

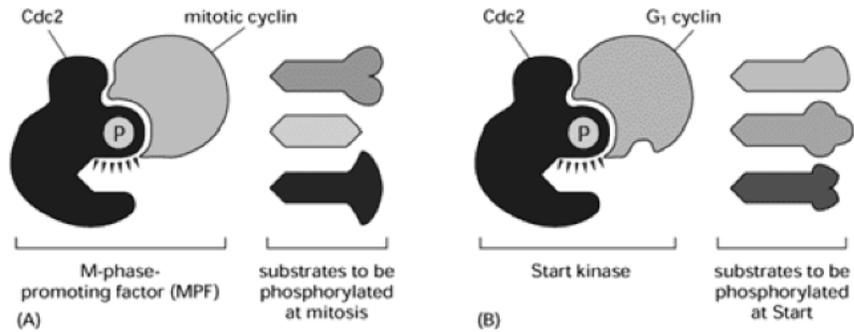
# La fonction des complexes CDK-cyclines et la transition G1-S

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

Nous avons étudiés en détaille la structure et la régulation des différents composants de la machinerie de contrôle du cycle cellulaire : les CDK, les cyclines et les CKI. Maintenant nous allons étudier comme les complexes CDK-cyclines catalysent la succession ordonnée des étapes du cycle cellulaire.

- En commençant par G1 nous avons déjà étudiés comme pour passer de G1 a S il faut inactiver les différents mécanismes qui composent le point de restriction. Le point qui empêche les cellules de passer de G1 a S. Je vous rappelle que les CKI sont inactivés a la fin de G1, c'est qui permet aux complexes CDK-cyclines de G1 de phosphoryle Rb et libérer E2F pour la transcription des gènes requis pour la phase S.

