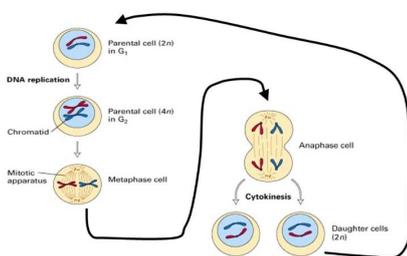




L  
A  
S

# CYCLE CELLULAIRE

## P'TITE INTRO POUR LES RAPPELS CLASSIQUES DU CYCLE



Le **cycle cellulaire** est :

- Un processus complexe
- Une **séquence** ordonnée d'événements
- Permet la **duplication** des chromosomes
- Une **copie** de chaque chromosome est **ségréguée** dans chaque cellule fille

« Le rêve d'une bactérie est de devenir deux bactéries »

François Jacob (prix Nobel français de biologie moléculaire)

→ Cellule **procaryote** (bactérie) devient 2 bactéries **par défaut** (condition : nécessaire pour manger) : la phrase s'applique aux procaryotes mais pas aux...

→ Cellule **eucaryote** (exemple : cellule du corps) ne se divise pas par défaut, mais c'est une réponse à une **signalisation**, un **ordre** pour devenir 2 cellules (division essentielle)

Ces événements associés à cette division cellulaire se regroupent au sein du **cycle cellulaire**.

Rôle : Une cellule parentale donne **2** cellules filles identiques

- 1) Initialement, une cellule eucaryote **diploïde** en phase G1, dont le nombre double de chromosome dit **2n**
- 2) Phase **S** (Synthèse) = phase de **réplication**
- 3) Après la phase S, les cellules contiennent **4n** de chromosomes et rentrent en phase **G2**
- 4) Phase de **division** qui sépare les chromosomes en **2** cellules filles au cours de l'**anaphase**
- 5) **Dernière** étape : **séparation** des cellules filles (avec les myosines de type II) qui contiennent **2n** chromosomes aboutissant à la **cytokinèse**

## I. CYCLE CELLULAIRE ET MUTANTS

### A. IDENTIFICATION DES MUTANTS DE PROGRESSION DU CYCLE CELLULAIRE

**Mutations conditionnelles** = Mutations dont l'effet **délétère** sur le cycle cellulaire ne s'exprimera que dans **certaines** conditions

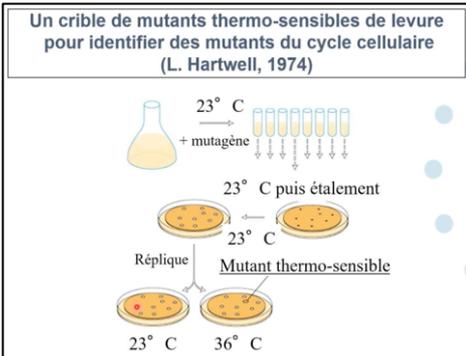
On peut garder ces cellules dans des conditions **favorables** pour qu'elles poussent normalement, mais on peut aussi étudier leur phénotype (lors du blocage cellulaire) en les mettant dans des conditions **moins** favorables.

MUTATIONS <u>THERMOSENSIBLES</u>	MUTATIONS <u>CRYOSENSIBLES</u>
Sensibles aux <b>hautes</b> températures	Sensibles aux <b>basses</b> températures

Température **permissible** : lorsque la mutation ne s'exprime **pas**, le phénotype est **sauvage** (= normal) ++

Température **non** permissible : lorsque la mutation **s'exprime**, le phénotype est **muté** ++

Partant de ce principe, ces mutations ont été identifiées et étudiées par un chercheur (Prix Nobel de médecine pour ces travaux dans les années 70, osef) dans des cellules de levures (cellules eucaryotes unicellulaire, qui ressemblent dans leur fonctionnement de base à nos cellules à nous).



**EXPÉRIENCE DE LI HARTWELL**

- 1) Il a fait pousser des levures à **23°C** en présence d'un mutagène pour **augmenter** le nombre de **mutation**
- 2) Il les a **étalés** pour avoir des colonies à 23°C (température permissive)
- 3) Il a fait des **répliques** de cette boîte sur une autre boîte à **36°C** (par un geste très simple)

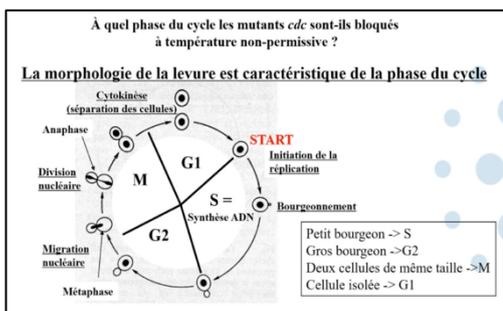
Ce qui est observé normalement : Les cellules poussent et forment des colonies aussi bien à **23°C** qu'à **36°C** (schéma)  
Ce qu'il a observé : Certaines colonies poussent à 23°C mais sont **absentes** de la boîte à **36°C** (événement rare)

**Explication et conclusion** : Par la présence d'un **mutant**, une partie de la colonie l'exprimant est incapable de se diviser lorsque les températures **s'élèvent**, c'est donc un mutant **thermosensible**. Ce chercheur a isolé une série de gènes (d'abord génétiquement, puis fonctionnellement), qu'il a appelé de manière générale : les **gènes CDC** (Cell Division Cycle).

B. ISOLEMENT DE SOUCHES MUTANTES DANS 32 GÈNES ESSENTIELS POUR LA PROGRESSION DE LA DIVISION CELLULAIRE = GÈNES CDC

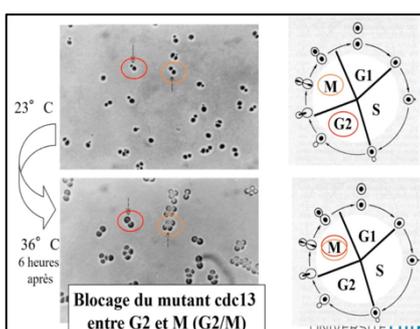
**QUESTION** : À quelle phase du cycle les mutants sont-ils bloqués, lorsqu'ils sont transférés à température non permissive ?

