

LA REGULATION DU CYCLE CELLULAIRE

Introduction

Les événements et les différentes phases du cycle cellulaire étaient connus depuis longtemps. La remarquable constance de la succession des différentes phases suggérait un contrôle tout au long du cycle, mais les approches biochimiques directes pour mettre en évidence des molécules impliquées dans la régulation ne donnaient aucun résultat. Ce sont des expériences de biologie cellulaire qui ont permis de déceler la présence des facteurs de régulation présents à certaines phases du cycle.

Deux types d'expériences ont été menés entre 1960 et 1970, amenant à la notion de MPF : expérience d'injection dans les ovocytes et expériences de fusions cellulaires

1-Expérience de micro-injection de cytoplasme d'un ovocyte II (bloqué en 2ème division de méiose, métaphase II) dans un ovocyte I : l'ovocyte I est mûr (figure 1)

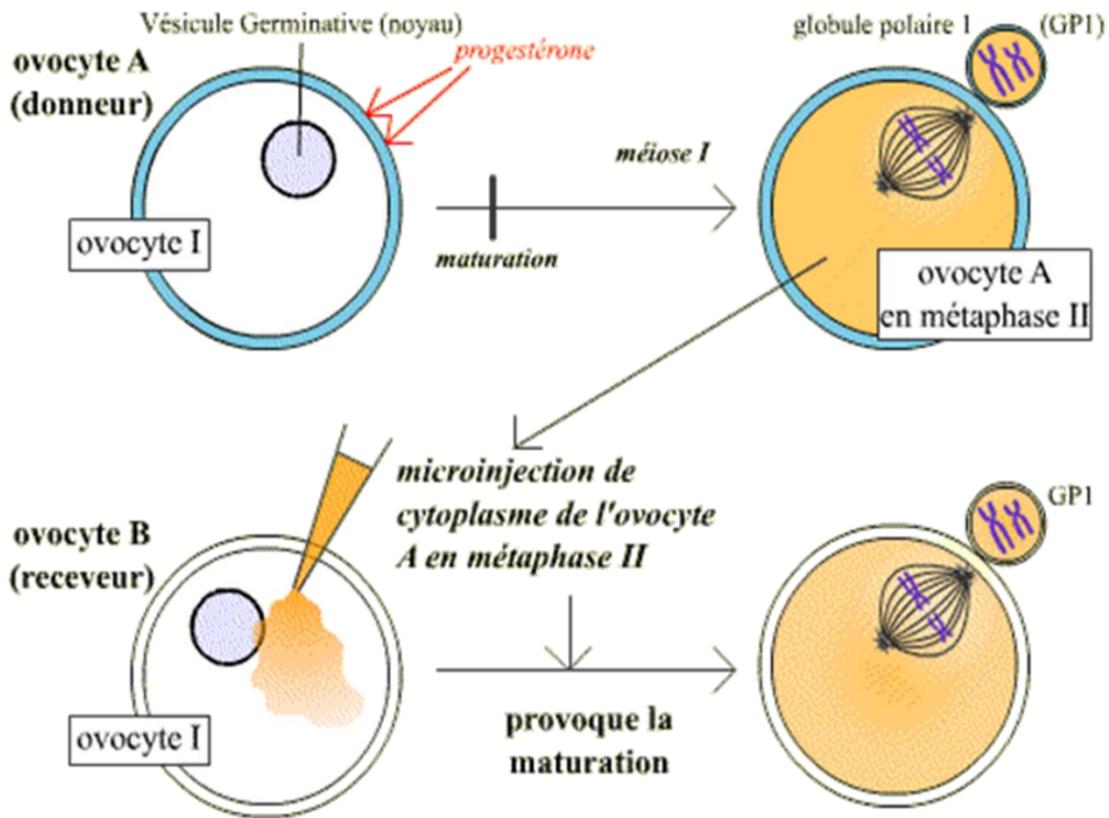
L'ovocyte est un système modèle qui a permis l'analyse du déclenchement de la phase M du cycle cellulaire. Chez le Xénope, c'est après une décharge hormonale de progestérone que l'ovocyte I, jusque là bloqué en début de prophase I de méiose, poursuit la méiose, termine la première division et effectue le début de la deuxième division méiotique jusqu'à la métaphase II, stade auquel il reste à nouveau bloqué ; cette étape s'appelle la maturation .

Lorsque du cytoplasme de cet ovocyte bloqué en métaphase II est prélevé et injecté dans un ovocyte I, il induit la maturation de l'ovocyte receveur.

