

La dynamique de l'enveloppe nucléaire

Joël Beaudouin, Nathalie Daigle

➤ Dans les cellules eucaryotes, la chromatine est séquestrée dans le noyau. Ce compartiment est délimité par l'enveloppe nucléaire (Figure 1), constituée de deux membranes concentriques [1]. La membrane nucléaire externe se trouve en contact avec le cytoplasme et est en continuité avec le réticulum endoplasmique rugueux dont elle partage la structure et la fonction. La membrane nucléaire interne est, elle, en contact avec le nucléoplasme et contient un ensemble de protéines qui lui sont propres. Ces deux membranes se rejoignent autour des pores nucléaires, larges complexes transmembranaires formant des canaux aqueux permettant une circulation sélective de molécules entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire. Directement sous-jacent à la membrane nucléaire interne des cellules eucaryotes supérieures, on trouve un réseau de filaments intermédiaires appelé *lamina* [2]. Des études *in vitro* ont déjà montré que les protéines de la membrane nucléaire interne et certaines protéines des pores nucléaires interagissent avec la *lamina* ainsi qu'avec la chromatine [3]. Ainsi, du point de vue biochimique, membrane nucléaire interne, *lamina*, pores nucléaires et chromatine sont étroitement connectés. Une telle organisation pourrait être primordiale pour la stabilité et la fonction du noyau, ainsi que pour l'organisation de l'hétérochromatine en interphase. Elle n'a cependant pas été observée *in vivo*. Nous avons abordé cette question de la dynamique des composants de l'enveloppe nucléaire grâce à des techniques de microscopie confocale : les protéines d'intérêt, fusionnées à des protéines fluorescentes de différentes couleurs,

sont visualisées en trois dimensions dans des cellules vivantes, et leur devenir dans le temps et dans l'espace est analysé [4].

Dynamique de l'enveloppe nucléaire dans un noyau en interphase

La dynamique de la membrane nucléaire interne et de la *lamina* avait déjà été analysée *in vivo*, et selon ces études, les protéines de la membrane nucléaire interne sont libres de diffuser dans le réticulum endoplasmique, mais sont immobilisées transitoirement sur la membrane interne du fait de leurs interactions avec la *lamina* et la chromatine [5]. Par ailleurs, dans des analyses à court terme, la *lamina* apparaît comme une structure stable, lieu de peu d'échanges protéiques en interphase [6]. Afin d'obtenir des données plus précises sur la dynamique de l'enveloppe

nucléaire, nous nous sommes intéressés aux pores nucléaires, en étudiant notamment POM121, une protéine du pore qui ancre le complexe sur la membrane nucléaire (Figure 1) [7]. Au sein du complexe, POM121 apparaît comme une protéine très stable, dont la demi-vie est de l'ordre de la durée du cycle cellulaire. Cela indique que le pore lui-même est essentiellement un complexe stable en interphase. En outre, l'observation du mouvement des pores

montré que ces complexes sont organisés en un réseau totalement immobile. Lors de mouvements cellulaires, ce réseau se déforme, de manière coordonnée et élastique, en phase avec le reste du noyau, suggérant que les pores nucléaires sont véritablement ancrés dans l'enveloppe. Le seul ancrage dans la membrane n'est pas suffisant pour assurer cette stabilité, et la *lamina*, elle-même très stable pendant toute l'interphase, paraissait un très bon candidat pour assurer cette fonction d'amarrage des pores. En utilisant le photoblanchiment (*bleaching*) de fluorescence, il est possible de créer un motif sur la *lamina* et de comparer sa défor-

