

# ORGANISATION ET STRUCTURE FONCTIONNELLE DU NOYAU

## GENERALITES

17<sup>ème</sup> siècle : observation de la cellule au microscope.

19<sup>ème</sup> siècle : (1831) observation du noyau et du nucléole.

20<sup>ème</sup> siècle : le noyau comme support de l'information génétique.

21<sup>ème</sup> siècle : vers l'assemblage complet du puzzle nucléaire.

L'ADN est essentiellement situé dans le noyau.

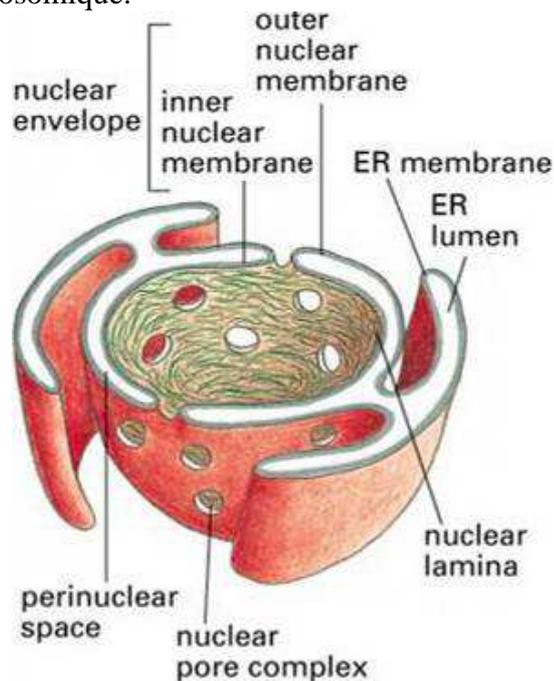
Amélioration des microscopes : MO, MET, MO à contraste de phases, MEB, MO confocal...

Amélioration des techniques de mise en évidence : histochimie, immunohistochimie

Techniques physico-chimiques : Séparation des noyaux par ultracentrifugation sur gradient de saccharose, extraction des protéines.

## L'ENVELOPPE NUCLEAIRE

- Propre aux **eucaryotes**
- **Double membrane** : 2 membranes composées de deux feuilletts lipidiques.  
Entre les deux membranes : un espace qui permet le passage de molécules.
- **Organisation fonctionnelle spécialisée du réticulum**
- Structure **dynamique** d'organisation variable suivant le cycle cellulaire.
  - o Phase organisée variable au cours du cycle cellulaire
  - o Désassemblage en cours de mitose pour permettre la répartition chromosomique.

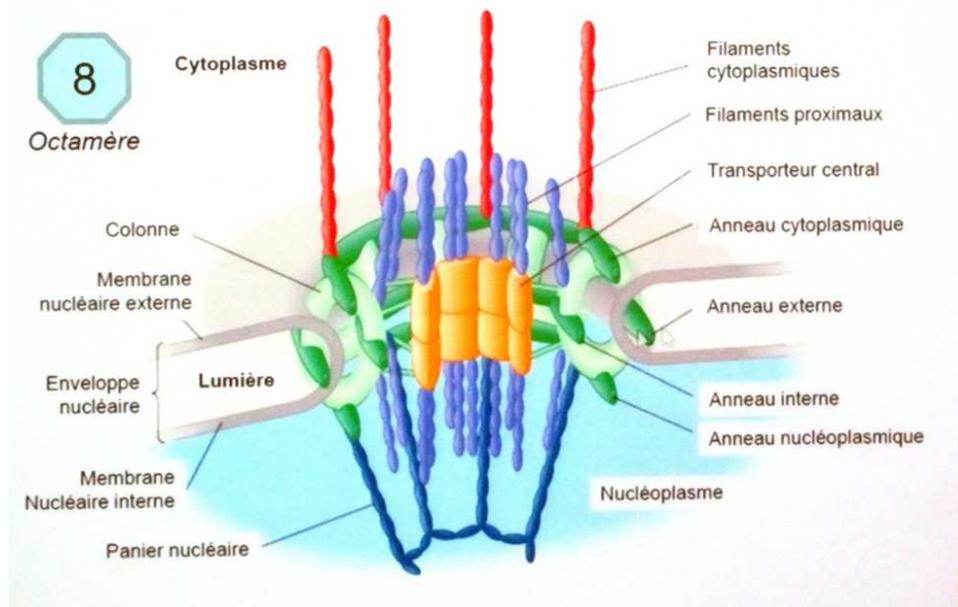


## ORGANISATION GENERALE DE L'ENVELOPPE

- **Deux bicouches lipidiques** : la membrane interne et la membrane externe
- Espace péri nucléaire de **30 nm**
- La membrane interne est associée à une **armature interne de protéines, les lamines** en interaction avec la **chromatine**.

## PORES NUCLEAIRES

- Nombre variable : **3000 à 4000**
- Rôle dans le **transport nucléocytoplasmique**
- Rôle dans la délimitation fonctionnelle de la zone périphérique du noyau.
- Composées de **nucléoporines**
- Système à **double symétrie** :
  - o système radiaire : 8 colonnes,
  - o symétrie planaire un groupe « interne » et un groupe « externe »
- Complexes de pores nucléaires (NPC) de la levure
- Dans un pore : 456 protéines de 30 différents types
- $125 \times 10^6$  Daltons.



### *Du côté du cytosol nous avons :*

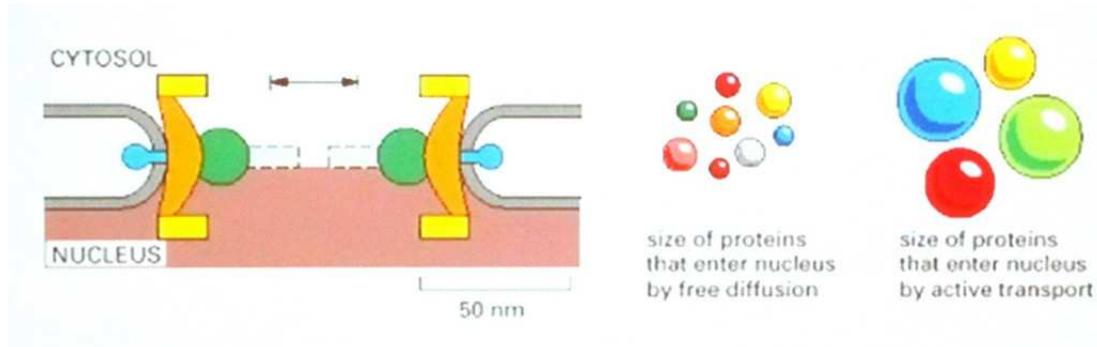
- 8 filaments cytoplasmiques (filaments intermédiaires)
- 8 sous unités formant le grand anneau cytoplasmique sur lequel sont fixés nos 8 filaments (un par sous unité)

### *Du côté du nucléoplasme :*

- 8 sous unités du grand anneau nucléoplasmique
- 8 fibrilles nucléaires qui relient les 8 sous unités du grand anneau nucléoplasmique en formant le panier nucléaire.

