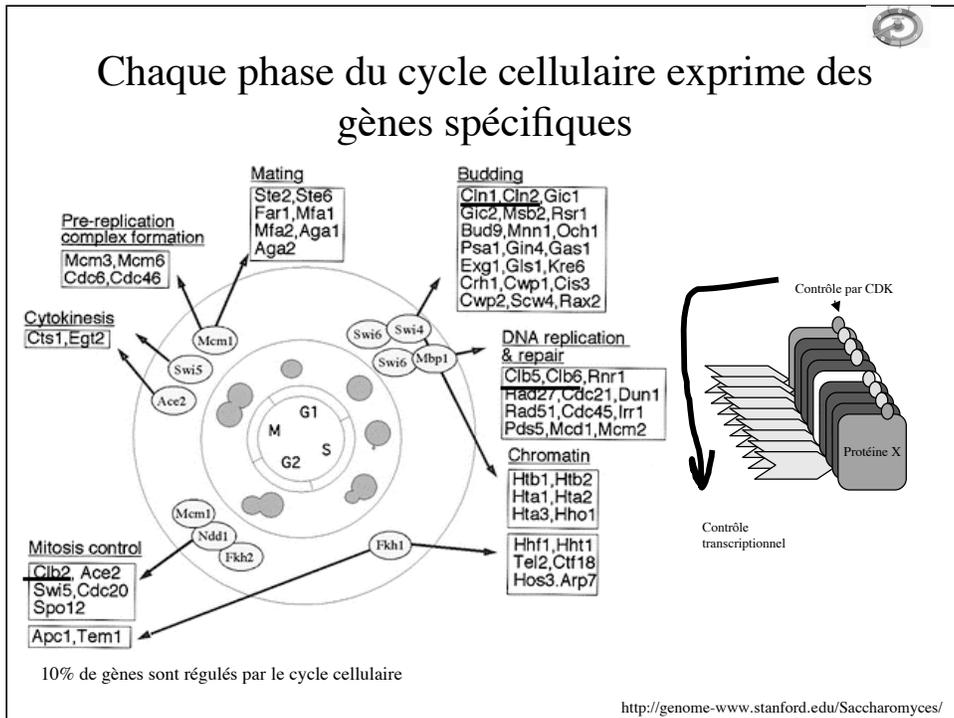


# Le contrôle transcriptionnel

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



C'est encore dans la levure où nous avons une connaissance détaillée de l'expression des gènes dans chaque étape du cycle cellulaire. On peut se demander comment les chercheurs sont arrivés à avoir ce grand volume d'information : c'est grâce à la technologie des micropuces. Voici un sommaire de l'expression des gènes spécifiques à chaque étape du cycle cellulaire.

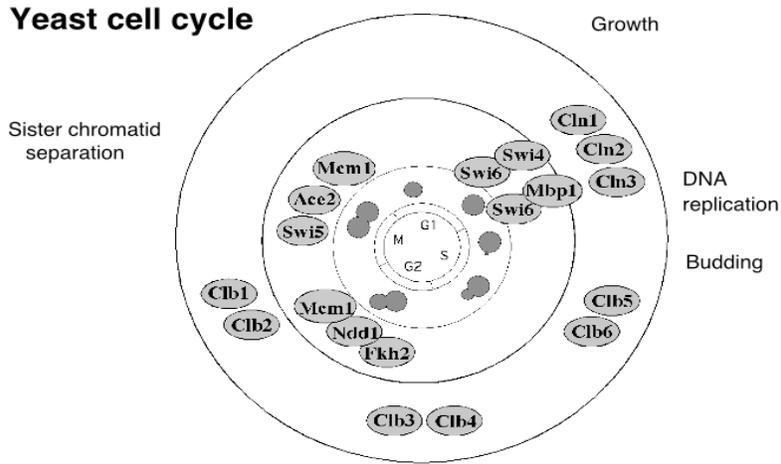
Les gènes qui participent à la réplication de l'ADN sont exprimés à la fin de G1. Ils ont dans leur promoteur deux types de séquences de reconnaissance, connues comme MCB et SCB.

MCB: ou MluI cell cycle box (ACGCGTNA) contient un site de reconnaissance pour l'enzyme MluI. Les MCB se retrouvent par exemple dans les gènes qui codent pour la DNA polymérase ou la thymidilate synthase. MCB est régulé par liaison d'un complexe des protéines Swi6 et MBP1.

SCB (CACGAAA) l'autre signal pour réguler l'expression à la fin de G1 est lié par un complexe des protéines Swi4, Swi6 et MBP1. Alors, Swi6 est une sous-unité régulatrice importante pour la transcription à la fin de G1.

En G2 et M la cellule a besoin d'exprimer des protéines pour la mitose et d'autres facteurs de transcription font la relève de Swi4, Swi6 et MBP1. Il est très intéressant à noter que les cyclines de chaque étape du cycle cellulaire sont transcrites dans l'étape où elles vont fonctionner. C'est une bonne façon pour la cellule d'éviter un cycle cellulaire désorganisé.

