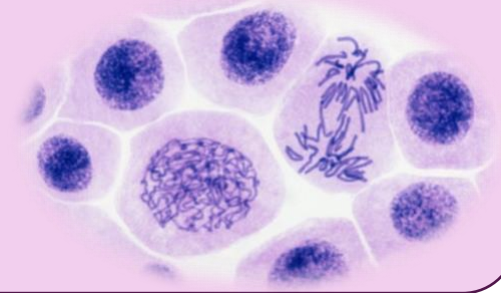


LE CYCLE CELLULAIRE



Bienvenue dans la version complète de cette incroyable fiche sur le cycle cellulaire. Mes commentaires seront en italiques. Au programme dans cette fiche, quelques notions en plus qu'à la TTR. Mais pas de panique tu en es largement capable. Alors prends une grande inspiration, expire tranquillement et plonge toi dans ce cours passionnant (... ou presque).

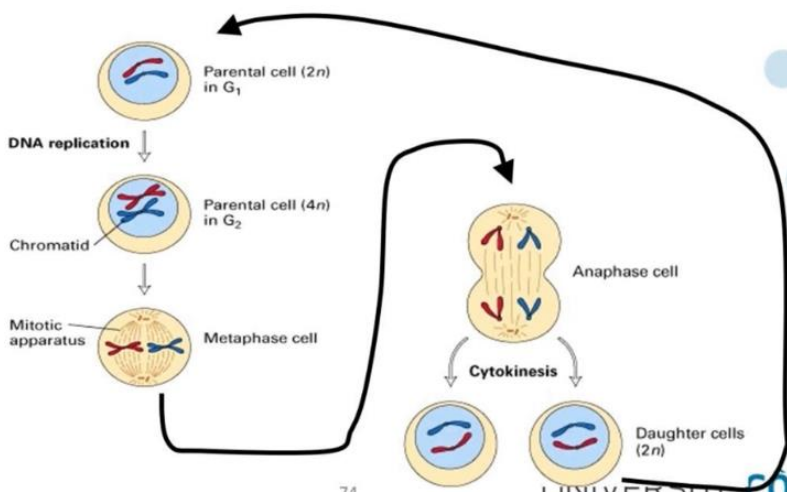
D) RÉGULATION DU CYCLE CELLULAIRE :

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

a dit François Jacob (prix Nobel français en biologie moléculaire).

- Cette phrase s'applique pour les **procaryotes** (bactérie) = vont devenir 2 bactéries par défaut.
- Moins vraie pour les **eucaryotes** (cellule de notre corps par exemple) = recevoir un ordre pour devenir 2 cellules.

Ces événements qui sont associés à cette division cellulaire s'appelle : le **cycle cellulaire**. Le but est qu'une cellule parentale donne deux cellules filles identiques. 📺📺



1. On a une cellule eucaryote diploïde en phase **G1** = nombre double de chromosomes dit **2n**. (1 paire de chaque chromosome à une chromatide).
2. La phase **S** (synthèse) = phase de réplication.
3. Elle donne des cellules en phase **G2** qui ont **4n** chromosomes. (1 paire de chaque chromosome à deux chromatides).
4. Phase de division avec séparation des chromosomes en deux cellules filles dans un processus appelé **l'anaphase** (**mitose**).
5. Séparation des cellules filles (avec les myosines de type II) qui contiennent maintenant **2n** chromosomes, aboutissant à la cytokinèse.

📺📺 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** = mutations dont l'**effet délétère** sur le cycle cellulaire ne s'exprime que dans **certaines conditions**.

Dans des conditions favorables, elles poussent normalement. Dans des conditions moins favorables, on peut étudier leur phénotype (lors du blocage cellulaire).

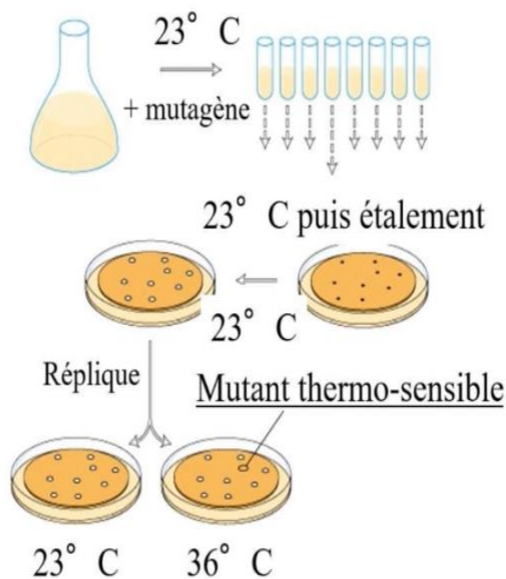
Mutations THERMOSENSIBLES	Mutations CRYOSENSIBLES
Mutations ts : sensibles aux hautes températures	Mutations cs : sensibles aux basses températures

- On dit que la température est **permissive** : la mutation n'est pas exprimée = phénotype **sauvage** (normal) 🧪🧪
- La température est **non permissive** : mutation s'exprime = phénotype **muté**. 🧪🧪

Partant de ce principe, ces **mutations** ont été identifiées et étudiées par un chercheur dans des cellules de levures (cellules **eucaryotes** unicellulaire, qui ressemblent dans leur fonctionnement de base à nos cellules à nous).

La partie de la colonie exprimant la **mutation thermosensible** est incapable de se **diviser** lorsque la température s'élève : ce sont des **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 degrés en présence d'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 à 23°C sur une autre boîte, cette fois à 36°C, par un geste très simple.

En temps normal, les cellules poussent et forment des colonies aussi bien à 23°C qu'à 36°C.

Cependant, ce qu'il a observé c'est que certaines des colonies poussent à 23°C mais sont absentes à 36°C ! 🧐

- ➔ Cela est dû aux **mutants thermosensibles**, c'est à dire un mutant qui est **incapable de se diviser** lorsque la température augmente.



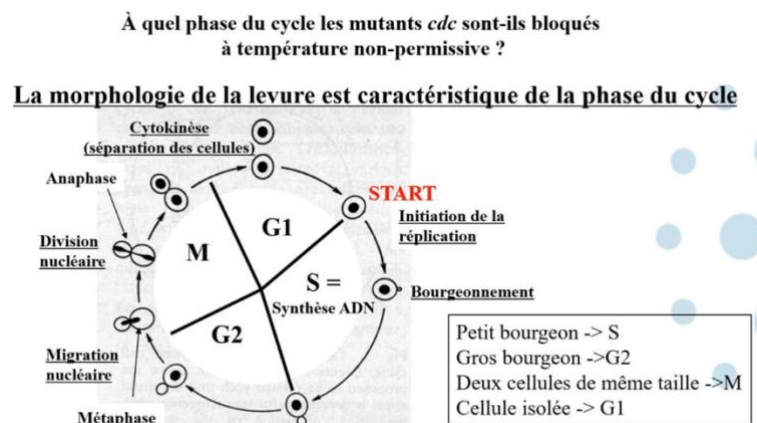
Ce chercheur a isolé toute une série de gènes (d'abord génétiquement, puis fonctionnellement). Il les a appelés de manière globale : **les gènes CDC** (Cell Division Cycle).

