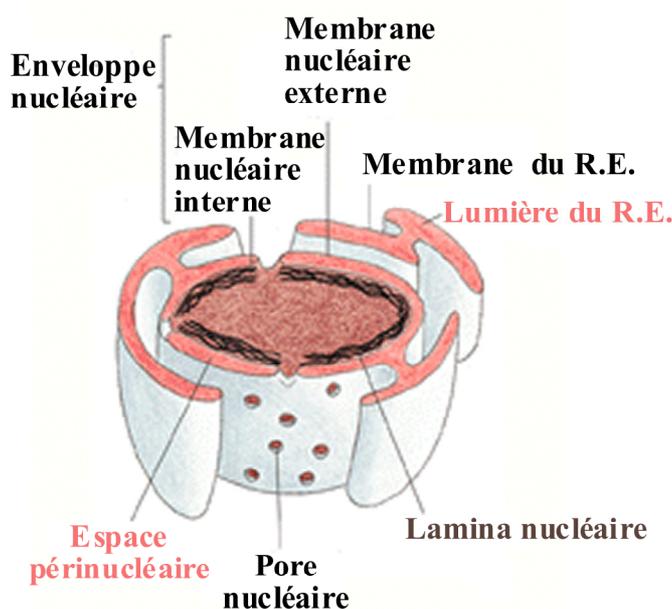


MECANISME MOLECULAIRE DU TRANSPORT NUCLEAIRE

d'après le cours du Dr NEHRBASS

INTRODUCTION

L'enveloppe nucléaire renferme l'ADN et définit le compartiment nucléaire. Elle est formée de 2 membranes concentriques qui se continuent avec le réticulum endoplasmique. Bien que la membrane interne et externe du noyau soit continue, les deux membranes ont une composition en protéines différentes. La membrane interne est entourée par la membrane externe qui ressemble très fortement à la membrane du R.E.R. . Comme celle-ci, elle est parsemée de ribosomes engagés dans la synthèse protéique. Les protéines synthétisées sur ces ribosomes sont transportées dans l'espace compris entre les membranes interne et externe du noyau (l'espace périnucléaire), qui est continu avec la lumière du R.E.



