

Biologie Cellulaire végétale

L3 S5

2007-2008

*Anne-Catherine SCHMIT
ULP-CNRS UPR 2357, IBMP
anne-catherine.schmit@ibmp-ulp.u-strasbg.fr*

PLANNING 2008, le
vendredi de 8h à 10h
amphi VLES

28 septembre	AC Schmit
5 octobre	AC Schmit
12 octobre	AC Schmit
19 octobre	JL Imler
26 octobre	JL Imler
29 octobre	JL Imler
9 novembre	AC Schmit
16 novembre	JL Imler
23 novembre	J de Mey
30 novembre	J de Mey
7 décembre	J de Mey
14 décembre	J de Mey
21 décembre	Pas de cours

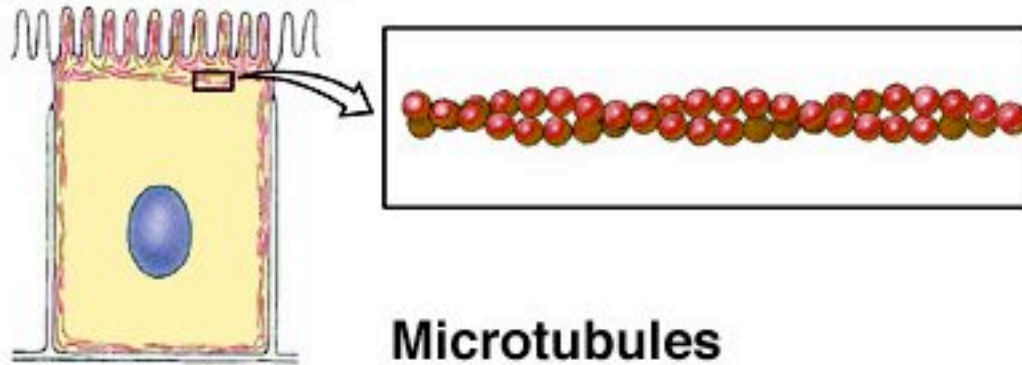
Cours intégraux
et photocopiés
sont accessibles
via Univ-R

- I. Rappel du cytosquelette des eucaryotes (2h)
- II. Mécanismes régulateurs du cycle cellulaire (4h)
- III. Cultures cellulaires végétales et régénération des plantes (2h)

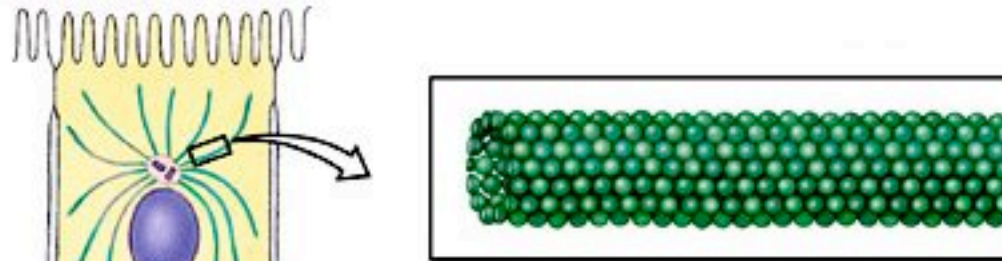
Objectifs : Dans le domaine de la recherche fondamentale, l'exemple les connaissances acquises sur le cytosquelette et la régulation du cycle cellulaire servira mieux faire comprendre l'intérêt des biotechnologies (en général) et végétales (en particulier).

Les éléments du cytosquelette

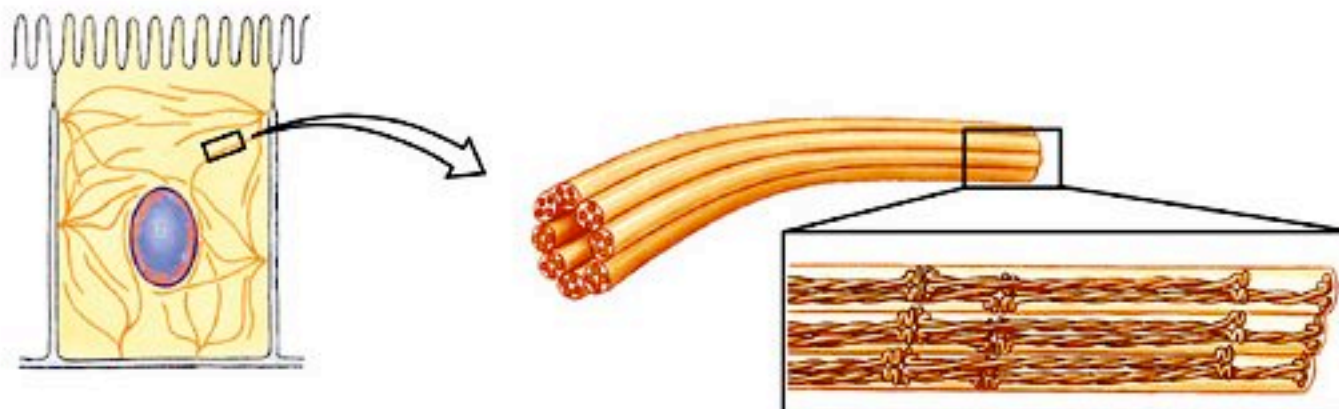
Microfilaments



Microtubules



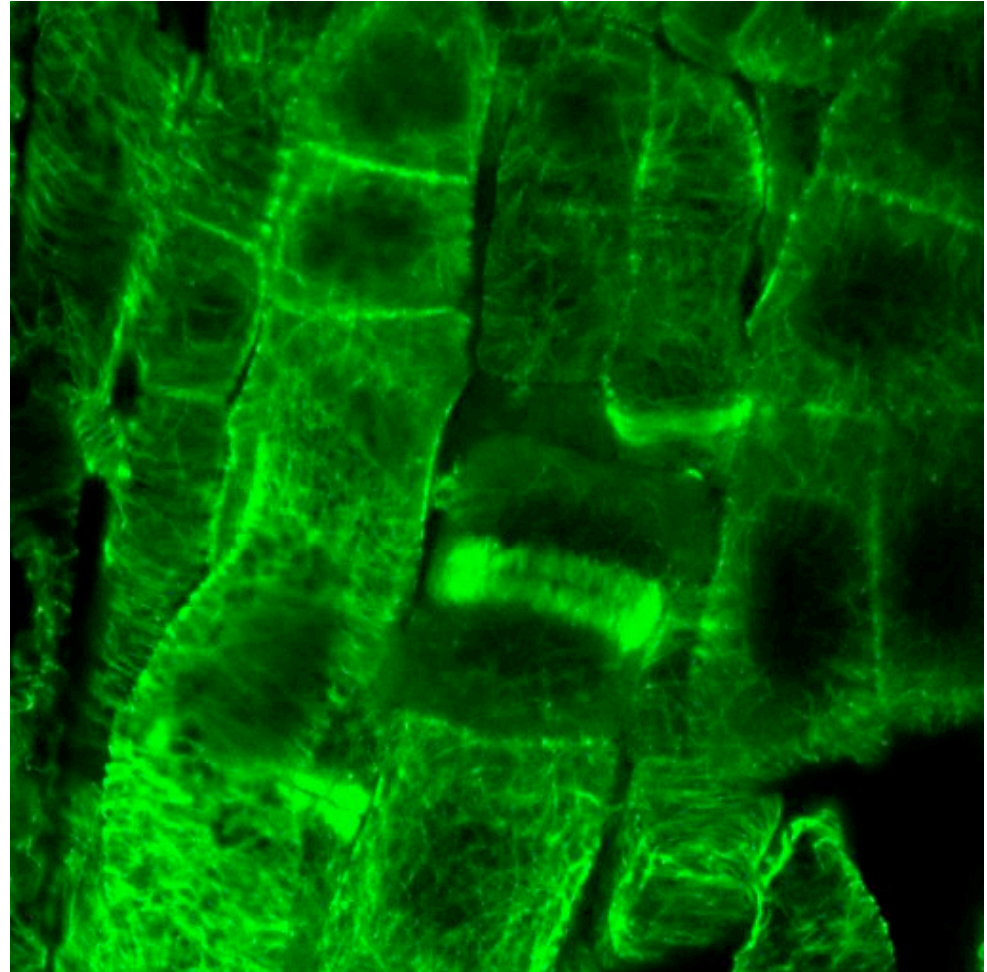
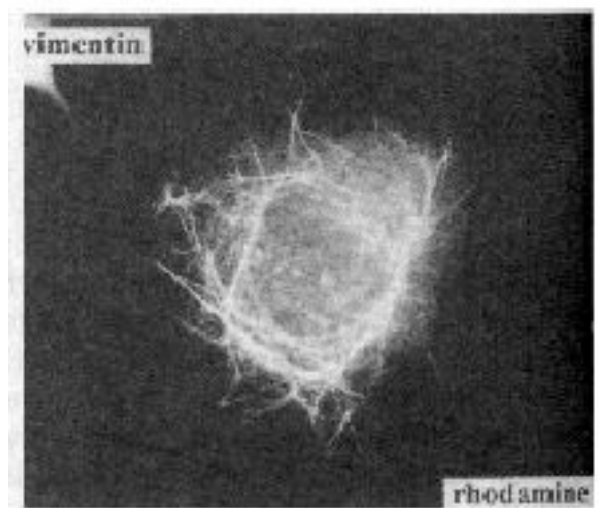
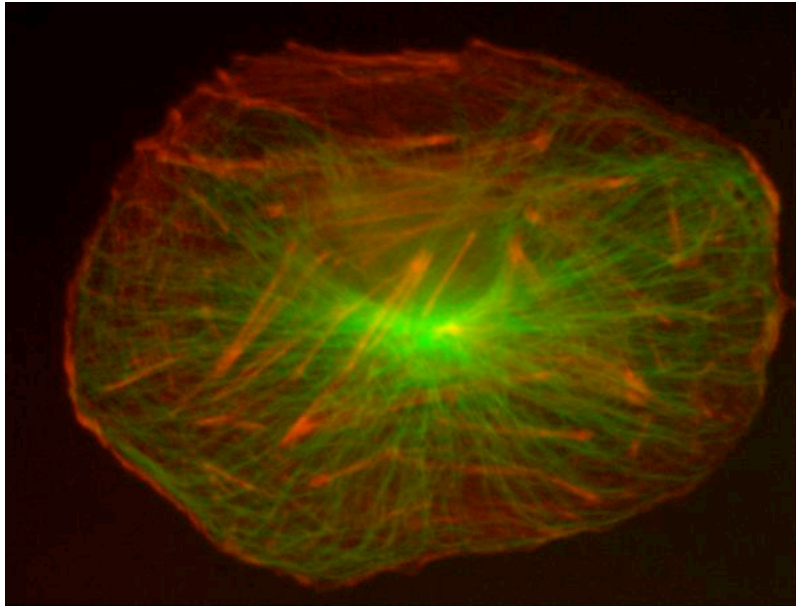
Filaments intermédiaires



Microtubules

Microfilaments d'actine

Filaments intermédiaires



I. Le cytosquelette des eucaryotes

A. Les tubulines et leurs protéines associées

1. La famille des tubulines
2. Les MAPs structurales
3. Synthèse des dimères de tubuline
4. Sites de nucléation des polymères
5. Les complexes de nucléation

A. Les tubulines et leurs protéines associées

1. Alpha α , beta β , gamma γ , Delta δ , epsilon ϵ , zeta ζ et eta η tubulines

Compared	% Identical	% Similar
α, β	41	58
α, γ	31	47
β, γ	33	52
α, δ	22	36
β, δ	22	35
α, ϵ	30	45
β, ϵ	30	44
γ, δ	27	43
γ, ϵ	28	44
δ, ϵ	23	36

FtsZ : protéine de bactéries ayant 10% d'homologie avec les tubulines et formant des polymères

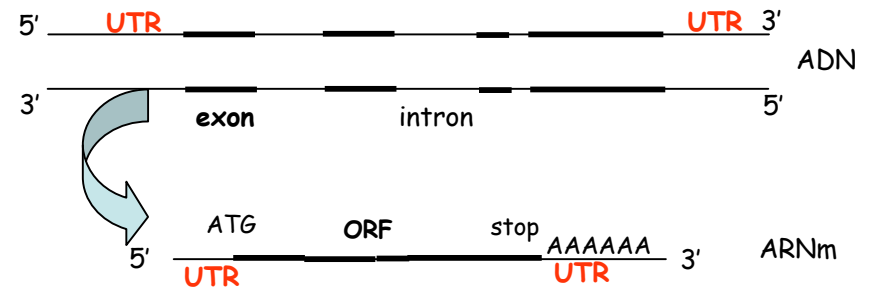
Nombre variable de gènes et variations isotypiques

espèce	α	β
homme	8 gènes	5 gènes
souris	7 gènes	6 gènes
xénope	4 gènes	5 gènes
drosophile	4 gènes	4 gènes
<i>Caenorhabditis elegans</i>	9 gènes	6 gènes
trypanosome	2 gènes	2 gènes
Paramécie	4 gènes	3 gènes
Chlamydomonas	2 gènes	2 gènes
tabac	7 gènes	9 gènes
arabette	6 gènes	9 gènes
Levure <i>Sc</i>	2 gènes	1 gène
Levure <i>Sp</i>	2 gènes	1 gène
bactéries	absent	absent

DNA et RNA :

Domaines 3' et 5' UTR différents, impliqués dans la régulation transcriptionnelle et post transcriptionnelle

Séquences codantes (ORF) très similaires



Protéines :

Fortes similarités, parfois régions consensuelles identiques et séquences C-terminales très variables, impliquées dans la régulation post-traductionnelle d'expression et la liaison avec les MAPs

Nombre variable de gènes et variations isotypiques

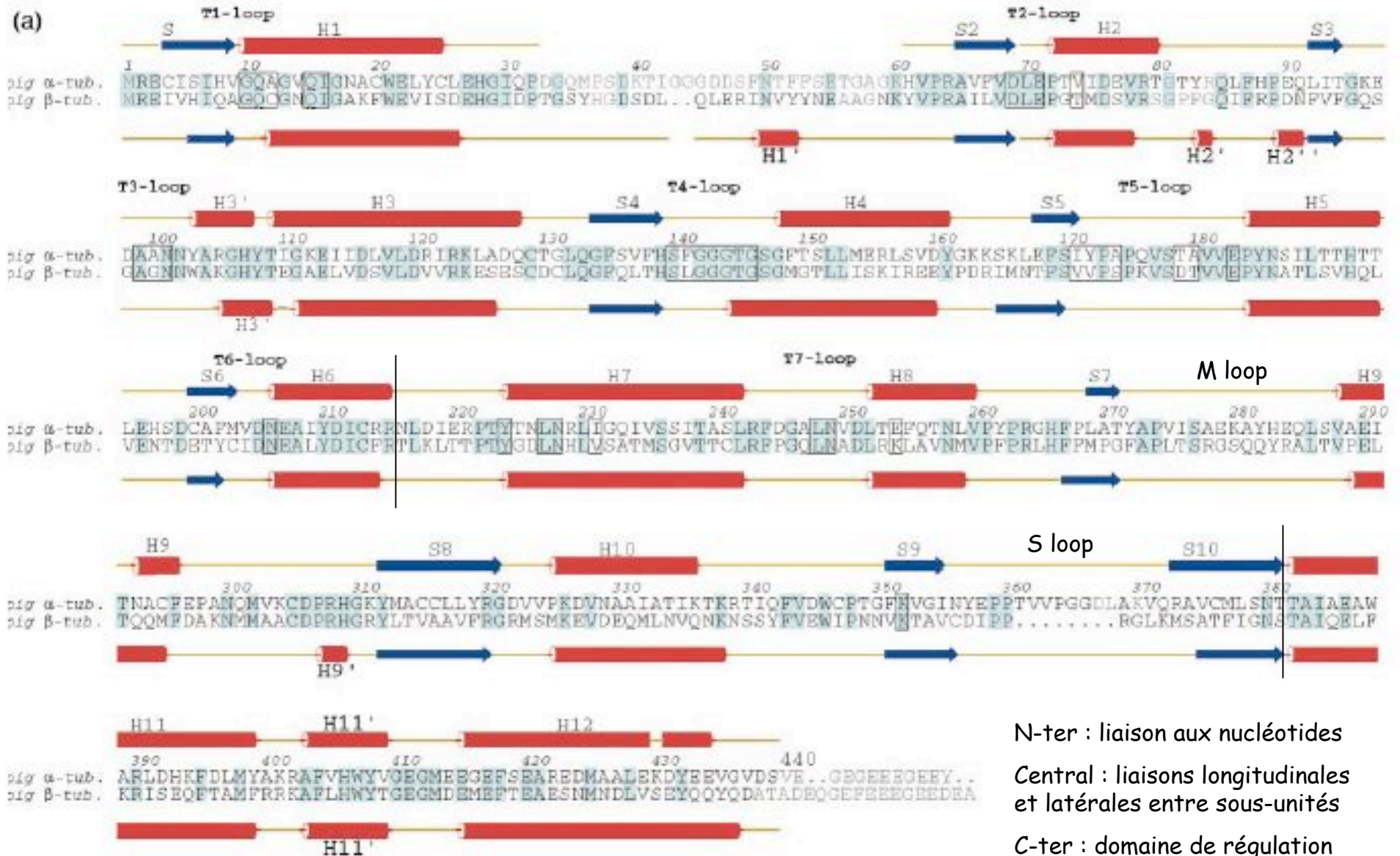
espèce	α	β
homme	8 gènes	5 gènes
souris	7 gènes	6 gènes
xénope	4 gènes	5 gènes
drosophile	4 gènes	4 gènes
<i>Caenorhabditis elegans</i>	9 gènes	6 gènes
trypanosome	2 gènes	2 gènes
Paramécie	4 gènes	3 gènes
Chlamydomonas	2 gènes	2 gènes
tabac	7 gènes	9 gènes
arabette	6 gènes	9 gènes
Levure <i>Sc</i>	2 gènes	1 gène
Levure <i>Sp</i>	2 gènes	1 gène
bactéries	absent	absent

6 classes de β -tubulines :

= mutations ponctuelles d'acides aminés

- Classes I et IV b : expression constitutive
- Classe II : prédominante dans le cerveau, les cellules normales et tumorales mammaires
- Classes III, IV a et VI : variable au cours du développement et prédominante dans les cellules cancéreuses
- Classe V : exclue des neurones

Comparaison de séquence des tubulines α et β de porc



N-ter : liaison aux nucléotides

Central : liaisons longitudinales et latérales entre sous-unités

C-ter : domaine de régulation

Modulation intrinsèque de la dynamique des microtubules selon leur composition isotypique

Tubuline de cerveau de bœuf

Parameter	$\alpha\beta_{II}$	$\alpha\beta_{III}$	$\alpha\beta_{IV}$
Mean rate, dimères/sec			
Growing	49 ± 6	77 ± 6	51 ± 2
Shortening	54 ± 4	98 ± 11	51 ± 3

2. Facteurs protéiques associés aux microtubules

"Microtubule associated proteins" **MAPs** structurales

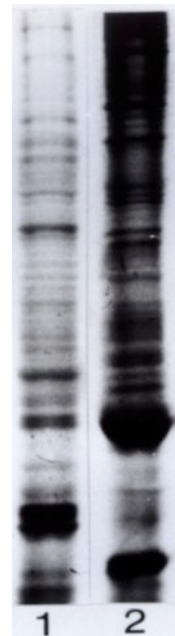
Les **MAPs** restent associées aux microtubules lors de leur purification biochimique par cycles successifs de polymérisation (37°C, GTP) / dépolymérisation (0°C)

Extrait brut
(cervelle de porc)

