



LE CYCLE CELLULAIRE

Coucouuuuu les P1 <33 J'espère que vous allez avoir un aussi grand sourire en lisant cette fiche que le mien en la faisant !! N'hésitez pas à prendre du repos après les journées de la TTR et à l'apprendre quelque temps après pour l'EB1 ;)

Vous verrez que ce cours est assez ludique, surtout qu'on aborde certains mécanismes dans des pathologies (et ça c'est super intéressant)... trêve de blabla et c'est parti!!!! (PS : vous l'aurez bien compris, mes commentaires seront sous cette forme)



I. RÉGULATION DU CYCLE CELLULAIRE

Un jour, François Jacob (qui a reçu un prix Nobel français en biologie moléculaire) a dit :

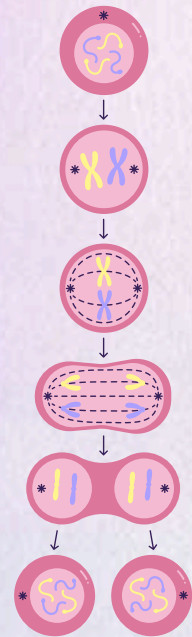
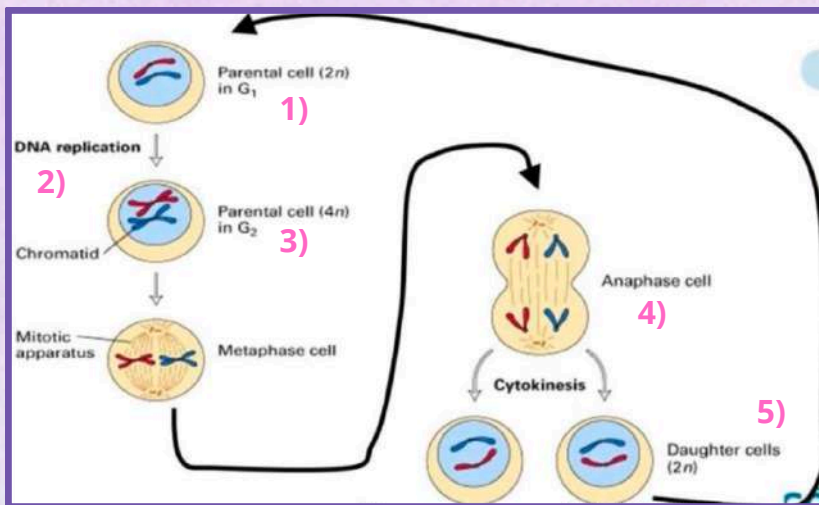
“ Le rêve d’une bactérie est de devenir deux bactéries. ”

→ Pour les **procaryotes** (bactéries...) : deviennent 2 par **défaut**.

→ Pour les **eucaryotes** (nos cellules...) : deviennent 2 à condition de recevoir un **ordre/signalisation**.

Ces évènements qui sont associés à cette division cellulaire s'appellent : le **CYCLE CELLULAIRE**. Le but est qu'**une cellule parentale** donne **deux cellules filles** identiques. 🚩🚩

(si l'emoji 🚩 est présent alors cela veut dire que c'est une notion qui est déjà tombée à l'examen classant)
DONC HYPER IMPORTANT +++++



1) On part d'**une cellule eucaryote diploïde** en phase **G1** = nombre double de chromosomes dit **2n**.

→ 1 paire de chr à 1 chromatide

2) La phase **S** (synthèse) = phase de **réplication**.

3) La cellule de départ donne **des cellules** en phase **G2** qui ont **4n** chromosomes.

→ 1 paire de chr à deux chromatides

4) La phase de **division** correspond à la séparation des chromosomes en **deux cellules filles** (en anaphase ; cf. mitose).

5) Finalement : **séparation** des cellules filles (avec les myosites de type II ; cf. cytosquelette) qui contiennent à partir de maintenant **2n** chromosomes, aboutissant à la cytokinèse.

TUT' RAPPELLES :

- *diploïde car les chromosomes sont en PAIRES (1 venant de la mère et 1 venant du père) ;*
- *la notion de "2n" ou "4n" fait plutôt référence à la quantité d'ADN qui sera dupliqué en phase S qu'au nombre de chromosomes qui reste en réalité le même (et heureusement...).*

Le **cycle cellulaire** est :

- ♥ une séquence ordonnée d'évènements ;
- ♥ les chromosomes sont dupliqués ;
- ♥ une copie de chaque chromosome est ségréguée dans chaque cellule fille.

C'est donc un **processus complexe** dont il est essentiel de connaître les mécanismes, pour comprendre son fonctionnement et ses dysfonctionnements dans les pathologies.

A. Identification des mutants de progressions du cycle cellulaire

On cherche des **mutations conditionnelles**, c'est-à-dire des mutations dont **l'effet délétère** sur le cycle cellulaire ne s'exprime que dans **certaines conditions**.

- conditions favorables : les cellules **poussent** normalement.
- conditions moins favorables : possibilité d'étudier leur **phénotype** lors du **blocage cellulaire**.

MUTATIONS THERMOSENSIBLES

sensibilité aux **hautes** températures

MUTATIONS CRYOSENSIBLES

sensibilité aux **basses** températures

- température **permissive** : phénotype **SAUVAGE** (aka normal) donc la mutation ne s'exprime **pas**.
- (permissive comme PERMETTRE donc elle permet de laisser la cellule effectuer ses tâches normalement)
- température **non permissive** : phénotype **MUTÉ** donc la mutation s'exprime.

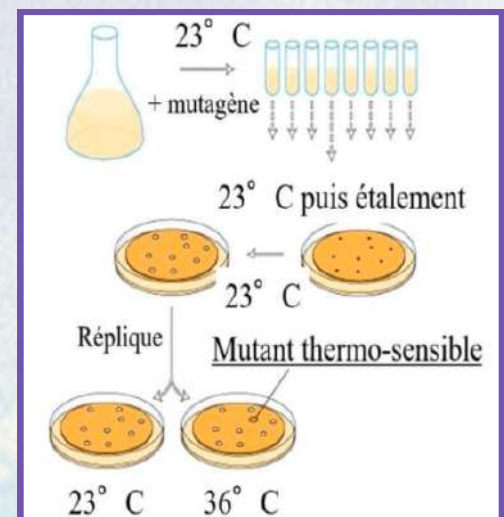
Partant de ce principe, ces mutations ont été identifiées et étudiées par un chercheur dans des cellules de levures qui sont des cellules eucaryotes unicellulaires. (leurs mécanismes sont donc semblables aux nôtres)

→ La partie de la colonie exprimant la mutation thermosensible est INCAPABLE de se diviser lorsque la température s'élève = **mutants thermosensibles**.

“ Un crible de mutants thermo-sensibles de levure pour identifier des mutants du cycle cellulaire (L. Hartwell, 1974) ”

Expérience de Li Hartwell :

- Il a fait pousser des levures à **23°C** avec un **mutagène** pour augmenter le nombre de mutations
- Il les a étalées pour avoir des colonies à **23°C** (= température permissive)
- Il a fait des répliques de la boîte de **23°C** sur une autre boîte MAIS cette fois-ci à **36°C**



Observations de l'expérience de Li Hartwell :

- EN TEMPS NORMAL : les cellules poussent et forment des colonies aussi bien à 23°C qu'à 36°C
- AVEC LE MUTAGÈNE : certaines des colonies poussent à 23°C mais sont **absentes** à 36°C

TUT' LOGIQUE:

- on a des mutants thermo-sensibles DONC quand la température est trop haute, ces petites cellules ne se divisent plus ;
- la température permissive est de 23°C et 36°C >>> 23°C donc forcément y'a plus ces cellules exprimant cette mutation.

AINSI : cette incapacité de division lors de hautes températures est dûe aux MUTANTS THERMOSENSIBLES !

Ce chercheur a ensuite isolé toute une série de gènes (d'abord génétiquement, puis fonctionnellement). Il les a appelés les **GÈNES CDC (Cell Division Cycle)**.

B. Isolement des souches mutantes dans 32 gènes essentiels pour la progression de la division cellulaire = gène CDC

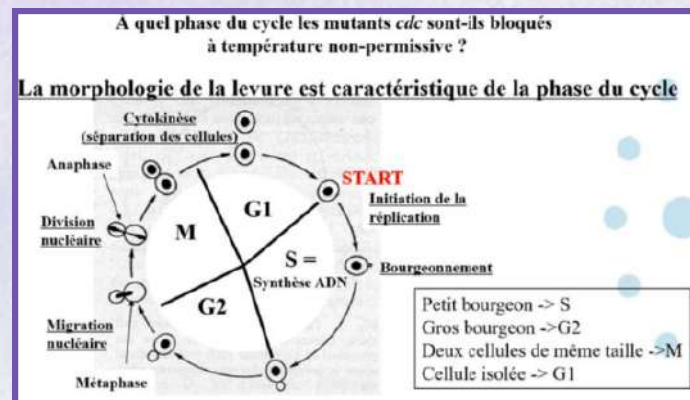
On a vu que les cellules ne forment plus de colonies/ne se divisent plus.

