA SORTIE NUCLÉOLAIRE DE VHL.

La séquestration nucléolaire des protéines contenant un NoDS^{H+} est un processus réversible. Suite au dégagement des ions H⁺ extracellulaires et au rétablissement du pH neutre, les protéines sont relâchées du nucléole et reprennent leur localisation cellulaire habituelle. Dans les prochaines sections, nous voulons investiguer le mécanisme de relâchement nucléolaire des protéines contenant un NoDS^{H+} suite à la neutralisation du milieu acide extracellulaire. Les résultats des sections précédentes suggèrent que les arginines du NoDS^{H+} de VHL sont méthylées en conditions neutres, mais que suite à une acidification du milieu extracellulaire, la déméthylation des arginines du code permet la séquestration nucléolaire. Nous croyons que suite au rétablissement du pH neutre dans le milieu extracellulaire, les arginines du NoDS^{H+} sont reméthylées pour permettre la sortie des protéines du nucléole. Nous allons tout d'abord examiner les effets d'inhiber la méthylation, à l'aide des inhibiteurs MTA et AdOx, suite à la neutralisation du milieu acide sur la sortie nucléolaire de VHL et sur le rétablissement de sa localisation nucléaire et cytoplasmique.

Des cellules MCF-7 exprimant de façon transitoire VHL-GFP ont été cultivées pendant trois heures en conditions hypoxiques et acides pour induire la relocation et la détention nucléolaire de la protéine. Les cellules ont ensuite été transférées dans des conditions normoxiques et neutres et traitées avec les inhibiteurs de méthylation généraux MTA ou AdOx pendant trois heures. Moins de 15% des cellules non-traitées ou traitées avec le contrôle DMSO présentaient une localisation nucléolaire de VHL-GFP, ce qui suggère que la majorité des protéines étaient relâchées et sorties du nucléole après le transfert des cellules de conditions acides à neutres pour trois heures (Figure 18). Par

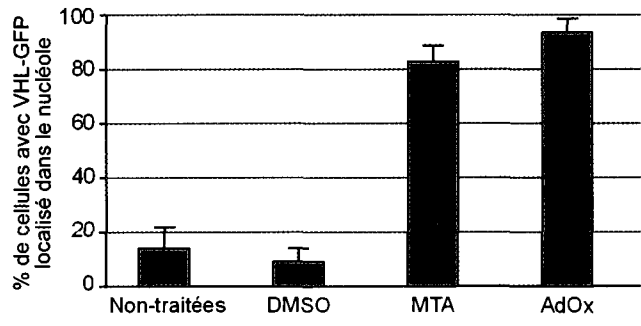
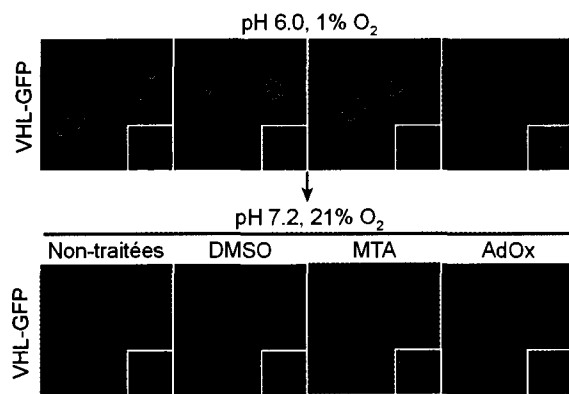


Figure 18: La sortie de VHL du nucléole après la neutralisation du milieu acide est empêchée par le traitement avec des inhibiteurs de méthylation.

Des cellules MCF-7 exprimant de façon transitoire VHL fusionné à GFP ont été cultivées pendant 3 heures en hypoxie dans du milieu à pH 6.0 pour induire la séquestration nucléolaire de VHL-GFP. Les cellules ont ensuite été cultivées en normoxie dans du milieu à pH 7.2 pendant 3 heures et laissées non-traitées ou traitées avec les inhibiteurs de méthylation MTA à 100mM ou AdOx à 10mM, ou avec le contrôle DMSO. La localisation de VHL-GFP a été déterminée par microscopie à fluorescence de GFP et les encarts montrent l'ADN coloré au Hoechst. Le pourcentage de cellules démontrant une localisation de VHL-GFP dans le nucléole après la neutralisation du milieu acide a été mesuré en fonction du traitement soumis et est représenté graphiquement. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type de trois expériences indépendantes.

contre, dans les cellules traitées avec les inhibiteurs de méthylation MTA et AdOx, VHL-GFP était localisé dans le nucléole de plus de 80% des cellules (Figure 18). Ces résultats suggèrent qu'en inhibant la méthylation après la neutralisation du milieu acidiqes extracellulaire, le relâchement et la sortie nucléolaire de VHL est empêché. Comme à la section 3.1, nous ne pouvons pas déduire quel type de méthylation est responsable du relâchement nucléolaire de VHL puisque les inhibiteurs de méthylation MTA et AdOx sont généraux.

3.8 LES ARGININES DU NoDS^{H+}VHL SONT REMÉTHYLÉES APRÈS LA NEUTRALISATION DU MILIEU ACIDIQUE.

Les résultats de la section précédente suggèrent que la méthylation est nécessaire pour la sortie de VHL du nucléole après la neutralisation du milieu acidiqes extracellulaire. Dans cette section, nous voulons déterminer précisément l'état de méthylation des arginines du STAD du NoDS^{H+}VHL après la neutralisation du milieu acidiqes extracellulaire. Comme en conditions neutres et acidiqes, présentées aux figures 12 et 14 respectivement, nous avons utilisé le système F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP (Figure 11) et la spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie en phase liquide (LC/MS-MS). Des cellules MCF-7 exprimant de manière stable la protéine F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP ont d'abord été maintenues pendant 4 heures en conditions hypoxiques et acidiqes. Les cellules ont ensuite été cultivées dans des conditions normoxiques et neutres et en présence de cycloheximide avant de réaliser l'immunoprécipitation de F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP. La bande correspondant à la protéine F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP colorée à l'argent sur une gel de polyacrylamide-SDS a été

extraite du gel (Figure 19B) et digérée avec les enzymes chymotrypsine et GluC. Les peptides ont ensuite été analysés par LC/MS-MS (Figure 19C). Les résultats suggèrent que les trois arginines du STAD du NoDS^{H+}VHL sont méthylées. La deuxième et la troisième arginines contiennent un groupe méthyle tandis que la première arginine contient deux groupes méthyles (Figure 19C et D). Ces résultats suggèrent que les deux premières arginines du STAD du NoDS^{H+}VHL sont reméthylées après le dégagement des ions H⁺ extracellulaires. À la lumière des résultats de MS (Figure 19) et de l'expérience avec les inhibiteurs de méthylation (Figure 18), après la neutralisation du milieu extracellulaire, il est possible que la reméthylation des arginines du NoDS^{H+}VHL permette le relâchement de la protéine du nucléole.

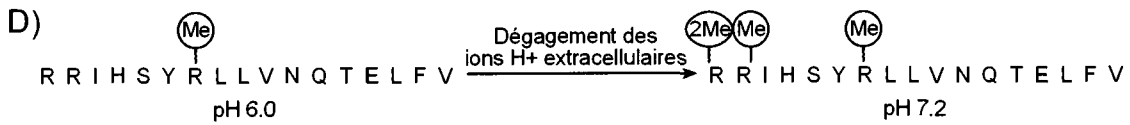
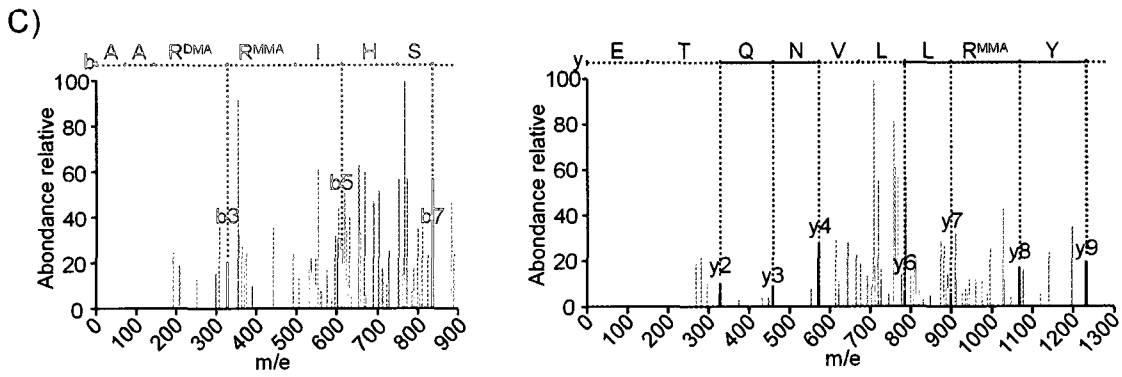
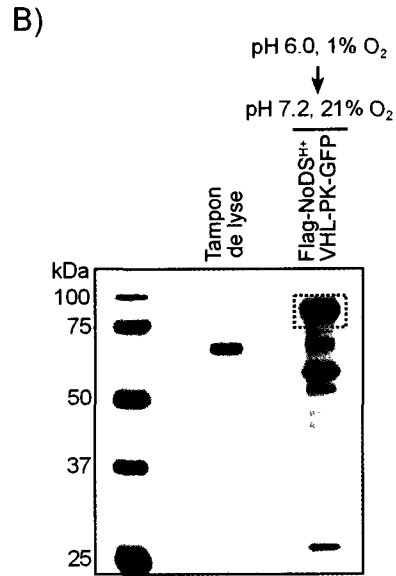
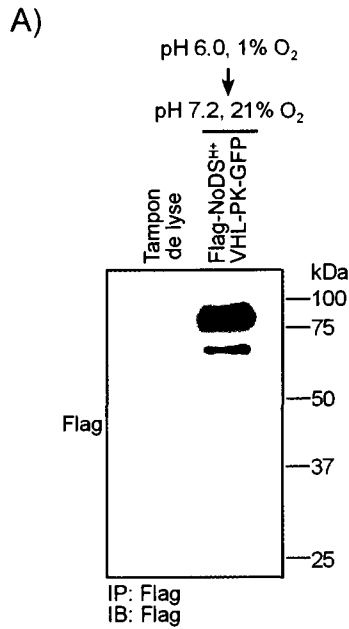


Figure 19: Les trois arginines du NoDS^{H+} de VHL sont méthylées après la neutralisation du milieu acide.

Des cellules MCF-7 exprimant de manière stable Flag-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP ont été cultivées en hypoxie pendant 4 heures dans du milieu à pH 6.0 et ont ensuite été cultivées pendant 2 heures en normoxie dans du milieu à pH 7.2 contenant de la cycloheximide à 100 µg/mL avant d'être récoltées et lysées. Les immunoprécipitations ont été faites avec des billes Flag. Le tampon de lyse avec les billes Flag sert de contrôle négatif. **(A)** Les produits des immunoprécipitations ont été migrés sur un western et la membrane a été sondée avec l'anticorps Flag. **(B)** Les protéines ont été séparées sur un gel de polyacrylamide-SDS et colorées à l'argent. La bande correspondant à F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP a été extraite du gel pour analyser la séquence du NoDS^{H+}VHL par spectrométrie de masse. **(C)** La protéine a été digérée avec les enzymes chymotrypsine et GluC. Les peptides obtenus ont été analysés par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS). **(C et D)** Les résultats de spectrométrie de masse suggèrent qu'après la neutralisation du milieu acide, la première arginine est diméthylée (DMA) et la deuxième et troisième arginines sont monométhylées. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de 2 peptides différents ainsi que par l'analyse de deux séries ioniques soient b et y. Ces résultats et ceux présentés à la Figure 7 suggèrent que les deux premières arginines, qui ne contiennent aucun groupe méthyle en conditions acides, sont reméthylées après un dégagement des ions H⁺ extracellulaires.

