Le cycle cellulaire: Introduction

Dr Gerardo Ferbeyre Département de biochimie, E515 g.ferbeyre@umontreal.ca



A étudier pour l'examen

• L'étude du cycle cellulaire est fascinante:

Permet la compréhension du développement;

Le mode de propagation de la matière vivante;

La compréhension des maladies causées par une division cellulaire incontrôlée comme le cancer ou les maladies où la prolifération est défectueuse comme le vieillissement.

• Interrompre pendant le cours:

Ça anime la classe;

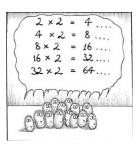
Votre doute pourrait être le doute de quelqu'un d'autre.

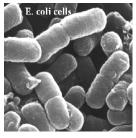
• Le course est basé sur les chapitres 17, 18 et 23 du : Molecular Biology of the Cell par Alberts et al. 4iéme édition et par

A Long Twentieth Century of the Cell Cycle and Beyond By Paul Nurse In Cell, Vol 100, 71-78, 7 January 2000

Le concept du cycle cellulaire

- Mécanisme de reproduction cellulaire
- La cellule duplique son contenu et se divise en deux







Division binaire

Bourgeonnement

Le rêve de toute cellule: devenir deux cellules François Jacob

Le mot cycle nous vient du grec« kyklos » qui signifie circule. Un cycle c'est un événement qui se répète. Alors les cellules vivantes se dupliquent elles mêmes après un cycle cellulaire. Mais le cycle cellulaire n'est pas une répétition simple parce qu'il implique une duplication de la cellule et de son contenu suivi d'une division cellulaire. On trouve des division binaires dans la plupart des cellules mais aussi des divisions par bourgeonnement dans quelques levures.

Les caractéristiques universelles du cycle cellulaire

- L'information génétique doit être répliquée (Réplication de l'ADN)
- Les originaux et les copies doivent être séparés (Ségrégation des chromosomes)
- Une cellule est divisée en deux cellules filles (Cytokinesis)

La réplication exacte du matériel génétique a été expliquée par Watson et Crick avec leur modèle de la double hélice en 1953 et démontré par Meselson et Stahl en 1958.

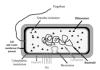
La ségrégation des chromosomes dupliqués aux deux cellules filles a été proposée originalement dans la théorie chromosomique de l'inhérence en 1902 par Walter Sutton et Théodore Boveri.

http://www.nature.com/celldivision/milestones/full/milestone01.html

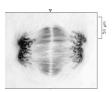
La cytokinèse est facilement observable au microscope même si l'on ne connaît pas encore très bien les détails.

Procaryotes vs Eucaryotes

- Un origine de réplication
- Chaque copie de l'ADN s'attache à la membrane et se sépare graduellement à mesure que la cellule se divise
- Pas de condensation visible de l'ADN
- Absence de structures spécialisées pour la ségrégation des chromosomes
- La fission cellulaire se passe entre les sites de liaison de l'ADN à la membrane (FtsZ)



- Plusieurs origines de réplication
- Le génome est beaucoup plus grand, il y a le besoin d'un système pour répartir l'information génétique entre les deux cellules filles.
- Condensation et décondensation de l'ADN
- Structures spécialisées pour la ségrégation chromosomique (fuseau mitotique)
- La fission cellulaire est perpendiculaire au fuseau mitotique

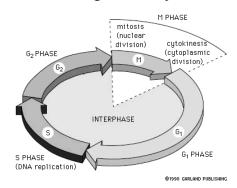


Même si le cycle cellulaire décrit le mécanisme universel de duplication cellulaire, on peut constater d'importantes différences entre les organismes procaryotes et eucaryotes. Ces différences sont bien sûr dues aux niveaux différents d'organisation et à la complexité cellulaire entre les eucaryotes et les procaryotes. Pour les eucaryotes, le cycle cellulaire doit assurer la duplication et la répartition aux cellules filles de l'ADN présent en plus grande quantité et organisé dans des chromosomes qui peuvent atteindre plusieurs mètres de longueur.

Chez les bactéries, les chloroplastes et quelques mitochondries, la division cellulaire est contrôlée par un analogue de la tubuline connu comme FtsZ. La protéine FtsZ est essentielle pour la division cellulaire d'eubactéries et archabactéries. En réponse à un signal encore inconnu, FtsZ polymérise pour former un anneau qui définit et contrôle le site de division cellulaire (J Bacteriol 2003 May;185(9):2826-34).



