

Article

« Dynamique d'assemblage des machineries nucléolaires après la mitose, en temps réel et en cellules vivantes / Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells »

Danièle Hernandez-Verdun

M/S : médecine sciences, vol. 21, n° 12, 2005, p. 1025-1027.

Pour citer cet article, utiliser l'information suivante :

URI: <http://id.erudit.org/iderudit/012004ar>

DOI: 10.7202/012004ar

Note : les règles d'écriture des références bibliographiques peuvent varier selon les différents domaines du savoir.

Ce document est protégé par la loi sur le droit d'auteur. L'utilisation des services d'Érudit (y compris la reproduction) est assujettie à sa politique d'utilisation que vous pouvez consulter à l'URI <https://apropos.erudit.org/fr/usagers/politique-dutilisation/>

Érudit est un consortium interuniversitaire sans but lucratif composé de l'Université de Montréal, l'Université Laval et l'Université du Québec à Montréal. Il a pour mission la promotion et la valorisation de la recherche. Érudit offre des services d'édition numérique de documents scientifiques depuis 1998.

Pour communiquer avec les responsables d'Érudit : info@erudit.org



suite de la décharge neuronale, par des cellules largement connectées grâce à des jonctions de type *gap* [6]. Il semble toutefois possible d'observer une gliose précédant la survenue des crises dans certains modèles. La réaction astrocytaire ne serait donc pas obligatoirement secondaire à la crise.

Le travail présenté aujourd'hui bénéficie des dernières avancées de la technologie d'imagerie cellulaire du calcium. Les auteurs ont chargé les cellules de l'hippocampe (gyrus et CA1) avec du calcium « cagé ». L'exposition à une source laser permet la libération et la brusque élévation intracellulaire du calcium. La technique utilisée, couplée à la technologie de microscopie en double photon, permet de cibler une cellule particulière et d'enregistrer les conséquences dans les cellules voisines. Lorsque le calcium est libéré au sein d'un astrocyte, on observe dans les neurones avoisinants l'appari-

tion d'une dépolarisation typique d'un PDS. Si le calcium est libéré dans le cytoplasme d'un neurone, rien ne se passe. De façon intéressante, les auteurs ont testé 5 modèles différents de genèse des crises. Dans chaque cas, l'interférence avec la transmission neuronale n'affecte pas le PDS tandis que le blocage des vagues calciques se transmettant d'astrocytes en astrocytes ou l'inhibition de l'augmentation intracellulaire du calcium astrocytaire inhibe totalement l'apparition du PDS.

Ce travail place donc l'astrocyte au cœur du mécanisme de synchronisation de la crise. Comment s'intègrent ces données dans la véritable clinique d'une crise chez l'homme ? Au moins dans le phénomène de réentrée qui met en résonance la décharge neuronale et la réponse gliale lors de la crise. Quel est l'œuf et quelle est la poule ? La réponse reste ouverte, mais la modulation des trans-

porteurs astrocytaires du glutamate devient une nouvelle cible thérapeutique pour le contrôle de crises particulièrement invalidantes. ♦

An astrocytic basis of epilepsy

RÉFÉRENCES

1. Araque A, Perea G. Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia* 2004 ; 47 : 241-8.
2. Fellin T, Pascual O, Gobbo S, et al. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 2004 ; 43 : 729-3.
3. Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E. Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 2004 ; 24 : 6920-7.
4. Tian GF, Azmi H, Takano T, et al. An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med* 2005 ; 11 : 973-81.
5. Dingledine R, Hynes MA, King GL. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in epileptiform bursting in the rat hippocampal slice. *J Physiol (Lond)* 1996 ; 380 : 175-89.
6. Nett WJ, Oloff SH, McCarthy KD. Hippocampal astrocytes *in situ* exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiol* 2002 ; 87 : 528-37.

NOUVELLE

Dynamique d'assemblage des machineries nucléolaires après la mitose, en temps réel et en cellules vivantes

Danièle Hernandez-Verdun

Institut Jacques Monod, 2, place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France
dhernand@ccr.jussieu.fr

protéines-protéines dans les PNB [6]. Notre but est de comprendre le rôle des PNB au cours de l'assemblage du nucléole.