CHAPITRE 4: DISCUSSION

4.1 RÉSUMÉ DES DÉCOUVERTES MAJEURES

Dans cette étude, nous avons examiné l'état de méthylation des arginines du motif NoDS^{H+} en conditions neutres, acidiqes et après la neutralisation du milieu acidiqes ainsi que son rôle dans le processus de séquestration nucléolaire des protéines. Nous avons premièrement déterminé que la synthèse active de protéines n'était pas nécessaire à la relocalisation nucléolaire du NoDS^{H+} de VHL et de VHL suggérant que les protéines VHL et NoDS^{H+} de VHL présentes avant le début de l'acidose sont celles séquestrées dans le nucléole. Par la suite, nous avons remarqué que la vitesse de la séquestration nucléolaire de VHL et du NoDS^{H+}VHL était augmentée lorsque tous les processus de méthylation étaient inhibés. Ces deux résultats supportent la possibilité que le motif NoDS^{H+} soit modifié au niveau post-translationnel par la méthylation des arginines pour réguler la détention nucléolaire des protéines. Ensuite, nous avons déterminé par western avec des anticorps spécifiques aux arginines symétriquement diméthylées que des arginines de VHL et du fragment 100 à 130 de VHL étaient méthylées en conditions neutres. De plus, à l'aide d'analyses par LC-MS/MS, nous avons spécifiquement démontré qu'en conditions neutres, les trois arginines du motif NoDS^{H+} sont monométhylées. En conditions acidiqes, nous avons constaté par LC-MS/MS que les deux premières arginines du motif NoDS^{H+} étaient dans un état non-méthylé. De plus, dans ces conditions, VHL n'a pas été reconnu par des anticorps spécifiques aux arginines méthylées. Nous avons également observé par MALDI-TOF-MS une perte de groupes méthyles suivant l'acidification du milieu extracellulaire acidiqes sur un peptide contenant le STAD du NoDS^{H+} de la protéine Hsc70. Avec des peptides synthétiques du NoDS^{H+} de VHL, nous avons observé que le motif avec les deux premières arginines

non-méthylées avait une plus grande affinité pour des nucléoles acidiqes que le NoDS^{H+}VHL avec les arginines monométhylées ou des arginines substituées pour des résidus alanines ou citrullines. Tous ces résultats suggèrent qu'en conditions neutres, la méthylation des arginines du NoDS^{H+}VHL empêcherait la relocalisation nucléolaire mais qu'en conditions acidiqes, les deux premières arginines du motif perdraient leurs groupes méthyles pour permettre la détention dans le nucléole. Suite à la neutralisation du milieu acidiqes, nous avons observé que les arginines du NoDS^{H+}VHL étaient dans un état méthylé. Également, nous avons constaté que l'inhibition de la méthylation empêchait la sortie de VHL du nucléole suite à la neutralisation. Ces derniers résultats suggèrent que la reméthylation des arginines du NoDS^{H+}VHL permettrait le relâchement nucléolaire des protéines.

4.2 UNE FORME DE MÉTHYLATION RÉGULE LA SÉQUESTRATION NUCLÉOLAIRE

Le but initial de cette étude était d'investiguer la possibilité que la méthylation joue un rôle dans la détention nucléolaire des protéines suivant l'accumulation d'ions H⁺ extracellulaires. Pour ce faire, nous avons suivi la localisation cellulaire et la séquestration nucléolaire de VHL et du NoDS^{H+} reconstitué de VHL dans des cellules traitées avec un inhibiteur de la traduction et avec des inhibiteurs généraux de la méthylation. La relocalisation nucléolaire de VHL et du NoDS^{H+}VHL en acidose n'a pas été empêchée, retardée ou affectée de quelque façon en présence de cycloheximide, suggérant que les protéines présentes en conditions neutres sont celles séquestrées dans le nucléole suivant l'acidification extracellulaire. De plus, la synthèse de nouvelles protéines, que ce soient des protéines contenant un motif NoDS^{H+} ou tout autre forme de

protéines et d'enzymes, ne semble pas être nécessaire pour accomplir efficacement le processus de détention nucléolaire. Nous avons par la suite observé que le traitement avec deux différents inhibiteurs généraux de la méthylation, AdOx et MTA, a considérablement augmenté la vitesse de la séquestration nucléolaire de VHL et du NoDS^{H+} de VHL suivant l'acidose. Puisque l'inhibition de la méthylation n'a pas bloqué la relocalisation nucléolaire mais a plutôt accéléré ce processus, nous pouvons envisager la possibilité que le retrait de groupes méthyles, et non leurs ajouts, soit impliqué dans le processus de détention nucléolaire des protéines. Puisque les inhibiteurs de la méthylation sont généraux, la perte de groupes méthyles pourrait se faire au niveau de l'ADN, de l'ARN, des protéines contenant un NoDS^{H+} ou d'autres protéines au niveau des arginines ou des lysines.

Les résultats précédents suggèrent que des groupes méthyles sont retirés suivant l'acidification extracellulaire. Mais pour pouvoir retirer ces groupes méthyles, ils doivent forcément être ajoutés à un certain moment avant l'épisode d'acidose, donc possiblement en conditions neutres. Par contre, lorsque nous avons traité des cellules à pH neutre avec l'inhibiteur de méthylation MTA, nous n'avons observé aucune accumulation du NoDS^{H+}VHL dans le nucléole. Il se peut qu'en acidose, les changements ne soient pas seulement au niveau de la méthylation, mais également au niveau du nucléole le rendant ainsi compétent pour accueillir les protéines contenant un motif NoDS^{H+}. Alternativement, il est possible que les groupes méthyles présents en conditions neutres soient très stables et aient un faible taux de turnover. Ainsi, dans les cellules traitées à pH neutre avec l'inhibiteur de méthylation, les groupes méthyles seraient restés en place. Conséquemment, sans le retrait des groupes méthyles, la relocalisation de VHL et du

NoDS^{H+}VHL vers le nucléole n'aura pas été déclenchée et la localisation cellulaire de ces protéines resterait inchangée.

Pour déterminer si la relocalisation nucléolaire est possible en conditions neutres et si la méthylation au niveau du motif NoDS^{H+} est impliquée dans le processus de détention nucléolaire, nous avons créé le système suivant: le NoDS^{H+} de VHL a été fusionné au domaine ODDD de HIF- α pour contrôler l'accumulation et l'état de méthylation du motif. En inhibant la méthylation, nous avons observé une relocalisation du NoDS^{H+}VHL fusionné à l'ODDD du cytoplasme vers le nucléole. Ces résultats suggèrent premièrement que des protéines NoDS^{H+}VHL-ODDD conservées dans un état non méthylé ont la capacité d'être relocalisées dans le nucléole de cellules exposées à un pH neutre. De plus, puisque la localisation cellulaire de la protéine NoDS^{H+}-ODDD diffère en présence et en absence de l'inhibiteur de méthylation, nous croyons que l'ajout de groupes méthyles sur le NoDS^{H+}VHL-ODDD en conditions neutres permet d'assurer une localisation cellulaire cytoplasmique et d'empêcher la relocalisation nucléolaire. Également, nous pensons que les groupes méthyles ajoutés en conditions neutres sont très stables et restent sur la protéine pour une longue période, puisque l'accumulation nucléolaire du NoDS^{H+}VHL en conditions neutres et en présence d'inhibiteur de méthylation a été possible seulement à l'aide du système ODDD.

À la lumière de ces résultats, nous croyons que l'ajout de groupes méthyles en conditions neutres et leurs retraits en conditions acides, pour induire la détention nucléolaire, se fait au niveau du motif NoDS^{H+}, possiblement sur les résidus arginines. Par contre, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que d'autres procédés de méthylation jouent un rôle dans ce processus. La méthylation et le retrait des groupes

méthyles pourraient se faire aussi au niveau de l'ADN, de l'ARN, ou encore sur les résidus lysines et arginines de protéines ne contenant pas un motif NoDS^{H+}, d'enzymes ou même d'histones.

4.3 DES GROUPES MÉTHYLES SONT RETIRÉS DES ARGININES DE VHL ET DU NoDS^{H+}VHL SUITE À L'ACIDIFICATION EXTRACELLULAIRE

Notre prochain objectif était d'analyser l'état de méthylation des arginines de VHL et du NoDS^{H+} de VHL, en conditions neutres et acides, à l'aide d'anticorps spécifiques aux arginines méthylées et d'analyses par spectrométrie de masse. Nous avons premièrement observé qu'un anticorps spécifique aux arginines symétriquement diméthylées appelé SYM11 a reconnu la protéine VHL et le fragment endogène de VHL des résidus 100 à 130 immunoprécipités de cellules exposées à un pH neutre. Avec le fragment 100 à 130, nous avons pu restreindre le nombre d'arginines possiblement symétriquement diméthylées sur VHL à quatre arginines, dont trois composent le STAD du NoDS^{H+} de VHL. Ce même anticorps n'a pas reconnu la protéine VHL isolée de cellules acides, suggérant qu'aucune arginine n'est diméthylée de manière symétrique. Ces résultats suggèrent que des groupes méthyles sont perdus sur des arginines de VHL suite à l'accumulation d'ions H⁺ extracellulaires. À l'aide d'analyses par MS, nous pourrions préciser ces résultats et déterminer exactement si des arginines du NoDS^{H+} de VHL sont méthylées en conditions neutre et lesquelles. De plus, en comparant les analyses de MS à pH neutre et acide, nous pourrions déterminer si des groupes méthyles sont perdus sur une ou des arginines du NoDS^{H+} de VHL suivant l'acidification extracellulaire.

Pour analyser le NoDS^{H+}VHL par MS, nous avons du faire appel à un système nous permettant d'isoler en grande quantité le motif en conditions acides, puisque VHL et le NoDS^{H+}VHL séquestrées dans le nucléole ne peuvent pas être immunoprécipitées. Le NoDS^{H+}VHL a été séquestré dans le cytoplasme en le fusionnant à la protéine purement cytoplasmique, pyruvate kinase (PK). Ainsi, le motif se situe à l'extérieur du noyau et ne peut pas entrer en contact avec le nucléole pour la séquestration en conditions acides. Nous avons démontré, par une expérience *in vitro* à 4°C, que le NoDS^{H+}VHL fusionné à PK a la capacité d'être détenu dans le nucléole lorsque la membrane nucléaire de cellules acides est rompue ou lorsqu'un signal de localisation nucléaire (NLS) est ajouté. Ces expériences suggèrent que la protéine PK n'affecte pas la fonction du motif dans la séquestration nucléolaire. De plus, ces résultats suggèrent que le NoDS^{H+}VHL peut être activé pour la détention nucléolaire, soit dans le noyau ou dans le cytoplasme, sans être en contact avec le nucléole.

À l'aide du système nous permettant d'isoler le NoDS^{H+}VHL en grandes quantités, nous avons analysé chacun des résidus du motif par LC/MS-MS, suite à un traitement avec un inhibiteur de la synthèse des protéines. Les résultats de LC/MS-MS, en conditions neutres, suggèrent que les trois arginines du STAD du NoDS^{H+}VHL sont dans un état monométhylé. En conditions acides, la dernière arginine contient un groupe méthyle, alors que les deux premières arginines sont non-méthylées. Ces résultats suggèrent que des groupes méthyles sont présents sur chacune des deux premières arginines du motif NoDS^{H+}VHL, en conditions neutres, mais qu'ils sont retirés suite à l'acidification du milieu extracellulaire. Puisqu'avant l'analyse par LC/MS-MS, le motif NoDS^{H+}VHL a été immunoprécipité suite à un traitement avec la cycloheximide, ce sont

les protéines présentes avant le début de l'acidose qui perdent des groupes méthyles et non des protéines nouvellement synthétisées dépourvues de groupes méthyles. Les résultats avec les anticorps spécifiques aux arginines symétriquement diméthylées et les analyses de MS sont consistants avec les résultats des inhibiteurs de méthylation et ensemble suggèrent que des groupes méthyles sont retirés suivant l'accumulation d'ions H^+ extracellulaires.

4.4 DIFFÉRENCES ENTRE LES RÉSULTATS AVEC L'ANTICORPS SYM11 ET LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Les résultats obtenus avec l'anticorps SYM11 et la spectrométrie de masse suggèrent tout deux que des arginines de la protéine VHL et du fragment 100 à 130 de VHL, contenant le motif NoDS^{H+}, sont dans un état méthylé en conditions neutres. De plus, ces résultats sont consistants en suggérant que des arginines de la protéine VHL perdent des groupes méthyles suivant l'acidification du milieu extracellulaire. Par contre, les résultats de LC/MS-MS, suggérant que les arginines du motif NoDS^{H+} de VHL contiennent un groupe méthyle, diffèrent des résultats générés par l'anticorps SYM11, qui prévoient que des arginines du fragment 100 à 130 de VHL sont symétriquement diméthylées à pH 7.2. Plusieurs raisons peuvent expliquer les différences observées avec ces deux méthodes.