Étapes du cycle cellulaire eucaryote



G1 et G2

- Croissance cellulaire,
- Temps variable
- La cellule doit s'assurer que toutes les conditions internes et externes sont adéquates pour la synthèse de l'ADN et la mitose

M

• Ségrégation des chromosomes et division cellulaire, prend environ 1 heure

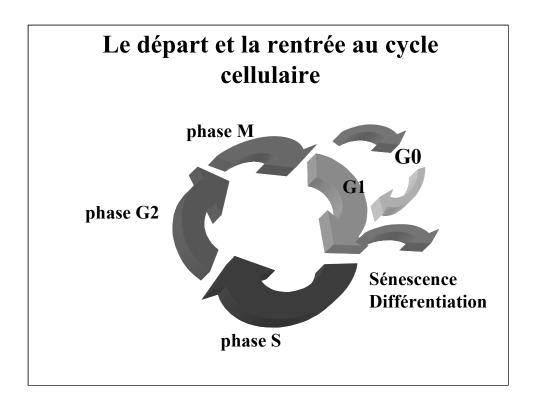
S

- Duplication de l'ADN, prend environ 8 heures
- G1, S et G2 ensemble sont aussi nommées interphase (23 à 24 heures)

Les étapes du cycle cellulaire ont été définies par rapport aux événements majeurs de la vie de la cellule : la synthèse de l'ADN et la division cellulaire. Les microscopistes ont fait la première séparation du cycle en deux phases : interphase et division parce qu'on peut facilement distinguer les cellules en division des cellules qui ne le sont pas. Quand les connaissances et les techniques de la génétique et la BM se sont développées, les chercheurs ont défini la phase S (la partie de l'interphase ou la cellule synthétise l'ADN). Entre la division ou mitose et la phase S on peut alors placer deux nouvelles phases ou Gaps (G1: entre M et S) et G2 entre S et M.

Pendant les phases G1 et G2, les cellules se préparent pour la phase S et la mitose respectivement. Cette préparation implique la duplication du contenu cellulaire et la communication avec l'environnement. Bien sûr la cellule n'entrera pas en phase S afin de dupliquer son ADN si elle est en danger des faire des erreurs. La synthèse des protéines spécifiques à chaque cellule se passe plutôt pendant la phase G1. C'est l'état où la plupart de la régulation transcriptionelle aura lieu. C'est l'état que les cellules préfèrent pour communiquer entre elles et exécuter leurs fonctions.

Par contre les étapes S et M sont dédiées a assurer la transmission de l'information génétique. Elles impliquent le déroulement des processus automatiques de réplication et mitose qui ont une durée fixe.



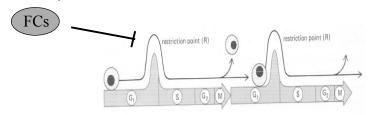
La plupart des cellules dans un organisme adulte n'est cyclent pas. Ça veut dire qu'elles sont dans un état ou il n'y a pas de progrès de G1 vers S. On dit qui elles sont en quiescence ou G0. Ces cellules en G0 peuvent, par contre, retourner au cycle cellulaire et ré-initier la progression G1-S et la prolifération cellulaire.

Il y a aussi des cellules qui sont sorties du cycle et qui ne peuvent pas retourner parce qu'elles ont subi beaucoup de changements biochimiques : c'est le cas des cellules en différentiation terminale et des cellules sénescentes. Ces derniers représentent un programme d'arrêt permanent de la prolifération que nous verrons en détails plus tard.



Le point de restriction

- Si l'on arrête la croissance des cellules par différentes méthodes puis on rétablit les conditions de croissance, les cellules quiescentes (G0) prennent toujours le même temps pour commencer la phase S.
- Pardee proposa que cette expérience indique l'existence d'un point de contrôle que les cellules doivent traverser avant d'entrer en phase S. Une fois ce point traversé, les cellules procèdent vers les phases S-G2-M.
- Avant PR les cellules ont besoin des facteurs de croissance, après PR ils n'ont plus besoin de facteurs de croissance.



Les facteurs de croissance inactivent PR

Pardee, A. B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **71**, 1286-1290 (1974)

L'idée de PR a stimulé la recherche sur le mécanisme d'action des facteurs de croissance. Le PR est le réflexe cinétique de l'action des facteurs de croissance sur le mécanisme qui contrôle le cycle cellulaire. Ce mécanisme est demeuré quand même un mystère pendant plusieurs années.