La **levure de boulanger** ou levure à **bourgeon** est un organisme cellulaire qui se divise de manière **asymétrique**, ce qui est particulièrement utile. Par l'inspection en microscopie de ces cellules, on peut savoir dans quelle **phase** du cycle cellulaire, les mutants se trouvent :



PHASE G1	La cellule fille isolée, va progressivement <b>émerger</b> .
PHASE S	<b>Progression</b> du bourgeon pour obtenir à la fin un <b>petit bourgeon</b>
PHASE M	Au début de la phase M, ce bourgeon va grandir pour donner <b>2 cellules filles</b> de même <b>taille</b> (environ)
PHASE G2	<b>Gros</b> bourgeon

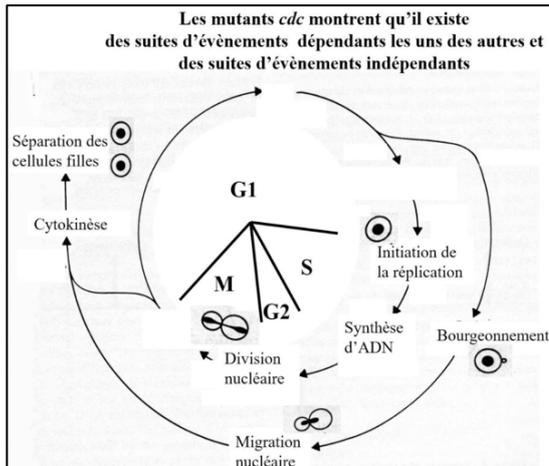
C. DÉTERMINATION MICROSCOPIQUE DES DIFFÉRENTES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE : EXEMPLE DU MUTANT CDC13



À TEMPÉRATURE <b>PERMISSIVE</b>	Division <b>normale</b> des cellules (différentes phases du cycle)
À TEMPÉRATURE <b>NON PERMISSIVE</b> (présence de mutations)	😊 En phase <b>M</b> , la cellule est capable de <b>compléter</b> le cycle cellulaire (4 cellules)
	😞 En phase <b>G2</b> , la cellule est <b>bloquée</b> (peu progressée), car elle ne peut <b>pas</b> continuer le cycle cellulaire à cause de la <b>mutation CDC13</b>

**++ Le gène CDC13 intervient dans la transition G2/M ++**

NB : C'est juste un exemple montrant comment les chercheurs ont progressé dans la compréhension des gènes essentiels pour le cycle cellulaire.



Grâce à des analyses génétiques qui se sont complexifiées en combinant des mutants, on sait qu'il existe des séries d'évènements qui **dépendent** les uns des autres :

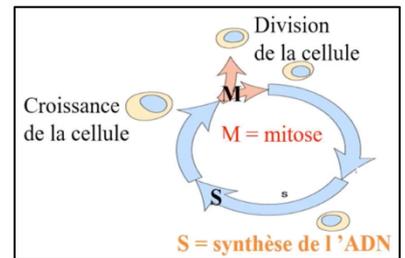
- La mitose implique que la synthèse de l'ADN soit complètement effectuée
- La synthèse de l'ADN implique que l'initiation de la réplication soit finie

Dans une série d'évènements, ils dépendent des uns et des autres. Certains évènements peuvent être **découplés** les uns des autres, passant par exemple de la phase G1 (en début de synthèse) directement à la migration cellulaire.

**II. POINTS DE CONTRÔLES (CHECKPOINT)**

La **succession d'évènements** au cours du cycle cellulaire implique un **contrôle** de qualité qui vérifie que l'étape précédente est bien **terminée**, ce sont :  
 → **POINTS DE CONTRÔLE = CHECKPOINT**

Exemple : Vérification de l'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale, surveillance de la quantité de nourriture présente, interaction avec les molécules de signalisation...

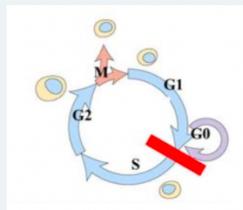


**A. DIFFÉRENTS POINTS DE CONTRÔLES DU CYCLE**

1) CHECKPOINT G1/S

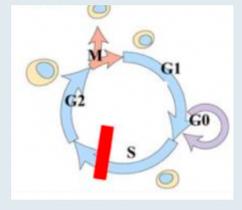
Contrôles :

- **Taille** des cellules
- **Nourriture**
- **Signalisation**
- **Dommmages** à l'ADN



2) CHECKPOINT INTRA-S

→ S'active s'il y a un **blocage** de la réplication. Ce n'est pas un blocage forcément définitif : si le dommage n'est pas trop important, il peut être **réparé**  
 → **Endommagements** de l'ADN



3) CHECKPOINT G2/M

Contrôles :

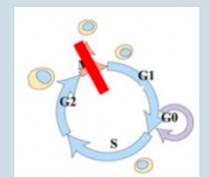
- Activation de **MPF**
- **Complétion** de la réplication
- **Taille** des cellules
- **Endommagement** de l'ADN



4) CHECKPOINT MITOTIQUE

Contrôles :

- **APC-CDC20** contrôlés par **Macl2**
- **Attachement** des chromosomes au fuseau

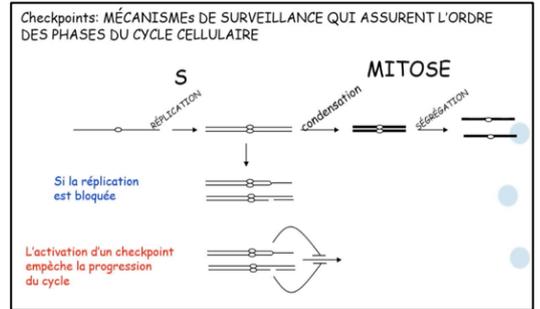


B. UNIVERSALITÉS DES CHECKPOINTS

Ce mécanisme de surveillance peut être étudié **génétiquement** (différentes phases du cycle cellulaire).

Imaginez que pendant la réplication, un accident est lieu (comme blocage de la réplication, manque de polymérase, ADN endommagée...)

Immédiatement, la cellule normale réagit en **activant** un **checkpoint** (ici 13) qui va **bloquer** la **progression** de la réplication.



Cellule humaine exposée à des radiations ionisantes (RI)

	Lésion/Gy	Lésion/2Gy (radiothérapie)
Lésion des bases	2000	4000
Coupure simple-brin	100	200
Coupure double-brin	20	40

Ordre de grandeur du nombre de lésions :

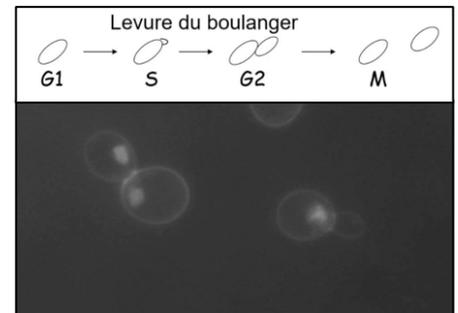
- 4000 lésions de base
- 200 coupures simple brun
- 40 coupures double bruns

Les endommagements les **plus dangereux** de l'ADN sont les coupures **double brins** mais elles sont **minoritaires** (car les plus difficiles à réparer sans créer d'autres dommages).

