

Echanges nucléo-cytoplasmiques :

I Les modalités de transport des macromolécules : les principales voies

On s'intéresse au transport de protéines et d'acides nucléiques entre le noyau et le cytoplasme à travers les pores nucléaires.

Dans une cellule il y a du matériel génétique enfermé dans le noyau et le tout au sein d'une cellule qui contient du cytoplasme et divers autres organites. Une cellule, qu'elle soit isolée (ex : une cellule sanguine) ou qu'elle soit au sein d'un tissu, elle est soumise à de nombreux stimuli extracellulaires qui peuvent être :

- Electrochimiques : changement de température, de lumière...
- Développementaux : qui induisent le développement
- Des signaux physiologiques : apport d'une hormone qui va arriver à la surface d'une cellule.

Ces signaux modulent l'expression du matériel génétique de la cellule, donc aboutissent à une modification des activités transcriptionnelles. Cela détermine différentes expressions de protéines et finalement, ça détermine le phénotype de la fonction cellulaire. Cela met donc en jeu le mouvement de molécules entre le noyau et le cytoplasme (une hormone va être transportée de la surface de la cellule jusqu'au noyau et des ARN exprimés dans le noyau vont être transportés du noyau jusque dans le cytoplasme).

Une cellule eucaryote est compartimentalisée, ce qui lui permet d'assurer différentes fonctions (ex : mitochondrie). Maintenir la compartimentation et la distribution de molécules requiert de l'énergie. C'est valable pour les cellules animales et végétales (il y a les chloroplastes en plus dans les cellules végétales).

Quels sont les types de transport de macromolécules (ARNs et protéines) ?

- La diffusion : selon le gradient de concentration
- Le transport transmembranaire : à travers des pores, des canaux, des translocateurs pour traverser les membranes lipidiques
- Le transport dépendant du cytosquelette, les moteurs moléculaires (=protéine qui hydrolyse l'ATP pour se déplacer sur une fibre de cytosquelette) :
 - Grâce à une vésicule lipidique, faire sortir une grosse quantité de matériel. Elles ont pour cible la membrane.
 - Ou de simples particules transportées (ex : certains ARNs transportés dans certaines zones du cytosquelette)

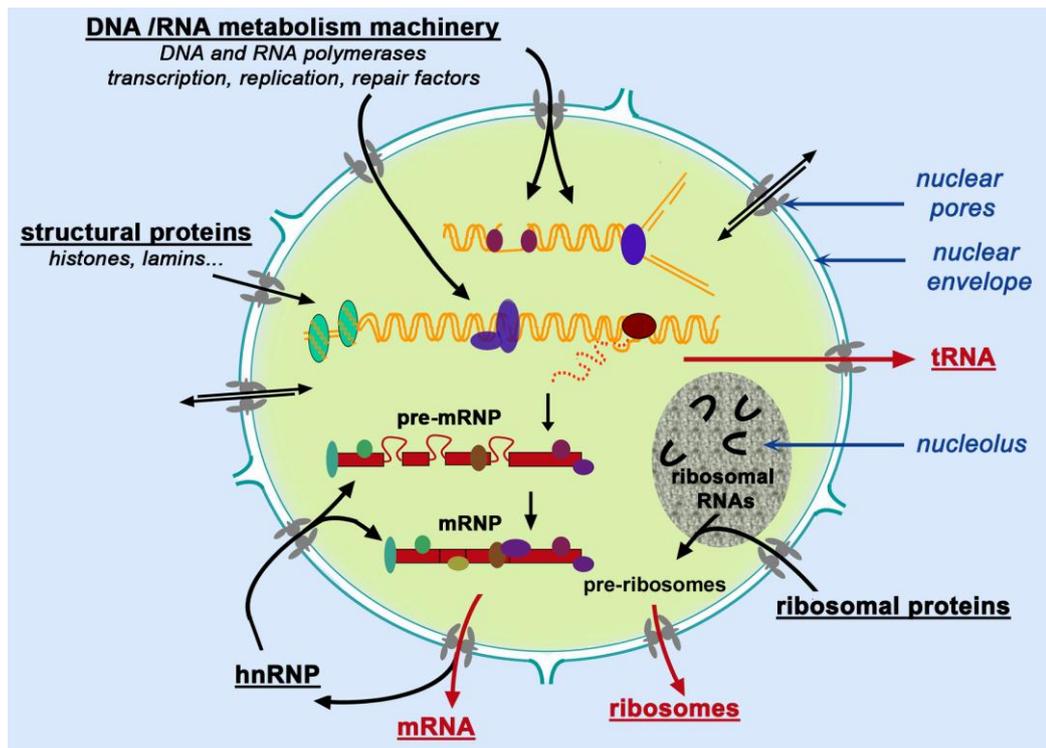
A quels problèmes faut-il faire face ?

- au problème de la spécificité : il faut définir un signal d'adressage pour un certain compartiment donné (ex : séquence dans un polypeptide) qui se trouve dans la structure primaire ou tertiaire.
- La directionnalité est imposée et elle est plus ou moins irréversible (ex : certaines protéines sont importées dans le noyau et ne sont pas réexportées dans le cytoplasme).
- Le transport de macromolécules peut être couplé ou pas à la synthèse de ces macromolécules (ex : dans le RE, adressage cotraductionnel couplé à la synthèse). Les protéines sont transportées sous une forme dénaturée, non native (contrairement aux

protéines qui sont adressées au noyau qui sont dans une forme tri-dimensionnellement correcte).

