

## **Les canaux ioniques de l'enveloppe nucléaire sont-ils impliqués dans le fonctionnement des noyaux cellulaires ?**

**Gilles Guihard**  
**Éric Rousseau**

Le noyau cellulaire est délimité par une enveloppe formée de deux membranes séparées par l'espace périnucléaire. Les échanges entre noyau et cytoplasme s'effectuent par des canaux appelés pores nucléaires. Des mesures électrophysiologiques effectuées par la technique de *patch-clamp in situ* ou sur des noyaux isolés et sur des vésicules membranaires incorporées dans des bicouches lipidiques planes, ont montré l'existence de canaux ioniques sélectifs au  $\text{Cl}^-$ , au  $\text{K}^+$  et au  $\text{Ca}^{2+}$ . La répartition de ces canaux entre l'une et l'autre des membranes de l'enveloppe nucléaire suggère l'existence d'une polarité fonctionnelle au niveau de cette interface entre le cytoplasme et le nucléoplasme. Il est probable que ces canaux ioniques contribuent à la régulation des propriétés physiologiques des noyaux en contrôlant les concentrations ioniques dans l'espace périnucléaire, l'activité des ions dans le nucléoplasme et donc le potentiel électrique des deux membranes nucléaires.

### ADRESSES

G. Guihard : *stagiaire post-doctoral*. Institut de recherche en biotechnologie, 6100, rue Royalmount, H4P 2R2, Montréal, Québec, Canada. E. Rousseau : *professeur agrégé à la faculté de médecine de l'université de Sherbrooke, chercheur boursier senior du fonds de recherche en santé du Québec*. Le Bilarium, Département de physiologie et biophysique, Faculté de médecine de l'université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada.  
e-mail : e.rousseau@courrier.usherb.ca

**L**e noyau des cellules eucaryotes est délimité par une enveloppe nucléaire constituée de deux membranes concentriques séparées par un espace périnucléaire [1]. La membrane externe est structurellement et fonctionnellement reliée à la membrane du réticulum endoplasmique par la présence d'une  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  ATPase, de cytochromes b5 et P450, et de sites de fixation des ribo-

somes. La membrane interne est caractérisée par son association avec le réseau nucléo-squelettique composé par les lamines A, B et C. L'enveloppe nucléaire est ponctuée par des pores nucléaires, édifices supramoléculaires impliqués dans le transport nucléo-cytoplasmique des acides nucléiques et des protéines. Des études ultrastructurales [2] indiquent que les protéines composant le pore nucléaire s'organisent en un

octo-trimère ménageant un domaine central hydrophile (environ 10 nm de diamètre) responsable du passage de macromolécules à travers l'enveloppe nucléaire et entouré par huit infundibulums périphériques dont la fonction n'est pas encore caractérisée [3].

La présence de l'ADN génomique confère au noyau un rôle central dans la biologie cellulaire. Les fonctions de réplication, de réparation et de dégradation de l'ADN se produisent exclusivement à l'intérieur du noyau. Il en est de même pour les activités liées à l'expression génique (transcription des gènes et modifications post-transcriptionnelles des ARN) ou à la division cellulaire. Cette dynamique moléculaire est rendue possible grâce aux échanges incessants de solutés et de macromolécules entre le nucléoplasme et le cytoplasme. Du fait de son implication dans le transport de macromolécules, l'enveloppe nucléaire exerce un contrôle sur l'ensemble de ces processus (figure 1). Les données de la littérature suggèrent que certaines fonctions du noyau pourraient être modulées par des variations de composition ionique du nucléoplasme et de l'espace périnucléaire (figure 1). Cette hypothèse est appuyée par la découverte récente de canaux ioniques nucléaires [4]. Les objectifs de cet article sont de présenter les caractéristiques de ces canaux ioniques et de proposer certaines hypothèses concernant leur implication dans la régulation de la physiologie des noyaux cellulaires.

### Le pore nucléaire est-il un canal ou un transporteur de macromolécules ?

Chaque macromolécule néosynthétisée est acheminée vers des régions spécialisées de la cellule. Dans le cas des ARN, des protéines membranaires et des protéines des compartiments intracellulaires, ce ciblage implique le franchissement d'au moins une membrane. Il a été suggéré que ce franchissement puisse être facilité par des structures membranaires spécialisées de type canal dont l'ouverture s'accompagnerait de mouvements ioniques [5]. De très nombreux travaux ont établi que le

transport des protéines vers l'intérieur du noyau s'effectue en plusieurs étapes [6]. La protéine nucléophile néosynthétisée est reconnue par un hétérodimère cytosolique (Importine  $\alpha$  et  $\beta$ ). Le complexe s'associe au pore nucléaire puis est transféré vers le nucléoplasme. L'ensemble de ce processus fait intervenir l'hydrolyse du GTP par l'intermédiaire d'une protéine de la famille Ran (Ran/TC4) mais aussi l'hydrolyse de l'ATP. Par analogie avec les ATPases impliquées dans le transport des ions à travers la membrane plasmique ou les membranes intracellulaires, il a été proposé que le pore nucléaire couple l'hydrolyse de l'ATP au transport de macromolécules. Toutefois, l'hydrolyse de l'ATP pourrait aussi être impliquée dans le renouvellement du GTP intracellulaire, ou dans le maintien des protéines nucléophiles dans un état

conformationnel compatible avec leur transport. Dans un second modèle, principalement fondé sur des données structurales [2], il a été proposé que les pores nucléaires auraient une structure de type « canal », avec un domaine central permettant la diffusion de macromolécules à travers l'enveloppe nucléaire. Selon ce modèle, les pores nucléaires n'offriraient peu ou pas de résistance à la diffusion des ions. Toutefois, cette perméabilité ionique pourrait être réduite lors du passage des ARN ou des protéines nucléophiles à travers les pores nucléaires. Des mouvements ioniques de grande amplitude ont été transitoirement observés par la technique de *patch-clamp* appliquée à des noyaux isolés d'érythrocytes aviaires [10] ou de noix de coco [8] (voir Tableau 1). En combinant la technique de *patch-clamp* et l'observation par microscopie

