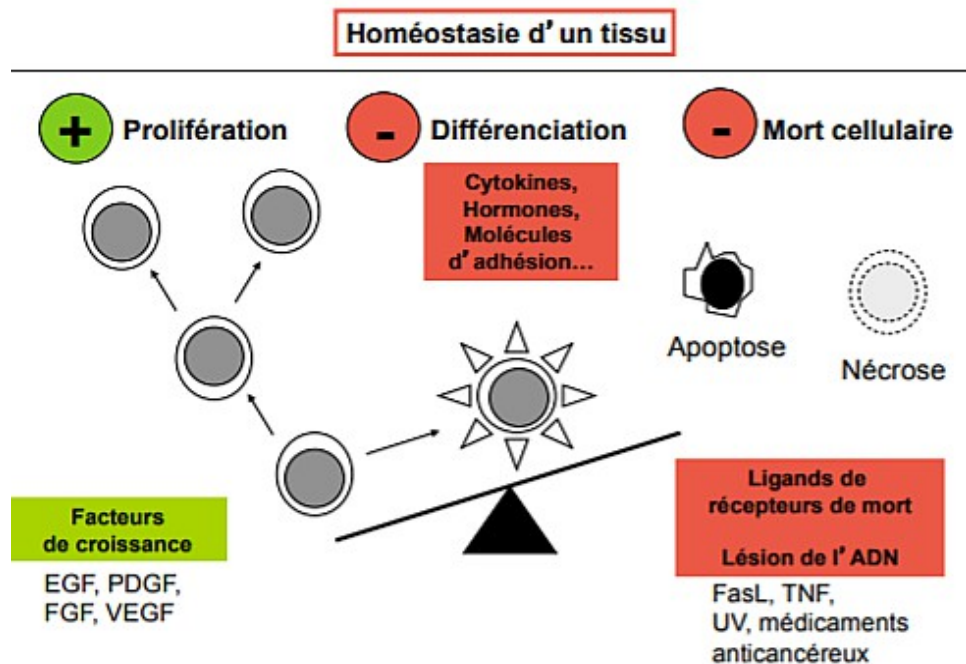


PROLIFÉRATION CELLULAIRE



I. Définition du cycle cellulaire

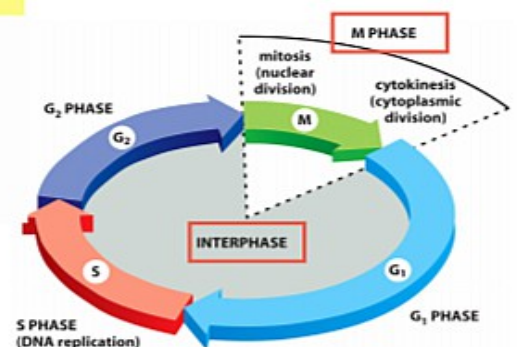
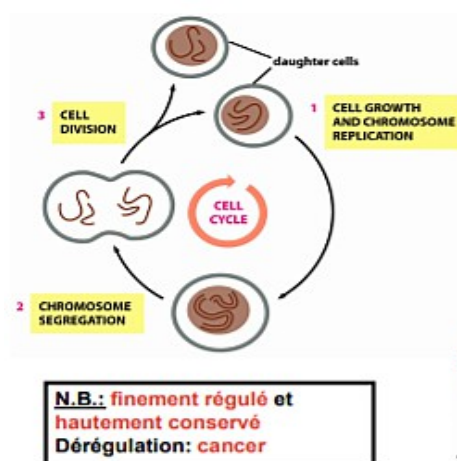
Cycle cellulaire → phases conduisant à la division d'une cellule mère en 2 cellules filles génétiquement identiques.

- (1) la cellule augmente de taille
- (2) réplique ses chromosomes
- (3) Ségrégation des chromosomes
- (4) Division de la cellule : donne 2 cellules filles génétiquement identiques à la cellule mère.

Chaque phase est finement régulée avec des mécanismes hautement conservés.

Observés dans les levures et les œufs de xénopes.

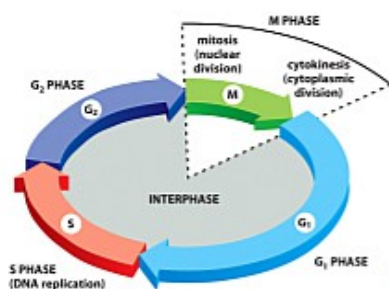
Si dérégulation il y a → KC



Le cycle cellulaire est composé de 2 grandes phases :

- **Interphase** : prépare les cellules pour se diviser
 - Phase G1 : prépare les cellules pour leur permettre de répliquer leur ADN
 - Phase S : réplication de l'ADN
 - Phase G2 : prépare la cellule pour rentrer dans la phase M
- **Phase M** :
 - Mitose : division du noyau
 - Cytotédièrese : division du cytoplasme

II. L'interphase



II- L' interphase

Cellules quiescentes
G0: Gap (intervalle) 0:

Facteurs de croissance

Interphase:

Transcription, traduction, réplication
Augmentation du volume cellulaire
Modifications morphologiques

Phase G1: Gap 1: Synthèse de protéines de la réplication.
Duplication des centrosomes
Contrôle de la qualité de l'ADN

Phase S: Réplication de l'ADN

Phase G2: Gap 2:
Contrôle de la qualité de l'ADN
synthèse du complexe protéique «condensine»
Synthèse de protéines de la phase M

La plupart des cellules de l'organisme sont quiescentes → ne prolifèrent pas et restent en G0

Pour que les cellules prolifèrent, il faut un environnement adéquat et notamment des facteurs de croissance (ex : EGF) afin de faciliter l'activation de la voie des MAPK (MAP Kinases) → cellules rentrent en interphase

Pendant l'interphase :

- transcription de gènes en ARNm
- traduction ARNm en protéines
- Réplication de l'ADN pour permettre la ségrégation de l'ADN et la répartition chez les 2 cellules filles

- Augmentation du volume de la cellule
- Modifications morphologiques

ex : si cellule adhérente à la base, elle va se détacher de son support pour faciliter la division et les cellules filles vont se ré-attacher aux autres cellules constituant le tissu ou à la MEC.