Observations au microscope et expériences

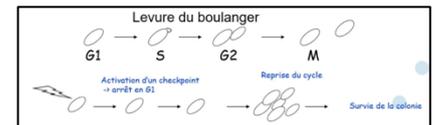
Expérimentalement, si on prend une levure (exemple : levure de boulanger à petit bourgeon avec une division asymétrique), on peut distinguer les cellules :

- En phase **S**
- En phase **G2**
- En phase **M**



1) IRRADIATION D'UNE CELLULE NORMALE SAUVAGE

- 1) Irradiation des cellules en **G1**
- 2) Cellule **non** capable de **répliquer** son ADN à cause des **dommages**
- 3) Si l'irradiation n'est pas trop importante, au bout d'un certain temps, la cellule va **reprendre** le cycle et les colonies vont **survivre**



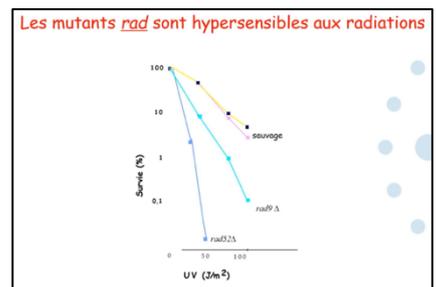
RAPPEL :

Pour étudier un phénomène cellulaire, on fait souvent appel à la génétique, ici on utilise un type de mutants.

**Mutations rad** = Mutations qui rendent **hypersensibles** les levures aux **radiations**

Graphique : Survie des cellules en fonction de la dose irradiée

- Cellules **irradiées** : ne reprennent **pas**
- **Mutants** (exemple rad 52, rad 9) : cellules encore **+ sensibles** aux radiations

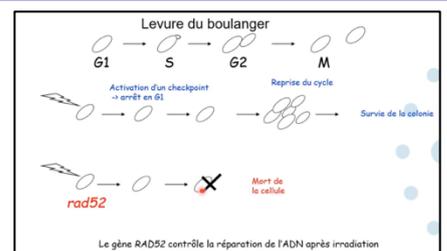


2) IRRADIATION D'UNE CELLULE QUI PORTE UNE MUTATION DE SENSIBILITÉ DE RADIATION AU **rad52**

La cellule **mutée** (irradiée en G1) **arrête** son cycle grâce à son **checkpoint actif** puisqu'il détecte les dommages (la mutation). La cellule va **mourir** et elle est **incapable** de réparer les dommages.

Cette expérience montre que le produit du **rad52** n'est **pas** impliqué dans le **checkpoint** (car toujours fonctionnel).

- Le rad52 **contrôle** une protéine impliquée dans la **réparation** (dommage non réparé) et **non** dans le **checkpoint**.

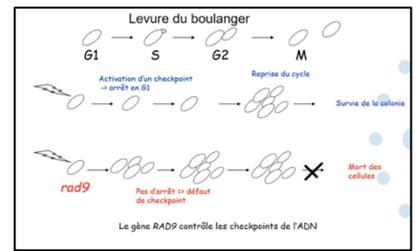


3) IRRADIATION D'UNE CELLULE QUI PORTE UNE MUTATION DE SENSIBILITÉ DE RADIATION AU rad9

La cellule **mutée** (irradiée en G1) commence à se **diviser** tout de suite et continue à se diviser même en **présence de dommages**.

Elle forme une **microcolonie** (contrairement à rad52) : les cellules de la colonie vont progressivement mourir à cause des dommages et des **excès de défauts** de l'ADN.

→ Le **rad9** intervient dans le **checkpoint** car lorsqu'il est muté, il n'est plus capable de faire son rôle : arrêter le cycle cellulaire lors de dommages de la cellule



Ces découvertes ont permis :

→ Faire toute une série d'expériences

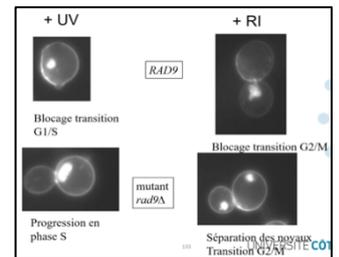
→ Varier le type de dommages

→ Regarder si ces mutants sont : soit mutants généraux pour différents types de dommages, soit mutants spécialisés dans un certain type de dommages

Quel que soit le « donneur de dommages », comme des radiations UV ou des ionisantes, le même gène rad9 (à son état non muté) au cours d'un checkpoint est capable d'induire :

→ Un blocage de la transition G1/S

→ Un blocage de la transition G2/M



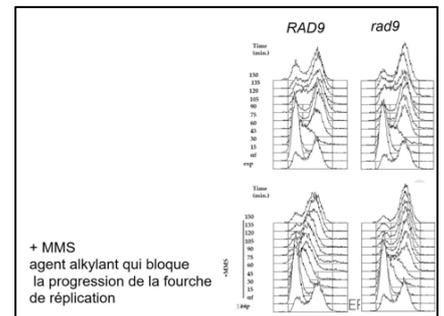
4) TRAITEMENT D'UNE CELLULE QUI PORTE DES AGENTS CHIMIQUES DE MMF

Autre source de dommages : Agents **chimiques** comme des agents **alkylants** qui vont **endommager** l'ADN

Exemple d'agents alkylants : **MMF** (Méthyl Méthane Sulfonate)

Rôle des agents alkylants : **Bloquer** la progression de la **souche**

On va suivre le destin de cellules sauvages, de levures sauvage et mutées pour **rad9** qui ont été traitées au **MMF**.



RÉSULTATS DE LA CYRTOMÉTRIE DE FLUX POUR ANALYSER LE CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES TRAITÉES AU MMF

→ Cellules sauvages : Très fortement **bloquées** en **G1**, puis lorsqu'elles sont **réparées**, elles vont **continuer** leur cycle cellulaire. Elles repartent toutes en mêmes temps : ce sont des cellules **synchronisées**.

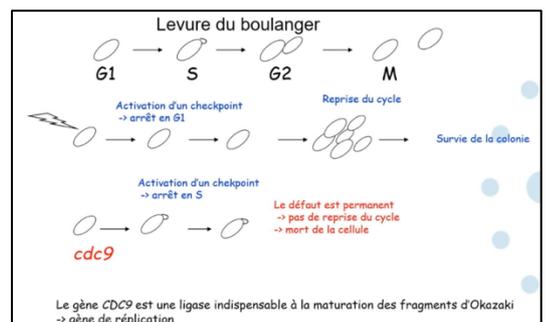
→ Cellules mutées rad9 : **Non** bloquée en G1, elle finit le cycle et **meurt** (à cause de ses dommages)

5) TRAITEMENT NON PERMISSIVE D'UNE CELLULE QUI PORTE UNE MUTATION CDC9

Les chercheurs ont pris des mutants du cycle cellulaire (exemple : cdc9) sans irradier les cellules, en passant le mutant cdc9 à température non permissive.