## MARQUAGE DE MOLECULES HYDROSOLUBLES ET ETUDE DE LA DIFFUSION DANS LE NOYAU :

- Permet la **libre diffusion de molécules** de petit poids moléculaire (<5000 Da)
- **Pas de diffusion simple des protéines de plus de 60 kDa** : transport spécifique
- Modélisation d'un canal cylindrique de **9 nm de diamètre** et de **15 nm de long** au centre du complexe de pore.

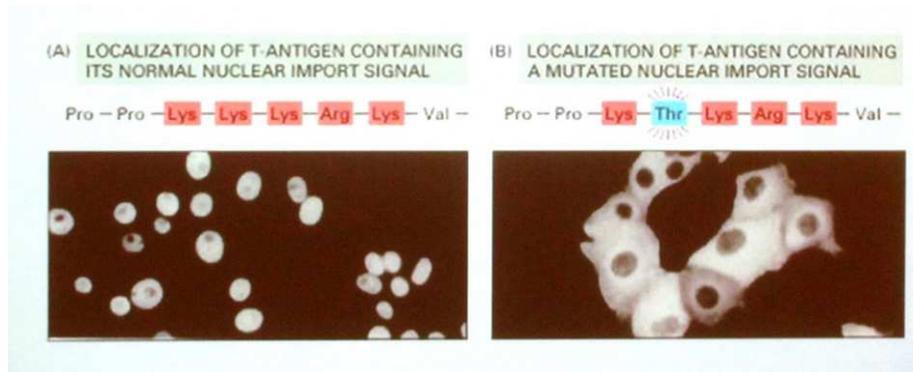


## LES ECHANGES NUCLEOCYTOPLASMIQUES

SORTENT DU NOYAU : ARNs \_ Ribosomes \_ RNP \_ Protéines

RENTRENT DANS LE NOYAU. : Protéines et RNP

Certaines protéines ont un compartiment intracellulaire : elles expriment un signal d'adressage qui leur permet de se fixer à une autre protéine sur un organe (exemple de PSCT1 et de PEX)



Il existe des **signaux d'adressage** composés de séquences d'acides aminés :

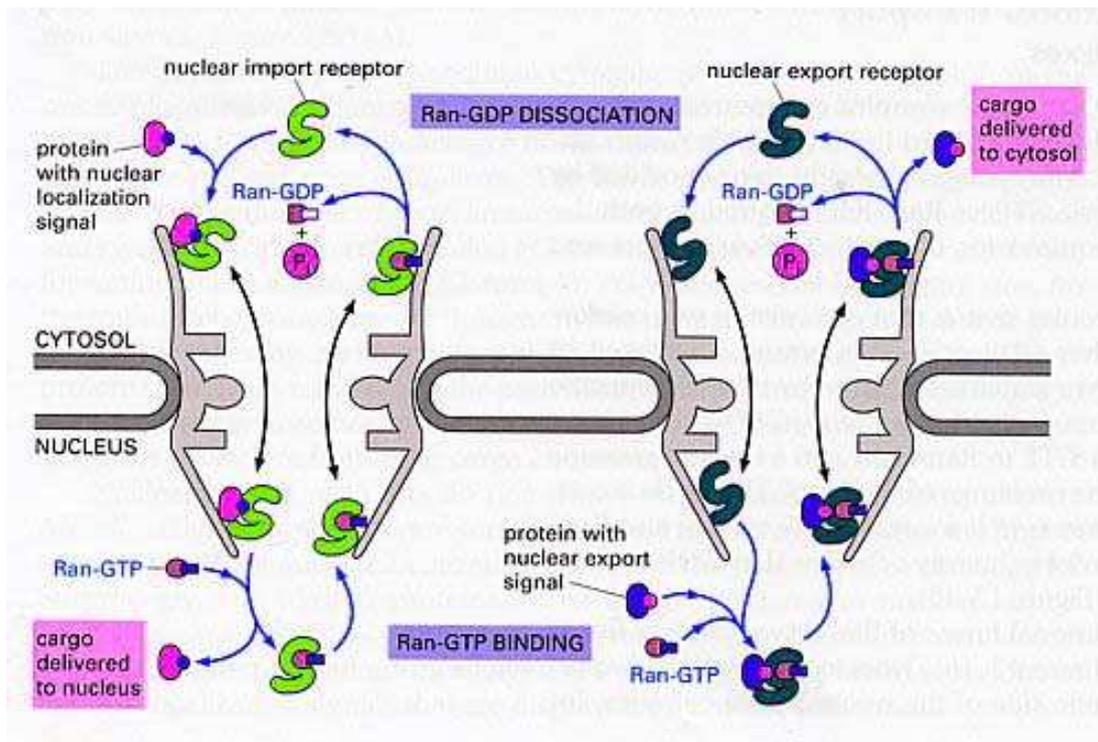
→ Permettent aux protéines de circuler vers l'intérieur ou vers l'extérieur de la cellule, voire de les retenir dans la cellule :

- **séquence d'importation NLS**
- **séquence d'exportation NES**
- **séquence de rétention NRS**

Les échanges nucléocytoplasmique ont besoin du système clé – serrure mais également d'énergie → l'hydrolyse du **GTP** par la protéine adaptatrice : **Ran-GTPase**.

