

Ran ou le parfum de la chromatine

La ségrégation correcte du matériel génétique au moment de la mitose dépend de la formation du fuseau mitotique, assemblage de microtubules qui se réorientent autour des chromosomes. Les mécanismes qui contrôlent l'assemblage et la réorientation de cette structure dynamique sont très complexes et peu connus. Une GTPase nucléaire de la famille de Ras, Ran, impliquée jusqu'à maintenant dans le transport nucléo-cytoplasmique, s'avère un acteur essentiel de ce processus. Pendant l'interphase, la forme active, Ran-GTP, est nucléaire, et la forme inactive, Ran-GDP, cytoplasmique. Lors de la mitose, Ran-GTP

induit la polymérisation des microtubules et leur organisation en un fuseau bipolaire, probablement sous l'effet inducteur de la chromatine elle-même. Ran-GTP, agirait durant la mitose comme au cours du transport nucléocytoplasmique lors de l'interphase, d'échange, agirait en libérant des protéines nucléaires directement responsables de l'assemblage des polymères de tubuline. Ces données, en suggérant l'implication directe de la chromatine dans l'assemblage des microtubules par l'intermédiaire de Ran, confirment que la formation du fuseau est un processus en perpétuelle activité.

La ségrégation fidèle du matériel génétique d'une cellule à ses deux cellules filles dépend de l'assemblage d'une merveilleuse structure de microtubules, le fuseau mitotique. Les microtubules, polymères cylindriques de molécules de tubuline, sont essentiels pour la morphologie cellulaire et pour le transport intracellulaire d'organites. En interphase, les microtubules sont longs et stables et rayonnent dans toutes les directions à partir d'un unique centre organisateur de microtubules appelé centrosome dans la plupart des cellules animales (figure 1A, gauche). Lors que la cellule

s'apprête à entrer en phase M ou mitose (division cellulaire), après la duplication de ses centrosomes et la réplication de son ADN, le réseau de microtubules longs et stables se réorganise et les microtubules deviennent courts et dynamiques. Les centrosomes se séparent, les chromosomes se condensent et l'enveloppe nucléaire est rompue (figure 1A, centre). Par la suite, les microtubules se réorientent de façon prédominante vers les chromosomes. Enfin, les kinétochores, structures protéiques spécialisées des chromosomes, capturent des microtubules des centrosomes. Le fuseau mitotique est formé (figure 1A, droite).

La réorganisation du réseau de microtubules autour des chromosomes durant l'assemblage du fuseau est un processus qui n'est pas tout à fait compris. Des études utilisant des cellules de plantes et certaines cellules méiotiques animales dépourvues de centrosomes, ont révélé néanmoins que des fuseaux peuvent s'assembler en l'absence de ces organelles (figure 1B). Comment ce réseau bipolaire de polymères pourrait-il s'assembler autour de la chromatine en l'absence de sources préalables de microtubules? La chromatine pourrait-elle avoir un rôle actif dans la mise en route de l'assemblage des microtubules pen-