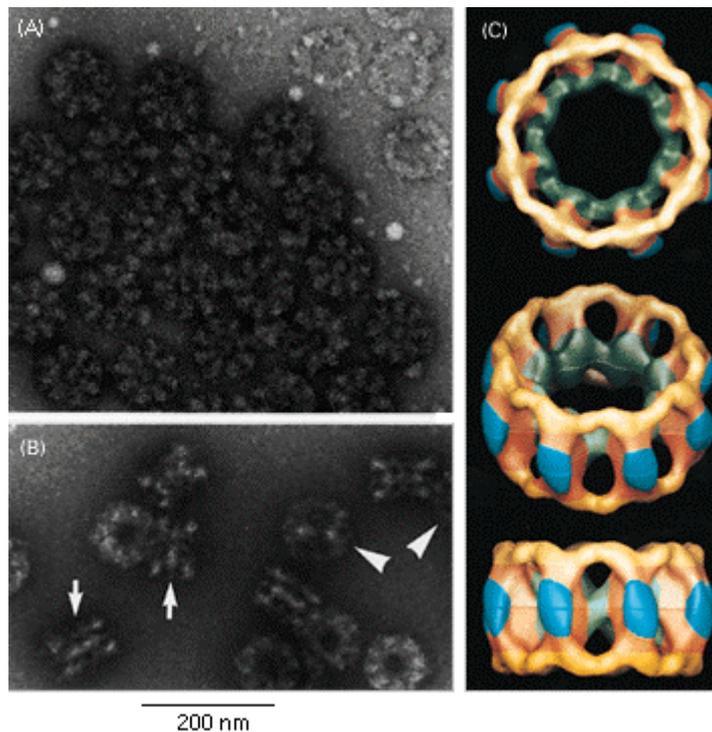
L'enveloppe nucléaire

Le trafic bidirectionnel apparaît continu entre le cytosol et le noyau. La plupart des protéines qui ont une fonction dans le noyau - incluant les histones, les ADN et ARN polymérase, les protéines régulateurs de gènes, les protéines permettant les transformations physicochimiques (le "processing" des anglo-saxons) de l'ARN - sont sélectivement importés du cytosol où elles ont été synthétisées vers l'intérieur du compartiment nucléaire. Dans le même temps, les ARNt et ARNm qui ont été synthétisés dans le noyau sont eux exportés vers le cytosol. Comme le processus d'importation, le processus d'exportation est sélectif : les ARNm, par exemple, sont exportés seulement après qu'ils aient été modifiés correctement par un « processing » de cet ARN dans le noyau. Dans certains cas, le processus de transport est complexe : les protéines

ribosomales, par exemple, sont synthétisées dans le cytosol, importées dans le noyau où elles sont assemblées en particules avec des ARNr nouvellement synthétisés- et ensuite ré-exportées vers le cytosol en tant que sous-unité ribosomale. Chacune de ces étapes implique un transport sélectif au travers de la membrane nucléaire.

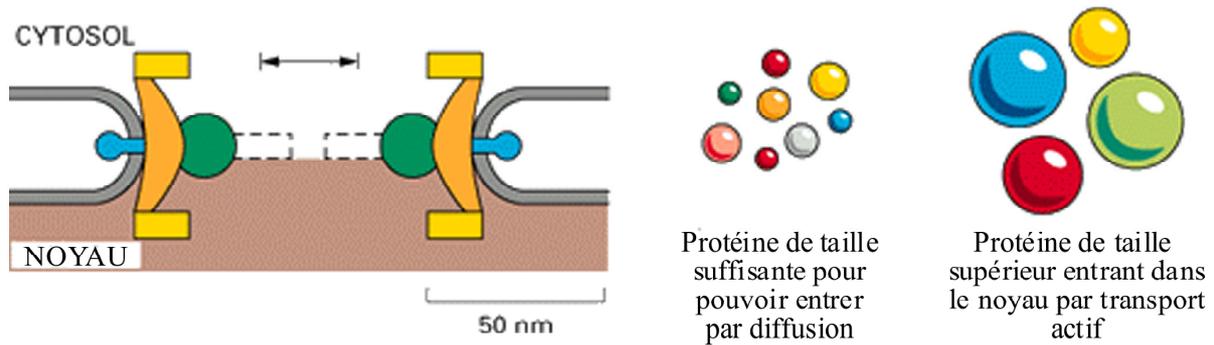
I- LES PORES NUCLEAIRES

L'enveloppe nucléaire chez tous les eucaryotes est perforée par des pores nucléaires. Chaque pore est formé par une structure élaborée appelée le complexe du pore nucléaire, qui semble être composé d'au moins 100 protéines différentes, arrangées selon une symétrie octagonale.



Micrographie électronique (A et B) et reconstitution par ordinateur en trois dimensions (C) de complexes de pore nucléaire (de J.E. Hinshaw and R. Milligan, Cell 69:1133-1141, 1992. © Cell Press.)

Chaque complexe contient un ou plusieurs canaux aqueux ouverts à travers lesquels des molécules solubles dans l'eau peuvent traverser la membrane nucléaire par diffusion passive, mais seulement si leur taille est suffisamment petite : les molécules inférieures à 5000 Da diffusent si rapidement que l'on peut considérer que l'enveloppe nucléaire est totalement perméable à celles-ci.



Des études ont montré que la taille des canaux est d'environ 9nm de diamètre pour 15nm de longueur, occupant donc un faible volume du complexe de pore nucléaire. Mais une protéine de taille supérieure, par exemple une protéine de 44 000 Da met environ 40mn pour être équilibré entre le cytosol et le noyau. Et comment pourrais passer une protéine de 100 à 200 000 Da ? Il y a donc nécessité d'un transport actif pour faire traverser l'enveloppe nucléaire à des protéines d'une taille relativement importante.