**Ran est associée au GDP dans le cytoplasme et au GTP dans le noyau.**

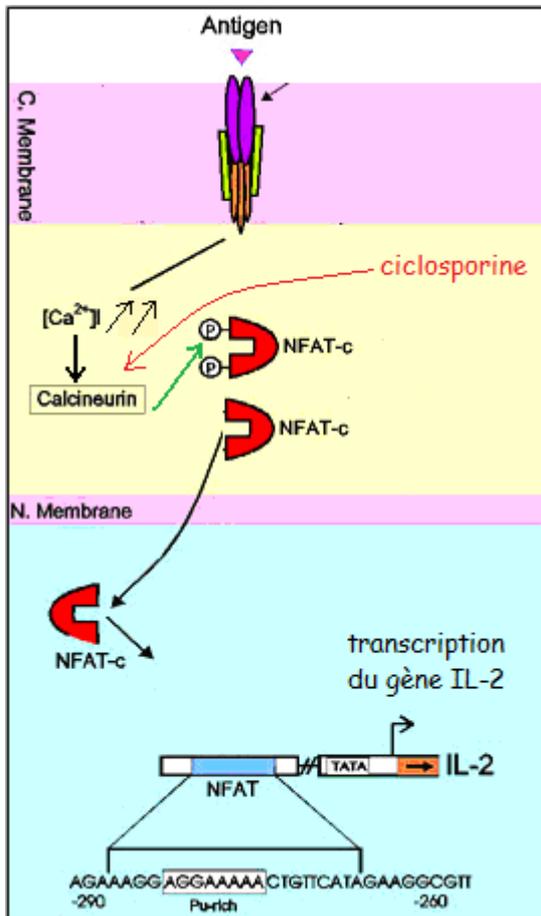
- 1) Une protéine cargo à séquence NLS est reconnue par un récepteur nucléaire (famille de l'importine)
- 2) Le complexe se dissocie dans le noyau grâce à Ran-GTP qui déplace le cargo
- 3) Le complexe RanGTP-importine retourne dans le cytoplasme
- 4) Ran-GTP est déphosphorylé et libère l'importine.



Ce système fonctionne à l'envers avec une protéine un NES (Nucléar Export Sequence)

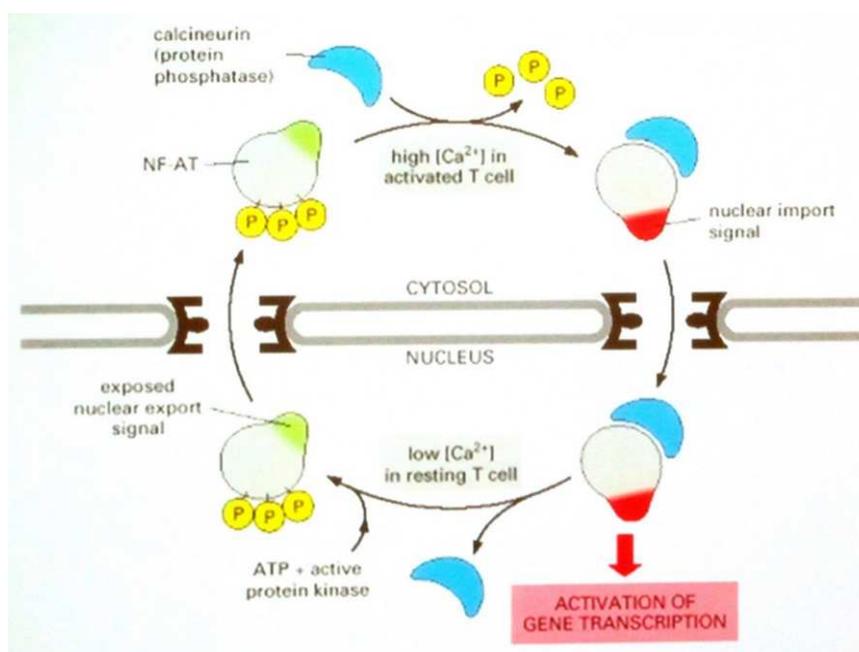
Certaines protéines doivent faire la navette entre le noyau et le cytoplasme : **Les facteurs de transcription**. Ce sont des facteurs qui s'associent aux ARN polymérase.

Le facteur de transcription de l'interleukine-2, NFAT, dans les lymphocytes  
 NFAT = facteur nucléaire des lymphocytes T



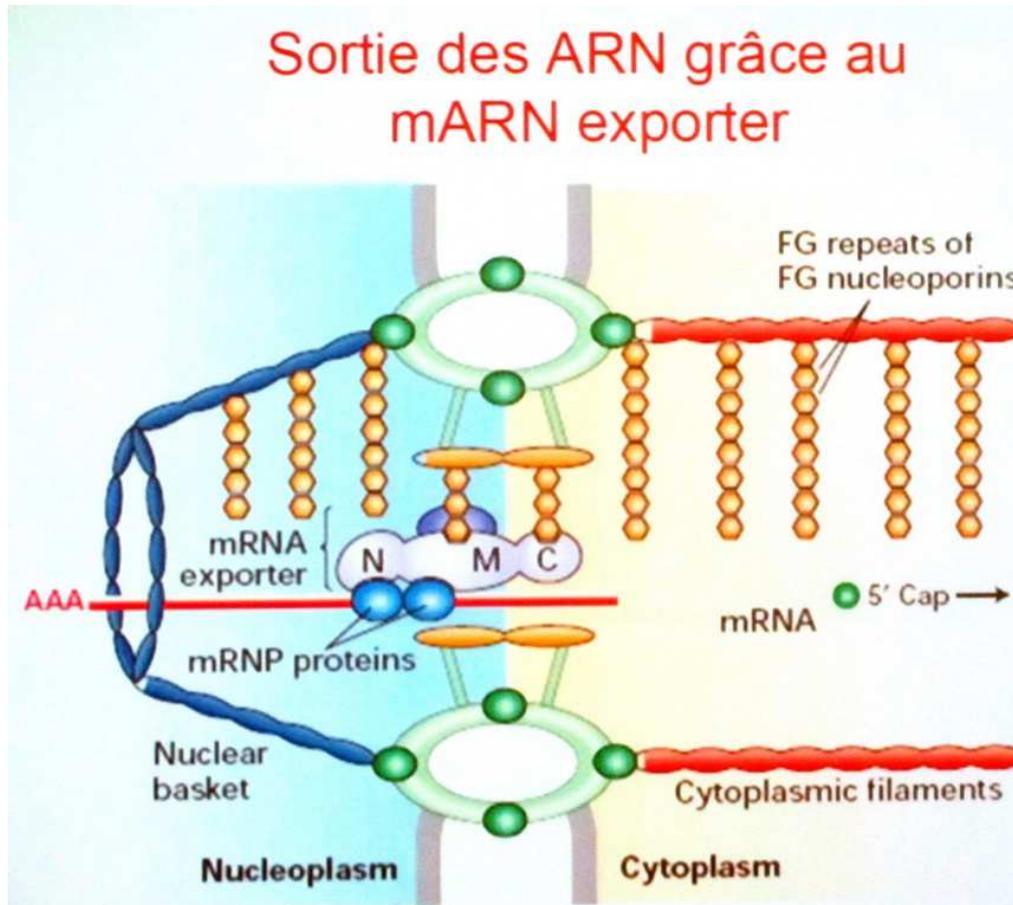
- 1) la stimulation du récepteur à l'antigène déclenche un pic de  $Ca^{2+}$  dans le cytosol, celui-ci active la calcineurine, une ser/thr phosphatase.
- 2) La calcineurine déphosphoryle NFAT ce qui démasque son domaine NLS (NLS = Nucléar Landing System = signal d'import)
- 3) NFAT va au noyau où il active la transcription du gène de l'IL-2 impliqué dans la prolifération des lymphocytes T
- 4) NFAT est phosphorylé dans le noyau et retourne vers le cytoplasme sous forme de NFATP