# Les complexes CDK-cyclines activent leur substrats par phosphorylation

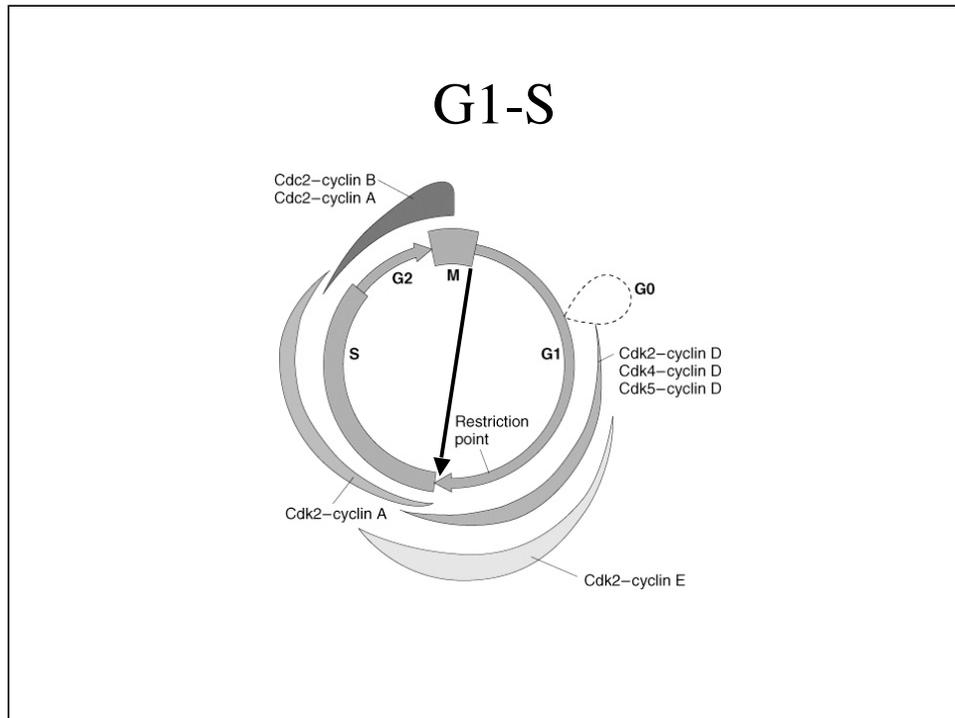


## Un motif d'interaction en deux parties

	Cy motif						
E2F1	K	R	R	L	D	L	• Le site de phosphorylation (S/TPXK/R) ainsi que le motif Cy (ou RXL) constituent le site de liaison « en deux parties » pour les complexes CDK-cyclines
E2F2	K	R	K	L	D	L	
E2F3	K	R	R	L	E	L	
p107	K	R	R	L	F	G	• Ce motif d'interaction se trouve dans les CKI, les substrats et les protéines de recrutement des CDK
p130	K	R	R	L	F	V	
Cdc6	G	R	R	L	V	F	
Myt1	P	R	N	L	L	S	• Le motif Cy interagit avec un sillon hydrophobique à la surface de la cycline
Cdc25a	P	R	R	L	L	F	
p57	C	R	S	L	F	G	
p27	C	R	N	L	F	G	
p21(N)	C	R	R	L	F	G	
p21(C)	K	R	R	L	I	F	
HPV18 E1	K	R	R	L	F	T	
SSeCKS (1)	L	K	K	L	F	S	
SSeCKS (2)	L	K	K	L	S	G	
b3-endonexin	K	R	S	L	K	L	

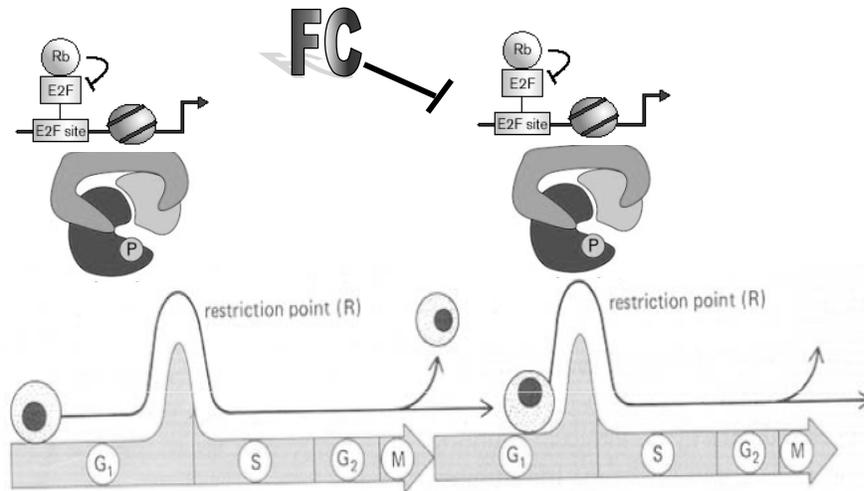
Comme les complexes CDK-cyclines contrôlent leurs cibles par phosphorylation on doit s'attendre à trouver un signal de reconnaissance dans les cibles, les CKI et d'autres protéines qui interagissent avec eux. Le site de phosphorylation de CDK contient la séquence S/TPXK/R. Plusieurs substrats contiennent aussi le motif Cy ou RXL que interagisse avec la cyclin.

Alors pour comprendre comme la phosphorylation par CDK régule un processus biologique on doit identifier les protéines cibles qui devraient avoir des sites de phosphorylation pour les complexes CDK-cyclines. La phosphorylation d'un où plusieurs de ses sites devraient changer l'activité des protéines en question. Cette tâche monumentale est loin d'être accomplie. C'est qui suit c'est l'état actuel des nos connaissances.



Deux questions importantes, 1) pour quoi le cycle a besoin de G1. Le modèle de la laveuse indique la possibilité de passer directement de M à S, mais ce n'est pas le cas normalement, même si ça arrive parfois; 2) quels sont les facteurs qui contrôlent la transition G1-S? Nous savons que les complexes CDK-cycline de G1 sont responsables de cette transition alors la question posée d'une autre façon c'est: comment sont contrôlés les complexes CDK-Cyclines de G1.

En G1 les complexes CDK-cyclines sont inactifs et E2F est inhibé par Rb.