Les acides nucléiques sont synthétisés dans le noyau et les protéines dans le cytoplasme. De plus, en extracellulaire, il existe aussi des protéines et acides nucléiques (tels que les virus).

1. Echanges nucléocytoplasmiques : par exemple tous les ARN sont exportés (ARNm, ARNt, ARNr). Et par exemple les facteurs de transcription (de manière régulée), les protéines structurales (ex :les lamines, les histones) sont importées.



2. Echanges
 - Vers tous les compartiments cellulaires (ex : la mitochondrie) : comme des enzymes synthétisées dans le cytoplasme et importées dans la mitochondrie ou le péroxysome. Ou encore des protéines transmembranaires ou sécrétées qui sont importées dans le RE.
 - Entre le RE et la membrane : grâce à des vésicules. C'est l'exocytose.
 - Entre la membrane et l'intérieur de la cellule. C'est l'endocytose.
3. Echanges d'acides nucléiques : une grande partie des ARNm sont exportés. Et certains de ces ARNm vont être adressés à des sites subcellulaires spécifiques (ex : l'ARN ou l'ADN viral ou alors dans certains neurones).

II Les pores nucléaires :

Ce sont des zones perforées au sein de l'enveloppe nucléaire qui permettent le passage de molécules. Ils comportent une zone dense aux électrons (qui comporte donc du matériel protéique).

Au microscope électronique, on voit que ces pores ont une structure très élaborée : on a des émanations sous forme de filaments (cytoplasmiques et nucléaires) au nombre de 8 = organelle très symétrique et très structuré. Ces filaments se rejoignent au niveau nucléaire en formant un panier de basket. Ces pores se situent au point de fusion entre la membrane nucléaire interne.

Il existe un nombre variable de pores entre les cellules : de 100 à plusieurs centaines de milliers, dépendant de la taille du noyau (environ 20 pores par micromètre carré). Taille : une centaine de nanomètres de diamètre avec un canal interne d'environ 30 nm. Masse : 100×10^6 Daltons (ce qui est 40 fois plus qu'un ribosome !!!).

Il n'existe pas de continuité entre le noyau-cytoplasme et l'espace péri-nucléaire (entre les 2 membranes).

Ces pores sont constitués uniquement d'une répétition d'une trentaine de protéines qui sont appelées des nucléoporines (Nup) qui sont répétées en de multiples copies.

Comment les a-t-on découvert ?

Principalement par trois approches :

- Génétique : chez des mutants de levure, on a regardé l'export d'ARNm (on a mis une sonde couplée à la queue polyA des ARNm et couplée à un fluorochrome pour localiser les ARNm). Des chercheurs ont étudié chez ces mutants les défauts d'export des ARNm. Il s'est avéré que c'était des mutants de protéines des pores nucléaires.
- Biochimique : purifier les pores nucléaires et regarder leur constitution en protéines (par séquençage ou spectrométrie de masse). On a pu établir la liste précise des protéines constituant un pore nucléaire.
- Prédiction in silico : quand on identifie une nucléoporine chez la levure, on regarde dans le génome humain s'il y a une protéine homologue (donc on va en déduire que c'est une nucléoporine).

Caractéristiques :

- La structure du pore nucléaire est globalement **conservée** au cours de l'évolution. Ils sont constitués d'une structure en **sous-complexes** qui remplissent chacun une fonction particulière.
- La **stoéchiométrie** : les nucléoporines sont présentes en 8 copies ou multiples de 8 copies.
- **Orientation et disposition** : le pore n'est pas symétrique dans l'axe longitudinal. Certaines nucléoporines sont présentes des 2 côtés (noyau et cytoplasme), d'autres seulement d'un seul côté (noyau ou cytoplasme). Ces dernières forment les filaments du cytosquelette.

Les motifs protéiques spécifiques sont :

- **Motifs transmembranaires**. Dans la structure primaire des nucléoporines, on voit qu'elles contiennent un nombre limité de motifs protéiques. De plus, il y a seulement 3 protéines qui assurent l'ancrage au niveau des membranes (= nombre très limité).
- Il y a certaines protéines qui présentent beaucoup de **répétitions de dipeptides** (répétition FG = phénylalanine et glycine). Ces répétitions sont fortement hydrophobes (aromatiques), ils médient les interactions avec les facteurs transportés au sein du pore nucléaire. Ces répétitions sont présentes dans beaucoup de nucléoporines, en particulier celles qui sont dans l'axe de transport (filaments cytoplasmiques et au niveau du canal nucléaire).
- Domaines **coiled-coil** = domaines d'interaction entre les protéines. Ils permettent l'empilement des protéines.
- Motif **beta-propeller** (propeller = turbine en anglais) : des domaines se replient entre eux pour donner des cylindres, qui constituent des surfaces d'interaction protéine-protéine pour coordonner leur assemblage.