La ciclosporine est un antibiotique produit par un champignon, cette molécule peut bloquer la calcineurine et empêcher NFAT d'être déphosphorylé et donc d'aller dans le noyau. La ciclosporine est le médicament le plus ancien utilisé pour empêcher le rejet de greffons.



## REGULATION DU TRANSPORT

- par le masquage des séquences d'import ou d'export
- par la modification de pores nucléaires
- par l'ancrage de protéines que le versant intranucléaire de la membrane.



L'ARN sort dans le sens **3' → 5'** c'est-à-dire (**cap en 5'**)

L'ARN doit être épissé, avant de sortir.

L'épissage est un processus par lequel les ARN transcrits à partir de l'ADN génomique subissent des étapes de coupure et ligature conduisant à l'élimination de certaines régions dans l'ARN final. Les segments conservés s'appellent des **exons** et ceux qui sont éliminés s'appellent des **introns**.

## TRANSPORT ET DEGRADATION DE L'ARN

Une fois mûr, l'ARN quitte le noyau.

Les ARN défectueux sont dégradés *in situ* par un complexe multimoléculaire : l'**exosome**.

Environ **5% des ARN sont exportés** à travers les pores nucléaires

Des protéines de tri reconnaissent des séquences situées dans la région non traduite en 3' (3'UTR) entre le codon stop et le Poly-A

**En théorie, les ARN non épissés ne sortent pas du noyau. Comment font les rétro-virus qui ont des introns ? Et pour infecter de nouvelles cellules ?**

Le VIH se sert de sa Reverse Transcriptase pour intégrer le génome humain. Pour envahir de nouvelles cellules, son ARN doit aller dans le cytoplasme et s'encapsider. Mais son ARN (codé par Pol II) contient des introns et subit un épissage alternatif d'où > 30 protéines.

Pour sortir, le VIH code pour une protéine Rev, qui se lie à un récepteur d'exportation (séquence NES), mais se lie aussi à une séquence spécifique appelée REV responsive element (RRE) → Le complexe Rev/ ARN peut sortir !

## AUTRES ACTIONS DES PROTEINES DE PORES.

Les **protéines de pores Nup** peuvent également avoir un **rôle important lors de la mitose**. Complexe 107-160 et répartition chromosomique en métaphase

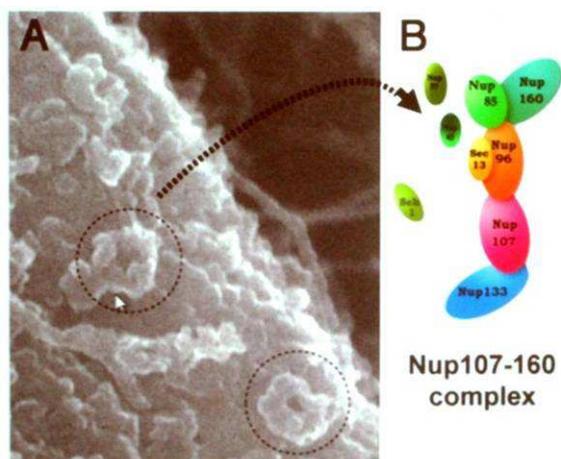


Fig. 1. A: Analyse par microscopie électronique à balayage de la surface de l'enveloppe nucléaire des cellules HeLa. Les pores nucléaires sont entourés.

B: représentation schématique du complexe Nup107-160 des vertébrés, un des constituants majeurs des pores nucléaires.

Copyright CNRS / Institut Curie / IJM - V. Doye / T. Allen

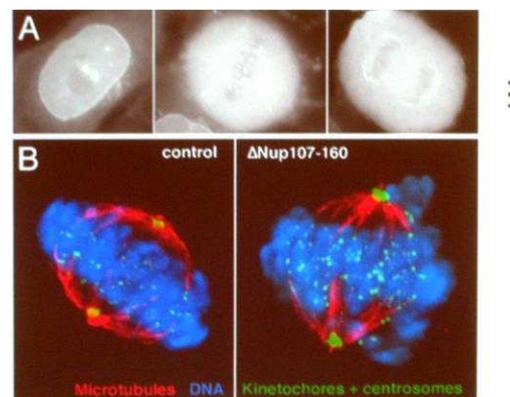


Fig. 2. A: GFP\_Nup37 se localise à l'enveloppe nucléaire et aux kinetochores dans des cellules HeLa. On note également le recrutement précoce de cette sous-unité du complexe Nup107-160 lors de la reformation de l'enveloppe nucléaire en anaphase. B: La déplétion du complexe Nup107-160 affecte la ségrégation des chromosomes dans les cellules HeLa.