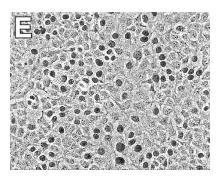
Méthodes pour étudier le cycle cellulaire

- Observation directe: cellules en phase M
- Incorporation de thymidine marquée au ³H
- Incorporation de BrdU
- PCNA
- Cytométrie de flux

Les méthodes les plus utilisées pour étudier le cycle cellulaire basent leur résultats dans la possibilité d'identifier les événements majeurs du cycle soit la phase S et la phase M. Cependant il n'y a pas des méthodes directes pour établir si les cellules en G1 ou G2 sont à l'intérieur ou hors du cycle cellulaire.



Observation de cellules en phase S

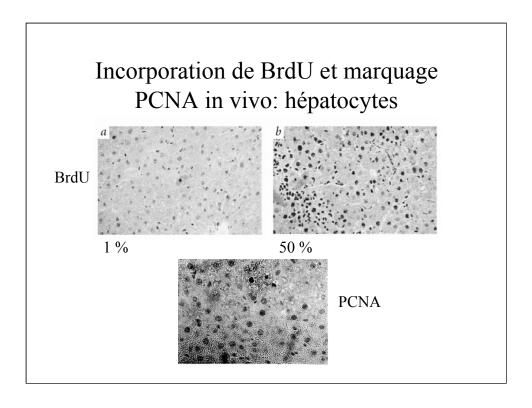


- Incorporation de BrdU: un analogue de la thymidine
- Anticorps anti-BrdU couplé à la péroxydase
- Prolifération cellulaire est non synchronisée
- 30-50 % sont en phase S

Pour observer les cellules en phase S ont peut utiliser :

Des analogues radioactifs ou fluorescents des nucléotides Le BrdU

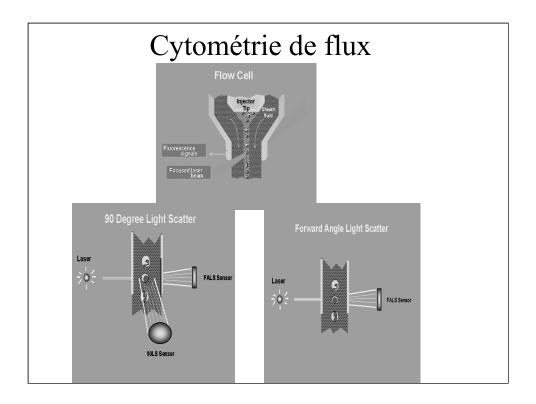
La plus part des cellules en culture prolifèrent relativement vite. L'incubation avec BrdU par exemple arrive à marquer entre 30 et 50 % des cellules.



In vivo dans l'organisme adulte, la croissance cellulaire est très limitée. Seulement un petit % des cellules prolifèrent. Par contre, les cellules en G0 peuvent rentrer dans le cycle cellulaire en réponse à différents stimuli. Dans l'exemple, les hépatocytes normalement quiescents rentrent dans le cycle cellulaire après l'hépatectomie.

Malgré ces conditions il faut incuber le BrdU pendant des temps relativement longs (incubation pendant une semaine) pour oberver la fraction des cellules qui prolifèrent.

L'utilisation des anticorps contre PCNA a l'avantage d'étudier un marqueur endogène de prolifération parce que PCNA augment en G2/M et diminue en G0.

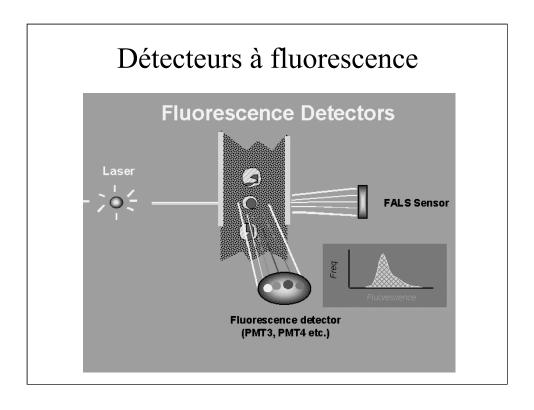


La cytométrie de flux est une méthode optique pour quantifier des cellules et mesurer leurs composantes.