II- LE NLS (NUCLEAR LOCALISATION SIGNAL)

En général, plus le noyau est actif durant la transcription, plus son enveloppe contient un nombre important de complexe de pore nucléaire. L'enveloppe nucléaire d'une cellule de mammifère type contient entre 3000 et 4000 NPC (Nuclear Pore Complex). Si la cellule synthétise de l'ADN, elle a besoin d'importer environ 10^6 molécules d'histones du cytosol toute les 3 minutes, pour compacter l'ADN néosynthétisé en chromatine. Cela signifie que chaque NPC doit transporter environ 100 molécules d'histone par minute. Si la cellule est en croissance rapide, chaque NPC doit également transporter chaque minute 6 sous-unités ribosomales nouvellement assemblées du noyau, où elles sont produites, vers le cytoplasme, où elles sont utilisées. Et ceci n'est qu'une faible part du trafic total qui transite à travers les pores nucléaires.

Lorsque les protéines nucléaires sont expérimentalement extraites du noyau et micro-injecté dans le cytoplasme, une grande partie d'entre-elles se réaccumulent dans le noyau. La sélectivité de l'importation de ces protéines réside dans des résidus appelé Nuclear Localisation Signal (NLS). Ce signal est présent uniquement chez les protéines nucléaires. Il peut être localisé n'importe où dans la séquence de la protéine, et consiste généralement en une courte séquence (souvent entre 4 et 8 acides aminés) qui varie selon les protéines nucléaires mais souvent riche en acides aminés chargé positivement (Lysine, Arginine) et contenant parfois des prolines : *exemple* : **LysLysLysArgLys**. Chez beaucoup de protéine nucléaire, la séquence est séparé en deux blocs de 2 à 4 acides aminés chacun, les 2 blocs étant séparé l'un de l'autre par environ 10 acides aminés. Ce signal forme parfois une boucle à la surface de la protéine. Le NLS est également dans certain cas phosphorylé ce qui peut induire son inactivation, puis être déphosphorylé et donc activé : la cellule peut ainsi contrôler l'exportation de ces protéines.

Enfin, si il existe des séquences de localisation nucléaire, il existe également des séquence d'exportation nucléaire, appelé NES (Nuclear Export Signal).

III- STRUCTURE DES PORES NUCLEAIRES

Le NPC est une structure supra-moléculaire d'environ 125 million Da chez les vertébré et de 65 million Da chez la levure.