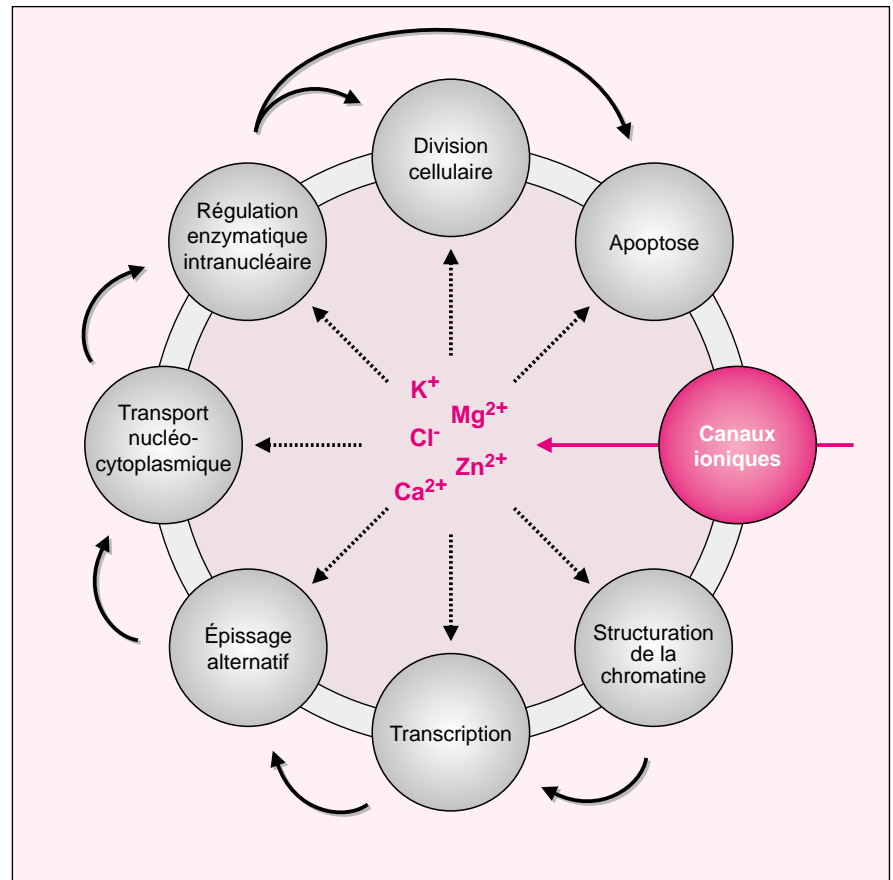


Figure 1. **Fonctions physiologiques du noyau.** Les perméabilités ioniques des membranes externe et interne de l'enveloppe nucléaire (cercle rouge) influencent plusieurs fonctions physiologiques du noyau (cercles gris) en modulant les flux et les activités ioniques.

| Tableau I  |                       |                                   |  |             |
|--|-----------------------|-----------------------------------|--|-------------|
| CLASSIFICATION DES PRINCIPAUX CANAUX IONIQUES NUCLÉAIRES |                       |                                   |  |             |
| Sélectivité ionique                                      | $\gamma$ (pS)         | Origine cellulaire                | Régulateurs  | Références  |
| K <sup>+</sup>   | 180-200 (BLP) et (PC) | pronucléus, cœur                  | ND   | [4, 11, 35] |
|  | 200 (PC)              | pancréas                          | Ca <sup>2+</sup> (+)<br>Vm (+)                           |             |
|  | ND (PC)               | cœur                              | Zn <sup>2+</sup> (-), GTP $\gamma$ -S (-)<br>dNTP (-)    | [3]         |
| Ca <sup>2+</sup>   | 113-244 (a) PC        | ovocyte ( <i>Xenopus laevis</i> ) | InsP <sub>3</sub> (+)<br>héparine (-)                    | [22, 23]    |
| Cl <sup>-</sup>  | 150-180 (PC) et (BLP) | cœur et foie                      | DIDS (-)<br>acide niflumique (-)<br>acide rétinoïque (+) | [12, 42]    |
|  | 30-58 (PC) et (BLP)   | cœur et foie                      | ATP (-), DIDS (-)<br>acide niflumique (-)                | [12, 42]    |
| Cationique   | 532 (PC)              | cœur                              | Vm (+), PKA (+)  | [37]        |
|  | 800 (PC)              | érythrocyte                       | ND   | [7]         |
|  | 1000 (PC)             | noix de coco                      | ND   | [8]         |
|  | 75 (BLP)              | cœur                              | ND   | [12]        |
| ND   | 421 (PC)              | cœur                              | protéines à localisation nucléaire                       | [9]         |
|  | 440 (PC)              | blastocyste                       | ND   | [41]        |

pS: pico-siemens; BLP: bicouche lipidique plane; PC: patch clamp; Vm: voltage transmembranaire; DIDS: 4,4' diisothiocyanate stilben-2,2' disulfonique acide; ND: non déterminé; dNTP: désoxynucléotides triphosphates; PKA: protéine kinase A.

pie à force atomique [9], Bustamante *et al.* ont montré que la diffusion de facteurs de transcription vers l'intérieur du noyau s'accompagne d'un encombrement du domaine central du pore nucléaire et, parallèlement, d'une diminution significative des flux ioniques à travers l'enveloppe nucléaire. Selon leur modèle, l'encombrement stérique provoqué par le passage de protéines nucléophiles diminuerait la conduction des ions à travers le pore nucléaire. Ce modèle confirmerait donc que le

pore nucléaire se comporte comme une structure de type « canal » en présence de protéines nucléophiles. On ignore actuellement si les ions diffusent par le domaine central ou par les infundibulums périphériques.

