

Biologie moléculaire

Petite protéine G Ran et contrôle de l'import-export nucléaire

Le noyau de la cellule eucaryote, compartiment intracellulaire particulier qui sépare le support de l'information génétique du reste de la cellule, ne constitue pas pour autant un espace hermétiquement clos. Au contraire, de nombreuses informations moléculaires sous forme de protéines et d'ARN sont constamment échangées de manière bidirectionnelle entre le cytoplasme et le noyau. Ce transport appelé nucléocytoplasmique ou nucléaire est un processus cellulaire actif, consommateur d'énergie et hautement organisé, qui se trouve de fait finement contrôlé par les cellules. Le transport nucléaire est notamment essentiel à l'expression génétique et au bon déroulement du cycle cellulaire et représente ainsi une fonction-clé de la vie des cellules [1]. Les nombreuses recherches réalisées dans ce domaine au cours des dernières années ont permis de révéler certains des mécanismes moléculaires qui sont à la base du fonctionnement et de la régulation de ce processus cellulaire. Ces travaux indiquent que la petite protéine G Ran semble y jouer un rôle déterminant et original pour un membre de la superfamille Ras [2].

Le transport nucléaire

La compartimentalisation de la cellule eucaryote crée une complexité supérieure à celle rencontrée chez les procaryotes mais apporte aux cellules un niveau supplémentaire de régulation des processus biologiques. Les cellules peuvent ainsi séparer physiquement certaines protéines ou ARN de leur site d'action biologique en déterminant leur répartition

entre noyau et cytosol, puis permettre l'activité biologique en autorisant le transport de ces molécules en fonction de signaux qu'elles reçoivent.

De nombreuses molécules compartimentalisées dans la cellule sont ainsi soumises à ce transport nucléaire. Les protéines de la chromatine, les facteurs de transcription et certains types de protéine-kinases ou phosphatases sont importés du cytoplasme vers le noyau alors que les particules ribosomiques dont l'assemblage s'effectue dans le nucléole, certaines protéines comme Rev du VIH-1, ainsi que les différentes classes d'ARN produits dans le noyau sont exportés du noyau vers le cytoplasme. En outre, plusieurs des protéines hnRNP (*heterogenous nuclear ribonucleoproteins*) qui constituent les particules ribonucléo-protéiques sont, quant à elles, sujettes à des cycles répétés d'import-export entre noyau et cytosol. Le transport nucléaire représente un trafic moléculaire très dense dans la cellule. A titre d'exemple on peut mentionner que dans la cellule Hela qui se divise régulièrement, la seule formation des sous-unités ribosomiques cytosoliques nécessite, chaque minute, le transport au travers de la membrane nucléaire d'environ 560 000 protéines qui participent à la construction du ribosome et de 14 000 sous-unités ribosomiques complètes. La cellule doit donc finement organiser le transport nucléaire dans le temps tout en contrôlant la nature des produits autorisés ou non à traverser la frontière nucléaire.

La bicouche lipidique de la membrane nucléaire constitue une barrière relativement infranchissable et

c'est l'existence des pores nucléaires qui permet le transport des molécules entre le noyau et le cytoplasme. Le pore nucléaire, complexe protéique d'environ 125 000 kDa, est une des structures macromoléculaires les plus importantes de la cellule. Il est constitué de 50 à 100 protéines en cours d'identification appelées nucléoporines qui forment un canal de diffusion au travers de la bicouche lipidique nucléaire. Ce long conduit de 10 à 20 nm possède un diamètre suffisant pour laisser diffuser librement les ions et les petites molécules mais se comporte comme une porte de communication très sélective pour les molécules de taille supérieure à 50-60 kDa [3]. C'est le site utilisé par les cellules pour contrôler le transport nucléaire. Quelles sont les bases moléculaires de ce mécanisme ?

Transport nucléaire des protéines et petite protéine G Ran

L'une des bases moléculaires du transport nucléaire réside dans l'existence d'une signalétique particulière. De courts signaux peptidiques présents au sein des molécules à transporter sont reconnus par des récepteurs spécifiques et déterminent ainsi la nature de la molécule à transporter et sa destination finale au travers de la membrane nucléaire [4]. Le signal de localisation nucléaire NLS (*nuclear localization signal*) est le mieux caractérisé. Composé d'acides aminés basiques il permet aux protéines qui le possèdent d'être importées dans le noyau cellulaire.