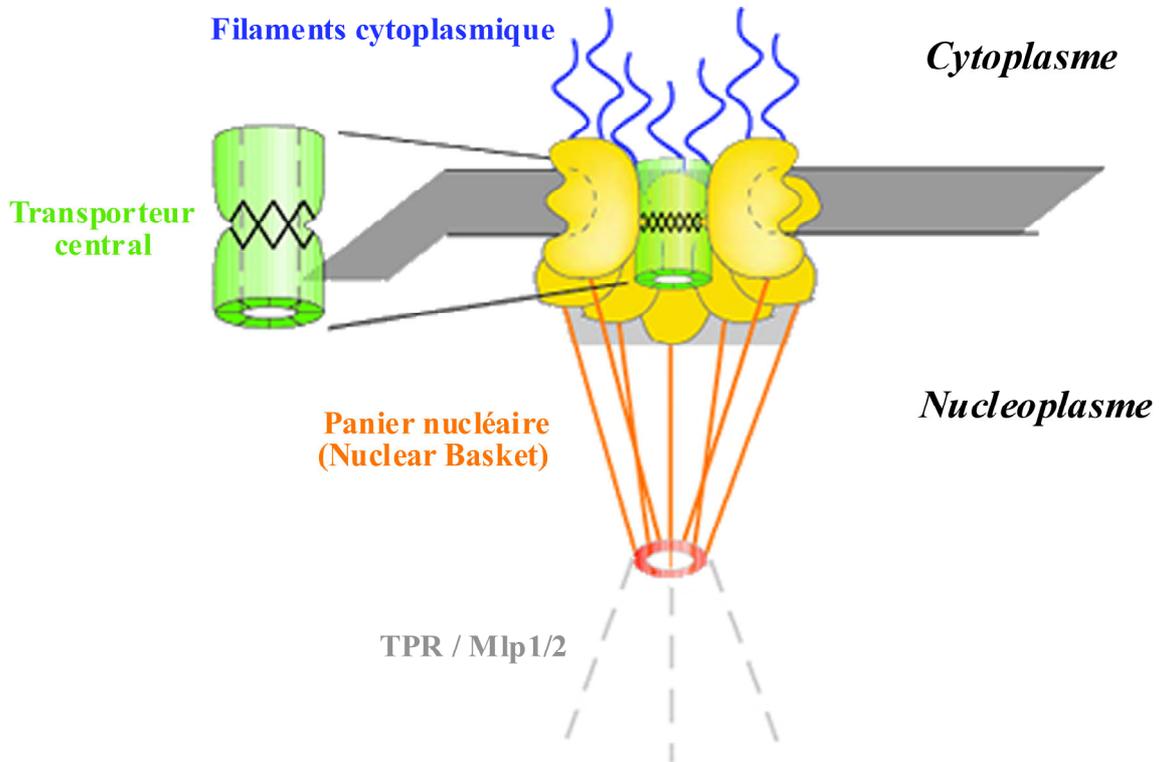
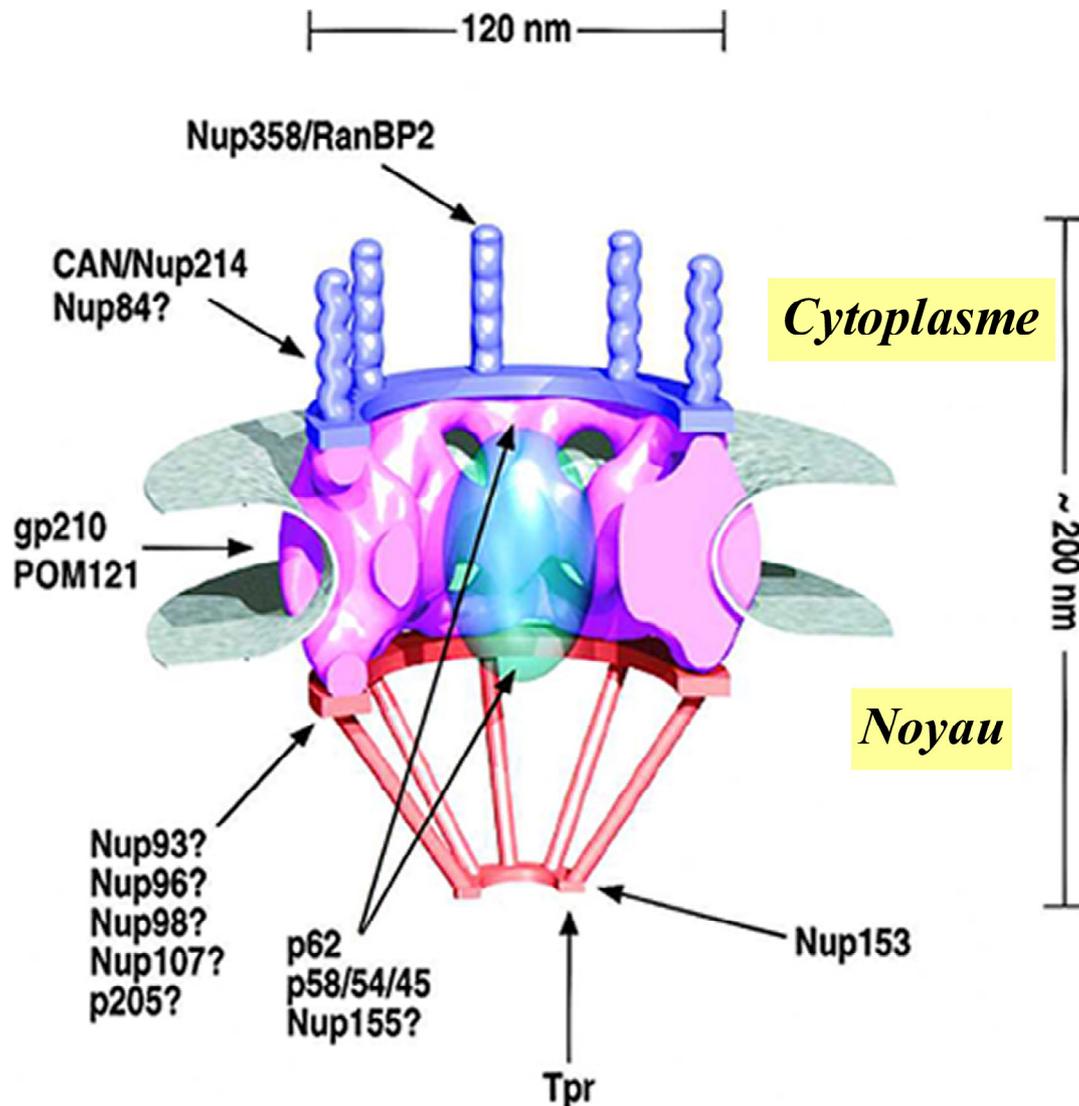