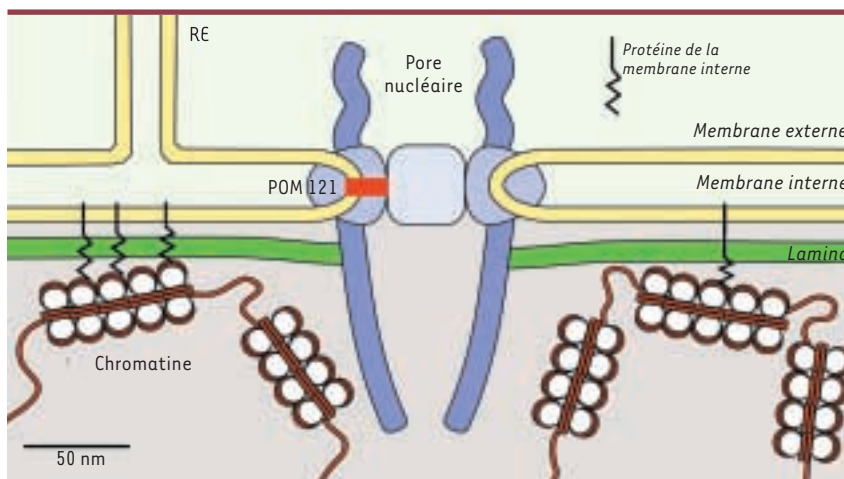


Figure 1. Structure de l'enveloppe nucléaire. Représentation à l'échelle. Le pore nucléaire est connecté de manière stable avec la *lamina*. Chromatine, *lamina* et membrane nucléaire interne sont également interconnectées.

Jan Ellenberg's laboratory,
Gene expression and cell
biology biophysics
programme,
European Molecular Biology
Laboratory,
Meyerhofstrasse 1,
D-69117 Heidelberg,
Allemagne.



mation à celle du réseau des pores nucléaires. Nous avons montré qu'effectivement, ces déformations lors de mouvements cellulaires sont parfaitement corrélées, montrant l'interconnexion très stable entre les pores nucléaires et la lamina. Ce résultat suggère que la lamina sert de structure d'ancrage pour les pores.

Dynamique de la rupture de l'enveloppe nucléaire en mitose

La dynamique de l'enveloppe nucléaire est totalement bouleversée en mitose. Chez les eucaryotes supérieurs, l'enveloppe est entièrement dispersée dans les périodes de prophase et prométaphase, puis réassemblée à la fin de la mitose. Jusqu'à présent, on connaissait surtout les mécanismes biochimiques associés à la rupture de l'enveloppe nucléaire. Le schéma qui découlait de ces études *in vivo* stipulait que la rupture débute avec la dépolymérisation de la lamina, due à la phosphorylation de ses constituants, puis survient une déstabilisation et une vésiculation des membranes [8]. On sait maintenant qu'*in vivo*, lors de la mitose, les protéines membranaires de l'enveloppe nucléaire sont dispersées dans le réticulum endoplasmique, et ne s'accumulent pas dans des vésicules [5]. Par ailleurs, Georgatos *et al.* avaient aussi observé sur des préparations de cellules fixées que les microtubules étaient co-localisées avec des invaginations qui apparaissaient dans l'enveloppe lors de

la prophase, mais dont la fonction est restée jusqu'à maintenant controversée [9].

Nous avons donc précisé la chronologie de la rupture de l'enveloppe nucléaire *in vivo* [10]. Une première observation montre que la perméabilisation de l'enveloppe nucléaire intervient avant la dépolymérisation de la lamina, contrairement à ce que suggéraient les données *in vitro*. En outre, nous avons pu vérifier que les microtubules sont impliqués dans le mécanisme. Dans la période qui

précède la perméabilisation, et jusqu'à une heure avant cette modification, des plis, co-localisés avec des faisceaux de microtubules, se forment le long de l'enveloppe nucléaire, dans la région des centrosomes. Environ 10 minutes avant la perméabilisation, des invaginations de l'enveloppe, ayant les centrosomes à leur base, croissent à l'intérieur du noyau. En utilisant la même technique de "photoblanchiment" que précédemment, nous avons pu montrer qu'en parallèle, la lamina est mise sous tension et étirée