Premièrement, l'anticorps SYM11 est spécifique aux arginines symétriquement diméthylées et ne détecte pas les arginines asymétriquement diméthylées, mais sa spécificité n'a jamais été testée contre les arginines monométhylée. Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité que l'anticorps SYM11 détecte, en plus des arginines

symétriquement diméthylées, les arginines contenant un seul groupe méthyle dans la protéine VHL et le fragment 100 à 130 de VHL à pH neutre, ce qui concorderait avec les résultats de spectrométrie de masse des arginines du motif NoDS^{H+}VHL.

Deuxièmement, même si la plupart des résultats de MS suggèrent que les arginines du NoDS^{H+} de VHL sont monométhylées à pH neutre, nous avons tout de même obtenu un spectre où la première arginine contenait deux groupes méthyles à pH 7.2, plus précisément suite à la neutralisation du milieu acide. (Figure 19). Pour obtenir une arginine diméthylée, une arginine non-méthylée doit d'abord recevoir un premier groupe méthyle avant de pouvoir accepter un deuxième groupe méthyle. La monométhylation d'arginines est souvent considérée comme un état transitoire. Dans la plupart des protéines, les arginines passent par un état transitoire de monométhylation, mais sont rapidement diméthylées, soient de manière symétrique ou asymétrique. Dans notre cas, il se peut que la monométhylation ne soit pas qu'un état transitoire et que la majorité des arginines du NoDS^{H+}VHL soient monométhylées en conditions neutres. Une minorité d'arginine monométhylée pourraient accepter un deuxième groupe méthyle pour devenir symétriquement diméthylée, ce qui expliquerait pourquoi, en conditions neutres, nous détectons VHL et le fragment 100 à 130 de VHL avec l'anticorps SYM11 et que nous avons observé qu'une seule fois une arginine du NoDS^{H+}VHL possédant deux groupes méthyles par LC/MS-MS. Alternativement, il se peut que le nombre d'arginines dans le motif NoDS^{H+} contenant un groupe méthyle soit équivalent ou même inférieure au nombre d'arginine diméthylées. Il est possible que les peptides que nous avons analysés par LC/MS-MS contenaient des arginines majoritairement monométhylées que par pur hasard. Également, il se peut que les enzymes peptidiques aient moins d'accès sur une

protéine contenant plusieurs arginines diméthylées, résultant en des digestions partielles et incomplètes et des peptides trop gros pour être analysés par LC/MS-MS. Mais encore, les peptides contenant plusieurs arginines diméthylées pourraient être plus difficiles à purifier par chromatographie en phase liquide ou à analyser par LC/MS-MS, soit au niveau de l'ionisation des peptides, de la transmission, de la sélection et de la fragmentation des ions peptidiques ou de la résolution des fragments peptidiques. Pour répondre à ces questions, il faudrait réaliser de nombreuses analyses par LC/MS-MS du NoDS^{H+}VHL, ou encore tester l'efficacité de l'analyse par LC/MS-MS de peptides synthétiques formés de la séquence en acides aminés du NoDS^{H+}VHL avec différentes combinaisons d'arginines non-méthylées, monométhylées et diméthylées.

4.5 UNE SECONDE PROTÉINE POURVUE D'UN MOTIF NoDS^{H+} DÉMONTRE UNE PERTE DE GROUPE MÉTHYLE EN ACIDOSE.

Comme prochaine étape, nous avons analysé le motif NoDS^{H+} de la protéine endogène Hsc70, en conditions neutres et acides, par MALDI-TOF-MS. Hsc70 a été digérée avec l'enzyme LysC pour produire le peptide RAVRRLRTACERAK contenant le STAD du NoDS^{H+}, puis les valeurs expérimentales des pics obtenues sur les spectres de masse ont été comparées aux valeurs théoriques de ce peptide avec diverses modifications post-traductionnelles. Si l'on considère que les autres modifications post-traductionnelles, phosphate et carbamidométhyle, ne changent pas, alors de 1 à 2 groupes méthyles seraient perdus sur le peptide RAVRRLRTACERAK suite à l'accumulation d'ions H⁺ extracellulaires. Ces résultats sont consistants avec les résultats observés avec les anticorps spécifiques aux arginines méthylées et par LC/MS-MS du motif

NoDS^{H+}VHL et suggèrent que des groupes méthyles seraient retirés suivant l'acidose. Par contre, avec la méthode MALDI-TOF-MS, nous ne pouvons pas déterminer lesquels des acides aminés du peptide RAVRRLRTACERAK possèdent des groupes méthyles en conditions neutres et acidiqes. Par conséquent, nous ne pouvons pas préciser quels résidus perdent un groupe méthyle, comme le suggère les résultats, suivant l'accumulation d'ions H⁺ extracellulaires. Pour répondre à ces questions, il faudrait réaliser une analyse LC/MS-MS sur les peptides suite à la spectrométrie de masse MALDI-TOF. La technique LC/MS-MS permettrait de déterminer précisément la séquence en acides aminés du peptide analysé ainsi que la présence de modifications post-traductionnelles sur chacun des résidus. Par contre, il est difficile de réaliser l'analyse LC/MS-MS suite à la MALDI-TOF-MS, puisque cette technique requiert beaucoup de produits d'une grande pureté. La protéine Hsc70 que nous isolons de nucléoles provenant de cellules acidiqes n'est pas aussi pure que suite à une immunoprécipitation. Hsc70 apparaît comme une bande singulière et forte sur un gel coloré à l'argent, mais ce n'est pas la seule protéine à migrer vers 70kDa. Des dizaines d'autres protéines peuvent se retrouver dans cette bande dans des quantités variables. Ces protéines diminuent la pureté de notre échantillon et peuvent grandement affecter l'analyse par MS. La protéine Hsc70 pourrait être immunoprécipitée de cellules exposées à des conditions neutres et serait assez pure et abondante pour réaliser une analyse LC/MS-MS, suivant la MALDI-TOF, sur les peptides générés et ainsi déterminer leurs séquence en acides aminés et si des groupes méthyles sont présents sur certains résidus. Par contre, puisque nous ne pouvons pas réaliser une immunoprécipitation des protéines séquestrées dans le nucléole à pH 6.0, il sera très difficile, voir même impossible, de

réaliser une analyse LC/MS-MS de la protéine Hsc70 impure provenant de nucléole acidiques. Malheureusement, nous ne pourrions donc pas déterminer la position des groupes méthyles sur la protéine et quels résidus perdent un groupe méthyle suivant l'acidose. L'expérience que nous avons réalisée nous a tout de même indiqué qu'il y a une perte de groupes méthyles possiblement sur le motif NoDS^{H+} d'une protéine endogène, Hsc70, extraite du nucléole de cellules acidiques. De plus, ces résultats viennent appuyer les analyses de MS réalisées sur le motif NoDS^{H+}VHL de la protéine exogène F-NoDS^{H+}VHL-PK-GFP.

4.6 L'AFFINITÉ DU MOTIF NoDS^{H+}VHL POUR LE NUCLÉOLE EST AUGMENTÉE PAR DES ARGININES NON-MÉTHYLÉES

Le troisième objectif de cette étude était de déterminer si un lien existe entre l'état de méthylation des arginines du NoDS^{H+}VHL et l'affinité du motif pour le nucléole. À l'aide de peptides synthétiques composés du NoDS^{H+}VHL, nous avons démontré que l'affinité du motif pour le nucléole était plus grande lorsque les deux premières arginines du STAD sont dans un état non méthylé (AARRIHSYR^{MMA}LLVNQTELFV ou AARRIHSYALLVNQTELFV) que lorsque les arginines sont monométhylées (AAR^{MMA}R^{MMA}IHSYR^{MMA}LLVNQTELFV ou AAR^{MMA}R^{MMA}IHSYALLVNQTELFV). Ces résultats sont consistants avec les résultats observés avec les inhibiteurs de méthylation qui suggéraient que le retrait de groupes méthyles avait un rôle dans la séquestration nucléolaire de VHL et du NoDS^{H+}VHL en acidose. Également, ces résultats appuient les résultats obtenus avec la protéine NoDS^{H+}VHL-ODDD qui suggéraient que l'état de méthylation, possiblement de la protéine, contrôlait sa fonction

dans la détention nucléolaire. Ensemble avec les résultats de spectrométrie de masse et des anticorps spécifiques aux arginines méthylées, ces résultats précisent que la perte de groupes méthyles, suivant l'acidification extracellulaire, se fait sur les arginines du motif NoDS^{H+}VHL dans le but d'augmenter l'affinité du motif pour le nucléole.

Le peptide dont les deux premières arginines ont été substituées pour des alanines (AAAIHSYR^{MMA}LLVNQTELFV) ne présentait, quant à lui, aucune affinité envers le nucléole. Ces résultats sont consistants avec les résultats publiés par notre laboratoire et suggèrent que les arginines présentes dans le NoDS^{H+}VHL ne peuvent être substituées pour des alanine et semblent être importantes pour la fonction du motif dans la détention nucléolaire (Mekhail *et al.*, 2007). L'analyse mutationnelle réalisée par notre laboratoire suggère également que les arginines ne peuvent pas être substituées pour des acides aminés de même charge, soient les lysines (Mekhail *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que les arginines pourraient posséder un rôle indépendant de leur charge positive dans la séquestration nucléolaire du NoDS^{H+}VHL. Nous voulions réaliser les expériences de microinjection *in vivo* et de capture des peptides *in vitro* avec un peptide composé du NoDS^{H+}VHL avec les deux premières arginines substituées pour des lysines (AAKKIHSYR^{MMA}LLVNQTELFV). Contrairement à tous les autres peptides, nous avons été incapables de dissoudre le peptide contenant des lysines, initialement solide, sous une forme liquide. Les résultats de l'analyse mutationnelle du motif NoDS^{H+}, publiés par notre laboratoire, et les résultats obtenus avec les peptides, composés du NoDS^{H+}VHL avec les deux premières arginines du STAD dans un état non méthylé, monométhylées ou substituées pour des alanines, suggèrent que les arginines sont

absolument cruciales pour la fonction du motif dans la séquestration nucléolaire et ne peuvent en aucun cas être modifiées ou substituées pour quelconque acide aminé.

Les peptides NoDS^{H+}VHL ont démontré une affinité plus élevée envers les nucléoles provenant de cellules exposées à des conditions acides que les nucléoles de cellules neutres. Ces résultats suggèrent que les nucléoles de cellules acides sont différents des nucléoles de cellules neutres dans leur capacité à capturer les protéines contenant un motif NoDS^{H+}. Il est donc possible que l'acidification produise des modifications au niveau du nucléole pour qu'ils puissent recevoir les protéines NoDS^{H+}. Ces modifications pourraient se faire au niveau de la structure, de la composition en ADN, en ARN ou en protéines, des modifications post-traductionnelles des protéines, des modifications post-transcriptionnelles de l'ARN ou des modifications de l'ADN du nucléole. À la lumière de ces résultats, notre laboratoire investigate actuellement les différences dans la composition en protéines, en ADN et en ARN des nucléoles ainsi que dans les modifications des composantes nucléolaires en conditions neutres et acides. De plus, l'endroit exact où les protéines pourvues d'un motif NoDS^{H+} sont détenues dans le nucléole en acidose est étudié. En déterminant le rôle du nucléole, en plus du rôle du motif NoDS^{H+} et de la méthylation des arginines, plus de détails sur le mécanisme de la séquestration nucléolaire des protéines en acidose seront découverts.