- Motif **alpha-solénoïde** : formé d'empilement d'hélices alpha (environ 20). Cet empilement forme lui-même une hélice courbée. Ces protéines stabilisent la courbure membranaire en stabilisant l'interaction lipide-protéine.

Il faut faire attention car le transport nucléocytoplasmique ne concerne pas toutes les molécules. Un pore nucléaire est perméable à toutes les molécules qui sont plus petites que 50kDa (ex : ions) de manière passive. Pour les molécules qui sont plus grosses, le transport est actif : il nécessite de l'énergie, il est **sélectif** (seules certaines protéines sont transportées) et il est **efficace**.

Par pore nucléaire, on a environ 100 histones transportées /min. Pour les sous-unités ribosomiques, on estime l'export à 5/pore/min.

Concernant le transport : 3 règles du jeu :

- Les protéines importées ou exportées du noyau présentent un **signal d'adressage** = NLS et NES. Ce sont de courtes séquences peptidiques qui sont situées dans la séquence primaire de la protéine.
- Ces signaux d'adressage sont reconnus par des récepteurs solubles = **Karyoferrines**.
- Ces karyoferrines ont la capacité d'**interagir** avec les nucléoporines à répétition FG. Ce sont elles qui assurent le pont entre les molécules transportées et le pore nucléaire. De plus elles interagissent avec une GTPase (Ran) qui est le régulateur clé du transport nucléaire.

L'import des protéines :

Il a été illustré par l'analyse de l'import de sous-unités protéiques codées par le virus SV40. Les chercheurs ont identifié une séquence dans la protéine T qui est la séquence qui permet de reconnaître le pore nucléaire.

Les NLS classiques sont des séquences courtes d'acides aminés chargés positivement (Lysine, Arginine) qui n'ont pas de position spécifique (peuvent être au début, au milieu ou à la fin de la protéine). Ces séquences ne sont pas clivées durant le transport. Il y a différents types de NLS :

- Simple ou en 2 parties : contiennent des suites d'acides aminés basiques. Mais ça ne concerne que 60% des protéines.
- Les autres : ont des NLS non prédictives. Concerne 40% des protéines. (Donc il est difficile de détecter si une protéine va être importée dans le noyau car seulement 60% d'entre elles ont une NLS détectable)

Expérience : In vitro on perméabilise des cellules de manière à ne garder que les noyaux. On injecte dans la cellule une protéine à laquelle on ajoute une NLS et une fluorochrome (FITC) : on remarque que la protéine ne rentre ni dans le pore nucléaire, ni dans le noyau. Si on rajoute un extrait cellulaire, on remarque que la protéine se colle aux pores mais ne rentre pas dans le noyau. Maintenant si à tout cela on ajoute de l'énergie, la protéine va réussir à rentrer dans le noyau. Ceci met en évidence 2 étapes dans le transport : une étape de ciblage (adressage) et une étape de translocation (qui est énergie dépendante).

D'après l'expérience précédente, on peut prédire qu'il y a des protéines de l'extrait cellulaire qui sont impliquées dans l'étape d'adressage et de translocation. Si on fractionne un extrait cellulaire, on va pouvoir déterminer quelle fraction possède les bons facteurs. Ces facteurs sont les karyoferrines (=importines).

Donc on a une protéine (qu'on appelle cargo et qui possède une NLS) qui va fixer une importine alpha, sur laquelle vient s'ajouter une importine bêta1 (parfois liaison directe importine bêta-cargo).

Cette dernière a la capacité de reconnaître les répétitions FG des nucléoporines. Donc le complexe rentre dans le noyau. Et enfin cette importine possède la particularité d'interagir avec Ran-GTP. Ran-GTP est une protéine qui se trouve exclusivement dans le noyau, elle permet de dissocier le complexe apporté pour relarguer dans le noyau cette protéine à NLS. Enfin l'importine B1 peut sortir du noyau.

Ce Ran-GTP est une petite GTPase (petite protéine G). Elle existe sous 2 formes (une liée au GTP, l'autre au GDP) interconvertibles et elle régule le transport nucléaire. On passe de Ran-GTP au Ran-GDP grâce à l'activité GTPasique intrinsèque de la molécule (hydrolyse). On passe de Ran-GDP au Ran-GTP grâce à des échanges GDP-GTP (favorisés par des cofacteurs tels que RCC1). Ce cofacteur est exclusivement lié à la chromatine dans le noyau. Les facteurs qui favorisent l'hydrolyse du GTP sont des protéines GAP, qui sont associés aux filaments cytoplasmiques du pore nucléaire. Donc les enzymes clés du cycle de Ran sont compartimentalisées. Par conséquent, on aura un gradient de concentration de la protéine Ran-GTP dans le noyau, et de Ran-GDP dans le cytoplasme. Ce transport est exclusivement unidirectionnel.

Quels que soient les types de NLS, la seule variation qu'il puisse y avoir sont les différents types de karyoferrines qui reconnaissent directement certaines protéines. Puis le principe est le même.