On va alors se demander à quelle phase du cycle, plus précisément, ces mutants CDC sont bloqués à température non permissive. (eh oui toujours plus en biocell mais une fois compris vous allez voir tout va s'éclaircir)

L'utilisation de la levure de boulanger (= levure à bourgeon) est ici particulièrement utile, puisque c'est un organisme cellulaire qui se divise de manière **asymétrique**. Par l'inspection en microscopie de ces cellules, on peut savoir dans quelle phase du cycle cellulaire elle se trouve :

TUT' EXPLICATION : une division asymétrique signifie qu'à chaque phase de la division cellulaire, on va avoir un aspect différent pour la cellule au microscope. Donc si c'est différent, on va pouvoir savoir si elle est en G1, S...

PHASE G1	la cellule fille isolée va progressivement émerger
PHASE S	progression du petit bourgeon pour arriver à la fin de la phase S à un petit bourgeon
PHASE G2	gros bourgeon
PHASE M	au début de la mitose, le bourgeon grandit pour donner deux cellules filles de même taille



TUT' EXPLICATION :

Maintenant on va aborder un tas d'expériences (pour votre plus grand plaisir) et là je souhaitais juste vous expliquer les appellations parce qu'en P1 j'étais restée un peu hébétée pour aucune raison mdr :

Vous allez voir qu'on parle de "mutant X" (ex : mutant CDC13...), ça veut dire que le gène X a subi une mutation.

Or, vous savez grâce à vos cours de biomol qu'un gène code pour une protéine, et cette protéine a des fonctions précises dans la cellule.

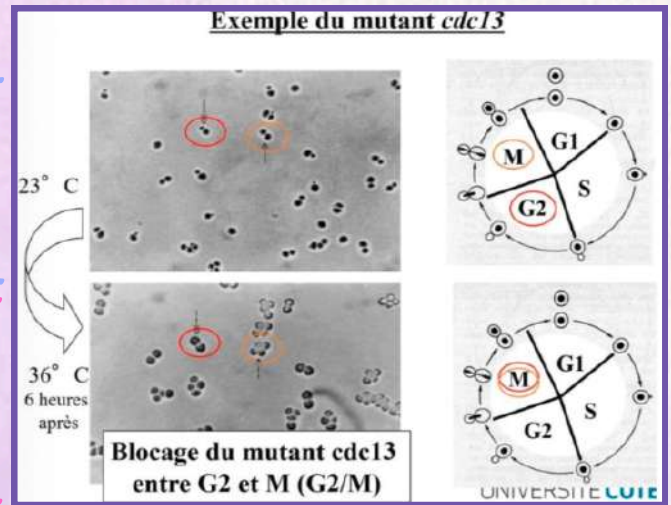
Ainsi, si le gène est muté (avec les différentes méthodes qu'on va décrire dans ce cours comme les radiations ou les températures non permissives), la protéine produite devient défectueuse ou non fonctionnelle.

Résultat : la cellule perd la fonction normalement assurée par cette protéine.

C. Détermination microscopique de différentes phases du cycle cellulaire : exemple du mutant CDC13

TEMPÉRATURE **PERMISSIVE** : les cellules se divisent dans des phases différentes du cycle.

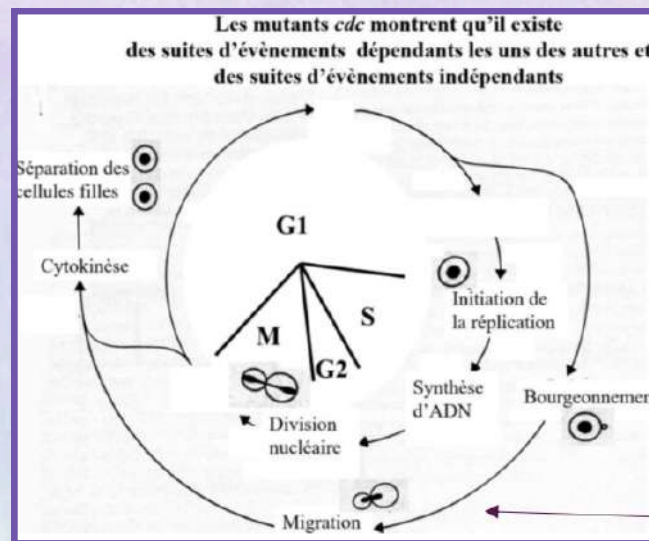
TEMPÉRATURE **NON PERMISSIVE** (donc avec mutations) : on va avoir des différences selon les phases qu'on va détailler.



- La cellule en **phase M** : (en orange sur la diapo du Saint Gigi) → capable de **compléter** le cycle cellulaire (comme on peut le voir avec la présence de 4 cellules)
- La cellule en **phase G2** : (en rouge sur la diapo du Saint Gigi) → faible progression car reste **bloquée** : elle ne peut **pas** faire le cycle cellulaire.

→ CONCLUSION : le moment du cycle cellulaire qui nécessite le produit du gène CDC13 est la TRANSITION G2/M

→ LE GÈNE CDC13 INTERVIENT DANS LA TRANSITION G2/M.



Par des analyses génétiques qui se sont complexifiées en combinant différents mutants, ils ont montré qu'il existe toute une série d'évènements qui dépendent des uns et des autres, comme par exemple :

- la **mitose** implique que la synthèse de l'ADN a été complètement effectuée au préalable ;
- la **synthèse de l'ADN** implique que l'initiation de la réplication a été faite ;

Il y a donc une série d'évènements qui dépend des uns des autres. Certains évènements peuvent être découplés les uns des autres, passant par exemple de la phase G1 directement à la migration cellulaire.

II. LES POINTS DE CONTRÔLES = CHECKPOINT

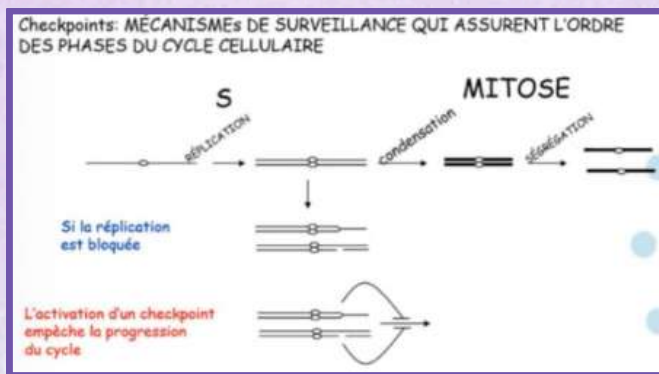
Les **checkpoints** vérifient que les étapes sont bien terminées. Ce sont des **contrôles de qualité** avant de passer "à l'étape suivante".

À titre d'exemple : alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale, surveillance de la qualité de nourriture présente, interaction avec les molécules de signalisation...



A. Universalité des checkpoints

→ Ce mécanisme de surveillance peut être étudié génétiquement : exemple des différentes phases du cycle cellulaire.



Mais imaginez un instant que pendant toute cette véritable usine cellulaire il y ait un accident de parcours lors de la réplication (ex : blocage de la réplication, manque de polymérase, ADN endommagé...).

La cellule va immédiatement le **détecter** et va **agir** en conséquence : elle va **activer un CHECKPOINT** (dans ce cas précis, le checkpoint 113) qui va **BLOQUER LA PROGRESSION DE LA RÉPLICATION** (dans le but de limiter les erreurs).

Pour avoir un ordre d'idées (par cellule et par jour) :

- 4000 lésions de bases
- 200 coupures simple brin
- 40 coupures double brin

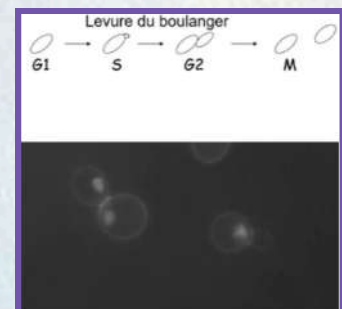
→ Pour les endommagements de l'ADN, **les plus dangereux sont les coupures doubles brins** : elles sont minoritaires mais les plus dangereuses car difficiles à réparer sans créer d'autres dommages.

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

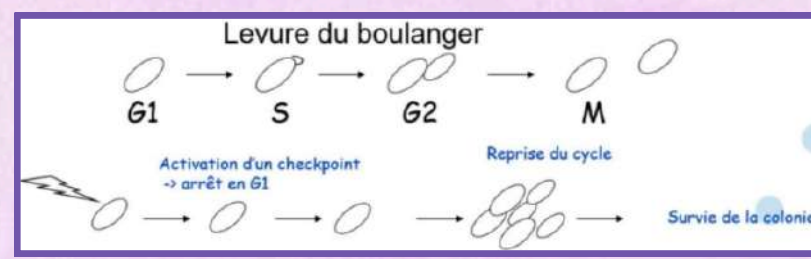
Expérimentalement, si on prend une levure (ex : levure de boulanger à petit bourgeon avec une division asymétrique), on peut distinguer :

- ° les cellules en **phase S**
- ° les cellules en **G2**
- ° les cellules en **phase M**



(En vrai vous n'êtes pas obligés (à mon sens) de scruter chaque image au mm près mais regardez les toutes au moins à la première lecture)

IRRADIATION D'UNE CELLULE NORMALE SAUVAGE



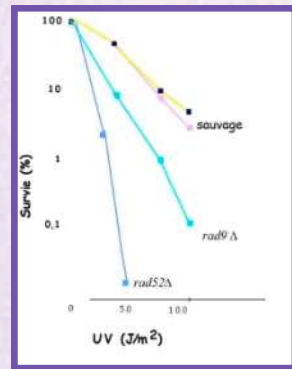
Rappel : pour étudier un phénomène cellulaire on fait souvent appel à la génétique. Ici, cela a été fait avec un autre type de mutant.