4.7 LA DÉMÉTHYLATION DES ARGININES DU NODS^{H+}VHL INDUIT LA DÉTENTION NUCLEOLAIRE EN ACIDOSE

L'ensemble des résultats suggèrent que le retrait des groupes méthyles des arginines en acidose permettrait la séquestration nucléolaire des protéines contenant un

motif NoDS^{H+}. Le retrait de groupes méthyles sur des arginines pourrait se faire par une réaction de déméthylation ou de déméthylimination (Wang *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2007). La déméthylation convertit les arginines diméthylées et monométhylées en arginines nues tandis que la déméthylimination convertit les arginines non méthylées ou monométhylées, mais pas diméthylées, en résidus citrullines (Cuthbert *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2007). Les résultats obtenus avec les peptides, dont les deux premières arginines du STAD sont dans un état non méthylé ou monométhylé, suggèrent que nous avons possiblement une réaction de déméthylation des arginines, suivant l'acidose, pour induire la détention nucléolaire. Par contre, nous devons considérer la possibilité qu'une réaction de déméthylimination des arginines monométhylées, les convertissant en citrullines, survienne suite à l'accumulation d'ions H⁺ extracellulaires. Le peptide NoDS^{H+}VHL avec les deux premières arginines substituées pour des citrullines (AACitCitIHSYR^{MMA}LLVNQTELFV) n'a présenté aucune affinité envers le nucléole, contrairement au peptide contenant des arginines nues. D'après ces résultats, nous croyons qu'en acidose, seule une réaction de déméthylation des arginines méthylées et la production concomitante d'arginines nues est capable d'induire la détention nucléolaire des protéines contenant un motif NoDS^{H+}.

4.8 LES ARGININES DU MOTIF NODS^{H+}VHL SONT REMÉTHYLÉES SUITE AU DÉGAGEMENT DES IONS H⁺ EXTRACELLULAIRES.

Le dernier but de cette étude était de déterminer l'état de méthylation des arginines du motif NoDS^{H+} après la neutralisation du milieu extracellulaire acide et si la méthylation joue un rôle dans le relâchement nucléolaire des protéines. Nous avons

premièrement observé que le traitement avec les inhibiteurs de méthylation MTA et AdOx bloquait la sortie de la protéine VHL du nucléole suite au rétablissement du pH neutre, suggérant qu'une certaine forme de méthylation est impliquée dans le mécanisme de relâchement nucléolaire de VHL. Nous avons par la suite déterminé par LC/MS-MS que toutes les arginines du motif NoDS^{H+} de VHL étaient dans un état méthylé suite à la neutralisation du milieu acide. Ces résultats suggèrent que des groupes méthyles seraient ajoutés aux deux premières arginines du motif en passant de conditions acides à neutres. L'analyse LC/MS-MS a été réalisée sur le motif NoDS^{H+}VHL immunoprécipité de cellules soumises à un traitement avec de la cycloheximide suite à la neutralisation du pH acide. Ceci suggère que ce ne sont pas des protéines nouvellement traduites qui sont méthylées au niveau des arginines du code, mais bien les protéines provenant du nucléole qui sont reméthylées. Il est possible que la reméthylation des résidus arginines du NoDS^{H+} suite à la neutralisation active la sortie des protéines du nucléole. Alternativement, il se peut que les arginines soient reméthylées à l'extérieur du nucléole, suite à leur relâchement, et qu'une autre forme de méthylation soit impliquée dans l'induction de la sortie nucléolaire des protéines.

Les résultats de spectrométrie de masse démontrant que les arginines du STAD sont reméthylées suite au rétablissement du pH neutre suggèrent, conjointement avec l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude, que les arginines au niveau du NoDS^{H+}VHL subissent une réaction de déméthylation suite à l'accumulation d'ions H⁺ extracellulaires. La déméthylation catalyse le retrait des groupes méthyles des arginines méthylées pour produire des arginines nues et celles-ci ont la capacité de recevoir à nouveau des groupes méthyles. La déméthylimination retire également les groupes

méthyles, mais contrairement à la déméthylation, transforme les arginines monométhylées en résidus citrullines. Aucune réaction enzymatique à date n'a été identifiée capable de convertir les citrullines en arginines nues ou en arginines monométhylées, donc la déméthylimination bloque les réactions de méthylation ou de reméthylation éventuelles. Puisque des groupes méthyles semblent être ajoutés suite à la neutralisation du milieu acide pour produire des arginines méthylées, ces résidus devaient être avant la réaction de reméthylation, donc en conditions acides, des arginines nues et non des résidus citrullines.

4.9 MODÈLE DE RÉGULATION DE LA SÉQUESTRATION NUCLÉOLAIRE PAR LA MÉTHYLATION ET DÉMÉTHYLATION DES ARGININES DU MOTIF NoDS^{H+}.

D'après l'ensemble des résultats que nous avons obtenus dans cette étude, nous présentons un modèle du cycle de méthylation et déméthylation des arginines en fonction de la concentration en ions H⁺ extracellulaires. Ce modèle est présenté à la figure 20. Suite à la synthèse des protéines contenant un motif NoDS^{H+} en conditions neutres, les trois arginines du STAD sont méthylées. L'addition de groupes méthyles au niveau des arginines du NoDS^{H+} inactive le motif dans sa fonction de séquestration nucléolaire. De plus, la méthylation diminue l'affinité du motif pour le nucléole et par le fait même assure la localisation et la mobilité de la protéine dans la cellule. Suite à une accumulation d'ions H⁺ extracellulaires, la déméthylation des deux premières arginines du STAD est déclenchée. Le retrait des groupes méthyles du NoDS^{H+}, pour produire des arginines nues, augmente l'affinité du motif pour le nucléole et active le motif pour induire la séquestration nucléolaire des protéines. Lors de la neutralisation du milieu extracellulaire

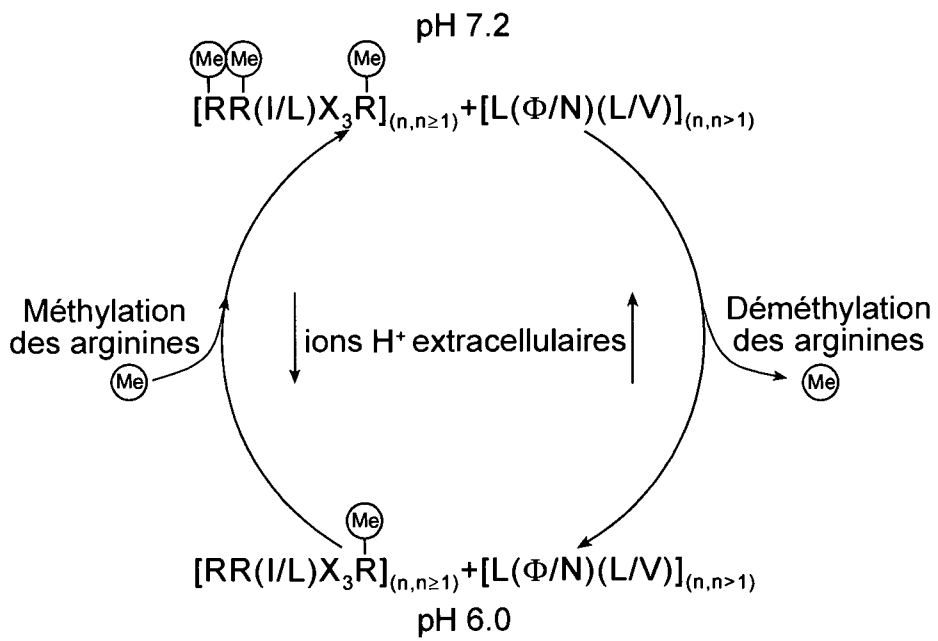


Figure 20: Modèle du cycle de méthylation et déméthylation des arginines du motif NoDS^{H+} en fonction de la concentration en ions H⁺ extracellulaires.

À pH neutre, le NoDS^{H+} serait méthylée au niveau des arginines pour inactiver le motif et assurer la localisation et la mobilité de la protéine dans la cellule. Lors d'une accumulation d'ions H⁺ dans le milieu extracellulaire, la déméthylation du NoDS^{H+} pour produire des arginines nues permettrait d'activer le motif et de déclencher la détention nucléolaire des protéines. Suite au dégagement des ions H⁺ extracellulaires, les arginines du NoDS^{H+} seraient reméthylées et les protéines sont relâchées du nucléole et reprennent leur localisation cellulaire et leur mobilité habituelle

acidique, les protéines pourvues d'un motif NoDS^{H+} sont relâchées du nucléole et regagnent leur localisation cellulaire et leur mobilité habituelle. Dans ces conditions, les deux premières arginines du NoDS^{H+} sont reméthylées.

L'ensemble des résultats de spectrométrie de masse semblent suggérer qu'en conditions neutres, les arginines du STAD contiennent au minimum un groupe méthyle. Parfois, les arginines peuvent contenir deux groupes méthyles, comme nous l'avons observé à une reprise par LC/MS-MS, ou peuvent être diméthylées de manière symétrique, comme le suggèrent les expériences avec l'anticorps SYM11. Nous croyons que la monométhylation des arginines du NoDS^{H+}VHL à pH neutre serait suffisante pour empêcher la relocalisation de la protéine vers le nucléole et assurer sa localisation cytoplasmique et nucléaire. Nous croyons non seulement que l'ajout d'un seul groupe méthyle est suffisant mais est également plus avantageux. Pour déclencher la détention nucléolaire en acidose et protéger les cellules de l'hypoxie, il serait plus rapide d'avoir une seule réaction enzymatique pour enlever les monométhyles des arginines que deux réactions enzymatiques séquentielles pour retirer les diméthyles. Alternativement, enlever deux groupes méthyles de chacune des deux arginines du motif requerrait plus d'enzymes pour déclencher la séquestration nucléolaire dans le temps nécessaire pour assurer la survie cellulaire.

Les arginines possèdent cinq donneurs possibles de liaisons hydrogènes à l'intérieur de leur groupe guanidinium (Bedford et Clarke, 2009). Ainsi, les arginines peuvent former des interactions avec des accepteurs de liaisons hydrogènes, telles que les acides nucléiques thymines, adénines et guanines de l'ADN, les groupes phosphates de l'ADN et l'ARN et les acides aminés aspartates des protéines (Calnan *et al.*, 1991;

Mitchell *et al.*, 1992; Luscombe *et al.*, 2001; Bedford et Clarke, 2009). L'ajout de groupes méthyles sur les arginines ne change pas leur charge positive (Schneider et Bannister, 2002; Boisvert *et al.*, 2005a; Pahlich *et al.*, 2006). Par contre, l'ajout de groupes méthyles sur les arginines accroît le volume et bloque des liaisons hydrogènes, donc diminue les interactions possible avec l'ADN, l'ARN et les protéines (Bedford *et al.*, 2000; Boisvert *et al.*, 2005a; Pahlich *et al.*, 2006; Bedford et Clarke, 2009). Les arginines du motif NoDS^{H+}VHL sont méthylées en conditions neutres, mais les groupes méthyles sont retirés suivant la diminution du pH extracellulaire pour produire des arginines nues. Il se peut que le retrait des groupes méthyles des arginines du NoDS^{H+} augmente le nombre de liaisons hydrogènes possibles pour permettre au motif de former de nouvelles liaisons avec de l'ADN, de l'ARN ou des protéines à l'intérieur du nucléole en conditions acides. Parallèlement, en conditions neutres, l'ajout de groupes méthyles sur les arginines du motif pourrait bloquer des liaisons hydrogènes et empêcherait l'interaction du motif NoDS^{H+} avec les composantes du nucléole. Alternativement, il se peut que le retrait des groupes méthyles modifie simplement le volume ou peut-être la structure tridimensionnelle du motif NoDS^{H+}, lui permettant ainsi de s'intégrer et se lier à une ou des composantes du nucléole.