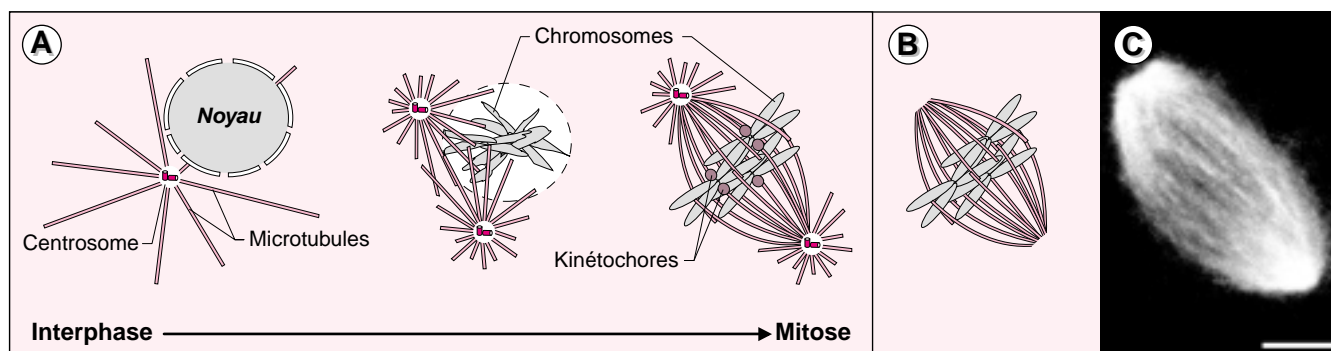


Figure 1. Différents types de fuseaux bipolaires. A. Redistribuition des microtubules lors de l'assemblage du fuseau mitotique. B. Fuseau « méiotique » en l'absence de centrosomes. C. Fuseau induit par Ran-GTP dans des extraits « mitotiques » en l'absence de centrosomes, de kinétochores et de chromosomes. Échelle : 5 µm.

dant l'organisation du fuseau en l'absence de centrosomes? Pourrait-elle avoir un rôle dans l'assemblage de microtubules pendant la formation du fuseau en général?

Ran, parfum de la chromatine...

Récemment, la compréhension de l'assemblage du fuseau a été grandement améliorée grâce à des études utilisant des extraits d'œufs méiotiques de crapaud. On peut, à partir de ces œufs arrêtés naturellement en phase M, récupérer un extrait cytoplasmique « mitotique », riche en protéines. Cet « extrait mitotique » se comporte de manière semblable au cytoplasme des œufs. En particulier, il peut être fertilisé artificiellement par l'ajout de spermés débarrassés de membranes (purifiés à partir des testicules du crapaud mâle) et entraîner l'assemblage de fuseaux tout comme le cytoplasme des œufs mais en dehors du contexte cellulaire [1].

Des études utilisant ce système ont révélé un rôle essentiel dans l'assemblage du fuseau d'une protéine jusqu'ici sans rapport avec ce processus. La protéine, nommée Ran (GTPase nucléaire de la famille de Ras), est une petite protéine se liant au GTP, qui est impliquée dans le transport de molécules de part et d'autre de la membrane nucléaire. Les petites GTPases sont des enzymes qui existent dans un état lié au GTP

ou dans un état lié au GDP. Elles ont une faible capacité intrinsèque d'hydrolyse du GTP et n'atteignent leurs niveaux physiologiques d'hydrolyse qu'en interagissant avec des protéines activant leur activité GTPasique (abréviation GAP en anglais). Après hydrolyse, le GDP produit est libéré et elles s'associent de nouveau au GTP en interagissant avec des facteurs d'échange des guanosines (abréviation GEF en anglais). Les localisations spatiales des cofacteurs de Ran, la GAP (la protéine RanGAP chez l'homme, qui agit en conjonction avec des protéines de la famille de RanBP1) et le GEF (RCC1 chez l'homme) à l'intérieur de la cellule sont très différentes [2, 3]: RanGAP est principalement cytoplasmique tandis que RanGEF est une protéine nucléaire et associée à la chromatine en mitose. Dans la cellule en interphase, la distribution asymétrique des activités RanGAP et RanGEF détermine à leur tour une localisation asymétrique des différentes formes de Ran: dans le noyau, Ran-GTP est la forme majoritaire alors que Ran-GDP est la forme prédominante dans le cytoplasme. Les localisations distinctes de Ran-GTP et Ran-GDP sont ainsi essentielles pour imposer asymétrie et direction dans le transport nucléocytoplasmique.

Le premier indice d'un rôle de Ran dans l'assemblage du fuseau a été fourni par une observation tout à fait

impressionnante: Ran-GTP, contrairement à Ran-GDP, promeut l'assemblage de fuseaux dans des extraits arrêtés en phase M en l'absence de centrosomes, de kinétochores... et de chromatine ! [4-8].