- Cette expérience montre qu'une substance contenue dans le cytoplasme de l'ovocyte bloqué en métaphase II peut induire la maturation. Ce facteur a été appelé MPF (Maturation Promoting Factor). On s'aperçut par la suite que le MPF n'est pas seulement le déclencheur de la méiose ovocytaire, mais qu'il déclenche aussi l'entrée en mitose (phase M) des cellules somatiques.

L'abréviation MPF peut donc aussi correspondre à "Mitosis Promoting factor."

- En réalité le cytoplasme injecté contient du MPF « actif » (c'est justement parce que ce MPF est maintenu actif que l'ovocyte est bloqué en métaphase II). La petite quantité de MPF actif injectée suffit pour activer le stock de MPF inactif de la cellule receveuse.

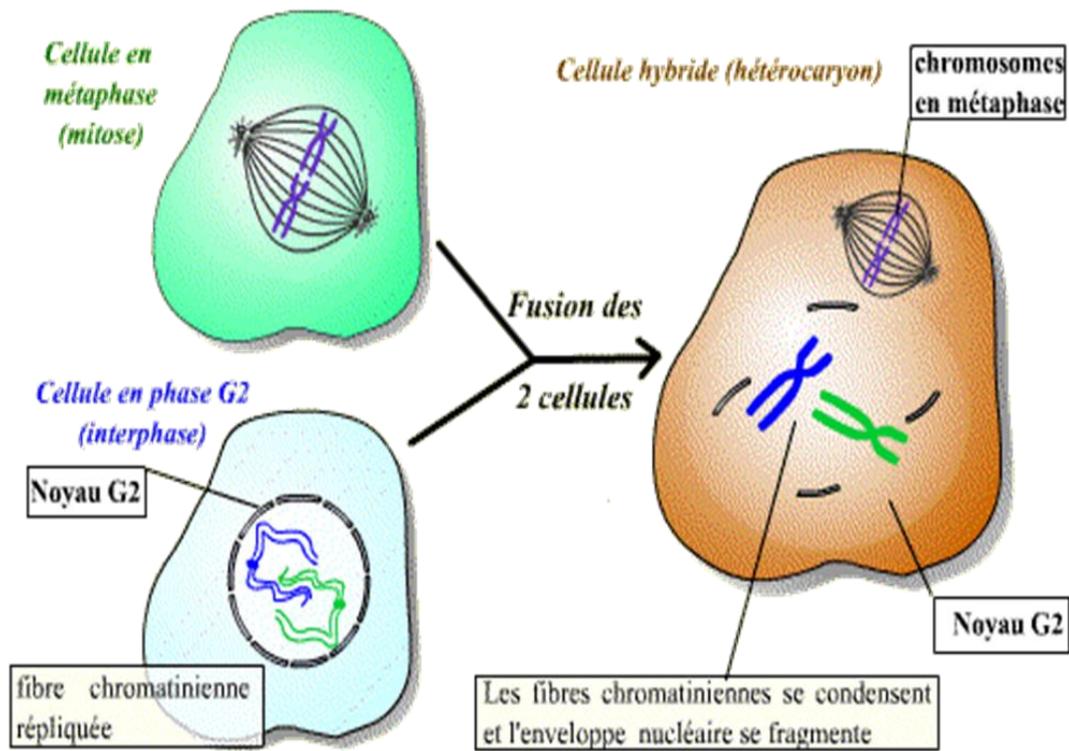


(figure 1) Expérience d'injection de cytoplasme entre des ovocytes de Xénope.

2-Expériences de fusion de cellules à des stades différents du cycle cellulaire:

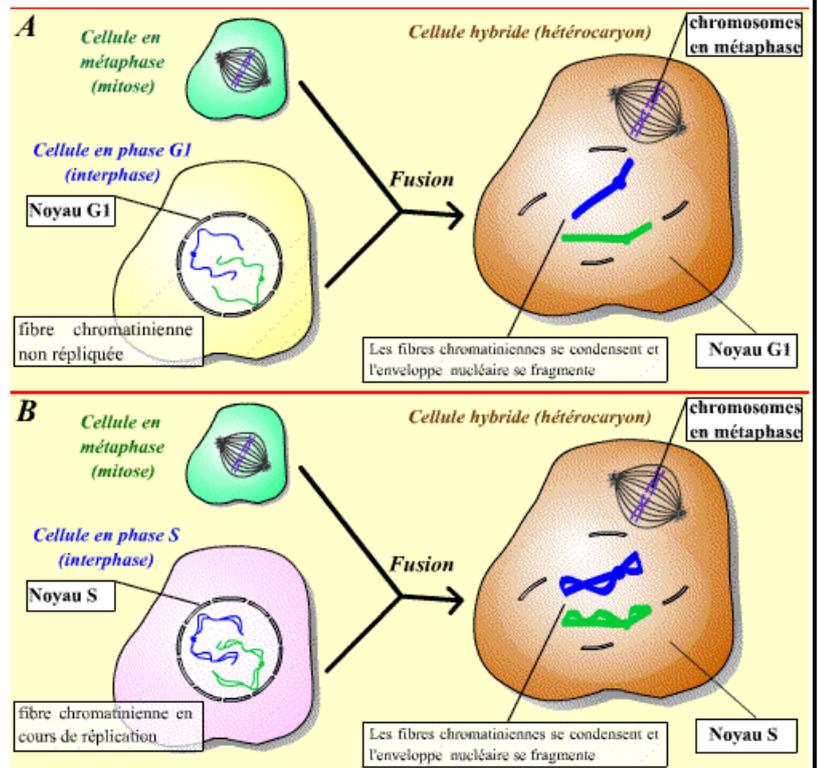
Il est possible de réaliser la fusion de deux cellules qui sont à des stades différents du cycle cellulaire : on obtient alors un hétérocaryon (cellule contenant deux noyaux différents) avec mise en commun des cytoplasmes. Ce modèle expérimental permet de savoir si une cellule donnée contient un facteur de stimulation d'une étape du cycle.

La fusion d'une cellule en mitose et d'une cellule en interphase permet d'observer une condensation des chromosomes issus de la cellule en interphase. Un facteur présent dans la cellule en mitose induit donc visiblement une "entrée en mitose" précoce du noyau de la cellule en interphase. Ce facteur est le MPF.



3-Fusion d'une cellule en interphase (ici phase G2) et d'une cellule en métaphase (phase M).

La fusion de toute cellule en interphase (même en phase G1 ou S) et d'une cellule en phase M induit la condensation des chromosomes et la disparition de l'enveloppe nucléaire. A. Fusion d'une cellule en phase G1 avec une cellule en phase M. B. Fusion d'une cellule en phase S avec une cellule en phase M



Conclusions

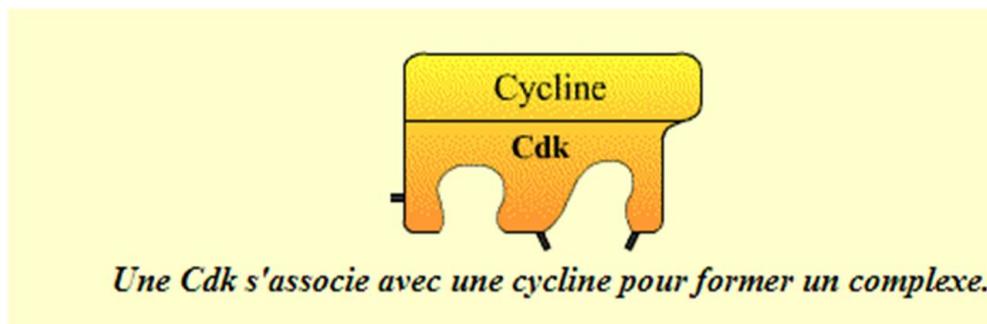
Ces expériences montrent que l'entrée en mitose (ou en méiose) est contrôlée par un facteur cytoplasmique diffusible, le MPF.

Mis en évidence en 1971, le MPF ne sera identifié et caractérisé précisément qu'en 1988* : c'est un complexe formé de deux protéines :

une sous-unité catalytique, protéine kinase, qui est une enzyme phosphorylant des protéines cibles, et qui n'est activée qu'en présence d'une cycline, d'où son nom, protéine kinase-cycline dépendante (Cdk).

une sous-unité régulatrice appartenant à la famille des cyclines.

Ce complexe cycline / Cdk agit en déclenchant différentes réactions. Il permet entre autres de provoquer la condensation des chromosomes, de fragmentation de l'enveloppe nucléaire et la formation du fuseau mitotique.



I. -L'entrée en phase S (réplication de l'ADN) est aussi sous le contrôle d'un facteur diffusible

De même que précédemment, on peut réaliser la fusion d'une cellule en phase S avec une cellule en phase G1 ou G2. Les résultats ne sont pas les mêmes dans ces deux cas de figure. Si la cellule est en G1, on observe, après fusion, une réplication prématurée des fibres chromatiniennes de G1 (Fig.A). Si la cellule est en G2 par contre, il n'y aura pas de nouvelle réplication (Fig.B)

1-Fusion d'une cellule en phase G1 (avant réplication) et d'une cellule en phase S (en réplication). Un facteur contenu dans le cytoplasme de la cellule en phase S agit sur les fibres chromatiniennes de la cellule en G1 pour induire la synthèse d'ADN. Il existe donc, dans le cytoplasme des cellules en phase S, un facteur de stimulation d'entrée en phase S.