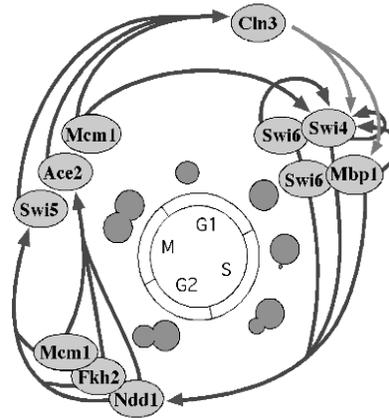
# Facteurs de transcription qui régulent le cycle cellulaire de la levure



Alors, le contrôle transcriptionnel assure que chaque famille de cyclines est exprimée dans l'étape du cycle cellulaire où elles vont agir. Le contrôle par dégradation va assurer que les cyclines ne vont pas agir de hors de leur étape spécifique. La cellule assure que dans chaque étape du cycle seulement les événements spécifiques à cette étape auront lieu.

## Le réseau transcriptionnel de régulation du cycle cellulaire

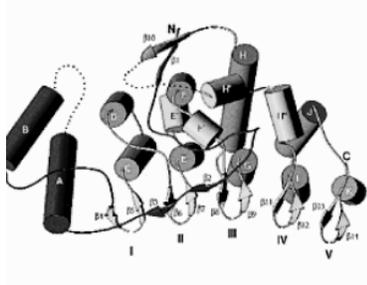
- Les activateurs qui fonctionnent dans une phase du cycle activent les activateurs de la phase suivante (réseau circulaire).



Encore plus intéressante c'est le fait que les facteurs d'une étape vont activer les facteurs de l'étape qui vient. Cette organisation de la transcription pendant le cycle cellulaire a été caractérisée comme un réseau transcriptionnel. On peut dire qu'en parallèle au contrôle des CDK qui régulent le cycle par phosphorylation des protéines il y a un contrôle transcriptionnel.

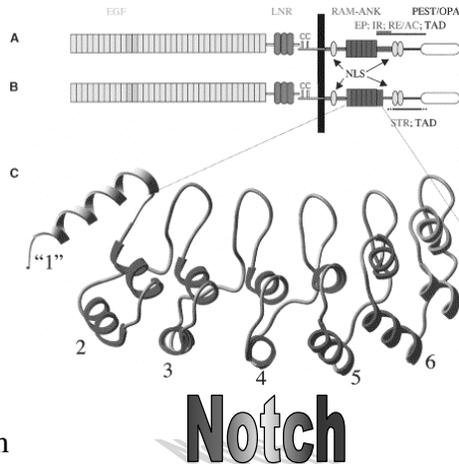
Ces deux mécanismes de contrôle ne vont pas agir en isolation. Il y a, bien sûr, des interactions entre les deux niveaux de contrôle. Par exemple, les facteurs de transcription de la mitose active les facteurs s de transcription de G1 a travers de la cycline 3. Et les complexes Cdk-Cyclin 3 activent les facteurs de transcription de G1-S, Swi4,6 et Mbp1 par phosphorylation (voir Whi5 diapo 16).

## Swi6 contient des répétitions ankyrines



Nat Struct Biol 1999 Feb;6(2):157-65

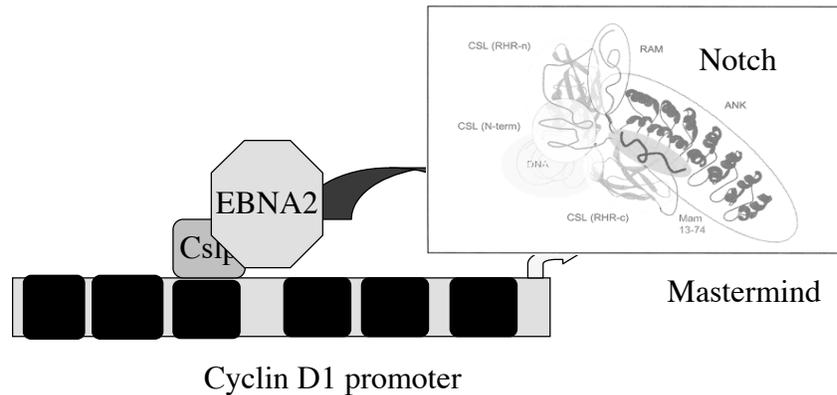
Swi4, MBP, p16INK4a, Notch



S'il y a une leçon qu'on devrait apprendre de la conservation extraordinaire de mécanismes de contrôle du cycle cellulaire c'est que c'est que nous savons chez la levure sera aussi vrai pour les cellules supérieures. Alors, on devrait attendre la découverte d'un réseau de régulation transcriptionnel chez les cellules de mammifères et peut être aussi de facteurs des transcriptions similaires à Swi4, Swi6 et MBP1. En fait Swi4, 6 et MBP1 possèdent des répétitions du type ankyrin représentées ici comme des hélices bleues et de feuilles bêta verts. Les répétitions ankyrin se trouvent dans plusieurs protéines qui lient les CDK comme le CKI p16INK4a et une famille très importante des facteurs de transcription eucaryotes.