### **Les membranes externe et interne de l'enveloppe nucléaire possèdent des canaux ioniques sélectifs**

Les premières mesures électrophysiologiques ont été effectuées à partir

de 1963 par le groupe de Loewenstein [10]. A l'aide de deux micro-électrodes de verre, ces auteurs ont noté l'existence d'une différence de potentiel électrique entre l'intérieur du noyau et le cytosol de cellules de glandes salivaires de la larve de *Chironomus thummi*. Ce potentiel électrique ne provient pas d'un équilibre de Donnan qui, par définition, est dû à une répartition asymétrique des charges électriques portées par des macromolécules non diffusibles. Sans préciser l'origine de ce potentiel électrique, ces auteurs ont proposé que la perméabilité ionique de l'enveloppe nucléaire ne serait pas aussi grande qu'on ne le prévoirait en présence de pores nucléaires béants. L'enregistrement de courants ioniques de l'enveloppe nucléaire a confirmé cette hypothèse.

Deux techniques électrophysiologiques ont concouru à la caractérisation de ces canaux au niveau moléculaire: la technique du *patch-clamp* et l'incorporation de vésicules dérivées des membranes nucléaires dans des bicouches lipidiques planes (*figure 2*). Les résultats obtenus à l'aide de ces deux stratégies expérimentales s'inscrivent dans un contexte biophysique. La mise en œuvre de ces deux techniques implique l'extraction des noyaux, la préparation des enveloppes et des membranes nucléaires. La caractérisation des canaux ioniques nucléaires observés dans ces conditions peut être partielle en raison de la disparition ou de la dégradation de protéines ou de co-facteurs au cours du processus de purification. D'autres approches, reposant sur l'utilisation de sondes fluorescentes, ont été développées afin d'étudier les flux ioniques (principalement les flux de Ca<sup>2+</sup>) à travers l'enveloppe nucléaire [3, 11]. Ces investigations sont moins invasives que les techniques électrophysiologiques mais elles ne permettent pas de résoudre quantitativement et temporellement l'activité des canaux ioniques à l'échelle moléculaire.

La stratégie utilisée dans la technique du *patch-clamp* consiste à créer un contact étroit entre une micropipette de verre reliée à un dispositif de contrôle du potentiel et d'enregistrement du courant électrique et la surface des noyaux isolés ou *in situ*. Ce contact, de très forte résistance

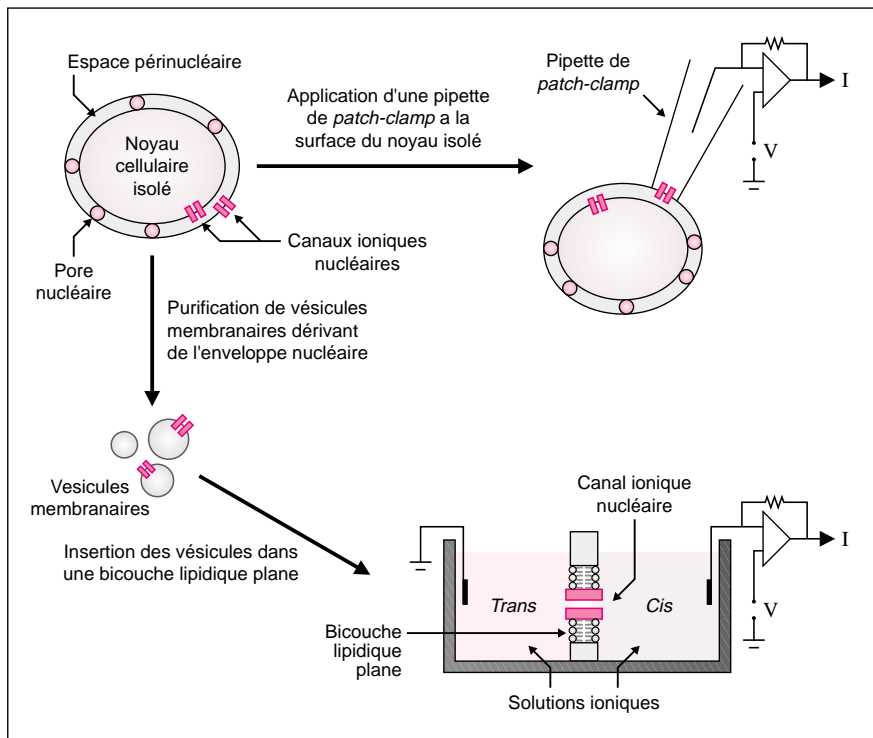


Figure 2. **Mise en évidence des canaux ioniques nucléaires par la technique de patch-clamp et l'utilisation de bicouches lipidiques planes.** A. La technique de patch-clamp permet d'étudier exclusivement les canaux ioniques présents dans la membrane externe des noyaux purifiés. Une micropipette de verre est remplie d'une solution de composition ionique connue. Elle est reliée à un dispositif qui impose un potentiel ( $V$ ) et enregistre les courants ioniques ( $I$ ). La pointe de la micropipette, qui mesure environ  $1\mu\text{m}$  de diamètre, est appliquée à la surface des noyaux. Le contact créé entre la membrane et le verre est hautement résistif, soit plusieurs giga-ohms ( $10^9\Omega$ ) ce qui permet d'enregistrer des courants ioniques mesurant quelques pA ( $10^{-12}\text{A}$ ) à travers le fragment de membrane nucléaire ainsi isolé. B. Pour la technique des bicouches lipidiques planes, des vésicules membranaires de l'enveloppe nucléaire sont purifiées puis incorporées dans une bicouche lipidique séparant électriquement deux compartiments (cis et trans) de composition ionique déterminée. Chaque compartiment est relié par une électrode de basse résistance à un dispositif d'imposition du potentiel ( $V$ ) et d'enregistrement du courant ( $I$ ) similaire à celui décrit en A. Ces deux méthodes permettent de mesurer l'amplitude du courant et le temps pendant lequel le canal est dans un état ouvert à chaque potentiel imposé. La représentation  $I$  en fonction de  $V$  permet, selon la loi d'Ohm, de déterminer la conductance unitaire ( $\gamma = I/V$ ) du canal étudié à partir du rapport entre le temps passé à l'état ouvert et le temps total d'observation. La probabilité d'ouverture ( $P_o$ ) du canal est déterminée pour une condition expérimentale donnée.