Molécule plurivalente, Ran-GTP est capable d'induire non seulement la polymérisation de microtubules mais aussi leur organisation en structures fusiformes (*figure 1C*). Ce phénomène rappelle l'auto-organisation d'un fuseau bipolaire autour de la chromatine en l'absence de centrosomes observée dans les cellules végétales, dans certaines cellules animales en méiose et même dans les extraits d'œufs [9]. Cette ressemblance n'est pas due à une pure coïncidence. Il a été démontré que la capacité de la chromatine à induire l'assemblage de microtubules et la formation d'un fuseau dans les extraits d'œufs dépend de la capacité de RCC1 (très concentré au niveau de la chromatine) d'engendrer exclusivement autour des chromosomes la forme Ran-GTP, et d'enclencher ainsi l'assemblage de microtubules en contrecarrant l'activité GAP dominante de l'environnement. Ran étant lui-même libre de diffuser, la chromatine pourrait en principe créer autour d'elle-même une région de la forme « active » de Ran (*figure 2*).

Ainsi, la chromatine pourrait envoyer un signal indiquant sa position et changer l'état de son environnement

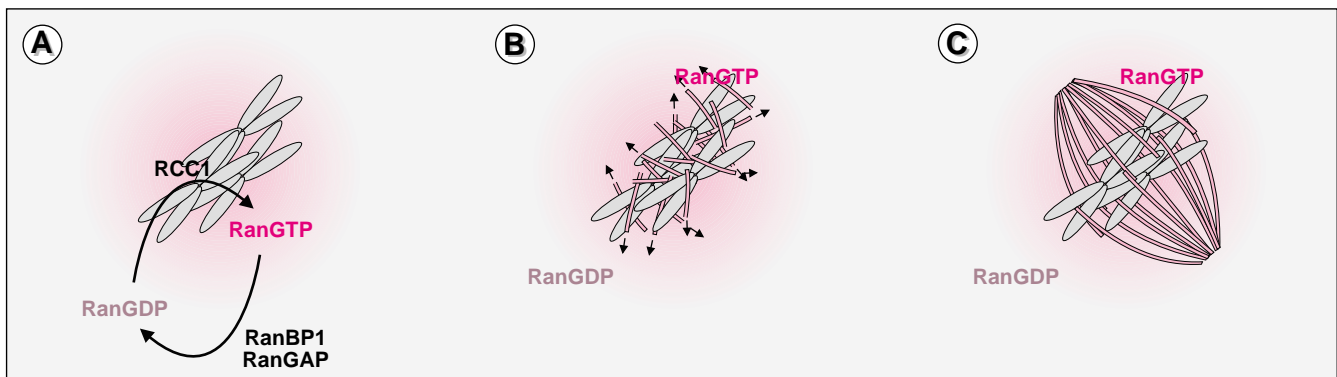


Figure 2. Le cycle GTPasique de Ran et son rôle lors de l'assemblage du fuseau méiotique. **A.** L'activité GAP (RanBP1/RanGAP) est cytoplasmique tandis que l'activité d'échange GEF (RCC1) est associée aux chromosomes. **B.** La haute concentration en RCC1 des chromosomes permet d'engendrer la forme Ran-GTP (rouge) en concentration suffisante pour contrecarrer l'activité prédominante GAP cytoplasmique et induire l'assemblage (flèches) de microtubules dans le voisinage des chromosomes. **C.** Les microtubules engendrés autour de la chromatine s'auto-organisent, par la suite, en un réseau bipolaire (fuseau) grâce à des protéines organisatrices présentes dans le cytoplasme. Le halo rose délimite le noyau.

cytoplasmique afin de faciliter l'assemblage de microtubules ! C'est comme si la chromatine émettait un parfum...

Un rôle dans la mitose ?