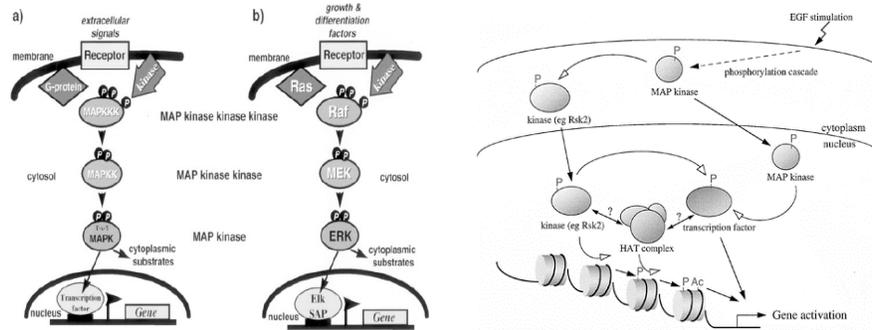


Il y a deux barrières importantes qui empêchent les cellules de rentrer en phase S. 1) Les CKI 2) les protéines de la famille Rb. Ces deux barrières constituent le point de restriction, défini par Pardee dans ses expériences classiques de cinétique du cycle cellulaire. Pour passer de G<sub>1</sub> à S il faut bloquer l'action inhibitrice des CKI et Rb. En fait toutes les arrêtes du cycle cellulaire en G<sub>1</sub> en réponse à différents facteurs externes ou internes sont en partie dépendant d'une augmentation des niveaux des CKI et une activation de la famille Rb. C'est pour ça que les CKI sont importantes pour établir les états de quiescence, différenciation et sénescence.

Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM. Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science*. 1996 May 10;272(5263):877-80.

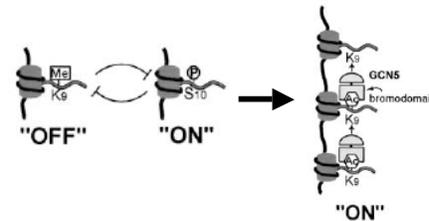


## La voie des MAP kinases



ERKs stimulent la prolifération par 2 mécanismes:

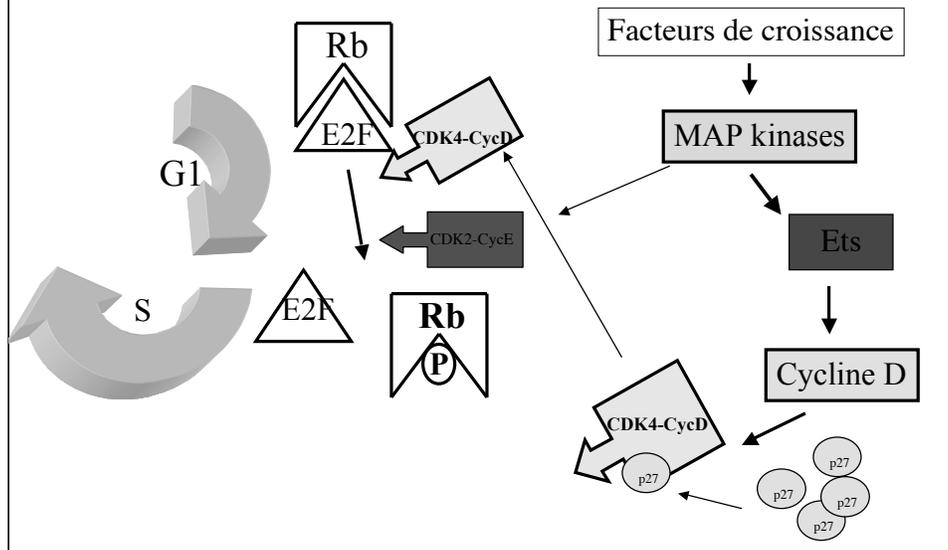
- activation des gènes spécifiques
- activation globale de la chromatine via Rsk (Ser10P et KpAcet dans H3)



La voie de MAP kinase implique une série des protéines kinases qui sont activées par phosphorylation par la kinase précédente. Les MAP kinases sont ainsi phosphorylées et activées par les MAPKK qui sont aussi activé par les MAPKKK. Il y a plusieurs voies des MAP kinases dans la cellule. La voie connue comme la voie de ERK c'est la plus étudiée dans le contexte des facteurs de croissance. Les récepteurs de FC activent la voie de ERK principalement via la petite GTPase Ras. Ras active Raf ou la MAPKKK, qui active Mek ou la MAPKK qui active ERK1/2 ou les MAPK. Les fonctions de ERK dans la prolifération sont faites par plusieurs substrats donc les facteurs de transcription de la famille ETS et d'autres protéines kinase comme Rsk.