L'export des protéines :

Il met en jeu des séquences NES hydrophobes riches en Leucine. Ces protéines à NES sont aussi capables de lier un récepteur et une karyoferrine (ici = exportine = CRM1). Une exportine a la capacité de se lier à la NES uniquement en présence de Ran-GTP. On va avoir formation d'un complexe d'export (complexe ternaire) constitué de NES-exportine et Ran-GTP dans le noyau. Ce complexe est exporté du noyau vers le cytoplasme. Dans le cytoplasme, RanGTP est hydrolysé en Ran GDP grâce à des protéines qui sont sur les filaments cytoplasmiques. Ceci dissocie le complexe. Le transport est là encore unidirectionnel.

Il existe des dizaines de karyoferrines différentes mais le principe est toujours le même : elles interagissent avec Ran-GTP de manière compétitive pour les importines ou de manière coopérative pour les exportines.

Qu'est-ce qui se passe au sein même du canal ?

Le canal du pore nucléaire n'est pas ouvert, il est complètement occupé par ces nucléoporines à répétition FG. Ces dipeptides hydrophobes ont la capacité d'interagir entre eux par des liaisons hydrophobes. Ceux-ci forment une maille imperméable, un réseau complètement fermé par ses interactions FG-FG. Les karyoferrines ont la capacité d'interagir avec ces répétitions (en dissolvant les interactions FG-FG) donc elles peuvent rentrer à l'intérieur de cette maille, ce sont les seules protéines capables de passer.

Ensuite donc le cargo est relâché dans le noyau et est piégé dedans (directionnalité et irréversibilité du transport). La karyoferrine peut retraverser ce canal pour faire circuler d'autres protéines.

III Autres systèmes de transport de protéines.

a) Réticulum endoplasmique.

Un peptide signal est reconnu par un récepteur soluble (SRP : Signal Recognition Protéine) qui médie l'interaction de la protéine d'intérêt avec le translocon. Le translocon est un complexe protéique transmembranaire à travers lequel les protéines dénaturées sont injectées au cours de leur synthèse

par le ribosome. Les protéines passent donc sous forme débobinées, sous forme de chaînes qui traversent le canal au cours de leur synthèse.

b) Mitochondrie

Toutes les protéines ne sont pas transportées dans la mitochondrie, certaines sont synthétisées directement dans la mitochondrie (chaînes métaboliques).

Les protéines devant aller dans la mitochondrie ont un signal d'adressage mitochondrial, qui interagit avec un complexe appelé transporteur de la « outer membrane », leur permettant ainsi d'être transportées depuis le cytoplasme vers l'intérieur de la mitochondrie ou vers l'espace inter-membranaire.

Les protéines passent sous forme débobinées, sous forme de chaînes qui traversent le canal au cours de leur synthèse.

c) Peroxisome

Les peroxysomes sont des compartiments à forte activité enzymatique (hydrolyse matériel extérieur + métabolisme lipidique...).

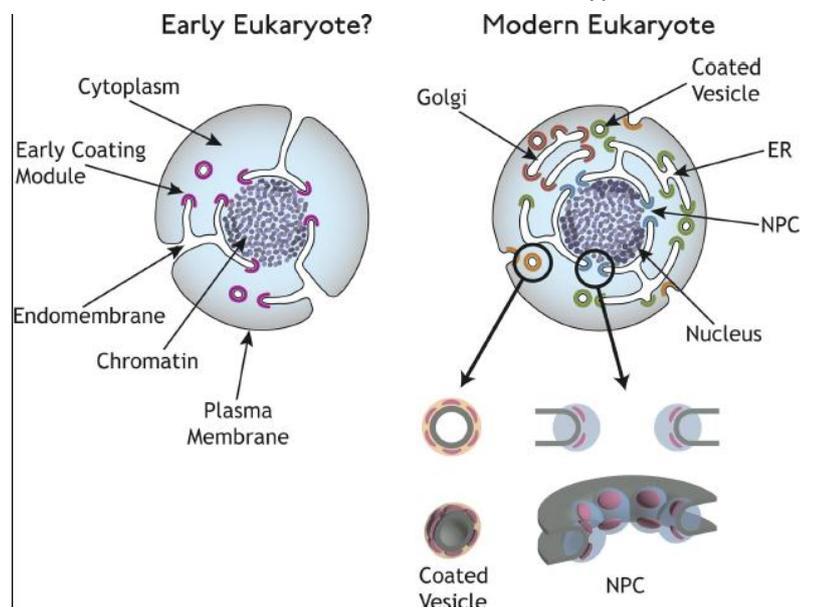
Un signal d'adressage (Peroxisomal Targeting Sequence PTS) est reconnu par un récepteur soluble (PEX 5) qui a la capacité d'interagir avec le transporteur formé de protéines transmembranaire.

Les protéines passent sous forme natives (repliées, structure ternaire voir quaternaire voire même assemblées en complexes multi-protéiques).

Remarques :

- Tous ces systèmes sont similaires : signal d'adressage → récepteur soluble → transport.
- Ce système est très conservé, il est d'origine procaryotique (ce qui est logique puisque la mitochondrie était à l'origine une bactérie).
- Les pores nucléaires sont quant à eux des transports cellulaires spécifiques des eucaryotes (puisque noyau).
- On retrouve les protéines de transport du pore nucléaire dans d'autres structures de transport.