Gène cdc9 (à l'état sauvage) : Ligase indispensable à la réplication et à la **maturation** des fragments **d'Okazaki**, gène de réplication

En **présence** du mutant cdc9, la cellule s'**arrête en phase S**.



Explication : ce mutant empêche cdc9 d'avoir son rôle indispensable. Donc, la réplication est **imparfaite**. Les défauts sont détectés au cours du checkpoint entraînant l'arrêt (non lié à une irradiation exogène ici).

? QUESTION : Est-ce que c'est le même qu'avec les radiations cdc9 ?

Expérience : Par une étude d'**épistasie** (interaction entre deux gènes ou plus), **couplage** de 2 mutations ensemble (dans la même cellule) : **cdc9 + rad9**

But : Voir si rad9 est aussi un checkpoint repérant un défaut mitotique créé par une mutation endogène (oui)

Conclusion :

→ La cellule ne reconnaît pas le dommage quand cdc 9 et rad9 sont mutés, elle ne s'arrête pas en phase S, mais prolifère jusqu'à former une microcolonie puis finit par mourir.

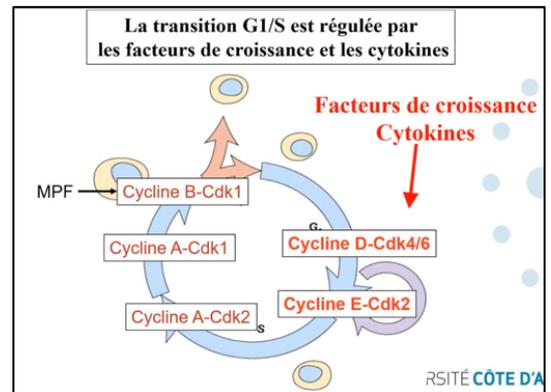
→ Ces mécanismes de checkpoint (exemple : cdc9) sont **universels** quel que soit le type de **dommage** ou type de **transition**, « c'est vraiment le cœur de la fonction des cellules ».

### III. TRANSITION G1/S

D'un point de vue fonctionnel dans nos cellules eucaryotes, la transition G1/S est la transition la **plus** importante car elle détermine si la cellule **peut** se diviser ou pas.

Au cours de cette transition, la cellule reçoit des **ordres** par des **molécules de signalisation** (facteurs de croissance, cytokines...) pour être capable de prendre des « grandes décisions ». Ces ordres activent toute une **cascade** d'événements qui permettent à la cellule de prendre la **décision** de franchir la transition G1/S.

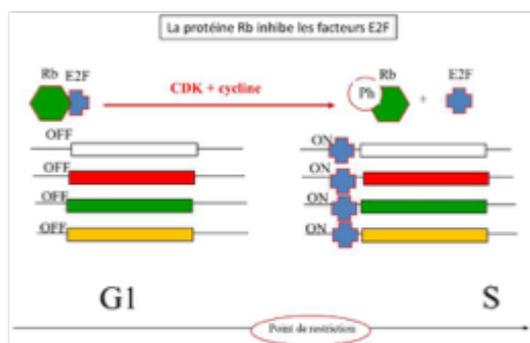
Pour entrer en phase **S**, il faut activer la transcription des gènes qui sont indispensables à la réplication.



**RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION**

Pendant la phase **G1**, l'expression des gènes polymérase, ligases, hélicases... est **réprimée**. Mais il faut que ces gènes soient **ON** pour débiter la phase **S** et permettre la réplication de la cellule.

Cible de la transition G1/S : **Contrôle** de l'expression de ces **gènes** impliqués dans le mécanisme de la **régulation** de la transition G1/S ++



Fiche d'identité de la famille de E2F

**Rôle** : Entraîner l'expression des gènes permettant d'enclencher la phase S et d'**activer** la transcription (des gènes, ceux de la régulation de la transcription)

⚠ E2F en est capable que quand il est **actif** et **fonctionnel**

**Lieu d'action** : **Fixation** sur le **promoteur** (cf. biomol) de ces gènes

**Raison de l'inactivité** : due à la liaison avec la **protéine Rb** (RétinoBlastoma) lors du cycle cellulaire (donc notamment en phase **G1**) qui a une action de **séquestration** de E2F **sauf** en phase **S**

**But** : Rendre la famille E2F active

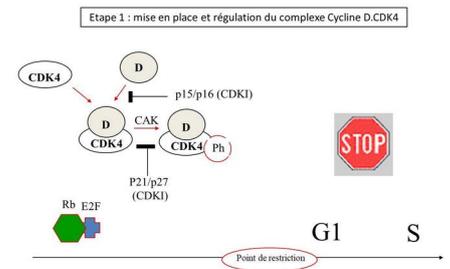
**Comment ?** : **Phosphorylation** de Rb par CDK + cycline

A. 1<sup>ÈRE</sup> ÉTAPE : MISE EN PLACE ET RÉGULATION DU COMPLEXE CYCLINE D-CDK4

→ En début de G1, des ordres sont donnés pour mettre en jeu notamment le couple **Cycline D-cdk4 ++**

Plusieurs étapes :

- **Fixation** de la cycline D à cdk4 (assemblage)
- Formation d'un **hétérodimère**  
→ **NON actif** : Formation NON suffisante pour que le couple fonctionne par lui-même
- Activation d'une autre kinase = **CAK** qui va se charger de **phosphoryler Cdk 4**
- Cycline D + Cdk 4 phosphorylé  
→ Complexe **ACTIF** : Il va agir comme une kinase.

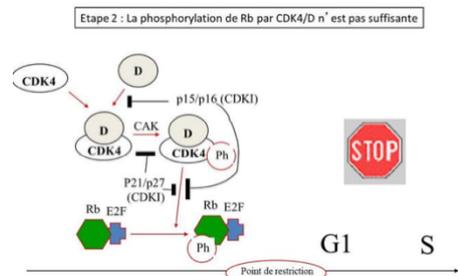


« Pédales de frein » = **Cdki** (petites protéines ayant chacune leur cible) à la réalisation de cette étape :

- Petites protéines : **p15, p16, p21, p27...** (protéine de 15 000 / 16 000... Dalton)
- En fonction du contexte cellulaire, on peut avoir besoin de **ralentir** le cycle cellulaire pour **limiter** la division, et dans ce cas-là, j'appuie sur des **pédales de frein** en exprimant le produit de ces gènes (p15, p16) qui vont **inhiber** différentes étapes d'activation (formation du complexe cycline D-cdk4, activation par CAK, phosphorylation du Rb...). Certains limiteurs de cdk peuvent agir à **plusieurs** niveaux.