Copyright CNRS / Institut Curie / IJM - V. Doye / T. Allen

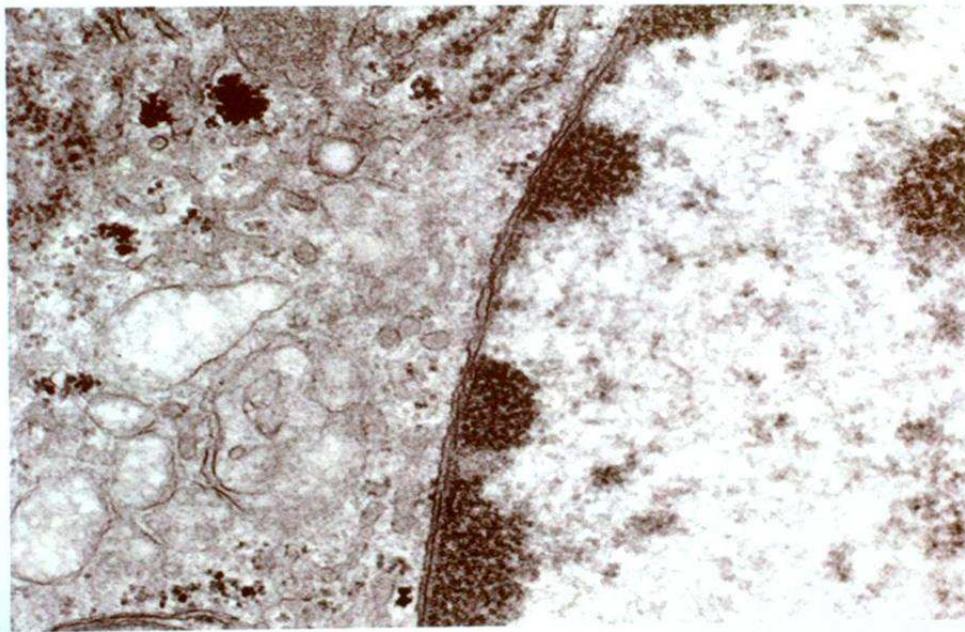
tubules en rouge, DAPI bleu localise l'adn donc les chromatides, les petits points verts c'est les kinétochores des chromosomes.

Les protéines ont des rôles de modification post traductionnelle des protéines transportées.  
Ajout de SUMO « small ubiquitin-like modifiers »

**La sumoylation de Ran-GAP1 permet son transport du cytosol vers le noyau.**

- **Sumoylation et répartition génétique** : le modèle de NUP84 \_ NUP60/MLP1-2/ULP1 Yku70 dans la réparation des fractures d'ADN double brin
- **Les nucléoporines sumoylées interagissent avec l'ADN et réparent les cassures de l'ADN.**

## L'ENVELOPPE ET LA LAMINA NUCLEAIRE.



Famille des lamina contient au moins trois groupes.

Relie l'enveloppe aux chromatides.

Réseau **fibrillaire de 30 à 100 nm d'épaisseur**

Filaments intermédiaires et protéines associées à la membrane.

### Rôles multiples :

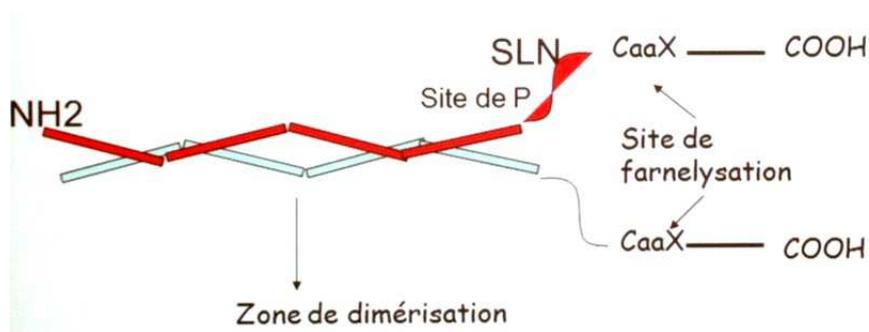
- **support mécanique**
- **organisation de l'enveloppe**
- **organisation de la chromatine interphasique**
- **réplication de l'ADN**

Les filaments intermédiaire de type V :

- Les lamines A et C sont codées par un gène LMNA
- La lamine B codée par LMNB.

Domaine globulaire et domaine en Hélice  $\alpha$  (rod domain)

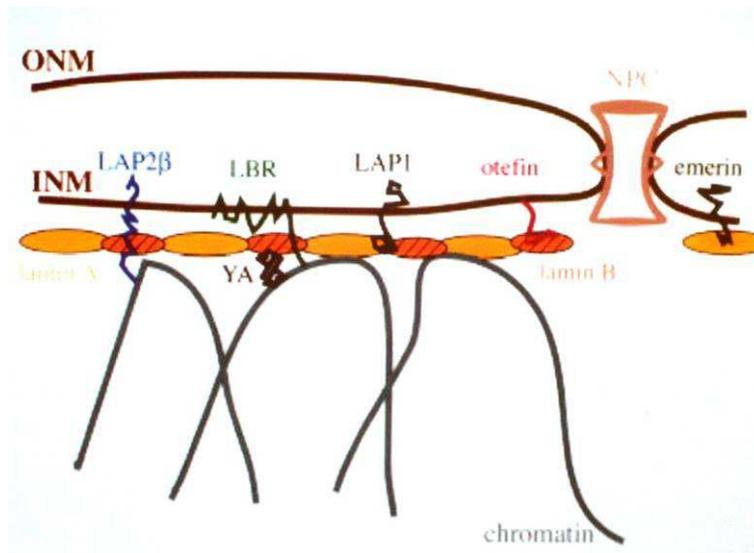
**Association** de ce réseau à la **chromatine** et à des **facteurs de transcription** sur la face nucléoplasmique et à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire.



C veut dire cystéines

Les quatre a ce sont des AA : forment le site de **farnétylation**

X ça peut être un peu n'importe quoi.



ONM outer nuclear membrane

INM inner

Les lamines sont fixées par d'autres molécules à la membrane interne (liaisons covalentes avec les lipides). Elles sont elles-mêmes reliées à la chromatine.