➤ Les pores nucléaires et les protéines des manteaux vésiculaires sont formés des mêmes types de molécules (ex : SEC 13 est présente dans les 2). On peut supposer que tout le réseau d'endomembrane des cellules eucaryotes pourrait avoir évolué à partir d'un ancêtre commun formé d'un nombre limité de protéines. Le plus ancien eucaryote aurait une sorte de pro-noyau formé d'une zone où l'information génétique est rassemblée qui commence à être compartimenté par la présence d'endomembrane formant des invaginations. Ces invaginations sont permises par des structures d'endocytose qui auraient évoluées pour former, à terme, les pores nucléaires.



IV. Transport des ribonucléoparticules.

a) ARN ribosomique (majoritaire).

Il n'existe pas sous forme nu, il est toujours lié aux protéines ribosomales ou sous forme de sous-unités ribosomales. Les protéines auxquelles il est associé présentent des NES permettant l'interaction avec l'exportine et Ran-GTP, et donc l'export dans le cytoplasme.

Il en est de même pour les ARN de transfert, les petits ARN et certains ARN viraux, dont celui du VIH.

☞ On a donc des voies classiques d'export, si ce n'est que le cargo est ici un ARN.

b) ARN messagers et autres ARN viraux.

Ils utilisent un autre facteur fonctionnant indépendamment de Ran-GTP. Les ARNm sont associés au cours de leur maturation, ou de leur synthèse par l'ARN polymérase II, à des protéines qui servent d'adaptateur pour la machinerie d'export. Ces protéines sont capables de recruter le dimère d'export (chez les eucaryotes) formé d'une petite protéine liant soit directement l'ARN soit les protéines ayant été déposées sur l'ARN au cours de sa synthèse. Le dimère d'export a la capacité de reconnaître les nucléoporines à répétition FG, permettant ainsi la pénétration dans le pore nucléaire. Une hélicase à ARN, associée sur les filaments cytoplasmique des pores nucléaires, débobine l'ARNm une fois qu'il est exporté et éjecte le récepteur associé à l'ARNm, imposant ainsi la direction. L'hélicase est une protéine hydrolysant l'ATP pour assurer un changement de conformation de l'acide nucléique. Le dimère d'export peut, quant à lui, rentrer dans le noyau.

Le transport des ARNm est particulièrement couplé à leur synthèse :

- les protéines recrutant le dimère d'export sont recrutées au cours de sa synthèse, souvent via l'ARN polymérase II.
- TREX (Transcription and mRNA Export) assure le couplage entre la transcription et l'export.

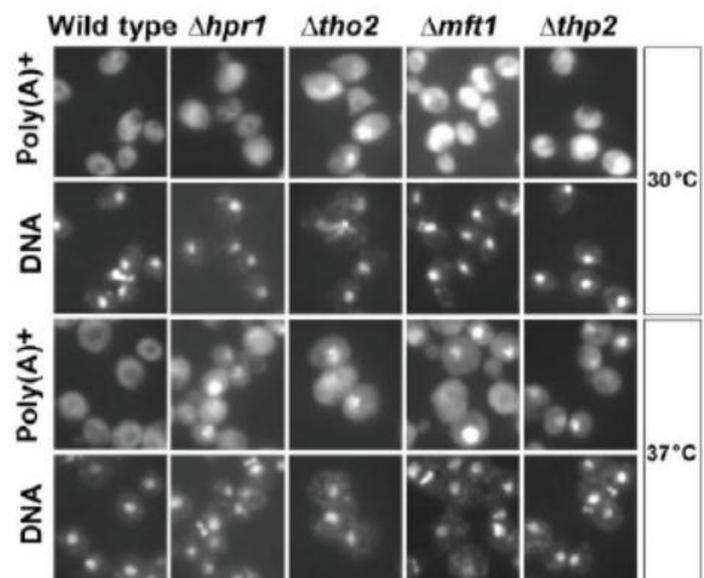
Etude d'hybridation in situ (FISH)

colonne de droite : cellules mutantes des sous-unités de TREX.

colonne de gauche : cellules sauvages

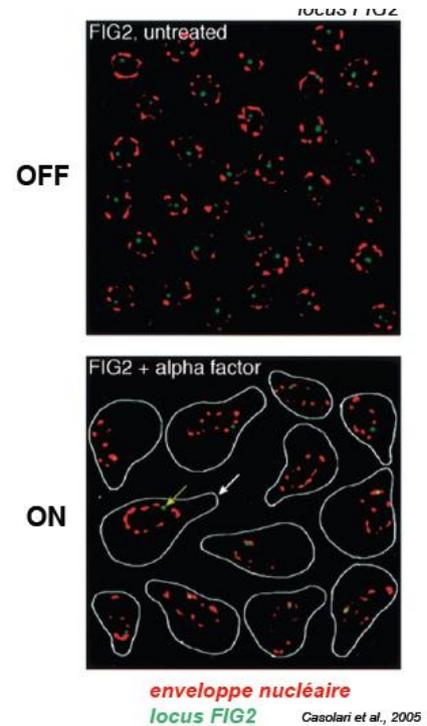
☞ sauvages : les ARNm sont surtout localisés dans le cytoplasme. Ainsi les ARNm sont rapidement transportés après leur synthèse.