Un mécanisme général par le quel les ERKs peuvent stimuler la prolifération cellulaire c'est à travers ses effets sur la chromatine. Les ERKs phosphorylent et activent la kinase Rsk, qui à la fois phosphoryle l'histone 3 en serine 10. Cette phosphorylation facilite l'action d'histones acetylases qui vont permettre une conformation active et ouverte de la chromatine. La combinaison de l'ouverture de la chromatine avec l'activation de facteurs de transcription spécifiques permet aux MAP kinases l'activation des gènes requis pour progresser en G1. La question reste quand même pour savoir quels sont les gènes activés par ERKs qui permettent le passage de G1E à G1L et après à S. Mol Cell. 2000 Jun;5(6):905-15.

## Les facteurs de croissance inactivent Rb via la voie des MAP kinases



Un des gènes activés par les MAP kinases c'est celui de la cycline D. Voici comme ça fonctionne pour le cycle cellulaire, et ce n'est pas juste un gène. En réalité il devrait exister quelques dizaines de gènes importants pour expliquer comment les MAP kinases régulent le cycle cellulaire

Induction de la transcription du gène de Cycline D

Accumulation des complexes Cdk4-CycD

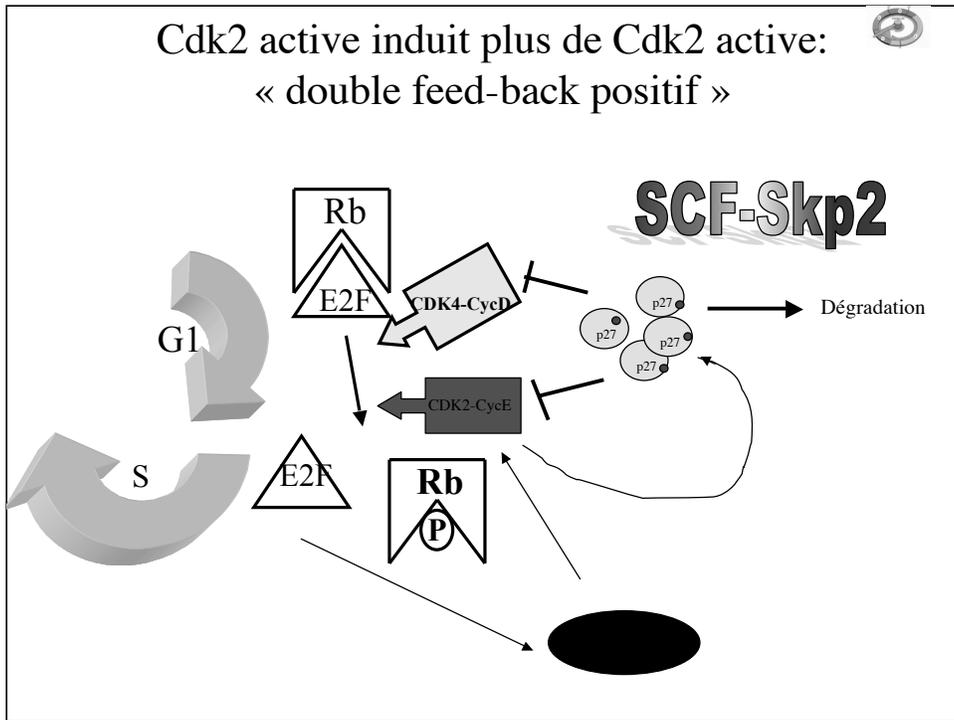
Titration de p27 et p21 (Sherr & Roussel, Land)

Phosphorylation de Rb

Activation de E2F

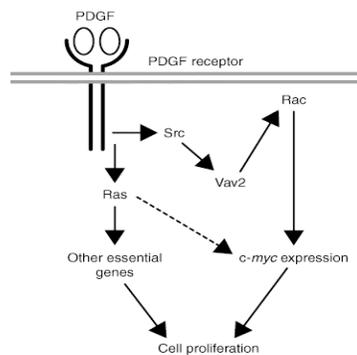
En plus la MAP kinase contrôle le cycle par phosphorylation de plusieurs protéines. On estime que il y a quelques centaines des événements de phosphorylation catalysés par les ERK qui coordonnent le cycle cellulaire. Un exemple c'est la phosphorylation de Cdk2 en thréonine 160 qui active les CDK comme nous l'avons expliqué, dans notre première lecture. (Baldassare).

La perte de Rb réduit les besoins de MAP kinases pour la prolifération. Ça veut dire que la fonction plus importante de la voie de MAP kinases c'est l'induction de la cycline D et l'inactivation de Rb.