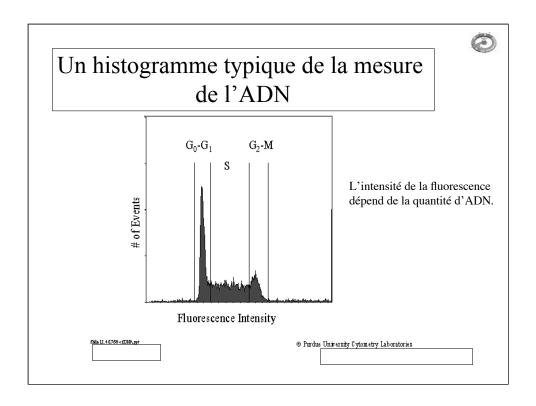
A l'intérieur du cytomètre une suspension de cellules est forcée à passer une à une dans un tuyau très fin. Chaque cellule reçoit un rayon laser. Le cytomètre mesure la lumière dispersée par chaque cellule ainsi que la fluorescence émise en réponse au rayon laser.

La dispersion directe de la lumière sert à compter le nombre de cellules qui passent devant le détecteur ainsi que leur taille.

La dispersion angulaire de la lumière reflète les propriétés de la surface des cellules (granulation et irrégularités).



Les détecteurs de fluorescence permettent d'étudier n'importe quelle composante de la cellule que l'on peut marquer avec une sonde fluorescente. L'iodure de propidium par exemple marque l'ADN.

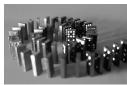


Voici un résultat typique de FACS pour étudier le cycle cellulaire avec l'iodure de propidium qui marque l'ADN. La plupart des cellules se trouvent en G1 parce que c'est l'étape la plus longue. En G1 les cellules sont diploïdes. En phase S, l'ADN commence à se dupliquer alors l'intensité de la fluorescence augmente puis atteindra le double de la valeur de G1 dans les cellules en G2 et M qui ont complètement dupliquée leur ADN (cellules tétraploïdes).



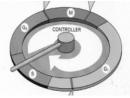
La laveuse et le cycle cellulaire

- Événements du cycle contrôlés par un mécanisme indépendant (contrôleur)
- · Pas de dominos



- C'est le contrôleur qui décide la succession des étapes
- C'est le contrôleur qui décide qu'un événement se passe une seule fois
- Contrôle on-off pour chaque étape

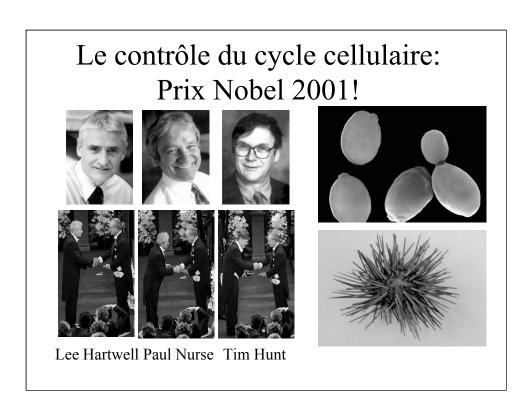




= points des verifications

Comment comprendre la succession ordonnée des différentes étapes et différents événements qui arrivent dans chaque phase du cycle cellulaire? Avant de rentrer dans les détails nous pouvons utiliser une laveuse comme exemple.

Comme la cellule, la laveuse fonctionne selon un cycle composé de différentes étapes. La laveuse est contrôlée par un contrôleur qui régule et active les différents événements du cycle de lavage. Par analogie l'on peut penser qu'il y a un contrôleur moléculaire à l'intérieur de la cellule qui contrôle le passage d'une étape à l'autre du cycle cellulaire. La minuterie détermine dans la laveuse la durée et l'ordre des étapes. Dans la cellule notre minuterie moléculaire ferait la même chose. Chaque événement, dans la laveuse où dans la cellule, se passe un après l'autre. La laveuse ne commence pas a rincer avant d'avoir terminé le lavage. La cellule ne commence pas la mitose avant d'avoir fini la phase S. Dans un cycle, chaque événement se passe une seule fois. La laveuse fait une étape de lavage, une étape de rinçage. La cellule fait, par exemple une seule étape de réplication. Une autre similarité intéressante c'est qu'une fois une étape commencée, elle est engagée à finir, ce qui veut dire qu'il y a un contrôle on/off. A la différence des laveuses, le cycle cellulaire est bien régulé. La cellule possède des points spécifiques dans le cycle où le cycle s'arrête si les systèmes de vérification cellulaires détectent des erreurs. C'est comme si une laveuse était capable d'allonger l'étape de lavage parce qu'elle détecte des vêtements sales.