☞ mutants : accumulation dans le noyau. On a donc un défaut d'export des ARNm.



Par immuno-précipitation (1h14), on trouve que TREX est localisé sur les gènes actifs. Ce complexe est donc spécifiquement associé aux gènes transcrits.

➡ Dans le cas où le gène est transcrit le locus du gène est localisé au niveau du pore nucléaire (rapprochement voir fusion des marquages rouge et vert), alors que lorsqu'il n'est pas transcrit il est clairement intranucléaire.



Un certain nombre de gènes se repositionnent au niveau du pore nucléaire lorsqu'ils sont transcrits. On suppose que ceci permet d'exporter plus rapidement l'ARNm transcrit. Cela permet aussi une adaptation rapide aux changements d'induction de transcription.

Certains ARNm sont transportés d'un point à un autre du cytoplasme, principalement en utilisant les fibres du cytosquelette, les moteurs moléculaires (enzyme convertissant l'énergie chimique ATP en énergie mécanique) dont la plus connue est la myosine. La myosine interagit avec l'actine et hydrolyse l'ATP pour induire un changement de conformation permettant la liaison à la molécule d'actine suivante. On a ainsi un déplacement directionnel.

Certains ARNm possèdent un signal d'adressage, code nucléotidique, reconnaissant la myosine et ciblant ainsi leur transport.

Exemples :

Mitochondrie :

Certains ARNm vont être transportés vers la mitochondrie pour être traduits à proximité. Ceci accélère le transport de la protéine d'intérêt dans le compartiment cible.

Réticulum endoplasmique :

Il en est de même pour le réticulum endoplasmique

Mitose :

Chez la levure, certains ARNm sont transportés spécifiquement dans la cellule fille lors de la division. Ceci permet une expression différente dans la cellule fille et dans la cellule mère, notamment un changement de type sexuel.

Fibroblaste :

Dans les fibroblastes présentant un cône de croissance (lors de la cicatrisation), l'ARNm de l'actine est transporté au niveau du cône de croissance permettant une forte synthèse d'actine et une forte activité de polymérisation du cytosquelette dans le cône de croissance. La cellule a ainsi une grande capacité de croissance et de déplacement.

Neurone :

Dans les neurones, certaines protéines sont spécifiquement exprimées à l'extrémité des axones grâce au transport spécifique d'ARNm spécifique le long des axones.

Ovocytes :

Dans de nombre ovocyte et embryon, certains ARNm, codant pour des facteurs de développement ou de régulation impliqués dans la polarisation, sont transportés vers des zones de l'œuf. Ce transport est donc indispensable à la polarisation de l'œuf.

☞ Ce transport permet de définir une **polarisation**, puisqu'on a un transport spécifique et donc la séparation de 2 zones.

c) ARN viraux.

Il y a quasiment autant de mécanismes que de virus existants, chacun détournant à sa manière la machinerie de transport cellulaire.

Exemples de mécanisme :

- endocyté puis transporté jusqu'au pore nucléaire grâce à un moteur moléculaire appelé la dynéine
- interagit directement avec les protéines du pore nucléaire.
- code pour des protéines possédant des NLS s'associant avec des acides nucléiques.

V. Mouvements moléculaires et vie de la cellule.

a) Régulation du transport.

Cette régulation permet à la cellule de répondre à des signaux physiologiques.

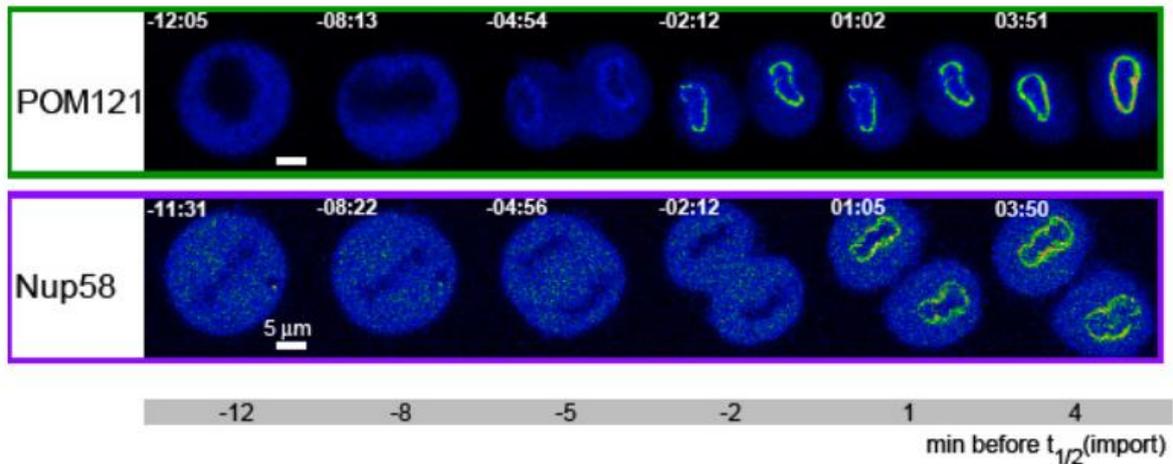
- Démasquage du NLS.
Le récepteur au gluco-corticoïdes est un facteur de transcription naturellement localisé dans le cytoplasme. Quand une hormone ou un agoniste de ce récepteur est présent, cela déplace une charpente (HSP 90) révélant ainsi un NLS. Le récepteur peut alors être transporté dans le noyau et activer ses gènes cibles.
- Modification post-traductionnelle.
Les gènes impliqués dans l'utilisation du phosphate extra-cellulaire sont activés en cas de déprivation de phosphate. Leur facteur de transcription est alors capable d'interagir avec une importine et d'être transporté dans le noyau. En revanche en cas de haute concentration en phosphate, ce facteur est majoritairement sous forme phosphorylé, il n'est alors plus capable d'interagir avec une importine mais avec une exportine. Dans ce cas la composition du milieu d'environnement influe sur la forme du facteur et sur sa capacité à interagir avec une protéine différente.
- Régulation par ancrage.
La liaison de certains facteurs de signalisation transmembranaires à leur ligand induit leur clivage. La protéine qui était naturellement près de la membrane est solubilisée et se retrouve ainsi dans le cytoplasme. Le NLS présent sur cette protéine permet alors son import dans le noyau.
- Réarrangement de pores nucléaires.
Ils sont alors plus ou moins perméables aux protéines, mais de manière non spécifique.