→ On irradie les cellules en **G1**, et on va voir que la cellule **ne va pas pouvoir répliquer son ADN parce qu'elle a beaucoup de dommages**. Donc la réplication ne peut pas se faire.
 → Si l'irradiation n'est pas trop importante, au bout d'un certain temps la cellule va **reprendre le cycle et des colonies vont survivre**. (*elles dead ça quand même*)

Les mutations vont rendre ces levures **hypersensibles aux radiations** : c'est ce qu'on appelle les **mutations rad**.

Le graphique montre la survie des cellules en fonction de la dose d'irradiation :

- les cellules irradiées ne reprennent pas
- les mutants (ex : RAD52, RAD9) : les cellules vont être encore plus sensibles aux radiations. (*d'où le fait que la courbe de RAD52 ou RAD9 se retrouve nettement plus bas pour une même dose d'irradiation*)



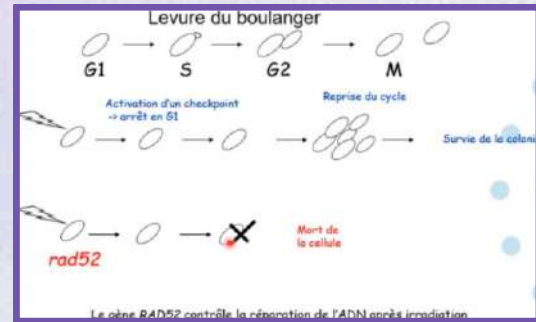
IRRADIATION D'UNE CELLULE QUI PORTE UNE MUTATION DE SENSIBILITÉ DE RADIATION AU RAD52

La cellule s'arrête : on voit au microscope qu'elle va mourir. Donc son **checkpoint est actif**.

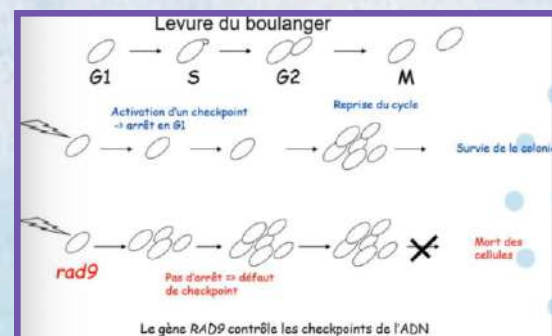
(*En effet, le checkpoint a pour rôle de surveiller que tout va bien ET SI ÇA VA MAL BAM la cellule va tout stopper pour se préserver*)

Cela signifie que le **produit du RAD52 n'est pas impliqué dans le checkpoint** (vu que la cellule meurt). En revanche, comme elle meurt, elle est **incapable de réparer les dommages**.

🎯 Donc, le **rad52 contrôle une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN après radiation et non dans le checkpoint**.



IRRADIATION D'UNE CELLULE QUI PORTE UNE MUTATION DE SENSIBILITÉ DE RADIATION AU RAD9



On fait la même expérience en irradiant en **G1**. Ce qu'on voit est totalement différent. On s'aperçoit que la **cellule commence à se diviser tout de suite** et elle continue à se diviser même en présence de **dommages**.

Elle fait donc une microcolonie (à la différence de rad52). La cellule va **se diviser en présence de dommages et entraîner encore plus de défauts de l'ADN**. Cela devient insupportable pour la cellule, qui va **mourir par excès de dommages**.

Ainsi, il y a une **mutation rad9 qui intervient dans le checkpoint**.

TUT' RÉPÉTITION

- si après radiation la cellule meurt direct, alors le checkpoint est actif → le gène radX n'est pas impliqué dans le checkpoint ;
- si après radiation la cellule continue sa petite vie puis finit par mourir MAIS parce qu'elle va "trop" mal alors le checkpoint n'est pas actif puisqu'il n'a pas arrêté la cellule avant qu'elle meurt de dommages → le gène radX contrôle le checkpoint vue qu'il est ici défaillant suite à la radiation.

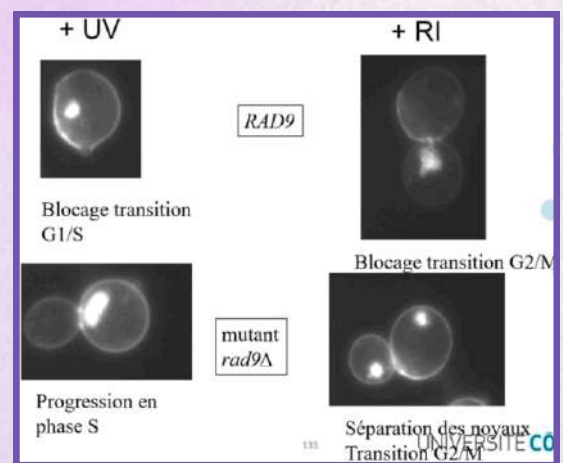
Ces découvertes ont permis de faire toute une série d'expériences et de **VARIER le TYPE de DOMMAGES** et de regarder si ces mutants sont :

- mutants **GÉNÉRAUX** pour différents types de dommages.
- mutants **SPÉCIALISÉS** dans un certain type de dommages.

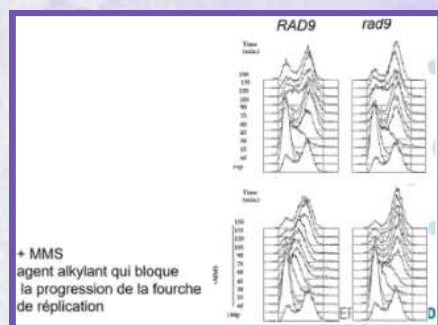
Par exemple : en comparant des radiations UV et des radiations ionisantes.

On s'aperçoit que quelque soit le "donneur de dommages", le même **gène rad9** (checkpoint comme vu plus haut) est capable d'induire :

- un **blocage de la transition G1/S**
- un **blocage de la transition G2/M**



TRAITEMENT D'UNE CELLULE QUI PORTE DES AGENTS CHIMIQUES DE MME



On peut faire varier la source de dommages : par des **agents chimiques** qui vont **endommager l'ADN**. Notamment des agents alkylants, comme le MMF (méthyl méthane sulfonate) qui va lui-même va **bloquer la progression de la fourche**.

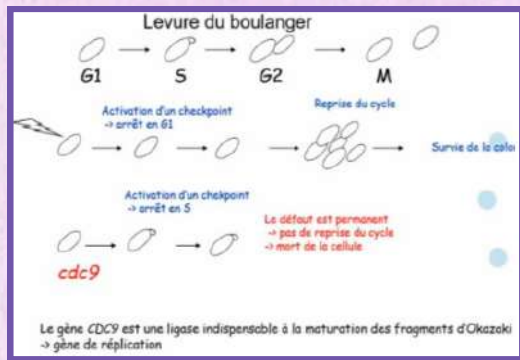
On va suivre le destin de cellules qui ont été traitées au MMF dans :

- une cellule de levure sauvage
- une cellule mutée pour rad9

Résultats de la cryométrie de flux pour analyser le cycle cellulaire des cellules traitées au MMF :

- Cellules **sauvages** : très fortement **bloquées en G1**, puis le temps de se **réparer** elles vont progressivement repartir dans le cycle. On dit qu'elles sont **synchronisées** : c'est-à-dire qu'elles repartent toutes en même temps.
- Mutants rad9** : la cellule ne va **pas être bloquée en G1**. Elle va traverser le cycle et **mourir** après.

TEMPÉRATURE NON PERMISSIVE D'UNE CELLULE QUI PORTE UNE MUTATION CDC9



Les chercheurs ont pris des mutants du cycle cellulaire (ex : CDC9) sans irradier les cellules, en passant le mutant **CDC9 à température non permissive.**

Un mutant CDC9 **va arrêter la cellule en phase S** car le produit gène CDC9 (ligase ; cf. biomol) est un **mutant** qui est indispensable à la **réplication** et notamment à la **maturation des fragments d'Okazaki**. C'est un gène de **réplication**. Cette fois-ci il n'y a pas d'irradiation exogène mais un phénomène **endogène** : une réplication imparfaite qui va activer un **checkpoint**.

Mais est-ce que cela va de même pour des radiations CDC9 (exogène) ?