Schéma général d'un Complexe de pore nucléaire

Les NPC s'assemblent après chaque cycle cellulaire par en procédant par étape d'assemblage de sous-complexe pré-formé. Ils sont composés de 30 à 50 protéines différentes référencé comme des nucléoporines (Nups), chacune de ces nucléoporines pouvant être présente en 8 ou plus copies par NPC. Une famille de Nups contenant un nombre important de peptide FG répété est distribuée à travers tout le NPC.



Complexe de pore nucléaire humain

Quelques exemples de protéine et de catégorie de protéines du NPC :
 Les protéines POM : Protéines du pore nucléaire intégrées à la membrane.
 Les protéines Nup : Les nucleoporines. Environ 30 Nups différentes
 Nic96p: protéines interagissant avec le Core et les filaments cytoplasmique du NPC. Jouerait un rôle dans l'assemblage du pore nucléaire et/ou dans la formation de structure majeur du pore
 MLP1/2p (myosin-like proteins) et Tpr : constituant majeur des filaments cytoplasmique du NPC, respectivement chez la levure et chez les vertébrés.

IV- LE TRANSPORT NUCLEAIRE ACTIF

A - Fixation (Docking) de la protéine possédant un NLS sur la face cytoplasmique du NPC

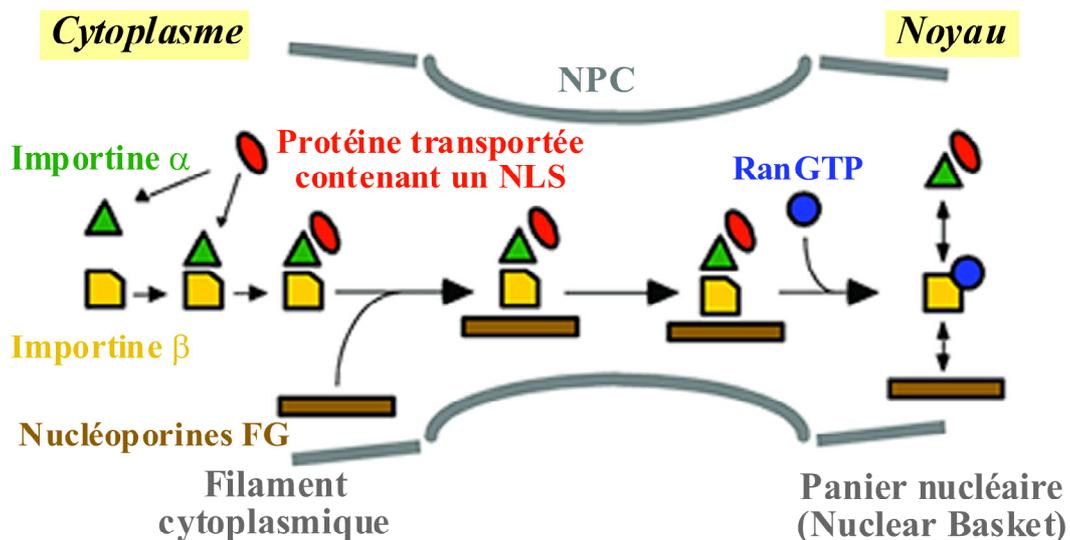
Cette étape est indépendante de l'énergie et de la température. Elle fait intervenir deux type de protéines : les karyopherines α et β et la protéine RanGTP.