2- Fusion d'une cellule en phase S et d'une cellule en phase G2 (après la réplication). Le facteur contenu dans le cytoplasme de la cellule en phase S n'agit pas sur les fibres chromatiniennes déjà répliquées : ce facteur n'est pas actif sur des cellules ayant déjà répliqué leur ADN. Il existe donc un mécanisme qui bloque toute nouvelle réplication tant que la mitose n'a pas eu lieu

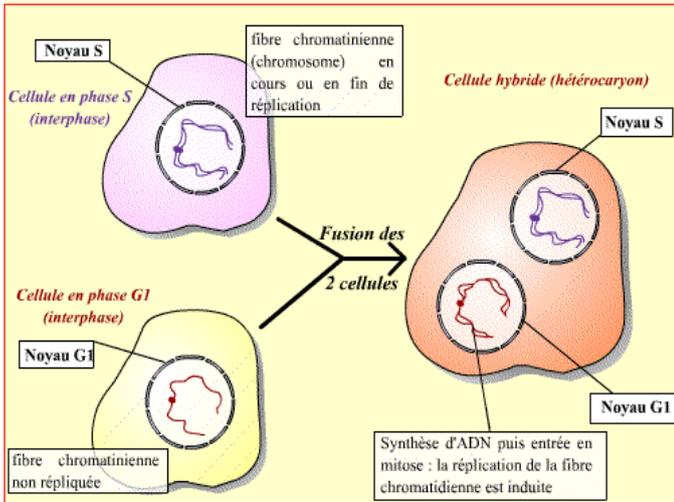


Fig.A

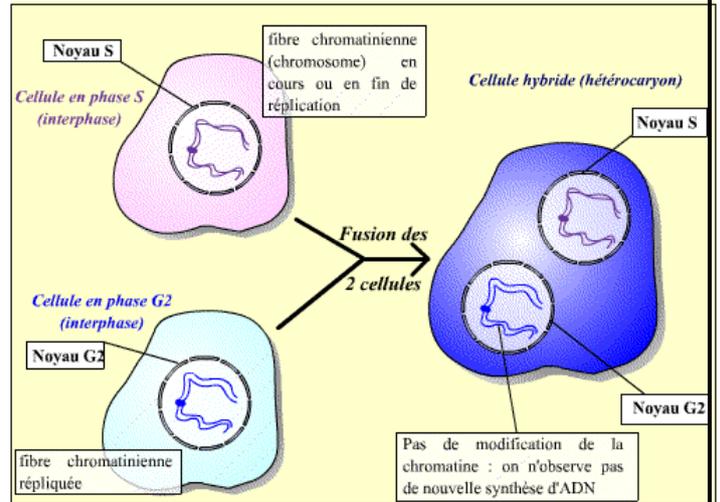
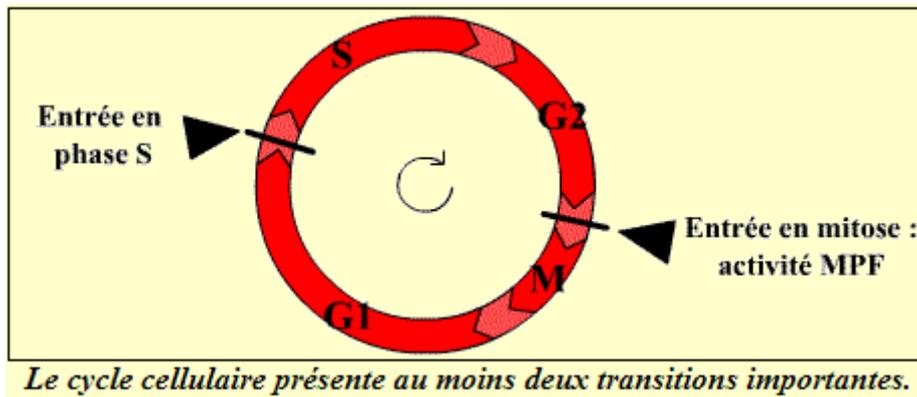


Fig.B

Conclusion : deux transitions importantes dans le cycle cellulaire

Ces expériences permettent donc de mettre en évidence que deux transitions importantes dans le cycle cellulaire, l'entrée en mitose et l'entrée en phase S, sont sous la dépendance de facteurs de régulation.