Dans la protéine Notch les répétitions ankyrines sont essentielles pour activer la transcription.

## Notch une protéine avec des répétitions ankyrins régule le cycle cellulaire



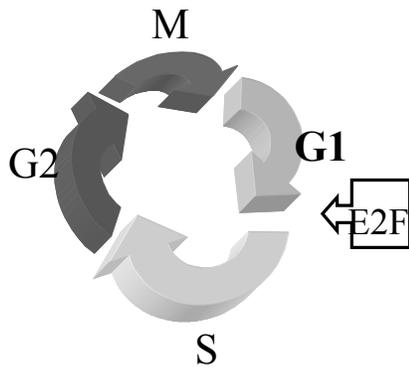
Cette famille des protéines est connue par le nom Notch après sa découverte chez la Drosophile. Il y a seulement un gène Notch chez la Drosophile, deux chez les vers et quatre chez la souris. Notch est un gène très bien connu pour son rôle dans le développement de la mouche ou il est responsable de prévenir la différenciation des cellules en neurones. Chez la souris l'effet antidiérentiation de Notch est importante pour maintenir les cellules souches (Genes Dev. 2002, 16(7):846-58).

Notch est un récepteur de membrane. La stimulation de Notch par son ligand Delta déclenche une protéolyse de Notch. Un fragment de Notch (NotchIC) est ensuite transloqué au noyau où il régule la transcription des gènes. Le fragment de Notch n'est pas lié à l'ADN directement. Il va lier une protéine déjà liée à l'ADN connue comme CSL. CSL est un répresseur de la transcription. Alors, on peut dire que Notch convertit un répresseur en un activateur.

Quels gènes sont-ils régulés par Notch : les gènes qui participent dans le cycle cellulaire comme la cycline D1 et plusieurs autres qu'on ne connaît pas.

Le virus de Epstein-Barr possède une protéine qui reproduit l'action de NotchIC. Elle s'appelle EBNA2. Le promoteur du gène pour la cycline D1 révèle aussi d'autres familles de FT importantes pour le contrôle du cycle cellulaire chez les mammifères. La famille AP1, la famille ETS et la famille TCF. Ici on va se concentrer dans la famille E2F pour laquelle le rôle dans le cycle cellulaire est bien établi.

## Les facteurs de transcription de la famille E2F sont nécessaires pour la transition G1-S



### La famille E2F

E2F1, 2, 3a

- Activation de la transcription
- Passage G1-S, sortie de G0

E2F 3b, 4, 5

- Répresseurs de la transcription:
- Établissement de G0 et arrêt de croissance associé à la différenciation cellulaire

E2F6: Répresseur à l'aide du répresseur Polycomb

E2F7: Répresseur pendant S et G2

E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis.  
Muller H et al. Genes Dev 2001 Feb 1;15(3):267-85

La famille E2F c'est la famille des facteurs de transcription mieux connue pour réguler le cycle cellulaire chez les eucaryotes supérieurs. Il y a 6 membres de la famille E2F : E2F1, 2 et 3a fonctionnent plu tôt comme activateurs de la transcription et E2F4 et 5 comme de répresseurs. E2F4 et 5 ne possèdent pas de signal de localisation nucléaire. E2F6 est un dominant négatif de la famille E2F. Chez la Drosophile le gène homologue de E2F dE2f1 est essentiel pour la rentrée à la phase S. Un deuxième gène dE2f2 est probablement un répresseur de la transcription des gènes contrôlés par dE2f1. Chez la souris le fibroblastes KO pour e2f1, 2 et 3 sont incapables de rentrer en phase S.

Note : Efl-1 and dpl-1 encode homologues of vertebrate E2F and DP proteins that regulate transcription as a heterodimer. efl-1 and dpl-1 mutants have elevated levels of activated Map kinase in oocytes. Their mutant phenotype and that of mex-5 mutants can be suppressed by reducing Ras/Map kinase signaling. Dpl-1 and possibly efl-1 may act in but are not essential for the cell cycle in C. elegans Mol Cell. 2001 Mar;7(3):451-60.

Note: Examination of eye discs from de2f1; de2f2 double-mutant flies reveals that relatively normal patterns of DNA synthesis can occur in the absence of both E2F proteins. This study shows how repressor and activator E2Fs are used to pattern transcription and how the net effect of E2F on cell proliferation results from the interplay between two types of E2F complexes that have antagonistic functions. Genes Dev. 2001 Aug 15;15(16):2146-60.



## Les cibles de E2F

### Régulation du cycle cellulaire

- Cdk1
- Cycline D and E
- E2F 1, 2, 3
- Cdc25

### Métabolisme des nucléotides

- Dihydrofolate réductase
- Thymidylate synthase
- Ribonucleotide réductase

### Réplication de l'ADN

- Initiation: Orc1, Cdc6, Mcm 3, 5, 6
- Facteurs de replication: RPA, RFC, PCNA, DNA ligase, DNA polymérase alpha, Topoisomérase II alpha.