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

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

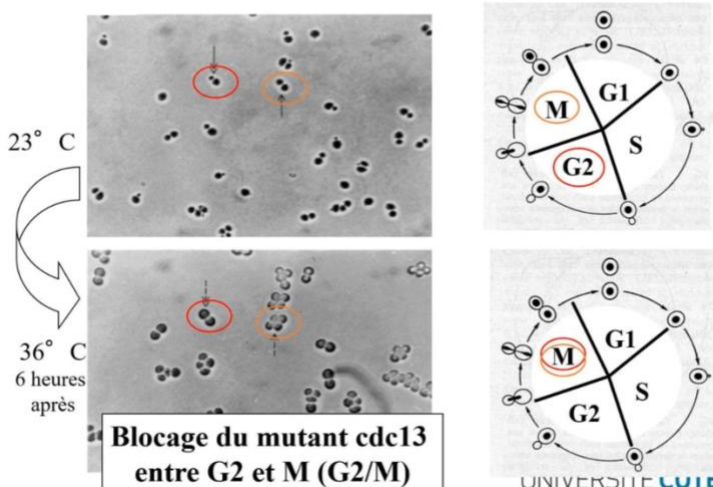
L'utilisation de la levure de boulanger (=levure à bourgeon) et ici particulièrement utile, puisque c'est un organisme cellulaire qui se divise de manière asymétrique. Par l'inspection en microscopie de ces cellules, on peut savoir dans quelle phase du cycle cellulaire elle se trouve :

PHASE G1	La cellule fille isolée va progressivement émerger.
PHASE S	Progression de ce petit bourgeonnement 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 (environ.)



C. Détermination microscopique de différentes phases du cycle cellulaire : exemple du mutant *cdc13* :

Exemple du mutant *cdc13*



À TEMPÉRATURE PERMISSIVE :

Les cellules se divisent (*chacune dans des phases différentes du cycle*).

À TEMPÉRATURE NON PERMISSIVE (présence des mutations) :

☺ La cellule en phase M (*cellule entourée en orange*) est capable de compléter le cycle cellulaire (*résultat = 4 cellules*)

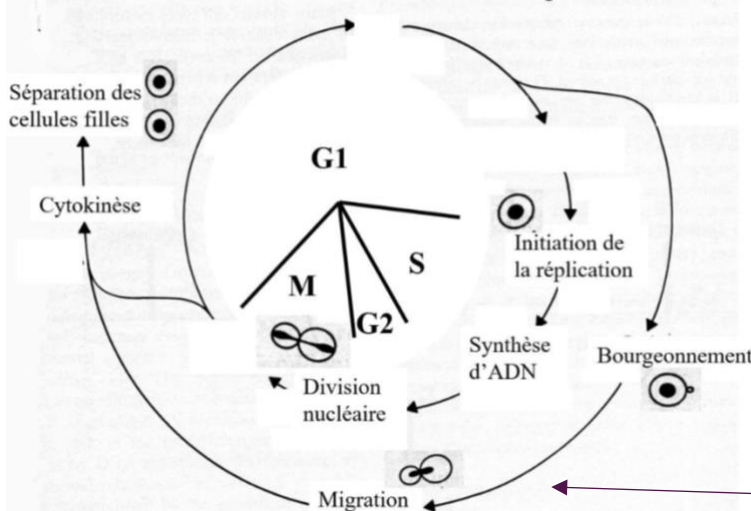
☹ La cellule en phase G2 (*cellule entourée en rouge*) a un peu progressé mais elle reste **bloquée**. Elle ne peut pas faire le cycle cellulaire. La mutation *cdc13* est bloquée quelque part entre **G2 et M**

⇒ 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 ++**

(« c'est juste un exemple » pour montrer comment les chercheurs ont progressé dans la compréhension des gènes essentiels pour le cycle cellulaire.)

Les mutants *cdc* montrent qu'il existe des suites d'événements dépendants les uns des autres et des suites d'événements indépendants



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

♡ La **mitose** implique que la **synthèse de l'ADN** a été complètement effectuée.

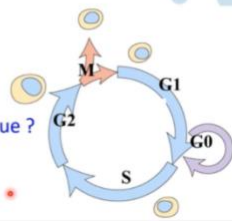
♡ La **synthèse de l'ADN** implique que l'initiation de la **réplication** a été faite.

→ Il y a une **série d'événements qui dépend des uns des autres**. Certains événements peuvent être découplés les uns des autres, passant par exemple de la phase G1 directement à la migration cellulaire. (Voir la partie sur les checkpoints.)

II) LES POINTS DE CONTRÔLES (CHECKPOINT) :

checkpoints: mécanismes de surveillance qui assurent l'ordre des phases du cycle cellulaire

- Division ?
 - nourriture, signalisation ou espace ?
- Passer à la prochaine étape ?
 - Étape précédente terminée ?
 - Endommagement du matériel génétique ?



Les checkpoints vérifient que les étapes sont bien terminées. Ce sont des contrôles de qualité. (En gros, ils s'assurent que tout va bien avant de passer à l'étape suivante.)

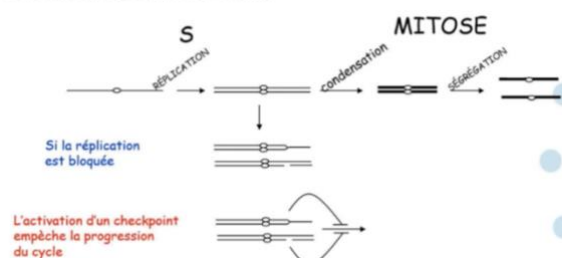
Checkpoints = points de contrôle.

Exemples : alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale, surveillance de la quantité 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.

Checkpoints: MÉCANISMES DE SURVEILLANCE QUI ASSURENT L'ORDRE DES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE



Maintenant, imaginez qu'il y ait un accident pendant la réplication (*oups*). Ça pourrait être un blocage de la réplication, manque de polymérase, ADN endommagé... Immédiatement, une cellule normale réagit : elle va **activer** un checkpoint (*ici checkpoint 113*) qui va **bloquer la progression de la réplication**. (=limiter les erreurs.)

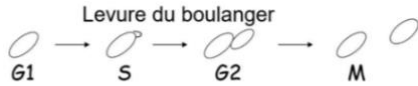
« Pour donner un ordre de grandeur du nombre de lésions : »

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

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

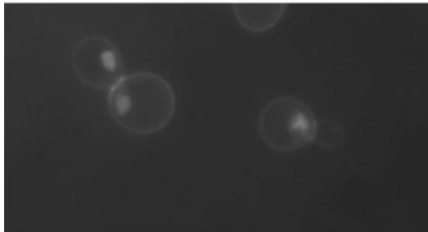
Dans les endommagements de l'ADN, les plus dangereux sont les **coupures doubles brins** : elles sont minoritaires mais les plus **dangereuses** (ce sont les plus difficiles à réparer sans créer d'autres dommages).