II. Définition et mode d'action des Kinases cycline-dépendantes (Cdk)

Entre 1987 et 1990, le régulateur universel de l'entrée en mitose (le MPF) est caractérisé : c'est une kinase cycline-dépendante (Cdk) associée à une cycline. Entre 1990 et 2000, une douzaine de Cycline / Cdk sont décrites chez l'homme. Six d'entre elles interviennent dans le contrôle direct du déroulement du cycle cellulaire. Les Cdk forment des complexes hétérodimériques avec les cyclines, leurs sous unités régulatrices.

La première Cdk mise en évidence fut la Cdk1 qui, associée à la cycline B, constitue le MPF:

Cycline B / Cdk1 = MPF

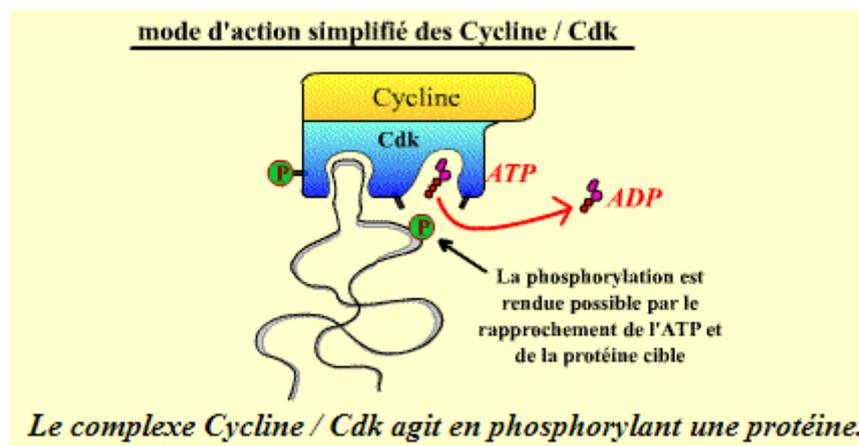
Les Cdk ne deviennent fonctionnelles que lorsqu'elles sont associées à une cycline .

Les cyclines ne sont pas présentes pendant tout le cycle, elles apparaissent puis disparaissent brusquement à des moments précis du cycle, de façon périodique. Les Cdk peuvent donc être sous forme activée ou désactivée, selon qu'elles sont associées ou non à leur cycline. Mais nous verrons que d'autres activateurs ou inhibiteurs des Cdk interviennent.

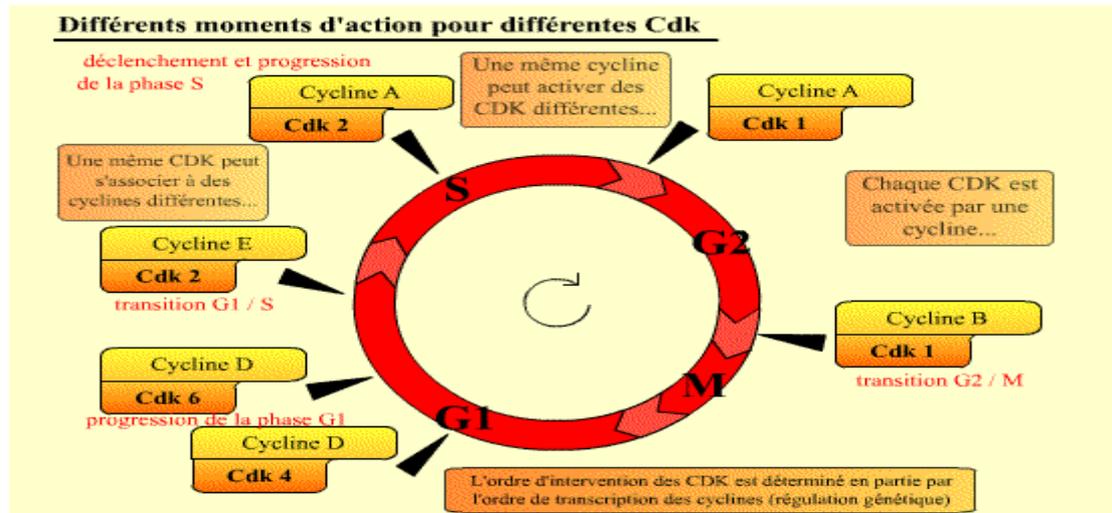
Les Cdk sont des sérine-thréonine kinases, enzymes qui catalysent la phosphorylation de protéines cibles (= substrats) jouant un rôle dans les événements du cycle cellulaire (fragmentation de l'enveloppe nucléaire, compaction des chromosomes, réplication de l'ADN ...), ou dans l'avancement du cycle. Leur activité consiste à transférer le groupement γ -phosphate de l'ATP sur une sérine ou une thréonine, présentes dans les protéines cibles, à condition que ces acides aminés soient dans une séquence d'acides aminés caractéristique (séquence consensus) spécifiquement reconnue par la kinase (exemple : Ser/Thr-Pro-X-Arg/Lys).