Montagnoli et al Genes & Dev 13, 1181, 1999

## Les facteurs de croissance induisent Myc via Src et la petit GTPase Rac



J. Michael Bishop



Harold Varmus

Prix Nobel 1989

Src: premier oncogène découvert  
Oncogène : gènes qui induisent le cancer lors  
que leur expression est altérée.

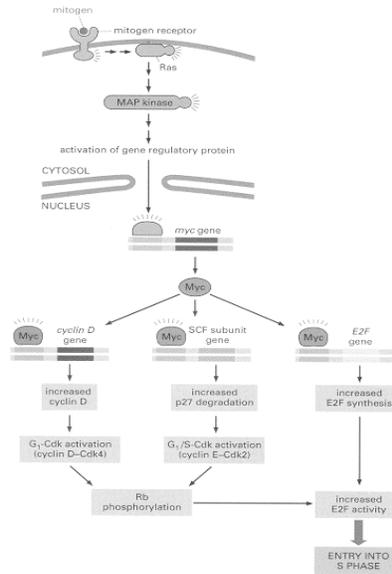
L'induction de *myc* par les facteurs de croissance comme le PDGF passe par la protéine kinase Src. La voie entre Src et le promoteur de *myc* n'est pas encore complètement connue, mais nous savons que Src active Vav, une protéine qui active la petite GTPase Rac.

**nature cell biology, 2001 volume 3 issue 6 pp 580 - 586**

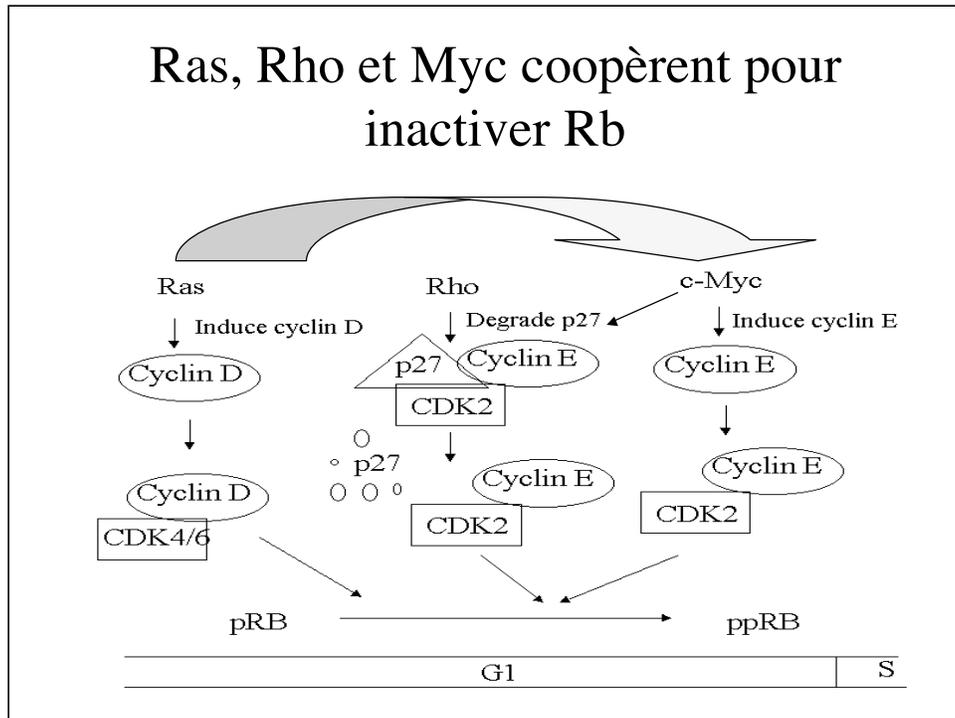
**Regulation of *c-myc* expression by PDGF through Rho GTPases**