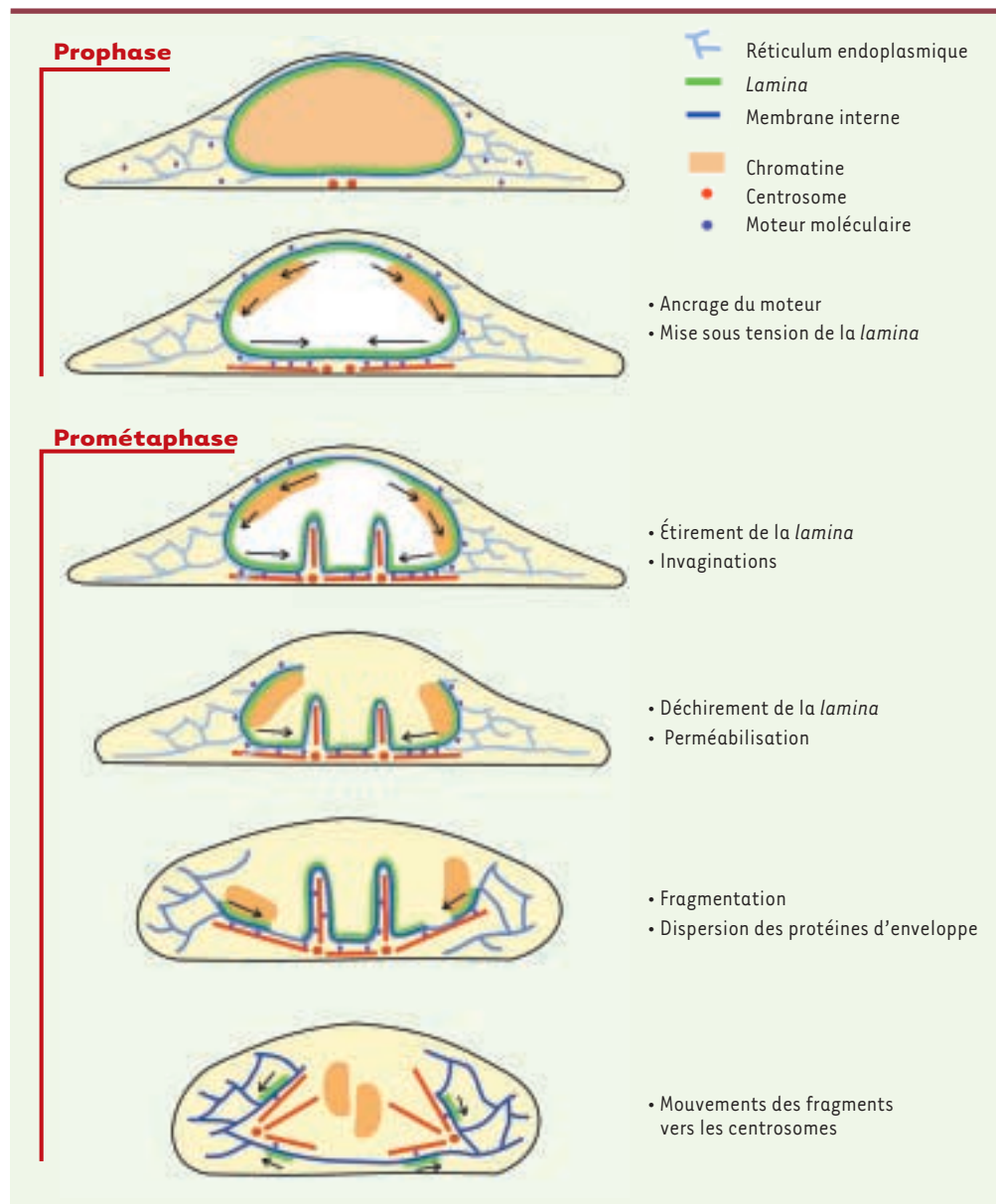


Figure 2. Modèle de la rupture de l'enveloppe nucléaire.



sous l'effet des microtubules, localement et dans des régions généralement éloignées des centrosomes. Finalement, la perméabilisation se produit lors de l'apparition de trous dans l'enveloppe, dans la région où l'étirement est maximal, suggérant un déchirement de la *lamina*. Par la suite, de nouveaux trous apparaissent et la plupart des protéines de l'enveloppe commencent à se disperser, puis, lorsque l'enveloppe nucléaire est fragmentée, les fragments initialement attachés aux chromosomes s'en détachent et sont entraînés vers les centrosomes, où ils sont finalement dispersés. Ce mouvement suggère qu'un moteur moléculaire migrant vers le pôle négatif des microtubules, tel que la dynéine [11], est impliqué dans le mécanisme.