Le développement d'un système d'étude *in vitro* du transport des protéines vers le noyau a constitué une avancée majeure pour l'analyse molé-

culaire du transport nucléaire. Ce système est fondé sur l'utilisation de cellules de mammifères dont la membrane plasmique a été perméabilisée et qui ont ainsi perdu certains des facteurs cytosolubles nécessaires au transport nucléaire. On peut redonner à ces cellules leur capacité de transport en leur restituant certaines fractions cytosoliques et alors visualiser, par exemple, l'accumulation nucléaire d'un substrat fluorescent porteur d'un signal de localisation nucléaire NLS introduit dans leur cytoplasme [5, 6]. L'utilisation intensive de ce type de modèle a permis: (1) de purifier et d'identifier les facteurs cytosolubles, importines et Ran, qui dirigent l'import nucléaire protéique; et (2) de schématiser le processus en deux phases principales.

La première phase, qui est l'accrochage du substrat cytosolique au pore nucléaire, ne requiert pas d'énergie mais nécessite la présence du complexe cytoplasmique importine α /importine β où α joue le rôle de récepteur du signal de localisation nucléaire NLS alors que β permet l'interaction avec le pore nucléaire [7, 8]. La seconde phase correspond à la translocation du substrat au travers du pore nucléaire et à son relargage dans le noyau. Cette étape, constituant le transport nucléaire proprement dit, requiert du GTP comme seule source d'énergie, ainsi que la présence spécifique de la petite protéine G Ran, comme facteur utilisateur du GTP [9].

Ran semble être une des protéines majeure de la vie cellulaire. Présente à plus de 20 millions d'exemplaires par cellule c'est l'une des plus abondante des eucaryotes. Elle est aussi une de celles dont la structure est la mieux conservée au cours de l'évolution puisque les molécules présentes chez l'homme et chez la levure sont identiques à plus de 80%. En dehors de ces caractéristiques remarquables, Ran est la seule protéine de la superfamille Ras à localisation nucléaire, soit au niveau des pores, soit dans le noyau. Comme toute autre petite protéine G, Ran est capable de fixer le GTP puis de l'hydrolyser en GDP. Cette dernière étape s'accompagne d'un changement de conformation et permet à la GTPase d'exister dans

les cellules sous deux états conformationnels distincts, l'un lié au GTP et l'autre lié au GDP. La protéine peut ainsi interagir avec des partenaires moléculaires différents en fonction de l'équilibre GTP/GDP. Les cellules contrôlent ce cycle du GTP grâce à deux types de protéines: un facteur d'échange, appelé RCC1 chez les mammifères, qui catalyse la substitution du GDP par du GTP et qui permet ainsi la formation de la forme Ran-GTP, et un facteur GAP, appelé RanGAP1 chez les mammifères, qui, quant à lui, stimule l'activité GTPasique de Ran et ramène donc la protéine sous sa forme GDP [10] (figure 1).

Cycle du GTP de Ran et transport nucléaire

La convergence des résultats d'études biochimiques et génétiques sur Ran et ses régulateurs au sein d'organismes allant de la levure jusqu'aux mammifères, indique aujourd'hui avec certitude que ce sont les deux formes Ran-GDP et Ran-GTP de la petite protéine G qui dirigent le transport nucléaire [2].

• **Transport protéique du cytoplasme vers le noyau.** Les études *in vitro* dans le système acellulaire de l'import protéique montrent que la première forme active de Ran est celle liée au GDP [11], mais qu'il est aussi nécessaire que du GTP libre soit présent lors de l'expérience et que celui-ci soit fixé puis hydrolysé spécifiquement par Ran pour que le transport nucléaire soit complet [9, 12]. Une caractéristique du système réside dans la répartition des régulateurs, RanGAP1 dans le cytoplasme ou sur la face externe du pore nucléaire et RCC1 dans le noyau. Cette distribution particulière prédit l'existence d'un double gradient où Ran-GDP est concentré sur la face cytoplasmique du pore nucléaire alors que Ran-GTP se trouve dans le noyau. Toute modification biochimique ou génétique altérant cette répartition engendre des effets inhibiteurs sur le transport des protéines [1]. Ces observations suggèrent qu'au cours de son cycle de fixation et d'hydrolyse du GTP, Ran se déplace au travers du pore nucléaire et que la répartition asymétrique de ses régulateurs RCC1 et RanGAP1 est une des bases du caracté-