De cette phosphorylation, il résulte un changement de conformation des protéines cibles, ce qui entraîne des propriétés nouvelles pour ces dernières (activation, inhibition, changement de partenaire d'interaction...).

Les cyclines n'ont pas d'activité enzymatique, ce sont des protéines régulatrices nécessaires aux Cdk pour qu'elles soient enzymatiquement actives



Différents complexes Cycline / Cdk interviennent à des moments précis du cycle cellulaire: Le cycle cellulaire est contrôlé par au moins 6 complexes Cycline / Cdk différents qui interviennent à des moments précis du cycle cellulaire. (Chaque Cdk agit sur des substrats définis)



b) Actions des différents complexes Cycline / Cdk au cours du cycle cellulaire

Les complexes Cycline / Cdk assurent le bon déroulement du cycle cellulaire, permettant le passage d'une phase à l'autre du cycle et permettant la réalisation des événements du cycle, par le biais de l'activité kinase des Cdk :

Moment du cycle	Complexe Cycline / Cdk	Effets du complexe
G1	Cycline D / Cdk4 et Cycline D / Cdk 6	<ul style="list-style-type: none"> Phosphorylent et inactivent la protéine Rb ("Rétinoblastoma protein"), ce qui a pour effet de libérer les facteurs de transcription E2F qui contrôlent l'expression de gènes nécessaires pour la transition G1/S et pour la progression de S (synthèse des cyclines E et A, entre autres).
G1/S	Cycline E / Cdk 2	<ul style="list-style-type: none"> Responsable de la transition G1/S. Phosphoryle la protéine Rb. Induit la duplication du centrosome dans certains cas (xénope)
S	Cycline A / Cdk 2	<ul style="list-style-type: none"> Phosphoryle des substrats qui déclenchent et entretiennent la réplication de l'ADN et l'inactivation de facteurs de transcription de la phase G1. induit la duplication du centrosome chez les mammifères. arrêt de la dégradation de la cycline B qui s'accumule.
G2/M	Cycline B / Cdk 1	<ul style="list-style-type: none"> Dirige la transition G2/M par phosphorylation de nombreux substrats et conduit la progression de la mitose.

c) L'activité des Cdk est régulée

Les Cdk sont présentes avant qu'elles ne soient requises. Comment alors leur activité enzymatique apparaît-elle et disparaît-elle aux moments opportuns ?

-C'est, **premièrement**, grâce aux cyclines: les cyclines n'ont pas d'activité enzymatique par elles-mêmes, mais se lient aux kinases du cycle pour les rendre actives. L'activité des Cdk est donc contrôlée par un cycle de synthèse/dégradation de leur cycline associée, tout au long du cycle cellulaire.

-**Deuxièmement**, des protéines dé phosphorylant (Cdc 25) ou phosphorylant (CAK, Wee-1) les Cdk permettent de compléter le contrôle de l'activité des Cdk.

Nous verrons qu'une phosphorylation peut être activatrice ou inhibitrice.

- **Troisièmement**, des protéines inhibitrices, les CKI (Cdk Inhibitor), qui ne régulent que négativement

a- Les Cdk sont activées, par des phosphatases : Cdc 25 (responsables de Déphosphorylations "activatrices" des kinases : CAK ("Cdk Activating Kinase" = Cycline H / Cdk 7), (Polo K, indirect), [Phosphorylations "activatrices"]

b- Les Cdk sont inhibées par :

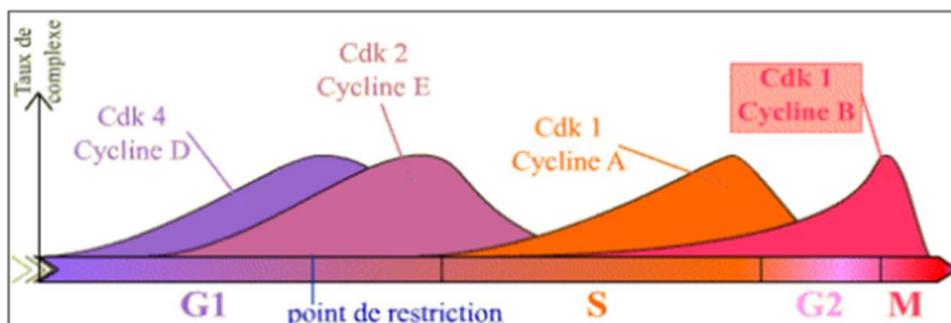
1. des protéines inhibitrices (inhibiteurs physiologiques), les CKI (Cdk Inhibitor) : p16, p21, p27, qui agissent sur les complexes Cycline / Cdk ;
2. une kinase : Wee 1 [responsable de Phosphorylations "inhibitrices"] qui agit sur la Cdk1 en phosphorylant les sites tyrosine 15 et thréonine 14.