4.10 LES ENZYMES RÉGULANT LA MÉTHYLATION ET DÉMÉTHYLATION DES ARGININES DU MOTIF NoDS^{H+}

Les réactions de méthylation et de déméthylation en fonction de la concentration en ions H⁺ extracellulaires seraient effectuées par des enzymes méthylases et déméthylases respectivement. L'ajout de groupes méthyles sur les arginines du motif

NoDS^{H+}, suite à sa synthèse à pH neutre, serait effectué par une ou plusieurs enzymes de la famille des protéines arginines méthyltransférases. Ces enzymes seraient également activées suite à la neutralisation du milieu extracellulaire acide pour reméthyliser les arginines du NoDS^{H+}. Il se peut qu'une seule PRMT soit responsable de méthyliser les arginines du motif NoDS^{H+} de toutes les protéines. Alternativement, il est possible que la méthylation du motif NoDS^{H+} de différentes protéines soit effectuée par différentes PRMTs. La méthylation à pH neutre, après la traduction des protéines et suite au dégagement des ions H⁺ extracellulaires, pourrait être effectuée par les mêmes enzymes ou par deux groupes différents de PRMTs, activées selon la condition. Dans le cas où les arginines seraient monométhylées, comme le suggèrent les résultats de LC/MS-MS, alors les enzymes PRMTs de type I ou de type II pourraient être responsables des réactions de méthylation. Les enzymes les plus susceptibles de méthyliser les arginines du motif NoDS^{H+} seraient CARM1, PRMT-5, -6 ou -7 puisque celles-ci méthylent des résidus arginines isolés (Pollack *et al.*, 1999; Friesen *et al.*, 2001; Meister *et al.*, 2001; Frankel *et al.*, 2002; Lee et Bedford, 2002; Boulanger *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005a; Lee *et al.*, 2005b; Miranda *et al.*, 2005; Sgarra *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007; El-Andaloussi *et al.*, 2007; Gonsalvez *et al.*, 2007; Guccione *et al.*, 2007; Hyllus *et al.*, 2007; Iberg *et al.*, 2008; Neuenkirchen *et al.*, 2008), comparativement aux PRMT-1, -3 et -8 qui méthylent les arginines entourées de résidus glycines (Najbauer *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1998; Frankel *et al.*, 2002). Par contre, si les arginines sont symétriquement diméthylées, tels que suggérés par les résultats obtenus avec l'anticorps SYM11, seules les PRMT de type II, donc PRMT5 et -7, seraient responsables d'effectuer cette réaction enzymatique (Pollack *et al.*, 1999; Friesen *et al.*, 2001; Meister *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005b; Cheng

et al., 2007; Gonsalvez *et al.*, 2007; Neuenkirchen *et al.*, 2008). Il se peut également que l'enzyme responsable de cette méthylation soit une nouvelle enzyme non identifiée à ce jour.

Les réactions de déméthylation au niveau des arginines du motif NoDS^{H+} suivant l'acidification du milieu extracellulaire seraient effectuées par une enzyme déméthylase d'arginines activée par la haute concentration en ions H⁺ extracellulaires. À ce jour, seulement une déméthylase d'arginines, nommée protéine contenant un domaine Jumonji 6 (JMJD6), a été identifiée (Chang *et al.*, 2007). Par contre, une récente découverte démontrant que l'activité enzymatique de JMJD6 est plutôt l'hydroxylation des lysines remet en question la possibilité que JMJD6 soit un déméthylase d'arginines (Webby *et al.*, 2009). Par conséquent, il reste encore beaucoup à découvrir en ce qui à trait à la déméthylation des arginines. Il est possible qu'une ou plusieurs déméthylases d'arginines, non découvertes à ce jour, catalysent le retrait des groupes méthyles des arginines du code NoDS^{H+} des différentes protéines.

La synthèse de nouvelles protéines ne semble pas être nécessaire pour effectuer la détention des protéines contenant un code NoDS^{H+} dans le nucléole en acidose, comme le suggèrent les expériences effectuées avec l'inhibiteur de la traduction cycloheximide. Ces résultats suggèrent premièrement que les protéines pourvues d'un motif NoDS^{H+} présentes en conditions neutres subissent une réaction de déméthylation au niveau des arginines et sont celles détenues par le nucléole suivant l'accumulation d'ions H⁺. De plus, les protéines présentes dans le nucléole en acidose sont reméthylées suite à la neutralisation du milieu acide et sont celles relâchées par le nucléole. Deuxièmement, ces résultats suggèrent que la synthèse de toute autre forme de protéines ou d'enzymes

n'est pas requise pour le cycle de méthylation et déméthylation et pour le processus de séquestration et relâchement nucléolaire. Nous croyons donc que les enzymes méthylases et déméthylases, responsables de l'ajout et du retrait des groupes méthyles des arginines du motif NoDS^{H+}, seraient présentes en tout temps, peu importe la concentration en ions H⁺ extracellulaires. Ces enzymes ne seraient pas nouvellement synthétisées suivant l'accumulation ou le dégagement des ions H⁺ extracellulaires. Il est donc possible qu'il y ait un système d'activation des enzymes méthylases et déméthylases contrôlé par la concentration en ions H⁺ extracellulaires. Suivant l'acidification du milieu extracellulaire, les déméthylases d'arginines seraient rapidement activées pour retirer les groupes méthyles du motif NoDS^{H+} et induire la séquestration nucléolaire des protéines. De manière semblable, suivant la neutralisation du milieu acide, les PRMTs seraient activées pour méthyler les arginines du NoDS^{H+}. Le fait que les enzymes seraient présentes en tout temps et que leurs activités seraient contrôlées par la concentration en ions H⁺ extracellulaires permettrait aux cellules de s'adapter rapidement suite à l'acidose par la séquestration nucléolaire des protéines et d'assurer leurs survies.

4.11 ÉTAPES FUTURES

Les résultats de cette étude suggèrent qu'un cycle de méthylation et déméthylation des arginines du motif NoDS^{H+} contrôle la séquestration nucléolaire en fonction de la concentration en ions H⁺ extracellulaires. Par contre, plusieurs aspects du mécanisme de détention nucléolaire des protéines restent à découvrir.

Lorsque nous avons effectué les expériences avec les inhibiteurs de méthylation généraux AdOx et MTA, nous ne pouvions exclure la possibilité que d'autres procédés de

méthylation et déméthylation soient impliqués dans la séquestration et la sortie nucléolaire des protéines. Pour tester la possibilité que des groupes méthyles soient retirés de l'ADN en conditions acides ou ajoutés suite à la neutralisation du milieu acide, nous pourrions utiliser des inhibiteurs spécifiques des ADN méthyltransférases tels que 5-azacytidine ou zebularine. Il existe également quelques inhibiteurs des protéines arginines méthyltransférases (PRMT) (Cheng *et al.*, 2004) et de certaines lysine-spécifique histones méthyltransférases (Greiner *et al.*, 2005; Kubicek *et al.*, 2007). Comme avec les inhibiteurs généraux de la méthylation, nous pourrions déterminer l'impact des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN, des arginines et des lysines des histones sur la vitesse de la relocalisation des protéines VHL et NoDS^{H+}VHL dans le nucléole suivant l'acidose et sur la sortie nucléolaire de ces protéines suivant le dégagement des ions H⁺ extracellulaires.

Au cours de cette étude, nous avons principalement travaillé avec la protéine VHL et le motif NoDS^{H+} de VHL. Il serait bon de réaliser des analyses LC/MS-MS sur le NoDS^{H+} reconstitué de d'autres protéines pour déterminer la présence de modifications post-traductionnelles sur les résidus du motif. Nous pourrions utiliser le NoDS^{H+} de Hsc70 ou encore de la sous-unité catalytique p125 de l'ADN polymérase delta (DNA pol δ p125). Pour nous permettre d'isoler le NoDS^{H+} de ces protéines de cellules acides, nous devons employer le même système qu'avec le NoDS^{H+}VHL, c'est-à-dire en fusionnant les divers motifs à la protéine cytoplasmique pyruvate kinase. Nous pourrions ainsi déterminer si, comme le NoDS^{H+} de VHL, les arginines des motifs NoDS^{H+} des divers protéines sont méthylées en conditions neutres, si des groupes méthyles sont retirés de certaines arginines suivant l'accumulation d'ions H⁺ extracellulaires et si des

groupes méthyles sont rajoutés suivant la neutralisation du milieu acide. Ces expériences permettraient de généraliser le processus de méthylation et déméthylation des arginines du motif NoDS^{H+} observé chez VHL à un éventail de protéines.

Pour supporter les résultats des analyses LC/MS-MS réalisées sur les NoDS^{H+} reconstitués des différentes protéines, nous pourrions analyser les NoDS^{H+} des protéines endogènes par spectrométrie de masse en conditions neutres. Ainsi, nous pourrions confirmer la présence et la position des groupes méthyles sur les arginines des motifs NoDS^{H+} à pH 7.2. Pour ce faire, les protéines endogènes VHL, Hsc70 et DNA pol δ p125 seraient immunoprécipitées de cellules exposées à des conditions neutres. Les protéines seraient ensuite digérées avec des enzymes protéolytiques spécifiquement choisies pour chacune des protéines pour produire des peptides de bonnes longueurs contenant le STAD du NoDS^{H+}. Une spectrométrie de masse MALDI-TOF serait d'abord réalisée avant d'analyser les peptides spécifiques contenant le NoDS^{H+} par LC/MS-MS. Nous ne pourrions pas utiliser cette technique pour analyser le NoDS^{H+} en conditions acides puisque les protéines séquestrées dans le nucléole à pH 6.0 ne peuvent pas être immunoprécipitées. Malgré tout, les résultats que générerait l'analyse LC/MS-MS du motif NoDS^{H+} de protéines endogènes permettraient d'appuyer et confirmer l'état de méthylation des arginines observé sur les NoDS^{H+} reconstitués.

Comme prochaine étape, nous pourrions examiner l'effet du type de méthylation des arginines du NoDS^{H+} sur l'affinité du motif pour le nucléole. Nous pourrions déterminer si la monométhylation, la diméthylation asymétrique et la diméthylation symétrique des arginines diminuent l'affinité du motif pour le nucléole de manière équivalente, semblable ou alors différente. Il est possible que la diméthylation des

arginines augmente la répulsion du motif envers le nucléole comparativement à la monométhylation. Alternativement, il se peut que la monométhylation soit le type de méthylation le plus efficace à empêcher la relocalisation nucléolaire. Pour tester ceci, nous pourrions utiliser des peptides synthétiques composés du NoDS^{H+} reconstitué de VHL avec différents états de méthylation des arginines, comme nous avons utilisé dans cette étude. L'affinité de ces différents peptides serait déterminée et comparée de façon *in vivo* par micro-injections et *in vitro* à l'aide d'expériences de capture par le nucléole. De la même façon, nous pourrions examiner si le nombre d'arginines non-méthylées a de l'importance dans l'ensemble du système de séquestration nucléolaire et dans l'affinité du motif pour le nucléole. Il serait également bon de déterminer si des peptides composés du NoDS^{H+} reconstitué de différentes protéines avec différents états et types de méthylation agissent de manière équivalente au NoDS^{H+} de VHL envers le nucléole.

Comme prochaine étape, notre laboratoire pourrait identifier et caractériser les enzymes PRMT responsables de la méthylation des arginines du motif NoDS^{H+} de VHL et de d'autres protéines en conditions neutres et après la neutralisation du milieu acide. Puisque plusieurs PRMTs sont déjà connues et identifiées, nous pourrions d'abord examiner si l'une de celles-ci méthyle le NoDS^{H+}. Si aucune des neuf PRMTs connues ne catalysent l'ajout de groupes méthyles sur NoDS^{H+}, nous devrions alors identifier une nouvelle méthylase d'arginines. Les déméthylases d'arginines responsables de retirer les groupes méthyles des arginines du motif NoDS^{H+} suivant l'accumulation d'ions H⁺ extracellulaires pourrait également être identifiée et caractérisée.

4.12 CONCLUSION

L'adaptation des cellules en hypoxie par la glycolyse anaérobie et la fermentation homolactique qui s'ensuit résulte en une acidification du milieu extracellulaire et est associée à de multiples conditions physiologiques et pathologiques telles que l'exercice musculaire et le cancer. La diminution du pH extracellulaire induit la relocalisation et la détention statique de la protéine suppresseuse de tumeurs VHL dans le nucléole. Suite au dégagement des ions H^+ extracellulaires, la protéine VHL est relâchée du nucléole et regagne sa localisation nucléo-cytoplasmique et sa propriété dynamique. La détention nucléolaire de VHL est dirigée par un motif spécifique se nommant le signal de détention nucléolaire régulée par H^+ (NoDS^{H+}). Ce code est retrouvé dans plusieurs protéines et active leurs séquestrations nucléolaires en acidose. Dans cette étude, nous avons examiné le mécanisme de détention nucléolaire des protéines par le motif NoDS^{H+} suite à l'accumulation d'ions H^+ extracellulaires. À l'aide d'analyses par spectrométrie de masse, nous avons démontré qu'un cycle de méthylation et déméthylation d'arginines présentes dans le motif NoDS^{H+} de VHL est régulé par la concentration en ions H^+ extracellulaires. Par des expériences avec des inhibiteurs de méthylation et des peptides, nous avons observé que l'état de méthylation des arginines contrôle l'activité du code NoDS^{H+}VHL, l'affinité envers le nucléole et la séquestration nucléolaires des protéines. Ces résultats suggèrent que la méthylation des arginines est un processus réversible et que l'état de méthylation des arginines du motif NoDS^{H+} est contrôlé par la concentration en ions H^+ extracellulaires et régule la détention nucléolaire.