électrique (plusieurs giga ohms), permet d'enregistrer l'activité des canaux ioniques localisés exclusivement dans la membrane externe (figure 2). Ces canaux ont été observés dans des noyaux de plusieurs types cellulaires (Tableau I) et il est possible qu'ils soient présents dans la membrane externe de tous les noyaux cellulaires. Des canaux nucléaires perméables au  $\text{K}^+$ , au  $\text{Ca}^{2+}$

ou au  $\text{Cl}^-$  ont été décrits (Tableau I). Un canal perméable au  $\text{K}^+$  ayant une conductance de 200 pico-siemens (pS) a été observé à plusieurs reprises (Tableau I). Par ailleurs, les activités de deux canaux perméables au  $\text{Cl}^-$  de 150 et 58 pS ont été enregistrées. Un canal cationique activé par l'inositol 1,4,5 tris-phosphate ( $\text{InsP}_3$ ) est présent dans la membrane externe nucléaire de l'ovocyte

de xénope. On a également décrit des canaux cationiques non sélectifs possédant des conductances différentes, mais leurs propriétés biophysiques restent encore largement méconnues. Enfin, certains travaux ont permis d'enregistrer des canaux de grandes conductances (440 et 421 pS) mais les conditions expérimentales ne permettaient malheureusement pas de déterminer leur sélectivité ionique. Ces canaux pourraient correspondre à des structures associées au pore nucléaire car leur conductance est fortement réduite en présence de protéines nucléophiles. La méthode de patch-clamp a aussi permis d'enregistrer les changements d'activité de plusieurs canaux nucléaires en réponse à des variations de potentiel électrique ou en présence d'effecteurs, inclus initialement dans la pipette ou perfusés en cours d'expérience par l'intérieur de la pipette. Comme le montre le Tableau I, le potentiel électrique, le  $\text{Ca}^{2+}$  l'ATP, la sous unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique et l' $\text{InsP}_3$  affectent le fonctionnement de plusieurs canaux de la membrane externe. Toutefois, la recherche des facteurs modulant le fonctionnement de ces canaux en est encore à un stade préliminaire. Les micropipettes se sont avérées particulièrement utiles pour l'étude des canaux ioniques présents à la surface des noyaux, mais elles sont relativement inadéquates pour étudier la membrane interne. Pour contourner cette difficulté, notre équipe a mis au point une stratégie de séparation des membranes externe et interne [12]. Après avoir extrait l'enveloppe nucléaire de cellules ventriculaires cardiaques, on a pu obtenir des populations membranaires enrichies en vésicules dérivées, soit de la membrane externe, soit de la membrane interne [12]. En utilisant la technique d'incorporation de vésicules membranaires dans des bicouches lipidiques planes (figure 2), on peut enregistrer l'activité de canaux ioniques présents dans chacune des populations membranaires (figure 3A et Tableau I). Cette approche a permis de confirmer l'existence du canal perméable au  $\text{K}^+$  de grande conductance (180 à 200 pS) et de décrire une activation du canal perméable au  $\text{Cl}^-$  de 180 pS par l'acide rétinolique

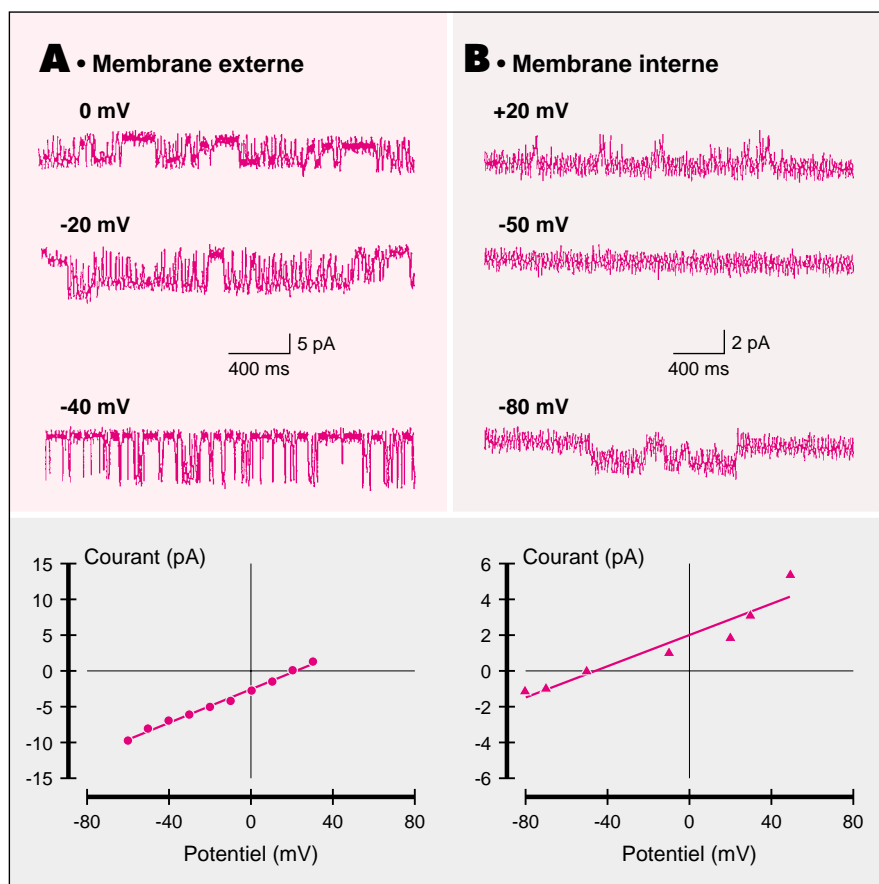


Figure 3. **Enregistrement de l'activité des canaux ioniques des membranes externe et interne de l'enveloppe nucléaire de cellules cardiaques.** Les traces représentent les variations de courant ionique enregistrées à différents potentiels après incorporation dans des bicouches lipidiques planes de vésicules dérivées de la membrane externe (A) ou de la membrane interne (B), en conditions asymétriques (A: 50 mM trans/450 mM cis de CsCl, B: 50 mM trans/450 mM cis de KCl). Les courbes courant/potentiel permettent de calculer les conductances unitaires ( $\gamma$ ) et de déduire la sélectivité ionique (en fonction du potentiel à zéro courant) pour ces canaux, dans les conditions expérimentales définies plus haut (A correspond à un canal sélectif au  $\text{Cl}^-$  de  $\gamma = 120 \text{ pS}$  et B correspond à un canal sélectif au  $\text{K}^+$  de  $\gamma = 42 \text{ pS}$ ).

qui est un modulateur important de l'activité transcriptionnelle. Cette approche nous a aussi permis d'observer pour la première fois, des canaux cationiques de petite conductance présents dans la membrane interne de l'enveloppe nucléaire (figure 3B).