B. 2<sup>ÈME</sup> ÉTAPE : PHOSPHORYLATION DE RB PAR CDK4/D

Une fois active, cdk4 va phosphoryler Rb mais cette première phosphorylation de Rb n'est **pas suffisante ++**, même si elle est **nécessaire ++** pour activer la transition G1/S.



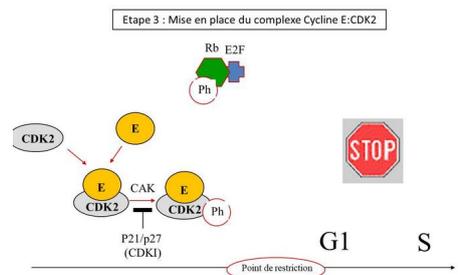
C. 3<sup>ÈME</sup> ÉTAPE : MISE EN PLACE DU COMPLEXE CYCLINE E/CDK2

→ Entrée en jeu du couple **Cycline E-cdk2 ++**

On retrouve le même schéma que précédemment :

- **Formation** du couple (NON actif)
- **Cak** active cdk2 par phosphorylation (actif)

Même **pédale de frein** : p21/p27 (= cdk) qui inhibe cak

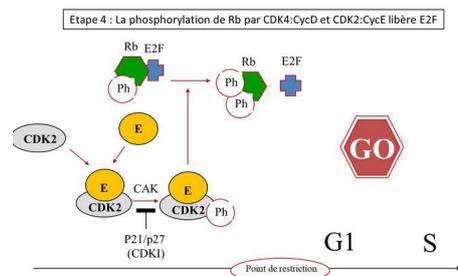


⚠ On a successivement (et non simultanément) l'intervention de :

- Cycline D-cdk4
- Cycline E-cdk2

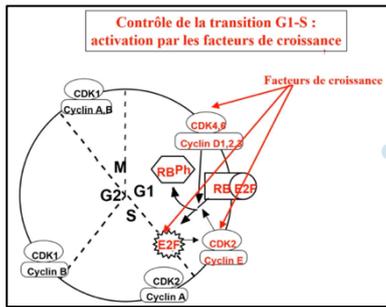
D. 4<sup>ÈME</sup> ÉTAPE : PHOSPHORYLATION DE RB PAR CYCLINE E/CDK2

Deuxième vague de phosphorylation de Rb réalisée par le couple **cycline E-cdk2** conduisant à une **hyperphosphorylation** de Rb. Elle est **suffisante** (et par logique, elle est aussi **nécessaire ++**)



**++ E2F est libéré** (de sa liaison avec Rb qui perd sa capacité à l'inhiber par cette double phosphorylation) et capable d'**activer la transcription** des gènes de réplication **++**

E. SCHEMA RÉCAPITULATIF DU CYCLE CELLULAIRE



FACTEURS DE CROISSANCE

Si on replace l'ensemble de ces réactions sur le cycle cellulaire, ce n'est que la reprise exactement de ce que l'on a dit : l'action successive de ces 2 couples cycline/cdk, dont l'activation est sous la dépendance de facteur de croissance (comme cdk, E2F...), a pour but de libérer E2F pour la transcription des gènes de la phase S.

SIGNALISATION	
Pédale d'accélération	Pédale de frein
Les signaux en amont sont les <b>facteurs de croissance</b> , ils sont des signaux <b>activateurs</b>	Elle est activée en amont par des facteurs de <b>transcription</b> (ETS) ou d'autres <b>inhibiteurs</b> (BMI-1) qui sont des facteurs de <b>régulation</b> de l'homéostasie cellulaire. Ce sont ces FT qui intègrent de nombreux signaux <b>endogènes</b> ou <b>exogènes</b> et déterminent si la cellule se divise ou pas. Ces signaux agissent sur :
	<p style="text-align: center;"><b>Inhibition par p16</b> <b>Inhibition par p53/p21</b></p> <p>Rôle : action sur les <b>2</b> couples p21 est sous <b>dépendance</b> du gène <b>p53</b> p21 =, directement activé par p53 (quand p53 est activé, il active p21) p21 = <b>pédale</b> de frein</p>

IV. P53 ET LES CANCERS

A. P53, UNE PROTÉINE « CÉLÈBRE »

+ Fiche d'identité de p53 +

p53 :

- Protéine centrale nommée **intégrateur** car son activation permet l'intégration de beaucoup de signaux venant de **l'extérieur**
- **Facteur de transcription** avec beaucoup de gènes sous sa dépendance, **gène suppresseur de tumeur**, grand centre d'intégration de l'information dans la cellule

Rôle : Entraîner l'expression d'un grand nombre de gène que p53 a sous sa **dépendance**

Activable par / Sous la dépendance de nombreux signaux : un **stress cellulaire** (quel qu'il soit, on a une activation de p53), par exemple :

- **Téломères** non fonctionnels
- Endommagements à l'ADN par des agents **génétoxiques** (qui endommagent l'ADN)
- Signaux prolifératifs **supra physiologiques** résultent généralement de l'activation d'oncogènes
- **Facteurs métaboliques** comme des dépressions en nucléotides

→ Autant de situations ou la cellule n'a pas envie de se diviser. P53 est activé de différentes façons, de nombreux mécanismes moléculaires aboutissent à son activation.

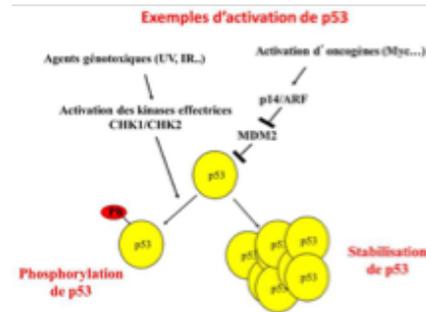
p53 activée est capable d'activer des gènes qui vont activer :

- Sénescence cellulaire : vont faire vieillir
- Cellules qui vont faire un arrêt transitoire le temps de se réparer et de repartir
- Cellules qui vont contribuer à la répartition de l'ADN s'il y a endommagement
- En cas de dommages trop importants, p53 active des gènes pro-apoptotiques (la cellule fait l'apoptose)
- Cellules qui peuvent entrainer dans certains cas une différenciation cellulaire et un arrêt du cycle

Il existe 2 grandes voies d'activation de p53

PAR MODIFICATION POST-TRADUCTIONNELLE DE P53

- 1) Des agents **généotoxiques** (UV, RX...) activent à travers une cascade d'événements 2 couples de kinases effectrices : **chk1/chk2**.
- 2) Les kinases activent vont **phosphoryler** (très utilisée comme méthode) **p53** par des cascades de phosphorylation (non évoquées).
- 3) p53 activée joue un rôle de **facteur de transcription**.