CHAPITRE 5: RÉFÉRENCES

Adams, M. M., Wang, B., Xia, Z., Morales, J. C., Lu, X., Donehower, L. A., Bochar, D. A., Elledge, S. J. et Carpenter, P. B. (2005) 53BP1 oligomerization is independent of its methylation by PRMT1. *Cell Cycle*. **4**(12): 1854-1861.

Akazawa, S., Unterman, T. et Metzger, B. E. (1994) Glucose metabolism in separated embryos and investing membranes during organogenesis in the rat. *Metabolism*. **43**(7): 830-835.

Allen, D. et Westerblad, H. (2004) Physiology. Lactic acid--the latest performance-enhancing drug. *Science*. **305**(5687): 1112-1113.

Ancelin, K., Lange, U. C., Hajkova, P., Schneider, R., Bannister, A. J., Kouzarides, T. et Surani, M. A. (2006) Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nat Cell Biol*. **8**(6): 623-630.

Andersen, J. S., Lam, Y. W., Leung, A. K., Ong, S. E., Lyon, C. E., Lamond, A. I. et Mann, M. (2005) Nucleolar proteome dynamics. *Nature*. **433**(7021): 77-83.

Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K., Lam, Y. W., Steen, H., Mann, M. et Lamond, A. I. (2002) Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol*. **12**(1): 1-11.

Aoki, K., Ishii, Y., Matsumoto, K. et Tsujimoto, M. (2002) Methylation of Xenopus CIRP2 regulates its arginine- and glycine-rich region-mediated nucleocytoplasmic distribution. *Nucleic Acids Res*. **30**(23): 5182-5192.

Avila, M. A., Garcia-Trevijano, E. R., Lu, S. C., Corrales, F. J. et Mato, J. M. (2004) Methylthioadenosine. *Int J Biochem Cell Biol*. **36**(11): 2125-2130.

Bannister, A. J. et Kouzarides, T. (2005) Reversing histone methylation. *Nature*. **436**(7054): 1103-1106.

Bedford, M. T. (2007) Arginine methylation at a glance. *J Cell Sci*. **120**(Pt 24): 4243-4246.

Bedford, M. T. et Clarke, S. G. (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell*. **33**(1): 1-13.

Bedford, M. T., Frankel, A., Yaffe, M. B., Clarke, S., Leder, P. et Richard, S. (2000) Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains. *J Biol Chem*. **275**(21): 16030-16036.

Bedford, M. T., Reed, R. et Leder, P. (1998) WW domain-mediated interactions reveal a spliceosome-associated protein that binds a third class of proline-rich motif: the proline glycine and methionine-rich motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**(18): 10602-10607.

Bedford, M. T. et Richard, S. (2005) Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell*. **18**(3): 263-272.

Bernardi, M. L., Flechon, J. E. et Delouis, C. (1996) Influence of culture system and oxygen tension on the development of ovine zygotes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil*. **106**(2): 161-167.

Berra, E., Ginouves, A. et Pouyssegur, J. (2006) The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep*. **7**(1): 41-45.

Boisvert, F. M., Chenard, C. A. et Richard, S. (2005a) Protein interfaces in signaling regulated by arginine methylation. *Sci STKE*. **2005**(271): re2.

Boisvert, F. M., Cote, J., Boulanger, M. C. et Richard, S. (2003) A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes. *Mol Cell Proteomics*. **2**(12): 1319-1330.

Boisvert, F. M., Dery, U., Masson, J. Y. et Richard, S. (2005b) Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control. *Genes Dev*. **19**(6): 671-676.

Boisvert, F. M., Dery, U., Masson, J. Y. et Richard, S. (2005c) [A new role for arginine methylation in DNA repair]. *Med Sci (Paris)*. **21**(6-7): 579-581.

Boisvert, F. M., Hendzel, M. J., Masson, J. Y. et Richard, S. (2005d) Methylation of MRE11 regulates its nuclear compartmentalization. *Cell Cycle*. **4**(7): 981-989.

Boisvert, F. M., Rhie, A., Richard, S. et Doherty, A. J. (2005e) The GAR motif of 53BP1 is arginine methylated by PRMT1 and is necessary for 53BP1 DNA binding activity. *Cell Cycle*. **4**(12): 1834-1841.

Boisvert, F. M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J. et Lamond, A. I. (2007) The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8**(7): 574-585.

Bonicalzi, M. E., Groulx, I., de Paulsen, N. et Lee, S. (2001) Role of exon 2-encoded beta-domain of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*. **276**(2): 1407-1416.

Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M. et Nigg, E. A. (1989) Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*. **56**(3): 379-390.

Boulanger, M. C., Liang, C., Russell, R. S., Lin, R., Bedford, M. T., Wainberg, M. A. et Richard, S. (2005) Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol*. **79**(1): 124-131.

Bruick, R. K. et McKnight, S. L. (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. **294**(5545): 1337-1340.

Byvoet, P., Shepherd, G. R., Hardin, J. M. et Noland, B. J. (1972) The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.* **148**(2): 558-567.

Calnan, B. J., Tidor, B., Biancalana, S., Hudson, D. et Frankel, A. D. (1991) Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. *Science.* **252**(5010): 1167-1171.

Catez, F., Erard, M., Schaerer-Uthurralt, N., Kindbeiter, K., Madjar, J. J. et Diaz, J. J. (2002) Unique motif for nucleolar retention and nuclear export regulated by phosphorylation. *Mol Cell Biol.* **22**(4): 1126-1139.

Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y. et Bruick, R. K. (2007) JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science.* **318**(5849): 444-447.

Charier, G., Couprie, J., Alpha-Bazin, B., Meyer, V., Quemeneur, E., Guerois, R., Callebaut, I., Gilquin, B. et Zinn-Justin, S. (2004) The Tudor tandem of 53BP1: a new structural motif involved in DNA and RG-rich peptide binding. *Structure.* **12**(9): 1551-1562.

Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., Aswad, D. W. et Stallcup, M. R. (1999) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science.* **284**(5423): 2174-2177.

Cheng, D., Cote, J., Shaaban, S. et Bedford, M. T. (2007) The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing. *Mol Cell.* **25**(1): 71-83.

Cheng, D., Yadav, N., King, R. W., Swanson, M. S., Weinstein, E. J. et Bedford, M. T. (2004) Small molecule regulators of protein arginine methyltransferases. *J Biol Chem.* **279**(23): 23892-23899.

Cloos, P. A., Christensen, J., Agger, K., Maiolica, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K. H. et Helin, K. (2006) The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature.* **442**(7100): 307-311.

Cochrane, A. W., Perkins, A. et Rosen, C. A. (1990) Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function. *J Virol.* **64**(2): 881-885.

Conti, E. et Izaurralde, E. (2001) Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol.* **13**(3): 310-319.

Cote, J., Boisvert, F. M., Boulanger, M. C., Bedford, M. T. et Richard, S. (2003) Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Mol Biol Cell.* **14**(1): 274-287.

Cuthbert, G. L., Daujat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A. J. et Kouzarides, T. (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*. **118**(5): 545-553.

Dacwag, C. S., Ohkawa, Y., Pal, S., Sif, S. et Imbalzano, A. N. (2007) The protein arginine methyltransferase Prmt5 is required for myogenesis because it facilitates ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol Cell Biol*. **27**(1): 384-394.

Dang, C. V. et Lee, W. M. (1989) Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J Biol Chem*. **264**(30): 18019-18023.

Dery, U., Coulombe, Y., Rodrigue, A., Stasiak, A., Richard, S. et Masson, J. Y. (2008) A glycine-arginine domain in control of the human MRE11 DNA repair protein. *Mol Cell Biol*. **28**(9): 3058-3069.

Dias, J. (2009) Anaerobic nucleolar proteome dynamics. M.Sc. Thesis in Cellular and Molecular Medicine, University of Ottawa of Ottawa, Ottawa. pp. 88.

Duan, D. R., Humphrey, J. S., Chen, D. Y., Weng, Y., Sukegawa, J., Lee, S., Gnarr, J. R., Linehan, W. M. et Klausner, R. D. (1995a) Characterization of the VHL tumor suppressor gene product: localization, complex formation, and the effect of natural inactivating mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**(14): 6459-6463.

Duan, D. R., Pause, A., Burgess, W. H., Aso, T., Chen, D. Y., Garrett, K. P., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Linehan, W. M. et Klausner, R. D. (1995b) Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science*. **269**(5229): 1402-1406.

Duerre, J. A. et Lee, C. T. (1974) In vivo methylation and turnover of rat brain histones. *J Neurochem*. **23**(3): 541-547.

Dundr, M. et Misteli, T. (2001) Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J*. **356**(Pt 2): 297-310.

El-Andaloussi, N., Valovka, T., Toueille, M., Hassa, P. O., Gehrig, P., Covic, M., Hubscher, U. et Hottiger, M. O. (2007) Methylation of DNA polymerase beta by protein arginine methyltransferase 1 regulates its binding to proliferating cell nuclear antigen. *FASEB J*. **21**(1): 26-34.

El-Andaloussi, N., Valovka, T., Toueille, M., Steinacher, R., Focke, F., Gehrig, P., Covic, M., Hassa, P. O., Schar, P., Hubscher, U. et Hottiger, M. O. (2006) Arginine methylation regulates DNA polymerase beta. *Mol Cell*. **22**(1): 51-62.

Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y. M., Masson, N.,

- Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J. et Ratcliffe, P. J. (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. **107**(1): 43-54.
- Fabbrizio, E., El Messaoudi, S., Polanowska, J., Paul, C., Cook, J. R., Lee, J. H., Negre, V., Rousset, M., Pestka, S., Le Cam, A. et Sardet, C. (2002) Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep*. **3**(7): 641-645.
- Fabiato, A. et Fabiato, F. (1978) Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J Physiol*. **276**: 233-255.
- Fatica, A. et Tollervey, D. (2002) Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol*. **14**(3): 313-318.
- Fodor, B. D., Kubicek, S., Yonezawa, M., O'Sullivan, R. J., Sengupta, R., Perez-Burgos, L., Opravil, S., Mechtler, K., Schotta, G. et Jenuwein, T. (2006) Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. *Genes Dev*. **20**(12): 1557-1562.
- Frankel, A., Yadav, N., Lee, J., Branscombe, T. L., Clarke, S. et Bedford, M. T. (2002) The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J Biol Chem*. **277**(5): 3537-3543.
- Friesen, W. J., Paushkin, S., Wyce, A., Massenet, S., Pesiridis, G. S., Van Duyne, G., Rappsilber, J., Mann, M. et Dreyfuss, G. (2001) The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins. *Mol Cell Biol*. **21**(24): 8289-8300.
- Gary, J. D. et Clarke, S. (1998) RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. **61**: 65-131.
- Gatenby, R. A. et Gawlinski, E. T. (2003) The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models. *Cancer Res*. **63**(14): 3847-3854.
- Gatenby, R. A. et Gillies, R. J. (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. **4**(11): 891-899.
- Gatenby, R. A. et Gillies, R. J. (2007) Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. **39**(7-8): 1358-1366.
- Ginisty, H., Amalric, F. et Bouvet, P. (1998) Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *Embo J*. **17**(5): 1476-1486.

Gladden, L. B. (2001) Lactic acid: New roles in a new millennium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**(2): 395-397.

Gonsalvez, G. B., Tian, L., Ospina, J. K., Boisvert, F. M., Lamond, A. I. et Matera, A. G. (2007) Two distinct arginine methyltransferases are required for biogenesis of Sm-class ribonucleoproteins. *J Cell Biol*. **178**(5): 733-740.

Graves, P. R. et Haystead, T. A. (2002) Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. **66**(1): 39-63; table of contents.

Green, D. M., Marfatia, K. A., Crafton, E. B., Zhang, X., Cheng, X. et Corbett, A. H. (2002) Nab2p is required for poly(A) RNA export in *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by arginine methylation via Hmt1p. *J Biol Chem*. **277**(10): 7752-7760.

Greiner, D., Bonaldi, T., Eskeland, R., Roemer, E. et Imhof, A. (2005) Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nat Chem Biol*. **1**(3): 143-145.

Groulx, I., Bonicalzi, M. E. et Lee, S. (2000) Ran-mediated nuclear export of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein occurs independently of its assembly with cullin-2. *J Biol Chem*. **275**(12): 8991-9000.