1ère phase : G1

Préparation des cellules pour permettre la réplication de l'ADN

Se traduit par :

- synthèse de protéines impliquées dans la réplication
- Duplication des centrosomes → centres organisateurs des microtubules qui permettent la formation du fuseau mitotique constitué de microtubule (permet la ségrégation)
- Contrôle de la qualité de l'ADN : si il y a mutation il faut engager le système de réparation

2ème phase : S

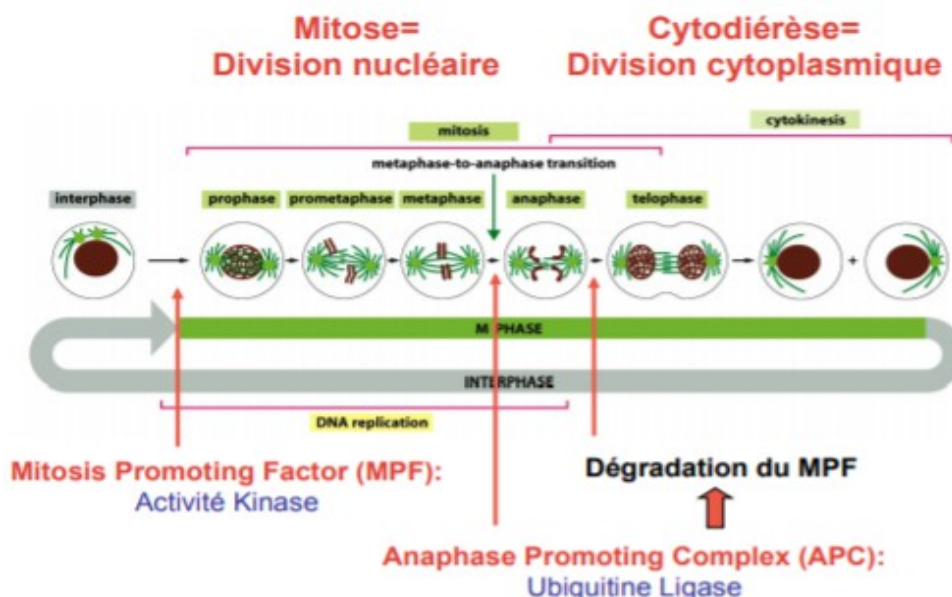
Réplication de l'ADN : contenu en ADN génomique doublé

3ème phase : G2

Prépare la division cellulaire : entrée des cellules dans la phase M

- contrôle qualité de l'ADN
- Synthèse de la **condensine** → complexe protéique qui s'associe aux chromosomes et permet la condensation des chromosomes
- Synthèse de protéines de la phase M

III. La phase M



Phase M → Transmission de l'information génétique lors de la division d'1 cellule mère en 2 cellules filles

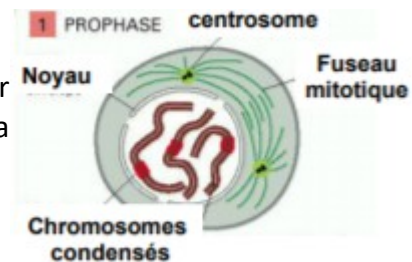
- Mitose : Division du noyau
 - (1) Prophase
 - (2) Prométaphase
 - (3) Métaphase
 - (4) Anaphase
 - (5) Télophase

Il y a 2 grands complexes qui jouent un rôle critique dans la prolifération des cellules en phase M

- MPF : Mitosis Promoting Factor
 - Activité Kinase
- APC : Anaphase Promoting Complex
 - Activité Ubiquitine ligase : permet de dégrader des protéines formant le MPF

La prophase :

Déclenchée par le MPF avec activité kinase qui va permettre de phosphoryler différentes protéines (Intégrines, Lamines, Histones, ..) → modification de la conformation des protéines → modifications de l'activité biologique



Morpho générale :

Cellules sphériques grâce à :

- cytosquelette remanié
- Phosphorylation des intégrines → facilite le détachement des cellules du support
- Modification des jonctions cellulaires → facilite la dissociation des cellules voisines

Cytoplasme :

- Assemblage du fuseau mitotique : 2 centrosomes reliés entre eux par des microtubules du fuseau mitotique

Noyau :

Enveloppe nucléaire intacte

Chromosomes fortement condensés → facilite leur ségrégation équitable entre les 2 cellules filles, possible grâce à la phosphorylation des Histones via le MPF → facilite le recrutement des protéines du complexe Condensine

Prométaphase :

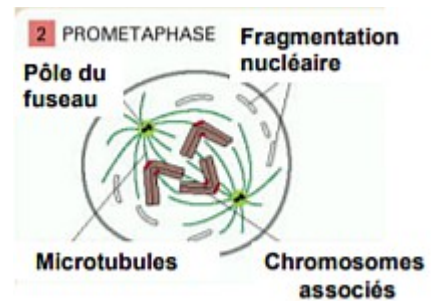
Cytoplasme :

- Migration des centrosomes au pôle opposé du noyau

Noyau :

Rupture de l'enveloppe nucléaire liée à :

- la phosphorylation des Lamines → déstabilise le réseau de Lamines → déstabilise l'enveloppe nucléaire
- Traction des Microtubules sur l'enveloppe nucléaire

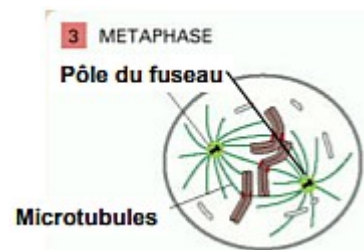


Association des chromosomes avec les microtubules du fuseau mitotique pour éviter la dispersion des chromosomes

Métaphase :

Alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale grâce à :

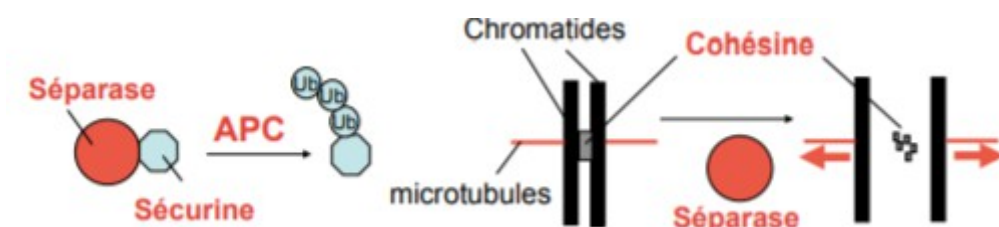
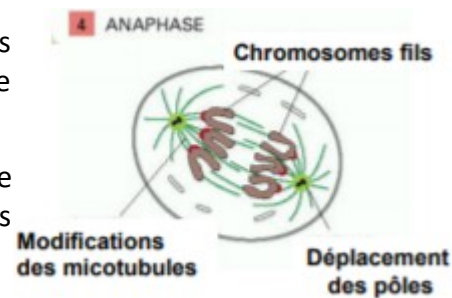
- l'action des protéines motrices des microtubules : kinésines, dynéines
- l'instabilité dynamique des microtubules



Anaphase :

Séparation physique des chromatides sœurs qui se retrouveront aux pôles opposés de la cellule grâce à l'activation de l'APC avec activité Ubiquitine Ligase qui va :