Pour cela, les chercheurs ont fait une étude d'épistasie : ils ont couplé les 2 mutations ensemble (dans la même cellule) = CDC9 + RAD9 afin de voir si **RAD9 est aussi un checkpoint d'un défaut mitotique crée par une mutation endogène.**

La réponse est **❄️ OUI ❄️** : la cellule ne reconnaît pas le dommage. Plutôt que de s'arrêter en phase S, la cellule va proliférer, faire une microcolonie et mourir.

🔴🔴🔴🔴 Ces mécanismes de checkpoint (ex : CDC9) sont universels, quel que soit le type de dommage ou de type de transition 🔴🔴🔴🔴
 ("c'est vraiment le coeur de la fonction des cellules")

B. Les différents points de contrôle du cycle

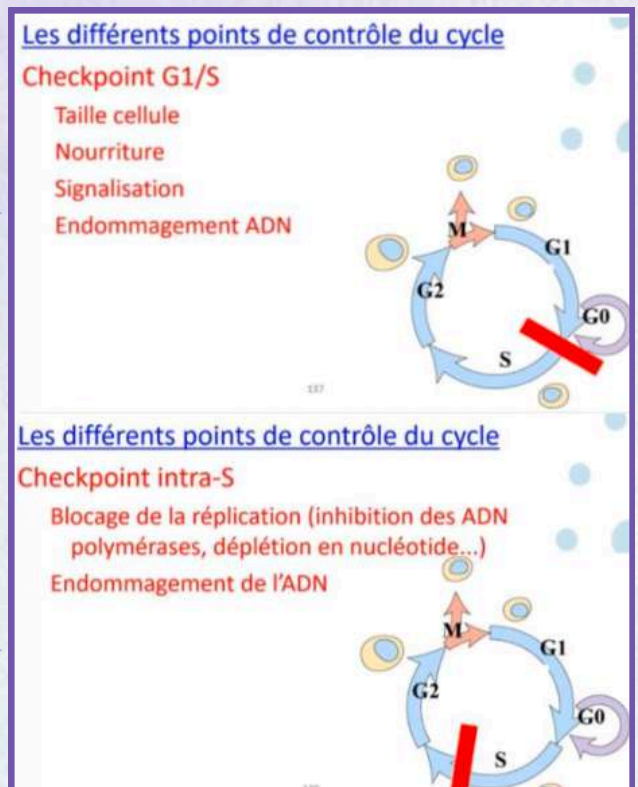
"Je me répète mais c'est tellement important."

Checkpoint G1/S qui contrôle :

- la taille des cellules
- la nourriture
- la signalisation
- les dommages de l'ADN

Checkpoint intra-S qui s'active :

- s'il y a un blocage de réplication (ce n'est pas forcément un blocage définitif ; s'il n'y a pas trop de dommages, on peut réparer la réplication)
- endommagement de l'ADN



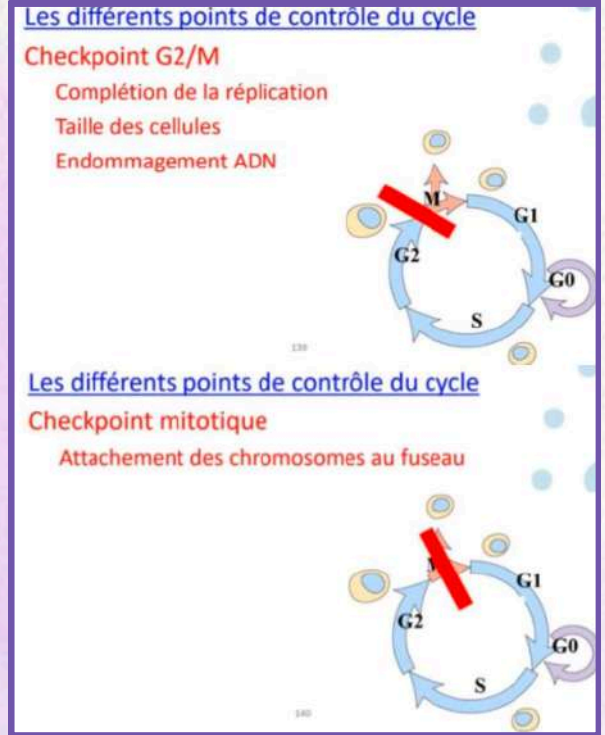
(Vous allez comprendre toutes ses abréviations qui, à priori, ont l'air barbares avec la suite des cours so don't worry) (ouais petit teaser comme ça oklm)

Checkpoint G2/M :

- activation de MPF
- complétion de la réplication
- taille des cellules
- endommagement de l'ADN

Checkpoint mitotique :

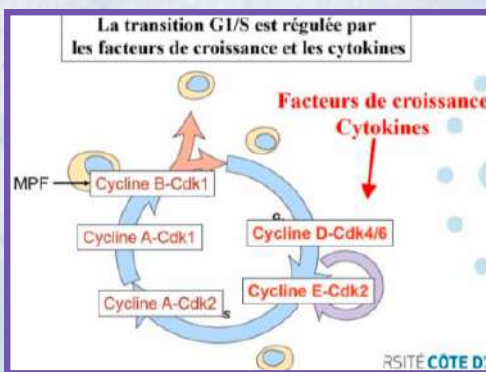
- ACP-CDC20 contrôlé par MAD2
- attachement des chromosomes au fuseau



♥ TABLEAU RECAAAAP LA TEAM

gène CDC13	transition G2/M
checkpoint 113	progression de la réplication
gène rad52	protéine impliquée dans la réparation de l'ADN
gène rad9	checkpoints (blocage transitions G1/S et G2/M) + défaut mitotique
gène CDC9	protéine pour la réplication (ligase)

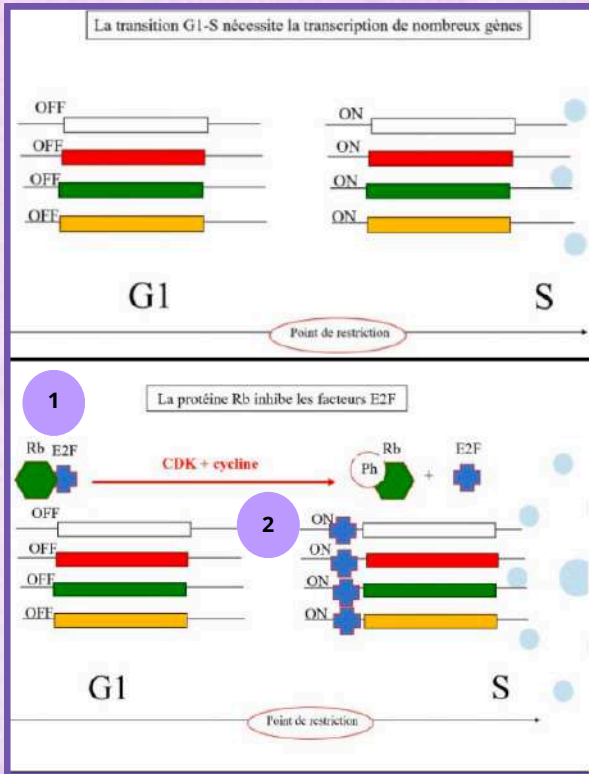
III. TRANSITION G1/S



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

C'est à ce moment que les "grandes décisions", qui sont **dépendantes de la présence d'ordres** que reçoit la cellule à travers des **molécules de signalisation** (facteurs de croissance, cytokines...). Ces mêmes molécules vont activer toute une cascade d'évènements permettant à la cellule de prendre la décision de franchir cette transition G1/S. Ainsi, pour rentrer en phase S, il faut activer la transcription des gènes indispensables à la réplication.

No worries on voit ça juste après ;)



→ **Régulation de la transcription :**

L'expression de ces gènes (polymérase, ligase, hélicase...) est **réprimée** pendant la phase **G1**. Puis, en **début de phase S**, ces mêmes gènes vont être **activés "ON"**, ce qui va faire que **la cellule peut se répliquer**.

Donc le **contrôle de l'expression de ces gènes** est la cible de ces mécanismes de **régulation de la transition G1/S**.

→ **Facteurs de transcription : famille E2F**

La **famille E2F ++** sont des **facteurs de transcription** qui sont spécialisés pour **activer les gènes de la réplication**.

Une fois que les gènes E2F sont "ON", E2F va se **fixer sur le promoteur** et **activer la transcription de ces gènes** (cf. biomol).

Dans la phase **G1**, le **E2F** existe dans la cellule mais **ne peut pas se fixer**. On dit qu'il est **séquestré** par une **protéine du rétinoblastome (= protéine Rb)** qui l'empêche de la fixer.

Pour libérer notre E2F et l'activer, la **phosphorylation de Rb par le complexe CDK + cycline est nécessaire**.