III. Le passage de G2 en M, c'est à dire le déclenchement de la mitose (l'entrée en mitose)

L'entrée en mitose, ou transition G2 / M, est sous le contrôle du complexe Cycline B / Cdk1, et se réalise de manière brutale. Or, on peut constater que la Cycline B est synthétisée pendant une longue période du cycle, et que le complexe Cycline B / Cdk1 se forme progressivement au cours des phases S et G2.

(Les courbes présentées montrent que pour les autres complexes, il existe de la même façon une accumulation progressive, en particulier pour la Cycline E / Cdk2)

Figure 20 : Abondance des complexes Cycline / Cdk au cours du cycle cellulaire



Comment alors expliquer que l'activité du complexe Cycline B / Cdk1 débute brusquement, au moment de l'entrée en mitose?

L'ensemble du processus peut être décomposé en trois temps:

Formation d'un stock de Cycline B / Cdk1 inactif (pré-MPF).

Activation de ces complexes.

Action de ces complexes.

***Activation brutale des Cycline B / Cdk1:** L'activation du stock de Cycline B / Cdk1 est le résultat d'une série de réactions interdépendantes; Lorsque la réplication est terminée, la phosphatase Cdc25 n'est plus séquestrée dans le cytoplasme et passe dans le noyau, et en fin de phase G2, la phosphatase Cdc 25 est activée, probablement par phosphorylation par la kinase Polo. Cdc 25 a alors pour action d'enlever les deux phosphates inhibiteurs de Cycline B / Cdk 1. Ceci permet l'activation d'une petite partie du stock de Cycline B / Cdk1.

Cdk 1 peut alors phosphoryler Cdc 25 (sur un site différent de celui de la kinase Polo). Cette phosphorylation active Cdc 25 : Cycline B / Cdk 1 active donc son propre activateur (Processus d'auto-activation). Dans le même temps, Cycline B / Cdk 1 phosphoryle Wee 1, inhibant cette protéine : Cycline B / Cdk1 inhibe donc son propre inhibiteur.

Ce double mécanisme de rétrocontrôle positif permet d'obtenir rapidement et de façon irréversible une grande quantité de complexes Cycline B / Cdk1 actifs (Feed-back positif)

Selon ce mécanisme, une activation partielle de Cdc 25 par la kinase Polo permet l'activation d'une sous population de complexes Cycline B / Cdk 1 qui, par la suite, phosphoryle plus de Cdc-25 et de Wee-1. Ceci permet plus de déphosphorylation de cycline B / Cdk1 et aboutit à une très rapide activation de tous les complexes Cycline B / Cdk 1 dans la cellule.

***Mode d'action des complexes activés:** Les complexes Cycline B / Cdk 1, une fois activés, permettent l'entrée en mitose. Pour cela, ils interviennent en déclenchant un certain nombre de phénomènes qui prennent place au début de la mitose, c'est à dire en prophase.

Les effets sur le cycle de l'activité de chaque complexe (ici Cycline B / Cdk1) dépendent donc des protéines cibles que chaque complexe phosphoryle.

Au début de la mitose, les complexes Cycline B / Cdk1 activés agissent en phosphorylant diverses protéines cibles. Parmi ces nombreuses protéines, on trouve:

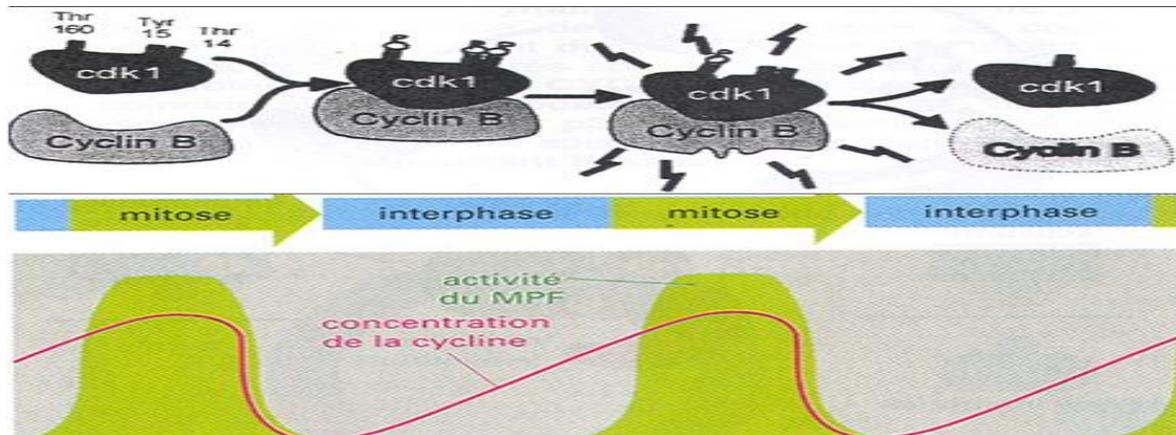
- Les condensines, les histones H1 et H3, impliquées dans la condensation des chromosomes.
- Les lamines, qui permettent la désorganisation de l'enveloppe nucléaire.
- Des protéines associées aux microtubules (MAPs), qui permettent l'assemblage du fuseau mitotique.
- L'APC (Anaphase Promoting Complex) dont l'activité est nécessaire à l'ubiquitinylation de la securine et de la cycline B (ce qui permet la sortie de la mitose.)