- PolyUbiquitinyler la Sécurine : interagit avec la Séparase (enzyme qui facilite la séparation des 2 chromatides sœurs dans les cellules en cours de division en dégradant la Cohésine)
- (1) Sécurine liée à la Séparase
 - (2) PolyUbiquitinylation de la Sécurine → Libération de la Séparase
 - (3) Dégradation de la Cohésine par la Séparase
 - (4) Séparation des 2 chromatides sœurs → migration progressive vers le pôle opposé grâce aux microtubules



Telophase :

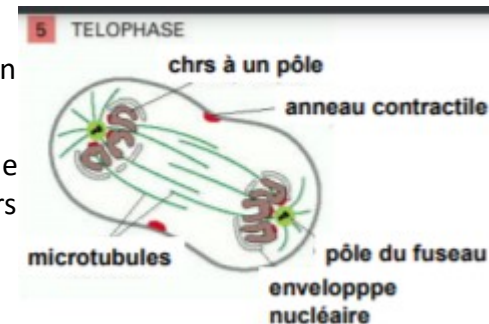
Inactivation du MPF par l'APC → dégradation du MPF

Il existe des phosphatases constitutivement actives qui vont déphosphoryler les substrats du MPF (Lamines, Histones, ..) ce qui permet de rentrer en Télaphase.

Cytoplasme :

- Jeux identiques de chromosomes au pôle opposé de la cellule en division
- Face cytoplasmique de la MP : ébauche de l'anneau contractile qui va faciliter la séparation physique des 2 cellules filles en cours de division

Anneau contractile constitué de Myosine II + Actine



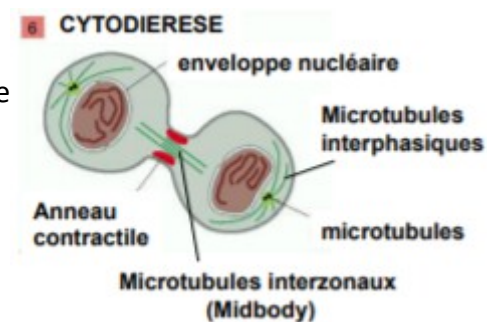
Noyau :

Ré association de l'enveloppe nucléaire car déphosphorylation des lamines

Cytodiérèse :

Séparation physique des 2 cellules filles

- (1) contraction de l'anneau contractile : formation d'un sillon de clivage
- (2) Dépolymérisation des Microtubules interzonaux (=midbody)
- (3) Désassemblage de l'anneau contractile
- (4) Fusion des membranes respectives



Les 2 centrosomes se retrouvent chacun dans une cellule fille et à partir de ces centrosomes émanent des microtubules interphasiques.

III.A. Morpho des chromosomes au cours du cycle

Phase quiescente G0 / G1 / Mitose / Anaphase / Télaphase : jeux de chromosomes avec 1 seule chromatide constituée :

- 1 bras court
- 1 bras long
- reliés entre eux par une unité centromérique : le centromère
- aux extrémités : seq télomériques : télomères qui stabilisent le chromosome

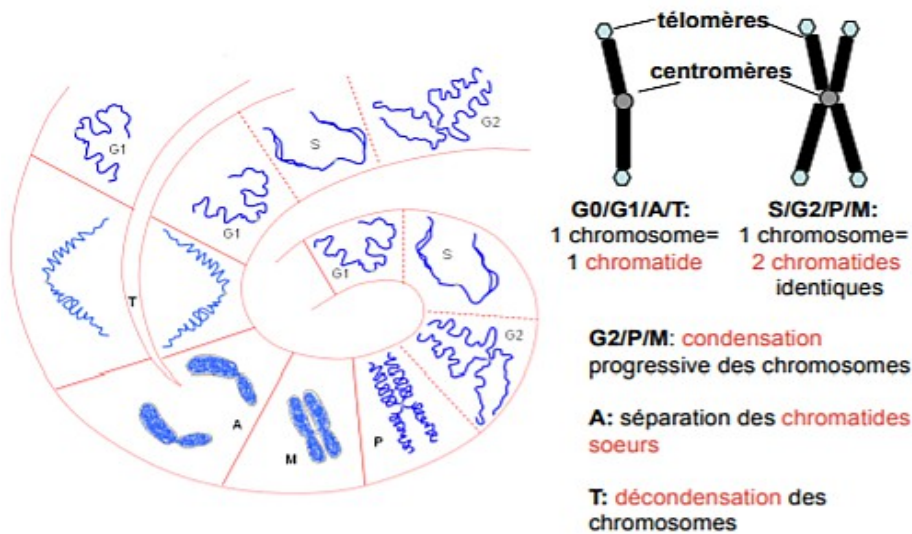
Anaphase : séparation des chromatides sœurs

Télaphase : Décondensation progressive des chromosomes par activation du MPF

Suite à la réplication (Phase S) / G2 / Prophase / Métaphase :

Les chromosomes vont se retrouver avec une morpho différentes : ils seront constitués de 2 chromatides identiques (2 bras courts, 2 bras longs + seq centromériques)

Condensation forte et progressive à partir de la phase G2, il y a une augmentation en prophase, et elle est **maximale au cours de la métaphase**



III.B. Désassemblage et ré-assemblage de l'enveloppe nucléaire

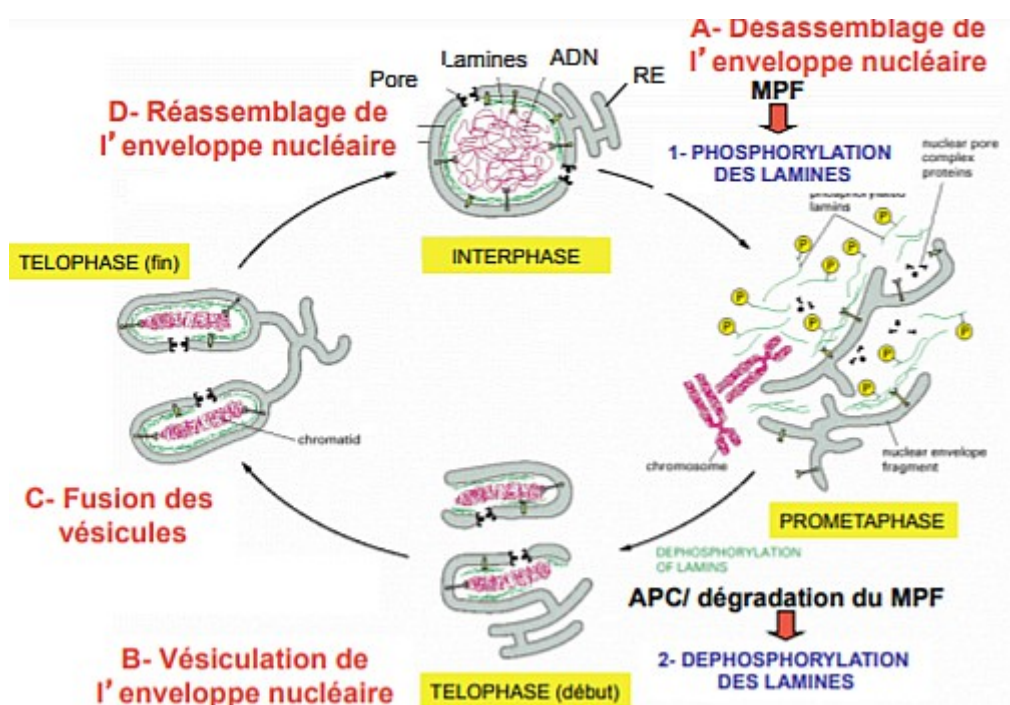
C'est lié à la phosphorylation des Lamines qui tapissent l'enveloppe nucléaire (coté intérieur = coté matrice nucléaire) et qui permettent de stabiliser l'enveloppe nucléaire.