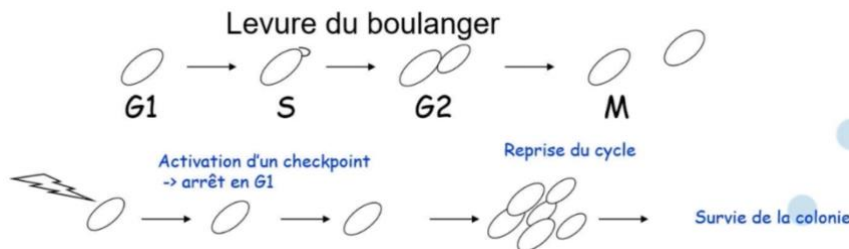
Différentes observations au microscope :

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
- ♥ Les cellules en G2
- ♥ Les cellules en phase M

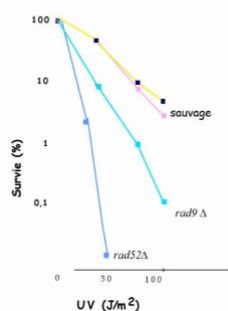


Irradiation d'une cellule normale sauvage :



On irradie les cellules en G1, et on va voir que la cellule ne va pas pouvoir répliquer son ADN parce qu'elle a plein de **dommages**. **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**.

Les mutants **rad** sont hypersensibles aux radiations



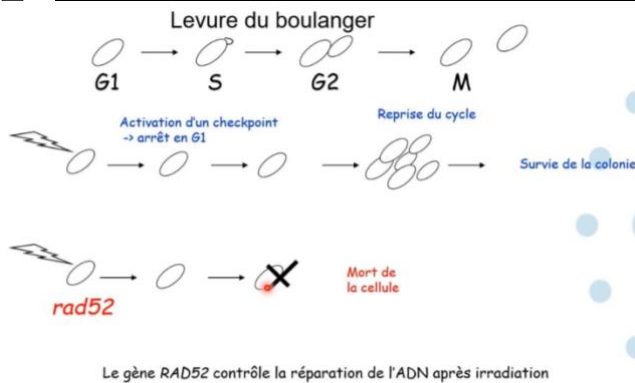
Rappel : pour étudier un phénomène cellulaire on fait souvent appel à la génétique. Ici, cela a été fait avec un autre type de mutants.

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** (exemple : rad52, rad9) : les cellules vont être **encore plus sensibles aux radiations**.

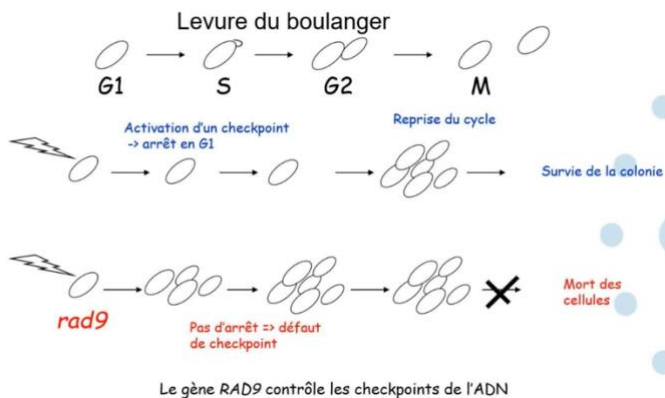
Irradiation d'une cellule qui porte une mutation de sensibilité de radiation au rad52.



La cellule s'arrête : on voit au microscope qu'elle va **mourir**. Donc son checkpoint est **actif**. Ce qui signifie que le produit du rad52 n'est pas impliqué dans le checkpoint. En revanche, comme la cellule 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.

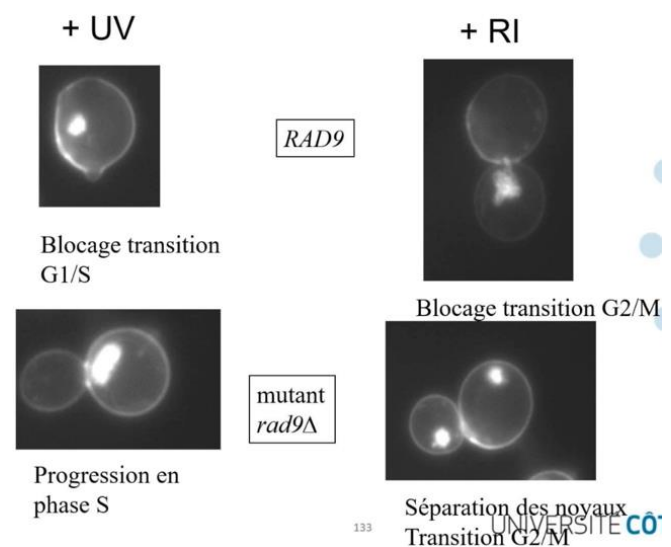
Ces découvertes ont permis de faire toute une série d'expériences et de :

- ❖ Variation du type de dommages
- ❖ Regarder si ces mutants sont :
 - Mutants **généraux** pour différents types de dommages.
 - Mutants **spécialisés** dans un certain type de dommages.

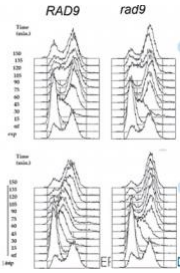
Par exemple : en comparant des radiations UV et des radiations ionisantes.

On s'aperçoit que quelque soit le « donneur de dommages », le même gène **rad9** (checkpoint) est capable d'induire :

- Un **bloquage de la transition G1/S**
- Un **bloquage de la transition G2/M**



Traitement d'une cellule qui porte des agents chimiques de MMF :



+ MMS
agent alkylant qui bloque
la progression de la fourche
de réplication

On peut 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 lui-même va bloquer la progression de la fourche.

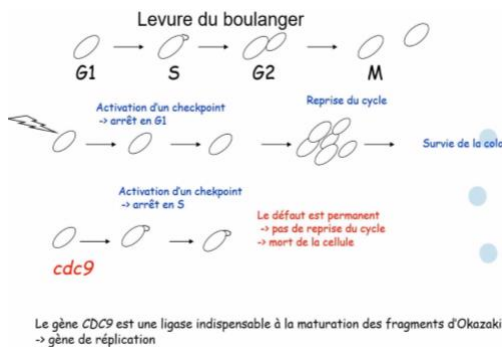
On va suivre le destin de cellules qui ont été traitées au MMF dans :

- ♥ Une cellule de levure sauvage
- ♥ Une cellule mutée pour rad9

Résultat de la cytométrie 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 (exemple : **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*) 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**.

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

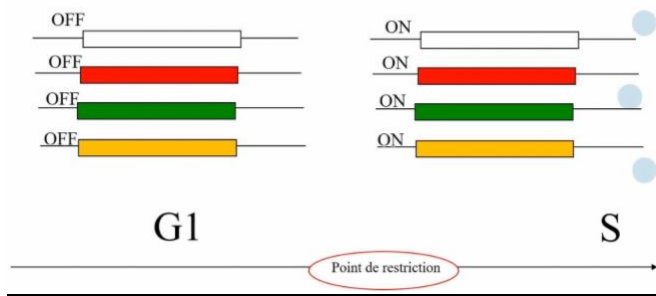
Pour cela, les chercheurs ont fait une étude d'**épistasie** : ils ont couplé les 2 mutations ensemble (*dans la même cellule*) = **cdc9 + rad9**. Afin de voir si rad9 est aussi un **checkpoint d'un défaut mitotique** créé par une mutation endogène.