Beaucoup de protéines portant un NLS ou un NES sont reconnues par les karyophérines. Les karyophérines forment trois classes de protéines : les importines, les exportines et les transportines. En présence de RanGTP, les exportines fixent les transporteurs, au lieu de les relâcher comme le font les importines. Les transportines, elles, semblent moins sensibles à Ran.

Les karyophérines α (cf. structure) s'accrochent au NLS et augmentent son affinité lorsqu'une karyophérine β (cf. structure) se fixe sur une α . Les sous-unités de karyophérines coopèrent pour fixer les séquences répétées FG des nucléoporines : les karyophérines β fixent les nucléoporines sur les répétitions peptidiques FG. Treize des trente nucléoporines possédant une séquence peptidique répétée FG, les karyophérines peuvent charger les protéines substrats sur de multiples sites le long du NPC (il existe probablement aux alentours de 200 sites de fixation aux karyophérines).

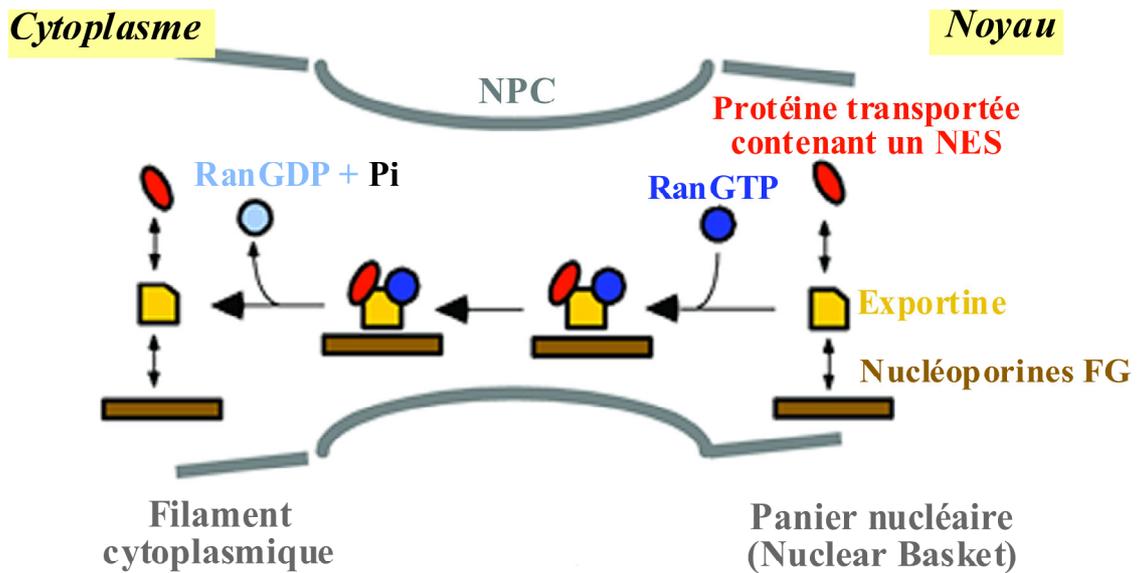
B - Import dans le noyau et désassemblage du complexe d'importation

Une fois fixé, le complexe pénètre dans le pore nucléaire. Le mécanisme de translocation semble inconnu. Arrivé dans le noyau, RanGTP se fixe aux karyophérines β et cause la dissociation du complexe et de la nucléoporine par un mécanisme allostérique.