### Mitotic activities.

- Cyclin A, B
- Cdc2
- Bub1
- Cdc20

### Duplication du centrosome:

- RanBPM

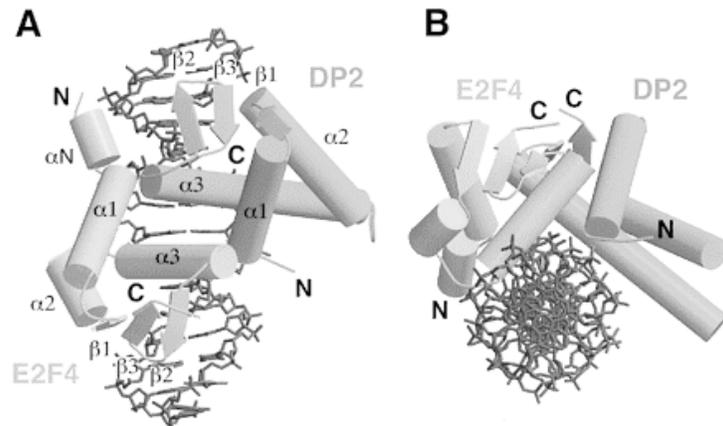
E2F contrôle le cycle cellulaire particulièrement la transition G1-S. Tous les gènes requis pour la réplication sont régules par E2F. Voici quelques exemples. E2F3b réprime ARF un régulateur négatif de la prolifération.

•Muller H, et al. Genes Dev. 2001 Feb 1;15(3):267-85. **E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis.**

•Ishida et al. **Role for E2F in Control of Both DNA Replication and Mitotic Functions as Revealed from DNA Microarray Analysis.** Molecular and Cellular Biology, July 2001, p. 4684-4699, Vol. 21, No. 14.

## Le heterodimer E2F-DP

E2F est une protéine qui a besoin d'une partenaire pour lier l'ADN », le partenaire c'est un de membres de la famille DP.



Winged-helix

E2F7 a deux domaines de liaison a l'ADN et n'as pas besoin de DP.

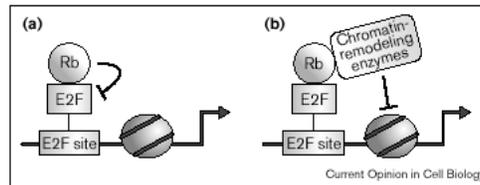
Les domaines de liaison a l'ADN de E2F et DP ont une structure similaire connue comme le motif « winged-helix ». Le motif « winged-helix » se trouve aussi dans d'autres facteurs de transcriptions comme HNF-3, Fox, ETS1 mais aussi dans l'histone H5 et RAP74 une sous-unité de TFIIE. Le motif a trois hélices et une feuille bêta (wing) formant un domine hydrophobe. Genes Dev. 1999 Mar 15;13(6):666-74.

**Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors.**

**Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE.** Genes Dev. 2000, 5;14(2):142-6.

Le winged helix 'est une sub-famille du motif helix-turn-helix presente dans plusieurs facteurs de transcriprion (i.e Cro)