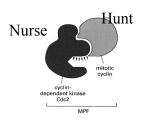
On doit a Tim Hunt et à Paul Nurse l'identification des composantes moléculaires de la minuterie qui contrôlent le CC. On doit à Lee Hartwell le concept et l'identification des systèmes de point de vérifications ou checkpoints.

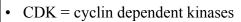
Hartwell est né aux EU. Effectue un stage post-doctoral avec le Prix Nobel Renato Dulbecco. Hartwell a été le premier a utiliser la levure comme modèle génétique pour étudier le cycle cellulaire. Il a identifié les gènes de *checkpoints*: gènes qui arrêtent le cycle cellulaire lorsqu'ils détectent des erreurs dans la cellule. Les *checkpoints* seront étudiés en détail dans notre cours. Hartwell est présentement président et directeur du Fred Hutchinson Cancer Research Center à Seattle

Paul Nurse est né en Angleterre. Il avait décidé d'étudier le cycle cellulaire après avoir lu deux papiers publiés par Lee Hartwell qui avait proposé d'utiliser la levure comme modèle génétique pour identifier les molécules qui contrôlent le cycle cellulaire. Pour éviter la compétition avec son collègue américain, Dr Nurse choisit la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Ses études avec cette levure ont mené à l'identification d'une des composantes essentielles de la machinerie du cycle cellulaire.

Tim Hunt aussi né en Angleterre a découvert l'autre composante essentielle de la machinerie du cycle cellulaire. Pour sa recherche, il a utilisé comme modèle l'oursin.

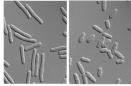
Le cycle cellulaire est contrôlé par une famille de protéines kinases





- MPF = maturation promoting factor
- MPF = CDK + cyclin





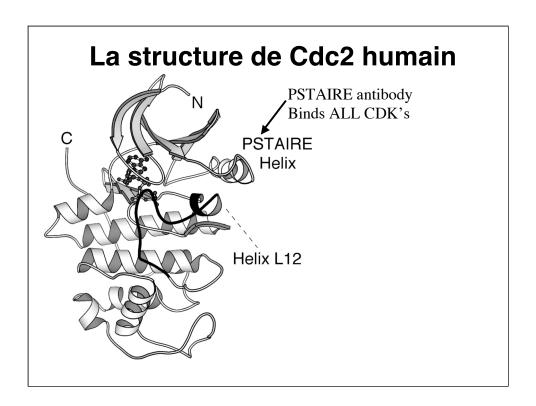
 $cdc2^{ts}$ $cdc2^{ts}$ hCDC2 plasmid

Lee, M. G. & Nurse, P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2. Nature **327**, 31-35 (1987)

Le contrôleur moléculaire qui contrôle le cycle cellulaire a été découvert dans la levure et l'oursin par les groupes de Paul Nurse et Tim Hunt. Le groupe de Paul Nurse a découvert une protéine kinase agissant comme facteur fondamental dans le contrôle du cycle cellulaire eucaryote. Le groupe de Tim Hunt pour sa part, découvre des protéines qui changent leurs niveaux pendant le cycle et agissent comme cofacteurs essentiels de la protéine kinase cdc2. À cause de ces fluctuations, ces dernières protéines sont nommées cyclines.

Suite à la découverte des cyclines, l'élément de contrôle moléculaire du cycle cellulaire a été rebaptisé CDK pour «cyclin dependent kinases». Les complexes CDK-cyclines sont aussi connus comme MPF parce que ils sont capables d'induire la maturation des oocytes de Xenopus. MPF a été découvert en 1971 par Yoshio Masui et Clement Markert et purifié dans le labo de James Mahler en 1988. Par contre, la reconnaissance de l'importance universelle de MPF a du attendre les études de Paul Nurse chez levure.

Cette généralisation simple et jolie va bientôt se compliquer dans notre cours. Pour commencer, il faut noter qu'il y a plus d'une CDK et plus d'une cycline.