La récapitulation de ces événements dynamiques nous fait proposer le modèle suivant (Figure 2): en prophase, un moteur moléculaire migrant vers le pôle négatif des microtubules est ancré sur l'enveloppe nucléaire et la connecte aux microtubules (Figure 2B). L'enveloppe nucléaire est alors tirée par ces moteurs en direction des centrosomes, ce qui provoque une accumulation de membranes et de *lamina* autour des centrosomes. Cette accumulation entraîne la formation des invaginations observées à l'intérieur du noyau (Figure 2C). Mais les forces dirigées vers les centrosomes affectent principalement les régions distantes de ces invaginations, où la *lamina* est étirée et finalement déchirée (Figure 2D). La perméabilisation a alors lieu, mais la tension se poursuit, facilitant la formation de nouveaux trous, puis la fragmentation, et finalement l'attraction des fragments vers les centrosomes (Figure 2E,F).

Le processus mécanique que nous proposons n'explique pas tout, et la dispersion des protéines de l'enveloppe est sans doute principalement dépendante de leur phosphorylation. Par ailleurs, plusieurs questions subsistent: comment se transmet la force produite par

les microtubules, qui sont dans le cytoplasme, à la *lamina*, qui, elle, se trouve à l'intérieur du noyau ? L'ancrage des pores nucléaires sur la *lamina* permet de relier mécaniquement le cytoplasme à la *lamina*, mais la connexion entre les pores et le moteur moléculaire reste à établir. En outre, si les microtubules sont dépolymérisés en prophase, la rupture de l'enveloppe nucléaire a toujours lieu, même si elle met en jeu un mécanisme différent, d'où la question suivante: quelle est la fonction d'un tel mécanisme, puisque la phosphorylation des protéines de l'enveloppe semble suffire pour les disperser. Il est possible que l'association de facteurs mécaniques et biochimiques augmente l'efficacité de la rupture de l'enveloppe et permette une entrée complète et irréversible en métaphase, mais cela reste à montrer.

L'analyse de la dynamique des protéines dans les cellules vivantes nous rappelle que les systèmes biologiques ne sont pas uniquement régis par des interactions biochimiques entre molécules, mais aussi par leur cinétique. Les techniques d'imagerie en microscopie confocale permettent de reconstituer des structures en 3 dimensions, d'observer leurs transformations au cours du temps et de quantifier divers paramètres contrôlant des processus qui, de prime abord, apparaissent fondamentaux et pourtant s'avèrent extrêmement difficiles à étudier *in vitro* dans leur globalité. ♦

Dynamics of nuclear cell membrane revealed *in vivo*.

- Gerace L, Burke B. Functional organization of the nuclear envelope. *Ann Rev Cell Biol* 1988; 4: 335-74.
- Gruenbaum Y, Wilson KL, Arel A, Goldberg M, Cohen M. Nuclear lamins--structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol* 2000; 129: 313-23.
- Wilson KL. The nuclear envelope, muscular dystrophy and gene expression. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 125-9.
- Ellenberg J, Lippincott-Schwartz J, Presley JF. Dual-colour imaging with GFP variants. *Trends Cell Biol* 1999; 9: 52-6.
- Ellenberg J, Siggia ED, Moreira JE, et al. Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol* 1997; 138: 1193-206.
- Broers JL, Machiels BM, Van Eys GJ, Kuijpers HJ, Manolers EM, Van Driel R, Ramaekers FC. Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J Cell Sci* 1999; 112: 3463-75.
- Daigle N, Baudouin J, Hartnell L, et al. Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *J Cell Biol* 2001; 154: 71-84.
- Marshall I, Wilson K. Nuclear envelope assembly alter mitosis. *Trends Cell Biol* 1997; 7: 69-74.
- Georgatos SD, Pырpasopoulou A, Theodoropoulos PA. Nuclear envelope breakdown in mammalian cells involves stepwise lamina disassembly and microtubule-drive deformation of the nuclear membrane. *J Cell Sci* 1997; 110: 2129-40.
- Beaudouin J, et al. Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule induced tearing of the *lamina*. *Cell* 2002 (sous presse).
- Salina D, et al. Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown. *Cell* 2002 (sous presse).