## Les protéines de la famille Rb inactivent les facteurs E2F

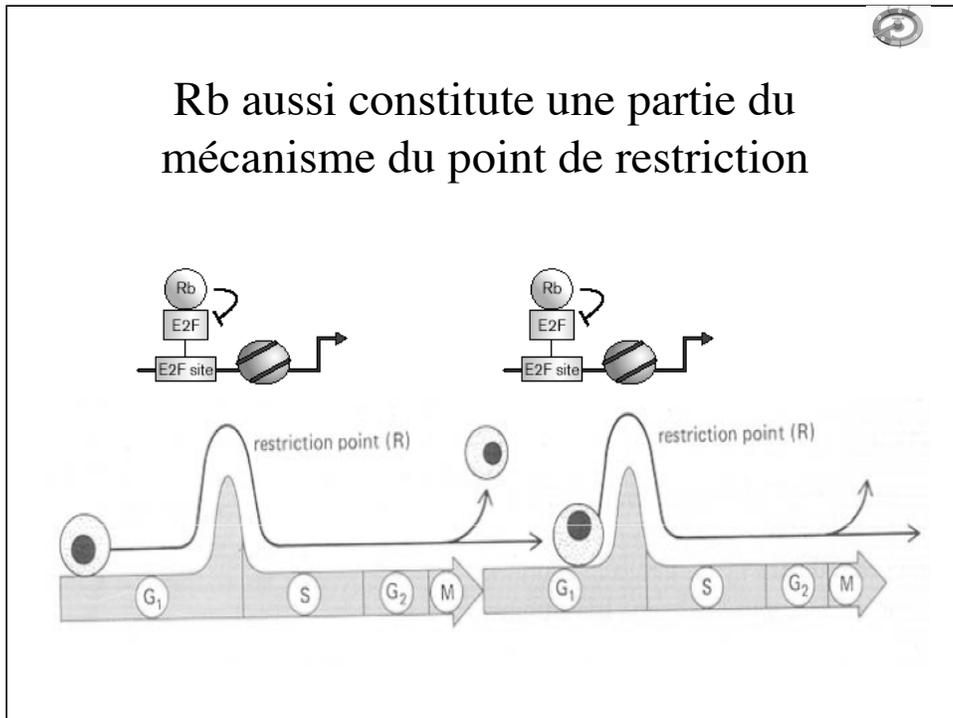


Rb can regulate E2F-dependent transcription by two distinct mechanisms. **(a)** Rb binds to the transactivation domain of E2F family members and blocks their ability to activate transcription. **(b)** Rb can interact with chromatin remodeling enzymes such as HDACs and SWI/SNF, and interaction of Rb with E2F allows these chromatin remodeling enzymes to be targeted to promoters where they can promote nucleosome assembly. This second mechanism of repression is the focus of this review.

Famille Rb= pocket proteins (Rb, p107, p130)

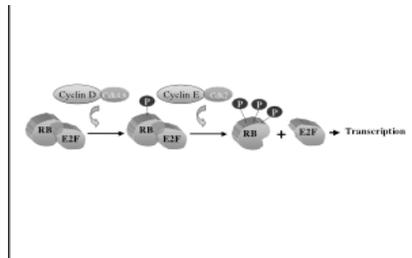
Les protéines de la famille Rb, (Rb, p107 et p130), régulent E2F par deux mécanismes : 1) bloquent directement l'activité transcriptional de E2F 2) recrutement des enzymes qui modifient la chromatine, comme les histones deacetylases, qui vont catalyser la formation d'une structure de la chromatine qui n'est pas accessible pour la transcription.

## Rb aussi constitue une partie du mécanisme du point de restriction



Alors si nous retournons au concept de point de restriction, le point qui définit une barrière à la prolifération nous pouvons établir un deuxième composant du PR, la famille Rb. Cette barrière ne permet pas la transcription des gènes requis pour passer de G<sub>1</sub> à la phase S et va agir avec les CKI pour maintenir la cellule en G<sub>1</sub>. Est-ce que Rb et les CKI constituent des composants indépendants du PR ou plus tôt ils sont reliés.

## La phosphorylation de Rb par les CDK libère E2F de l'inhibition dépendante de Rb



Phosphorylation séquentielle

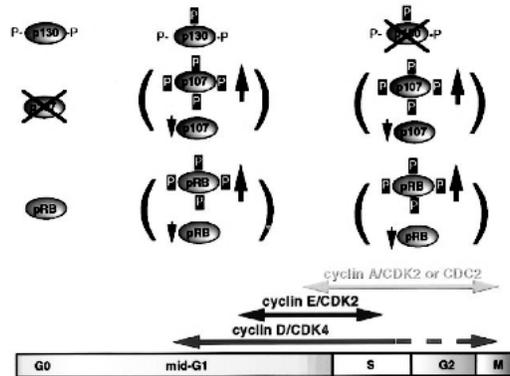
CDK4, 6-cycline D

CDK2-cycline E

CDK2-cycline A

Pour passer de la phase G1 à la phase S les cellules eucaryotes supérieures ont besoin d'inactiver Rb. Ce sont les complexes CDK-cyclins qui vont inactiver Rb par phosphorylation. Les complexes cyclin D-CDK4 ou CDK6 phosphorylent initialement Rb. Cette phosphorylation cause une inactivation partielle de Rb et une activation partielle de E2F. La phosphorylation par CDK4,6-cyclin D rend Rb plus susceptible à être phosphorylé par Cdk2-cyclin E c'est qui inactive complètement Rb et permet la transcription des gènes contrôlés par E2F. Il y a 16 sites de phosphorylation CDK dépendant dans Rb.

## Phosphorylation de p130, p107 et Rb pendant le cycle cellulaire



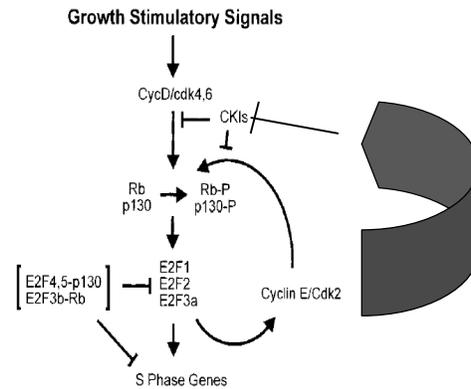
Les protéines “pocket” Rb, p107 et p130 sont phosphorylées par les complexes CDK-cyclines, CDK4-Cycline D en G1, Cdk2-Cyclin E en G1-S et Cdk2-Cycline A en S, G2 et le début de la phase M. A la fin de la mitose Rb est déphosphorylée et p107 est dégradé. La kinase responsable de la phosphorylation de p130 en G0 n'est pas encore connue.