L'implication de Ran-GTP dans l'assemblage de microtubules pourrait donc expliquer le mécanisme par lequel la chromatine dirige la production de microtubules pendant la formation du fuseau dans des cellules sans centrosomes, comme les cellules des plantes ou certaines cellules méiotiques chez les animaux. Un tel mécanisme, néanmoins, pourrait ne pas exister ou n'avoir aucune importance physiologique pendant la division cellulaire de la plupart des cellules animales, lors de laquelle les centrosomes sont les principales sources de microtubules durant l'assemblage du fuseau. De nouvelles études suggèrent toutefois le contraire. En effet, il a été démontré récem-

ment que Ran a un effet sur l'assemblage des microtubules des centrosomes. Il semble que Ran-GTP provoque la stabilisation des microtubules venant des centrosomes [10, 11] et une augmentation du nombre de microtubules nucléés par les centrosomes. Ceci suggère que, durant l'assemblage du fuseau mitotique, la chromatine pourrait induire localement une plus forte production et une élévation accrue des microtubules centrosomiques, en induisant la production de la forme Ran-GTP (figures 3A à 3C). Par ailleurs, l'inhibition de la production de Ran-GTP dans les extraits d'œufs perturbe sévèrement l'assemblage de fuseaux même en présence de centrosomes. Ceci veut dire que la seule présence de centrosomes qui nucléent quelques microtubules ne suffit pas pour permettre au fuseau de s'assembler [10] : une augmentation générale de la masse de microtubules (centrosomiques et non-centro-

somiques), dépendante de la production de Ran-GTP, est nécessaire pour maintenir centrosomes et chromosomes attachés et pour donner lieu à un fuseau normal avec une haute densité de microtubules (figure 3D). Ces études, de même que d'autres suggérant un rôle de Ran dans l'organisation des microtubules du fuseau [11], indiquent que Ran pourrait être un interrupteur général qui signalerait où, quand et comment faire des microtubules en mitose.

Un mécanisme conservé

Le mode d'action de Ran n'est pas direct : il semble nécessiter, pour ses différentes fonctions, des effecteurs en aval qui sont présents dans les extraits. Quels sont ces effecteurs et comment agit donc Ran en mitose ? Des études récentes démontrent que, loin d'avoir inventé de nouveaux mécanismes mitotiques, Ran semble reproduire en mitose son mode