≈20mg/ml tubuline

Centrifugation :
100.000g

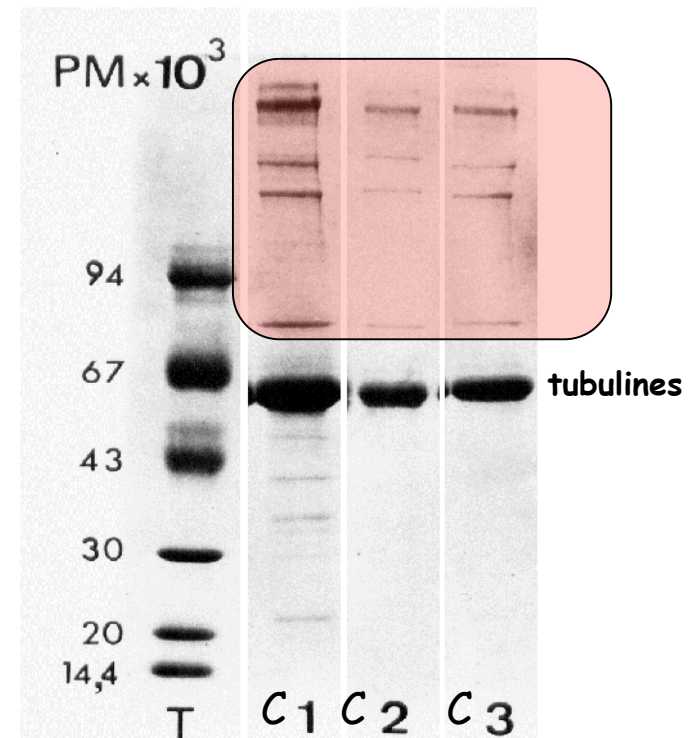
45 min, 0°C



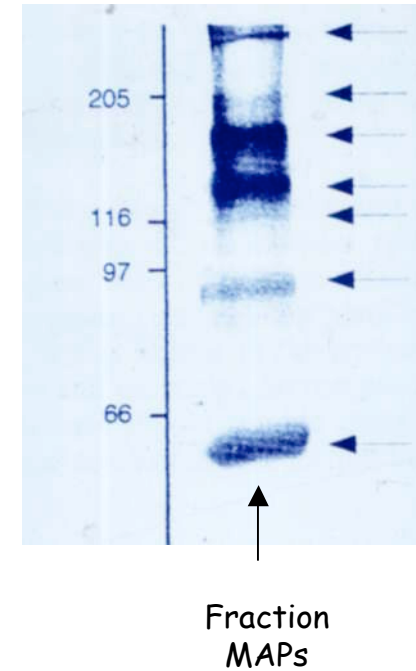
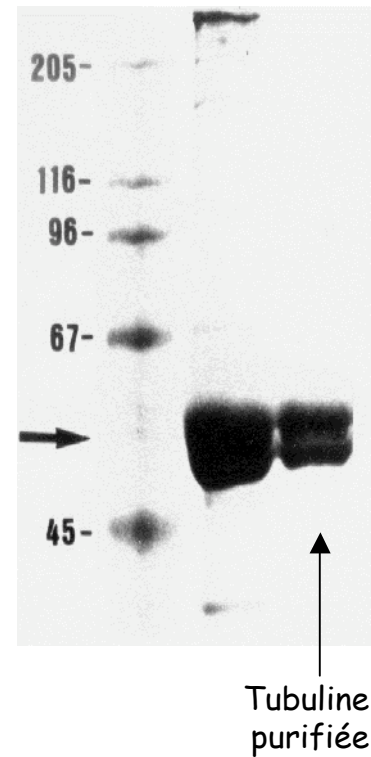
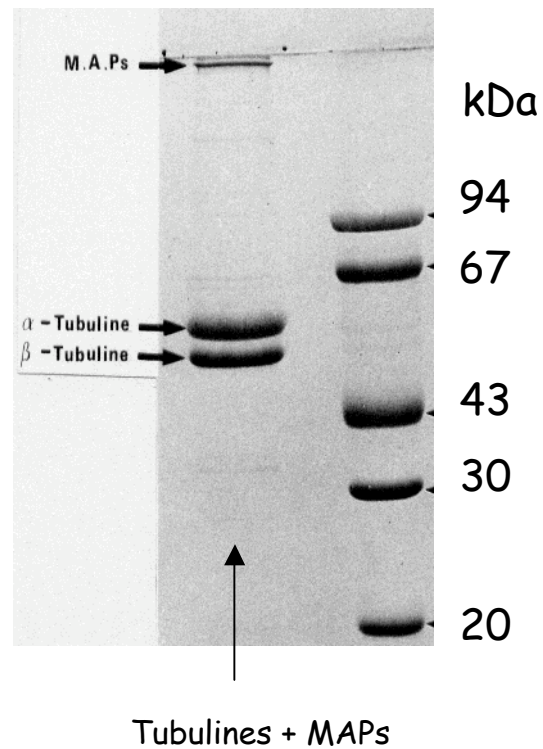
Surnagent (S) :
protéines solubles

Culot (C) :
Débris cellulaires

S C
électrophorèse

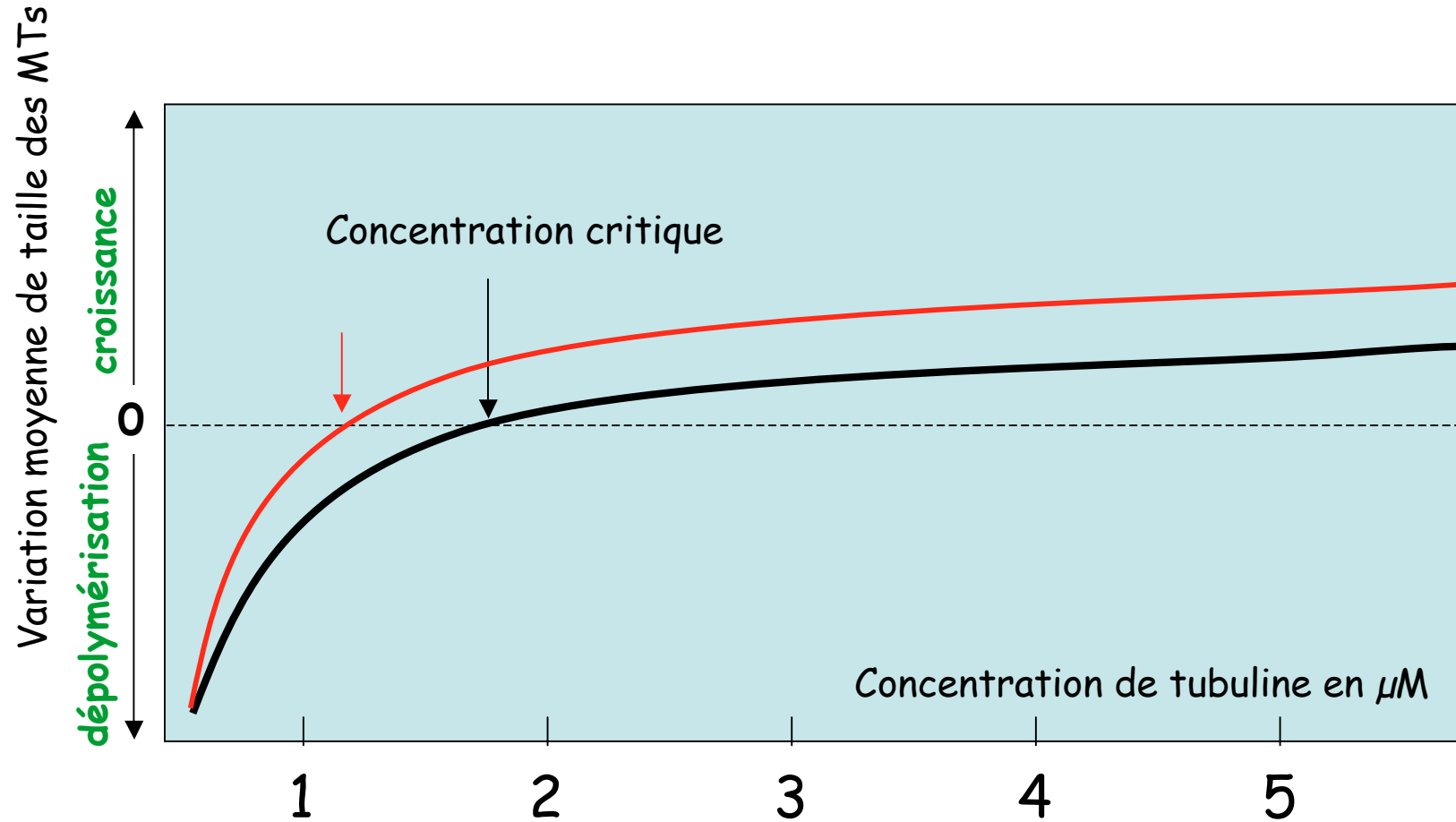


Méthodes de purification des tubulines et des MAPs animales



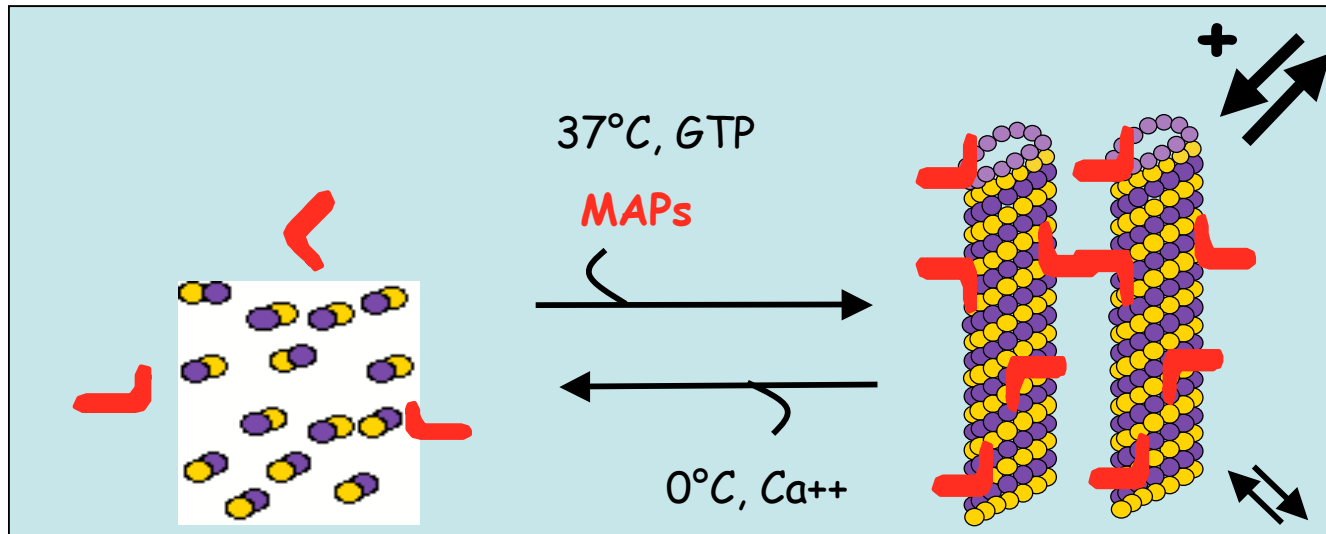
- Séparation des MAPs sur colonne échangeuse d'anions (DEAE-Sephadex ou DEAE-trisacryl)
 - > élution des MAPs de 0,15 à 0,45M NaCl
 - > élution de la tubuline à 0,7M NaCl

Assemblage de tubuline *in vitro* en présence de MAPs



En présence de MAPs

Les MAPs abaissent la concentration critique de polymérisation de la tubuline et stabilisent les microtubules par pontage

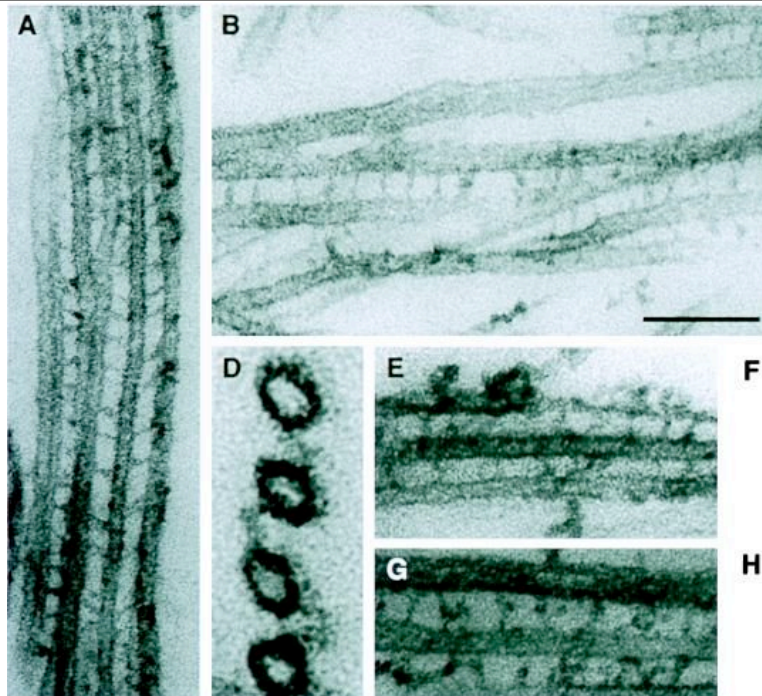


MAPs structurales

MAP 1-3
Tau

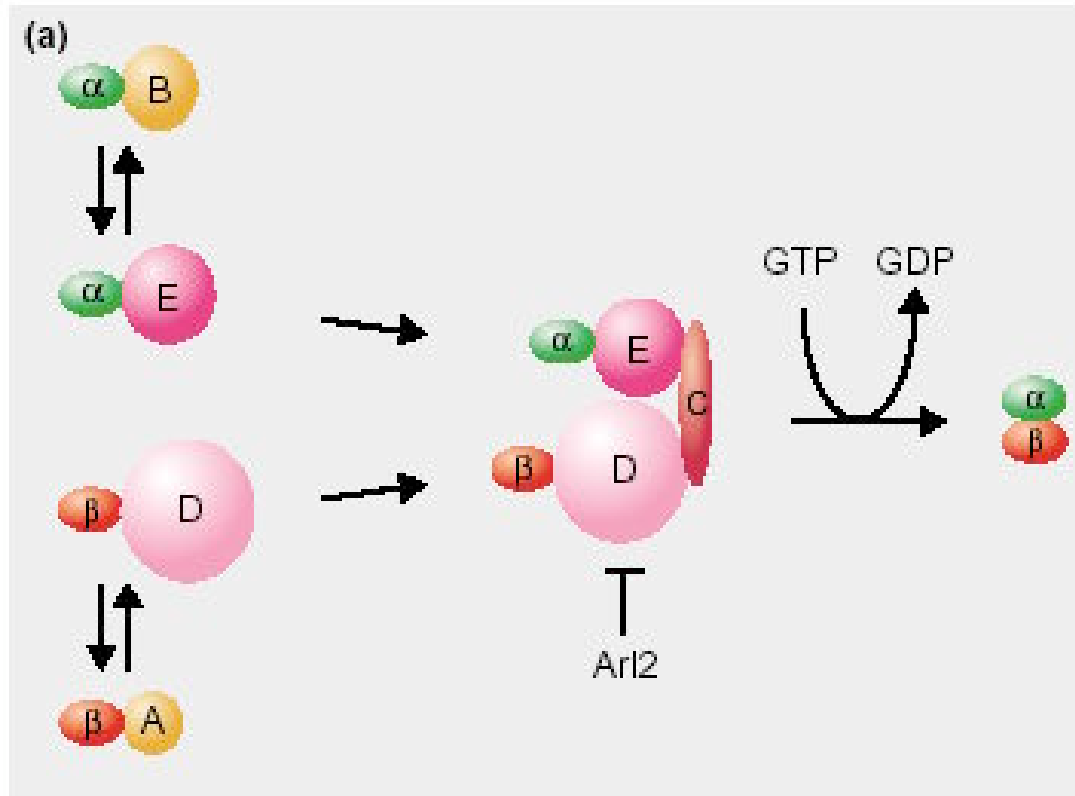
MAP 4/XMAP 230
MAP U
XMAP 215
XMAP 310

MAP 65
MAP 120
MAP 190
MOR-1



3. Synthèse des dimères de tubulines α/β

Repliement tridimensionnel des tubulines par des chaperones

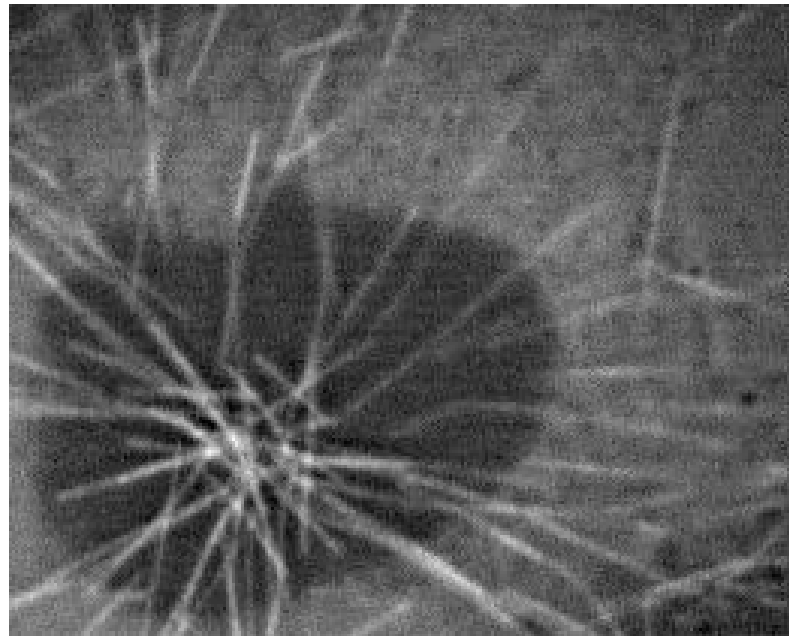


Mayer & Jürgens (2002)
Curr Opin Plant Biol 5 : 1-7

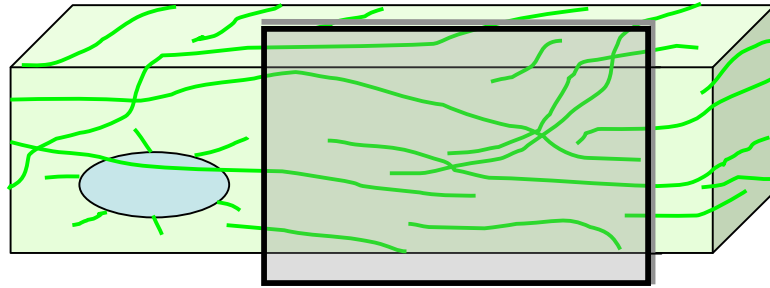
“Tubulin Folding Cofactors” (TFC) : A, B, C, D et E

4. Sites de nucléation des polymères

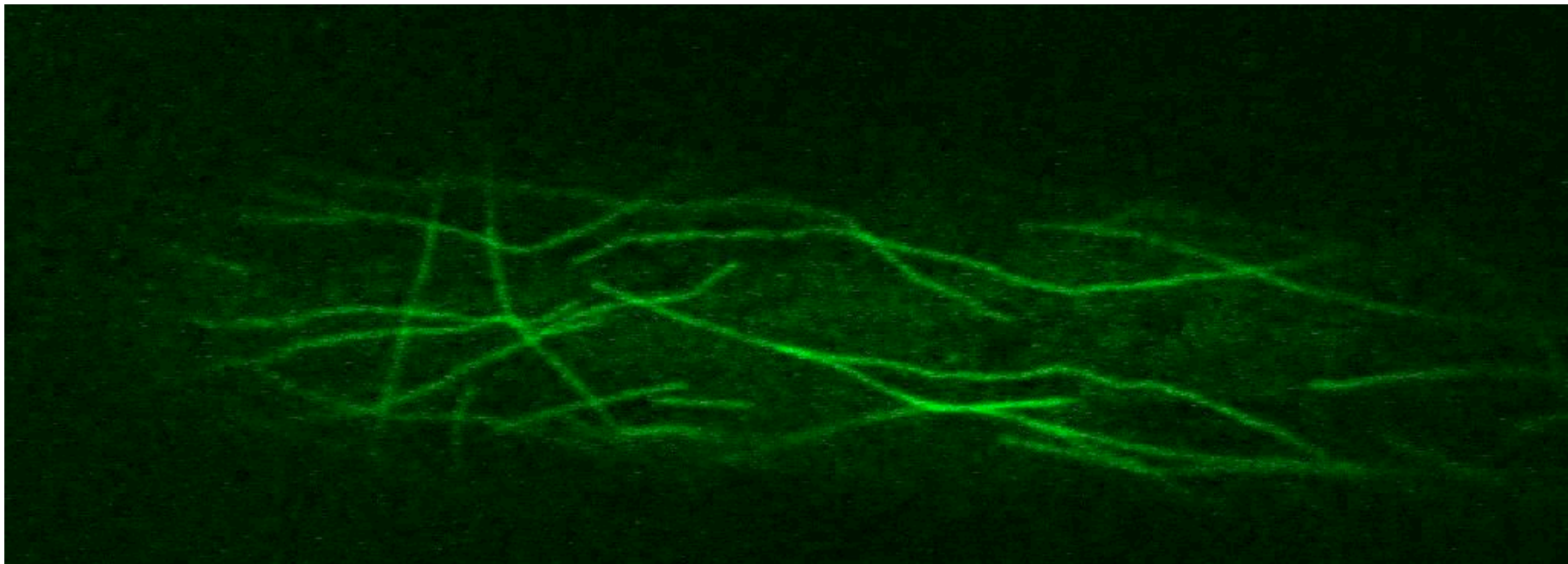
Nucléation et élongation des microtubules
à partir du centrosome en interphase



