

Synthèse et routage des protéines chez les eucaryotes.

I/ Problématique du Routage

I.a/Conséquence de la compartimentation et de la polarité cellulaire

Chez les bactéries le nombre de compartiments distincts est très limité

- 1.Le hyaloplasme
- 2.La membrane cytoplasmique
- 3.La paroi

La survie des bactéries ne semble pas nécessiter la mise en place d'un système élaboré de distribution des protéines.

I.a/Conséquence de la compartimentation et de la polarité cellulaire

Les cellules eucaryotiques sont constituées d'un grand nombre de compartiments spécialisés.

Ces compartiments sont tous constitués de protéines et délimités par au moins une membrane.

A cette compartimentalisation s'ajoute la polarisation de cellules
ex: cellules exocrine pancréatique/ terminaison synaptique

Où s'effectue la synthèse de protéines?

Comment s'effectue ce routage des protéines à tout moment dans la cellule?

I.b/Lieu de synthèse protéique chez les eucaryotes

Les cellules peuvent avoir 3 types de génomes différents:

1. ADN nucléaire
2. ADN mitochondrial
3. ADN chloroplastique

⇒ 3 types de ribosomes et 3 lieux de synthèse différents.

Le cytoplasme est le lieu de l'expression des gènes nucléaires.

Pour les 2 autres types d'ADN, l'expression s'effectue dans les organites.

La petite taille de l'ADN mitochondriale et chloroplastique ne permet pas de coder pour l'ensemble des protéines nécessaire au bon fonctionnement de ces organites.

b/ Lieu de synthèse protéique chez les eucaryotes

⇒ Besoin d'un apport de protéines issus de l'ADN nucléaire

La majorité des protéines produites dans ces organites servent essentiellement à leur propre élaboration.

Le problème de routage concerne exclusivement les protéines issus de la traduction des gènes nucléaires
: cytoplasme -----> Les différents organites

I.c/ Différents modes de transfert des protéines d'un compartiment à un autre

Passage à travers des pores:

Mitochondries et Noyau

Franchissement direct de membranes:

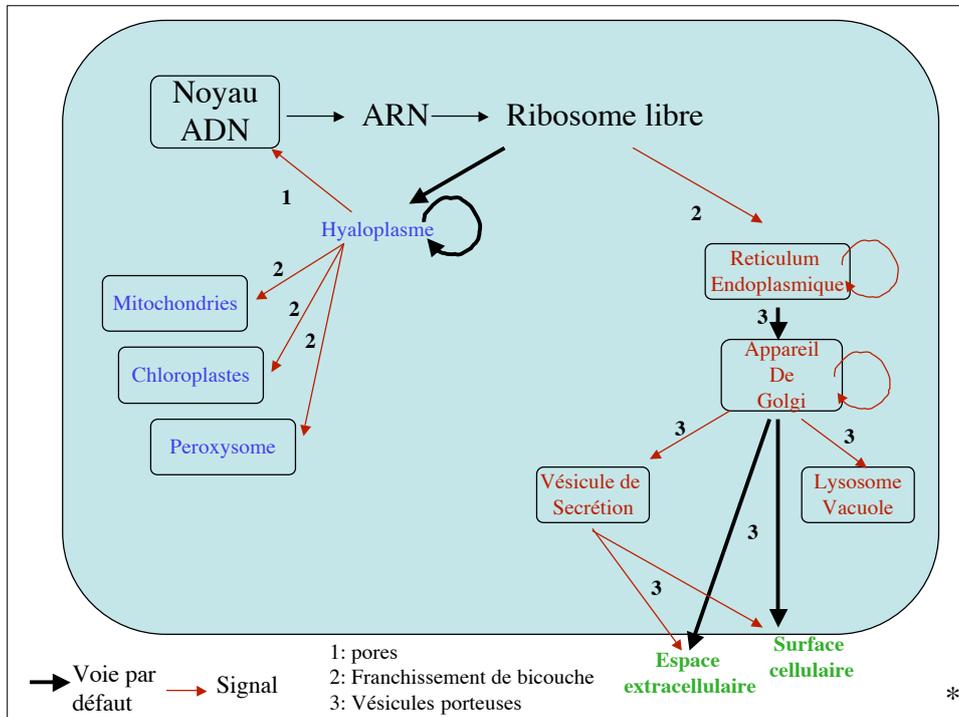
Besoin de protéines spécialisées et déjà localisées dans la membrane
transport cotraductionnel
transport post-traductionnel