Interphase : Lamines stabilise enveloppe nucléaire

Prométaphase : intervention du MPF qui phosphoryle les Lamines → déstabilisation du réseau de Lamines = désassemblage de l'enveloppe

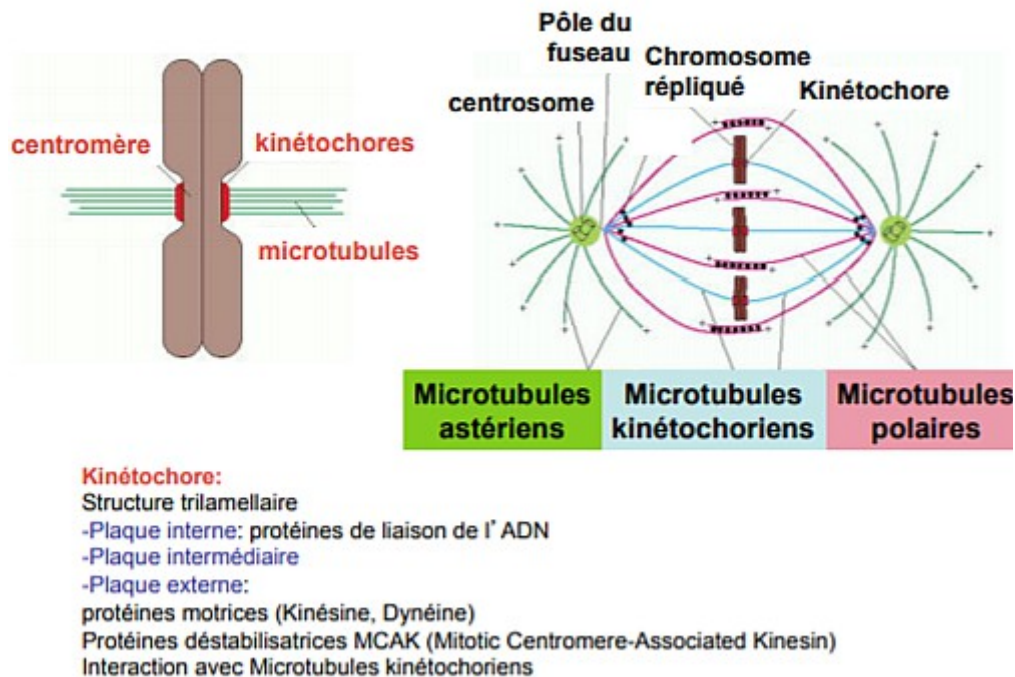
Anaphase : APC avec activité Ubiquitine Ligase va dégrader le MPF + phosphatases constitutivement actives qui vont déphosphoryler les Lamines → au début de la Télophase on facilite la vésiculation de l'enveloppe nucléaire puis à la fin de la télophase les vésicules vont fusionner pour ré assembler l'enveloppe nucléaire

Interphase : Enveloppe nucléaire intacte



III.C. Le fuseau mitotique

Fuseau mitotique → structure clef permettant la ségrégation des chromosomes entre les 2 cellules filles au cours de la division cellulaire



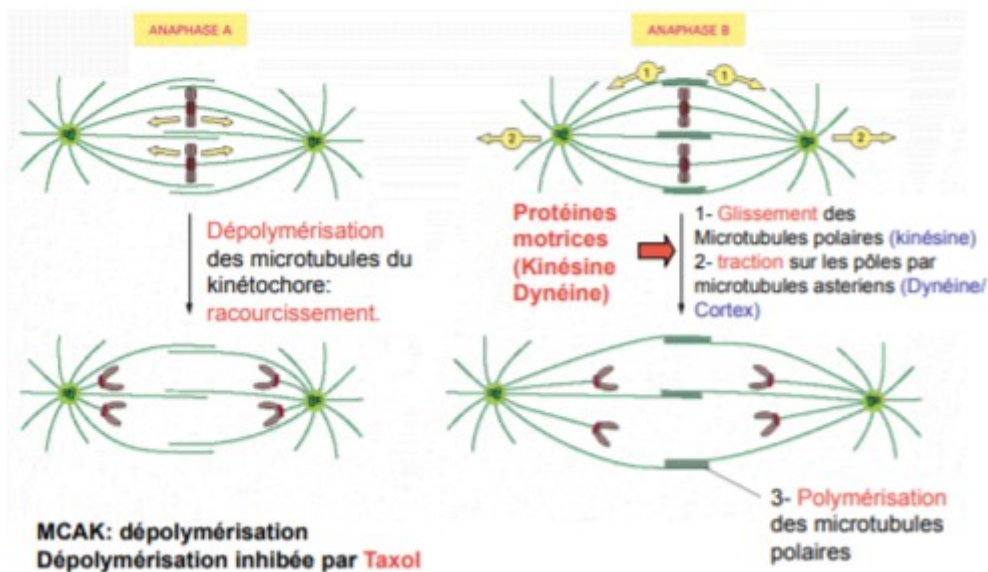
Fuseau mitotique constitué de microtubules :

- Microtubules **polaires** : permettent de relier les 2 pôles de la cellule en division en interagissant avec un autre microtubule polaire émanant du pôle opposé de la cellule
- Microtubules **Astériens** : émanent du centrosome et extrémité (+) est au contact des protéines du cortex (réseau protéique de la MP)
- Microtubules **Kinétochoriens** : interagissent avec le Kinétochore au nv des structures centromériques des chromosomes

Kinétochore → structure tri-lamellaire avec 3 plaques :

- plaque interne : avec protéines de liaison à l'ADN
- plaque intermédiaire
- plaque externe : interagit avec différents types de protéines
 - protéines motrices associées aux microtubules : Kinésines et Dynéines
 - MCAK(Mitotic Centromere-Associated Kininesin) : protéines déstabilisatrices (Fait partie de la famille des Kinésines mais n'a pas d'activité motrice!!)
 - Microtubules Kinétochoriens

Instabilité dynamique des microtubules + protéines motrices: ségrégation des chromosomes: Anaphase.