# La voie de Rb-E2F

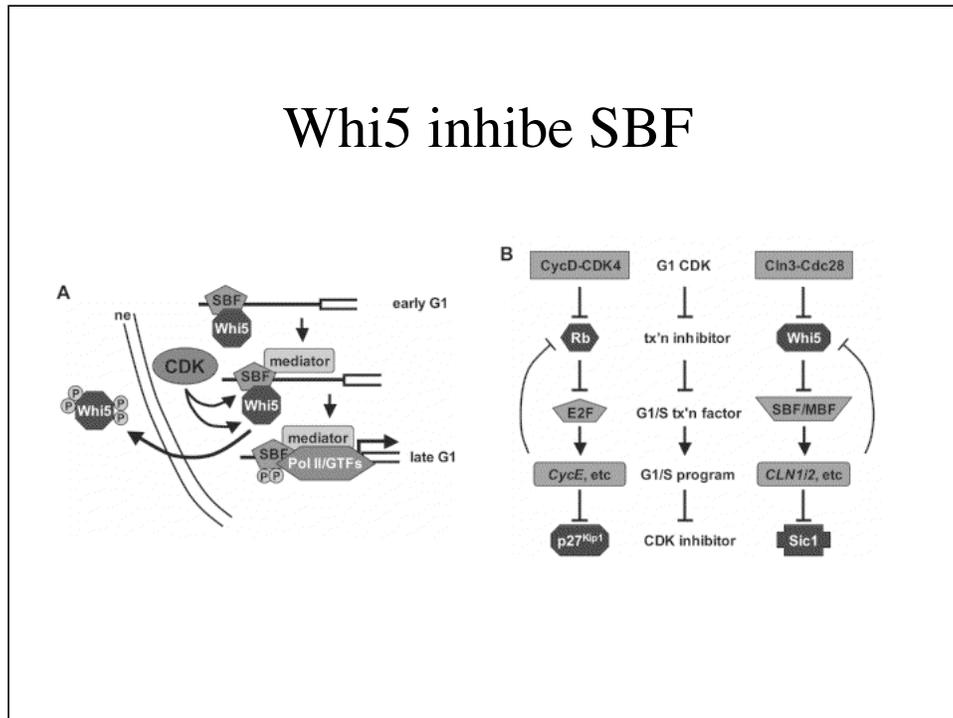
Plusieurs « feedback » positifs contrôlent la transition G1-S par E2F

1. Induction de cycline E
2. Induction de E2F
3. Induction de cycline A
4. Phosphorylation de CKI et Cdh1/Hct par les complexes CDK-cyclines



Rb bloque E2F et les complexes CDK-cyclin bloquent RB. Les CKI, en inhibant les complexes CDK-cyclins, protègent Rb et indirectement bloquent la transcription des gènes contrôlés par E2F. Cete voie de signalisation qui parte normalement des récepteurs des facteurs de croissance et passe par les complexes CDK-cyclines, Rb et E2F est connue comme la voie de RB ou la voie de Rb-E2F. La voie de Rb-E2F est très importante pour le contrôle du cycle cellulaire. Alors, il est maintenant claire que les CKI et RB fonctionnent en coopération pour maintenir le point de restriction

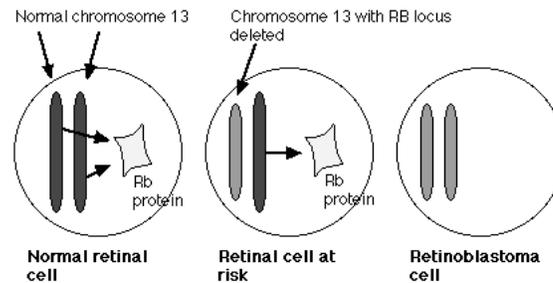
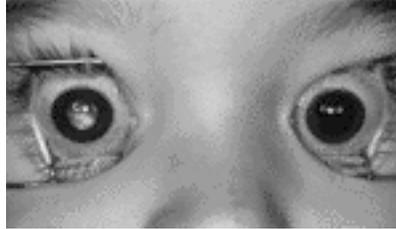
## Whi5 inhibe SBF



Whi5 inhibits G1/S transcription and that this inhibition is relieved by CDK-mediated phosphorylation. Deletion of *WHI5* bypasses the requirement for upstream activators of the G1/S transcription factors SBF/MBF and thereby accelerates the G1/S transition. Whi5 is recruited to G1/S promoter elements via its interaction with SBF/MBF in vivo and in vitro. In late G1 phase, CDK-dependent phosphorylation dissociates Whi5 from SBF and drives Whi5 out of the nucleus. Elimination of CDK activity at the end of mitosis allows Whi5 to reenter the nucleus to again repress G1/S transcription. These findings harmonize G1/S control in eukaryotes.