Mise en jeu de vésicule:

Bourgeoisement et fusion des membranes
=> transfert du contenu et du contenant
=> problème de spécificité et de recyclage

I.d/ Principales méthodes expérimentales mises en œuvre dans l'analyse du routage

1. Expérience de pulse chase associé à de l'autoradiographie
 1. Lieu de synthèse
 2. Trajet suivi
2. Méthode de fractionnement cellulaire associé à des techniques biochimiques : chromatographie , électrophorèse.
 3. L'immunocytochimie
 4. Le génie génétique



II/ Synthèse et devenir des protéines produites au niveau du cytoplasme

II.a/ Principe du routage post-traductionnel

1. Cette synthèse protéique s'effectue sur les ribosomes libres.
2. Ces protéines seront ensuite dirigées vers les compartiments ciblés:
Routage post-traductionnel.
3. Quatre destination majeures
Hyaloplasme
Noyau
Organites semi autonome (mitochondries, chloroplaste)
Peroxysome
4. Les protéines restent dans le hyaloplasme par défaut car elles ne possèdent pas de séquence d'adressage.
Ex: Les enzymes solubles du métabolisme énergétique, les protéines du cytosquelette et les protéines membranaires extrinsèques

II.a/ Principe du routage post-traductionnel

1. Les trois autres types de destinations utiliseront des systèmes nécessitant la présence:
 - d'une séquence signalé portée par la protéine à transporter,
 - D'un récepteur porté par la membrane la plus externe de l'organite,
 - Système de canaux créés par des protéines formant un tunnel membranaire.
2. Ces protéines devront être débobiner grâce à des protéines chaperonnes afin de permettre leur transfert.
 - Besoin d'ATP
 - Système assez rapide:
Ribosome--->Organite 2 à 3mn

II.b/ Routage des protéines vers le noyau

Très nombreux échanges entre le cytoplasme et le noyau

Les protéines intervenant dans les activités nucléaires

- Polymérase (ADN et ARN)
- Maturation des transcrits
- Structure de la chromatine
- Protéines de régulation

Exportation de particules ribonucléoprotéiques

- ARNm
- ARNt
- Sous unité ribosomique

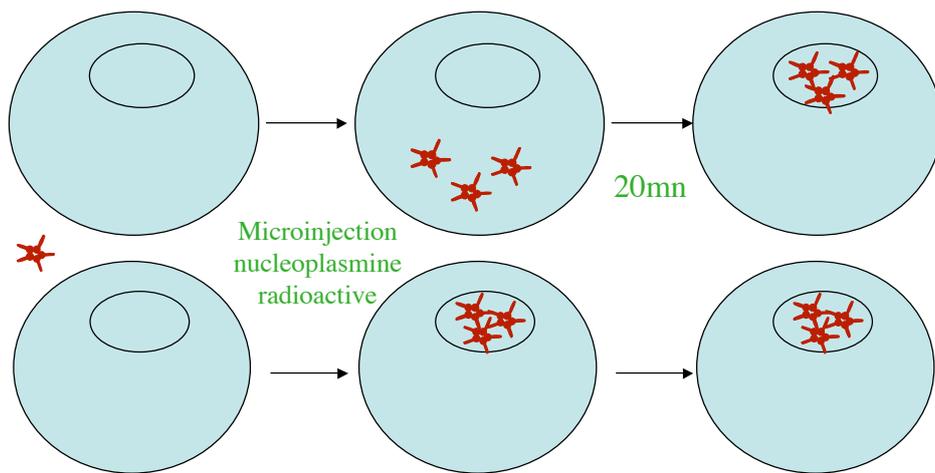
II.b/ Routage des protéines vers le noyau

Mise en évidence expérimentale

Modèle: ovocyte d'amphibien (intérêt cellule géante)

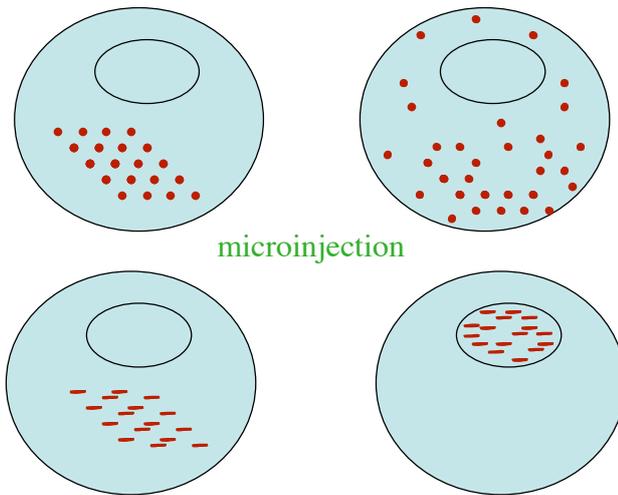


Protéine étudiée : nucléoplasmine (pentamère/nucléaire)