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** (par exemple **cdc9**) sont **universels**, quel que soit le type de dommage ou de type de transition. 📖 « C'est vraiment le cœur de la fonction des cellules. »

8

La transition G1-S nécessite la transcription de nombreux gènes

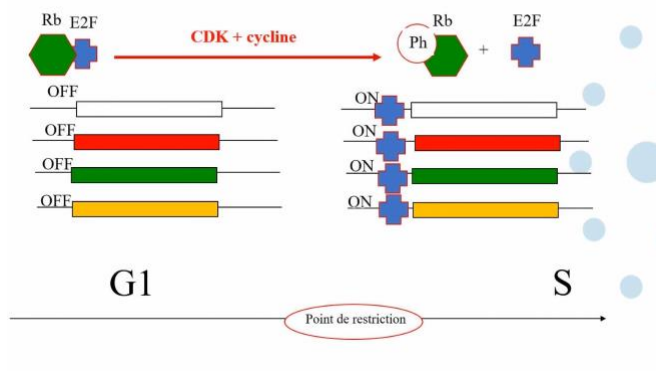


Régulation de la transcription :

L'expression de ces gènes (*polymérase, ligases, hélicases, etc*) est **réprimée** pendant la **phase G1**, et le fait qu'ils soient activés « **ON** » en début de **phase S** va faire que la cellule peut **se répliquer**.

⇒ Le contrôle de l'expression de ces gènes est la cible de ces mécanismes de **régulation** de la **transition G1/S**

La protéine Rb inhibe les facteurs E2F



Facteurs de transcription : **famille E2F**

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

Quand les gènes E2F sont « on », E2F peut se fixer **sur le promoteur** et **activer la transcription** de ces gènes.

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

CDK + cycline va **phosphoryler Rb**, ce qui libère **E2F** et **l'activer**.

Petite explication :

Avant la réplication, E2F est inactif, car il est séquestré par Rb. (Vous voyez sur le schéma ils sont liés et E2F ne peut donc pas se fixer)

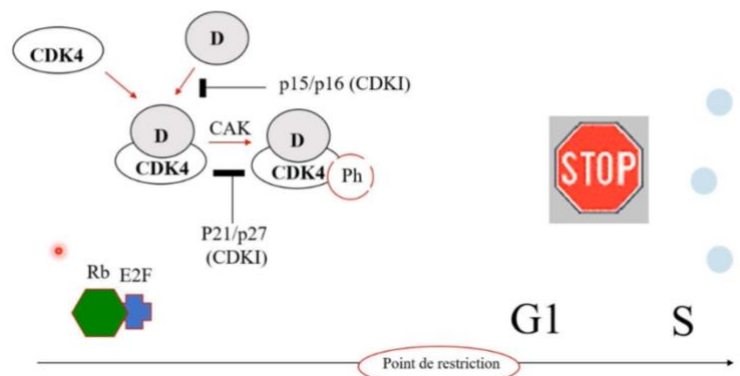
Ce qui va permettre la cellule de passer en phase S, c'est la phosphorylation de Rb. Rb va donc lâcher E2F et E2F va pouvoir faire son boulot et se fixer au promoteur.

A. Les étapes de la transition G1/S

Étape 1 : MISE EN PLACE ET RÉGULATION DU COMPLEXE CYCLINE D/CDK4

- En début de G1 : la cellule commence à recevoir des **ordres** pour se diviser qui vont agir sur les complexes **cycline/CDK**.
- Le premier complexe cycline/CDK à être activé est le complexe **cycline D/CDK4**
- Pour que l'activité kinase de ce complexe soit active :
 - Les deux protéines doivent **s'assembler**
 - Il faut que **cycline D** soit produite et interagisse avec **CDK4**

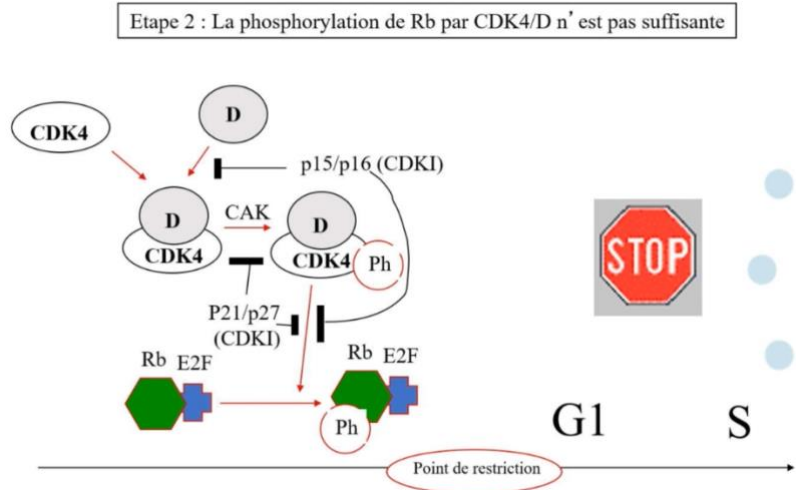
Etape 1 : mise en place et régulation du complexe Cycline D/CDK4



Étape 2 : LA PHOSPHORYLATION DE Rb PAR CDK4/D N'EST PAS SUFFISANTE

- Une fois que le complexe a interagit, il doit encore être **phosphorylé** par une autre kinase : la kinase **CAK**. Elle va activer ce complexe cycline/CDK4.
- Cycline/cdk4 activé va phosphoryler Rb.

Sur le schéma, on voit pleins de protéines (*p15*, *p16*, *p21*, *p27*... => ça correspond respectivement à des protéines de 15 000, 16 000, 21 000, 27 000... c'est juste pour expliquer leurs noms)

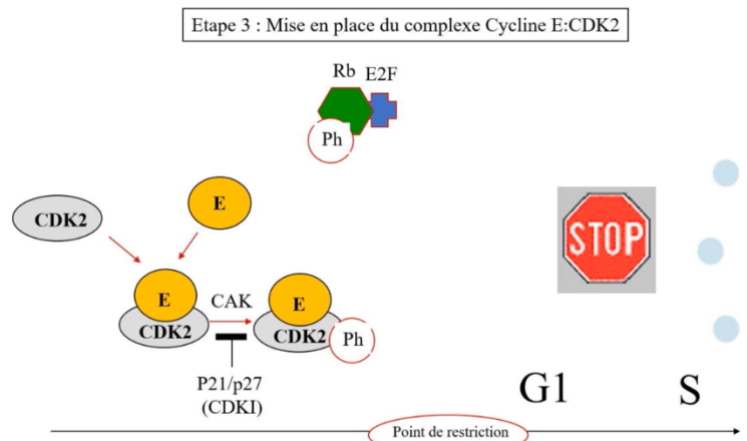


- Ces protéines sont des **CDKI** (le I c'est pour inhibiteurs donc -> CDKI = inhibiteurs des CDK ☺). Elles agissent comme des « **pédales de frein** ». En fonction du contexte on peut avoir besoin de **ralentir** le cycle cellulaire pour limiter la division, et dans ces cas-là on appuie sur la pédale de frein en **exprimant le produit** de ces gènes (*p15*, *p16*) qui vont **inhiber** différentes étapes d'activation (*formation du complexe cycline D-CDK4*, *l'activation par CAK*, *phosphorylation du Rb*...). Certains peuvent agir à plusieurs niveaux.