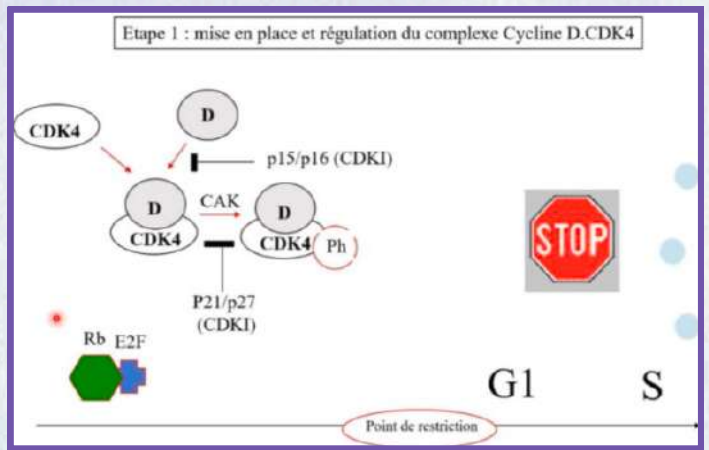
TUT SIMPLIFICATION :

- 1 Avant la réplication, on a pas besoin de E2F donc il est inactif grâce à sa séquestration par Rb.
- 2 La cellule veut rentrer en phase S donc elle doit phosphoryler Rb. Mais pourquoi ?? Tout simplement parce que ça va faire en sorte que Rb relâche E2F et ce fameux E2F va pouvoir se fixer au promoteur pour continuer tout ce qu'elle doit faire.

A. Les étapes de la transition G1/S

Étape 1 : mise en place et régulation du complexe cycline D/CDK4

- 1 : début de **G1** donc la cellule commence à recevoir des ordres pour se diviser qui vont agir sur les complexes **cycline/CDK** (hétérodimère).
- 2 : le premier complexe cycline/CDK à être activé est le complexe **cycline D/CDK4**
- 3 : pour que l'activité kinase du complexe devienne active, il faut réunir **deux** conditions :
 - l'assemblage des deux protéines ;
 - production de cycline D qui doit interagir avec CDK4.



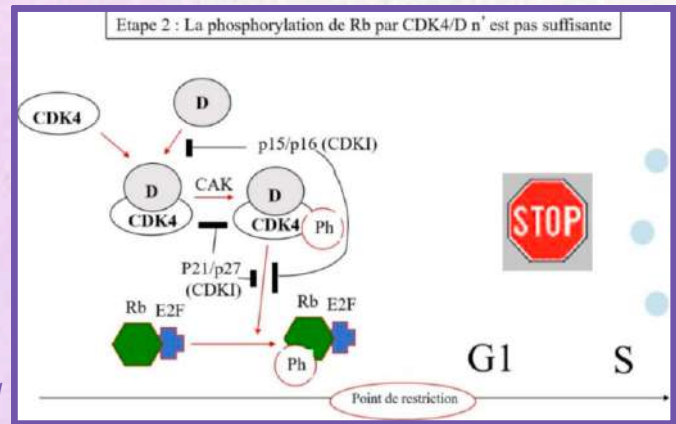
Étape 2 : la phosphorylation de Rb par CDK4/D n'est pas suffisante...

1 : une fois **l'interaction** du **complexe** faite, il doit être **phosphorylé** par une autre kinase : la kinase **CAK** qui va **activer le complexe cycline/CDK4**.

2 : le complexe devient alors actif donc il va pouvoir **phosphoryler la protéine Rb**.

TUTOR CULTURE G parce que why not : sur le schéma on voit plusieurs protéines (p15, p16, p21) et ça veut tout simplement dire :

- p pour protéine ;
 - le numéro correspond à l'équivalent de leur masse moléculaire en kDa
- Et CAK signifie Cycline Activating Kinase si ça vous aide pour retenir.



3 : ces protéines sont des **CDKI** (I pour inhibiteurs donc c'est des **inhibiteurs de CDK**) donc elles agissent comme des **pédales de frein**.

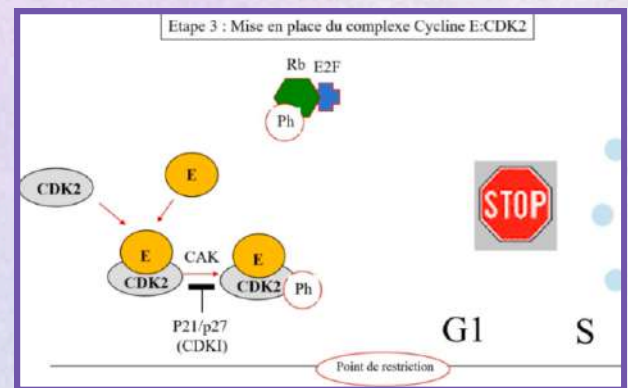
En fonction du contexte on peut avoir besoin de ralentir le cycle cellulaire pour limiter la division, et dans ces cas-là on appuie sur la pédale de frein en exprimant le produit de ces gènes CDKI (p15, p16), qui vont inhiber différentes étapes d'activation et à différents niveaux.

Étape 3 : la mise en place du complexe E/CDK2

1 : comme dit précédemment la **phosphorylation** de **Rb** par cycline D/CDK4 n'est **pas suffisante mais nécessaire ++** pour activer la transition G1/S.

On va avoir une **deuxième phosphorylation** est nécessaire par un autre complexe : **cycline E/CDK2**.

2 : même mécanisme pour l'activer : formation du couple (non actif) puis CAK phosphoryle CDK2 (actif).

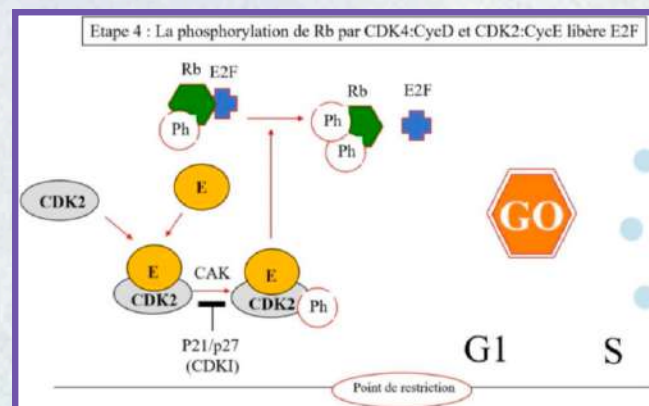


Étape 4 : la phosphorylation de Rb par CDK4/cycline D et CDK2/cycline E libère E2F (il en était temps...)

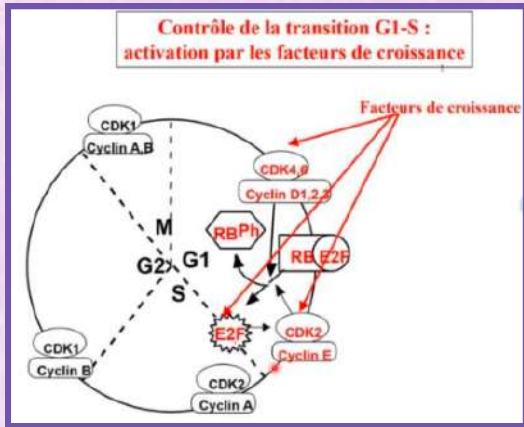
1 : **deuxième vague de phosphorylation** de Rb par le couple **cycline E/CDK2** → **HYPERphosphorylation de Rb = suffisante et nécessaire**.

2 : **E2F** est alors **libéré** de sa liaison avec Rb par cette hyperphosphorylation.

E2F devient par conséquent capable **d'activer la transcription des gènes de réplication et donc de passer la transition G1/S ++**



B. Schémas récapitulatifs du cycle cellulaire



♥ FACTEURS DE CROISSANCE :

Si on replace ce qu'on a dit dans le cycle cellulaire : c'est la reprise exacte de ce qu'on a dit.

L'activation SUCCESSIVE de ces deux couples cycline/CDK, dont l'activation est sous la dépendance de facteurs de croissance, a pour but de libérer E2F pour la transcription des gènes de la phase S.

(la répétition est à la base de l'apprentissage... n'est-ce pas... (blague à part accrochez-vous c'est bientôt fini promis))

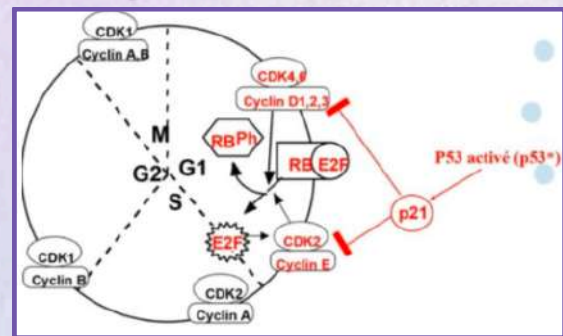
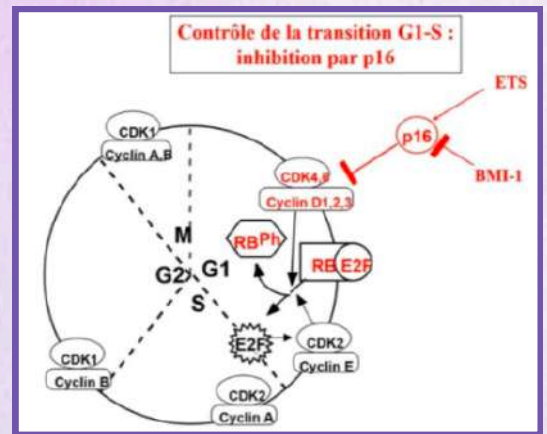
♥ SIGNALISATIONS :

→ la **PÉDALE D'ACCÉLÉRATION** 🚗 : les signaux en amont sont les **facteurs de croissance**, ce sont des signaux activateurs.