b) Assemblage des machineries de transport.

Il existe 2 cas de figures pour l'enveloppe nucléaire au cours de la division cellulaire :

- Elle peut ne pas se dissocier, c'est le cas des champignons. Le fuseau mitotique se forme alors au cœur du noyau et le noyau se divise par fission entre les 2 cellules.
- Elle peut se dissocier, c'est le cas des vertébrés.

Approche par microscopie :

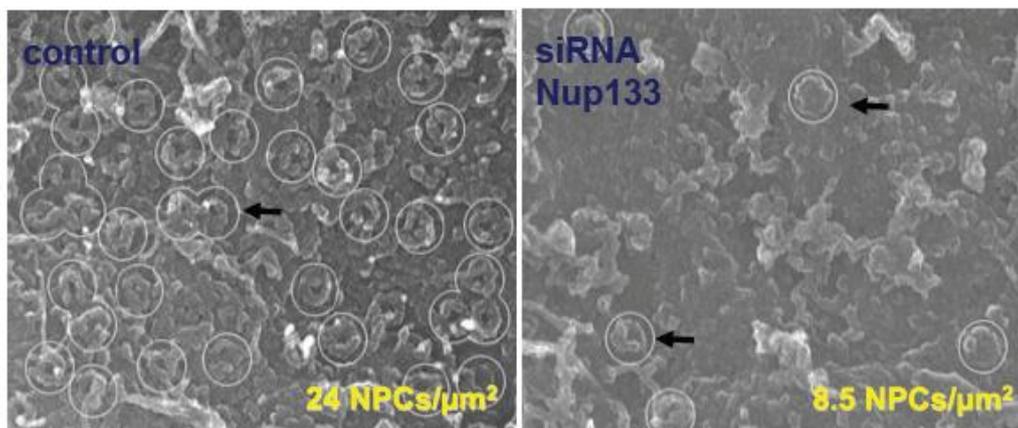


On regarde la cinétique de recrutement et de reformation de l'enveloppe nucléaire à la fin de la mitose grâce à des protéines fluorescentes (GFP). On a marqué toutes les protéines des pores nucléaires (séparément). Ici on a l'exemple de 2 protéines.

➡ POM121 est recrutée de manière plus précoce que nup58.

Historiquement on a utilisé la méthode suivante. En effet l'appareillage de la méthode précédente n'était pas encore disponible.

Approche par inactivation de gène :



Les siRNA sont de petits ARN ciblant spécifiquement la dégradation de l'ARNm de la protéine d'intérêt.

Ici on a inactivé par siRNA Nup133. On a regardé le nombre de pores nucléaires présents sur ces cellules (cercles entourés).