Étape 3 : MISE EN PLACE DU COMPLEXE E/CDK2

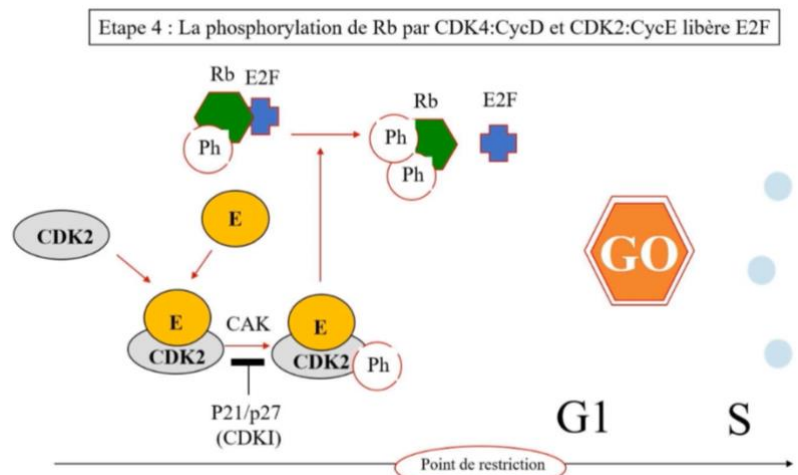
La phosphorylation de Rb par cycline D/CDK4 n'est pas suffisante puisqu'une deuxième phosphorylation est nécessaire.

- Un autre complexe **cycline E/CDK2** va phosphoryler à son tour Rb.



Étape 4 : LA PHOSPHORYLATION DE Rb PAR CDK4-CYCLINE D ET CDK2-CYCLINE E LIBÈRE E2F

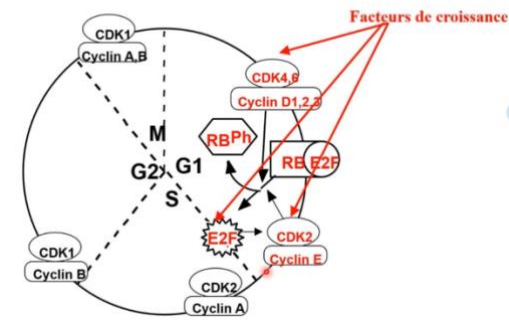
- Phosphorylation :
 - **CAK** active
 - **CDK** inhibe
 - **Rb** finit (si le complexe est actif) **HYPERphosphorylé**
- C'est le Rb hyperphosphorylé qui va **libérer E2F** : ce qui permet de **passer la transition G1/S**



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'action successive de ces **2 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** (#répétition)

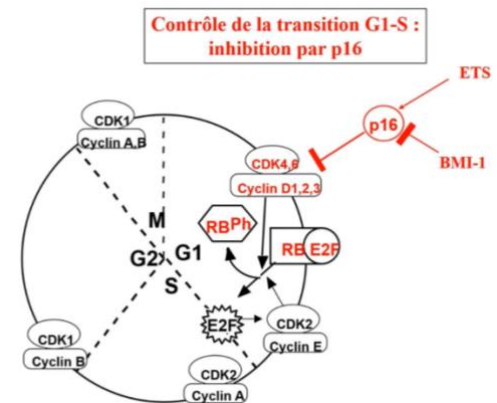


SIGNALISATIONS

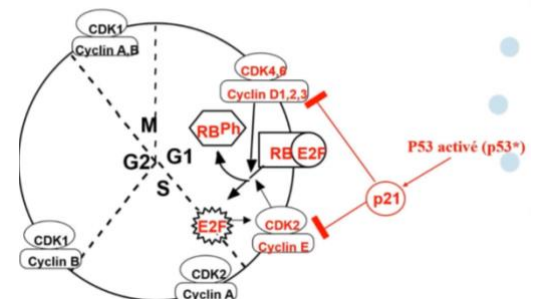
- La « **pédale d'accélération** » : les signaux en amont sont les **facteurs de croissance**, ce sont des signaux activateurs
- La « **pédale de frein** » : Elle est activée en amont, avec des **facteurs de transcription** (ETS) ou d'autres **inhibiteurs** (BMI-1 *c'est qu'un exemple*) qui vont réguler. Ce sont donc 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. La cellule va intégrer ces infos pour déterminer si elle se divise ou pas.
- Ces signaux vont agir sur :

❖ P16

- ❖ **P21**, qui est lui-même sous la dépendance d'une protéine p53 (qui est un grand centre d'intégration de l'information dans la cellule). P53 est un facteur de transcription qui a beaucoup de gènes sous sa dépendance d'expression. P21 est directement activé par p53 = appuyer sur la pédale de frein.



Contrôle de la transition G1-S : inhibition par p53/p21

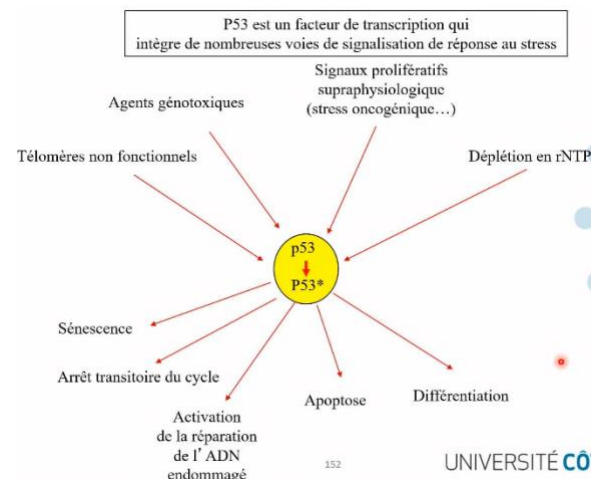


IV) P53 ET CANCERS

1. 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 proliférations supra physiologiques** résultent 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. P53 est activé de différentes façons. Il y a pleins 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 activer :

- La **sénescence cellulaire** : vieillissement cellulaire (*vous verrez le vieillissement cellulaire avec mon co-tut*)
- **Arrêt transitoire du cycle** = le temps de réparer les dommages puis de repartir.
- **Réparation de l'ADN** s'il y a endommagement
- **Activation des gènes pro-apoptotiques** = suicide cellulaire (*on reverra ça dans la leçon sur les morts cellulaires don't worry*)
- **Différenciation et un arrêt du cycle.**

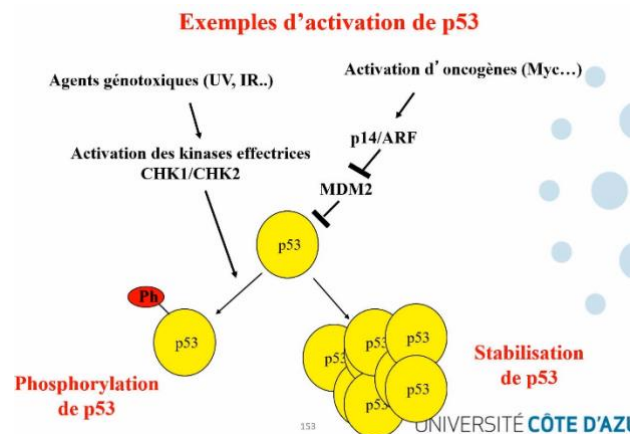
IL EXISTE DEUX VOIES D'ACTIVATION DE P53 :

♥ Par modification post-traductionnelle de P53

1. Des **agents génotoxiques** (UV, RX...) activent à travers une cascade d'événements 2 couples de **kinases effectrices** : **chk1/chk2**
2. Les kinases effectrices 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. **MDM2 est inhibé** (*on a inhibé l'inhibiteur de p53 donc on a activé p53 indirectement*)
4. **Stabilisation** de la quantité p53 (*le but ici est d'augmenter la quantité de p53*).