La Ségrégation des chromosomes vers les pôles opposés de la cellule en cours de division au cours de l'Anaphase est facilitée par l'instabilité dynamique des microtubules + protéines motrices (Kinésines et Dynéines)

Il y a 2 types d'Anaphase : phénomènes quasi concomitants

- **Anaphase A** : MCAK → Dépolymérisation des microtubules du Kinétochore → raccourcissement des microtubules Kinétochoriens → traction sur les chromatides sœurs → Séparation physique

Dépolymérisation inhibée par médicament anti-tumoral : **Taxol qui inhibe MCAK**

- **Anaphase B** : Protéines motrices (Kinésines et Dynéines)

Kinésines : glissement des microtubules polaires → éloignement des seq centromériques

Dynéines : associées aux protéines du cortex au nv des microtubules Astériens, exercent une traction sur les pôles des microtubules Astériens → éloignement des centrosomes

+ Polymérisation des microtubules polaires qui facilite aussi l'éloignement des chromatides sœurs vers les pôles opposés de la cellule en cours de division

IV. Répartition des organites

Répartition de façon + ou – aléatoires et équitables

Organites proviennent de la croissance et de la division d'organites existants dans la cellule mère

Organites uniques : ex : RE, Appareil de Golgi

Afin de se répartir équitablement, ils se morcellent au préalable en petits fragments qui se répartiront de façon aléatoire et équitable au cours de la mitose et de la cytodivision

V. Régulation du cycle cellulaire

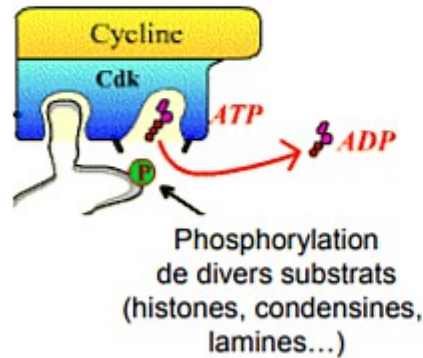
V.A. Les complexes cdk/cyclines

Ces complexes ont un rôle clef dans la phosphorylation de protéines → progression des cellules dans le cycle

Cdk: Cyclin-dependent kinase
sérine-thréonine kinases dépendantes des **cyclines**

2 SU :

- **cdk** : Serine Thréonine Kinase qui ne fonctionne qu'avec la Cycline, avec 2 cavités :
 - cavité qui interagit avec l'ATP
 - cavité qui interagit avec les substrats (histones, Condensines, Lamines)
- **Cycline** : interagit physiquement avec la cdk

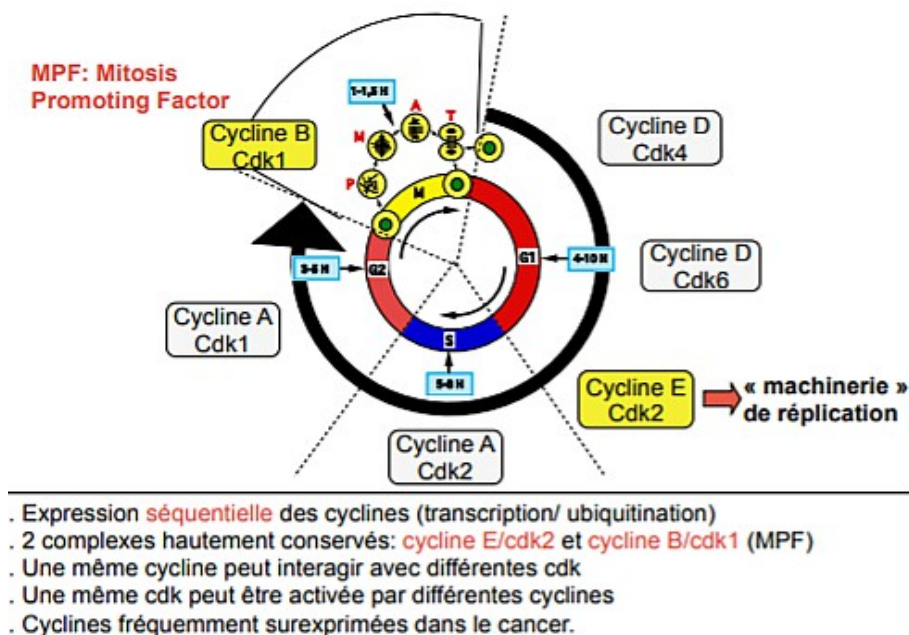


- . Réplication de l'ADN
- . Compaction des chrs
- . Dissociation de l'enveloppe nucléaire
- ...

Complexes qui jouent un rôle important dans :

- Réplication ADN
- Compaction des chromosomes : Phosphorylation des Histones → Condensines peuvent condenser les chromosomes
- Dissociation de l'enveloppe nucléaire : Phosphorylation des Lamines

V.B. Formation séquentielle de complexes cdk/cyclines



- Différents types de complexes cdk/cycline se forment de manière séquentielle au cours du cycle cellulaire. Cette formation séquentielle est due à l'expression transitoire et séquentielle des cyclines. (cdk exprimées de façon constitutive)

Début G1 : Expression de la Cycline D + cdk4 ou cdk6

Fin de G1 : Cycline E + cdk2

Phase S : Cycline A + cdk

Phase G2 : Cycline A + cdk1

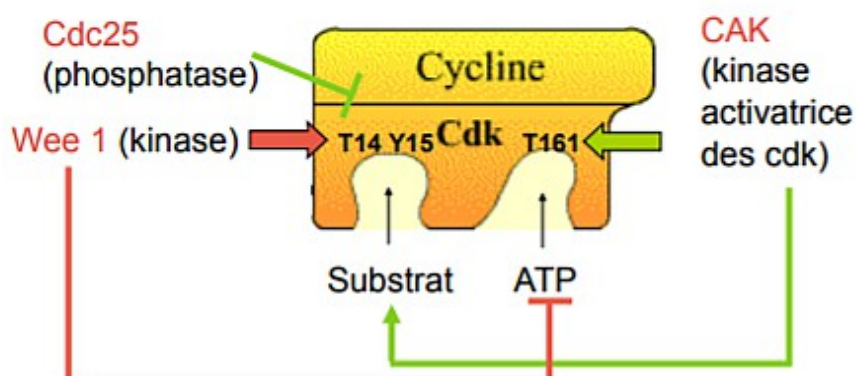
Phase M : Cycline B + cdk1

- Après son expression transitoire, les cyclines sont Ubiquitinylées → dégradation par le protéasome
- A retenir : 2 complexes hautement conservés (décrits chez la levure, ovocytes de xénopes, mammifères) :
 - Complexe **Cycline E/cdk2** : Mise en place de la machinerie de réplication → entrée en phase S
 - Complexe **Cycline B/cdk1** = **MPF** → entrée en Mitose
APC dégrade le MPF par PolyUbiquitinylation de la Cycline B !
- Une même cycline peut interagir avec différents cdk
- Une même cdk peut être activée par différentes Cyclines
- Les Cyclines peuvent être dérégulées dans le KC : sur-expression de Cyclines → prolifération anarchique des cellules KC