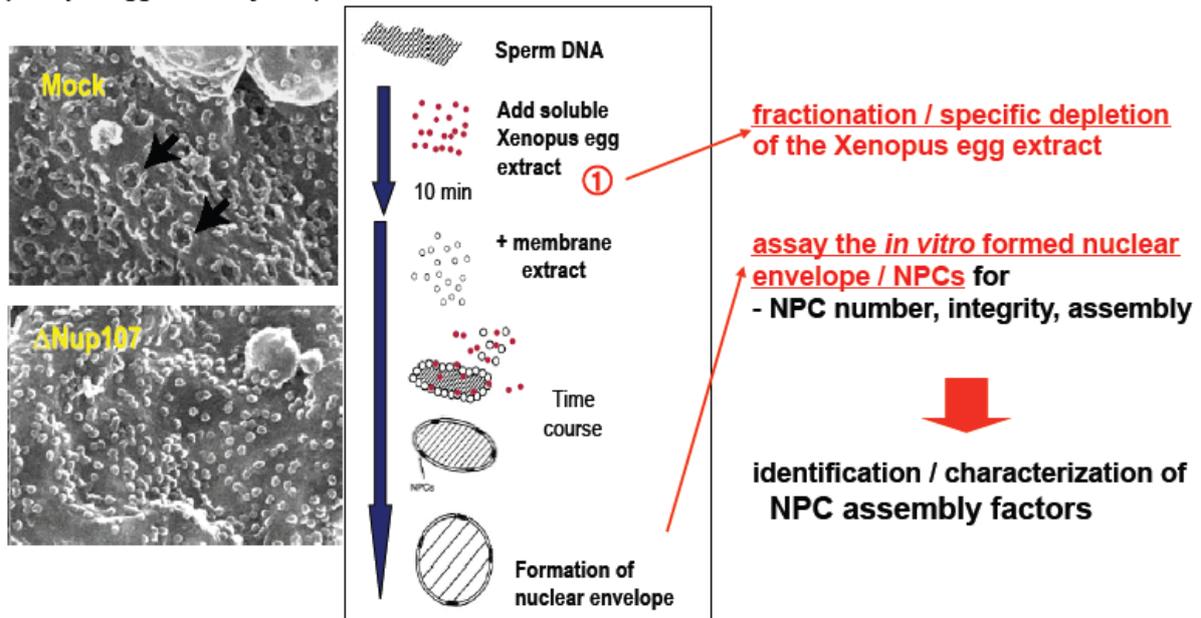
Si Nup 133 est inactivé, on a beaucoup moins de pores nucléaires.

➡ Nup 133 est essentiel à la formation des pores nucléaires : soit c'est un composant majeur, soit c'est un des facteurs clés d'assemblage du pore nucléaire. De plus Nup 133 est l'une des protéines recrutées les plus précocement. C'est donc une des molécules fondatrices des pores nucléaires.

Approche par biochimie :

Elle est basée sur la digestion d'extrait de xénope. Lorsqu'on met en présence de l'ADN de sperme de xénope et un extrait membranaire, on assiste *in vitro* à la reformation d'une enveloppe nucléaire, contenant des pores nucléaires. On peut ainsi suivre *in vitro* la synthèse et l'assemblage d'un pore nucléaire. Ensuite on peut fractionner l'extrait, enlever certaines protéines, en rajouter d'autres pour voir quelles sont celles qui interfèrent avec la formation des pores nucléaires.

(Xenopus egg extract system)



A droite on peut voir des images de microscopie électronique. Les cercles fléchés correspondent à des pores nucléaires.

Si on délète Nup 107 (par immun-déplétion avec des Anticorps spécifiques, aucun pore nucléaires n'est formé. Les « petits grains » visibles sont des ribosomes s'associant au réticulum endoplasmique et à la face externe de la membrane.

⇒ Nup 107 est un facteur clé de l'assemblage des pores.

Dans les cellules délétées par siRNA, il y a encore quelques pores nucléaires, beaucoup moins mais tout de même quelque uns, alors que dans les cellules déplétées *in vitro* il n'y en a plus du tout.

⇒ Dans le cas des siRNA il reste encore un peu d'ARNm, la déplétion n'est pas totale.

⇒ De plus le cas des siRNA est *in vivo*. Or *in vivo* les cellules qui n'ont aucuns pores nucléaires vont immédiatement mourir, elles ne seront donc pas observées. Alors que le système *in vitro* n'est pas vraiment vivant. On peut donc former une enveloppe sans pore et l'observer.

Certaines protéines clés ont la capacité de se lier à l'ADN et aux protéines du pore nucléaire. Elle médie ainsi la formation des pores nucléaires en recrutant à la surface de la chromatine les premiers constituants du pore nucléaire (Nup 133/Nup107). Ces composants ont la capacité de recruter à leur tour les nucléoporines transmembranaires qui arrivent au sein de vésicules lipidiques. La fusion des vésicules lipidiques contenant les nucléoporines transmembranaires se fait de manière concomitante avec la polymérisation des différentes sous-unités du pore nucléaire. Ainsi les protéines Nup sont recrutées par l'interaction directe avec la chromatine et les protéines membranaires sont recrutées de manière concomitante avec les vésicules de lipides qui fusionnent pour former l'enveloppe en même temps que se forme le pore nucléaire. Donc la formation du pore est couplée à la formation de l'enveloppe. Cette voie est une des voie d'assemblage du pore nucléaire, c'est la voie post-mitotique et la voie principale d'assemblage des pores nucléaires dans les cellules de mammifères.

Dans les cellules de levures en revanche, la membrane nucléaire ne se dissocie pas pendant la mitose. Il y a donc un autre mécanisme permettant à partir d'une membrane complètement close, étanche de creuser un trou et de former un pore nucléaire. Cette voie est appelée de novo. Elle existe aussi dans les cellules de mammifère, pendant l'interphase.

Certaines protéines ont la capacité d'induire des courbures de membrane. Elles sont recrutées sur la membrane nucléaire à l'intérieur et potentiellement à l'extérieur. Elles permettent de former le canal de manière concomitante avec le recrutement des protéines du pore nucléaire.

Dans cette voie la formation du pore n'est pas couplée avec la formation de l'enveloppe