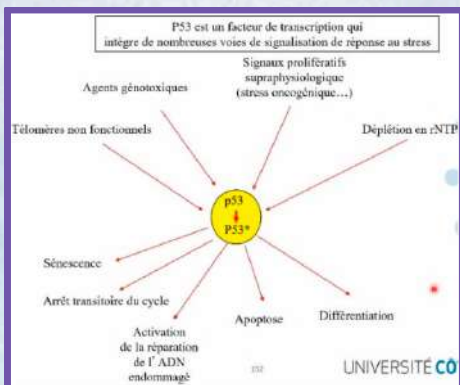
→ la **PÉDALE DE FREIN** 🚗 : elle est activée en amont avec des **facteurs de transcription** (ETS) ou d'autres inhibiteurs (ex : BMI-1) qui vont réguler. Ce sont des facteurs de régulation de l'homéostasie cellulaire parce qu'ils vont décider si la cellule se divise ou pas.

Ils vont eux-mêmes reconnaître un certain nombre de signaux exogènes ou endogènes de la cellule. Elle va intégrer ces infos pour déterminer si elle doit se diviser ou pas et ces signaux vont agir sur :

- **p16** ;
- **p21** qui est lui-même **sous la dépendance d'une protéine p53** qui est un facteur de transcription ayant beaucoup de gènes sous sa dépendance d'expression. p21 est directement activée par p53 qui se comporte en véritable pédale de frein.



IV. P53 ET CANCERS



Prenez ce magnifique schéma récap fait par les soins de l'unique et le fabuleux Pr. Gilson en tant qu'intro à cette 4ème et avant-dernière partie hehe

(vous allez voir que cette p53 est au véritable coeur de la cellule pour l'intégration des différentes infos et à quel point elle est importante #WeLoveP53)



A. P53, une protéine "célèbre"

L'activation de p53 va être sous la dépendance d'un certain nombre de signaux :

- endommagements à l'ADN par des **agents génotoxiques** ;
- **télomères non fonctionnels** ;
- signaux de **prolifération supra-physiologiques** résultant généralement de l'activation d'**oncogènes** ;
- facteurs **métaboliques** comme des **dépressions en nucléotides**.

Autant de situation où la cellule n'a pas envie de se diviser. Il existe une multitude de mécanismes moléculaires qui aboutissent à l'activation de p53.

En fonction du contexte différent de chaque cellule, p53 va activer des gènes qui vont à leur tour activer :

- la **sénescence** cellulaire : vieillissement cellulaire ;
- **arrêt transitoire du cycle** : le temps de réparer les dommages puis de repartir ;
- **réparation** de l'ADN si **endommagements** ;
- activation des **gènes pro-apoptotiques** : suicide cellulaire ; (*aka le meilleur cours*)
- **différenciation** et **arrêt du cycle**.

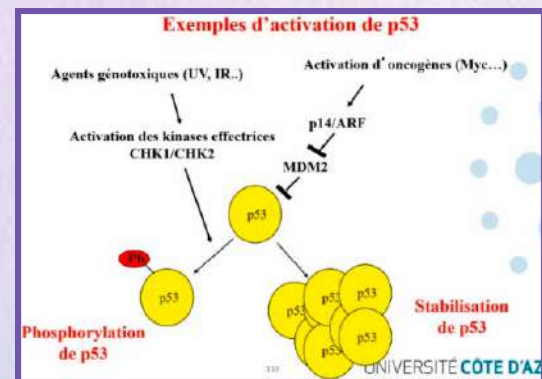
IL EXISTE DEUX VOIES D'ACTIVATION DE P53

→ par modification post-traductionnelle de p53 :

1 : des **agents génotoxiques** (UV, RX...) activent à travers une cascade d'évènements 2 **couples de kinases effectrices** : **chk1/chk2**. *BOOM BOOM CHK CHK BOOM (désolée j'étais obligée pour ceux/celles qui ont la réf #SKZ#stay)*

2 : les kinases vont **phosphoryler p53** par des cascades de phosphorylation.

3 : **p53 activée joue un rôle de facteur de transcription**



→ par modification de la quantité de p53 :

1 : activation par les **oncogènes** (sur-activation supra-physiologique) de **p14**.

2 : p14 est une **pédale de frein capable d'inhiber l'inhibiteur de p53 (= MDM2)**.

3 : **MDM 2 est alors inhibé**. (*Si on inhibe l'inhibiteur de p53 alors on l'active indirectement*)

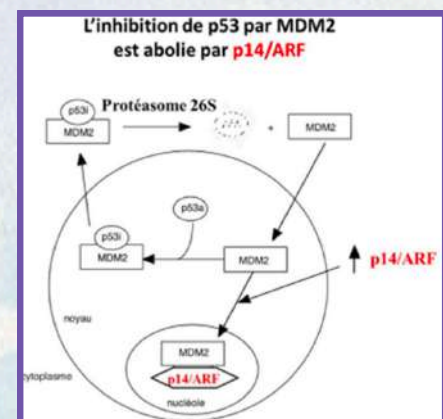
4 : **stabilisation** de la quantité de p53 (ici on veut l'augmenter).

FOCUS SUR LE MODE DE FONCTIONNEMENT DE MDM2 ET P14

◦ **MDM2 = protéine qui inhibe p53 jouant le rôle de navette entre le noyau et le cytoplasme.**

Elle interagit avec p53 qui est dans le noyau donc on a le complexe **MDM2/p53 dans le nucléoplasme**. Il est ensuite exporté dans le **cytosol** où il va être pris en charge par le **protéasome 26S et dégradé**.

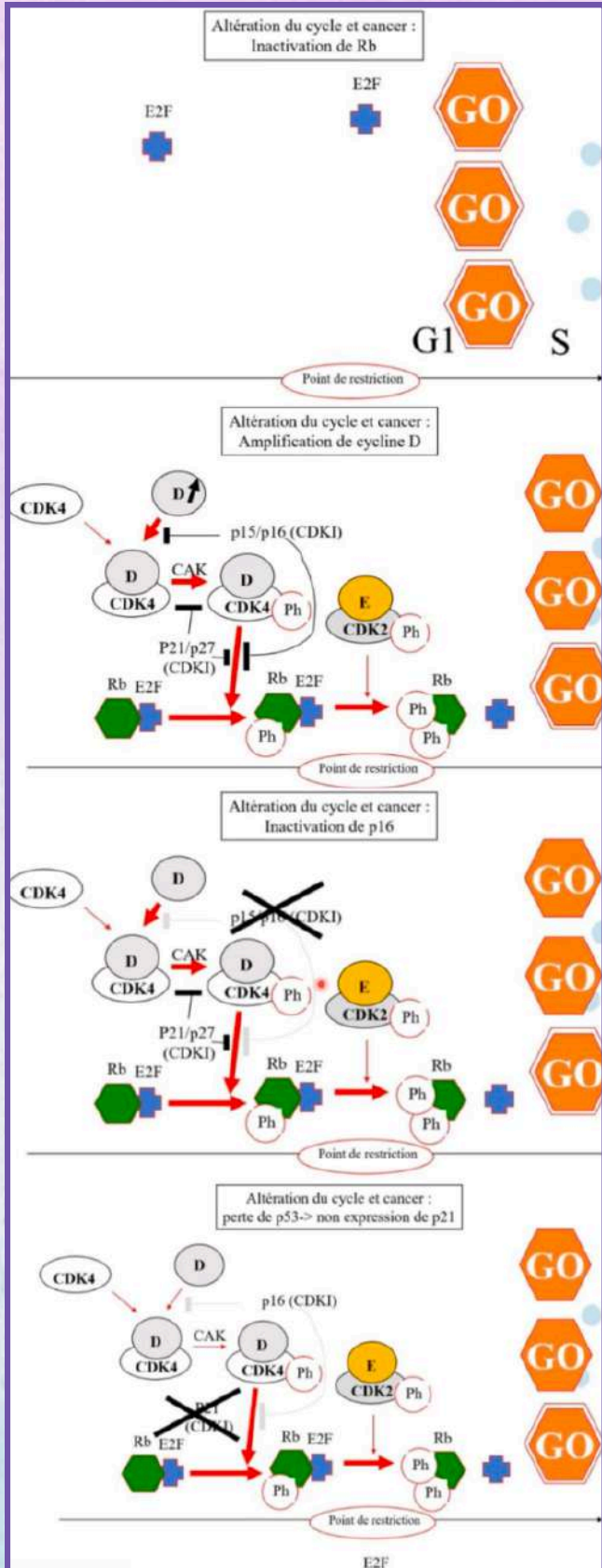
p53 peut alors être synthétisée mais elle présente très peu de quantité car elle est rapidement dégradée :(



° En cas de signal oncogénique, **p14/ARF est activé**. Il va interagir avec **MDM2** pour l'empêcher d'aller dégrader notre p53. Ainsi, **p14/ARF va séquestrer MDM2 dans le nucléole donc p53 ne sera pas dégradée**. #FreeP53

P53 devient stabilisé et peut agir comme facteur de transcription et rentrer en sénescence, apoptose...