C'est un exemple d'accélération en inhibant les inhibiteurs

PAR MODIFICATION DE LA QUANTITÉ DE P53

But : ↑ la quantité de p53

- 1) **Activation de p14** à la suite d'une activation **anormale** (sur-activation / supra physiologiques) de gènes (des **oncogènes** comme la protéine **Myc**) qui poussent la cellule vers un cancer
- 2) p14 est une pédale de frein capable d'**inhiber l'inhibiteur** de p53 (aka **MDM2**)
- 3) MDM2 inhibé, p14 **active indirectement** p53 et permet sa stabilisation de sa quantité

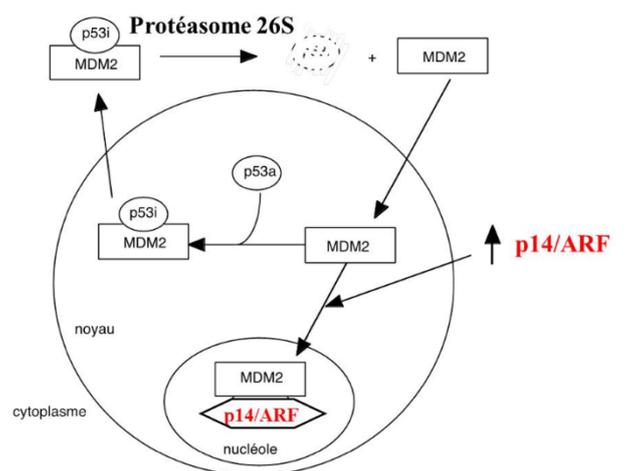
Fiche d'identité de MDM2

**MDM2** : Protéine **inhibitrice** de **p53**

Rôle : **Navette** entre le noyau et le cytoplasme

- 1) p53 est synthétisée dans la cellule et on la retrouve au niveau du noyau
- 2) Liaison entre p53 et MDM2 dans le nucléoplasme
- 3) MDM2 liée à p53 est capable d'exporter p53 du noyau **vers le cytoplasme** en passant par le port cellulaire
- 4) MDM2, une fois dans le cytoplasme, entraine p53 dans le **protéasome 26S** (usine à dégradation des protéine)
- 5) P53 est **dégradée**, p53 peut être synthétiser mais sa concentration est faible
- 6) MDM2 retourne dans le noyau et ainsi de suite

**L'inhibition de p53 par MDM2 est abolie par p14/ARF**



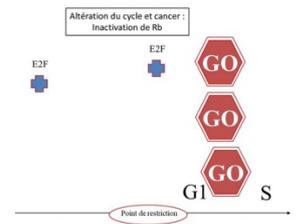
EN CAS DE SIGNAL ONCOLOGIQUE

- 1) Entrée en jeu de **p14/ARF**
  - 2) **Fixation** de p14/ARF à **MDM2** pour l'empêcher de dégrader p53
  - 3) P14 va entrainer MDM2 dans le **nucléole** et entraine sa **séquestration** dans le nucléole **l'empêchant** d'agir sur p53 (même si le nucléole ne présente pas de membrane)
  - 4) P53 n'est **pas dégradé** (car pas amené dans le protéasome) et donc la concentration de p53 **augmente** donc arrêt du cycle cellulaire
- p53 devient stabilisé, il peut agir comme FT et entrainer de la sénescence, apoptose...

B. ALTÉRATION ET PATHOLOGIES

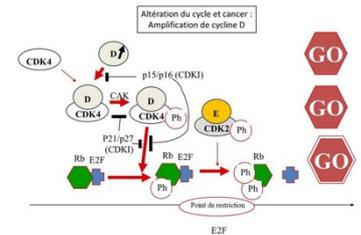
INACTIVATION DE RB

Tous ces mécanismes peuvent être **altérés** au cours du processus **cancéreux**, en agissant à différents niveaux. Par exemple, un certain nombre de cancers vont **inactiver Rb**. Rb est un « **gène suppresseur de tumeurs** » ++ : c'est-à-dire quand son **absence**, on favorise le cancer. Lorsque Rb est **muté**, il **n'inhibe** plus **E2F**, ce qui provoque une **hyperactivation** du cycle et E2F s'active de manière inopinée.



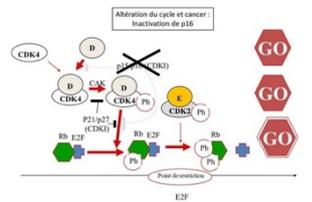
AMPLIFICATION DE CYCLINE D

Dans certains cancers, la **cycline D** peut être **amplifiée**, ce qui favorise l'**activation** du cycle cellulaire et joue le rôle d'une **pédale d'accélération** trop utilisée.



INACTIVATION DE P16

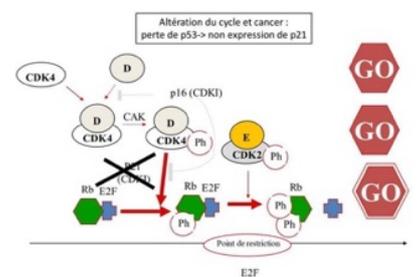
Dans de nombreux cancers, on peut **inhiber** la pédale de **frein** comme **p16** et donc aller plus vite.



NON-EXPRESSION DE P21 OU PERTE DE P53

**Perte de p53** et donc perte de la capacité à pouvoir **appuyer** sur la pédale de **frein**, **p21** ne s'exprime donc plus. Les **réplications** sont trop **nombreuses**.

**p53** est tellement important pour contrôler l'homéostasie cellulaire, que p53 **mutée** est impliquée dans à peu près la **moitié de tous les cancers** (peu importe l'origine) chez l'homme ++



V. RÉGULATION DE LA RÉPLICATION

A. LA VITESSE DE RÉPLICATION ET LES ORIGINES

Quelques ordres de grandeur sur :

- La vitesse de réplication
- Les origines de réplifications

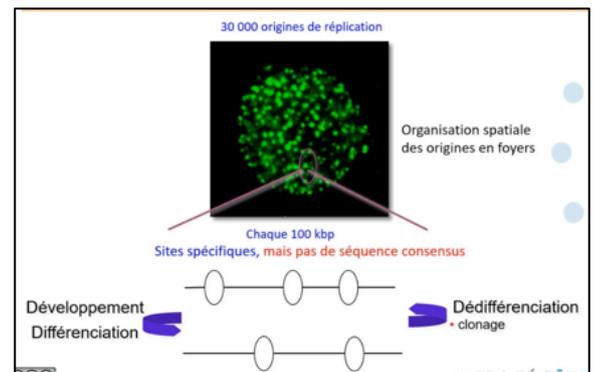
	Genome	Taille	vitesse	Durée	Origines	Commentaire
	<b>E. coli</b>	4.6 Mbp	60 kb/min	40 min	1	Compatible avec durée du cycle
	<b>Levure</b>	14 Mbp (1 cm)	3 kb/min	20 min	330	La réplication durerait 40 heures avec 1 origine 1 culture = 4.10 <sup>10</sup> cellules --> 400 000 km ADN synthétisé (Distance terre-lune)
	<b>Human</b>	3 Gbp (2 m)	3 kb/min	7 h	30 000	La réplication durerait une année avec une origine 2.10 <sup>13</sup> km ADN synthétisé (2 années lumières) pendant notre vie (10 <sup>16</sup> cycles cellulaires)