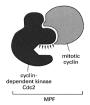
CDK:

- 1. lobe N-terminal: feuille bêta + hélice PSTAIRE,
- 2. lobe C-terminal,
- 3. site actif entre les lobes, notez la molécule d'ATP dans le site actif
- 4. la boucle T de l'hélice L12 inhibe l'enzyme. En fait plusieurs protéines kinases sont inhibées par une boucle similaire à la boucle T qui bloque l'accès au site actif.
- 5. Cette structure est conservée parmi toutes les protéines de la famille CDK chez tous les eucaryotes



Régulation des CDKs

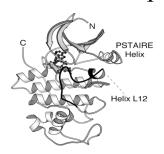
- Association des cyclines
- Phosphorylation
- Déphosphorylation
- Inhibiteurs (CKI)

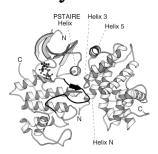


Étant donné que les CDKs déterminent la succession des événements pendant le cycle cellulaire, il est logique de penser que la régulation du cycle cellulaire est, en grande partie, la régulation de l'activité des CDKs. Voici la liste des mécanismes de contrôle des CDKs. Une liste que vous allez voir souvent. Le premier mécanisme est bien sûr l'association des cyclines.

La base structurale de l'activation des CDKs par les cyclines

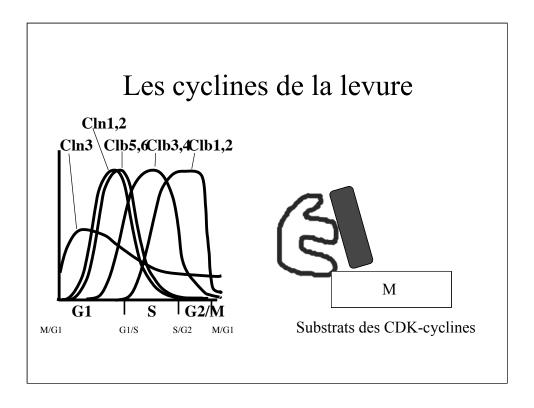






- La boucle T inhibe les CDKs
- La liaison de la cycline induit un changement de conformation de CDK de sorte que la boucle T sort du site actif

Nous connaissons le mécanisme d'activation des CDKs par les cyclines en détail. Des modèles structuraux de cette régulation ont été obtenus après avoir élucidé la structure en trois dimensions des complexes CDK-cycline.

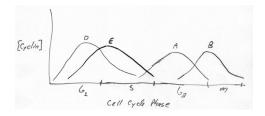


Comment la protéine kinase cdc2 peut-elle réguler les transitions du cycle cellulaire ? Comment la même activité enzymatique peut-elle faire des choses différentes ? La levure est un organisme modèle très utile pour répondre à ces questions. Chez la levure S. cerevisiae, une seule CDK forme des complexes avec différentes cyclines pour réguler le cycle cellulaire. Chez la levure S. pombe le cycle cellulaire se déroule de la même façon. Le principe est très simple : les différentes cyclines s'expriment seulement pendant des étapes spécifiques du cycle cellulaire. Comme les cyclines déterminent les substrats des CDKs, cette kinase se trouve à phosphoryler des substrats différents et pourtant à activer des événements spécifiques lors de chaque étape du cycle cellulaire. En début de G1, les cyclines de G1 permettent à CDK de phosphoryler des substrats qui participent au passage du cycle par G1. À la fin de la phase G1 les différentes cyclines changent la spécificité du CDK pour réguler le passage de G1 en phase S. En phase S, d'autres cyclines régulent la réplication de l'ADN. En phase M, d'autres cyclines régulent certains aspects de la mitose.

Ceci constitue un modèle simplifié. On va voir que la réalité est bien plus complexe. Mais le principe, l'essence ne changera pas malgré que l'on ajoutera d'autres mécanismes de régulation surtout chez les mammifères.