II.b/ Routage des protéines vers le noyau

Digestion de la nucléoplasmine par protéolyse suivie d'une purification



II.b/ Routage des protéines vers le noyau

Ces expériences démontrent que:

- Passage de la protéine du hyaloplasme vers le noyau ne se fait pas par diffusion.
- Présence de complexes pores nucléaires.
- Présence de séquence spécifique d'adressage.

Des comparaisons de séquences sur les protéines à localisation nucléaire ont permis de définir une séquence permettant ce transfert

Séquence NLS: Nuclear Localisation Signal

- Séquence de 5 à 10 aa: En général une Proline est suivie de 4 à 5 aa basique (Argine Lysine).

Ex (NH₂)-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-(COOH)

Cette séquence peut être continue ou interrompue.

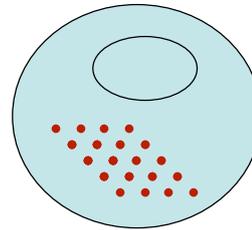
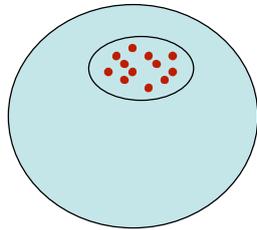
Ex PheLysLysLysArgLysVal ou LysArgPheAlaAlaThrLysLysAlaGlyGlnAlaLysLysLysLys

II.b/ Routage des protéines vers le noyau

Exemple de séquence NLS: Antigène T du virus SV 40

Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val

Pro-Pro-Lys-Thr-Lys-Arg-Lys-Val



b/ Routage des protéines vers le noyau

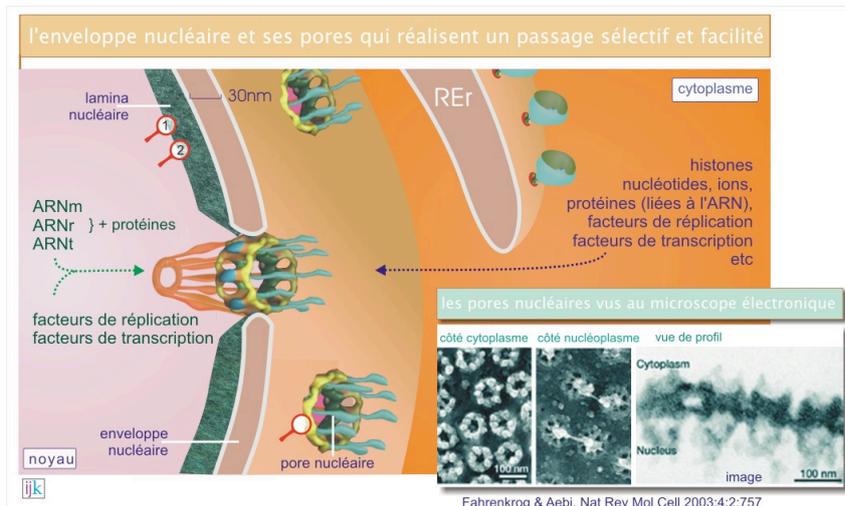
Ces séquences NLS nécessitent la présence de récepteurs appelés pore nucléaire présent dans la membrane nucléaire.

La fonction de ces pores est double:

transfert du nucleoplasme vers le hyaloplasme

transfert du hyaloplasme vers le nucléoplasme par la présence des séquences NLS.

Ces pores sont entre 2000 et 4000 par noyau



II.b/ Routage des protéines vers le noyau

Structure du pore nucléaire

Complexe protéique de 120000kDa composé de plusieurs structures:

- Deux anneaux (nucléaire et cytoplasmique)
- Un réseau central
- Huit rayons 16 filaments (8 de part et d'autres de la membrane nucléaire). Ces filaments jouent le rôle de site de fixation des protéines et des ARN à transférer.