BACTERIE ESCHERICHIA COLI ( E. Coli)	→ <b>Petit</b> génome <b>procaryotique</b> → <b>Vitesse</b> de réplication : <b>60 000 bases</b> environ par <b>minute</b> → <b>Réplication totale</b> du génome de <b>40 minutes</b> avec une origine de réplication → C'est une bactérie qui va se <b>diviser</b> entre <b>30 minutes</b> à <b>1h</b>
--------------------------------------	--

LEVURE	<p>→ Organisme <b>unicellulaire</b> mais <b>eucaryote ++</b></p> <p>→ ADN structuré de manière plus complexe : avec une chromatine <b>plus condensée</b> que celle des bactéries</p> <p>→ <u>Vitesse</u> de réplication <b>moins</b> importante : environ <b>3 000 paires de bases par minute</b></p> <p>→ Génome très important : nécessité d'avoir <b>plusieurs origines</b> de réplication. Il existe un équilibre entre le nombre d'origines, la taille du génome et la vitesse de réplication</p> <p>→ <u>Réplication</u> de l'ADN : environ <b>20 minutes</b></p> <p>N.B. : Si une seule origine de réplication dans le génome de la levure existait, la réplication serait de 40 heures (non compatible avec la vie de la cellule)</p> <p>→ Sur 1L de culture de levure, <math>4 \cdot 10^{10}</math> cellules donnent 400 000 km d'ADN synthétiser (soit la distance Terre-Lune)</p>
HOMME	<p>→ Génome encore <b>plus grand</b></p> <p>→ Structure de la chromatine qui <b>ressemble</b> beaucoup à celle de la <b>levure</b></p> <p>→ <u>Vitesse</u> de réplication : environ <b>3 000 paires de bases par minute</b></p> <p>→ <u>Division</u> du génome en phase S en <b>7 heures</b></p> <p>→ Beaucoup <b>plus d'origines</b></p> <p>N.B. : Si on avait qu'une seule origine de réplication, il faudrait environ 50 ans pour faire un bébé. Le nombre d'origines est très important pour que le temps de division de la cellule soit compatible avec le vie</p>

B. ASPECTS CELLULAIRES DE LA RÉPLICATION

La **localisation** des origines de réplifications (30 000 dans le noyau de la cellule humaine) est mise en évidence en les visualisant par **fluorescence**. Les origines se regroupent en **foyer** : on peut les étudier d'un point de vue moléculaire.



La réplication ne s'initie **pas** au **hasard ++**. Savoir quel ordre reçoit les chromosomes pour démarrer leur réplication (à tel endroit) est quelque chose qui n'est pas complètement connu.

LEVURE	<p>Les séquences d'ADN qui constituent les origines sont <b>spécifiques</b>, on parle de séquences <b>consensus</b>. À partir d'une séquence du génome, il est possible de reconnaître une séquence agissant comme origine de réplication.</p>
HOMME	<p>Au fur et à mesure du développement, la différenciation n'utilise pas toujours les mêmes origines. Ces origines ne sont <b>pas déterminées</b> de manière stricte par l'ADN et elles peuvent <b>changer</b> au cours du <b>développement</b> et de la <b>différenciation</b>.</p> <p>☹️ <b>PROBLÈME</b> : Pour le génome humain, on ne sait pas trouver les séquences d'origine car on ne trouve aucune séquence typique, particulière (consensus) permettant de les reconnaître en tant que tel.</p> <p>Il est tout de même possible de <b>cartographier</b> ses origines (localisation).</p> <p>Il y avoir d'autres déterminants plus compliqués, au niveau de la structure de la chromatine qui les détermine.</p>

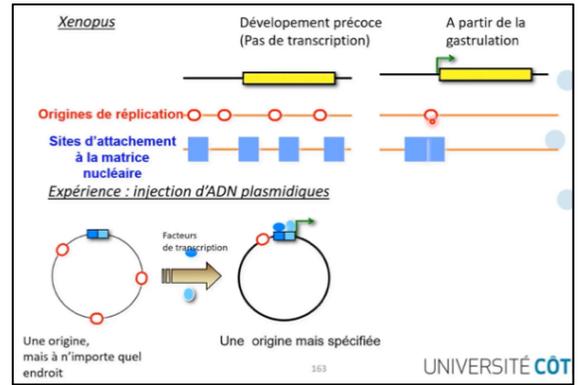
La détermination des origines de réplication n'est **pas** un phénomène **génétique** (ancré dans l'ADN) mais un **phénomène épigénétique ++**

**N.B.** : Par exemple, lors de différenciation du clonage ou de la reprogrammation des cellules, il y a une modification de la localisation des origines de réplication.

C. ORIGINES DE RÉPLICATIONS RÉGULÉES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT

EXEMPLE : Cartographie des origines de réplication chez le crapaud *Xenopus* pour étudier le développement précoce

- La transition n'a pas de transcription qui commence à partir de la...
- L'étape de la gastrulation qui correspond à :
  - Un changement très profond de la structure de la chromatine / chromosome
  - Un changement du choix des origines de réplication et de l'attachement à la matrice nucléaire (squelette fibreux qui donne sa structure aux chromosomes à l'intérieur du noyau)



**EXPÉRIENCE** : Injection d'ADN plasmidiques

Ce déterminisme épigénétique des origines peut être mimé à travers des expériences



Conditions : On prend une petite séquence d'ADN fabriquée en laboratoire sur laquelle on place une origine (qui provient d'une cellule). Puis, on place cet ADN (avec l'origine) dans une cellule



But : Observer l'activité de cette origine



Résultats : Plusieurs origines s'activent peu importe la séquence de l'ADN

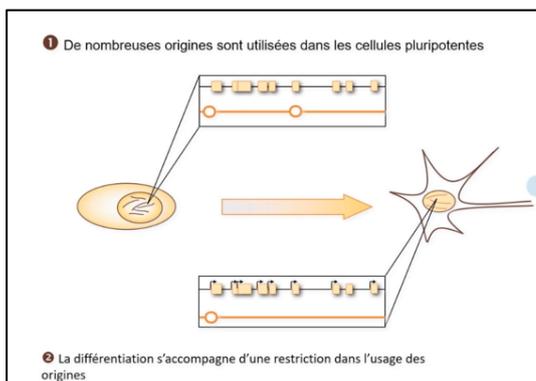


Conditions : On prend l'ADN que l'on met en présence d'un facteur de transcription



Résultats : Ce FT est capable de se fixer sur un site précis de l'ADN (boîte bleue sur le schéma). Ici, on force la transcription de l'ADN à un endroit précis (localisation de la transcription).