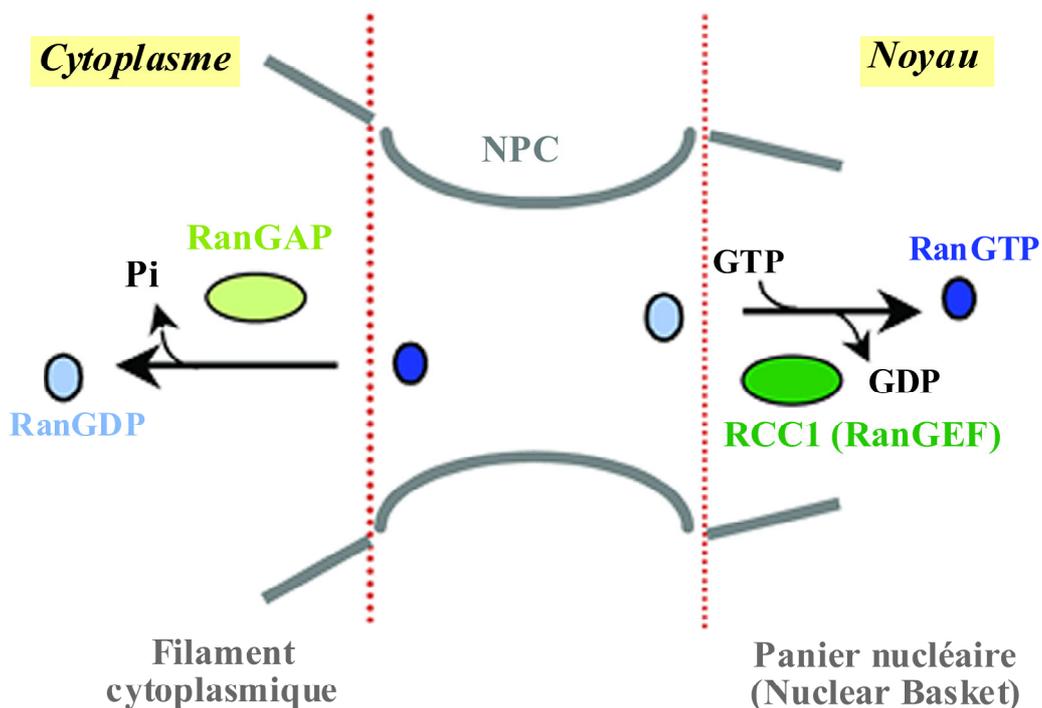
Dynamique moléculaire de l'import nucléaire

L'exportation se fait selon un procédé similaire, à cela près que l'on n'a plus affaire à des importines mais à des exportines et que la molécule responsable de la dissociation du complexe est RanGDP.