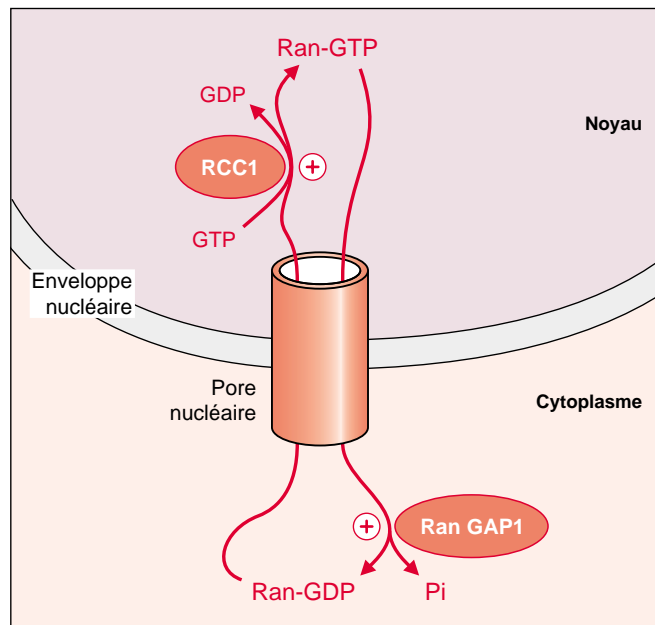


Figure 1. **Cycle de fixation et d'hydrolyse du GTP par Ran.** La localisation des régulateurs de Ran, RCC1 et RanGAP1, respectivement dans le noyau et le cytoplasme, suggère que la petite protéine G se déplace au travers du pore nucléaire lors de son cycle du GTP et qu'elle pourrait ainsi participer directement au transport nucléaire.

tère directionnel du transport nucléaire (figure 1). Quels sont les liens moléculaires entre la GTPase et les autres facteurs du transport nucléaire? Ran est capable d'interagir avec au moins une des nucléoporines du pore nucléaire déjà caractérisée [13]. La présence des deux formes Ran-GDP et Ran-GTP peut d'ailleurs être détectée au niveau des pores nucléaires [11]. Ran-GTP, situé dans le noyau et vraisemblablement sur la

face interne des pores nucléaires des cellules, est capable *in vitro* d'interagir directement avec l'importine β et de provoquer ainsi la dissociation du complexe importine α /importine β [14]. L'utilisation d'une protéine importine β mutante incapable de lier Ran-GTP permet d'ailleurs d'observer une accumulation anormale des molécules transportées au niveau de la face interne des pores nucléaires créant de ce fait un blocage du transport [11].

Ces différentes observations permettent de proposer un modèle dans lequel Ran contrôle le fonctionnement de l'import nucléaire protéique lié au NLS au travers de son cycle GTP/GDP (figure 2). Initialement, la protéine substrat porteuse du NLS est reconnue dans le cytoplasme par la sous-unité α de l'hétérodimère importine α /importine β . Ce complexe trimérique, stable grâce à la présence cytoplasmique de RanGAP1 qui maintient le niveau de Ran-GTP au minimum, peut alors s'accrocher au niveau de la face externe du pore nucléaire par interaction directe de la sous-unité β avec certaines nucléoporines [14, 15]. L'étape suivante, qui est vraisemblablement celle qui requiert la fixation et l'hydrolyse du GTP par Ran, correspond à la translocation du complexe au travers du pore nucléaire sans doute par une série d'interactions avec différentes nucléoporines [14, 15]. Une fois situé sur la face interne du pore, le complexe trimérique serait dissocié du fait d'une interaction directe de l'importine β avec Ran-GTP fortement concentré à ce niveau, libérant ainsi le substrat porteur du NLS dans le nucléoplasme. Le retour des importines α et β vers le cytoplasme des cellules se ferait alors séparément, β restant probablement lié à Ran-GTP [8]. La conversion, au niveau du cytoplasme, de Ran vers sa forme GDP du fait de la forte concentration de RanGAP1, libérerait l'importine β et favoriserait ainsi sa réassociation avec l'importine α pour un nouveau cycle de transport vers le noyau.