Méthodes utilisées

Nous avons utilisé la vidéo microscopie pour comparer la dynamique des protéines avec des étiquettes fluorescentes vertes (GFP) ou rouge (DsRed). Nous avons comparé les concentrations des protéines de maturation précoces ou tardives dans les PNB. Enfin nous avons utilisé une méthode de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) fondé sur la décroissance de la durée de vie de la GFP (donneur) en présence de DsRed (accepteur) [7]. Cette analyse non invasive, est réalisée pendant l'assemblage du nucléole et mesure la distance entre les deux étiquettes fluorescentes. La distance entre la GFP et la DsRed est inférieure à 7 nm s'il y a FRET ce

> Le noyau des cellules est réorganisé après chaque mitose. Ce qui implique la reformation de l'enveloppe nucléaire, la décondensation de la chromatine et la réorganisation des machineries nucléaires. Il faut réadresser les machineries au bon endroit au bon moment pour rassembler un noyau fonctionnel.

La re-formation du nucléole, site de la biogenèse des ribosomes, a été choisi comme système modèle [1, 2]. Nous cherchons à comprendre comment les machineries de maturation des ARN ribosomiques (ARNr) sont recrutées sur les

sites de transcription des gènes ribosomiques. Pendant la mitose, les machineries de maturation nucléolaires sont localisées à la périphérie des chromosomes et donc à distance des gènes ribosomiques.

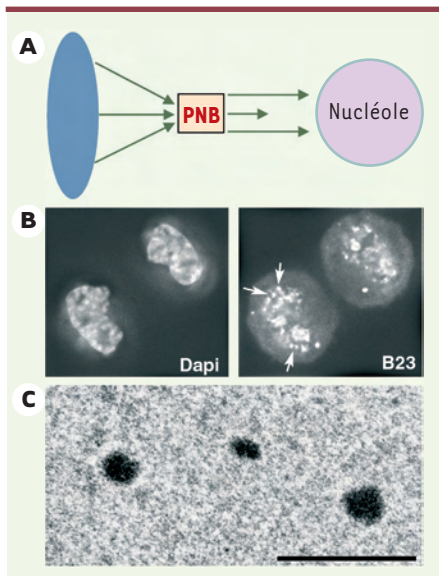
On sait que le recrutement des protéines de maturation n'est pas direct mais fait intervenir une étape intermédiaire : la formation de corps appelés PNB (*pre-nucleolar body*) [3-5]. Dans un travail récent, nous avons comparé la dynamique de formation des PNB, le tri des protéines en fonction du temps et les interactions

qui correspond à la distance d'interaction des molécules.

Résultats obtenus

La dynamique et le tri des protéines

Les protéines de maturation précoce (fibrillarine) et de maturation tardive (Bop1, B23 et Nop52) sont co-localisées en anaphase à la surface des chromosomes et forment plusieurs dizaines de PNB par noyaux en télophase. Nous avons montré préalablement en vidéomicroscopie [8] que la présence de la fibrillarine dans les PNB était en moyenne de 15 minutes avant son recrutement dans le nucléole, tandis qu'elle était de 80 minutes pour Nop52. Nous en avons conclu



qu'il y avait deux types de PNB correspondant respectivement à la maturation précoce et à la maturation tardive et à la cinétique de recrutement des protéines dans le nucléole. Dans ce travail, nous avons comparé dans la même cellule la dynamique des deux types de protéines. Nous avons co-exprimé la GFP-fibrillarine et la DsRed-B23, et suivi la localisation respective des deux protéines. Les images montrent la superposition des deux signaux dans les mêmes PNB. La quantification des deux signaux dans les PNB et en dehors des PNB indique : (1) que les deux protéines passent par les mêmes PNB ; (2) que la concentration dans les PNB est de 3 à 6 fois celle des protéines diffuses ; et (3) que la fibrillarine quitte plus vite les PNB que la protéine B23. Ainsi, dans les PNB, des protéines des machineries de maturation précoce et tardive sont co-localisées, mais leur temps de résidence n'est pas le même. Il y a donc un mécanisme de tri pour adresser ces protéines dans le nucléole. La même démarche a été suivie pour comparer la dynamique des protéines tardives entre elles. Nous avons constaté que les protéines Nop52 et B23 étaient ensemble dans les PNB et que leur concentration variaient simultanément dans les PNB et dans le nucléole. Cette observation peut s'expliquer par une interaction entre ces deux protéines avant leur recrutement dans le nucléole.