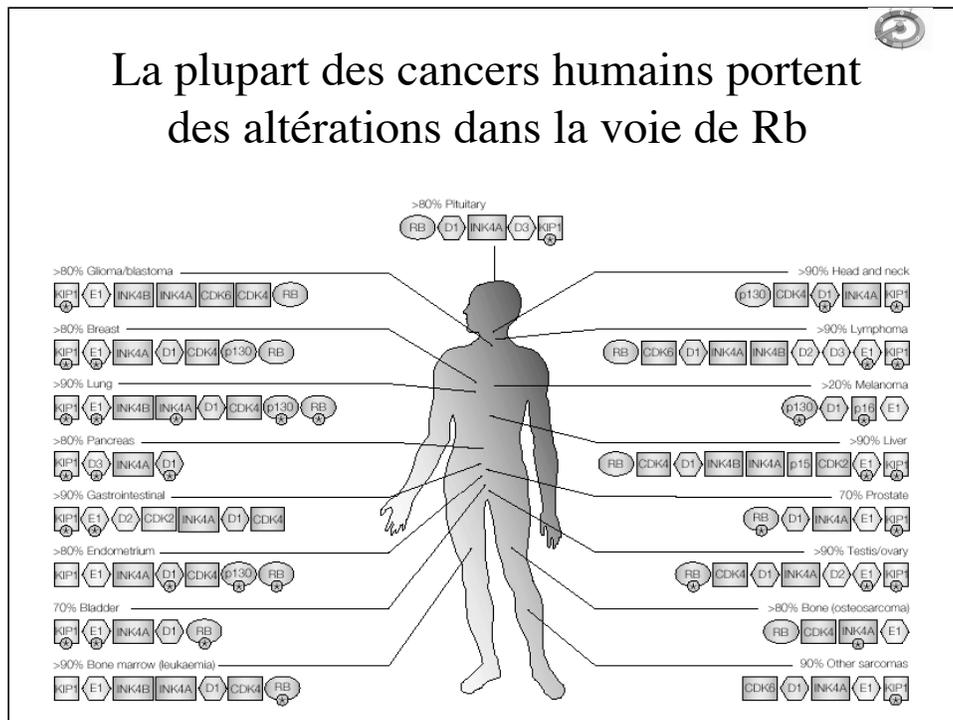
Cell. 2004 Jun 25;117(7):899-913.

## Retinoblastoma: le concept classique de gènes de suppression tumorale



La protéine Rb doit son nom à un type de cancer héréditaire qui affecte la rétine, le retinoblastoma. Le retinoblastoma héréditaire arrive quand les patients portent une mutation d'une des copies de gène Rb. La perte du deuxième allèle par mutation ou délétion a comme conséquence le manque total d'expression de Rb et éventuellement la formation d'un tumor cancéreux.

## La plupart des cancers humains portent des altérations dans la voie de Rb



Les tumeurs malignes où le cycle cellulaire est très dérégulé, montrent tous une altération d'un de membres de la voie de Rb-E2F.

Examen 2002.

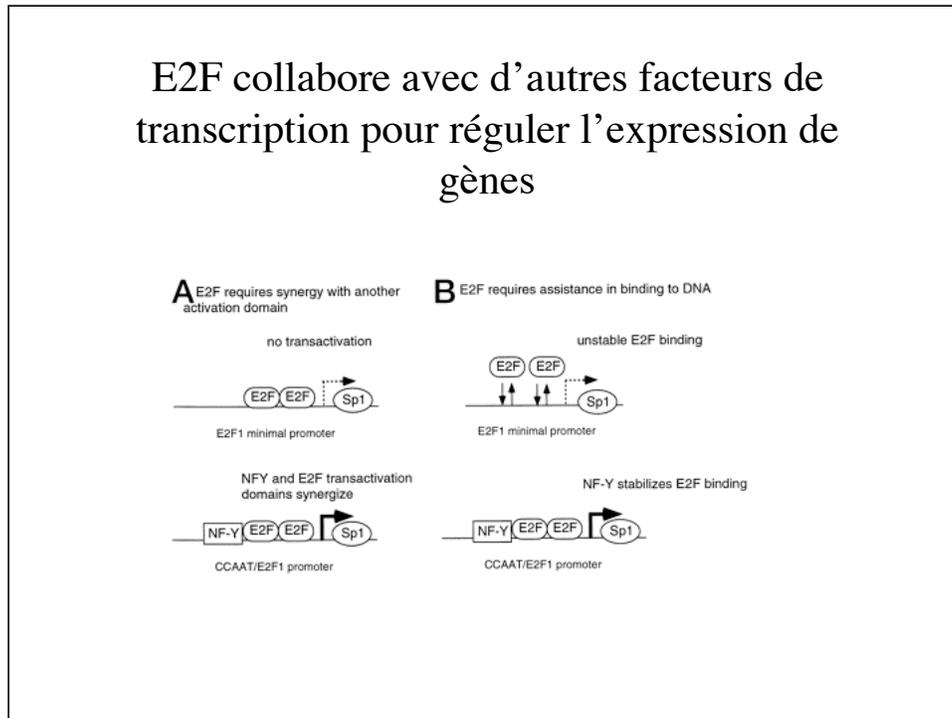
1) Dr Collins et son group de recherché à l'Institut Karolinska ont reporté les altérations génétiques plus fréquentes dans les patients avec glioblastoma, un cancer derivé des cellules qui compose le cervau. Ils ont trouvé que la grande majorité de patients avait un des altérations suivantes:

- 1) Amplification génétique du gène CDK4 localisé au chromosome 12q14
- 2) Perte de la protéine p16 (CDKN2A)
- 3) La perte de la protéine Rb

Par contre rarement ces patients avaient plus de une de ses altérations.

a) Explique pourquoi les altérations de CDK4, p16 et Rb sont exclusives

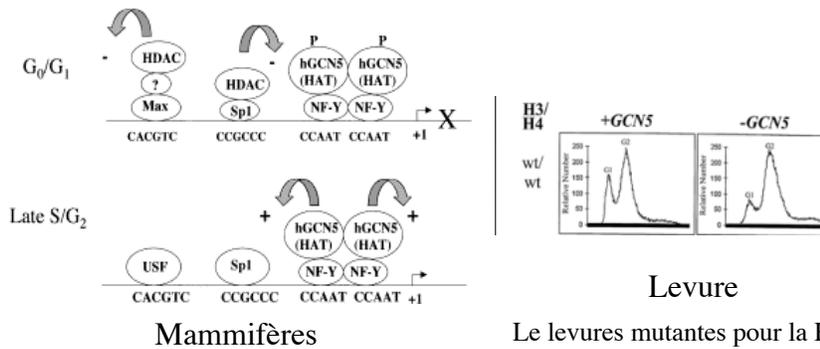
## E2F collabore avec d'autres facteurs de transcription pour réguler l'expression de gènes



Ça serait une vision très simpliste du cycle cellulaire des eucaryotes supérieurs si nous restons, avec l'idée que les facteurs E2F sont-ils, suffisants pour contrôler l'expression des gènes requis pour la division cellulaire. Il y a des facteurs de transcription qui contrôlent le cycle cellulaire parce qu'ils collaborent avec E2F pour réguler la transcription. Un exemple bien connu est celui du facteur NFY qui lie la boîte CAATT présente dans plusieurs gènes qui contrôlent la réplication et la mitose. NFY peut augmenter la capacité de E2F de lier l'ADN ou il peut collaborer avec E2F pour activer la transcription. En fait, les promoteurs qui répondent à E2F pourraient être classifiés selon quel facteur de transcription collabore avec E2F pour réguler la transcription

J Biol Chem. 1997 Jul 18;272(29):18367-74

## La régulation de la cycline B1: Rôle des histones acétylases (HAT) et deacetylases HDACs



Levure  
Le levures mutantes pour la HAT GCN5 ont un défaut dans le passage de G<sub>2</sub> a M et arrête leur croissance avec un contenu d'ADN typique de G<sub>2</sub>/M.

Finalemnt, il y a des gènes qui contrôlent le cycle cellulaire qui ont une expression indépendante de E2F. Par exemple la cyclin B1 est contrôlée par NFY et la boite CCAAT. Comme plusieurs autres facteurs de transcription, NFY lie son site de reconnaissance, la boite CCAAT, et recrute des histones acétylases pour activer la transcription. Cette activation se passe seulement en G<sub>2</sub> parce que l'activité de la HAT lie NFY est inhibée par phosphorylation. En G<sub>2</sub> une phosphatase dephosphoryle GCN5 et permet son activité HAT.

Le rôle de HAT dans le cycle cellulaire est mieux connu chez la levure. Le levures mutantes pour la HAT GCN5 ou les lysines des histones H3 et H4 ont un défaut dans le passage de G<sub>2</sub> a M et arrête leur croissance avec un contenu d'ADN typique de G<sub>2</sub>/M. Ceci indique que l'acétylation des histones par GCN5 est importante pour le passage G<sub>2</sub>/M. (The EMBO Journal Vol. 17,pp. 3155-3167, 1998).

Le gène FoxM1 (homologue de Fkh2 d la levure) régule la transcription du gène de cyclin B1 en G<sub>2</sub>.

## Prolifération et gènes

Augmente	Diminue
CDK et cyclines	CKI: p21, p27, p16
Cdc25 A, B, C	Wee1
SCF-Skp2 (F box)	SCF-Ago (F box)
E2F (E1A, E7)	Rb, p107, p130
Notch (EBNA2)	Cdc14
CAK	
APC-Cdc20	

## À rétenir

Plusieurs gènes sont exprimés dans des étapes spécifiques du cycle cellulaire.

La famille E2F1, classification et fonctions

Gènes activés par E2F

Les protéines de la famille Rb (pocket proteins)

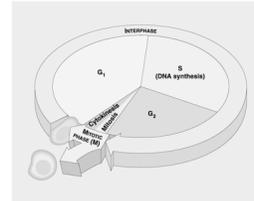
Mécanisme d'action de RB et point de restriction

La voie Rb-E2F et leur status dans le cancer

Le concept de gène de suppression tumorale

Feedback positifs qui permettent la transition G1-S

Role de HAT GCN5 dans le contrôle de la transcription en G2



## À venir

La fonction des complexes CDK-cyclines et la transition G1-S