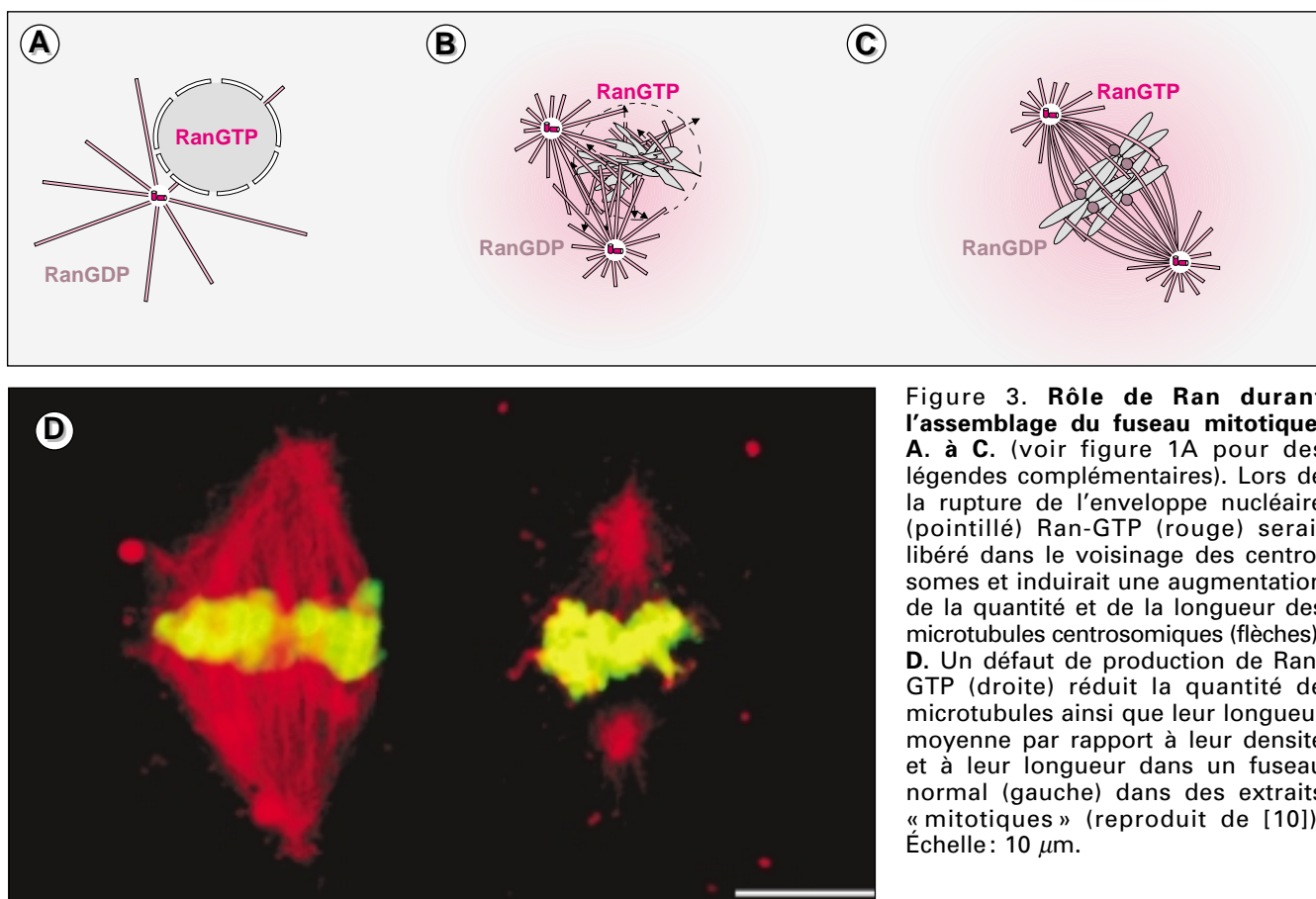


Figure 3. Rôle de Ran durant l'assemblage du fuseau mitotique. A. à C. (voir figure 1A pour des légendes complémentaires). Lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire (pointillé) Ran-GTP (rouge) serait libéré dans le voisinage des centrosomes et induirait une augmentation de la quantité et de la longueur des microtubules centrosomiques (flèches). D. Un défaut de production de Ran-GTP (droite) réduit la quantité de microtubules ainsi que leur longueur moyenne par rapport à leur densité et à leur longueur dans un fuseau normal (gauche) dans des extraits « mitotiques » (reproduit de [10]). Échelle: 10 µm.

d'action dans le transport nucléocytoplasmique.

Un des rôles de Ran-GTP dans les cellules en interphase est de provoquer la libération de protéines lorsqu'elles se trouvent à l'intérieur du noyau, en les dissociant de « complexes d'import » [2, 3] (figure 4, gauche). C'est cette fonction même que Ran semble mettre en œuvre aussi dans un environnement mitotique [12-14]. En effet, deux protéines nucléaires (TPX2 [15] et NuMA [16]) ont été identifiées comme effecteurs en aval de Ran dans l'assemblage de microtubules et du fuseau dans les extraits d'œufs de crapaud. Ces protéines, nucléaires en interphase, sont aussi présentes dans les extraits mitotiques dans des complexes d'import et sont rendues inactives par ces complexes. Néanmoins, lorsqu'elles sont ajoutées en très grand excès aux extraits mitotiques, ces protéines induisent l'assemblage de microtubules, ce qui indique qu'elles sont actives quand elles sont libres. Puisque Ran-GTP provoque la dissociation des complexes d'import, elle induit la libération des effecteurs qui, par conséquent, déclenchent l'assemblage de polymères de tubuline (figure 4, droite). Étant donné que

RCC1 est fortement concentré au niveau de la chromatine, Ran mettrait en œuvre localement autour de la chromatine cette « dissociation de complexes d'import nucléaire » dans le cytoplasme mitotique, suivant la rupture de l'enveloppe nucléaire (figure 4, droite). Le fait que cette petite GTPase reproduise si élégamment son *modus operandi* au cours du cycle cellulaire est un résultat surprenant.