V.C. Régulation de l'activité des cdk par phosphorylation

. phosphorylation activatrice: cdk1 T161

. phosphorylation inhibitrice/ déphosphorylation activatrice: cdk1 T14 et Y15



Complexes cdk/Cyclines finement régulés par des :

– **Kinases :**

- Activatrice des cdk : **CAK** → Phosphoryle résidu Thr : Facilite activité des cdk
(car phosphorylation de la Thr = modification de la conformation de la cdk : ouverture de la cavité substrat)
- Inhibitrice des cdk : **Wee 1** → Phosphoryle Thr et Tyr : Inhibe activité cdk
(car phosphorylation = modification de conformation : fermeture de la cavité ATP)

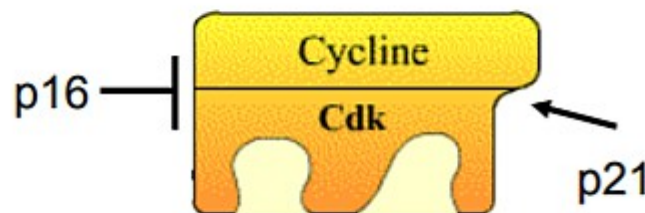
- **Phosphatases cdc25** : antagoniste à Wee1 → Déphosphoryle Thr et Tyr : Activation cdk

V.D. Inhibition des complexes cdk/Cyclines par les CKI

CKI: cyclin-dependent kinase inhibitor:

Famille p16 (p16, p15, p18, p19): compétition *versus* cycline D.

Famille p21 (p21, p27, p57): inhibiteur universel de l'activité cdk.



. Mutation inactivatrice des CKI: cancer
. Ex. mutation de p16: mélanomes malins

CKI → Inhibiteur de cdk dépendantes des Cyclines

2 familles :

- **p16** : compétition VS Cycline **D**

Agit en G1 → prévient l'interaction des cdk avec les Cyclines D : cdk inactives

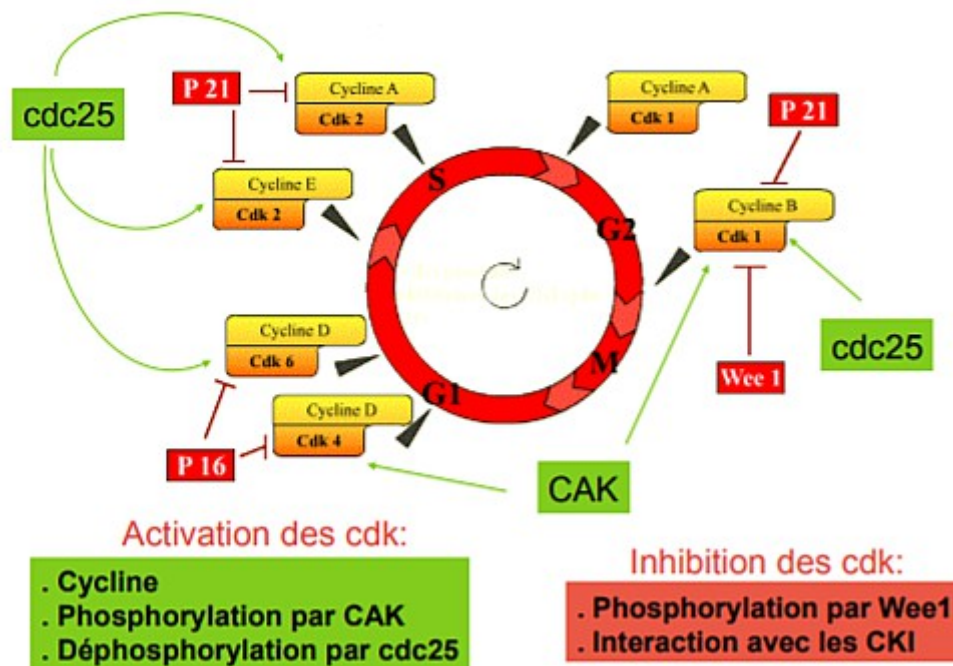
- **p21** : inhibiteurs universels de l'activité cdk

Interagissent avec les complexes cdk/Cyclines → modification de la conformation de cdk/Cycline → inhibe activité des cdk

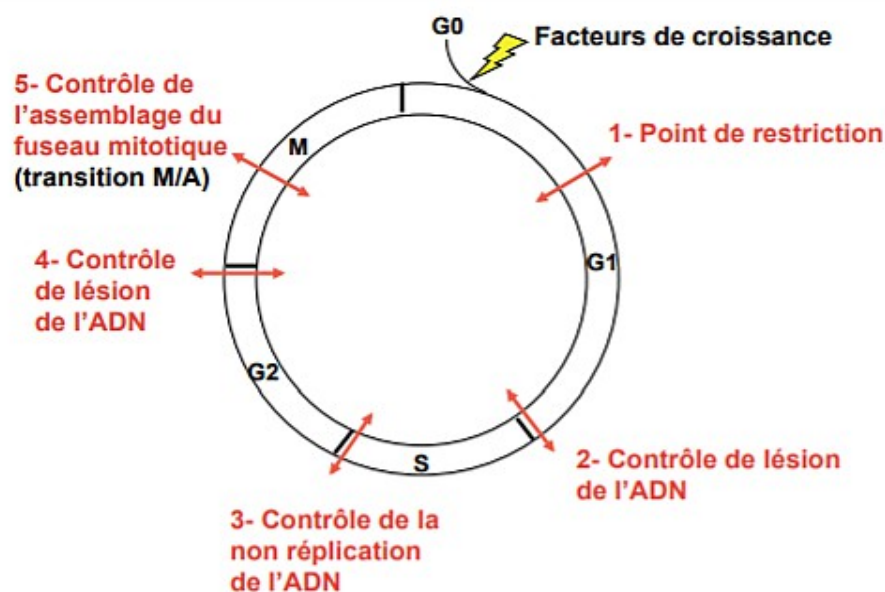
Mutations inactivatrices au niveau des gènes qui codent pour les CKI : CKI biologiquement inactives → levée d'inhibition de l'activité de cdk → prolifération incontrôlée → KC

ex : Mutation de la CKI p16 induit le dvlpmnt de mélanomes malins au dépend des mélanocytes (grains de beauté).

V.E. Les différents systèmes de régulation des complexes cdk/Cyclines



V.F. Les principaux points de contrôle du cycle cellulaire



Les points de contrôle permettent d'assurer le bon déroulement du cycle cellulaire et prévenir la propagation de mutations dans les cellules filles.