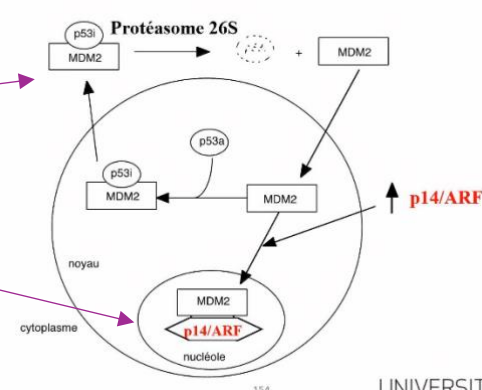
COMMENT AGISSENT MDM2 & p14 ?

MDM2 = protéine qui **inhibe** p53, elle joue un rôle de **navette** entre noyau et cytoplasme.

Elle interagit avec p53 qui est localisée dans le **noyau**. Une fois qu'on a un **complexe MDM2/p53** qui est formé dans le nucléoplasme, il est exporté dans le **cytosol** où il va être pris en charge par le **protéasome 26S** et **dégradé**. P53 peut être synthétisée mais elle présente très peu de quantité parce qu'elle **est rapidement dégradée**.

En cas de signal **oncogénique**, **p14/ARF** est activé. P14/ARF va interagir avec MDM2 pour **l'empêcher d'aller dégrader p53**. P14/ARF va **séquestrer MDM2** dans le nucléole donc P53 ne sera pas dégradé. P53 devient **stabilisé**, il peut agir comme facteur de transcription et rentrer en sénescence, apoptose, etc...

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



2. Altération et pathologies

Tous ces mécanismes peuvent être altérés au cours du processus cancéreux, en agissant à différents niveaux

Par exemple :

Inactivation de Rb

Un certain nombre de cancers vont inactiver Rb. Rb est un « **gène suppresseur de tumeurs** » ++ : c'est-à-dire qu'en 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

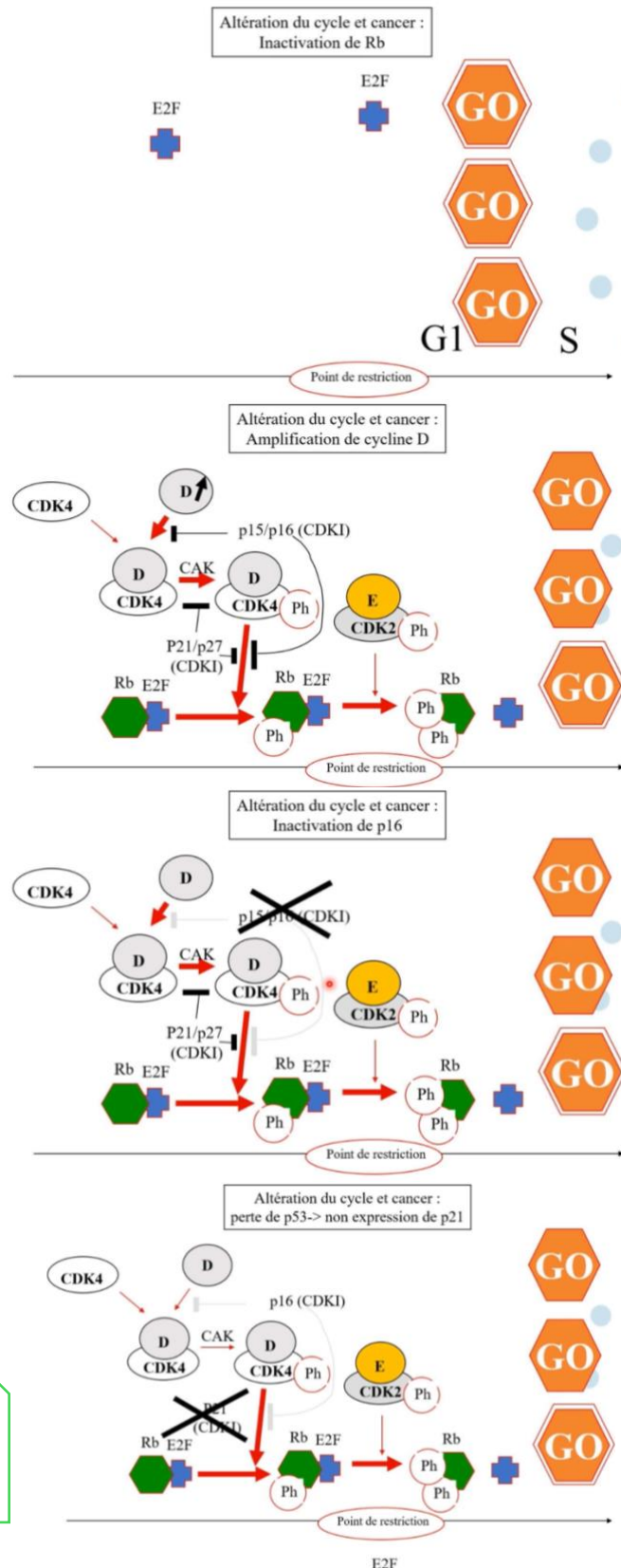
On retrouve dans le cancer des amplifications du gène de la cycline D : s'il y a beaucoup plus de cycline D, on va favoriser cette activation et on va plutôt avoir tendance à appuyer de manière trop importante sur la **pédale d'accélérateur**.

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 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.



P53 est tellement important dans l'homéostasie cellulaire qu'il est inactivé dans environ la MOITIÉ de tous les cancers.

Pour avoir un cancer :

- On suractive les oncogènes (=gène qui permettent le développement et la multiplication normale des cellules, donc une suractivation entraîne une multiplication trop importante.)
- On désactive les gènes suppresseurs de tumeur (=gène qui permettent d'arrêter une cellule qui se multiplierait trop, si on les désactive le cancer progresse facilement.)

Néanmoins, si l'une des deux conditions est déjà remplie le risque de cancer est accru.