Divers points restent à éclaircir dans ce système, notamment le mécanisme de translocation du complexe à l'intérieur du pore nucléaire et l'analyse de son lien avec le cycle GTP/GDP de Ran. L'identification des partenaires moléculaires de Ran devrait constituer une étape majeure de ces analyses. On peut aussi remarquer que ce modèle de l'action de Ran montre que la petite protéine G ne fonctionne pas selon «le mode Ras», où seule la forme GTP est active et délivre le signal, mais utilise son cycle complet de fixation et d'hydrolyse du GTP pour contrôler le transport nucléaire.

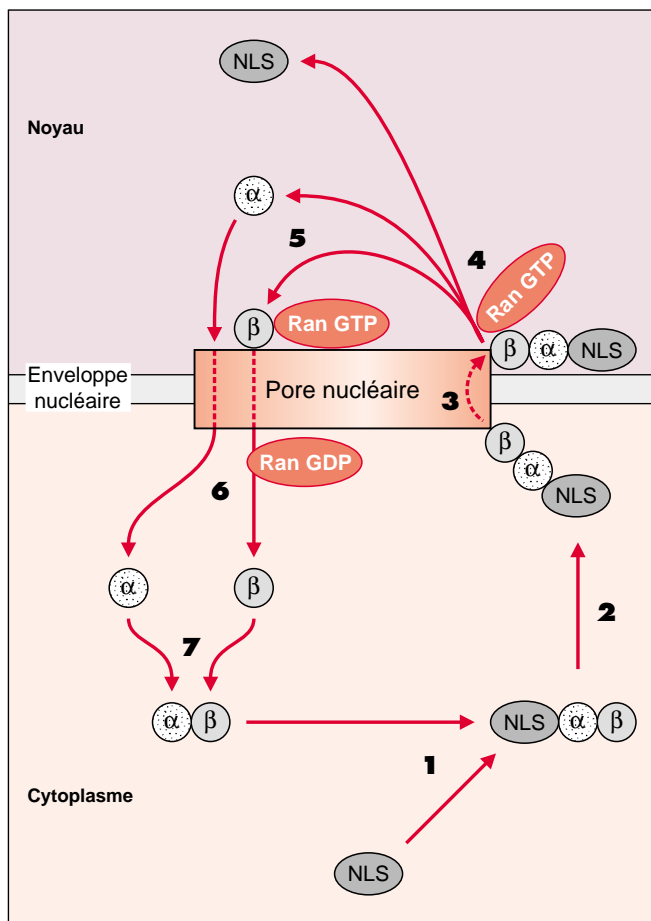


Figure 2. **Modèle du transport protéique du cytoplasme vers le noyau.** Une protéine cytoplasmique porteuse du signal de localisation nucléaire NLS est reconnue par le dimère importine α/β (phase 1) qui permet son ancrage sur le pore nucléaire (phase 2). La translocation du complexe au travers du pore nucléaire fait intervenir les nucléoporines du pore ainsi que la petite protéine G Ran (phase 3). La présence de Ran-GTP dans le noyau permet de dissocier le complexe et de libérer la protéine NLS dans l'espace nucléaire (phase 4). L'importine α et le complexe Ran-GTP/importine β sont recyclés vers le cytoplasme (phase 5). La conversion de Ran vers sa forme GDP au niveau du cytoplasme permet la libération de l'importine β (phase 6) qui peut alors s'associer à nouveau avec l'importine α (phase 7) pour un nouveau cycle de transport nucléaire (phase 1).

• **Transport des protéines et des ARN du noyau vers le cytoplasme.**

Le transport des ARN et le transport des protéines du noyau vers le cytoplasme apparaissent intimement liés compte tenu du fait que, pour les ARN, il semble que ce soit aussi des protéines (*RNA binding proteins*) qui dirigent le transport [16]. Ce transport repose sur l'existence de signaux protéiques appelés NES (*nuclear export signal*), comme le signal M9 détecté sur certaines hnRNP qui est à l'origine des cycles d'import-export de ces protéines entre noyau et cytoplasme, ou le signal riche en leucine de la protéine Rev du VIH-1 qui permet à certains ARN du virus d'être exportés vers le cytoplasme [17-19]. Ce transport vers le cytoplasme qui utilise des récepteurs spécifiques pour chaque type de signal est beaucoup moins bien connu que le transport des protéines vers le noyau mais semble lui aussi mettre en œuvre la petite protéine G Ran [20].