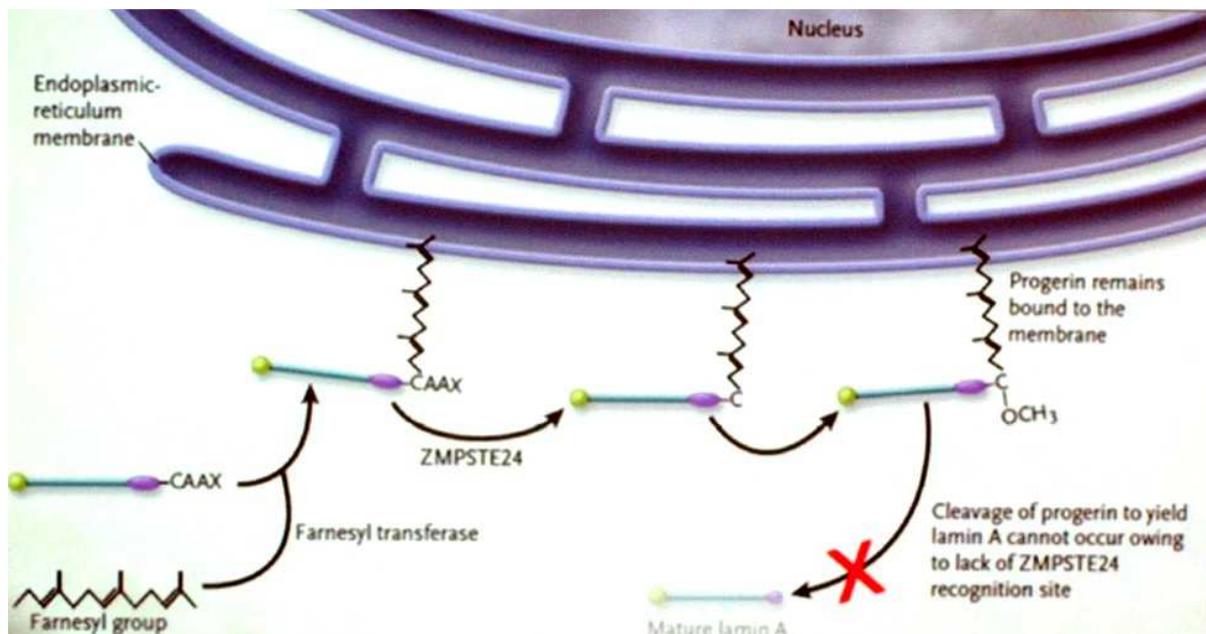
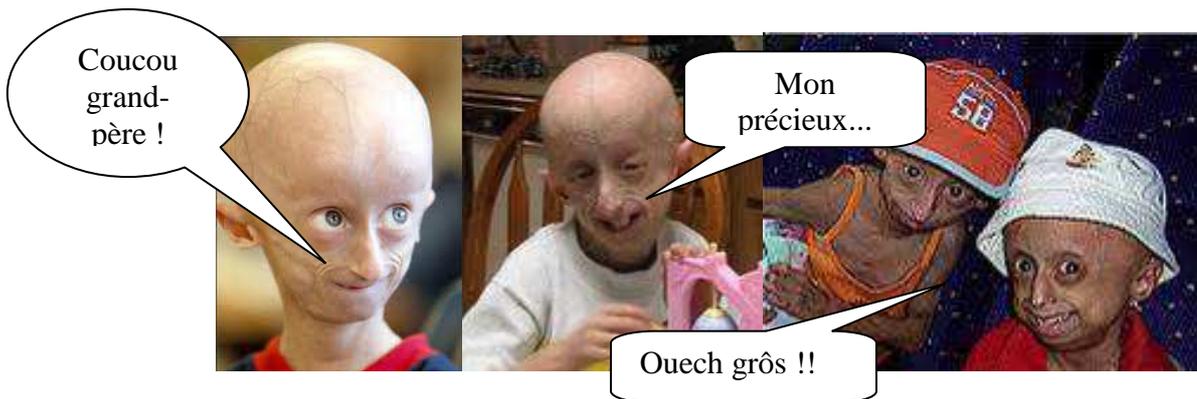
## MISE EN PLACE DES LAMINES

Gène LMNA synthétise prélamine A : ciblage vers la membrane interne de l'enveloppe nucléaire par un groupe farnésyl dans la région C-Ter : clivage secondaire de ce site par une métalloprotéinase qui reconnaît le site de clivage et libère la forme mature de lamine A

Une mutation peut conduire à une absence de clivage

→ Séquestration définitive de la prélamine A à la membrane externe sans maturation finale.

Dans la maladie du progéria, il existe une mutation qui empêche la métallo-protéase de se produire car le site de reconnaissance de la lamine par la Metallo P a été muté.



## **EFFET DES MUTATIONS DE LMNA**

- Modèle de la différenciation myoblaste / myotube in vitro
  - o mutation R453W : Arg453Tryptophane : arrêt de la différenciation et apoptose
  - o mutation R482W : Arg482Tryptophane : mutation apparemment normale.

## **LMNA ET ENVIRONNEMENT**

- modèle des protéases anti-virales dans le traitement antiviral HIV1
  - o apparition fréquente chez les patients traités par antiprotéases d'une lipodystrophie (disparition de la graisse sous cutanée) ou alors la graisse se met n'importe où, genre dans le cou.
  - o In Vitro : accumulation de farnésyl-prélamine A
  - o Inhibition de la metalloprotéinase ZMPSTE24