V) RÉGULATION DE LA RÉPLICATION

A. La vitesse de réplication et les origines

⇒ *Le mécanisme enzymatique de la réplication est enseigné dans le cours de la biologie moléculaire*

Quelques ordres de grandeur sur :

- La vitesse de réplication
- Les origines de réplifications

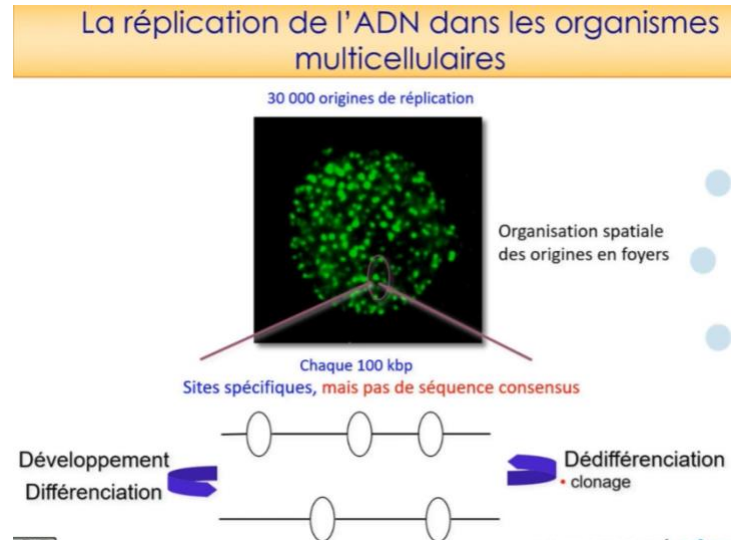
	Genome	Taille	vitesse	Durée	Origines	Commentaire
	E. coli	4.6 Mbp	60 kb/min	40 min	1	Compatible avec durée du cycle
	Levure	14 Mbp (1 cm)	3 kb/min	20 min	330	La réplication durerait 40 heures avec 1 origine 1 l culture = $4 \cdot 10^{10}$ cellules → 400 000 km ADN synthétisé (Distance terre-lune)
	Human	3 Gbp (2 m)	3 kb/min	7 h	30 000	La réplication durerait une année avec une origine 2.10 ¹³ km ADN synthétisé (2 années lumières) pendant notre vie (10 ¹⁶ cycles cellulaires)

BACTERIE ESCHERICHIA COLI (E.Coli)	<ul style="list-style-type: none"> - Petit génome procaryotique - Vitesse de réplication de 60 000 bases environ par minute - Réplication totale du génome de <u>40 min</u> avec une origine de réplication - C'est une bactérie qui va se diviser <u>entre 30 min et 1h</u>
LEVURE	<ul style="list-style-type: none"> - Organisme <u>unicellulaire</u> mais eucaryote (attention à ne pas confondre, le prof insiste dessus) - <u>ADN structuré</u> de manière <u>plus complexe</u> : avec une chromatine plus condensée que celle des bactéries - Vitesse de réplication moins importante : environ <u>3 000</u> paires de bases par minute - Génome très important : nécessité <u>d'avoir plusieurs origines</u> de réplication - Il y a un équilibre entre le <u>nombre d'origines</u>, la <u>taille du génome</u> et la <u>vitesse de réplication</u> - Réplication de l'ADN : environ en 20 min. Si on avait qu'une seule origine de réplication dans le génome de levure, ça prendrait environ 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 → <u>400 000 km d'ADN synthétiser</u> (environ la distance : terre - lune) (<i>c'est trop impressionnant wow</i>)
HOMME	<ul style="list-style-type: none"> - Génome <u>encore plus grand</u> - Structure de la chromatine qui ressemble beaucoup à la levure, à peu près 3 000 paires de bases par minute - On divise notre génome pendant la phase S en <u>7 heures environ</u> - Beaucoup plus d'origine : si on avait qu'une seule origine de réplication, il faudrait environ 50 ans pour faire un bébé. Donc le <u>nombre d'origines</u> est <u>très important</u> pour que le temps de division de la cellule soit <u>compatible avec la vie</u>.

B. Aspects cellulaires de la réplication

On peut regarder où sont localisées ces origines de réplication (30 000 dans le noyau de la 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 <u>séquences consensus</u> . 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. Ⓢ PROBLÈME : 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 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), mais **c'est un phénomène épigénétique** 📖📖

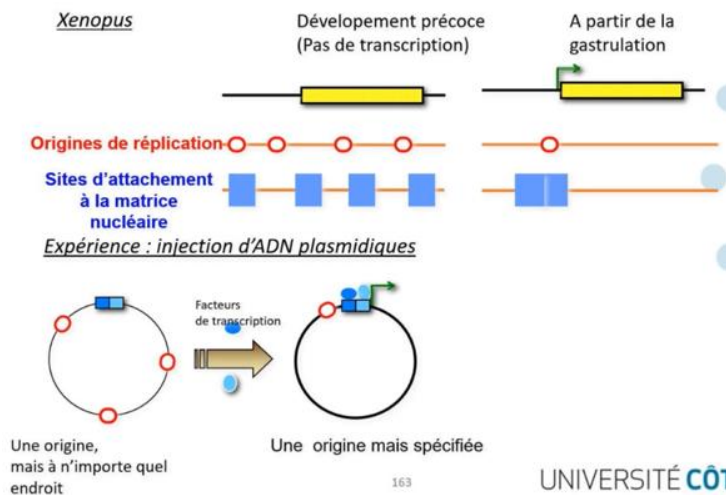
N.B. : Par exemple, lors de différenciation du clonage ou de la reprogrammation des cellules, il y a une modification de la localisation des origines de réplication.

C. Origines de réplifications régulées au cours du développement :

Exemple : Cartographie des origines de réplication chez le crapaud xenopus pour étudier le développement précoce

→ Il n'y a pas de **transcription** : celle-ci commence qu'à partir de la **gastrulation** (transcription des gènes).
 Donc 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.

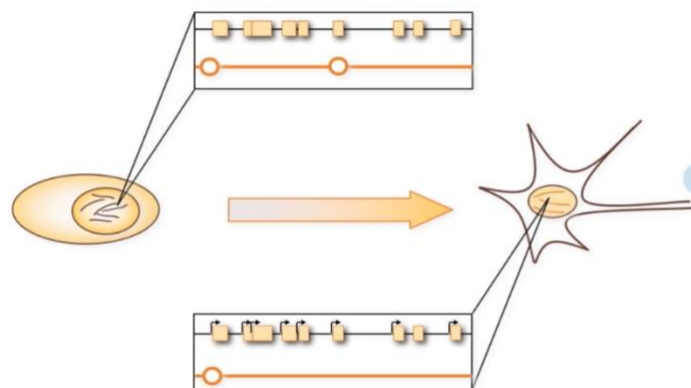
Origines de réplication :

Il y a beaucoup d'origines qui sont utilisées dans les **cellules pluripotentes**. La différenciation s'accompagne généralement d'une **restriction** dans les 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**. Il y a un couplage direct entre la différenciation et la façon dont les cellules se répliquent.