### L'enveloppe nucléaire constitue un réservoir de calcium intracellulaire

La modification de la concentration en calcium ionisé du cytosol  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  représente l'un des signaux intracellulaires survenant dans des cellules stimulées par des hormones ou des

neurotransmetteurs [16]. Dans de nombreuses cellules, ce signal est lié à la production d'InsP<sub>3</sub> à partir du phosphatidyl-inositol 4,5 bisphosphate (PtdInsP<sub>2</sub>) présent dans le feuillet interne de la membrane plasmique. L'InsP<sub>3</sub> diffuse dans le cytosol jusqu'à un récepteur-canal (R-InsP<sub>3</sub>) situé dans la membrane du réticulum endoplasmique. L'activation du récepteur R-InsP<sub>3</sub> provoque un flux sortant de  $\text{Ca}^{2+}$  accumulé dans ce compartiment, induisant des variations spatiales et temporelles du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique. La stimulation des cellules provoque aussi des variations de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur des noyaux [17, 18], et on a suggéré que ces der-

nières seraient le simple résultat de la diffusion du  $\text{Ca}^{2+}$  à travers les pores nucléaires après l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. Cette conception a été remise en question, du fait que des noyaux isolés peuvent entretenir un gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  nucléo-cytoplasmique [14, 15] et que le pore nucléaire peut s'opposer à de grandes variations de concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  en provenance du cytosol [16]. Les propriétés des membranes nucléaires confèrent à l'espace périnucléaire des caractéristiques analogues à celles d'un compartiment calcique intracellulaire (figure 4). Des noyaux isolés peuvent accumuler le  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'espace périnucléaire [17, 18] grâce à une  $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$  localisée dans la membrane externe [19]. Jusqu'à présent, aucun système de transport actif de  $\text{Ca}^{2+}$  n'a été mis en évidence dans la membrane interne, le  $\text{Ca}^{2+}$  accumulé pourrait être tamponné par une ou plusieurs protéines affines localisées dans l'espace périnucléaire [20]. Le PtdInsP<sub>2</sub> et les enzymes impliquées dans sa biosynthèse sont présents dans l'enveloppe nucléaire [21]. Des canaux ioniques pouvant être activés par l'InsP<sub>3</sub> ont été caractérisés dans la membrane externe [22, 23], mais des sites de liaison de l'insP<sub>3</sub> ont aussi été décrits dans la membrane interne [24] et pourraient être responsables des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  vers le nucléoplasme [18, 25]. Toutefois, il n'est pas établi que ces sites de liaison de la membrane interne correspondent effectivement à des canaux ioniques pouvant être activés par l'InsP<sub>3</sub>.

### Les canaux de l'enveloppe nucléaire ont-ils un rôle physiologique ?

L'hypothèse d'une modulation des concentrations ioniques intranucléaires par des canaux situés dans l'enveloppe des noyaux est difficile à concilier avec la présence de pores nucléaires dont les caractéristiques structurales militent en faveur d'une égalisation rapide des concentrations ioniques entre le cytoplasme et le nucléoplasme. Toutefois, les approches utilisant les techniques de micro-électrodes intracellulaires, de patch-clamp et de fluorescence suggèrent fortement une restriction de la