B. Exemples d'altération et de pathologies



INACTIVATION DE RB

Un certain nombre de cancers vont inactiver Rb qui se comporte comme un gène "suppresseur de tumeur" **T**, c'est-à-dire qu'en son absence, on favorise le cancer. Lorsque Rb est muté, il n'y a plus d'inhibition de E2F, provoquant une hyperactivation du cycle et E2F s'active de manière inopinée.

AMPLIFICATION DE CYCLINE D

On retrouve dans le cancer des amplifications du gène de la cycline D : s'il y a beaucoup plus de cycline D, on va favoriser cette activation et on va plutôt avoir tendance à appuyer de manière trop importante sur la pédale d'accélérateur.

INACTIVATION DE P16

Dans de nombreux cancers, on peut inhiber la pédale de frein et donc aller plus vite. Dans beaucoup de cancers, on retrouve une inactivation de p16 par exemple.

NON-EXPRESSION DE P21 OU PERTE DE P53




De même, on retrouve une non-expression de p21, par une perte de p53.
(On a vu plus haut que p53 active p21)

Ainsi, p53 est tellement important dans l'homéostasie cellulaire qu'il est **inactivé dans environ la MOITIÉ de tous les cancers**. Et ce qui provoque un cancer peut-être :

- une **suractivation des oncogènes** qui sont des gènes permettant le **développement et la multiplication normale des cellules**. Donc une **suractivation entraine une multiplication trop importante**.
- une **désactivation des gènes suppresseurs de tumeur** qui sont des gènes permettant **d'arrêter une cellule qui se multiplierait trop**. Donc si on les **désactive, le cancer progresse plus facilement**.

V. REGULATION DE LA REPLICATION

Dans ce cours on vous épargne le mécanisme enzymatique de la réplication puisqu'il est expliqué dans le cours de la biologie moléculaire (on dit merci Gigi).

	Genome	Taille	vitesse	Durée	Origines	Commentaire
	E. coli	4.6 Mbp	60 kb/min	40 min	1	Compatible avec durée du cycle
	Levure	14 Mbp (1 cm)	3 kb/min	20 min	330	La réplication durerait 40 heures avec 1 origine 1 l culture = $4 \cdot 10^{10}$ cellules \rightarrow 400 000 km ADN synthétisé (Distance terre-lune)
	Human	3 Gbp (2 m)	3 kb/min	7 h	30 000	La réplication durerait une année avec une origine $2 \cdot 10^{13}$ km ADN synthétisé (2 années lumières) pendant notre vie (10^{16} cycles cellulaires)

A. La vitesse de réplication et les origines

Maintenant, on va se pencher sur :

- la vitesse de réplication
- les origines de réplication

Bactérie
Escherichia
Coli (E.Coli)

- ° petit génome **procaryotique**
- ° vitesse de réplication de **60 000 bases/min**
- ° **réplication** totale du génome en **40min** avec une origine de réplication
- ° c'est une bactérie qui **va se diviser entre 30min et 1h**

Levure

- ° organisme unicellulaire mais **eucaryote** (attention à ne pas confondre)
- ° **ADN** structuré de manière plus **complexe** : avec une chromatine plus condensée que celle des bactéries
- ° vitesse de réplication moins importante : environ **3 000 paires de bases/min**
- ° génome très important : nécessité d'avoir **plusieurs origines de réplication**
- ° il y a un **équilibre entre le nombre d'origines, la taille du génome et la vitesse de réplication**
- ° réplication de l'ADN : **20 min**. Si on avait qu'une seule origine de réplication dans le génome de levure, ça prendrait 40 heures : ce qui ne serait pas compatible avec la vie de la cellule
- ° "pour vous donner encore un ordre d'idée" : sur 1L de culture de levure $4 \cdot 10^{10}$ cellules \rightarrow 400 000 km d'ADN synthétiser (distance : terre - lune)

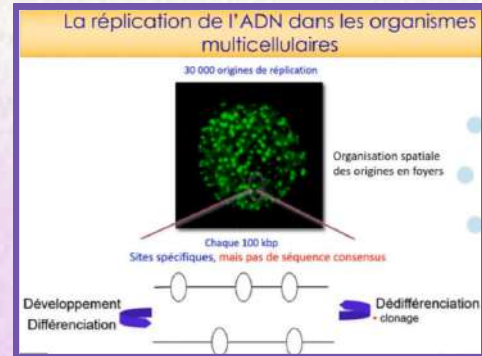
Homme

- ° **génome encore plus grand**
- ° structure de la chromatine semblable à la levure : **3 000 paires de bases/min**
- ° on divise notre génome pendant la **phase S en 7 heures environ**
- ° **beaucoup plus d'origine** : si on avait qu'une seule origine de réplication, il faudrait environ 50 ans pour faire un bébé. Donc temps important de division = compatible avec la vie

B. Aspects cellulaires de la réplication

On peut regarder où sont localisées ces origines de réplication (30 000 par noyau et par cellule humaine) en les visualisant par fluorescence. **Les origines se regroupent en foyer : on peut les étudier d'un point de vue moléculaire.**

“Le point important” : on s'aperçoit que cette réplication ne s'initie pas au hasard ! **Il est important de savoir quel ordre reçoit les chromosomes** pour démarrer leur réplication, à tel endroit du chromosome. C'est quelque chose qui n'est pas complètement connu.



Levure

Les séquences d'ADN qui constituent les origines sont spécifiques, on parle de **SÉQUENCES CONSENSUS**. À partir d'une séquence du génome, il est possible de reconnaître une séquence agissant comme origine de réplication.

Homme

Au fur et à mesure du développement, **la différenciation n'utilise pas toujours les mêmes origines**. Ces origines ne sont pas déterminées de manière stricte par l'ADN et elles peuvent changer au cours du développement et de la différenciation.

MAIS : pour le génome humain, **on ne sait malheureusement pas trouver les séquences d'origine car on ne trouve aucune séquence typique** particulière (consensus) permettant de les reconnaître en tant que telle.

Il est tout de même possible de cartographier ses origines (localisation). Il va y avoir d'autres déterminants plus compliqués, au niveau de la structure de la chromatine qui les détermine.

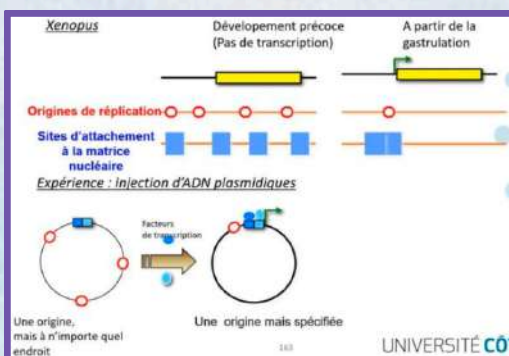


Donc la détermination des origines de réplication N'EST PAS un phénomène génétique (ancré dans l'ADN) **car c'est un phénomène ÉPIGÉNÉTIQUE** (pas de modifs des gènes directement mais possibilité de les rendre silencieux ou au contraire disponible)



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 réplifications régulées au cours du développement



On va prendre l'exemple de la cartographie des origines de réplication chez le crapaud xenopus pour étudier le développement précoce.

→ Ici, il n'y a pas de transcription : celle-ci commence qu'à partir de la gastrulation (= transcription des gènes) et on s'aperçoit que :

- cette transition n'a pas de transcription
- 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



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.

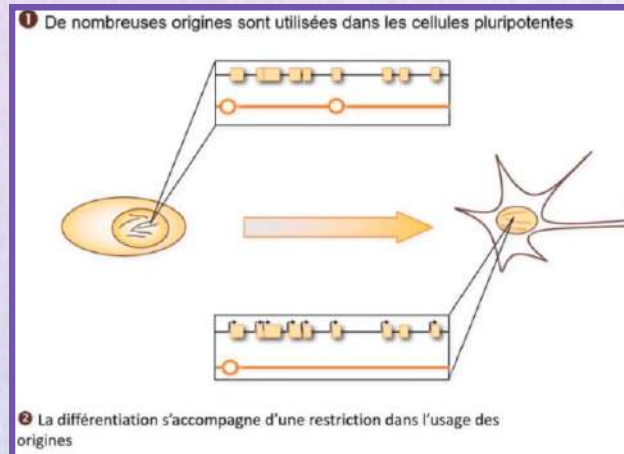
Ce déterminisme épigénétique des origines peut être mimé à travers des expériences.