→ La transcription va déterminer la localisation épigénétique de ces origines de réplication au cours du développement.



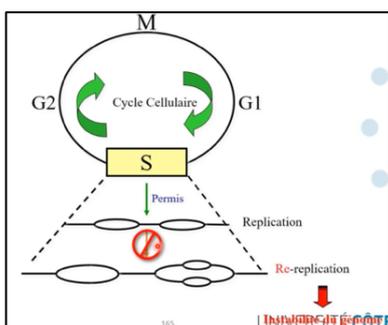
Origines de réplication :

De nombreuses origines sont utilisées dans les cellules **pluripotentes**. La différenciation s'accompagne généralement d'une **restriction** en fonction des **âges** des origines.

Coordination entre :

- Le **nombre de divisions** qu'on effectue ; de l'œuf jusqu'à l'organisme adulte
- La **différenciation** qui se produit de manière **concomitante**, couplage direct entre la différenciation et la façon dont les cellules se répliquent

D. « PERMIS DE RÉPLIQUER » UNE FOIS



Le permis de répliquer une fois et une seule fois est important ++

Si au cours du même cycle cellulaire, la réplication est **initiée plusieurs** fois, des **problèmes de stabilité** du génome vont survenir. Ce qui veut dire qu'il existe un mécanisme qui fait qu'une fois une origine activée au cours de la phase S, elle ne peut **pas** s'activer une **deuxième** fois.

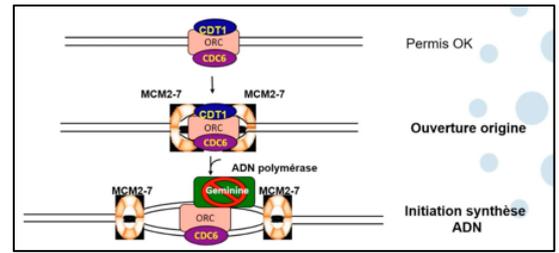
S'il y avait un problème de **re-réplication**, on aurait un **excès d'ADN** qui va se recombinaison et former des **mutations**. Pour éviter cette instabilité du génome, il existe un mécanisme qui empêche cette re-réplication :

**Permis de répliquer**

**FACTEUR DONNANT LE « PERMIS DE RÉPLIQUER »**

Imaginez que vous êtes une séquence d'ADN en phase G1, en sachant que cette séquence à été déterminée (génétiquement ou épigénétiquement en fonction des organismes) à un endroit donné du génome.

Plusieurs étapes se succèdent :



- 1) **Fixation** du complexe **ORC** (Origine Replication Complex) : ce complexe est essentiel pour la mise ne place de la **machinerie de répliation**
- 2) Arrivée de **CDT1** (protéine) : elle est **recrutée** par la protéine **ORC** (dans la future origine de répliation). CDT1 est importante pour recruter des acteurs essentiels de la répliation aka les **hélicases**
- 3) Ce facteur (CDT1) agit avec une protéine = **CDC6**

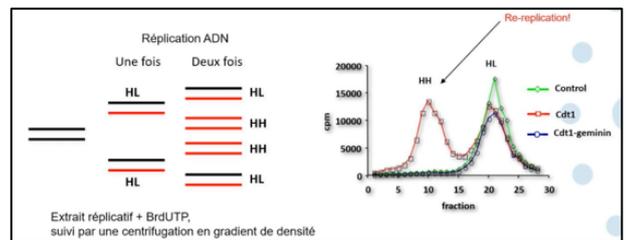
ORC + CDT1 + CDC6 : permettent la répliation  
Si on reçoit les signaux, on peut faire la transition G1/S

- 4) **Assemblément** d'un ensemble d'hélicases de répliation : protéines **MCM2 jusqu'à MCM7**.  
**Hélicases** = enzymes capables de **déréguler** l'ADN, ce qui est essentiel pour initier la répliation
- 5) **Ouverture** de l'origine puis les hélicases commencent leur voyage pour former les 2 fourches de répliation (bidirectionnelles)
- 6) Arrivée du **gémimine** (à la suite du voyage) = protéine capable d'**inhiber CDC1**
- 7) **CDC1** (rappel : nécessaire pour la répliation) **part**  
→ Sans CDC1, la **re-répliation est impossible**

**EXCÈS DE CDCT1 INDUIT UNE RE-RÉPLICATION**

Condition expérimentale : On donne un **excès** de **CDT1** à la cellule  
Résultat : On **empêche l'inhibition** de CDT1 car l'excès de CDT1 est dominant son l'inhibition par la gémimine

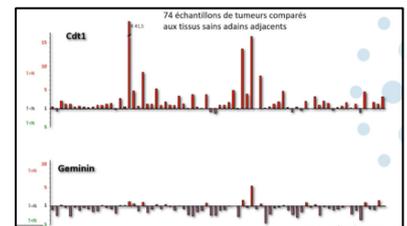
Par des techniques d'études de la répliation in vitro, on peut montrer qu'un **excès** de **CDT1** va entrainer un **excès** de **répliation**. On peut le mesurer par l'apparition de brins qu'on appelle « lourd-lourd » en mettant un précurseur de nucléotides, qui confère une densité plus importante à l'ADN.



**CDT1 SUREXPRIMÉ DANS DES CANCERS COLORECTAUX**

Ce mécanisme se passe aussi dans des **cancers humains**, où ce phénomène est utilisé par les cellules **cancéreuses**. Une étude a été faite dans des cancers **colorectaux**, sur des tumeurs humaines.

On s'aperçoit que cet excès de CDT1 qui entraine une **instabilité génétique** de répliation est utilisé par les cellules **tumorales**. C'est ce qui leur confère leur **caractère tumoral**. À l'inverse, l'**expression** de l'inhibiteur **gémimine** à plutôt tendance à être **réduite**.



**P'TITES DÉDIS :**

Pas de dédi aux changements de cours

Je sais que c'est relou, mais vous connaissez une partie déjà du cours donc pour l'apprendre ça sera plus facile ! En plus, avec les nouvelles expériences de la fiche, on comprend mieux pourquoi Gigi peut vous mettre des questions d'expériences sur des expériences que vous connaissez **déjà** (donc il faut bien les comprendre :)). N'hésitez pas à me dire si vous voulez que je change de mise en page pour la fiche car vous n'aimez pas trop et à me prévenir si des détails sont manquants (ouspi 😊). Et oui, parfois j'ai laissé des explications un peu plus complète que la ronéo, mais c'est pour mieux comprendre, ce ne sont pas des détails qui servent à rien, bon courage !