Dynamique des microtubules corticaux de plantes



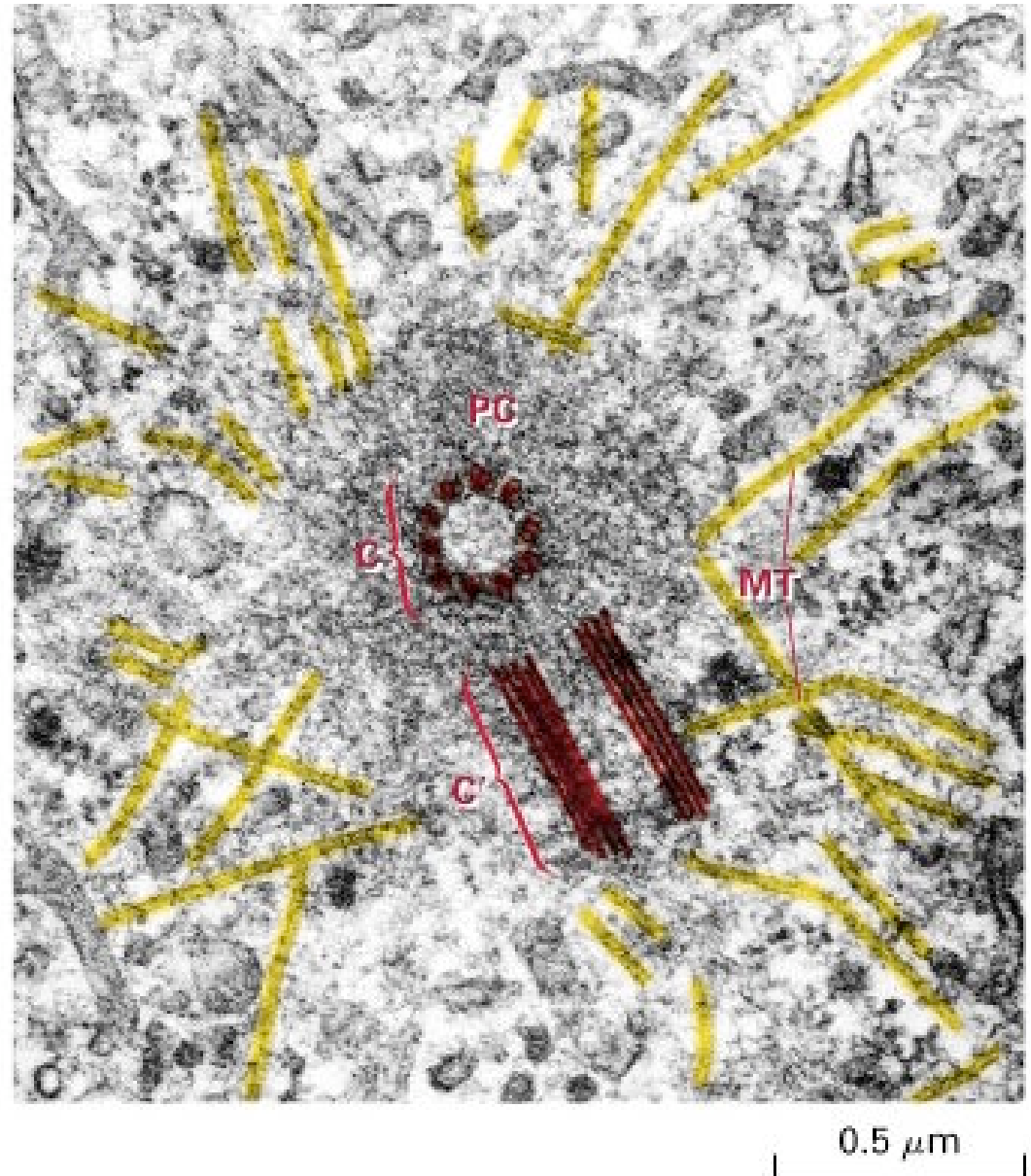
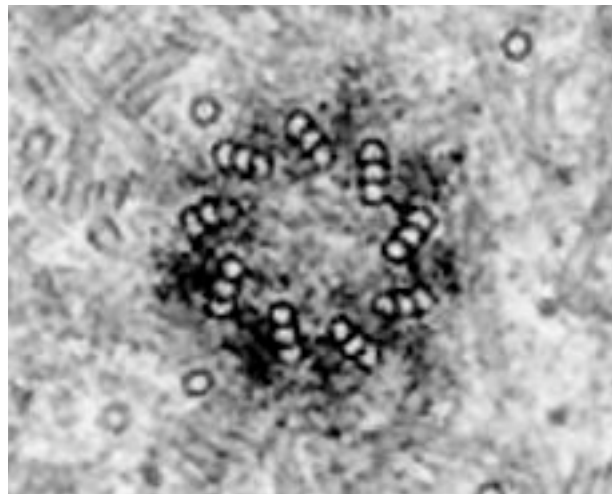
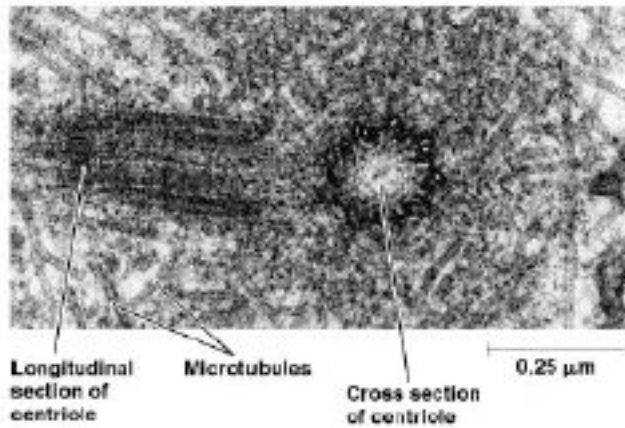
Expression d'une protéine fluorescente adressée aux microtubules : MBD-GFP



Poil racinaire d'*Arabidopsis thaliana*, cytosquelette cortical

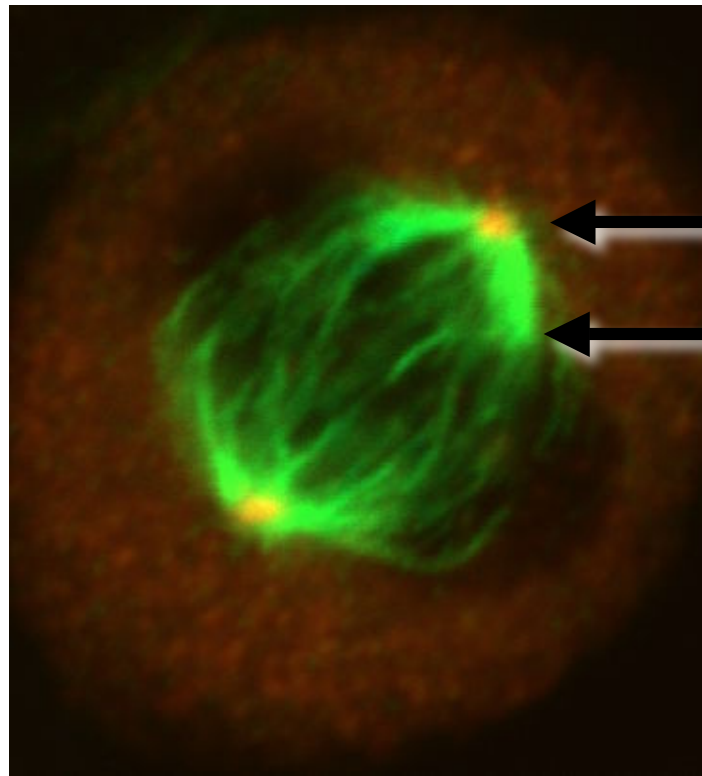
Cellules animales : structure du centrosome

2 centrioles à 9 triplets de MTs



La γ -tubuline est un marqueur de site de nucléation

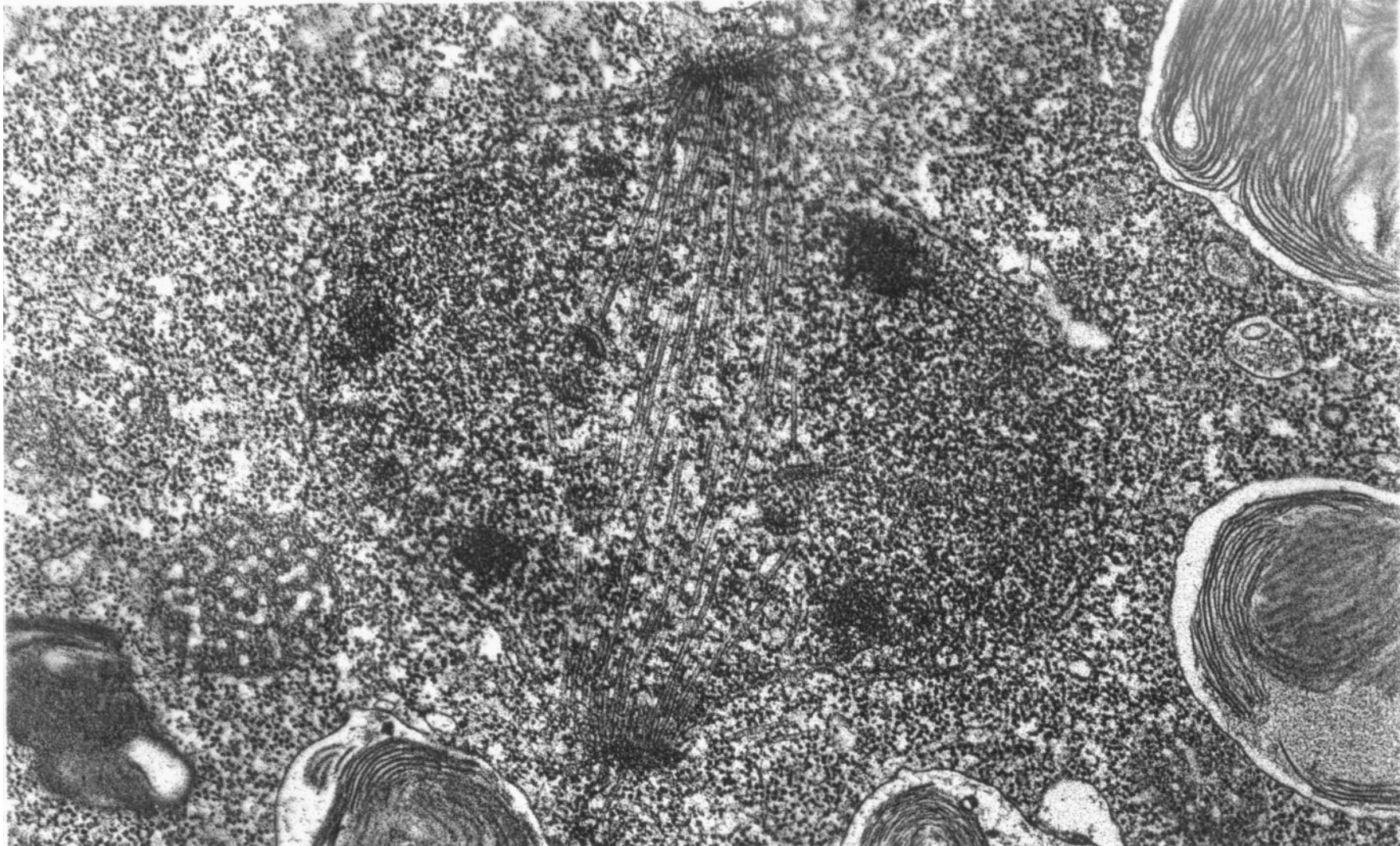
@ γ -tubuline + @ α -tubuline



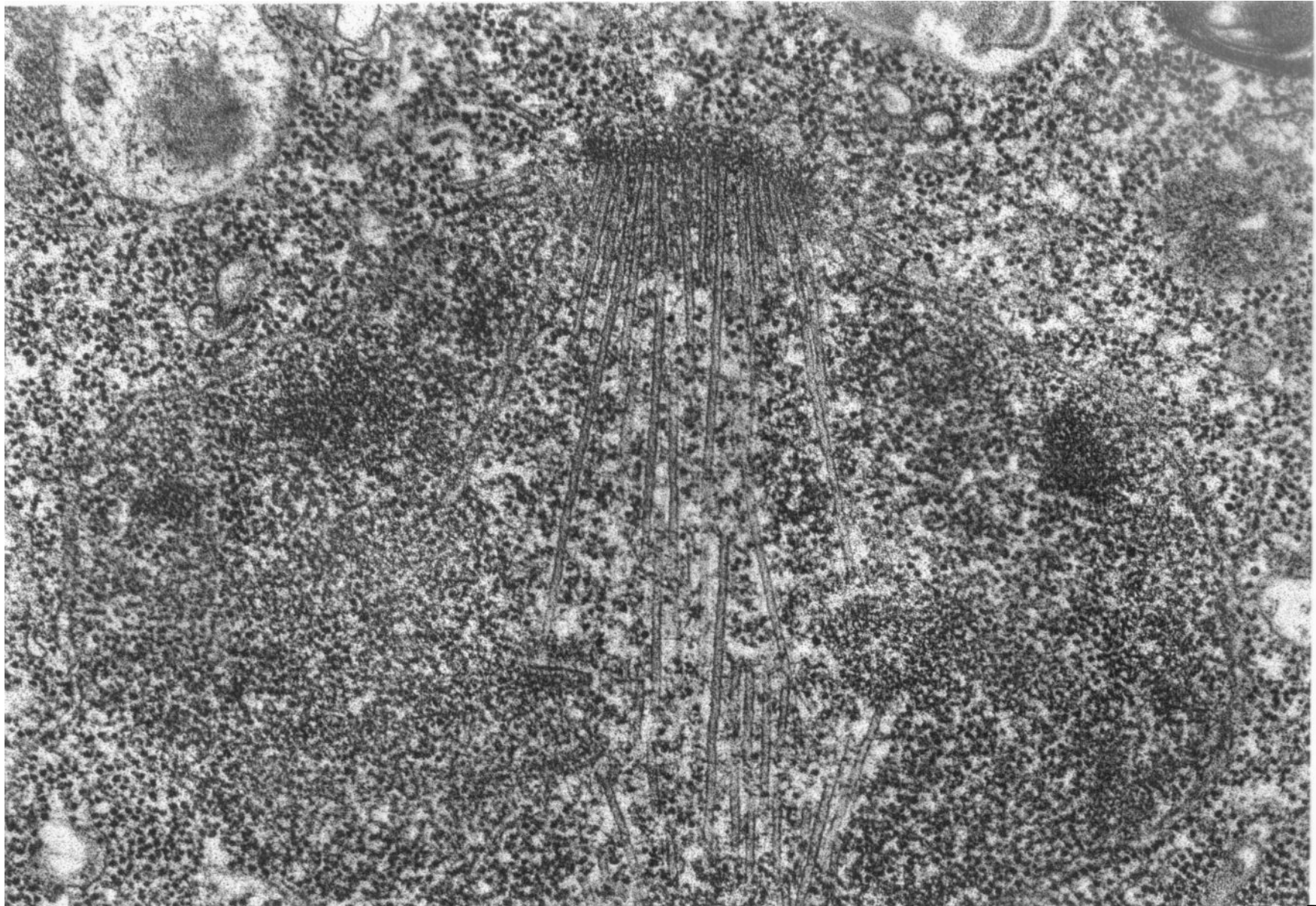
centrosome

Fuseau
mitotique

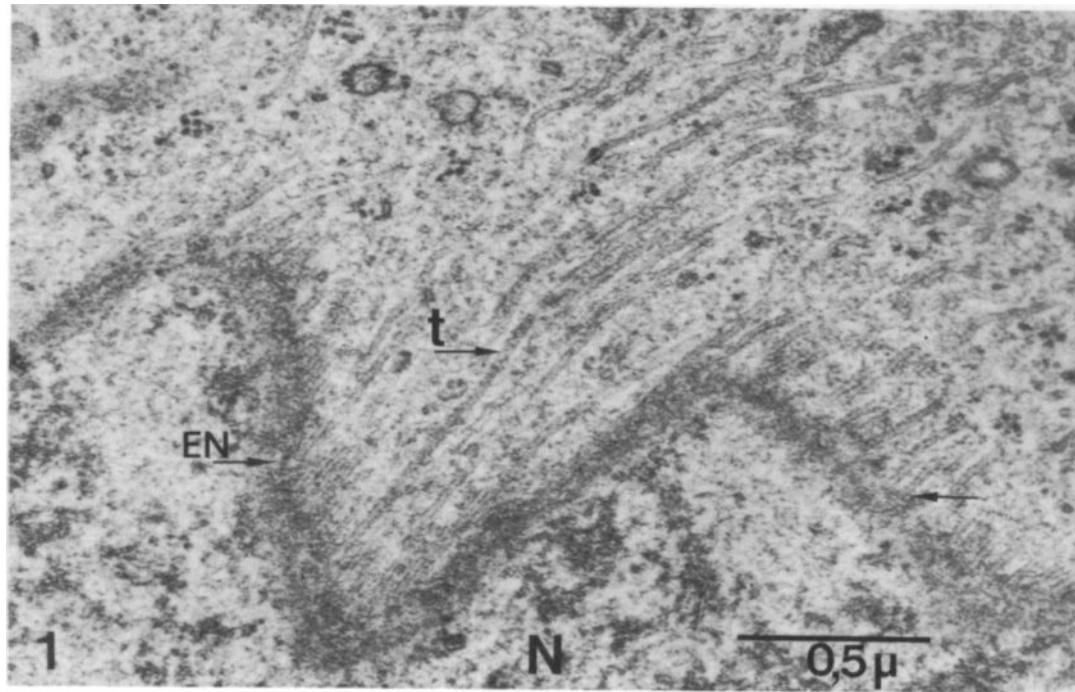
- Cellules de champignons : les corps polaires



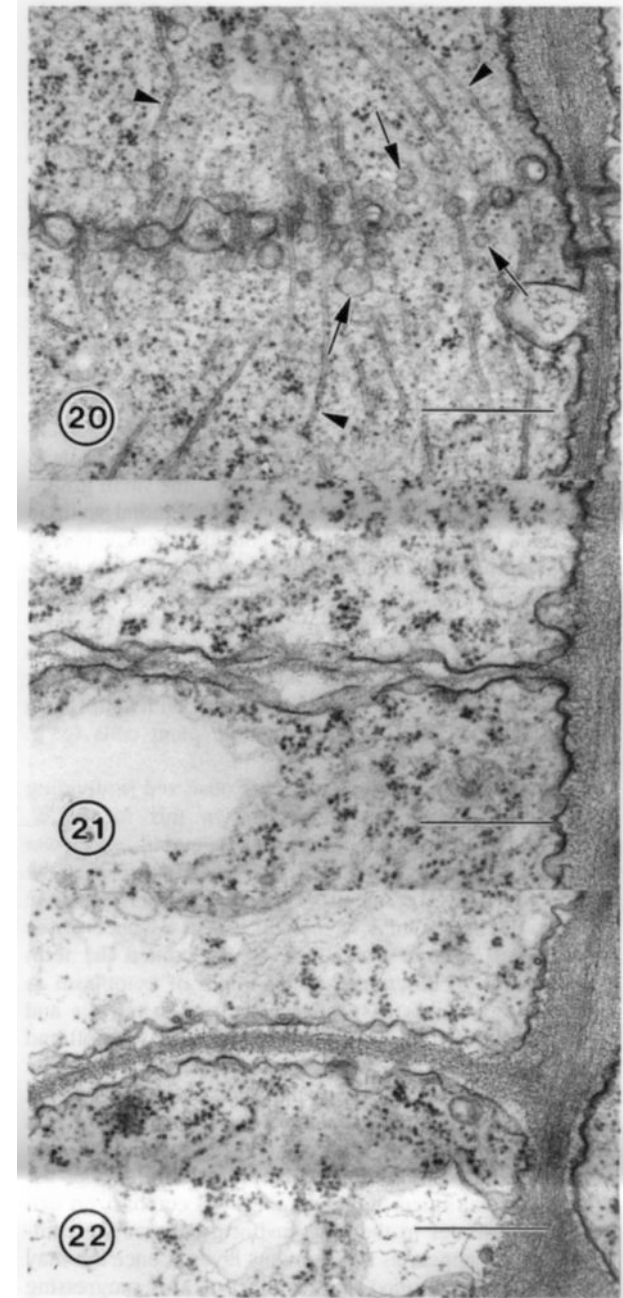
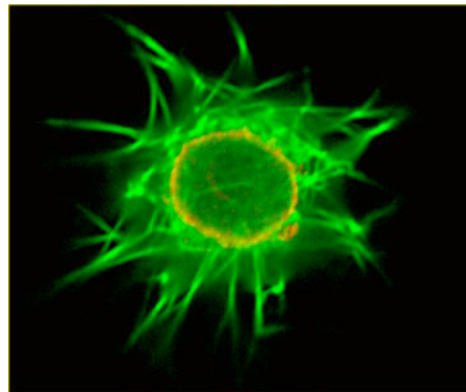
Présence de microtubules cytoplasmiques et intranucléaires



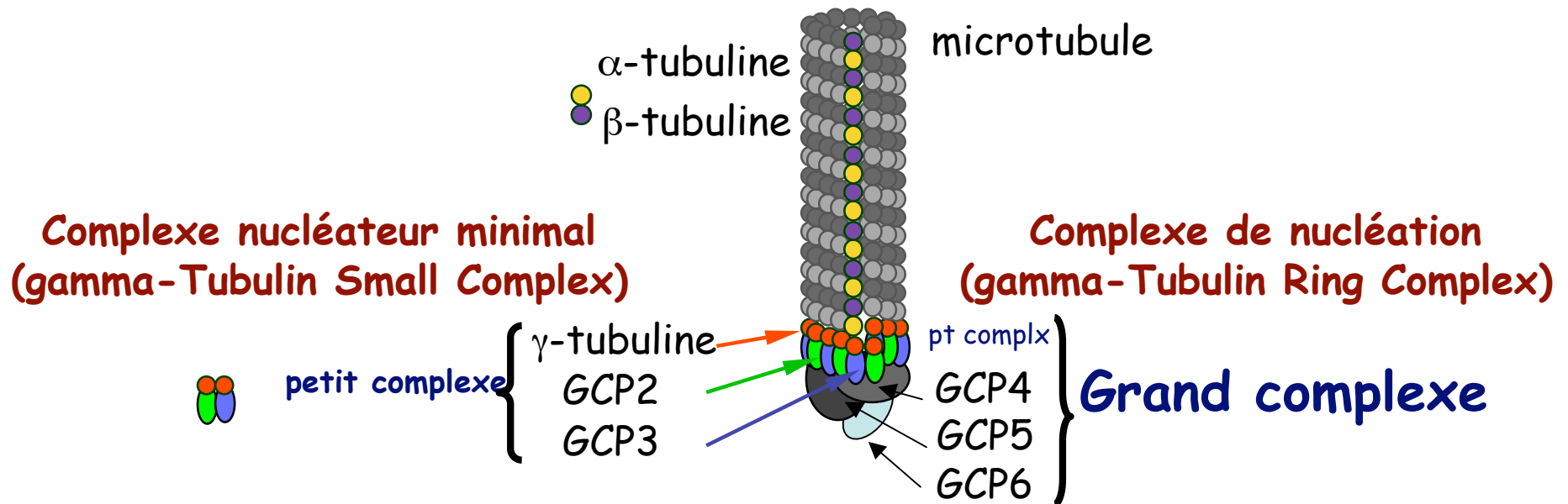
- chez les plantes : pas de site structuré... et pourtant des microtubules !