Bien que le rôle mitotique de Ran ne soit démontré clairement que dans les extraits d'œufs, la haute conservation de Ran et d'une grande partie de ses co-facteurs au cours de l'évolution suggère que ce type de mécanisme pourrait exister dans bien d'autres espèces. En effet, des résultats récents confirment un rôle physiologique potentiel pour Ran dans l'assemblage du fuseau et des microtubules, dans des cellules de mammifères et chez la levure [17, 18].

Le fuseau *self made*

La découverte de l'influence potentielle de la chromatine dans le déclenchement de l'assemblage de microtubules et de l'implication de Ran dans cet « effet chromatine mito-

tique » indique de nouveaux principes de contrôle spatio-temporel de la division cellulaire. Ainsi, ces dernières avancées dans la compréhension de l'assemblage du fuseau nous font réaliser que la machinerie de la division cellulaire n'est pas construite par un simple réarrangement de ce qui était avant la mitose et par un simple positionnement des chromosomes sur un échafaudage. Au contraire, dans la perspective actuelle, les chromosomes dirigent la construction du fuseau, une machine qui se crée elle-même sans arrêt...

Enfin, ce nouveau protagoniste de la division cellulaire pourrait non seulement fournir des informations plus précises sur la façon dont les cellules établissent leur machinerie de division mais elle pourrait aussi permettre une meilleure compréhension de la cause de plusieurs maladies: Ran, par exemple, a été associé à d'innombrables défauts de la division cellulaire et de la progression du cycle cellulaire [19, 20] et TPX2 est un marqueur de cellules qui prolifèrent de façon hypo-active [21]. Ainsi, ce nouveau domaine de recherche pourrait aussi ouvrir la voie à d'importantes applications médicales ■

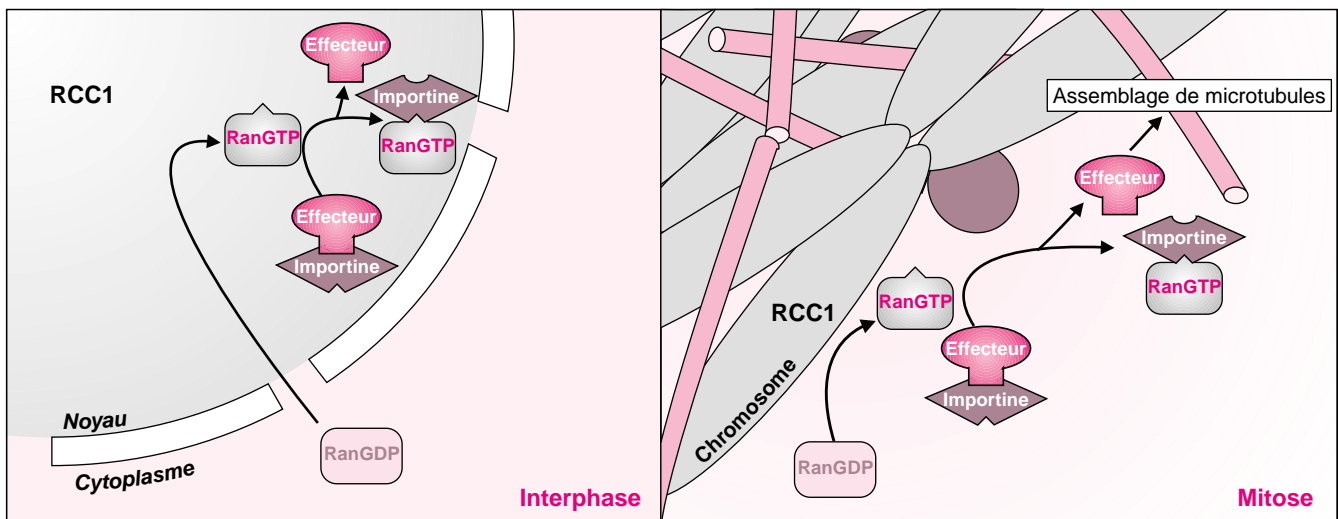


Figure 4. Le mécanisme d'action de Ran est conservé au cours du cycle. Gauche : dans le noyau d'une cellule en interphase, Ran-GTP induit la dissociation de « complexes d'import nucléaire » (représentés par « effecteur et importine ») et libère des protéines dans le noyau, y compris les effecteurs responsables de l'activation de la nucléation de microtubules. Droite : après la rupture de l'enveloppe nucléaire, Ran-GTP libère les effecteurs de la nucléation des microtubules dans le voisinage des chromosomes.