Par exemple, chez la levure, l'absence, soit de Ran, soit de ses facteurs régulateurs, RCC1 ou Ran-GAP1, conduit à l'accumulation des ARN dans le noyau du fait de l'inhibition de leur transport vers le cytoplasme [21-23]. Il a aussi été récemment montré que le transport des petits ARN nucléaires (ARN U) vers le cytoplasme dépendrait d'une interaction directe entre l'importine α et le complexe protéique de la Cap* de ces ARN et serait ainsi modulé par la présence des facteurs Ran et importine β [24]. Par ailleurs, le blocage de l'interaction entre l'importine β et Ran-GTP qui inhibe le transport des protéines vers le noyau, provoque aussi l'arrêt du transport vers le cytoplasme des protéines à signal M9, des ARNm et des ARN U sans affecter, en revanche, celui des ARNt [25]. De plus, une série de publications très récentes montre que : (1) les facteurs CAS et CRM1 sont de nouveaux récepteurs nucléaires de signaux NES, permettant respectivement le recyclage des importines α vers le

cytoplasme et le transport de la protéine Rev et des ARN U ; (2) ces mécanismes nécessitent vraisemblablement une interaction directe entre les facteurs CAS ou CRM1 et Ran-GTP [26-29].

La protéine Ran apparaît donc impliquée directement dans le transport du noyau vers le cytoplasme d'au moins certains ARN et certaines protéines. Il est aujourd'hui trop tôt pour proposer un modèle de fonctionnement de ce processus, mais l'analyse en cours des protéines liées aux différents ARN, ainsi que de leur récepteur dans le nucléoplasme ou au sein des pores nucléaires, procurera sans doute de précieuses informations dans l'avenir.

Observations

Le transport nucléaire, que ce soit celui des protéines ou celui des ARN, qu'il soit dirigé vers le noyau ou vers le cytoplasme, semble toujours reposer sur la présence de signaux protéiques reconnus par des récepteurs permettant le transport au travers des pores nucléaires. La machinerie moléculaire mise en œuvre pour le transport des différents types d'entités semble en partie redondante et la protéine Ran apparaît comme un des points communs aux divers transports nucléaires. Le rôle exact de Ran dans le transport des molécules vers le cytoplasme reste encore à définir, mais l'on peut évidemment se demander si, comme pour le transport des protéines vers le noyau, la petite protéine G n'interviendrait pas au niveau de la translocation au travers des pores nucléaires ainsi que dans le contrôle du caractère directionnel du transport.

Compte tenu du rôle central de Ran dans le fonctionnement du transport nucléaire, il n'est pas étonnant que la petite protéine G puisse constituer une cible utilisée par les cellules et même les virus pour contrôler les processus du transport des protéines et des ARN. Il a ainsi été observé sur des cellules soumises à un *stress* par la chaleur que la plupart des ARNm sont retenus dans le noyau, excepté ceux codant pour des protéines de choc thermique qui continuent d'être exportés vers le cytoplasme.

Cette subtile régulation cellulaire du transport nucléaire semble d'ailleurs bien reposer sur l'inhibition du système Ran et sur l'activation d'un système de transport indépendant [30]. De même, certains virus se servent aussi de ce point de contrôle du transport nucléaire, mais pour le détourner en leur faveur. Il a ainsi été observé très récemment que le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) induit l'arrêt complet du transport nucléaire des cellules qu'il a infectées, inhibe de ce fait leur expression génétique et cela, vraisemblablement, par altération directe du cycle de fonctionnement de la petite protéine G Ran [31] ■

Olivier Dorseuil

Chargé de recherche Inserm, Inserm U. 257, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris.