**Mario Chiariello, Maria Julia Marinissen and J. Silvio Gutkind**

# Myc stimule la transition G1-S par plusieurs mécanismes.

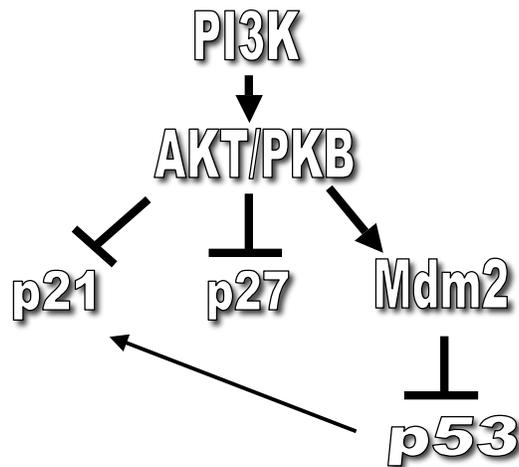


## Ras, Rho et Myc coopèrent pour inactiver Rb



La voie de MAP kinase n'agit toute seule pour inactiver Rb et permettre aux cellules passer le PR. La petite GTPase Rho et le facteur de transcription Myc coopèrent avec Ras pour inactiver Rb. Ras et la voie de MAP kinase inactivent Rb via une augmentation de la cycline D, une séquestration de p27 et une activation directe de Cdk2. Par contre, Rho et Myc coopèrent pour dégrader p27. En plus, Myc augmente aussi la transcription de la cycline E.

## La voie PI3K-AKT bloque les CKI et p53



La voie de PI3K est aussi très importante pour passer de G1 à S. En fait, c'est probablement la voie responsable de passer de G1L au PR. L'activation de la PI3K génère des phosphoinositols qui vont activer une protéine kinase, AKT. AKT va phosphoryler plusieurs protéines pour réguler le passage G1-S. Nous ne connaissons toutes les substrats de AKT mais nous savons que AKT inactive les CKI p27 et p21 et active le régulateur négatif de p53 Mdm2 (à étudier après). La phosphorylation de p21 et p27 par AKT retient ces protéines au cytoplasme par contre la phosphorylation de mdm2 active son transport au noyau. AKT donc régule le flux nucléo-cytoplasmique des protéines qui régulent le cycle cellulaire.

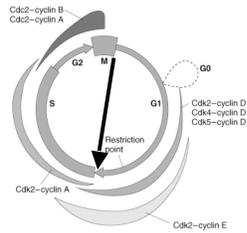
## Prolifération et gènes

**Oncogènes**

Augmente	Diminue
CDK et cyclines Cdc25 A, B, C SCF-Skp2 (F box) E2F (E1A, E7) Notch (EBNA2) CAK APC-Cdc20	CKI: p21, p27, p16 Wee1 SCF-Ago (F box) Rb, p107, p130 Cdc14
FC (EGF, PDGF, NGF) et R-FC (EGF-R, neu)	p53
MAPK (ras, raf)	
src	
myc	
akt	

**Suppresseurs tumorales**

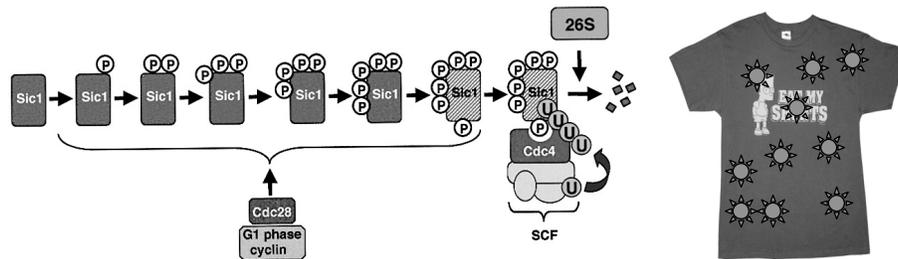
## La perte de CKI conduite aux aberrations chromosomiques



- G1 sert à se préparer pour répliquer l'ADN
- Si nous accélérons G1 par inhibition de CKI, les cellules rentrent en S sans avoir accumulé tous les facteurs nécessaires pour une réplication sans erreurs

- Il est très important de coupler la durée de G1 à la synthèse des facteurs requis pour la phase S.
- Aussi il faut commencer la phase S avec une accumulation des plusieurs complexes CDK-cyclines actives, de sorte qu'une fois la réplication est commencée, ils ne limiteront pas sa conclusion.
- La question est : comment la cellule assure-t-elle c'est deux conditions

## Transition G1-S avec un niveau élevé de complexes CDK-cyclines activés



Les complexes CDK-cyclines sont importants pour commencer la phase S. Il faut arranger le mécanisme de leur activation de sorte que les cellules entrent en phase S avec une quantité suffisante de complexes activés.