Remerciements

Je remercie Eugenia Piddini, Oliver J. Gruss, Stéphane Brunet, Virginie Hachet et Eric Karsenti pour leur relecture de ce manuscrit.

RÉFÉRENCES

- Desai A, Murray A, Mitchison TJ, Walczak CE. The use of *Xenopus* egg extracts to study mitotic spindle assembly and function *in vitro*. *Meth Cell Biol* 1999; 61: 385-412.
- Mattaj IW, Englmeier L. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 265-306.
- Gorlich D, Kutay U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 607-60.
- Kalab P, Pu RT, Dasso M. The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Curr Biol* 1999; 9: 481-4.
- Wilde A, Zheng Y. Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science* 1999; 284: 1359-62.
- Ohba T, Nakamura M, Nishitani H, Nishimoto T. Self-organization of microtubule asters induced in *Xenopus* egg extracts by GTP-bound Ran. *Science* 1999; 284: 1356-8.
- Carazo-Salas RE, Guarguaglini G, Gruss OJ, *et al*. Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature* 1999; 400: 178-81.
- Zhang C, Hughes M, Clarke PR. Ran-GTP stabilises microtubule asters and inhibits nuclear assembly in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci* 1999; 112: 2453-61.
- Heald R, Tournebize R, Blank T, Sandatzopoulos R, Becker P, Hyman A, Karsenti E. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* 1996; 382: 420-5.
- Carazo-Salas RE, Gruss OJ, Mattaj IW, Karsenti E. Ran-GTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 228-34.
- Wilde A, Lizarraga SB, Zhang L, *et al*. Ran stimulates spindle assembly by altering microtubule dynamics and the balance of motor activities. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 221-7.
- Gruss OJ, Carazo-Salas RE, Schatz CA, *et al*. Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell* 2001; 104: 83-93.
- Nachury MV, Maresca TJ, Salmon WC, Waterman-Storer CM, Heald R, Weis K. Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell* 2001; 104: 95-106.
- Wiese C, Wilde A, Moore MS, Adam SA, Merdes A, Zheng Y. Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science* 2001; 291: 653-6.
- Wittmann T, Wilm M, Karsenti E, Vernos I. TPX2, A novel *Xenopus* MAP involved in spindle pole organization. *J Cell Biol* 2000; 149: 1405-18.
- Merdes A, Ramyar K, Vechio JD, Cleveland DW. A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell* 1996; 87: 447-58.
- Guarguaglini G, Renzi L, D'Ottavio F, *et al*. Regulated Ran-binding protein 1 activity is required for organization and function of the mitotic spindle in mammalian cells *in vivo*. *Cell Growth Differ* 2000; 11: 455-65.
- Fleig U, Salus SS, Karig I, Sazer S. The fission yeast ran GTPase is required for microtubule integrity. *J Cell Biol* 2000; 151: 1101-12.
- Dasso M. The role of the Ran GTPase pathway in cell cycle control and interphase nuclear functions. *Prog Cell Cycle Res* 1995; 1: 163-72.
- Sazer S, Dasso M. The ran decathlon: multiple roles of Ran. *J Cell Sci* 2000; 113: 1111-8.
- Heidebrecht HJ, Buck F, Steinmann J, Sprenger R, Wacker HH, Parwaresch R. p100: a novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G₂, and M. *Blood* 1997; 90: 226-33.

Rafael Carazo-Salas

EMBL, Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg, Allemagne.

TIRÉS À PART

R. Carazo-Salas.