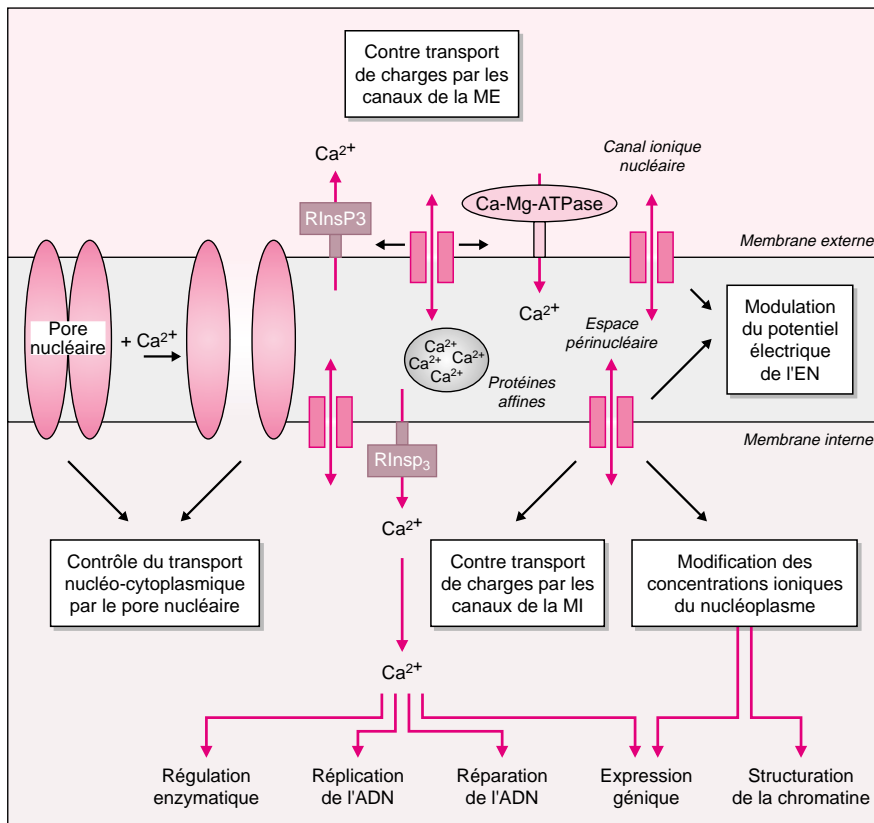


Figure 4. **Rôle des perméabilités ioniques de l'enveloppe nucléaire.** L'espace périnucléaire peut être considéré comme un réservoir de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Le transport actif du  $\text{Ca}^{2+}$  depuis le cytoplasme est assuré par une  $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$  située dans la membrane externe (ME). Le  $\text{Ca}^{2+}$  serait séquestré dans l'espace périnucléaire par des protéines affines et pourrait diffuser vers le cytoplasme ou le nucléoplasme lors de l'activation des récepteurs de l'inositol 1,4,5 trisphosphate (RInSP<sub>3</sub>) situés dans la membrane externe [30, 31] et/ou interne (MI) [32, 33]. Les canaux ioniques sélectifs aux cations ou aux anions monovalents serviraient au contre-transport de charges lors des mouvements de  $\text{Ca}^{2+}$ , et permettraient ainsi de maintenir le potentiel électrique des membranes éloigné du potentiel d'équilibre du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ce mécanisme faciliterait la régulation des flux calciques mais aussi le transport nucléo-cytoplasmique à travers le pore nucléaire. Ces flux ioniques pourraient modifier l'activité ionique nucléoplasmique et moduler ainsi de nombreux processus biochimiques. EN: enveloppe nucléaire.

perméabilité ionique globale de l'enveloppe nucléaire. On peut donc concevoir que l'importance du flux des macromolécules à travers l'enveloppe nucléaire *in vivo* entraîne un encombrement du domaine central, de la majorité voire de la totalité, des pores nucléaires. Dans ces conditions, les flux ioniques entre le cytosol et le nucléoplasme seraient limités et il devient envisageable que les canaux ioniques de l'enveloppe nucléaire modulent les concentrations ioniques de l'espace périnucléaire et les activités ioniques du

nucléoplasme (figure 4). La technique d'analyse par dispersion d'énergie de rayons X a permis d'observer des gradients nucléo-cytoplasmiques de  $\text{K}^+$  et de  $\text{Cl}^-$  dans des ovocytes de xénope dont la valeur est modifiée en présence de progestérone [26]. Des sites de fixation de stéroïdes ont été décrits dans l'enveloppe nucléaire [27] et il est donc possible que ces sites correspondent à des canaux nucléaires ou à des éléments régulateurs de ces canaux. En outre, il faut noter que l'acide rétinolique, le  $\text{Ca}^{2+}$  et la protéine kinase dépendante de

l'AMPc sont connus pour régler différents mécanismes nucléaires. Il apparaît donc plausible que certaines fonctions nucléaires dont les transports à travers la membrane nucléaire soient sensibles à des effecteurs intracellulaires communs. Dans ces conditions, on peut s'interroger sur les conséquences de l'ouverture ou de la fermeture des canaux sur les fonctions nucléaires.

## Structure de la chromatine et maturation des ARN

L'état structural de l'ADN *in vitro* est fortement influencé par la composition ionique du milieu [28, 29]. Dans des cellules intactes ou des noyaux isolés, les caractéristiques structurales de la chromatine sont influencées par les cations monovalents :  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  [30] pour lesquels un rôle de contre-ions associés aux charges négatives de l'ADN a été proposé [31]. L'ouverture – ou la fermeture – de canaux perméables aux cations dans la membrane interne pourrait induire des modifications très locales des concentrations cationiques, susceptibles de modifier la structure de la chromatine et donc son accessibilité pour des protéines se liant à l'ADN (figure 4). La transcription des gènes est suivie par des étapes de maturation des ARN messagers (modification des extrémités 3' et 5', épissage de la molécule). La présence de cations divalents, et plus spécialement de  $\text{Mg}^{2+}$ , est requise pour stabiliser les complexes ribo-nucléoprotéiques impliqués dans les réactions d'épissage. En revanche, le rôle du  $\text{Ca}^{2+}$  et des cations monovalents dans la maturation post-transcriptionnelle des ARN n'a pas été étudié en détail. Des variations locales de concentrations ioniques dans le nucléoplasme pourraient, toutefois, moduler les interactions protéine/protéine ou protéine/acide nucléique et donc affecter la maturation de l'ARN (figure 4).

## Facilitation de l'accumulation et de la libération de $\text{Ca}^{2+}$ par les noyaux

Il est reconnu que des variations de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  nucléaire

interviennent dans la régulation de l'expression génique, la réplication de l'ADN lors de la division cellulaire et sa dégradation lors de l'apoptose [32, 33]. Le  $\text{Ca}^{2+}$  intervient aussi dans la formation de la nouvelle enveloppe nucléaire lors de la mitose [34]. Les canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  présents dans l'enveloppe nucléaire constituent de bons candidats pour moduler le  $\text{Ca}^{2+}$  nucléaire et donc pour régler certaines fonctions du noyau [33]. Toutefois, la diffusion facilitée de  $\text{Ca}^{2+}$  via des canaux ou son transport actif catalysé par une  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase à travers l'une ou l'autre des deux membranes de l'enveloppe nucléaire correspond au déplacement vectoriel d'une charge électrique qui tend à établir une différence de potentiel électrique aux bornes de cette membrane. Cette différence de potentiel évolue vers une valeur (potentiel d'équilibre du  $\text{Ca}^{2+}$ ) et s'oppose à la diffusion ou au transport actif de nouveaux ions. Il est donc probable qu'un ou plusieurs systèmes de contre-transport de charges soient nécessaires afin de maintenir le potentiel électrique de la membrane éloigné du potentiel d'équilibre du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ce modèle a été envisagé dans le cas des compartiments calciques intracellulaires et il est conforté par l'existence de canaux  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  dans les membranes de ces compartiments [35, 36]. Bien qu'il ne s'agisse pour l'instant que d'une hypothèse de travail, nous envisageons que les canaux nucléaires sensibles au potentiel [12, 37] ou les canaux  $\text{K}^+$  nucléaires sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  [37] contribuent à régler les flux de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers l'enveloppe des noyaux et donc à régler les fonctions nucléaires dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  (figure 4). Très récemment, des sites de liaison d'inositol 1,3,4,5 tétrakisphosphate ( $\text{InsP}_4$ ) ont été décrits dans la membrane externe de noyaux de foie de rat et semblent correspondre à une protéine de 74 kDa [24]. Parallèlement, l' $\text{InsP}_4$  stimule une accumulation de  $^{45}\text{Ca}$  par des noyaux isolés [32], mais le mécanisme de cette accumulation induite par l' $\text{InsP}_4$  est inconnu. Toutefois, l' $\text{InsP}_4$  pourrait activer directement des canaux calciques de la membrane externe ou bien stimuler d'autres canaux ioniques nucléaires dont l'ouverture fournirait un

contre-transport de charge facilitant les mouvements de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la membrane externe.