ET LA γ -TUBULINE ?



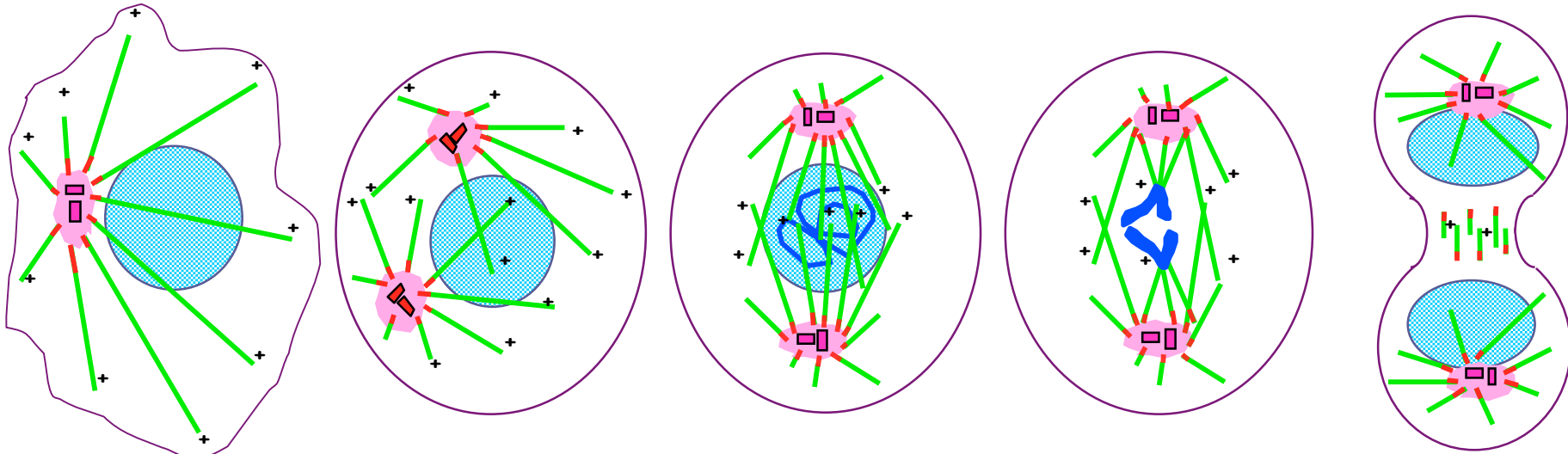
5. Les complexes de nucléation



γ -TuSCs	γ -TuRCs				
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Drosophila</i>	<i>Xenopus</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>Arabidopsis</i>	
Spc	Dgrip	Xgrip	HsGCP	AtGCP	
Tub4	γ -tubuline	γ -tubuline	γ -tubuline	γ -tubuline	GCP1
Spc97	84	110	97	75	GCP2
Spc98	91	109	97	95	GCP3
	72	72			
	75	75	66	75	GCP4
	128	133	116	106	GCP5
	163	210	200	210	GCP6

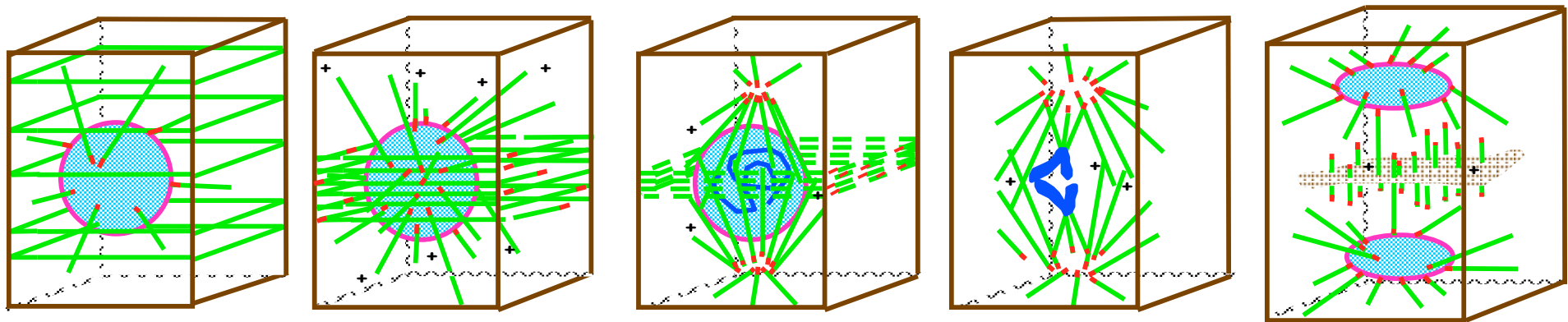
Polarité des microtubules au cours du cycle cellulaire dans une cellule animale et dans une cellule de plante

Cellule animale



Centres organisateurs des MTs (MTOCs)

Cellule de plante



Interphase

Phase G2

Prophase

Anaphase

Télophase

Biologie Cellulaire Végétale

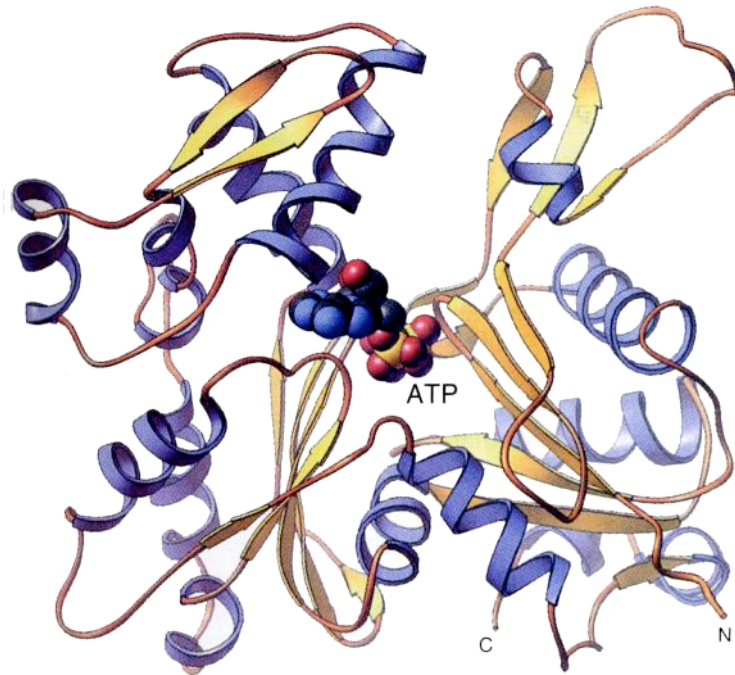
II. Le cytosquelette des eucaryotes

B. Le cytosquelette d'actine et ses moteurs associés

1. Assemblage polarisé de monomères d'actine
2. Localisation cellulaire des microfilaments d'actine
3. Protéines motrices liant l'actine
4. Autres protéines associées à l'actine
5. Effets de drogues sur le cytosquelette d'actine des cellules animales en interphase
6. Actine et motilité cellulaire de la cellule animale

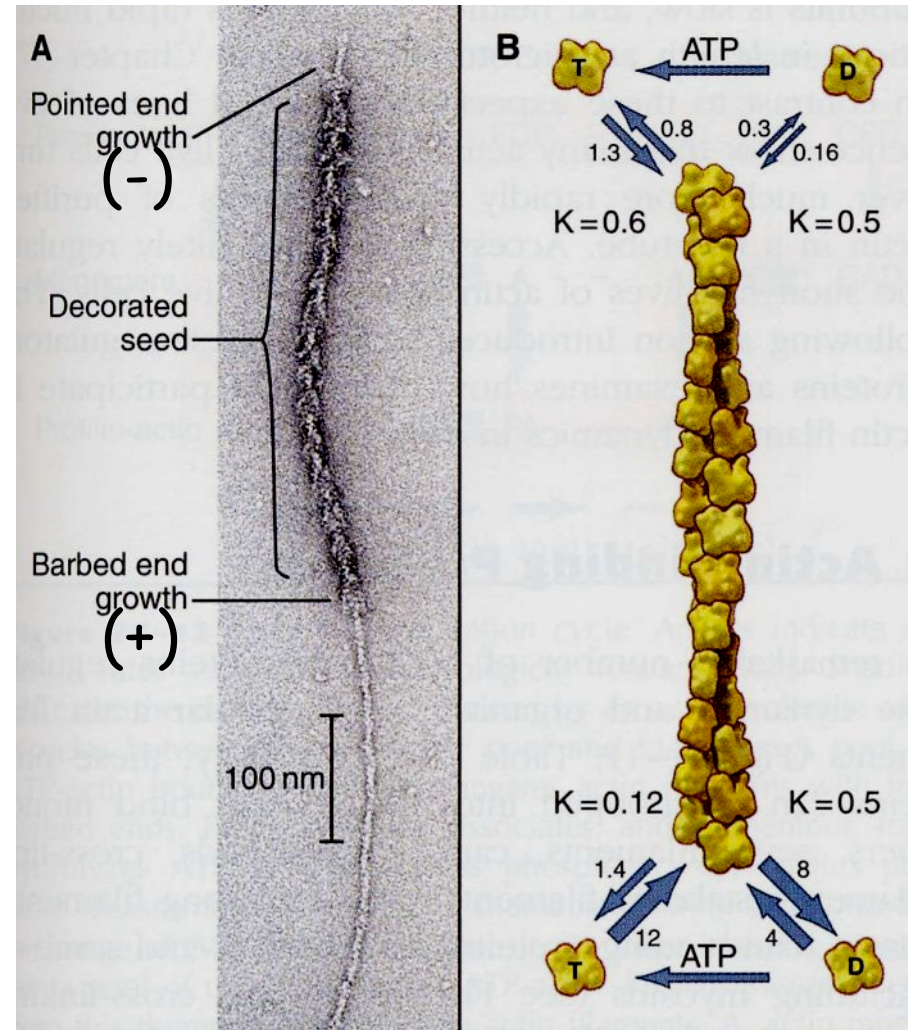
B. Le cytosquelette d'actine et ses moteurs associés

1. Assemblage polarisé de monomères d'actine



Forme globulaire : G-actine

Winder. (2003) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15 : 14-22



Décoration par méromyosine

2. Localisation cellulaire des microfilaments d'actine

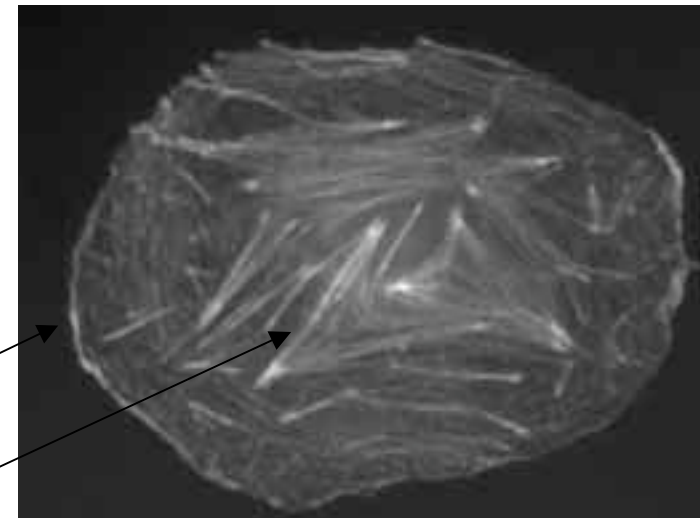
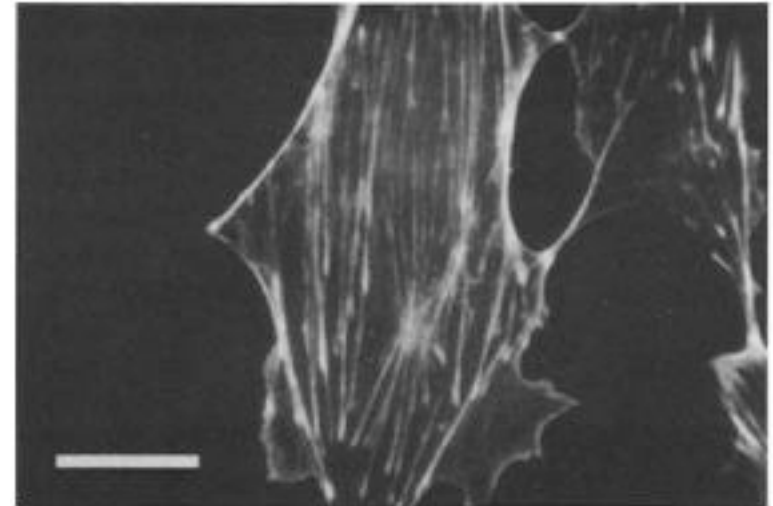
Cytosquelette actine au cours du cycle cellulaire chez la levure



Réseau cortical : filaments ramifiés
Fibres de stress : faisceaux denses

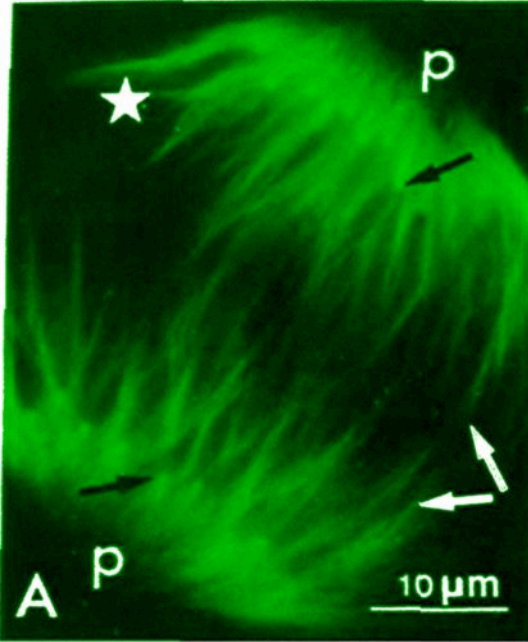
Cytosquelette actine des cellules animales

Stress fibres in PTK2 cells



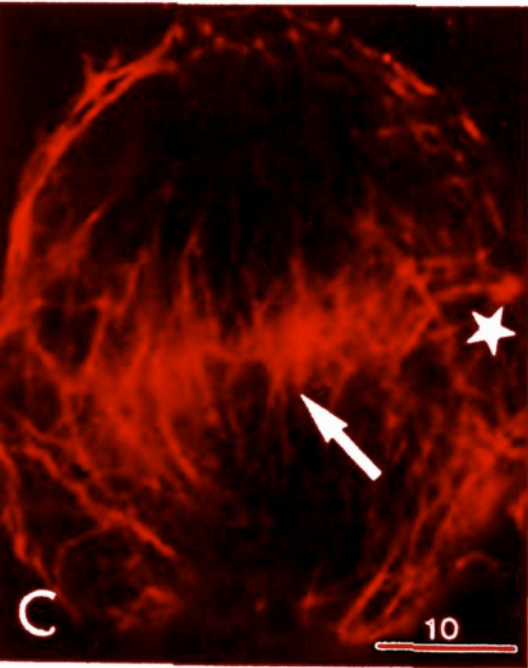
Cytosquelette
des cellules
végétales

tubuline

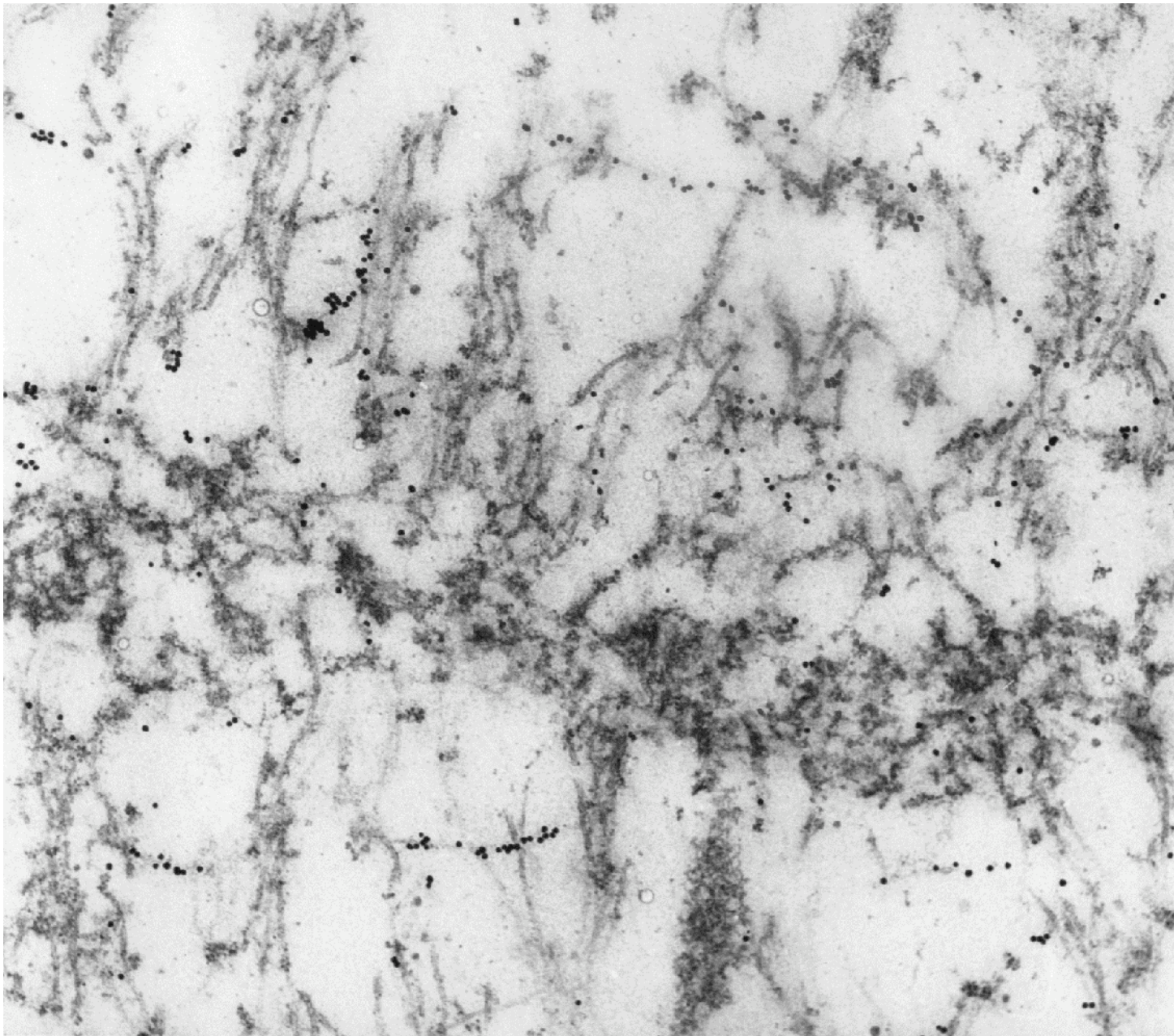


Anaphase

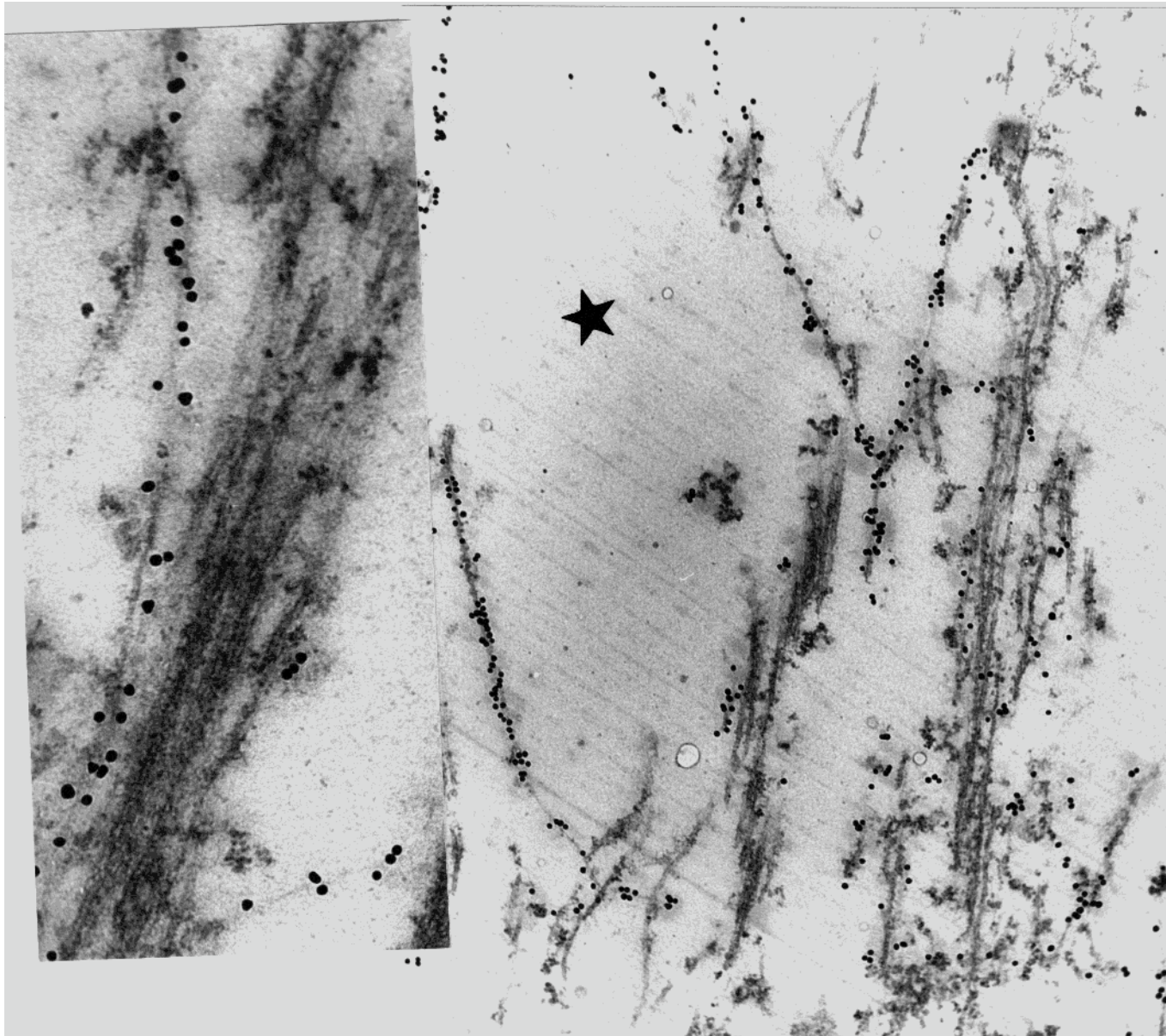
actine



Cellule d'albumen d'*Haemaphysalis*, en télophase.
Immunomarquage anti-actine/or colloïdal 20nm