Point de restriction : G1

La plupart des cellules de l'organisme sont en phase quiescente (G0) et pour rentrer dans le cycle cellulaire il faut que ces cellules se retrouvent dans un environnement adéquat : Facteurs de croissance : facilitent l'activation de la voie des MAPKinases et permettre le passage des cellules quiescentes en G1.

Point de restriction → point au-delà duquel les cellules n'ont plus besoin de facteur de croissance pour progresser dans le cycle : les facteurs de croissance ne sont utiles que de G0 jusqu'au point de restriction !

Fin de phase G1 : contrôle des lésions de l'ADN

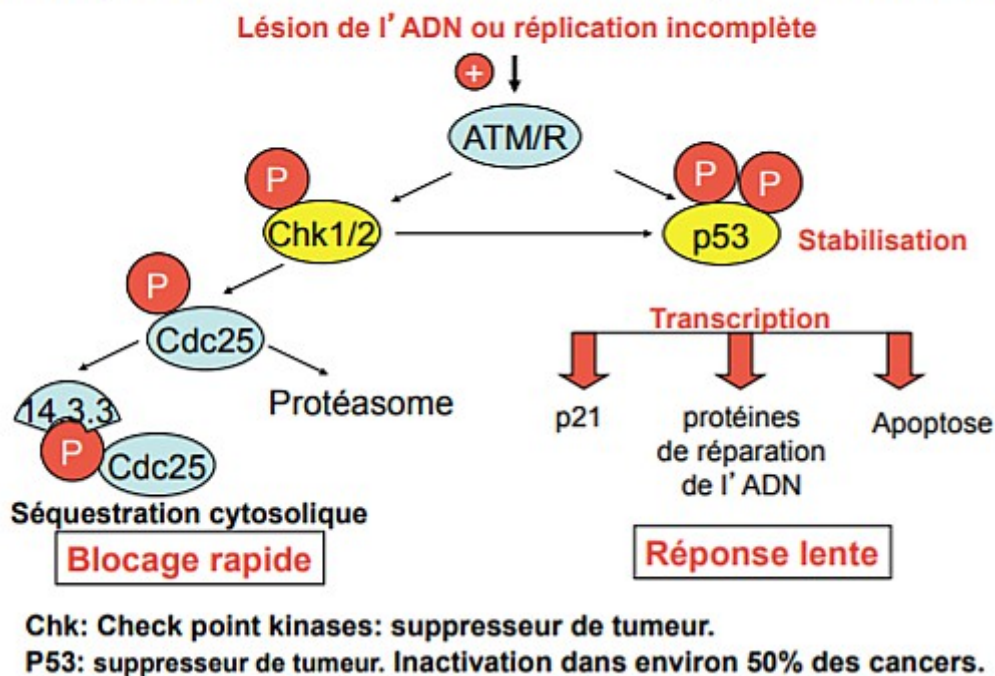
Fin phase S : Contrôle de non-réplication de l'ADN

Fin G2 : Contrôle lésion de l'ADN

Phase M (entre Métaphase et Anaphase) : Contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique : tous les chromosomes doivent interagir avec des microtubules Kinétochoriens

Signalisation moléculaire permet de stopper la progression des cellules dans le cycle + permettre la mise en place des mécanismes de réparation avant que le cycle puisse continuer.

Exemple du contrôle des lésions et de la réplication de l'ADN



Il y a des protéines qui vont surveiller l'intégrité de l'ADN génomique et vont être activées en cas de lésion/non-réplication de l'ADN → activation de protéines **Kinases ATM** ou **ATR** qui vont phosphoryler 2 types de protéines :

- **CHK1 / CHK2** : Kinases

Si pb : **réponse rapide** : Activation ATM + ATR → phosphorylation cdc25

→ interaction cdc25 phosphorylé avec une protéine chaperonne : séquestration cytosolique de cdc25

→ Ubiquitinylation de cdc25 phosphorylé ---> dégradation dans le protéasome

- **P53** : « Gardien du Génome », **mutée (mutation inactivatrice) dans la moitié des KC**

Facteur de transcription des gènes de la protéine **CKI p21**

Très faible expression si pas de problème avec dégradation de p53 par le protéasome

Si problème : **Réponse lente** : Activation ATM + ATR :

→ activation CHK1 + CHK2 → Hyperphosphorylation p53 → Stabilisation et accumulation p53 dans le noyau → ↗ transcription CKI p21 → bloque la progression des cellules

→ Activation des protéines de réparation de l'ADN

→ si impossible de réparer : phosphorylation persistante de p53 entraînant la transcription de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques : Apoptose

→ Ce sont des « suppresseurs de tumeur » car :

- activées quand il y a des mutations au nv de l'ADN
- stoppent la progression des cellules dans le cycle
- facilitent la mise en place des systèmes de réparation de l'ADN

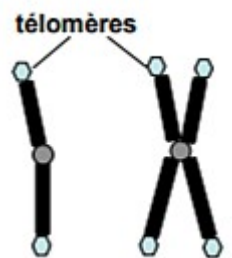
VI. Le cycle cellulaire et le vieillissement (sénescence)

Le nb de division des cellules humaines est limité (≈ 100) car au fur et à mesure des divisions cellulaires il y a l'activation du facteur de transcription P53 :

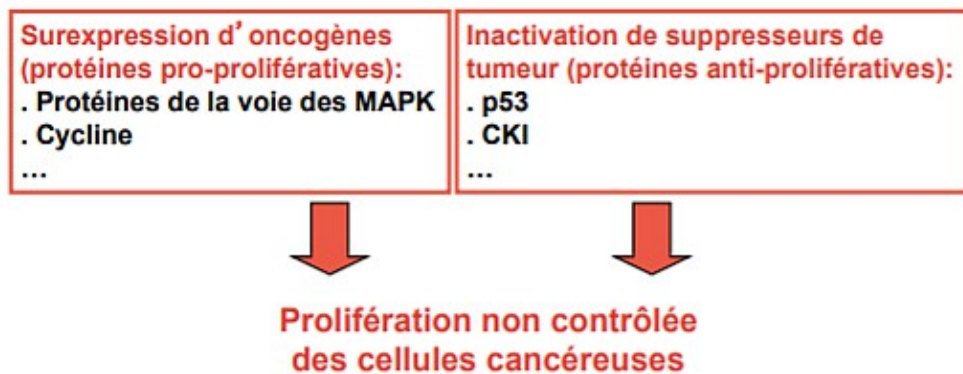
- ↗ **expression des CKI p16 et p21** : limite la prolifération cellulaire
- ↗ **expression β -galactosidase** : enzyme lysosomale : **marqueur** de la sénescence (ne joue pas un rôle causal dans l'induction de la sénescence juste un marqueur!!)
- ↘ **expression des Télomérases** : enzymes Reverse Transcriptase (SU Transcriptase inverse + SU ARN complémentaire de la seq TTAGGG constituant les télomères) qui permet la synthèse des Télomères : stabilisent les chromosomes