### Translocation de macromolécules à travers l'enveloppe nucléaire

Des résultats récents montrent que la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  accumulé dans l'espace périnucléaire contrôle le transport nucléo-cytoplasmique de macromolécules. La diminution de la concentration calcique périnucléaire provoque un blocage du transport nucléo-cytoplasmique et une fermeture du pore nucléaire [38-40], ce qui suggère qu'au moins une des protéines du pore nucléaire serait directement (ou indirectement) sensible au  $\text{Ca}^{2+}$ . L'énergie nécessaire à l'accumulation du  $\text{Ca}^{2+}$  par l'espace périnucléaire provient de l'hydrolyse de l'ATP par la  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase de la membrane externe. En établissant des systèmes de contre-transport de charges, les canaux ioniques nucléaires peuvent intervenir dans le contrôle du pore et de la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  accumulé dans l'espace périnucléaire. L'activation ou l'inhibition sélective de ces canaux ioniques pourrait induire ou bloquer un contre-transport, qui en retour modulerait l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'espace périnucléaire et donc influencerait le transport nucléo-cytoplasmique de macromolécules (figure 4).

### Conclusion

L'électrophysiologie des membranes de l'enveloppe nucléaire a récemment fait des progrès significatifs grâce à l'utilisation de méthodes extrêmement résolutes. Les mesures électriques réalisées au niveau des canaux ioniques unitaires ont permis de caractériser et de quantifier les flux ioniques à travers l'enveloppe nucléaire. Il est maintenant clair que l'enveloppe nucléaire constitue un compartiment intracellulaire actif du point de vue électrique et biochimique. Jusqu'à ce jour, aucune physiopathologie n'a pu être mise en relation avec un dysfonctionnement des canaux ioniques nucléaires. Il est possible qu'un tel dysfonctionnement du noyau soit

incompatible avec la vie de la cellule. Notre connaissance des canaux ioniques nucléaires n'a réellement progressé que depuis le début de la dernière décennie. Toutefois, les caractéristiques biochimiques et génétiques de ces canaux restent à établir et leur pharmacologie, comme leurs modes de régulation respectifs, doivent être approfondis. De même, il existe très peu d'informations concernant les transports ioniques (ATPases et co-transporteurs) nucléaires. Les hypothèses que nous avons avancées quant aux rôles des flux ioniques à travers l'enveloppe nucléaire ne forment pas une liste exhaustive et doivent être validées expérimentalement. Des approches combinant différentes méthodologies devraient permettre de résoudre cette problématique ■

#### Remerciements

Nous sommes très reconnaissants aux Drs N. Gallo-Payet et J. Bérard pour leur lecture critique et constructive de ce manuscrit. Les travaux réalisés au Bilarium sont financés par le Conseil de Recherches Médicales du Canada (CRM), la Fondation des Maladies du Cœur et le Fond de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

#### Note ajoutée aux épreuves

Le clonage et l'expression du canal chlorure nucléaire de petite conductance ont récemment été rapportés par Valenzuela *et al.* dans *J Biol Chem* 1997; 272: 12575-82.

#### TIRÉS À PART

E. Rousseau.

#### RÉFÉRENCES

1. Goldberg MW, Allen TD. Structural and functional organization of the nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 301-9.
2. Hinshaw JE. Architecture of the nuclear pore complex and its involvement in nucleocytoplasmic transport. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 15-20.
3. Bustamante JO. Topical review: nuclear electrophysiology. *J Membr Biol* 1994; 138: 105-12.
4. Mazzanti M, De Felice LJ, Cohen J, Malter H. Ion channels in the nuclear envelope. *Nature* 1990; 343: 764-7.
5. Simon S, Blobel G. A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* 1991; 65: 371-80.