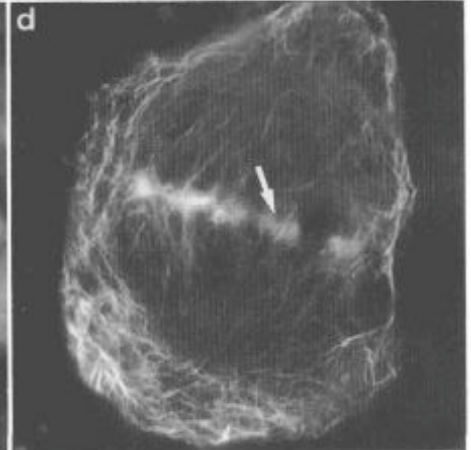
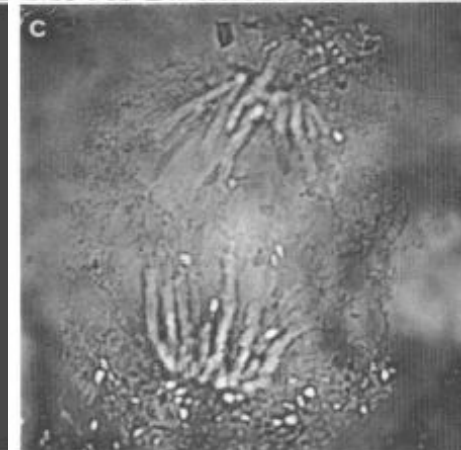
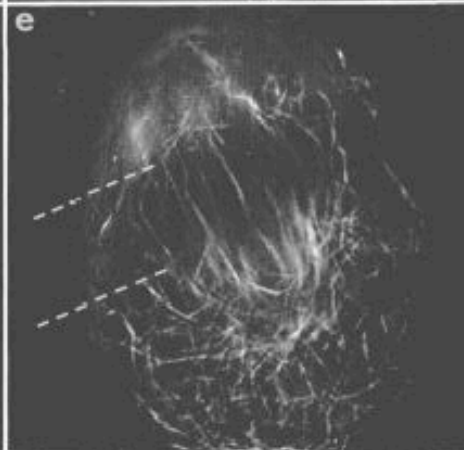
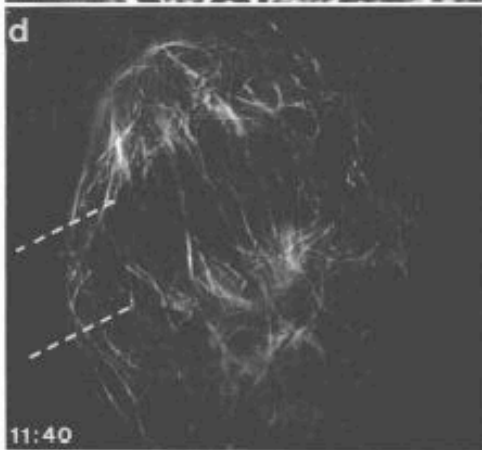
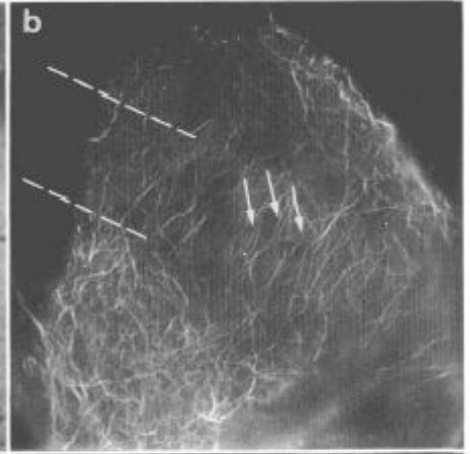
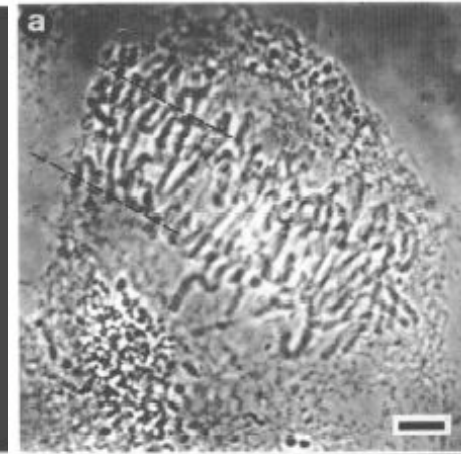
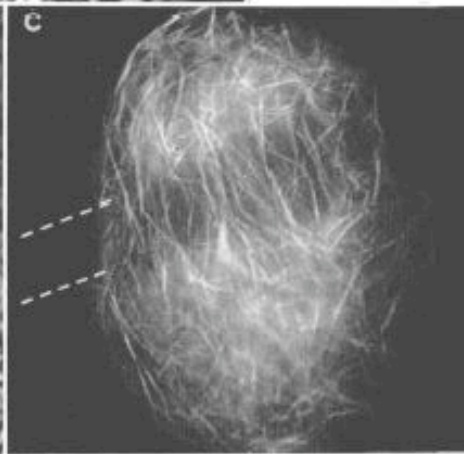
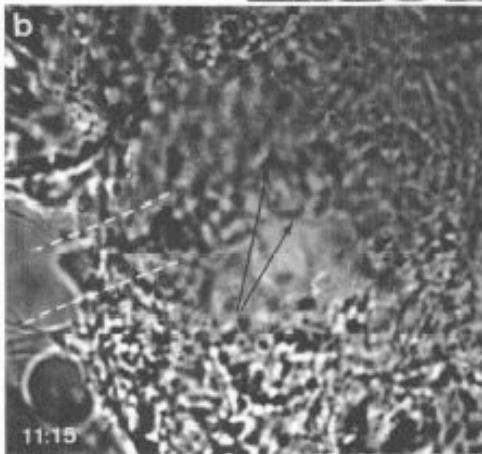
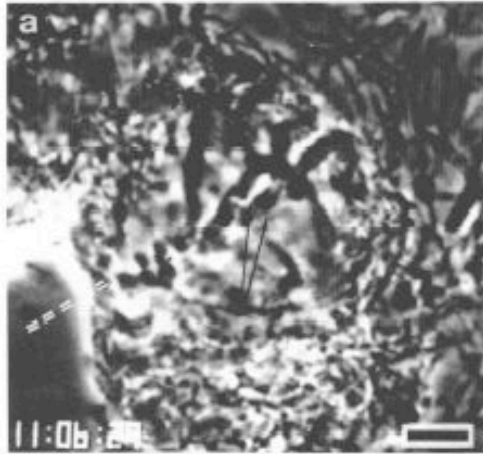


Cellule d'albumen d'*Haemaphysalis*, détail des cytosquelettes
Immunomarquage anti-actine/or colloïdal 20nm

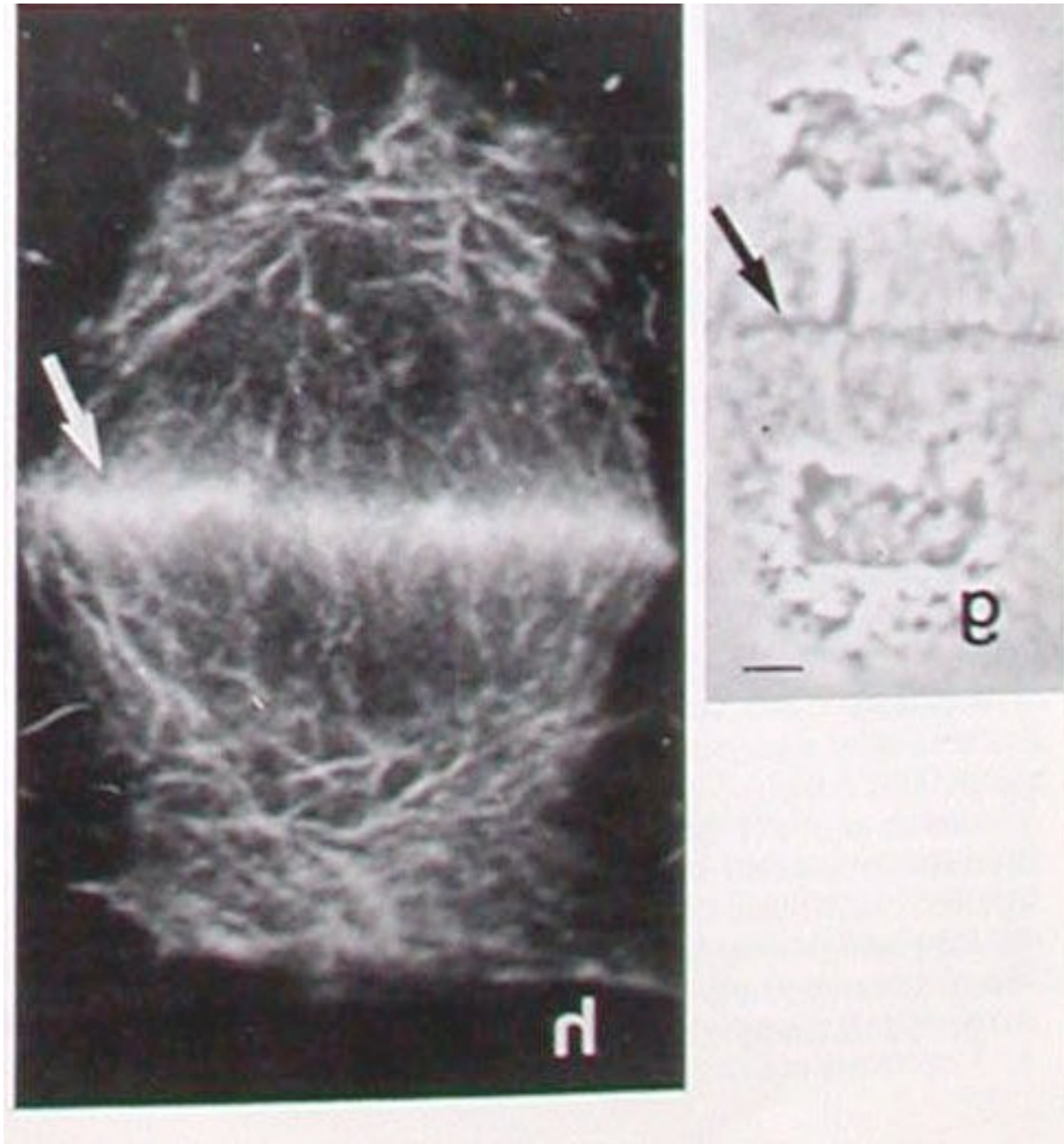


Microinjection de rhodamine phalloïdine

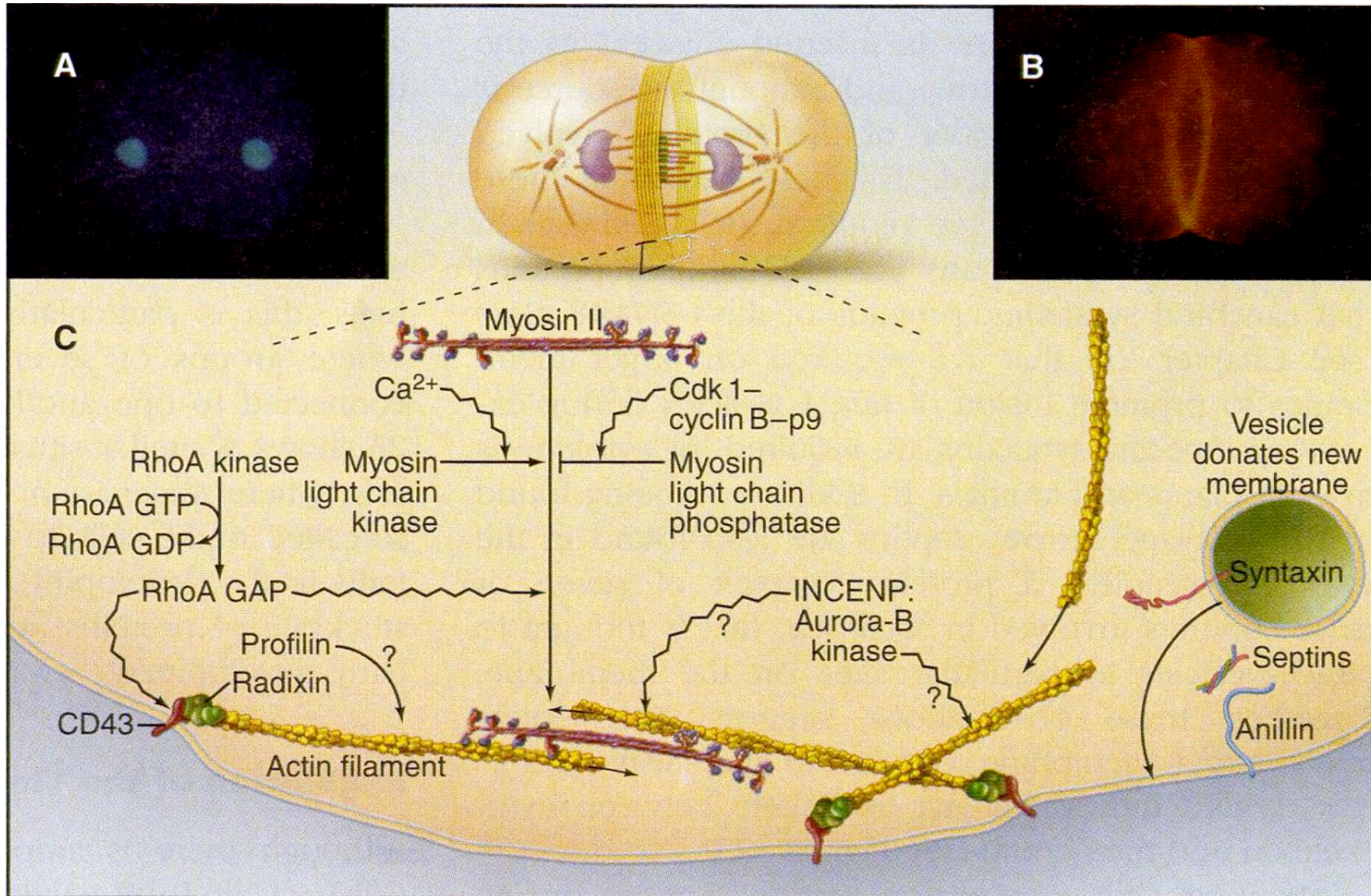
Schmit et Lambert (1990) Plant Cell 2 : 129-138.



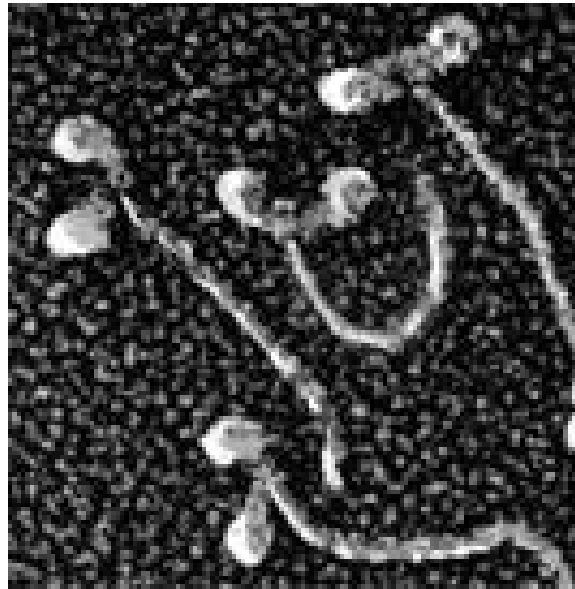
Faisceaux
d'actine dans
une cellule
végétale en
Télophase



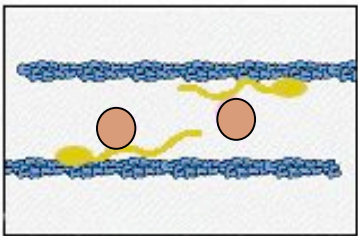
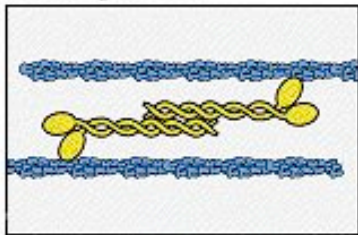
ACTINE dans les cellules animales en cytocinèse