Groulx, I. et Lee, S. (2002) Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol*. **22**(15): 5319-5336.

Gu, Y. Z., Moran, S. M., Hogenesch, J. B., Wartman, L. et Bradfield, C. A. (1998) Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr*. **7**(3): 205-213.

Guccione, E., Bassi, C., Casadio, F., Martinato, F., Cesaroni, M., Schuchlantz, H., Luscher, B. et Amati, B. (2007) Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature*. **449**(7164): 933-937.

Hergovich, A., Lisztwan, J., Barry, R., Ballschmieter, P. et Krek, W. (2003) Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat Cell Biol*. **5**(1): 64-70.

Hernandez-Verdun, D. (2006) Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol*. **125**(1-2): 127-137.

Hill, A. V. et Kupalov, P. (1929) Anaerobic and aerobic activity in isolated muscle. *Proc Royal Soc London Series B*. **105**: 313-322.

Hill, A. V., Long, C. H. N. et Lupton, H. (1924a) Muscular exercise, lactic acid and the supply and utilization of oxygen. *Proc Royal Soc London Series B*. **97**: 155-176.

- Hill, A. V., Long, C. H. N. et Lupton, H. (1924b) Muscular exercise, lactic acid and the supply and utilization of oxygen. *Proc Royal Soc London Series B*. **96**: 438-475.
- Hill, A. V., Long, C. H. N. et Lupton, H. (1924c) Muscular exercise, lactic acid and the supply and utilization of oxygen. *Proc Royal Soc London Series B*. **97**: 84-138.
- Hill, A. V. et Lupton, H. (1923) Muscular exercise, lactic acid and the supply and utilization of oxygen. *Quartely Journal of Medicine*. **16**: 135-171.
- Hiscox, J. A. (2002) The nucleolus--a gateway to viral infection? *Arch Virol*. **147**(6): 1077-1089.
- Hoffman, E. C., Reyes, H., Chu, F. F., Sander, F., Conley, L. H., Brooks, B. A. et Hankinson, O. (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*. **252**(5008): 954-958.
- Holzel, M., Rohmoser, M., Schlee, M., Grimm, T., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Hiddemann, W., Bornkamm, G. W. et Eick, D. (2005) Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation. *J Cell Biol*. **170**(3): 367-378.
- Hou, Z., Peng, H., Ayyanathan, K., Yan, K. P., Langer, E. M., Longmore, G. D. et Rauscher, F. J., 3rd (2008) The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression. *Mol Cell Biol*. **28**(10): 3198-3207.
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M. et Bunn, H. F. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**(14): 7987-7992.
- Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R. A., Jr., Gorgoulis, V. G., Zacharatos, P., Petty, T. J., Sheston, E. A., Mellert, H. S., Stavridi, E. S. et Halazonetis, T. D. (2004) Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature*. **432**(7015): 406-411.
- Hyllus, D., Stein, C., Schnabel, K., Schiltz, E., Imhof, A., Dou, Y., Hsieh, J. et Bauer, U. M. (2007) PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes Dev*. **21**(24): 3369-3380.
- Iacovides, D. C., O'Shea, C. C., Oses-Prieto, J., Burlingame, A. et McCormick, F. (2007) Critical role for arginine methylation in adenovirus-infected cells. *J Virol*. **81**(23): 13209-13217.

Iberg, A. N., Espejo, A., Cheng, D., Kim, D., Michaud-Levesque, J., Richard, S. et Bedford, M. T. (2008) Arginine methylation of the histone H3 tail impedes effector binding. *J Biol Chem.* **283**(6): 3006-3010.

Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S. et Kaelin, W. G., Jr. (1995) Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med.* **1**(8): 822-826.

Iliopoulos, O., Ohh, M. et Kaelin, W. G., Jr. (1998) pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(20): 11661-11666.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S. et Kaelin, W. G., Jr. (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.* **292**(5516): 464-468.

Iwai, K., Yamanaka, K., Kamura, T., Minato, N., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Klausner, R. D. et Pause, A. (1999) Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **96**(22): 12436-12441.

Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y. et Semenza, G. L. (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* **12**(2): 149-162.

Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. et Ratcliffe, P. J. (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* **292**(5516): 468-472.

Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R. et Semenza, G. L. (1996a) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* **271**(30): 17771-17778.

Jiang, B. H., Semenza, G. L., Bauer, C. et Marti, H. H. (1996b) Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol.* **271**(4 Pt 1): C1172-1180.

Kaelin, W. G., Jr. et Ratcliffe, P. J. (2008) Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell.* **30**(4): 393-402.

Kallio, P. J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H. et Poellinger, L. (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *Embo J.* **17**(22): 6573-6586.

- Kamura, T., Koepp, D. M., Conrad, M. N., Skowyra, D., Moreland, R. J., Iliopoulos, O., Lane, W. S., Kaelin, W. G., Jr., Elledge, S. J., Conaway, R. C., Harper, J. W. et Conaway, J. W. (1999) Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science*. **284**(5414): 657-661.
- Khacho, M. et Lee, S. (2009) Subcellular dynamics of the VHL tumor suppressor: on the move for HIF degradation. *Future Oncol*. **5**(1): 85-95.
- Khacho, M., Mekhail, K., Pilon-Larose, K., Pause, A., Cote, J. et Lee, S. (2008a) eEF1A is a novel component of the mammalian nuclear protein export machinery. *Mol Biol Cell*. **19**(12): 5296-5308.
- Khacho, M., Mekhail, K., Pilon-Larose, K., Payette, J. et Lee, S. (2008b) Cancer-causing mutations in a novel transcription-dependent nuclear export motif of VHL abrogate oxygen-dependent degradation of hypoxia-inducible factor. *Mol Cell Biol*. **28**(1): 302-314.
- Khurts, S., Masutomi, K., Delgermaa, L., Arai, K., Oishi, N., Mizuno, H., Hayashi, N., Hahn, W. C. et Murakami, S. (2004) Nucleolin interacts with telomerase. *J Biol Chem*. **279**(49): 51508-51515.
- Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J. A. et Kaelin, W. G., Jr. (1995) Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science*. **269**(5229): 1444-1446.
- Kleinschmidt, M. A., Streubel, G., Samans, B., Krause, M. et Bauer, U. M. (2008) The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation. *Nucleic Acids Res*. **36**(10): 3202-3213.
- Klose, R. J., Kallin, E. M. et Zhang, Y. (2006a) JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet*. **7**(9): 715-727.
- Klose, R. J., Yamane, K., Bae, Y., Zhang, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. et Zhang, Y. (2006b) The transcriptional repressor JHD3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature*. **442**(7100): 312-316.
- Klose, R. J. et Zhang, Y. (2007) Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8**(4): 307-318.
- Kubicek, S., O'Sullivan, R. J., August, E. M., Hickey, E. R., Zhang, Q., Teodoro, M. L., Rea, S., Mechtler, K., Kowalski, J. A., Homon, C. A., Kelly, T. A. et Jenuwein, T. (2007) Reversal of H3K9me2 by a small-molecule inhibitor for the G9a histone methyltransferase. *Mol Cell*. **25**(3): 473-481.

- Kutay, U. et Guttinger, S. (2005) Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol.* **15**(3): 121-124.
- Kwak, Y. T., Guo, J., Prajapati, S., Park, K. J., Surabhi, R. M., Miller, B., Gehrig, P. et Gaynor, R. B. (2003) Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Mol Cell.* **11**(4): 1055-1066.
- Lacroix, M., Messaoudi, S. E., Rodier, G., Le Cam, A., Sardet, C. et Fabrizio, E. (2008) The histone-binding protein COPR5 is required for nuclear functions of the protein arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep.* **9**(5): 452-458.
- Lam, Y. W., Trinkle-Mulcahy, L. et Lamond, A. I. (2005) The nucleolus. *J Cell Sci.* **118**(Pt 7): 1335-1337.
- Lamond, A. I. et Sleeman, J. E. (2003) Nuclear substructure and dynamics. *Curr Biol.* **13**(21): R825-828.
- Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F. M., Orcutt, M. L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L. et et al. (1993) Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science.* **260**(5112): 1317-1320.
- Lee, B. J., Cansizoglu, A. E., Suel, K. E., Louis, T. H., Zhang, Z. et Chook, Y. M. (2006) Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell.* **126**(3): 543-558.
- Lee, D. Y., Teyssier, C., Strahl, B. D. et Stallcup, M. R. (2005a) Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev.* **26**(2): 147-170.
- Lee, H. W., Kim, S. et Paik, W. K. (1977) S-adenosylmethionine: protein-arginine methyltransferase. Purification and mechanism of the enzyme. *Biochemistry.* **16**(1): 78-85.
- Lee, J. et Bedford, M. T. (2002) PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays. *EMBO Rep.* **3**(3): 268-273.
- Lee, J. H., Cook, J. R., Yang, Z. H., Mirochnitchenko, O., Gunderson, S. I., Felix, A. M., Herth, N., Hoffmann, R. et Pestka, S. (2005b) PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine. *J Biol Chem.* **280**(5): 3656-3664.
- Lee, S., Chen, D. Y., Humphrey, J. S., Gnarr, J. R., Linehan, W. M. et Klausner, R. D. (1996) Nuclear/cytoplasmic localization of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product is determined by cell density. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(5): 1770-1775.
- Lee, S., Neumann, M., Stearman, R., Stauber, R., Pause, A., Pavlakis, G. N. et Klausner, R. D. (1999) Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic trafficking is required for the

function of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol.* **19**(2): 1486-1497.

Lisztwan, J., Imbert, G., Wirbelauer, C., Gstaiger, M. et Krek, W. (1999) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev.* **13**(14): 1822-1833.

Lonergan, K. M., Iliopoulos, O., Ohh, M., Kamura, T., Conaway, R. C., Conaway, J. W. et Kaelin, W. G., Jr. (1998) Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol.* **18**(2): 732-741.

Los, M., Jansen, G. H., Kaelin, W. G., Lips, C. J., Blijham, G. H. et Voest, E. E. (1996) Expression pattern of the von Hippel-Lindau protein in human tissues. *Lab Invest.* **75**(2): 231-238.

Lukong, K. E. et Richard, S. (2004) Arginine methylation signals mRNA export. *Nat Struct Mol Biol.* **11**(10): 914-915.

Luscombe, N. M., Laskowski, R. A. et Thornton, J. M. (2001) Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Res.* **29**(13): 2860-2874.

Lutz, M. S. et Burk, R. D. (2006) Primary cilium formation requires von hippel-lindau gene function in renal-derived cells. *Cancer Res.* **66**(14): 6903-6907.

Maltepe, E. et Simon, M. C. (1998) Oxygen, genes, and development: an analysis of the role of hypoxic gene regulation during murine vascular development. *J Mol Med.* **76**(6): 391-401.

Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R. et Ratcliffe, P. J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* **399**(6733): 271-275.

Mayer, C., Bierhoff, H. et Grummt, I. (2005) The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev.* **19**(8): 933-941.

Meister, G., Eggert, C., Buhler, D., Brahms, H., Kambach, C. et Fischer, U. (2001) Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. *Curr Biol.* **11**(24): 1990-1994.

Mekhail, K., Gunaratnam, L., Bonicalzi, M. E. et Lee, S. (2004a) HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL. *Nat Cell Biol.* **6**(7): 642-647.