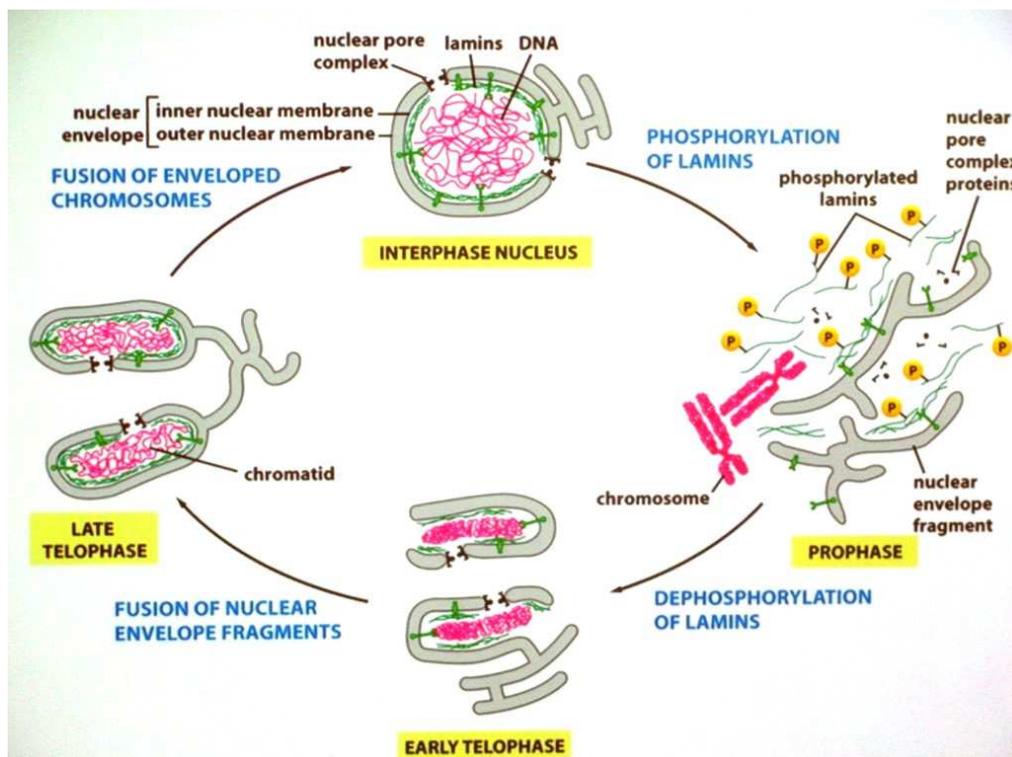
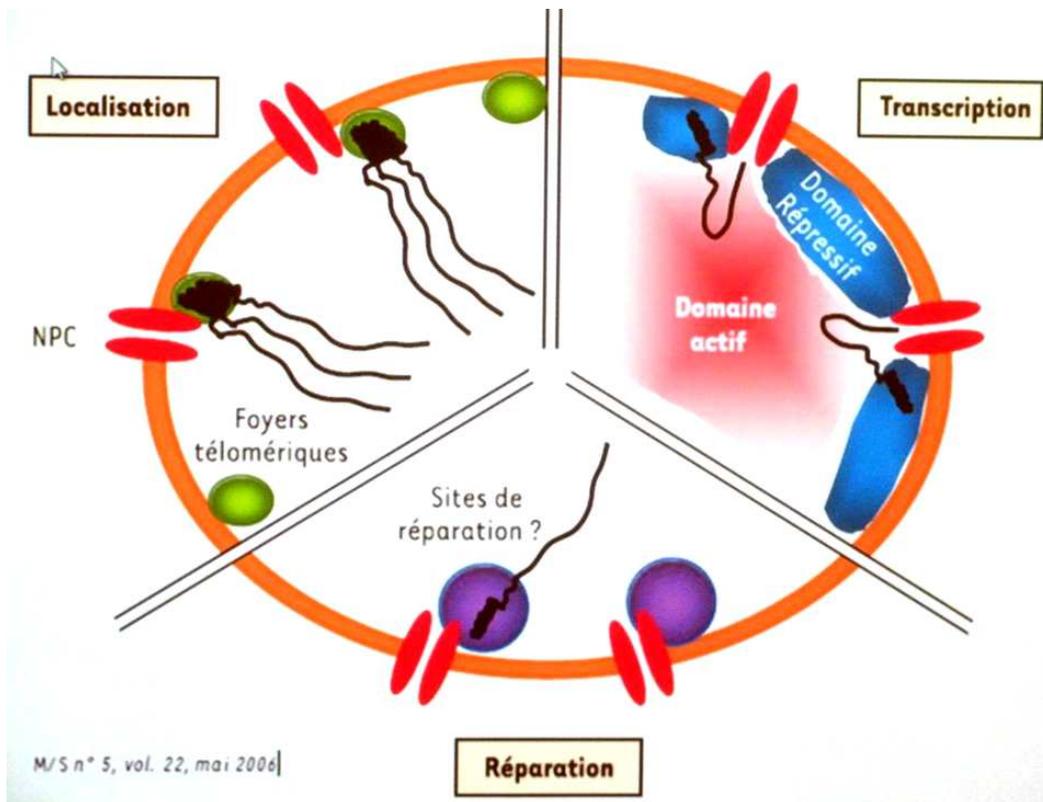
## **INTEGRATION VIRALE ET EMERINE**

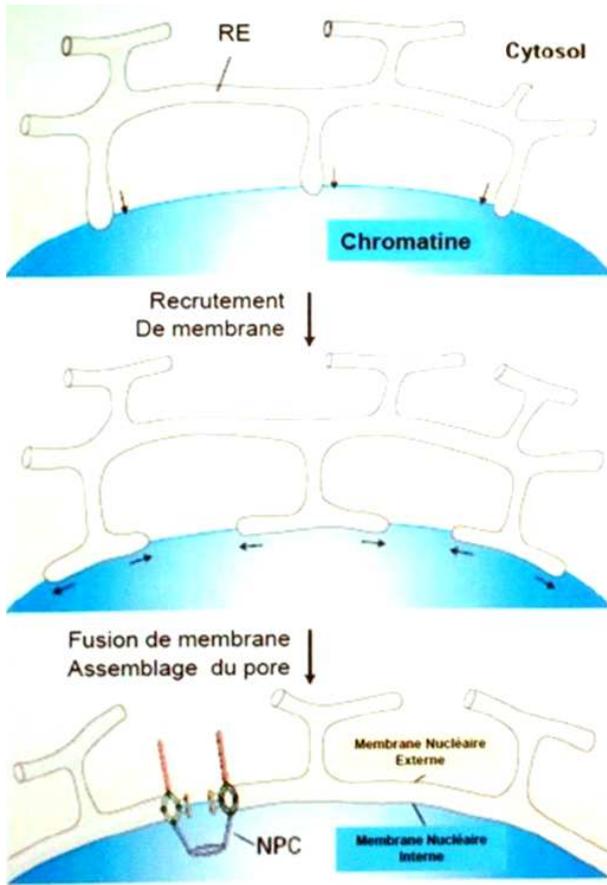
- L'émerine s'associe à la lamine A et à BAF (barrier to auto-integration) cofacteurs associés avec le virus HIV-1
- BAF s'associe à des protéines GAG
- Intégration virale de HIV-1 dans le génome nucléaire nécessite une lamina normale.

## ENVELOPPE ET TRANSCRIPTION

En général la membrane interne de l'enveloppe joue un rôle répressif sur l'expression génique. L'interaction entre la chromatine et l'enveloppe nucléaire participe à la régulation de l'expression génétique.