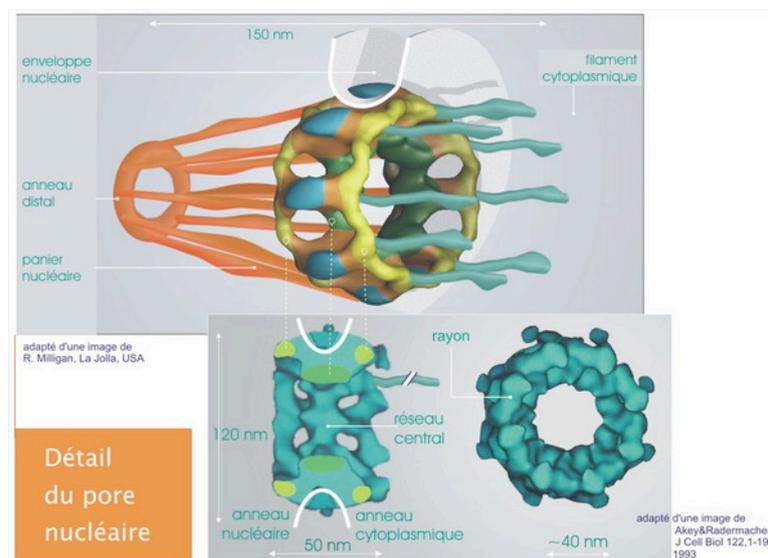
L'ensemble de ces protéines appartient à la famille des nucléoporines (Nup) : 30 membres connus.

<=> Panier de basket

Les molécules de PM < à 40kDa peuvent diffuser librement à travers le pore nucléaire

Les molécules de PM > à 40kDa nécessitent un transport actif.

II.b/ Routage des protéines vers le noyau



NB: Cette structure est très conservée dans l'évolution puisqu'elle est retrouvée de la Levure jusqu'au Mammifère.

*

II.b/ Routage des protéines vers le noyau



*

II.b/ Routage des protéines vers le noyau

Les séquences NLS sont reconnues par une protéine adaptatrice Importine- α (PM 60 kDa).

Ce complexe interagit avec le récepteur Importine- β (PM 97 kDa).

Ce deuxième complexe se liera aux filaments cytoplasmiques (Nup 358) du pore par le biais d'une séquence riche en Phe et Gly.

Ce processus permet ensuite le transfert du complexe (importine- α,β et protéine entrante) du cytoplasme vers le nucléoplasme grâce à la présence de séquences riche en Phe et Gly (F_xFG) situé sur la nucléopore Nup 153. Cette protéine est une élastique et peut ainsi adopter une structure étirée ou retractsée.

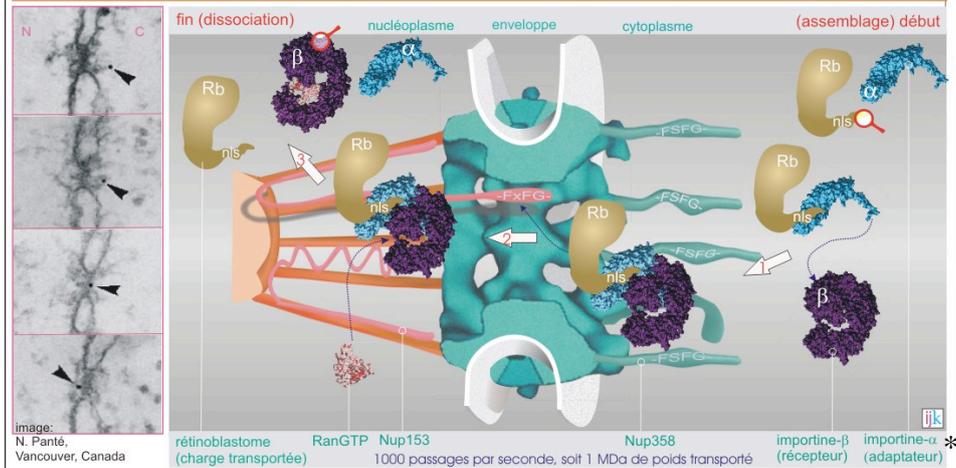
Le complexe Recepteur/Adaptateur est libéré de sa charge par une protéine liant le GTP : Ran GTP (PM 24kDa).