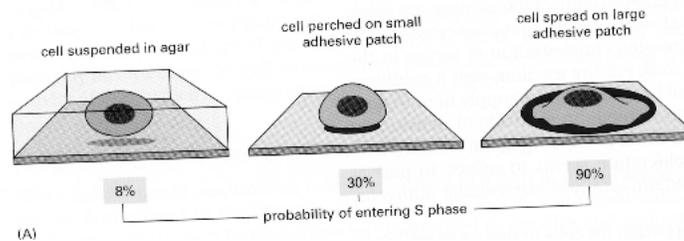
Remarkably, SCF<sup>Cdc4</sup> ubiquitin ligase binds and ubiquitinates Sic1 decorated with six, but not five, phosphates.

From Deshaies and Ferrell Cell Dec 107:819-22 (2001)

Le mécanisme utilisé par la levure *S. cerevisiae* pour réguler la transition G1-S est un exemple bien connu du rôle de CKI dans le cycle cellulaire. En G1 les cellules expriment peu de cyclines mais à mesure que la levure passe par G1 et si les nutriments sont bien disponibles, les cyclines de G1 commencent à s'accumuler et les complexes CDK/cyclines (dans ce cas Cdc28/Cln) augment progressivement leur activité. Nous savons que pour arriver à la phase S les cellules ont besoin de dépasser un seuil critique d'activité Cdk/Cln. À ça s'oppose Sic1 le CKI de la levure. La question est donc, Comme la levure arrive à libérer les CDK-CLn de Sic1 ?

Le mécanisme implique la phosphorylation de Sic1 par les complexes CDK-Cln dans plusieurs sites de phosphorylation. C'est un mécanisme de feed-back positif. Quand la phosphorylation de Sic1 est complète, Sic1 est reconnu par une protéine à boîte F et dégradée par le système ubiquitine proteasome. On peut dire que Sic1 agisse comme un détecteur de l'activité CDK-Cln parce que sa dégradation va seulement se produire quand cette activité atteint un niveau élevé ce qui est aussi nécessaire pour commencer la phase S. On a pas un niveau de compréhension similaire chez les mammifères, mais quelques aspects moléculaires du modèle de la levure sont aussi retrouvés chez les mammifères. Par exemple, plusieurs CKI sont dégradés via les protéines à boîte F et le protéasome.

## Contrôle de la prolifération cellulaire par l'ancrage des cellules

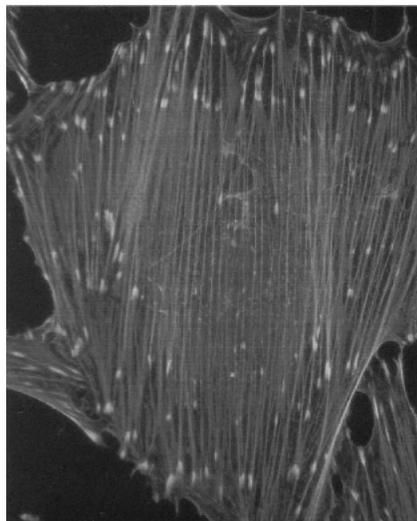


Pour la plupart des cellules, les facteurs de croissance ne sont pas suffisants pour assurer le passage de G1 à S. Un signal d'ancrage aux milieux extracellulaires est aussi requis pour la prolifération cellulaire. À continuation nous allons étudier comment les signaux d'ancrage régulent le cycle cellulaire.

L'importance de l'ancrage pour la prolifération des cellules normales est bien illustrée dans cette expérience. Si les cellules sont placées dans une surface à laquelle elles ne sont pas capables de s'attacher, peu de cellules rentrent en phase S. La quantité des cellules qui rentrent en phase S est en proportion directe avec leur degré d'ancrage.