- Mekhail, K., Khacho, M., Carrigan, A., Hache, R. R., Gunaratnam, L. et Lee, S. (2005) Regulation of ubiquitin ligase dynamics by the nucleolus. *J Cell Biol.* **170**(5): 733-744.
- Mekhail, K., Khacho, M., Gunaratnam, L. et Lee, S. (2004b) Oxygen sensing by H⁺: implications for HIF and hypoxic cell memory. *Cell Cycle.* **3**(8): 1027-1029.
- Mekhail, K., Rivero-Lopez, L., Al-Masri, A., Brandon, C., Khacho, M. et Lee, S. (2007) Identification of a Common Subnuclear Localization Signal. *Mol Biol Cell.*
- Mekhail, K., Rivero-Lopez, L., Khacho, M. et Lee, S. (2006) Restriction of rRNA synthesis by VHL maintains energy equilibrium under hypoxia. *Cell Cycle.* **5**(20): 2401-2413.
- Min, J. H., Yang, H., Ivan, M., Gertler, F., Kaelin, W. G., Jr. et Pavletich, N. P. (2002) Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science.* **296**(5574): 1886-1889.
- Miranda, T. B., Webb, K. J., Edberg, D. D., Reeves, R. et Clarke, S. (2005) Protein arginine methyltransferase 6 specifically methylates the nonhistone chromatin protein HMGA1a. *Biochem Biophys Res Commun.* **336**(3): 831-835.
- Misteli, T. (2001) Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science.* **291**(5505): 843-847.
- Mitchell, J. B., Thornton, J. M., Singh, J. et Price, S. L. (1992) Towards an understanding of the arginine-aspartate interaction. *J Mol Biol.* **226**(1): 251-262.
- Moroianu, J. et Riordan, J. F. (1994) Identification of the nucleolar targeting signal of human angiogenin. *Biochem Biophys Res Commun.* **203**(3): 1765-1772.
- Najbauer, J., Johnson, B. A., Young, A. L. et Aswad, D. W. (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**(14): 10501-10509.
- Neuenkirchen, N., Chari, A. et Fischer, U. (2008) Deciphering the assembly pathway of Sm-class U snRNPs. *FEBS Lett.* **582**(14): 1997-2003.
- Nichols, R. C., Wang, X. W., Tang, J., Hamilton, B. J., High, F. A., Herschman, H. R. et Rigby, W. F. (2000) The RGG domain in hnRNP A2 affects subcellular localization. *Exp Cell Res.* **256**(2): 522-532.
- Nielsen, O. B., de Paoli, F. et Overgaard, K. (2001) Protective effects of lactic acid on force production in rat skeletal muscle. *J Physiol.* **536**(Pt 1): 161-166.

Ohh, M., Park, C. W., Ivan, M., Hoffman, M. A., Kim, T. Y., Huang, L. E., Pavletich, N., Chau, V. et Kaelin, W. G. (2000) Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol.* **2**(7): 423-427.

Ohh, M., Yauch, R. L., Lonergan, K. M., Whaley, J. M., Stemmer-Rachamimov, A. O., Louis, D. N., Gavin, B. J., Kley, N., Kaelin, W. G., Jr. et Iliopoulos, O. (1998) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell.* **1**(7): 959-968.

Olson, M. O. (2004) Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci STKE.* **2004**(224): pe10.

Pabon, J. E., Jr., Findley, W. E. et Gibbons, W. E. (1989) The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril.* **51**(5): 896-900.

Pahlich, S., Zakaryan, R. P. et Gehring, H. (2006) Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis. *Biochim Biophys Acta.* **1764**(12): 1890-1903.

Pal, S., Vishwanath, S. N., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. et Sif, S. (2004) Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol Cell Biol.* **24**(21): 9630-9645.

Pal, S., Yun, R., Datta, A., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Kumar, J., Tempst, P. et Sif, S. (2003) mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad. *Mol Cell Biol.* **23**(21): 7475-7487.

Pause, A., Lee, S., Worrell, R. A., Chen, D. Y., Burgess, W. H., Linehan, W. M. et Klausner, R. D. (1997) The von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene product forms a stable complex with human CUL-2, a member of the Cdc53 family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(6): 2156-2161.

Pedersen, T. H., Nielsen, O. B., Lamb, G. D. et Stephenson, D. G. (2004) Intracellular acidosis enhances the excitability of working muscle. *Science.* **305**(5687): 1144-1147.

Pellar, G. J. et DiMario, P. J. (2003) Deletion and site-specific mutagenesis of nucleolin's carboxy GAR domain. *Chromosoma.* **111**(7): 461-469.

Phair, R. D. et Misteli, T. (2000) High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature.* **404**(6778): 604-609.

Pintucci, G., Quarto, N. et Rifkin, D. B. (1996) Methylation of high molecular weight fibroblast growth factor-2 determines post-translational increases in molecular weight and affects its intracellular distribution. *Mol Biol Cell.* **7**(8): 1249-1258.

- Pollack, B. P., Kotenko, S. V., He, W., Izotova, L. S., Barnoski, B. L. et Pestka, S. (1999) The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. *J Biol Chem.* **274**(44): 31531-31542.
- Puvion-Dutilleul, F., Bachellerie, J. P. et Puvion, E. (1991) Nucleolar organization of HeLa cells as studied by in situ hybridization. *Chromosoma.* **100**(6): 395-409.
- Quinn, P. et Harlow, G. M. (1978) The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *J Exp Zool.* **206**(1): 73-80.
- Racker, E. (1974) History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol Cell Biochem.* **5**(1-2): 17-23.
- Raijmakers, R., Zendman, A. J., Egberts, W. V., Vossenaar, E. R., Raats, J., Soede-Huijbregts, C., Rutjes, F. P., van Veelen, P. A., Drijfhout, J. W. et Pruijn, G. J. (2007) Methylation of arginine residues interferes with citrullination by peptidylarginine deiminases in vitro. *J Mol Biol.* **367**(4): 1118-1129.
- Ramon-Maiques, S., Kuo, A. J., Carney, D., Matthews, A. G., Oettinger, M. A., Gozani, O. et Yang, W. (2007) The plant homeodomain finger of RAG2 recognizes histone H3 methylated at both lysine-4 and arginine-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**(48): 18993-18998.
- Richard, S., Morel, M. et Cleroux, P. (2005) Arginine methylation regulates IL-2 gene expression: a role for protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5). *Biochem J.* **388**(Pt 1): 379-386.
- Rubbi, C. P. et Milner, J. (2003) Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *Embo J.* **22**(22): 6068-6077.
- Scherl, A., Coute, Y., Deon, C., Calle, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J. C., Greco, A., Hochstrasser, D. et Diaz, J. J. (2002) Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell.* **13**(11): 4100-4109.
- Schmidt, E. V. (1999) The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene.* **18**(19): 2988-2996.
- Schneider, R. et Bannister, A. J. (2002) Protein N-methyltransferase assays in the study of gene transcription. *Methods.* **26**(3): 226-232.
- Schoenfeld, A., Davidowitz, E. J. et Burk, R. D. (1998) A second major native von Hippel-Lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(15): 8817-8822.

Seizinger, B. R., Rouleau, G. A., Ozelius, L. J., Lane, A. H., Farmer, G. E., Lamiell, J. M., Haines, J., Yuen, J. W., Collins, D., Majoor-Krakauer, D. et al. (1988) Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature*. **332**(6161): 268-269.

Semenza, G. L. (1999) Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **15**: 551-578.

Semenza, G. L., Nejfelt, M. K., Chi, S. M. et Antonarakis, S. E. (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**(13): 5680-5684.

Semenza, G. L. et Wang, G. L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. **12**(12): 5447-5454.

Sgarra, R., Lee, J., Tessari, M. A., Altamura, S., Spolaore, B., Giacotti, V., Bedford, M. T. et Manfioletti, G. (2006) The AT-hook of the chromatin architectural transcription factor high mobility group A1a is arginine-methylated by protein arginine methyltransferase 6. *J Biol Chem*. **281**(7): 3764-3772.

Shen, E. C., Henry, M. F., Weiss, V. H., Valentini, S. R., Silver, P. A. et Lee, M. S. (1998) Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev*. **12**(5): 679-691.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A. et Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. **119**(7): 941-953.

Shi, Y. et Whetstine, J. R. (2007) Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell*. **25**(1): 1-14.

Shin, H. S., Jang, C. Y., Kim, H. D., Kim, T. S., Kim, S. et Kim, J. (2009) Arginine methylation of ribosomal protein S3 affects ribosome assembly. *Biochem Biophys Res Commun*.

Shou, W., Seol, J. H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z. W., Jang, J., Shevchenko, A., Charbonneau, H. et Deshaies, R. J. (1999) Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell*. **97**(2): 233-244.

Siomi, H., Shida, H., Nam, S. H., Nosaka, T., Maki, M. et Hatanaka, M. (1988) Sequence requirements for nucleolar localization of human T cell leukemia virus type I pX protein, which regulates viral RNA processing. *Cell*. **55**(2): 197-209.

- Smallbone, K., Gavaghan, D. J., Gatenby, R. A. et Maini, P. K. (2005) The role of acidity in solid tumour growth and invasion. *J Theor Biol.* **235**(4): 476-484.
- Smith, W. A., Schurter, B. T., Wong-Staal, F. et David, M. (2004) Arginine methylation of RNA helicase a determines its subcellular localization. *J Biol Chem.* **279**(22): 22795-22798.
- Stebbins, C. E., Kaelin, W. G., Jr. et Pavletich, N. P. (1999) Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science.* **284**(5413): 455-461.
- Tang, J., Gary, J. D., Clarke, S. et Herschman, H. R. (1998) PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *J Biol Chem.* **273**(27): 16935-16945.
- Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T. et Poellinger, L. (2000) Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Embo J.* **19**(16): 4298-4309.
- Tao, W. et Levine, A. J. (1999) P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(12): 6937-6941.
- Thomas, G. (2000) An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nat Cell Biol.* **2**(5): E71-72.
- Thompson, J. G., Simpson, A. C., Pugh, P. A., Donnelly, P. E. et Tervit, H. R. (1990) Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fertil.* **89**(2): 573-578.
- Tian, H., McKnight, S. L. et Russell, D. W. (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* **11**(1): 72-82.
- Tschochner, H. et Hurt, E. (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol.* **13**(5): 255-263.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P. et Zhang, Y. (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature.* **439**(7078): 811-816.
- Visintin, R. et Amon, A. (2000) The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr Opin Cell Biol.* **12**(3): 372-377.
- Visintin, R., Hwang, E. S. et Amon, A. (1999) Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature.* **398**(6730): 818-823.

Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. et Semenza, G. L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(12): 5510-5514.

Wang, G. L. et Semenza, G. L. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* **270**(3): 1230-1237.

Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y. H., Perlin, J. R., Leonelli, L., Sonbuchner, L. S., McDonald, C. H., Cook, R. G., Dou, Y., Roeder, R. G., Clarke, S., Stallcup, M. R., Allis, C. D. et Coonrod, S. A. (2004) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylimination. *Science.* **306**(5694): 279-283.

Warburg, O. (1956a) On respiratory impairment in cancer cells. *Science.* **124**(3215): 269-270.

Warburg, O. (1956b) On the origin of cancer cells. *Science.* **123**(3191): 309-314.

Webby, C. J., Wolf, A., Gromak, N., Dreger, M., Kramer, H., Kessler, B., Nielsen, M. L., Schmitz, C., Butler, D. S., Yates, J. R., 3rd, Delahunty, C. M., Hahn, P., Lengeling, A., Mann, M., Proudfoot, N. J., Schofield, C. J. et Bottger, A. (2009) Jmjd6 catalyses lysyl-hydroxylation of U2AF65, a protein associated with RNA splicing. *Science.* **325**(5936): 90-93.

Weber, J. D., Kuo, M. L., Bothner, B., DiGiammarino, E. L., Kriwacki, R. W., Roussel, M. F. et Sherr, C. J. (2000) Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex. *Molecular and cellular biology.* **20**(7): 2517-2528.

Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J. et Bar-Sagi, D. (1999) Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol.* **1**(1): 20-26.

Whetstine, J. R., Nottke, A., Lan, F., Huarte, M., Smolikov, S., Chen, Z., Spooner, E., Li, E., Zhang, G., Colaiacovo, M. et Shi, Y. (2006) Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell.* **125**(3): 467-481.

Williams-Ashman, H. G., Seidenfeld, J. et Galletti, P. (1982) Trends in the biochemical pharmacology of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. *Biochem Pharmacol.* **31**(3): 277-288.

Wong, J. M., Kusdra, L. et Collins, K. (2002) Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nat Cell Biol.* **4**(9): 731-736.

Yadav, N., Cheng, D., Richard, S., Morel, M., Iyer, V. R., Aldaz, C. M. et Bedford, M. T. (2008) CARM1 promotes adipocyte differentiation by coactivating PPARgamma. *EMBO Rep.* **9**(2): 193-198.

Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. et Zhang, Y. (2006) JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell*. **125**(3): 483-495.

Zhang, Y. et Xiong, Y. (1999) Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. *Mol Cell*. **3**(5): 579-591.

Zhao, X., Jankovic, V., Gural, A., Huang, G., Pardanani, A., Menendez, S., Zhang, J., Dunne, R., Xiao, A., Erdjument-Bromage, H., Allis, C. D., Tempst, P. et Nimer, S. D. (2008) Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev*. **22**(5): 640-653.