Conséquences de l'activité des complexes Cycline B / Cdk1: Globalement, l'activité kinase de ce complexe permet de provoquer de très nombreux événements de la mitose:

- La condensation des chromosomes.
- La désorganisation de l'enveloppe nucléaire.
- Le réarrangement du cytosquelette de tubuline et l'assemblage du fuseau mitotique.
- L'attachement des chromosomes répliqués au fuseau.
- Le réarrangement de l'actine.
- La réorganisation du Golgi et du Reticulum Endoplasmique.

- La dégradation de la Sécurine et de la Cycline B par APC - Cdc 20

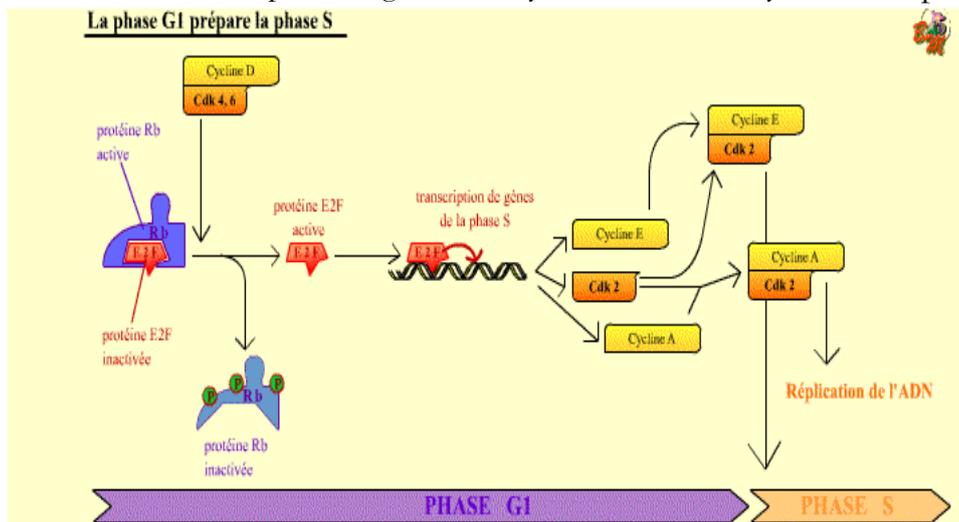
L'activité des complexes Cycline B / Cdk1



IV. Le passage de G1 à S

Au début de G1, la cellule contient le complexe Cycline D / Cdk 4 qui, une fois activé initie la phosphorylation de la pRb. Phosphorylée, la pRb libère E2F qui sert alors de facteur de transcription du gène de la cycline E. La fonction essentielle de la Cycline D / Cdk4 est donc d'activer, au début de la phase G1 (G1 précoce), la transcription du gène de la cycline E intervenant dans la phase suivante du cycle.

Après la synthèse de la Cycline E, le complexe Cycline E / Cdk 2 pourra alors se former. Or, ce nouveau complexe a lui aussi pour protéine cible la p Rb qu'il phosphoryle. Il commande donc, par boucle de rétro-activation, l'amplification de la synthèse de sa propre cycline. Lorsqu'elle est hyper phosphorylée, la pRb libère le facteur E2F qui stimule alors la transcription du gène de la cycline suivante, la cycline A. La phase G1 prépare



la phase S. L'activation du facteur de transcription E2F, grâce à la phosphorylation de la protéine Rb, permet la synthèse de gènes de la phase S. La transcription de Cdk 2 et de Cycline E, en particulier, permet d'augmenter cette activation de E2F, ce complexe phosphorylant Rb . Ce mécanisme permet à la cellule de préparer son entrée en phase S.