## RÉFÉRENCES

6. Görlich D, Mattaj IW. Nucleo-cytoplasmic transport. *Science* 1996; 271: 1513-8.
7. Matzke AJM, Weiger T, Matzke MA. Detection of a large cation-sensitive channel in nuclear envelopes of avian erythrocytes. *FEBS Lett* 1990; 271: 161-4.
8. Matzke AJM, Behensky C, Weiger T, Matzke MA. A large conductance ion channel in the nuclear envelope of a higher plant cell. *FEBS Lett* 1992; 302: 81-5.
9. Bustamante JO, Oberleithner H, Hanover JA, Liepins A. Patch clamp detection of transcription factor translocation along the nuclear pore complex channel. *J Memb Biol* 1995; 146: 253-61.
10. Loewenstein WR, Kano Y. Some electrical properties of a nuclear membrane examined with a microelectrode. *J Gen Physiol* 1963; 46: 1123-40.
11. Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH. Calcium transport pathways in the nucleus. *Pflugers Archiv* 1996; 432: 1-6.
12. Rousseau E, Michaud C, Lefebvre D, Proteau S, Decrouy A. Reconstitution of ionic channels from inner and outer membranes of mammalian cardiac nuclei. *Biophys J* 1996; 70: 703-14.
13. Claret M, Mauger JP. Hormones, oscillations et vagues calciques. *Med Sci* 1994; 10: 393-5.
14. Waybill MM, Yelamarty RV, Zhang Y, Scaduto Jr RC, Lanoue KF, Hsu CJ, Smith BC, Tillotson DL, Yu FTS, Cheung JY. Nuclear calcium gradients in cultured rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1991; 261: E49-57.
15. Himpens B, De Smedt H, Bollen M. Modulation of nucleocytosolic  $Ca^{2+}$  gradient in smooth muscle by protein phosphorylation. *FASEB J* 1994; 8: 879-83.
16. Al-Mohanna FA, Caddy KW, Bolsover SR. The nucleus is insulated from large cytosolic calcium ion changes. *Nature* 1994; 367: 745-50.
17. Nicotera PL, Orrenius S, Nilsson T, Bergren PO. An inositol 1,4,5 trisphosphate-sensitive  $Ca^{2+}$  pool in liver nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6858-62.
18. Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP ribose-mediated release of  $Ca^{2+}$  from the nuclear envelope. *Cell* 1995; 80: 439-44.
19. Lanini L, Bachs O, Carafoli E. The calcium pump of the liver nuclear membrane is identical to that of endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1992; 267: 11548-52.
20. Gilchrist JSC, Pierce GN. Identification and purification of a calcium-binding protein in hepatic nuclear membranes. *J Biol Chem* 1993; 268: 4291-9.
21. Divecha N, Banfic H, Irvine RF. Inositides and the nucleus and inositides in the nucleus. *Cell* 1991; 74: 405-7.
22. Mak DOD, Foskett JK. Single-channel inositol 1,4,5 trisphosphate receptor currents revealed by patch-clamp of isolated *Xenopus* oocyte nuclei. *J Biol Chem* 1994; 269: 29375-8.
23. Stehno-Bittel L, Luckhoff A, Clapham DE. Calcium release from the nucleus by  $InsP_3$  receptor channels. *Neuron* 1995; 14: 163-7.
24. Humbert JP, Matter N, Artault JC, Köppler P, Malviya AN. Inositol 1,4,5 trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of the nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5 trisphosphate. *J Biol Chem* 1996; 271: 478-85.
25. Hennager DJ, Welsh MJ, DeLisle S. Changes in either cytosolic or nucleoplasmic inositol 1,4,5 trisphosphate levels can control nuclear  $Ca^{2+}$  concentration. *J Biol Chem* 1994; 270: 4959-62.
26. Cameron IL, LaBadie DR, Hunter KE, Hazlewood CF. Changes in water proton relaxation and in nuclear to cytoplasmic element gradients during meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *J Cell Physiol* 1983; 116: 87-92.
27. Howell GM, Lefebvre YA. Characterisation of high affinity and low affinity dexamethasone binding sites on male rat liver nuclear envelope. *J Steroid Biochem* 1989; 33: 977-86.
28. Pohl FM, Jovin TM. Salt-induced co-operative conformational change of a synthetic DNA: equilibrium and kinetic studies with poly (dG-dC). *J Mol Biol* 1972; 67: 375-96.
29. Robert-Nicoud M, Arndt-Jovin DJ, Zarlring DA, Jovin TM. Immunological detection of left-handed Z DNA in isolated polytene chromosome: effect of ionic strength, pH, temperature and topological stress. *EMBO J* 1984; 3: 721-31.
30. Leake RE, Trench ME, Barry JM. Effect of cations on the condensation of hen erythrocyte nuclei and its relation to gene activation. *Exp Cell Res* 1972; 71: 17-26.
31. Cameron IL. Electron probe X ray microanalysis studies on the ionic environment of nuclei and the maintenance of chromatin structure. *Progress Clin Biol Res* 1985; 196: 223-39.
32. Bachs O, Agell N, Carafoli E. Calcium and calmodulin function in the cell nucleus. *Biochem Biophys Acta* 1992; 1113: 259-70.
33. Nicotera P, Zhivotovsky B, Orrenius S. Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 1994; 16: 279-88.
34. Sullivan KMC, Busa WB, Wilson KL. Calcium mobilization is required for nuclear vesicle fusion *in vitro*: implications for membrane traffic and  $IP_3$  receptor function. *Cell* 1993; 73: 1411-22.
35. Picher M, Decrouy A, Rousseau E. Conducting and voltage-dependent behaviors of potassium ion channels reconstituted from diaphragm sarcoplasmic reticulum: comparison with the cardiac isoform. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1279: 93-103.
36. Decrouy A, Rousseau E. Examination of the role of phosphorylation and phospholamban in the regulation of the cardiac sarcoplasmic reticulum Cl<sup>-</sup> channel. *J Memb Biol* 1995; 146: 315-26.
37. Bustamante JO. Nuclear ion channels in cardiac myocytes. *Pflugers Arch* 1992; 421: 473-85.
38. Greber UF, Gerace L. Depletion of calcium from the lumen of endoplasmic reticulum reversibly inhibits passive diffusion and signal mediated transport into the nucleus. *J Cell Biol* 1995; 128: 5-14.
39. Stehno-Bittel L, Perez-Terzic C, Clapham DE. Diffusion across the nuclear envelope inhibited by depletion of the nuclear  $Ca^{2+}$  store. *Science* 1995; 270: 1835-8.
40. Perez-Terzic C, Pyle J, Jaconi M, Stehno-Bittel L, Clapham DE. Conformational states of the nuclear pore complex induced by depletion of nuclear  $Ca^{2+}$  stores. *Science* 1996; 273: 1875-7.
41. Mazzanti M, De Felice LJ, Smith EF. Ion channels in murine nuclei during early development and in fully differentiated adults cells. *J Memb Biol* 1991; 121: 189-98.
42. Tabares L, Mazzanti M, Clapham DE. Chloride channels in the nuclear membrane. *J Memb Biol* 1991; 123: 49-54.

## Summary

### Are ion channels of the nuclear envelope involved in nuclear function?

The nucleus which contains the genome of eukaryotic cells, is delimited by an envelope that is composed of two membranes. The basic electrical properties of the nuclear envelope were initially investigated thirty years ago. However, the existence of nuclear ionic channels in the nuclear membranes was only discovered in the early 1990's. Electrophysiological experiments, performed *in situ* or on isolated nuclei using the patch-clamp technique, and membrane reconstitution into planar lipid bilayer, have revealed the existence of Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> selective ionic channels. These channels are regulated by several physical and biochemical factors. Experimental evidences indicate that the different nuclear ionic channels are unevenly distributed between the inner and the outer nuclear membrane, suggesting that the nuclear envelope is functionally polarized. It is likely that the nuclear ionic channels are also involved in the regulation of the nucleus physiology by controlling the ionic concentrations in the perinuclear space as well as the ionic activities in the nucleoplasm, thus the electrical membrane potential of the nuclear envelope.