RÉFÉRENCES

1. Gorlich D, Mattaj JW. Nucleocytoplasmic transport. *Science* 1996; 271 : 1513-8.
2. Koepf DM, Silver PA. A GTPase controlling nuclear trafficking: running the right way or walking RANdomly? *Cell* 1996; 87: 1-4.
3. Doye V, Hurt E. From nucleoporins to nuclear pore complexes. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 401-11.
4. Goldfarb DS, Garipey J, Schoolnik G, Kornberg RD. Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature* 1986; 322: 641-4.
5. Adam SA, Sterne-Marr R, Gerace L. Nuclear protein import using digitonin-permeabilized cells. *Methods Enzymol* 1992; 219: 97-110.
6. Moore MS, Blobel G. The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors. *Cell* 1992; 69: 939-50.
7. Gorlich D, Prehn S, Laskey RA, Hartmann E. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* 1994; 79: 767-78.
8. Gorlich D, Vogel F, Mills AD, Hartmann E, Laskey RA. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* 1995; 377: 246-8.
9. Moore MS, Blobel G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* 1993; 365: 661-3.

* Le motif Cap est une guanosine méthylée liée à l'extrémité 5' des ARN par un triphosphate. Ce motif Cap fixe des protéines jouant différents rôles dans la stabilité, la maturation et, le cas échéant, l'efficacité de la traduction des ARN.

10. Rush MG, Drivas G, D'Eustachio P. The small nuclear GTPase Ran: how much does it run? *Bioessays* 1996; 18: 103-12.
11. Gorlich D, Pante N, Kutay U, Aebi U, Bischoff FR. Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J* 1996; 15: 5584-94.
12. Weis K, Dingwall C, Lamond AI. Characterization of the nuclear protein import mechanism using Ran mutants with altered nucleotide binding specificities. *EMBO J* 1996; 15: 7120-8.
13. Yokoyama N, Hayashi N, Seki T, Pante T, Ohba K, *et al.* A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature* 1995; 376: 184-8.
14. Rexach M, Blobel G. Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* 1995; 83: 683-92.
15. Radu A, Moore MS, Blobel G. The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell* 1995; 81: 215-22.
16. Nakielny S, Dreyfuss G. Nuclear export of proteins and RNAs. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 420-9.
17. Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW, Luhrmann R. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 1995; 82: 475-83.
18. Michael WM, Choi M, Dreyfuss G. A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 1995; 83: 415-22.
19. Diaz J, Duc Dodon M, Schaerer-Uthurralt N, *et al.* Une protéine du virus de l'herpès simplex active, à la place de Rev et de Rex, le transport nucléocytoplasmique des messagers qui codent pour les glycoprotéines d'enveloppe des rétrovirus humains. *Med Sci* 1996; 12: 499-502.
20. Richards SA, Carey KL, Macara IG. Requirement of guanosine triphosphate-bound ran for signal-mediated nuclear protein export. *Science* 1997; 276: 1842-4.
21. Cheng Y, Dahlberg JE, Lund E. Diverse effects of the guanine nucleotide exchange factor RCC1 on RNA transport. *Science* 1995; 267: 1807-10.
22. Schlenstedt G, Wong DH, Koepf DM, Silver PA. Mutants in a yeast Ran binding protein are defective in nuclear transport. *EMBO J* 1995; 14: 5367-78.
23. Schlenstedt G, Saavedra C, Loeb JD, Cole CN, Silver PA. The GTP-bound form of the yeast Ran/TC4 homologue blocks nuclear protein import and appearance of poly(A)⁺ RNA in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 225-9.
24. Gorlich D, Kraft R, Kostka S, *et al.* Importin provides a link between nuclear protein import and U snRNA export. *Cell* 1996; 87: 21-32.
25. Kutay U, Izaurralde E, Bischoff FR, Mattaj IW, Gorlich D. Dominant-negative mutants of importin-beta block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex. *EMBO J* 1997; 16: 1153-63.
26. Ullman KS, Powers MA, Forbes DJ. Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell* 1997; 90: 967-70.
27. Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R, Gorlich D. Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 1997; 90: 1061-71.
28. Stade K, Ford CS, Guthrie C, Weis K. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 1997; 90: 1041-50.
29. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 1997; 90: 1051-60.
30. Saavedra C, Tung KS, Amberg DC, Hopper AK, Cole CN. Regulation of mRNA export in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 1996; 10: 1608-20.
31. Her LS, Lund E, Dahlberg JE. Inhibition of Ran guanosine triphosphatase-dependent nuclear transport by the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Science* 1997; 276: 1845-8.

TIRÉS À PART

O. Dorseuil.