Habituellement, mode répressif : liaison de l'hétérochromatine avec la lamina nucléaire.

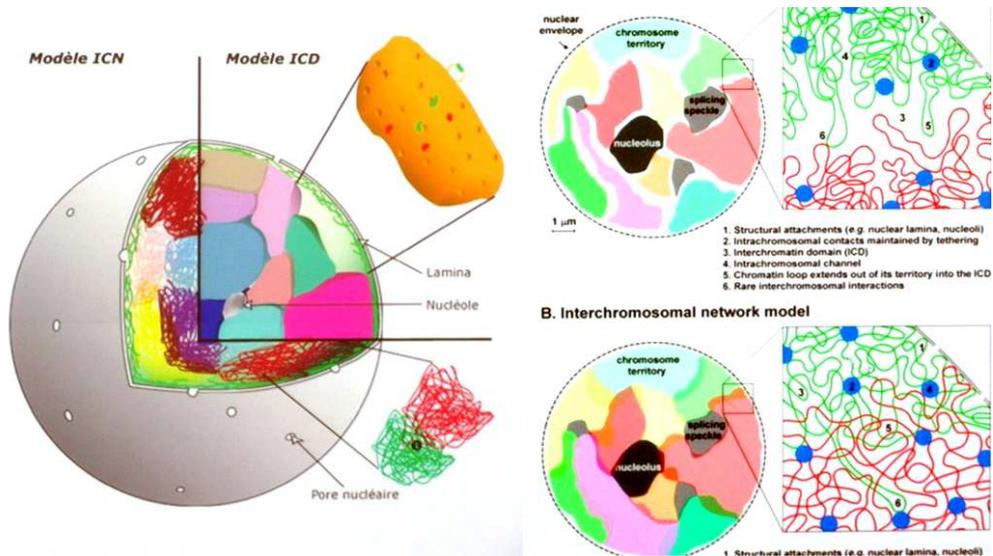




## Reconstitution de l'enveloppe nucléaire en télophase

### TERRITOIRES CHROMOSOMIQUES

- Organisation chromosomique ordonnée
- Chevauchement relatif entre territoire
- Faible densité génique : localisation plutôt périphérique
- Distribution radiale non aléatoire. Rapprochement de régions chromosomiques
- Libre diffusion au sein des territoires (modèles ICN inter chromosomal network)
- OU « canaux » périphériques (ICD inter chrom. Domains)



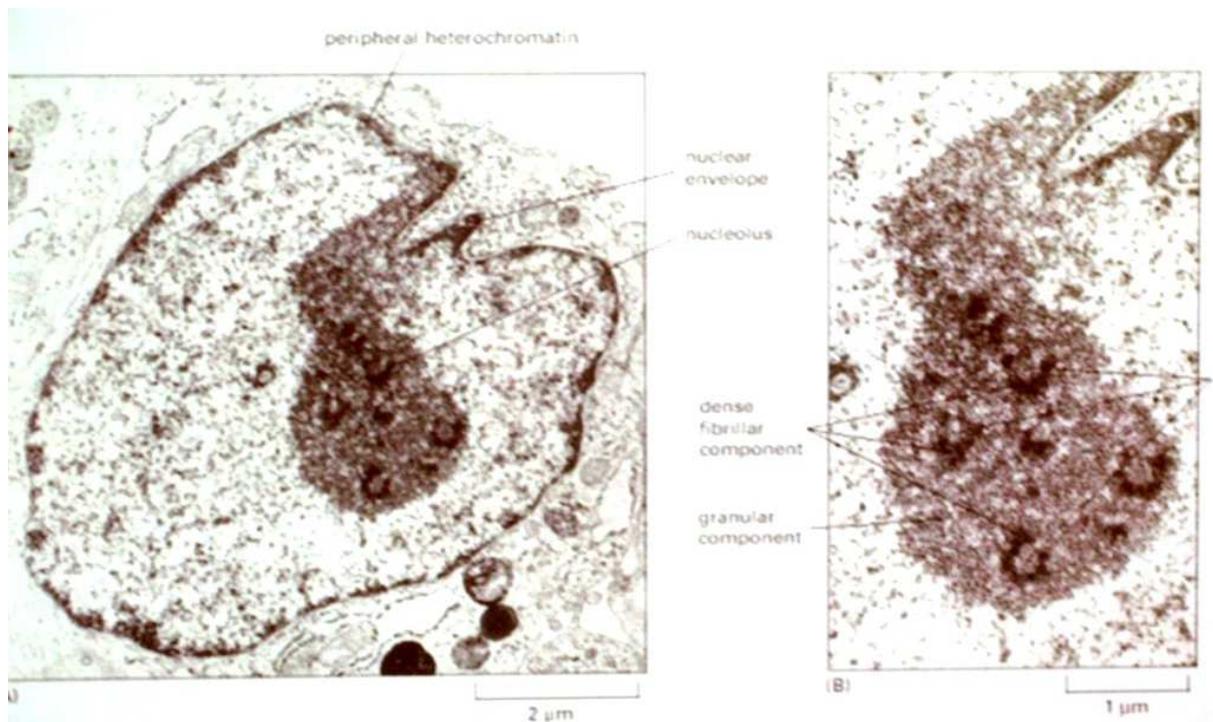
## LA MATRICE NUCLEAIRE

- Matériel insoluble au sein du noyau après étape d'extraction des acides nucléiques
- Structure d'échafaudage sur laquelle s'organise la chromatine.
- Protéines avec sites de liaison spécifiques pour des domaines particuliers de l'ADN : SARs MARS « scaffold associated » ou « matrix associated » régions.

## LE NUCLEOLE

C'est la machine qui permet de fabriquer les ribosomes. Composé de 3 régions

- centre fibrillaire : ADN codant pour l'ARNr et FT. Persistent après disparition du nucléole en prophase, associés aux constriction secondaires des chromosomes et forment les NOR.
- Fibrilles denses : ADN en cours de transcription
- Granules : assemblage du périosome.
- 4 types d'ARN (ARNr 28S, 5.8S, 18S, et 5S) et plus de 70 protéines s'associent pour former les 2 sous-unités de l'ARN ribosomique.
- Les gènes codant pour le s ARN ne proviennent que du bras court de 5 paires de chromosomes acrocentriques. (!)



Y'aura pas de questions au-delà du nucléole.