Les interactions protéiques dans les PNB

Pour mettre en évidence l'interaction des protéines Nop52 et B23, nous avons tout d'abord montré un FRET positif dans le nucléole. La durée de vie de la GFP-Nop52 est réduite en présence de DsRed-B23. En revanche, la durée de vie de la GFP-fibrillarine et de GFP-Bop1 n'est pas diminuée en présence de DsRed-B23. Il n'y a donc pas d'interaction détectable entre ces protéines. L'absence de FRET est attendue dans le cas du couple fibrillarine-B23 puisque les deux protéines ne sont pas dans le même compartiment

nucléolaire (contrôle négatif). Par ailleurs, Bop1 et B23 sont co-localisés dans le même composant nucléolaire et participent à la même étape de maturation des ARNr. Cela est un bon contrôle pour montrer la spécificité de la détection de FRET.

La mesure du FRET a été réalisée par cette approche entre GFP-Nop52 et DsRed-B23 pendant deux heures à partir de l'anaphase. Pendant cette période, les protéines forment des PNB puis les protéines sont recrutées dans le nucléole. L'enregistrement de la durée de vie de la GFP est réalisé sur l'ensemble du champ, ensuite les structures d'intérêts sont sélectionnées et le FRET est mesuré au cours du temps dans ces structures. À la périphérie des chromosomes en anaphase, le FRET n'a jamais été détecté. Le FRET est détecté dans 20 % des PNB quand les cellules entrent en télophase, mais dans 40 % en fin de télophase. Ce pourcentage est de 55 % dans les PNB en début de G1. Ces résultats indiquent que les interactions entre GFP-Nop52 et DsRed-B23 ont lieu dans les PNB avant leur recrutement dans le nucléole.

Conclusions

Le recrutement des protéines de maturation dans le nucléole n'est pas direct en début d'interphase. Il y a, entre la périphérie des chromosomes et le nucléole une étape intermédiaire, étape correspondant à la formation de nombreuses petites structures : les PNB. En analysant la dynamique des protéines de maturation précoce et tardive, nous avons montré que ces deux classes de protéines

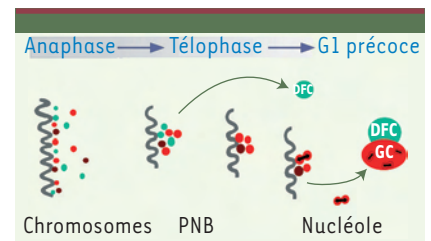


Figure 2. Trafic et interaction des protéines nucléolaires pendant l'assemblage du nucléole (d'après [6]).



passent par les mêmes PNB. Cette observation semble indiquer qu'il y aurait des sites de formation des PNB, puis un tri des protéines pour un recrutement précoce ou tardif dans le nucléole. Le mécanisme de tri n'est pas connu pour le moment. La mesure de FRET pendant l'assemblage du nucléole a permis de découvrir une interaction entre des protéines de maturation tardive au niveau des PNB. Ce signal de FRET augmente au cours du temps et suggère un rôle de plate-forme d'assemblage pour les PNB. Les nouvelles techniques d'observation et de mesure en cellules vivantes, et en temps réel [9, 10], montrent leur

potentiel pour comprendre des phénomènes complexes comme l'assemblage du nucléole. ♦

Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells

RÉFÉRENCES

1. Strouboulis J, Wolffe AP. Functional compartmentalization of the nucleus. *J Cell Sci* 1996 ; 109 : 1991-2000.
2. Hernandez-Verdun D, Louvet E. Le nucléole : structure, fonctions et maladies associées. *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 37-44.
3. Ochs RL, Lischwe MA, Shen E, et al. Nucleologenesis : composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma* 1985 ; 92 : 330-6.
4. Dundr M, Misteli T, Olson MOJ. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol* 2000 ; 150 : 433-46.
5. Hernandez-Verdun D, Roussel P, Gébrane-Younès J. Emerging concepts of nucleolar assembly. *J Cell Sci* 2002 ; 115 : 2265-70.
6. Angelier N, Tramier M, Louvet E, et al. Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells. *Mol Biol Cell* 2005 ; 16 : 2862-71.
7. Tramier M, Gautier I, Piolat T, et al. Picosecond-Hetero-FRET microscopy to probe protein-protein interactions in live cells. *Biophys J* 2002 ; 83 : 3570-7.
8. Savino TM, Gébrane-Younès J, De Mey J, et al. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol* 2001 ; 153 : 1097-110.
9. Misteli T. Protein dynamics : implications for nuclear architecture and gene expression. *Science* 2001 ; 291 : 843-7.
10. Janicki SM, Spector DL. Nuclear choreography : interpretations from living cells. *Curr Opin Cell Biol* 2003 ; 15 : 149-57.

NOUVELLE

Les trypanosomatides sous les feux du séquençage

Frédéric Bringaud

Laboratoire de Génomique fonctionnelle des trypanosomatides, UMR CNRS 5162, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France.
frederic.bringaud@parasitol.u-bordeaux2.fr

► La trypanosomiase africaine (la maladie du sommeil), la trypanosomiase sud-américaine (la maladie de Chagas) et les leishmanioses (cutanées, mucocutanées et viscérales) sont des maladies humaines, dites négligées, causées par des protozoaires appartenant à la famille des trypanosomatides [1]. Ces parasites sont des eucaryotes unicellulaires flagellés dont le génome nucléaire est généralement diploïde. Ils affectent environ 25 millions d'individus, principalement dans des régions économiquement défavorisées (régions tropicales et subtropicales des continents africain et sud-américain). En l'absence de traitement, ces parasitoses sont souvent mortelles. Or, l'absence de vaccin et l'augmentation des cas de résistance aux rares médicaments disponibles nécessitent le développement de nouveaux moyens thérapeutiques dirigés contre ces parasitoses. Avec l'avènement de la génomique et de la

post-génomique, la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques passe par le décryptage du génome complet de ces parasites. Cet objectif a récemment été atteint par le consortium « Trityp » en séquençant et en analysant le génome des souches TREU927 de *Trypanosoma brucei* (maladie du sommeil) [2], CL Brener de *Trypanosoma cruzi* (maladie de Chagas) [3] et Friedlin de *Leishmania major* (Leishmaniose cutanée) [4]. Le consortium Trityp est composé de quatre laboratoires de séquençage (*the Institute for Genomic Research, Wellcome Trust Sanger Institute, Seattle Biomedical Research Institute et Center for Genomics and Bioinformatics*) et d'une cinquantaine de laboratoires de la communauté scientifique internationale impliqués dans l'annotation et l'analyse de ces génomes. Les problèmes de santé publique ne sont pas les seules raisons de l'intérêt porté par la communauté scientifique

pour ces parasites. En effet, les trypanosomatides font partie des eucaryotes les plus anciens et qui sont les plus étudiés pour leurs nombreuses particularités métaboliques et structurales [5] parmi lesquelles : (1) les glycosomes ; (2) la présence d'une seule mitochondrie dont l'ADN représente 10 % de l'ADN cellulaire ; (3) la modification post-transcriptionnelle des ARN messagers mitochondriaux par ajout et délétion de résidus uridine (édition des ARN) ; (4) l'expression polycistronique des gènes nucléaires ; (5) la maturation des ARN pré-messagers nucléaires par *trans*-épissage ; et (6) la variation antigénique de la protéine de surface de *T. brucei*. Par ailleurs, ces parasites utilisent différentes stratégies pour échapper aux défenses immunitaires de l'hôte, telles que, la variation antigénique (*T. brucei*), le développement de formes intracellulaires (*T. cruzi* et les leish-