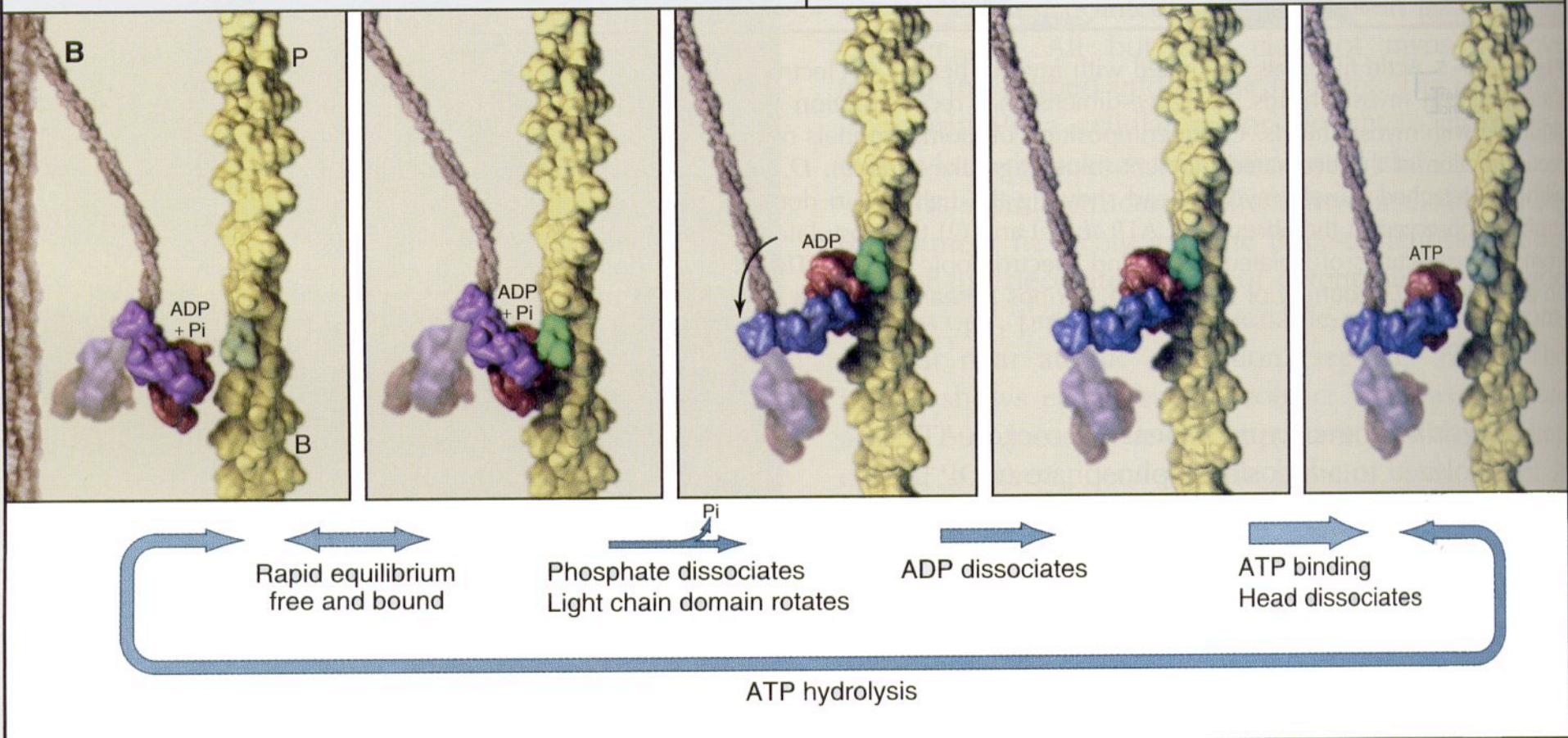
3. Protéines motrices liant l'actine



Motor protein

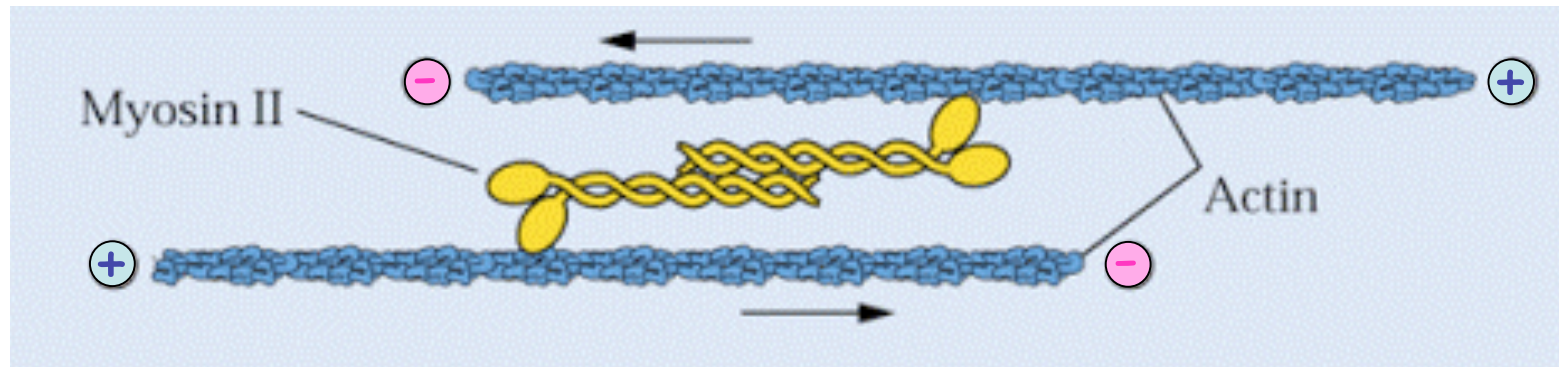


Système moteur acto-myosine



La contraction actomyosine dépendante

Protéines motrices : 2 classes de myosines bien caractérisées dans les plantes



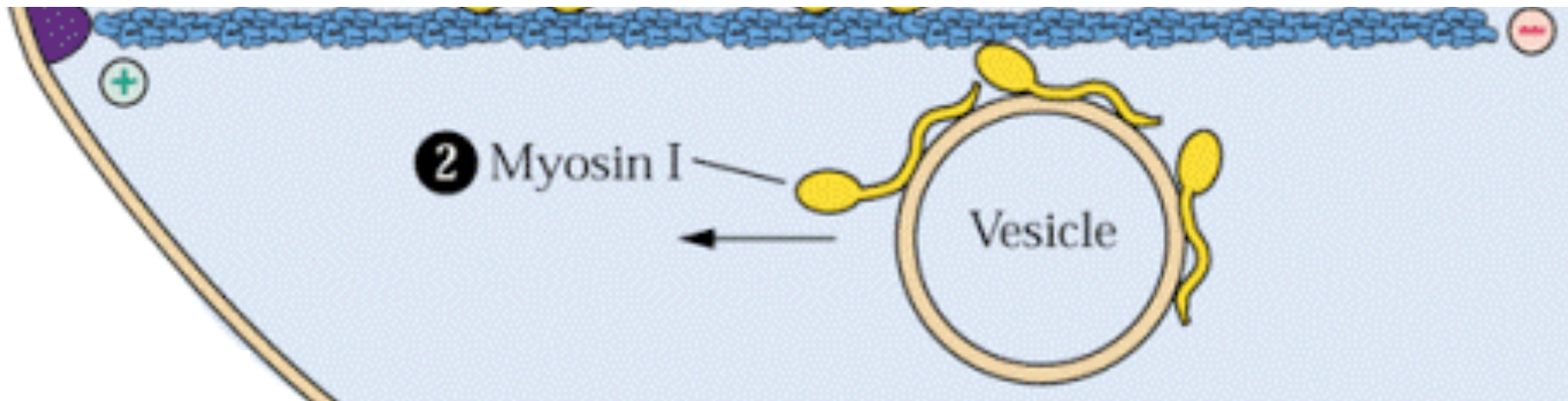
Les myosines II : sites ATPase dans les chaînes lourdes
=> $ATP \rightarrow ADP + P_i \rightarrow$ mouvement

Les filaments d'actine, d'orientation opposée, bougent du plus vers le moins,

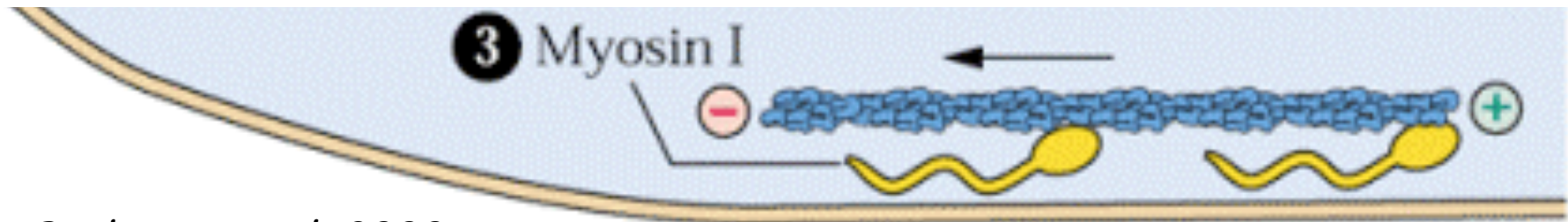
=> Contractions locales

Autres mouvements induits par la myosine

La myosine I déplace les vésicules le long du filament



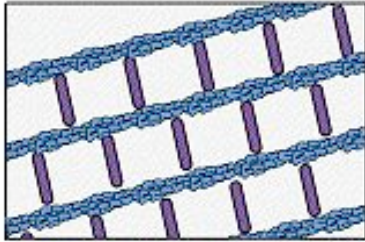
La myosine I déplace les filaments le long d'une membrane



Buchanan et al. 2000

4. Quelques autres protéines associées à l'actine et leur fonction

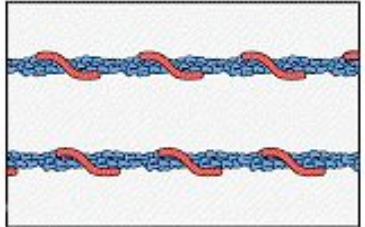
Bundling protein



68 kD

Fimbrine

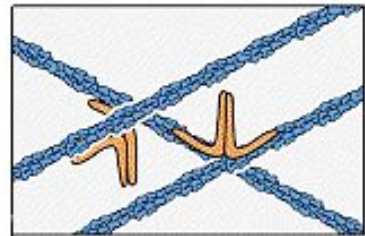
Side-binding protein



2 × 100 kD

α -actinine

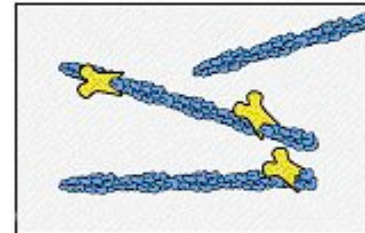
Cross-linking protein



2 × 35 kD

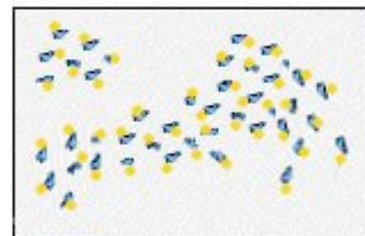
Tropomyosine

Severing protein



90 kD

Gelsoline



15 kD

Profiline

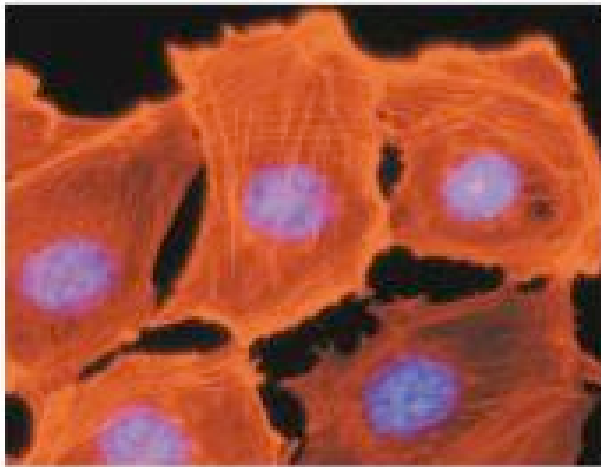


2 × 270 kD

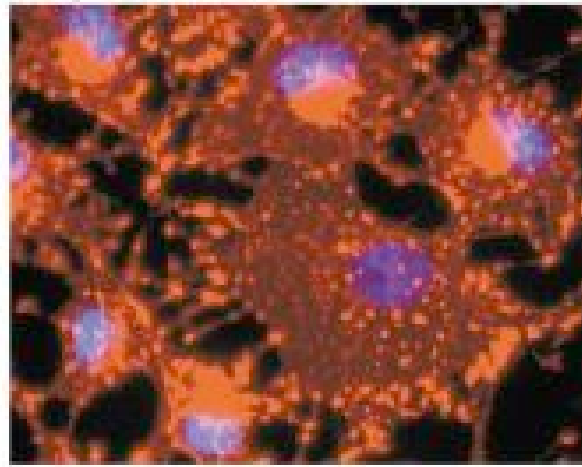
Filamine

5. Effets de drogues sur le cytosquelette d'actine des cellules animales en interphase

Control (rhodamine-phalloïdine)



Cytochalasin B



Latrunculin B

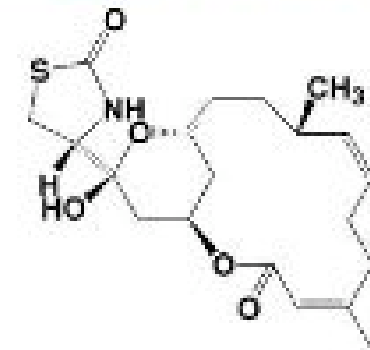
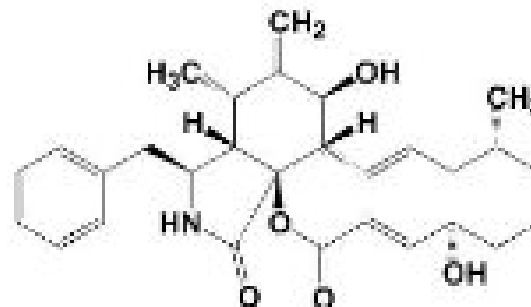
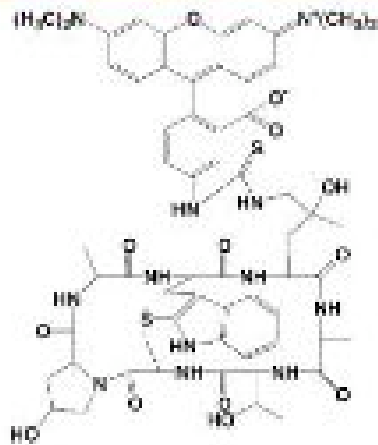
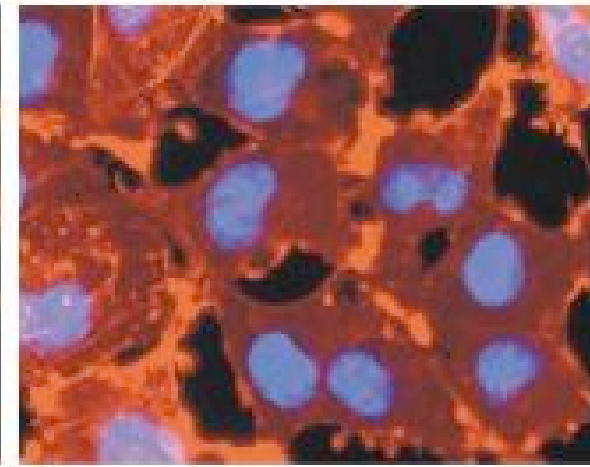
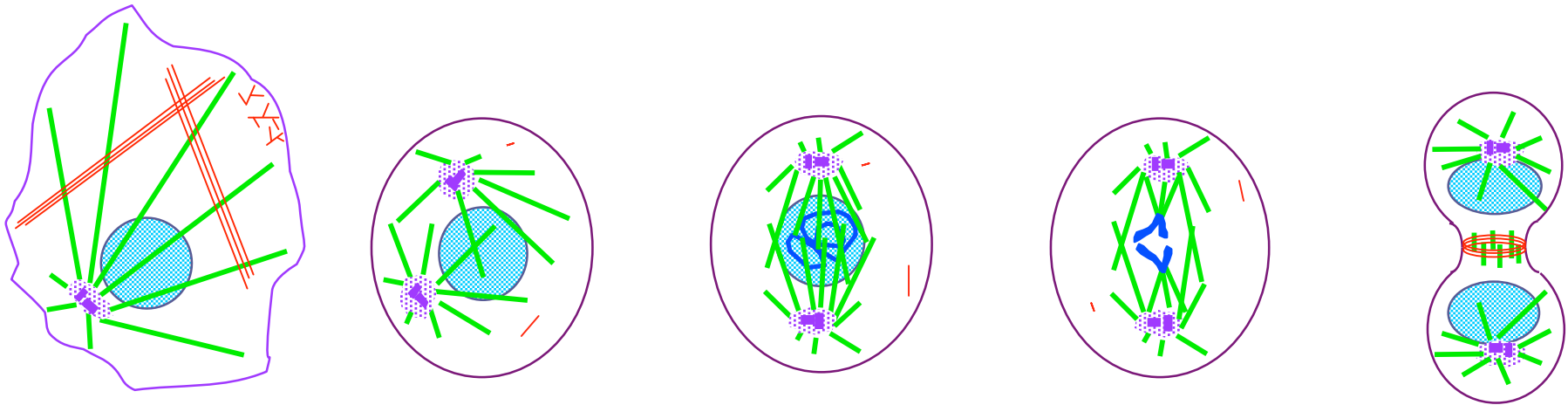
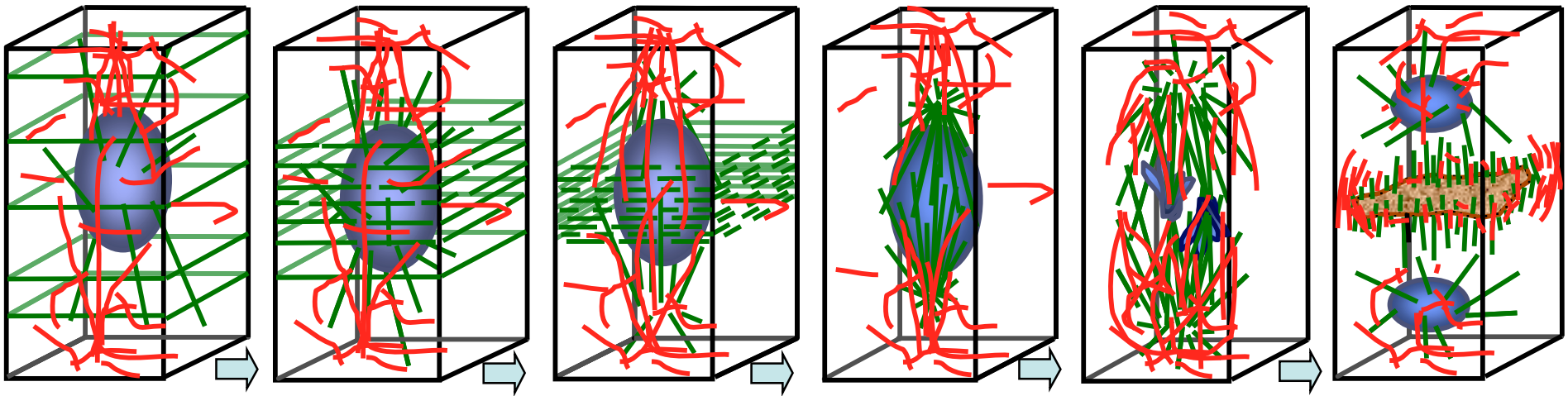


Schéma des cytosquelettes tubuline et actine



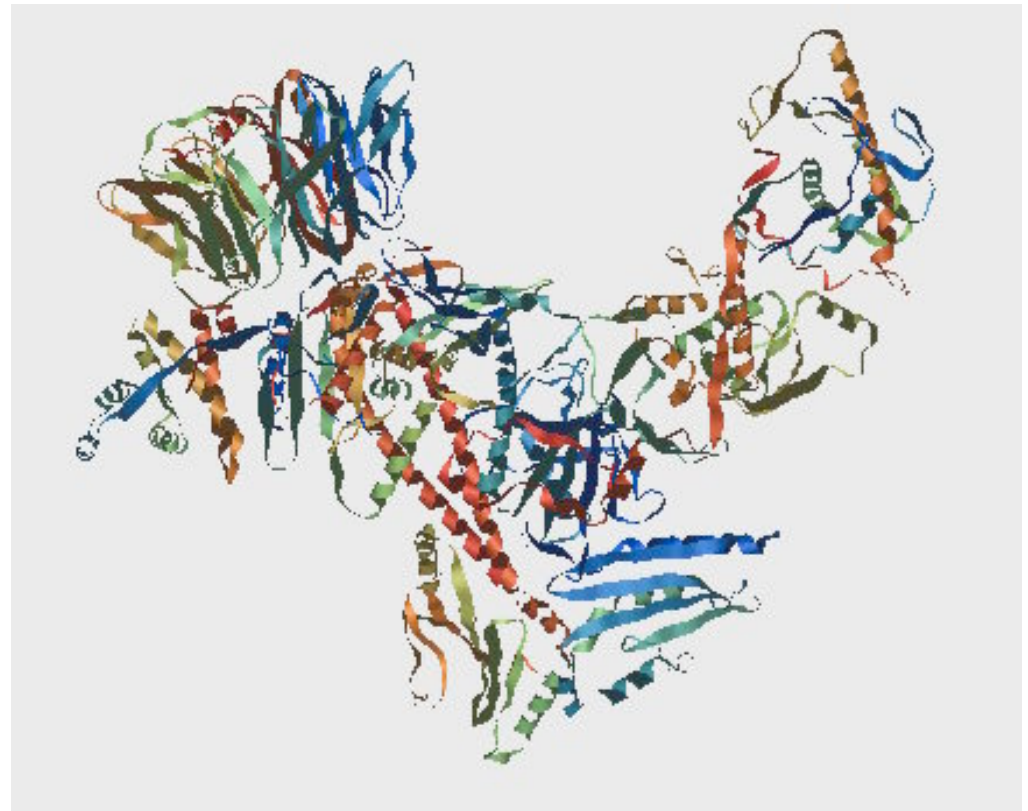
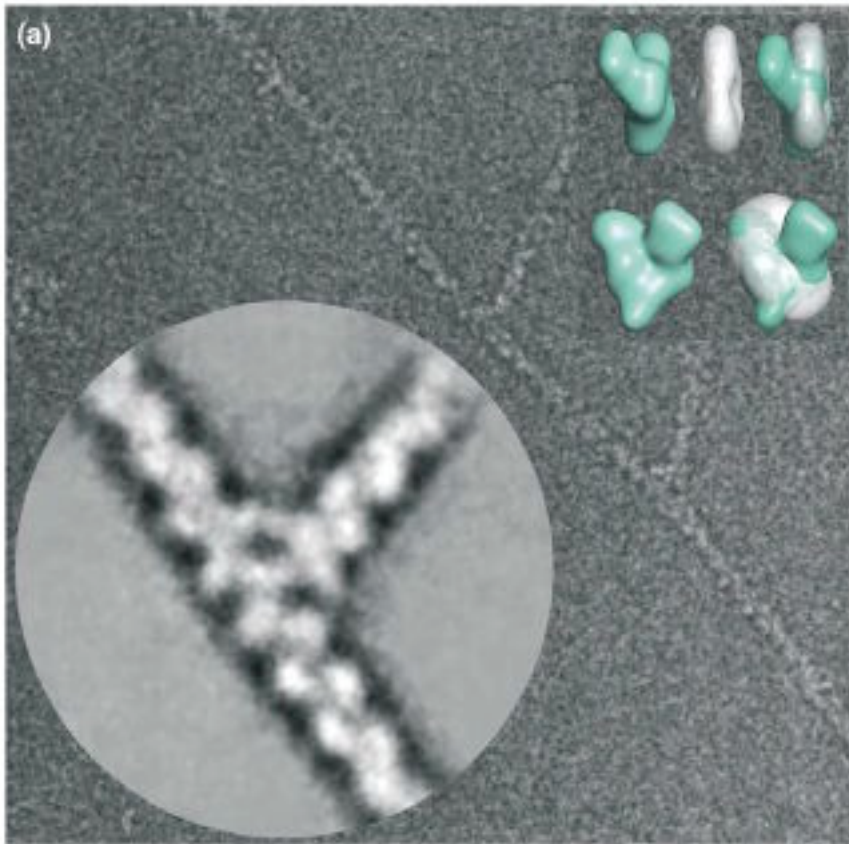
Cellules animales