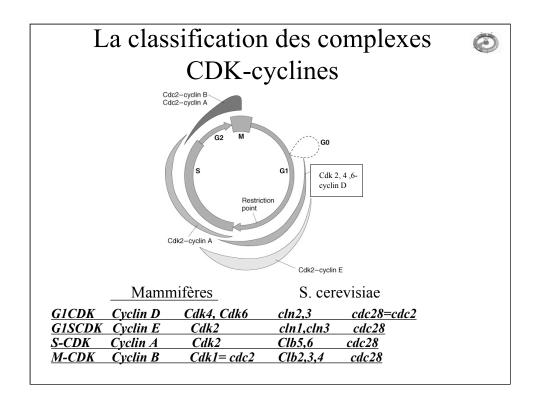
La classification des cyclines chez les mammifères



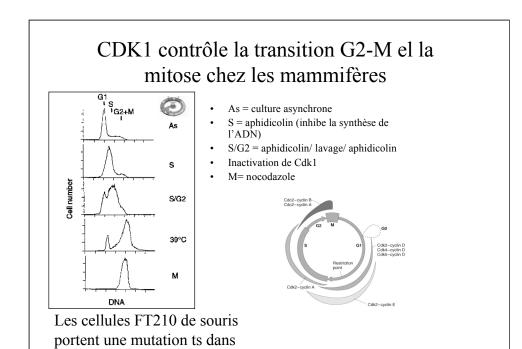
- Cyclines de phase G1: accélèrent le passage pour G1
- Cyclines de phase S: requises pour initier la réplication de l'ADN
- Cyclines de phase M: stimule les événements de la mitose

Avant de compliquer les choses, je vous présente la classification et la nomenclature des cyclines chez les mammifères. Les noms ne sont pas identiques à ceux utilisés chez la levure, mais le principe reste le même. Chaque étape du cycle cellulaire est contrôlée par la présence de cyclines spécifiques.

La cycline D1 a été la première cycline de la phase G1 découverte chez les mammifères et cette découverte fut effectuée simultanément par les laboratoires de Charles Sherr, David Beach et Andrew Arnold.



Bien sûr les mammifères ne se sont pas contentés d'une seule CDK. Cdk4 et 6 contrôlent la phase G1, Cdk2 contrôle la transition G1-S et la phase S. Cdk1 est la kinase qui ressemble le plus à cdc2. Elle contrôle la phase M.



Cdk1

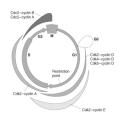
Nous avons vu que la CDK qui ressemble le plus à cdc2 chez les mammifères est CDK1. Cdc2 est essentielle chez la levure et CDK1 est bien sûr essentielle pour les cellules des mammifères. Il est quand même possible d'isoler des mutants ts de Cdk1 comme on l'avait vu chez la levure. Une lignée cellulaire de souris qui porte une mutation ts de CDK1 est très utile pour montrer le rôle de CDK1. L'analyse par FACS de ces cellules dans différentes conditions est un bon exemple d'étude du cycle cellulaire.

Le knockout de cyclin D, Cdk2, Cdk4 et Cdk6: viables!









- Les souris KO de CDK2, CDK4 ou CDK6 sont viables.
- Un examen plus détaillé de souris cdk4-/- indique un retard de croissance, une dysfonction reproductive et une dégénération des îlots pancréatiques.
- Les souris KO de les trois cyclin D arrivent a former la pluspart des organs.
 Besoin des cyclines D ou CDK4/6: cellules souches hématopoietiques, coeur

Conclusion: il y a un role tissue spécifique pour les complexes CDK4/6 Cyclines D.

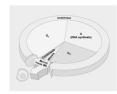
Les souris double mutantes CDK4, CDK6 ne sont pas viables mais la plupart de leur cellules prolifèrent normalement. Elles meurent pendant les dernières étapes du développement du à une anémie sévère. Leur cellules hématopoietiques ont besoin d'activité Cdk4,6.

Cell, Vol 118, 493-504, 20 August 2004

Les complexes Cdk2/cycline E compensent pour la absence de cyclines D. Les cellules des souris KO pour les cyclines D prolifèrent normalement. Par contre l'inhibition de la cycline E bloque leur prolifération. Notamment, l'inhibition de la cycline E n'as pas d'effet dans les cellules normales.

À retenir

- 1. Les étapes du cycle cellulaire
- 2. Point de restriction
- 3. Méthodes pour étudier le cycle cellulaire
- 4. L'histograme #cellules vs. fluorescence de l'ADN
- 5. Le modèle de la laveuse
- 6. Les CDKs comme régulateurs central du cycle cellulaire
- 7. La régulation de CDK par les cyclines
- 8. Les complexes CDK cyclines specifique a chaque étape du cycle cellulaire



À venir

- Encore la régulation des CDK-cyclines
- Les inhibiteurs de CDK (CKI)