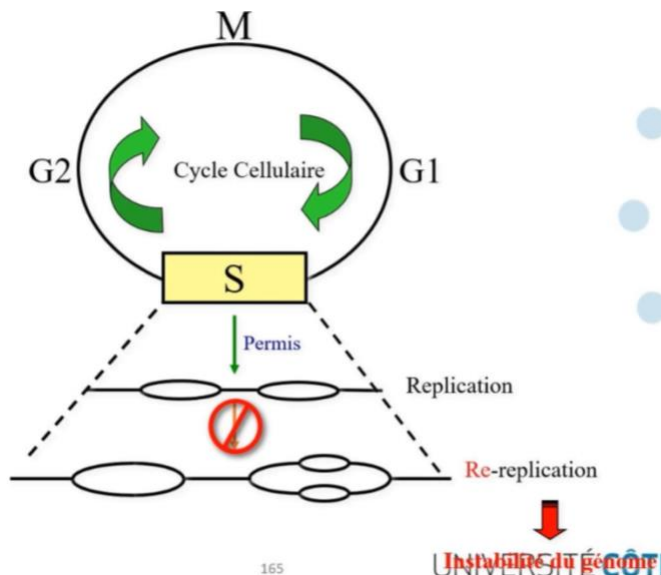
① De nombreuses origines sont utilisées dans les cellules pluripotentes



② La différenciation s'accompagne d'une restriction dans l'usage des origines

D. « Permis de répliquer » une fois

📖📖 Le permis de répliquer une fois et une **SEULE** fois est important 📖📖

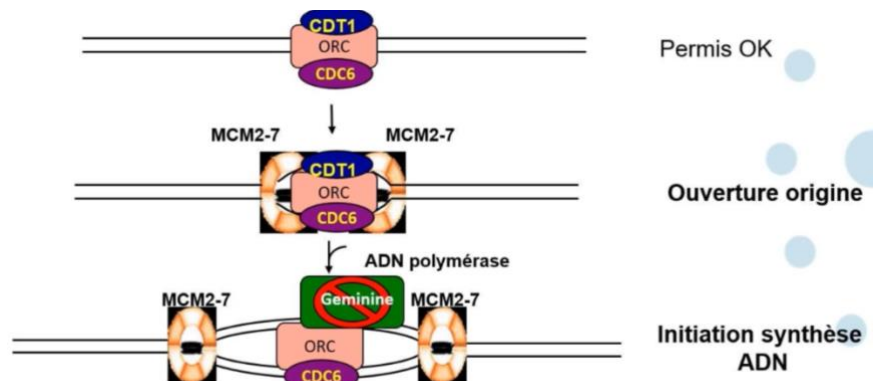


Si vous initiez au cours du même cycle cellulaire **plusieurs fois la réplication**, vous allez avoir des problèmes de **stabilité** du génome. Ce qui veut dire qu'il y a un mécanisme, qui fait que quand une origine est activée au cours de la phase S, **elle ne peut pas s'activer une deuxième fois**. 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**. +++

Facteur 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 Replication 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 qui sont les **hélicases**.
3. Ce facteur agit de concert avec une protéine qui s'appelle CDC6.
ORC + CDT1 + CDC6 : permet de répliquer. 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 MCM2 jusqu'à MCM7. 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). Le gémimine une protéine qui arrive et qui va **inhiber** CDT1.
7. CDT1 s'en va et donc **il ne peut pas y avoir de re-réplication puisqu'il faut CDT1 pour répliquer**.

(Beaucoup de bla bla pour dire que la réplication est initiée par ORC + CDT1 + CDT6. Ces 3 là vont recruter les hélicases (= vous l'avez vu en bio mol les hélicases permettent d'ouvrir la double hélice pour permettre le passage des polymérase, bref...). Bon bah pour empêcher que la même origine de réplication soit utilisée, on a gémimine qui va inhiber CDT1. S'il n'y a pas CDT1 alors la réplication n'est pas initiée donc PAS DE RE-RÉPLICATION. Et c'est tout ce qu'il faut comprendre)

Excès de CDT1 induit une ré-réplication

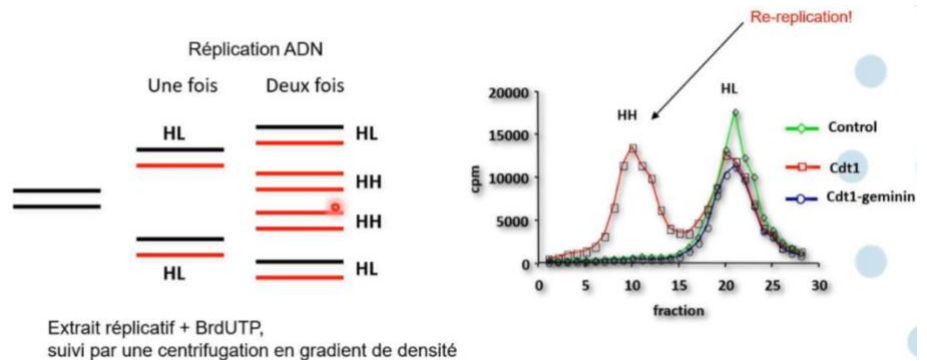
Si on agit sur ce phénomène en conditions expérimentales par exemple, en donnant un excès de CDT1 à la cellule.

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.

(Re, ici on dit juste que TROP DE CDT1 = TROP de réplifications)

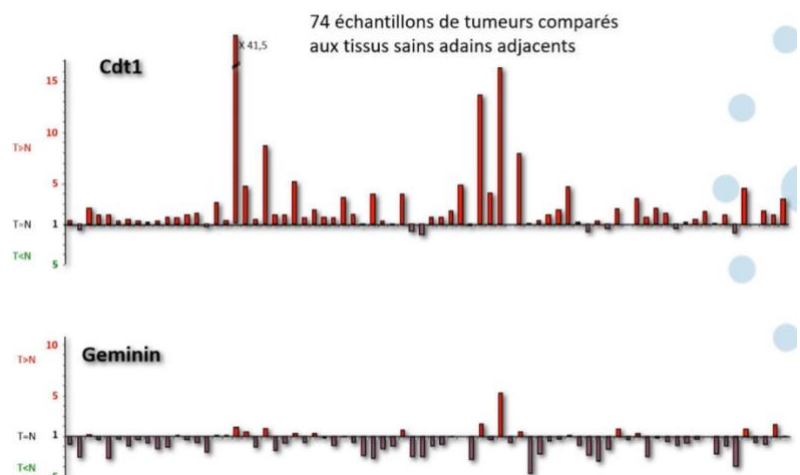


CDT1 surexprimé dans des cancers colorectaux

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 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 Gemini à plutôt tendance à être réduite. (C'est vicieux un cancer)



C'est la fin et c'est le moment des dédis (enfin)

Dédi à mes parents qui sont toujours au top et avec qui je ris beaucoup. C'était court ce WE mais je reviens TRÈS vite #boomerang

Dédi à mes amis tuteurs, j'ai passé une super TTR avec vous, je suis trop contente de vous avoir rencontré

Dédi à mes co-tuts avec qui je suis liée à vie dans l'adoration du St Gigi pour le meilleur et pour le pire

Dédi à mes p2ettes 💖 Ophélie et Camilia stay coquette, very demure, very cutesy and very mindful

Dédi à mes fillottes et mon fillot officieux, courage on est avec vous. Je suis fière de vous les enfants 🌟

Dédi à tous les las1/2/3 vous êtes infiniment plus forts que vous le pensez être, la p2 vaut le coup je vous jure vous ne souffrez pas pour rien

Dédi à mes amis de Hyères, l'été avec vous me manque déjà

Dédi à ma meilleure amie, Sara, avec qui je fête nos 10 ans d'amitié 🥰 Nice sans toi c'est nul, tu me manques et j'ai hâte de fêter nos noces d'étain autour d'un gâteau et des gossips