II.b/ Routage des protéines vers le noyau

Exemple de la protéine Rétinoblastome

- localisée dans le noyau et joue un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération cellulaire.
- en présence d'autres facteurs se fixe à l'ADN et rend ainsi ces régions moins accessible au ARN polymérase.
- empêche ainsi la transcription de gènes qui préparent à la division cellulaire.
- C'est une protéine suppresseur de cancer.

passage de Rb à travers le pore nucléaire; facilité par les importines et RanGTP



II.b/ Routage des protéines vers le noyau

Signal de localisation nucléaire de la protéine rétinoblastome (Rb, suppresseur de tumeur)

```

811 Ser Pro Tyr Lys Ile Ser Glu Gly Leu Pro Thr Pro Thr Lys Met 825
826 Thr Pro Arg Ser Arg Ile Leu Val Ser Ile Gly Glu Ser Phe Gly 840
841 Thr Ser Glu Lys Phe Gln Lys Ile Asn Gln Met Val Cys Asn Ser 855
856 Asp Arg Val Leu Lys Arg Ser Ala Glu Gly Ser Asn Pro Pro Lys 870
871 Pro Leu Lys Lys Leu Arg Phe Asp Ile Glu Gly Ser Asp Glu Ala 885
886 Asp Gly Ser Lys His Leu Pro Gly Glu Ser Lys Phe Gln Gln Lys 900
901 Leu Ala Glu Met Thr Ser Thr Arg Thr Arg Met Gln Lys Gln Lys 915
916 Met Asn Asp Ser Met Asp Thr Ser Asn Lys Glu Glu Lys

```

peptide (860-877) de destination, basique et "bipartite"

Mw 106 kDa

Remarque

- Il existe des protéines à localisation nucléaires ne nécessitant pas d'interaction à l'importine-α. De même RAN-GTP n'est pas toujours nécessaire au transfert de protéine via le pore.
- Il doit exister un système pour ramener les Importines du côté cytoplasmique.

*

II.b/ Routage des protéines vers le noyau

Export

Ces protéines contiennent une séquence NES (Nuclear Export Signal).

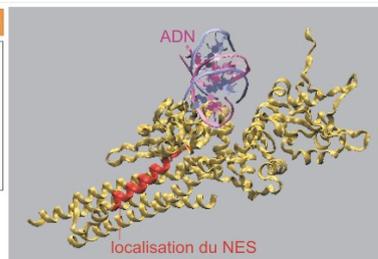
Cette séquence est riche en leucine (aa non polaire).

Signal d'export nucléaire de la protéine STAT-1 (facteur de transcription)

```
271 Gln Gln Val Arg Gln Gln Leu Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Gln 285
286 Lys Tyr Thr Tyr Glu His Asp Pro Ile Thr Lys Asn Lys Gln Val 300
301 Leu Trp Asp Arg Thr Phe Ser Leu Phe Gln Gln Leu Ile Gln Ser 315
316 Ser Phe Val Val Glu Arg Gln Pro Cys Met Pro Thr His Pro Gln 330
331 Arg Pro Leu Val Leu Lys Thr Gly Val Gln Phe Thr Val Lys Leu 345
346 Arg Leu Leu Val Lys Leu Gln Glu Leu Asn Tyr Asn Leu Lys Val 360
361 Lys Val Leu Phe Asp Lys Asp Val Asn Glu Arg Asn Thr Val Lys 375
```

peptide (301-320) de destination, riche en leucine

74 kDa



II.b/ Routage des protéines vers le noyau

L'exportation s'effectue selon des principes similaires de ceux de l'importation

L'exportine-1 reconnaît sa charge en présence de RAN-GTP.

Ce complexe se déplace dans le pore en se fixant à des séquences FXFG présent par exemple sur Nup 153 ou Nup 214.

Arrivé dans le cytoplasme le complexe se fixe à un filament cytoplasmique (Nup358) et à RanGAP (GTPase activatin protein).

RanGAP hydrolyse le GTP et ainsi conduit à la libération de la charge dans le cytoplasme.

II.b/ Routage des protéines vers le noyau

Orientation du transport nucléaire: rôle de Ran.

Le transport à travers la membrane nucléaire utilise un récepteur à double affinité :

- Fixation de la charge (importine α /Rb ou Exportine-1/Stat-1),
- liaison à un motif riche en Phe et Gly (La séquence FxFG).

Ran lié au GTP :

libérer la charge du système importine et
de fixer sa charge à l'exportine

Ran lié au GDP:

libère le système exportine de sa charge.

En fonction de la forme de Ran présente dans le cytoplasme ou le nucléoplasme => orientation du passage.

NB: Importance d'une répartition de ces 2 formes.