→ **ORIGINES DE RÉPLICATION** : Il y a beaucoup d'origines qui sont utilisées dans les cellules pluripotentes. **La différenciation s'accompagne généralement d'une restriction dans l'usage des origines.**

(+ la cellule se différencie, - il y a d'origines)

Et on va avoir une **coordination** entre :

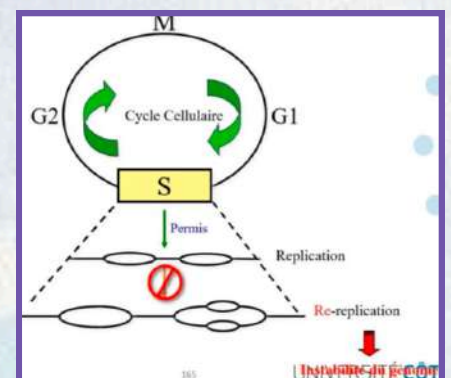
- ° le nombre de divisions qu'on effectue (de l'oeuf jusqu'à l'organisme adulte) ;
- ° la différenciation qui se produit de manière concomitante (= en même temps). Il y a un **couplage direct entre la différenciation et la façon dont les cellules se répliquent.**



D. "Permis de répliquer" une fois

Alors là vous me reprenez cette phrase par coeur svp : **LE PERMIS DE RÉPLIQUER UNE FOIS ET UNE SEULE FOIS EST IMPORTANT**

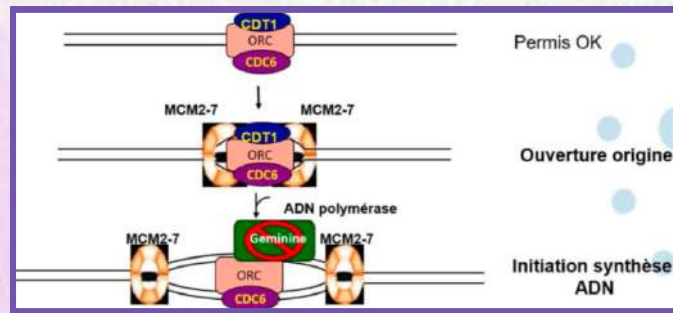
Si vous initiez au cours du même cycle cellulaire plusieurs fois la réplication, vous allez avoir des problèmes de stabilité du génome. Ce qui veut dire qu'il y a un mécanisme, qui fait que quand une origine est activée au cours de la phase S, elle ne peut pas s'activer une deuxième fois. **S'il y avait un phénomène de re-réplication, on aurait un excès d'ADN qui va recombinaison et qui va former des mutations.** Pour éviter cette instabilité du génome, il y a un mécanisme qui **empêche** cette réplication : **c'est ce qu'on appelle le +++permis de répliquer. +++**



♥ FACTEURS DONNANT LE "PERMIS DE RÉPLIQUER" :

Imaginez que vous êtes une séquence d'ADN en phase G1, avec une séquence qui a été déterminée (génétiquement ou épigénétiquement suivant les organismes) à un endroit donné du génome.

Il y a différentes étapes :



1. **Fixation** du **complexe ORC** (Origin Réplication Complex) : ce complexe est essentiel pour la mise en place de la machinerie de réplication.



2. Arrivée de **CDT1** (protéine) : elle est recrutée par la protéine ORC dans la future origine de réplication. CDT1 est importante pour charger des acteurs essentiels de la réplication que sont les hélicases.



3. Ce facteur agit de concert avec une protéine qui s'appelle **CDC6**
Ce qui permet de répliquer est donc : **ORC + CDT1 + CDC6** → si on reçoit les signaux, on peut faire la **transition G1/S**.



4. Assemblage d'un ensemble d'hélicases de réplication qui sont : les protéines **MDM2 jusqu'à MDM7**. Ces hélicases sont des enzymes qui vont dérouler la molécule d'ADN, qui est essentiel pour initier la réplication.



5. ouverture de l'origine.



6. Arrivée du **gémimine** : une fois que les hélicases ont commencé leur voyage pour former les 2 fourches de réplication (bidirectionnelles). La géminine est une protéine qui va inhiber CDT1.



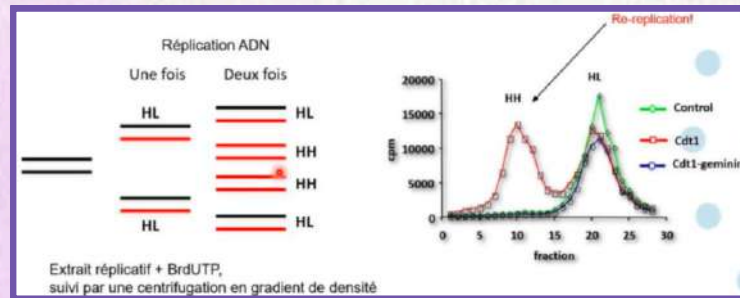
7. CDT1 s'en va donc il ne peut **pas y avoir de re-réplication** puisqu'il faut CDT1 pour répliquer.

BIG TUT' RÉSUMÉ :

- *initiation réplication : ORC + CDT1 + CDC6 qui vont recruter les hélicases !!*
- *on a le permis de RÉPLIQUER UNE SEULE FOIS donc on veut empêcher que la même origine de réplication soit utilisée → pour ça, on a la géminine qui inhibe CDT1 donc pas de re-réplication :)*

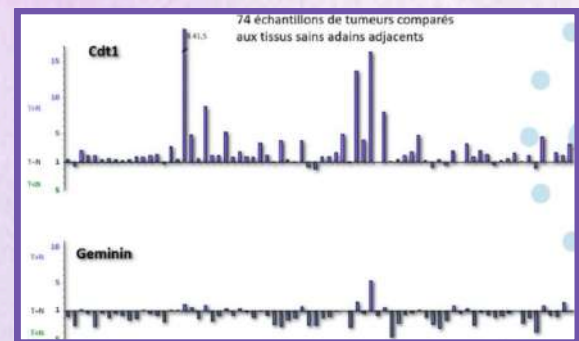
♥ EXCÈS DE CDT1 INDUIT UNE RE-RÉPLICATION :

Si on agit sur ce phénomène en conditions expérimentales, par exemple en donnant un **excès de CDT1 à la cellule**. On va d'une certaine façon empêcher ce phénomène de se produire, puisqu'il y a un excès de CDT1 qui va être dominant sur son inhibition. Par des techniques d'études de la réplication in vitro, on peut montrer qu'un **excès de CDT1 va entraîner un excès de réplication**. 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 les 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 entraîne une instabilité génétique de réplication**, est utilisé par les cellules tumorales. C'est ce qui leur confère leur caractère tumoral. À l'inverse, l'expression de l'inhibiteur **gémimine** a plutôt tendance à être **réduite**.



Et voilà, j'espère que cette version complète ne vous a pas semblé insurmontable !!

Comme d'habitude, si vous avez des questions : c'est direction le forum <3

Maintenant que cet avant-goût cellulaire a été fait...



PLACE À MES PREMIÈRES DÉDIS 😊 :

- Bien évidemment, je vais commencer par faire un dédicace au TUTORAT, sans qui je n'aurais jamais réussi ma P1 et j'espère que mes co-tuts et moi on saura vous apporter toute l'aide et le soutien que j'ai moi-même reçus !!
- Dédicace à la pré-rentree parce que c'est un super moyen de prendre de l'avance tout en étant entouré et plongé dans de la bonne humeur donc que demander de plus ?
- Dédicace à mes deux meilleures amies, Vanessa et Dakota, qui m'ont supportée durant le collège/lycée, qui ont su comprendre mes choix et m'ont toujours rappelée de lever la tête, même quand ça n'allait pas (mention spéciale à Vane qui a écouté mes 7632507268 vocaux pendant que j'allais à Valrose pour mes TD de licence mdr)
- DÉÉÉÉÉDI AU CONCERT DE STRAY KIDS QUI A ÉTÉ LE HIGHLIGHT DE MON ÉTÉ (bon, après avoir appris que j'ai été acceptée en P2 quand même) DU 26 JUILLET À PARIS ET DEPUIS LEQUEL JE NE SUIS TOUJOURS PAS REDESCENDUE DE MON PETIT NUAGE :



- Enfin, et le meilleur pour la fin, dédicace à ceux que je porte au plus près de mon appareil cardio-vasculaire, aka mes parents et mes deux chiens, Foxi et Châtaigne (don't worry vous allez voir mes stars d'ici peu 😊). Ils m'ont vue et entendue écrire, réciter, lire, re-écrire, re-réciter, re-lire... et tout ça sans dire un mot. Je ne saurai jamais comment les remercier pour tout le réconfort et l'amour qu'ils m'ont donnés pendant cette fameuse et tant attendue ✨P1✨ qui nous fait ressentir tout un tas d'émotions en l'espace de quelques instants ;)
- Et vous avez vraiment cru que j'allais vous oublier ? (parce que oui oui vous méritez votre propre dédicace, surtout ceux qui m'ont lu jusqu'ici haha). Même si je ne vous connais pas, il y a une chose dont je suis sûre : c'est que vous pouvez (et devez !) être EXTRÊMEMENT fiers de vous et du courage qu'il faut pour entreprendre de si belles et enrichissantes études, parce que c'est vraiment pas rien ^_^