Dynamique moléculaire de l'export nucléaire

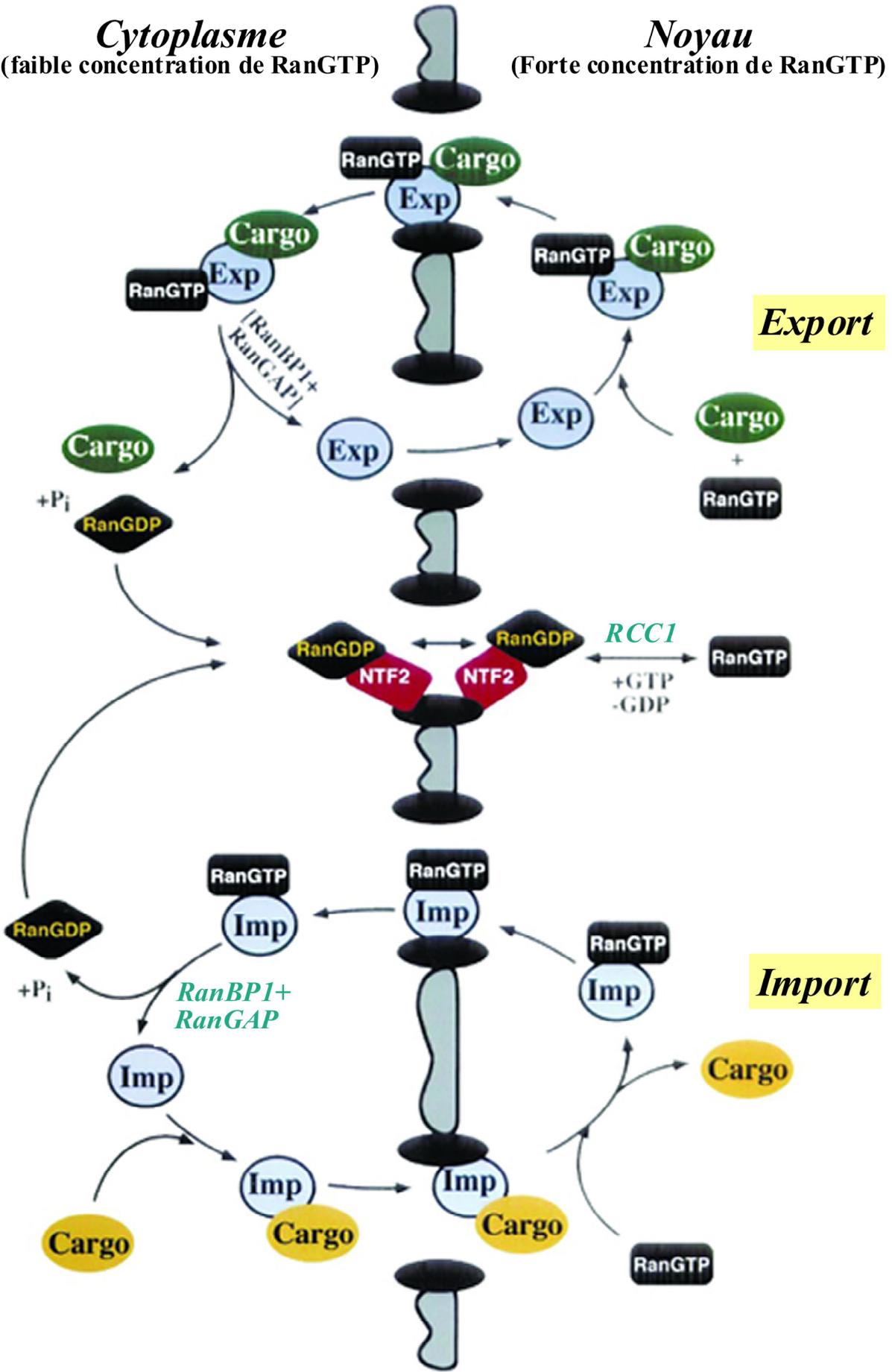
Le transport nucléaire est donc une suite d'importation et d'exportation de protéine gouvernée par un gradient de RanGTP, faiblement concentré dans le cytoplasme et fortement concentré dans le noyau. Et pour maintenir ce niveau de RanGTP dans le noyau, une enzyme, RCCI ou RanGEF (cf. structure), convertie le RanGDP en RanGTP, tandis que dans le cytoplasme, une autre enzyme, RanGAP (cf. structure), convertie le RanGTP en RanGDP.



Distribution asymétrique du Ran-GTP à travers le NPC

Cytoplasme
(faible concentration de RanGTP)

Noyau
(Forte concentration de RanGTP)



d'après D. Görlich and U. Kutay, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1999. 15:607–60

BIBLIOGRAPHIE:

Revue :

S.K. Vasu and D.J. Forbes, Nuclear pores and nuclear assembly, *Current Opinion in Cell Biology* 2001, 13:363–375

D. Görlich and U. Kutay, Transport between the cell nucleus and the cytoplasm, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1999. 15:607–60

K. J. Ryan and S. R. Wentz, The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm, *Current Opinion in Cell Biology* 2000, 12:361–371

I. G. Macara, Transport into and out of the Nucleus

Articles :

J.E. Hinshaw and R. Milligan, *Cell* 69:1133-1141, 1992

M. P. Rout et al., The Yeast Nuclear Pore Complex: Composition, Architecture, and Transport Mechanism, *The Journal of Cell Biology*, Volume 148, Number 4, February 21, 2000 635–651

B. Fahrenkrog, The Yeast Nucleoporin Nup53p Specifically Interacts with Nic96p and Is Directly Involved in Nuclear Protein Import, *Molecular Biology of the Cell* Vol. 11, 3885–3896, November 2000