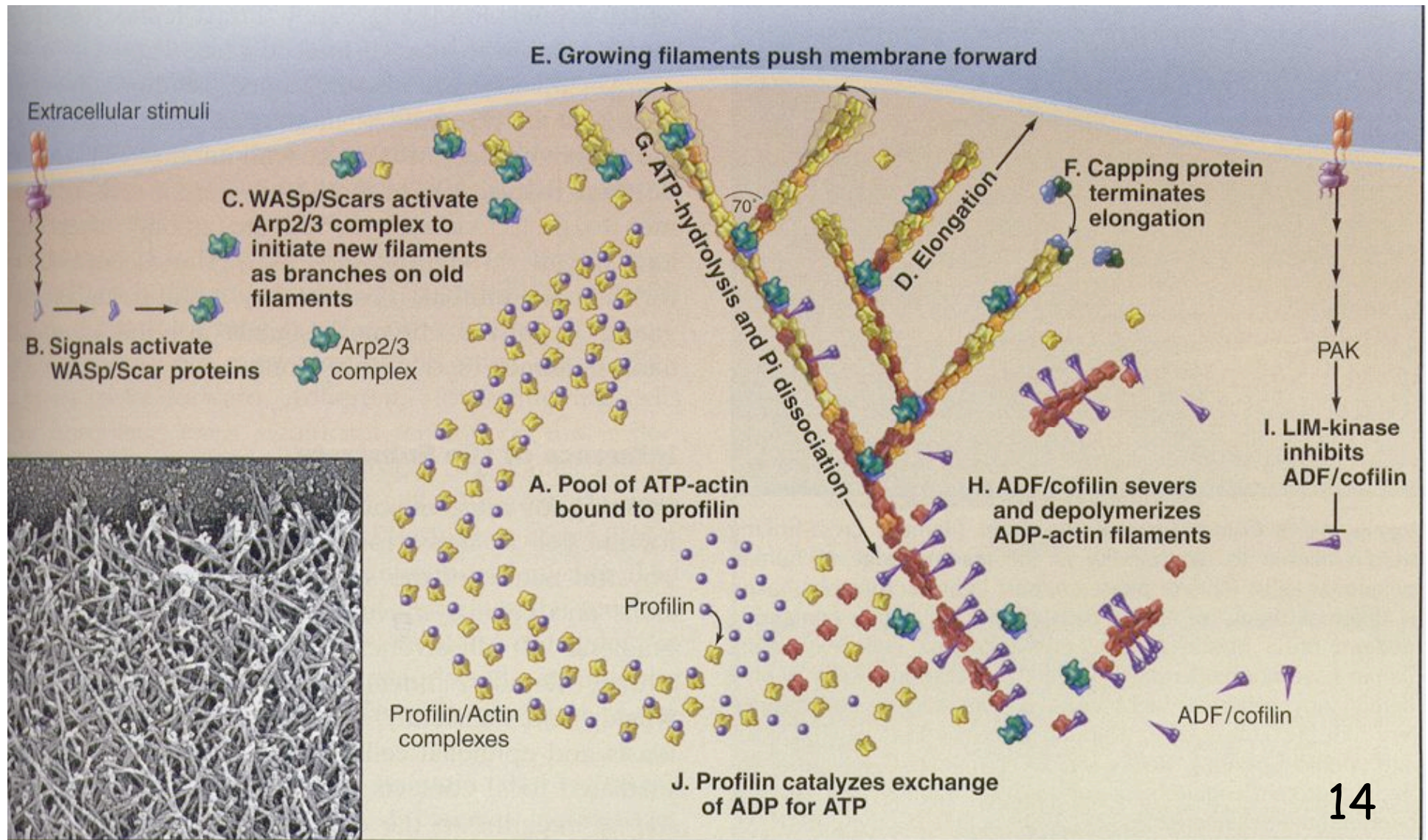
Cellules végétales

6. Actine et motilité cellulaire de la cellule animale

Le complexe ARP2/ARP3 permet l'organisation ramifiée des polymères dans le cortex



Dynamique des filaments corticaux

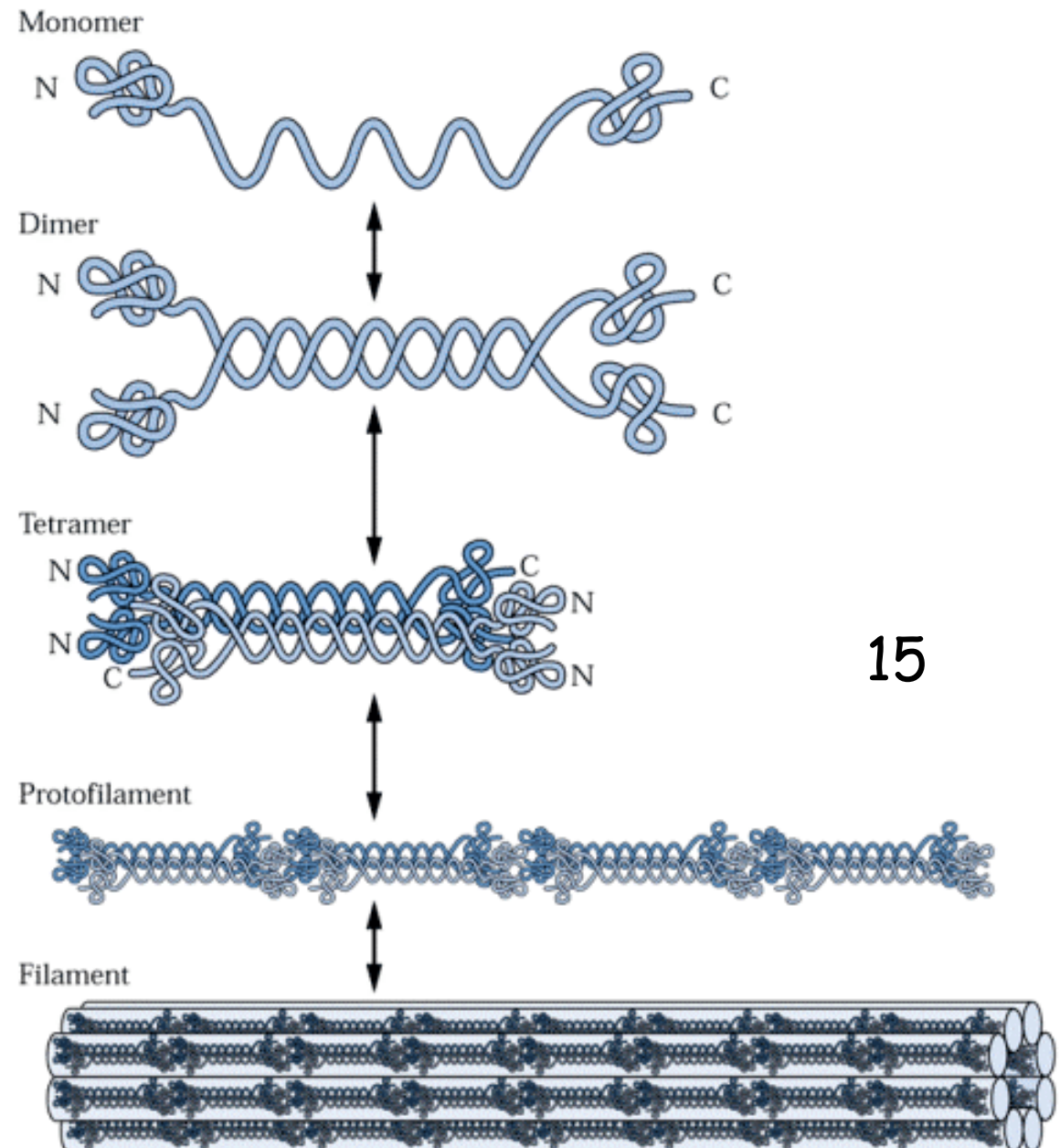


C. Les filaments intermédiaires

1. Organisation des polymères
2. Assemblage des polymères
3. Classification des filaments intermédiaires
4. Structure moléculaire comparable des filaments intermédiaires

C. Les filaments intermédiaires

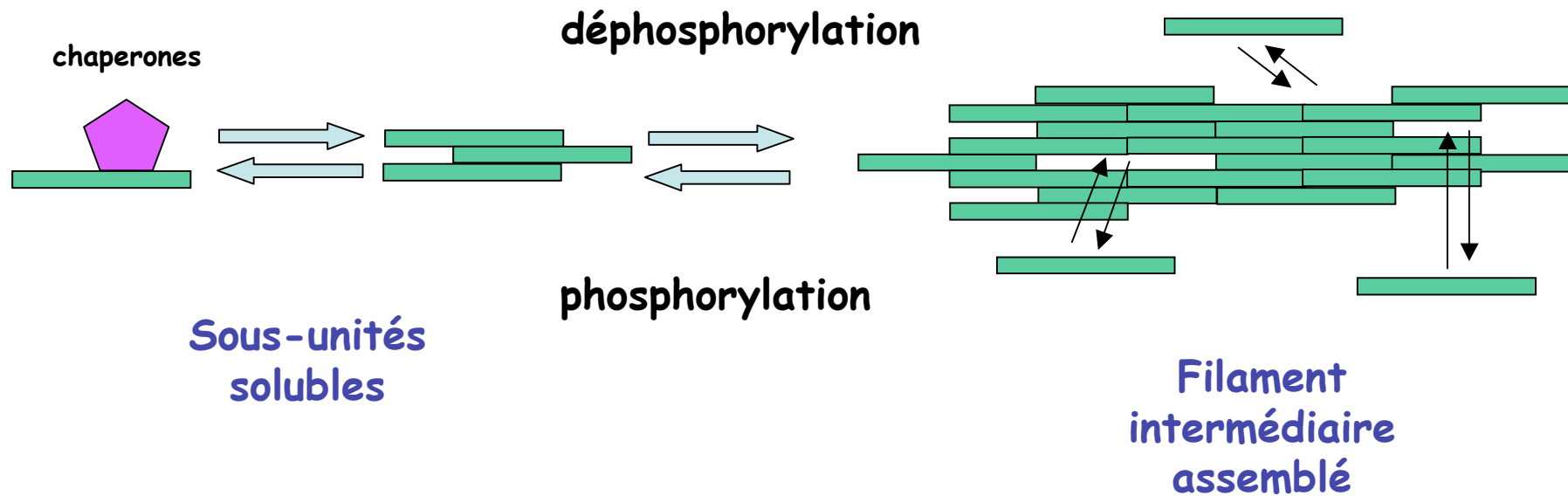
1. Organisation des polymères



15

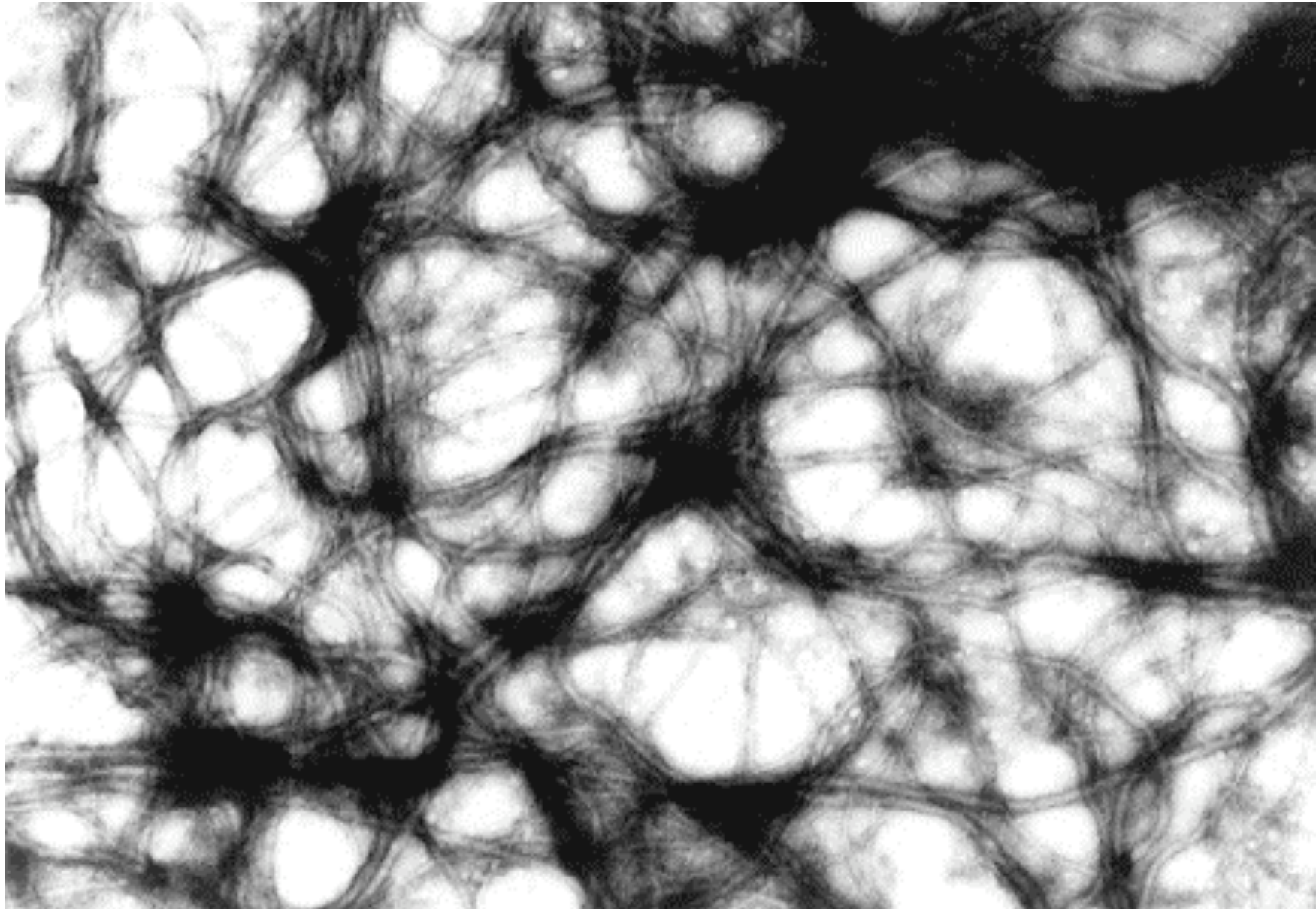
Diamètre $\approx 10\text{nm}$

2. Assemblage des polymères



Les filaments intermédiaires se sont pas polarisés

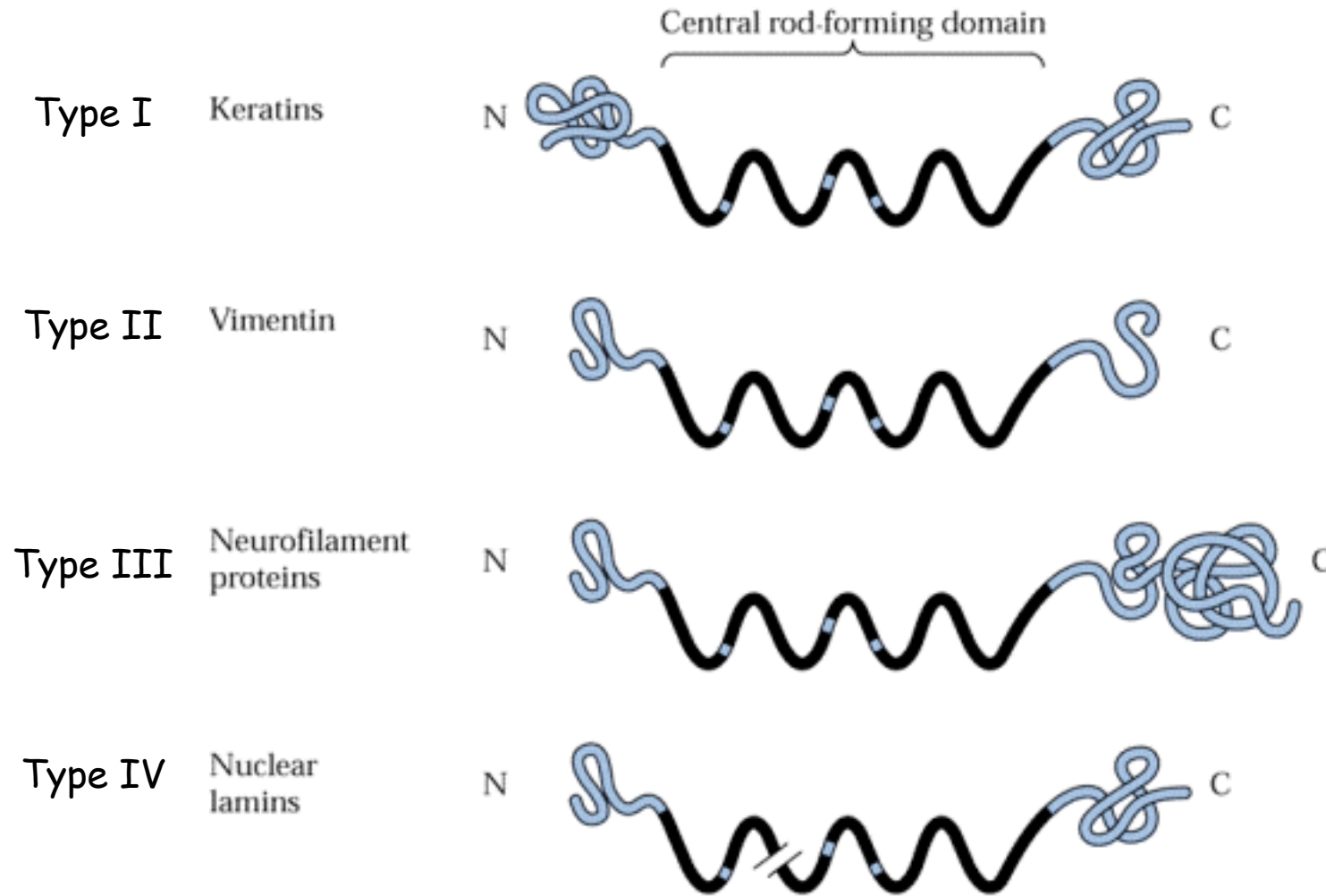
Filaments intermédiaires purifiés à partir de cellules végétales,
polymérisés *in vitro*



3. Classification des filaments intermédiaires

Type de filament intermédiaire	Composant polypeptidique (masse en daltons)	Localisation cellulaire
Type I	kératines acides (40 000 - 70 000) + kératines neutres et basiques (40 000 - 70 000)	cellules épithéliales et dérivés épidermiques, tels que les cheveux et les ongles
Type II	vimentine (53 000)	beaucoup de cellules d'origine mésenchymateuse souvent exprimée par les cellules en culture
	desmine (52 000)	cellules musculaires
	protéine fibrillaire acide de la neuroglie (45 000) GFAP	cellules gliales (astrocytes et certaines cellules de Schwann)
Type III	protéines des neurofilaments (environ 130 000* ; 100 000* ; et 60 000) H, M et L	neurones
Type IV	lamines nucléaires A, B et C (65 000 - 75 000)	lamina nucléaire de toutes les cellules
Type V	Nestines (230 000) homopolymères	muscle, neurones embryonnaires

4. Structure moléculaire comparable des filaments intermédiaires

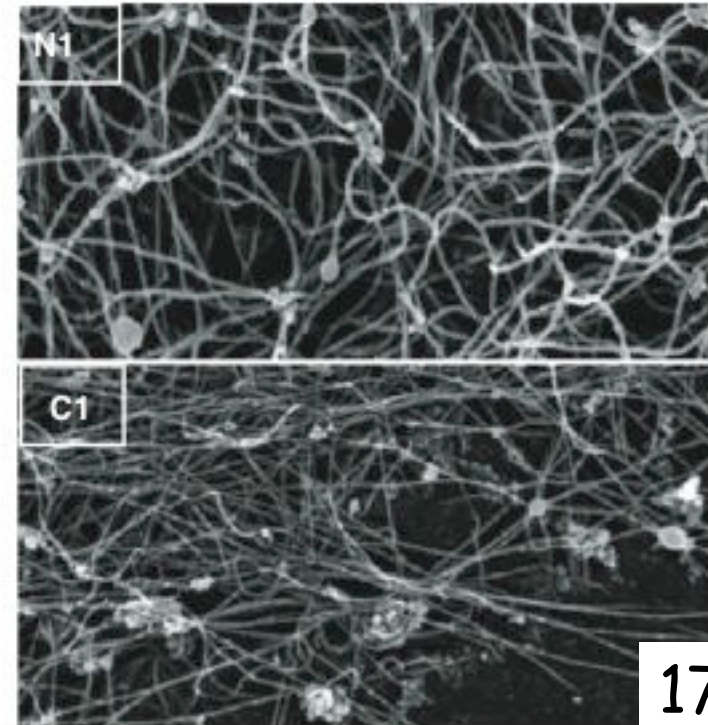
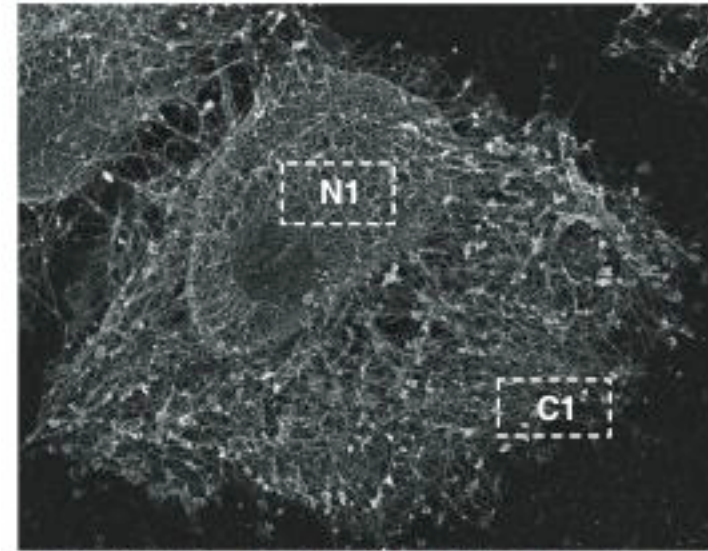
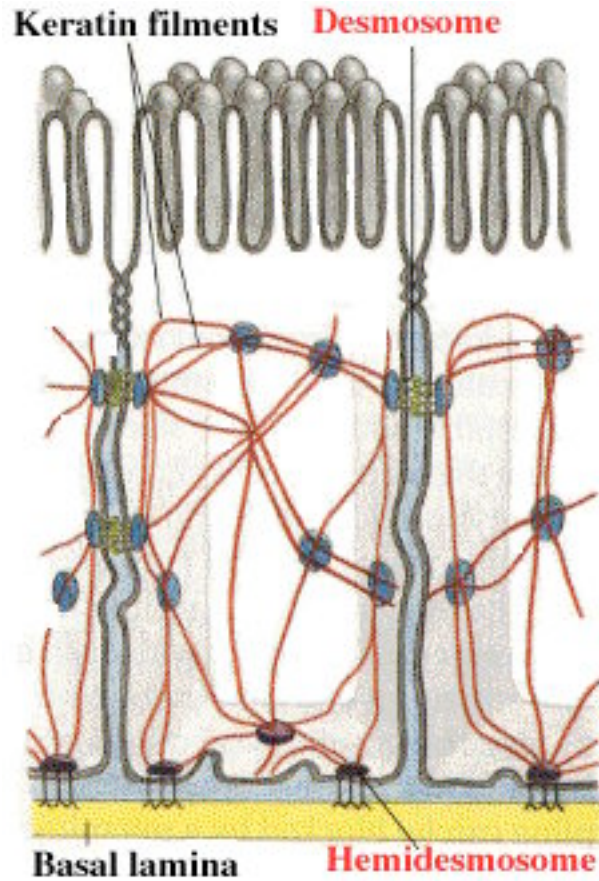