## Adhésions focales



Adhésion focales: endroits où les composants de la matrice extracellulaire (laminine, fibronectine) interagissent avec des récepteurs membranaires (intégrines) qui sont liés au cytosquelette

Dual function: Mechanical  
Signaling

Intégrines: récepteurs membranaires

Cytoskeletal proteins:  
talin,  
vinculin,  
alpha-actinin

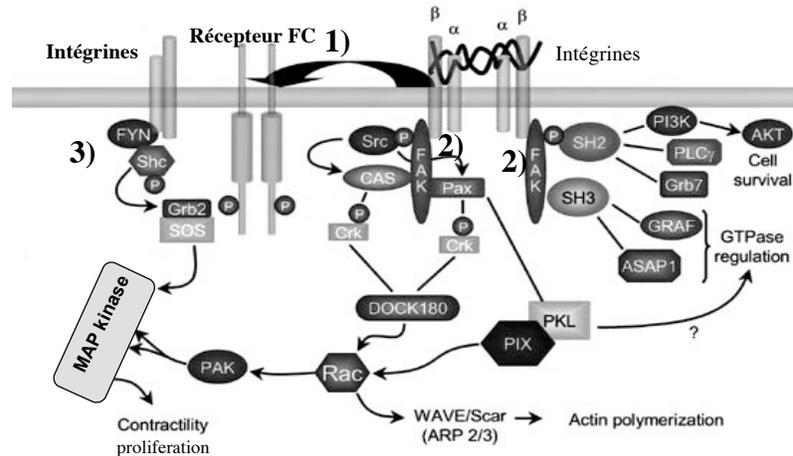
Signaling proteins  
FAK = « Focal Adhesion Kinase »:  
protéine kinase qui transmet les signaux des intégrines

Il y a deux hypothèses pour expliquer comment l'ancrage régule le cycle cellulaire. La théorie mécanique indique que les cellules ont besoin d'être attaché pour générer les forces qui 'ils sont besoin pour se diviser.

La théorie de signalisation indique que l'ancrage active des voies de signalisation qui coopèrent avec les FC pour passer de G1 à S.

L'ancrage des cellules a leur substrat n'est pas uniforme. Il y a des sites d'adhésion només Adhesion focales. Dans les AF on trouve des integrines, des protéines du cytosqueleton, et des protéines de signalisation. Sont les integrines qui vont attacher les cellules au milieu extracellulaire.

## Les voies de signalisation activées par les intégrines



- 1) Stimulation des récepteurs (dépendante du ligand), 2) FAK  
3) Fyn

Les récepteurs des intégrines activent trois voies des signalisations importantes qui stimulent la prolifération en coopération avec les signaux provenant des récepteurs de facteurs de croissance. (Model de coopération de Giancontti):

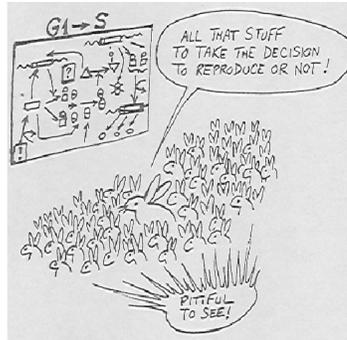
Les signaux activés par les intégrines vont passer par 1) le récepteur de FC, 2) Fak, 3) Fyn. Comment les intégrines facilitent-elles l'action des facteurs de croissance au niveau du récepteur c'est inconnu. Par contre, la voie de FAK a été très bien étudiée. Les récepteurs des intégrines lors de la liaison aux intégrines vont stimuler l'autophosphorylation de FAK C'est qui active Src et la PI3K. L'activation des Src et PI3K par les intégrines n'est pas suffisant pour stimuler les cellules a rentrer en phase S. Les facteurs de croissance sont toujours requis.

3) Quelques intégrines comme la integrin alpha1beta1, alphaVbeta1, et alphaVbeta3, sont aussi capables d'activer la kinase Fyn qui appartient a la famille de Src. Fyn active la voie de MAP kinase à travers Shc. Pour cette raison les intégrines qui activent Fyn sont suffisantes pour stimuler la prolifération.

Mol Cell 2001 8(1):115, Mettouchi et al

## À rétenir

- Les CKI et la famille Rb constituent deux barrières importantes pour passer de G1 à S.
- Mécanisme d'action de facteurs de croissance
- Contrôle spécifique et contrôle globale de la transcription par les ERKs
- Mécanisme d'inactivation de la famille Rb par les FCs via ERKs (rôle de la cycline D)
- Le concept d'oncogene: src et myc
- Le mécanisme d'action de myc
- La voie de PI3K-AKT
- La régulation de la prolifération par les intégrins
- Rôle de FAK



## À venir

La phase S et le contrôle de la ré-réplication  
La transition G2-M  
Le cycle d'APC  
Le cycle cellulaire embryonnaire