Par cycle de réplication de l'ADN on perd ≈ 100 pb (télomères) → raccourcissement progressif des chromosomes au cours de la réplication

Cellules souches avec capacité d'auto-renouvellement + cellules KC : forte activité Télomérase



VII. Cycle cellulaire et KC



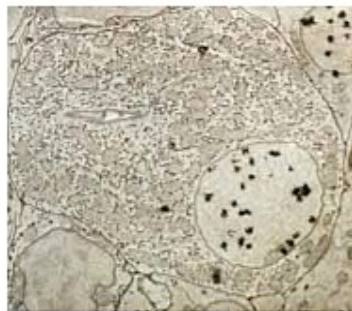
Il y a des mutations activatrices ou inactivatrices des gènes, ce qui se traduit par une prolifération non-contrôlée des cellules KC.

La sur expression d'oncogènes n'est pas suffisante à la prolifération incontrôlée, il faut en plus une inactivation de suppresseurs de tumeurs.

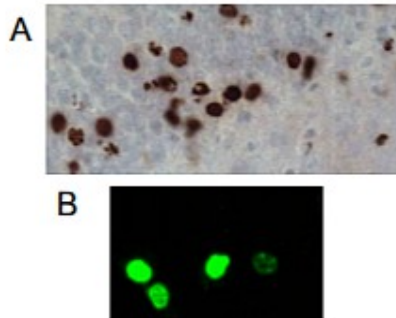
VIII. Les techniques d'études de la prolifération cellulaire

VIII.A. Analogue de la thymidine (nucléoside)

. Incorporation dans l'ADN en cours de réplication.



. Pulse de **thymidine tritiée** puis analyse par autoradiographie en microscope électronique.
. Mesure de la radioactivité incorporé sur **ADN précipité**



. Pulse de **Bromo-deoxyuridine (BrdU)**
. Révélation avec un anti-BrdU couplé à la peroxydase (A) ou à un fluorochrome (B).

Thymidine : nucléoside qui rentre dans les cellule, est phosphorylé par des Thymidine Kinase : devient un nucléotide (Thymine) qui peut s'incorporer dans l'ADN

Il existe différents types d'analogues de la Thymidine :

- **Thymidine tritiée** (radioactive) : Thymine tritiée incorporée dans l'ADN des cellules qui sont en prolifération (Phase S réplication) uniquement !

On fait un **pulse** (temps court d'incubation des cellules avec une molécule marquée): on

incorpore des cellules avec de l'EGF et pndt les 16 dernières heures de l'incubation on ajoute dans le milieu de culture de la Thymidine tritiée

+ Autoradiographie en ME : localisation dans le noyau

Pour mesurer la prolifération cellulaire, on mesure la radioactivité incorporée sur de l'ADN précipité : **directement proportionnelle à la réplication de l'ADN** et donc directement proportionnelle à la prolifération cellulaire

- **Bromo-deoxyuridine (BrdU)** : Il est phosphorylé et devient un nucléotide qui pourra s'incorporer dans l'ADN uniquement en phase S

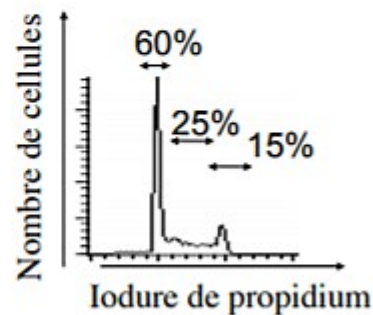
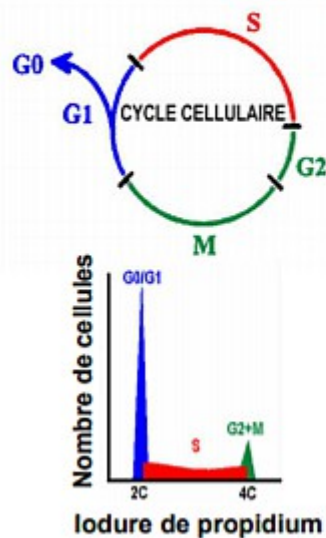
Révélation avec **Ac anti BrdU** couplé à la **peroxydase** : les noyaux qui ont répliqué leur ADN seront de couleur brune

Révélation avec **Ac anti BrdU** couplé à un **fluorochrome**

On peut ainsi mesurer la proportion de cellules qui ont incorporé BrdU

VIII.B. Cytométrie en flux

- . Incubation de cellules perméabilisées avec de l'**iodure de propidium** (agent fluorescent et intercalant de l'ADN)
- . Mesure de la fluorescence par cytométrie en flux.



Principe : analyse les cellules une à une qui défilent face à des rayonnements laser et émettant de la fluorescence.

Pour évaluer la prolifération cellulaire, on utilise un agent intercalant de l'ADN qui va nous permettre de quantifier l'ADN dans les cellules.

La qté d'ADN varie en fonction du cycle cellulaire :

- G0/G1 : contenu en ADN diploïde : $2n$
- S : $4n$ (tétraploïde)
- G2/M : $4n$ (tétraploïde)

Pour ce faire, il faut **perméabiliser les cellules** et on incube les cellules avec l'**Iodure de Propidium** qui est un agent intercalant qui fluoresce dans le rouge. **Il va s'intercaler dans l'ADN de manière proportionnelle au contenu en ADN**.

Le grand pic en G0/G1 indique que l'Iodure de Propidium a bien été incorporé (en qté plutôt modeste car contenu en ADN = 2C) mais que la plupart des cellules se trouvent dans cette phase et sont donc quiescentes ou en G1.

60% de cellules en phase G0/G1

Les cellules rentrent ensuite en phase S : elles augmentent leur contenu en ADN = augmente l'interaction avec l'Iodure de Propidium

25% de cellules en phase S

Phase G2/M : le contenu en ADN a doublé en phase S : j'ai donc 2x + de fixation à l'Iodure de Propidium qu'en phase G0/G1

15% de cellules en phase G2/M

Proportion de cellules qui prolifèrent = % en phase S + % en G2/M

Ici : 40% de cellules qui prolifèrent et 60% de cellules qui ne prolifèrent pas

→ Proportion importante de cellules qui prolifèrent : ce sont des cellules KC leucémiques

Cellules normales : max 10% de cellules qui prolifèrent

Hauteur des pics des phases S/G2/M moindre par rapport à G0/G1 car on a – de cellules en prolifération que de cellules quiescentes ou en G1

NB : on ne peut pas différencier les cellules en phase G2 de celles en phase M car elles ont le même contenu en ADN