Cytokératines : 95% des protéines de l'épiderme

Type I
Cellule épithéliale en culture

tonofilaments

K8/K18



Beil et al. (2003) Nature Cell Biol 5 : 803-811

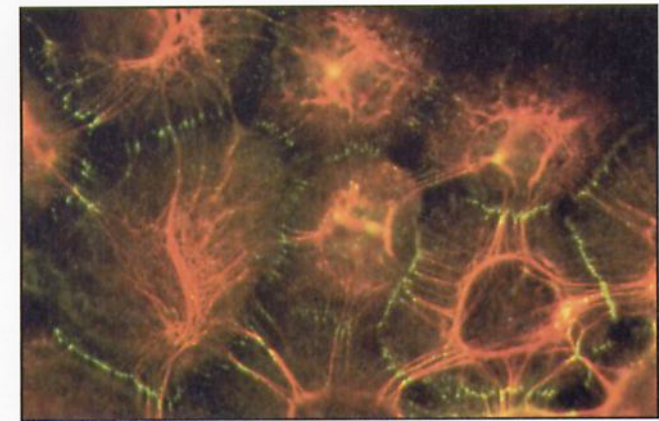
- Polymères à couple de sous-unités acide + basique, tissu spécifique

Acides (9 à 20)- basiques (1 à 8)

K1-K10 : épiderme

K4-K13 : langue, œsophage

K3-K12 : cornée



- Les kératines jouent un rôle dans la cohésion et l'intégrité des tissus épithéliaux (sujets au frottement)

Vimentines

Fibroblastes de rein
de hamster
(R. Goldman)

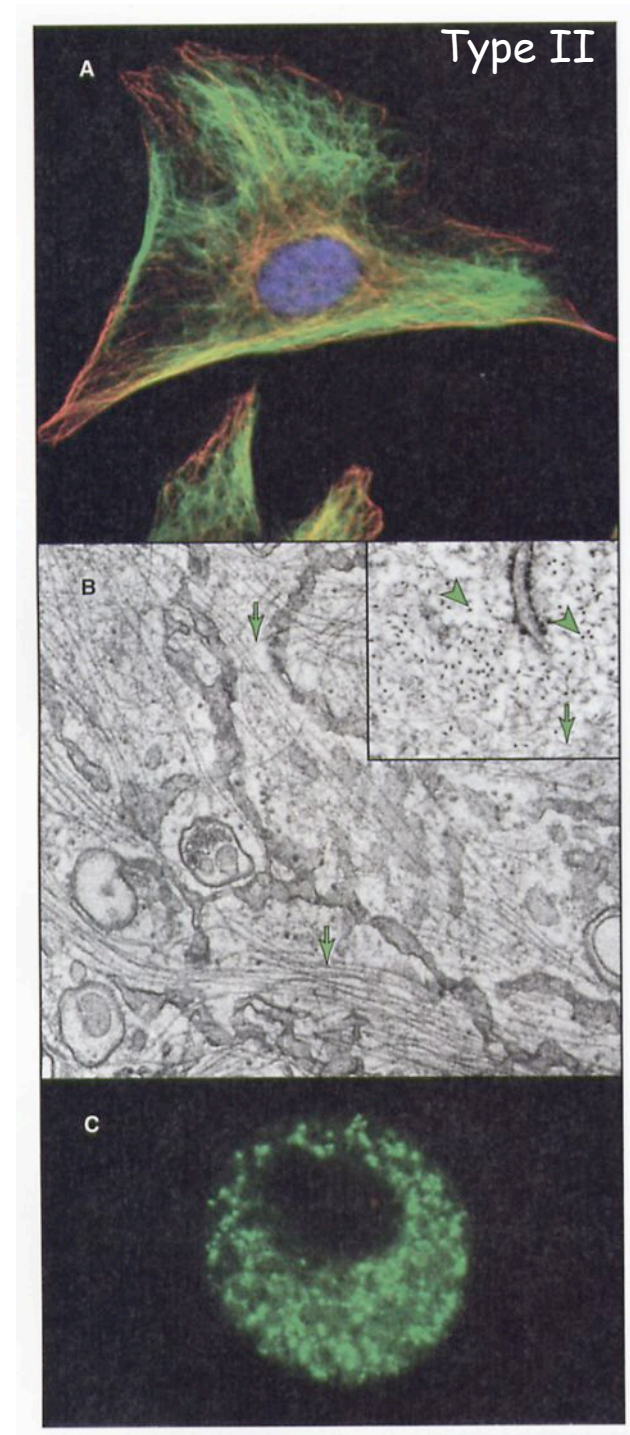
Noyau

Microtubules

vimentine

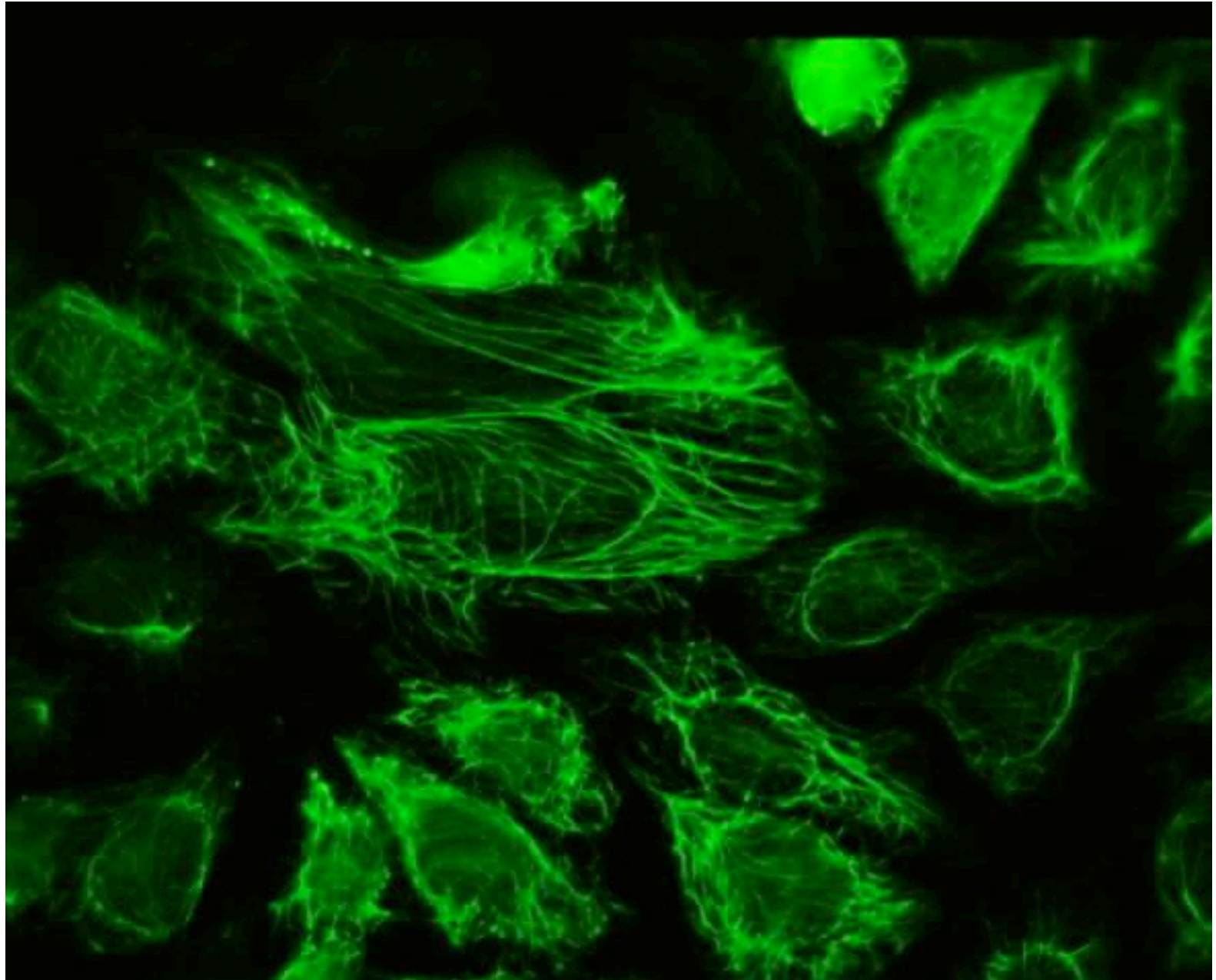
Microscopie électronique

En mitose, dépolymérisation des
filaments intermédiaires ; les sous-
unités ont tendance à s'agréger



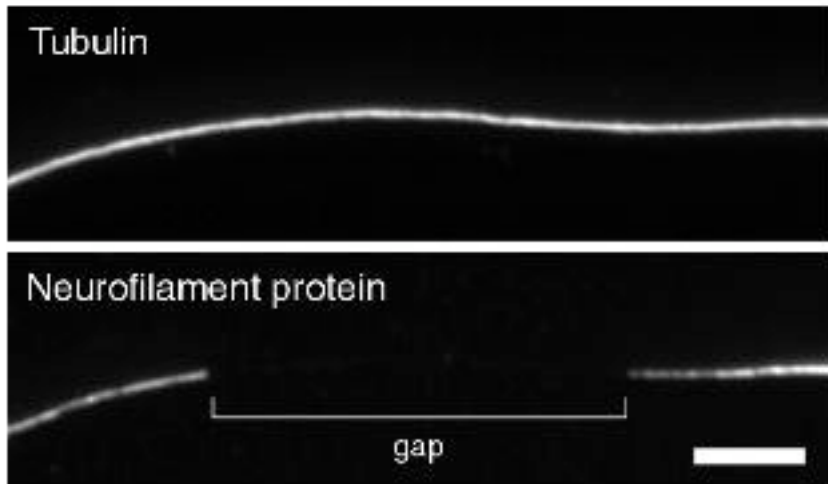
Vimentine

Type II

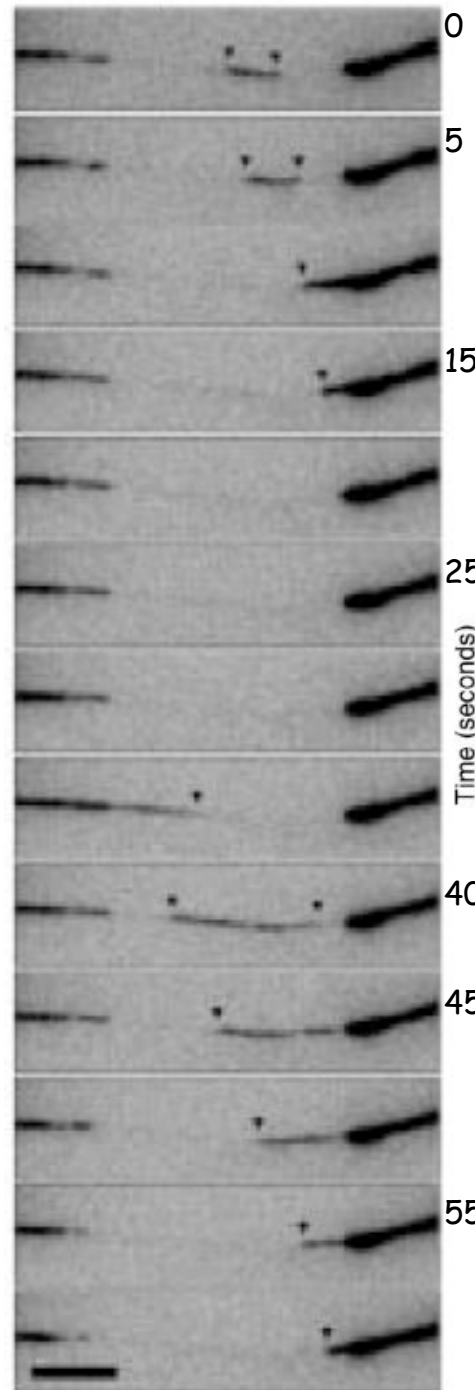


Dynamique des neurofilaments

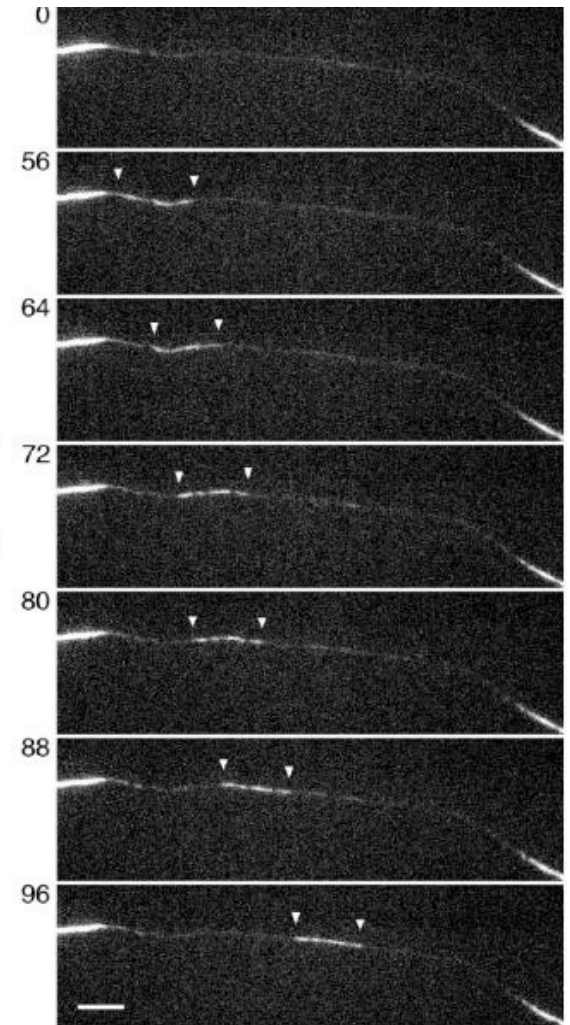
Expression de NFL-GFP dans un neurone en culture ->



- mouvements antérograde du corps cellulaire vers l'extrémité de l'axone
- blocage des mouvements -> maladie de Charcot = neurodégénérescence

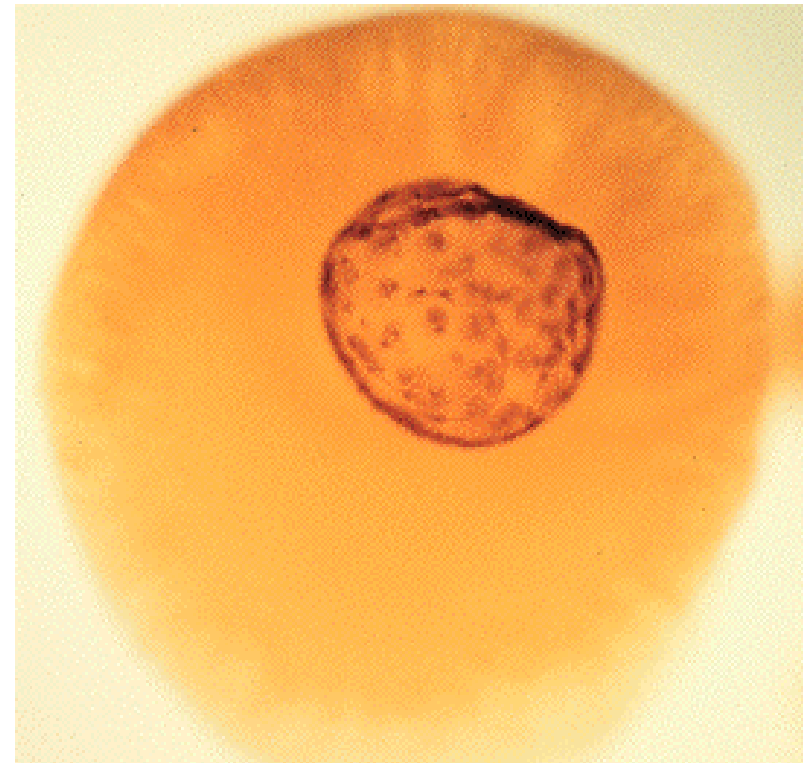
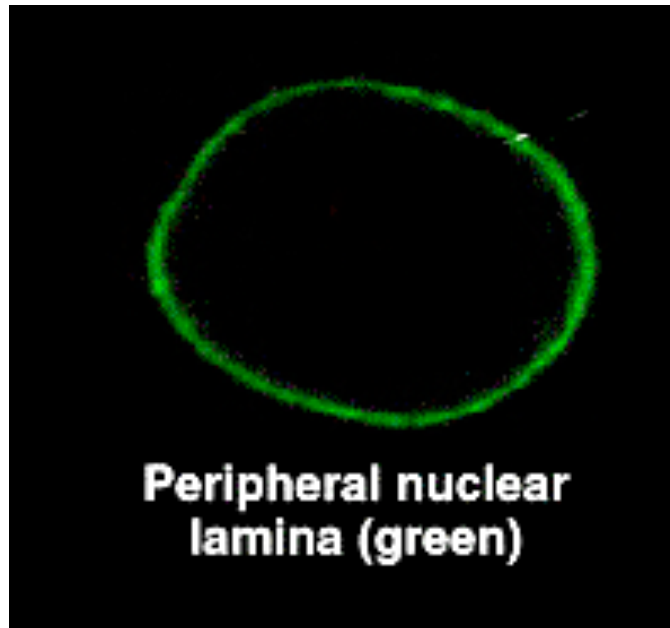


Type III



Wang et al. (2000) Nature Cell Biol 2 : 137-141

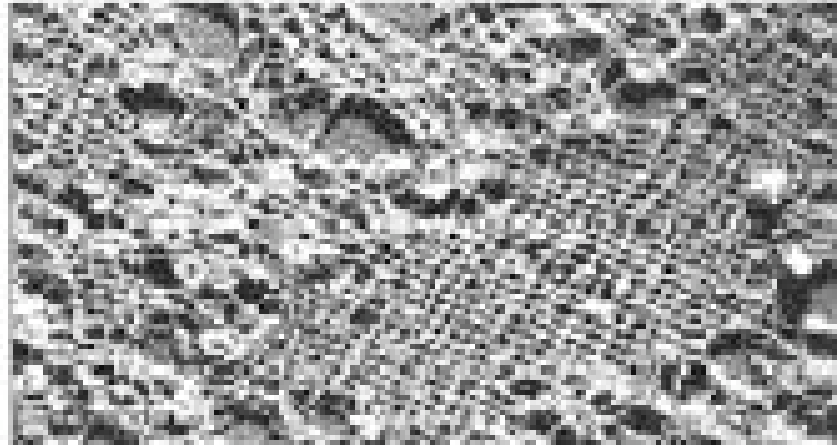
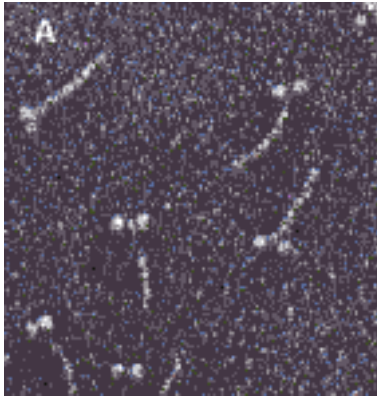
Lamines : réseau à la surface interne des noyaux



A/C : solubles en mitose

B : associées aux fragments d'enveloppe nucléaire en mitose ; essentielles au développement

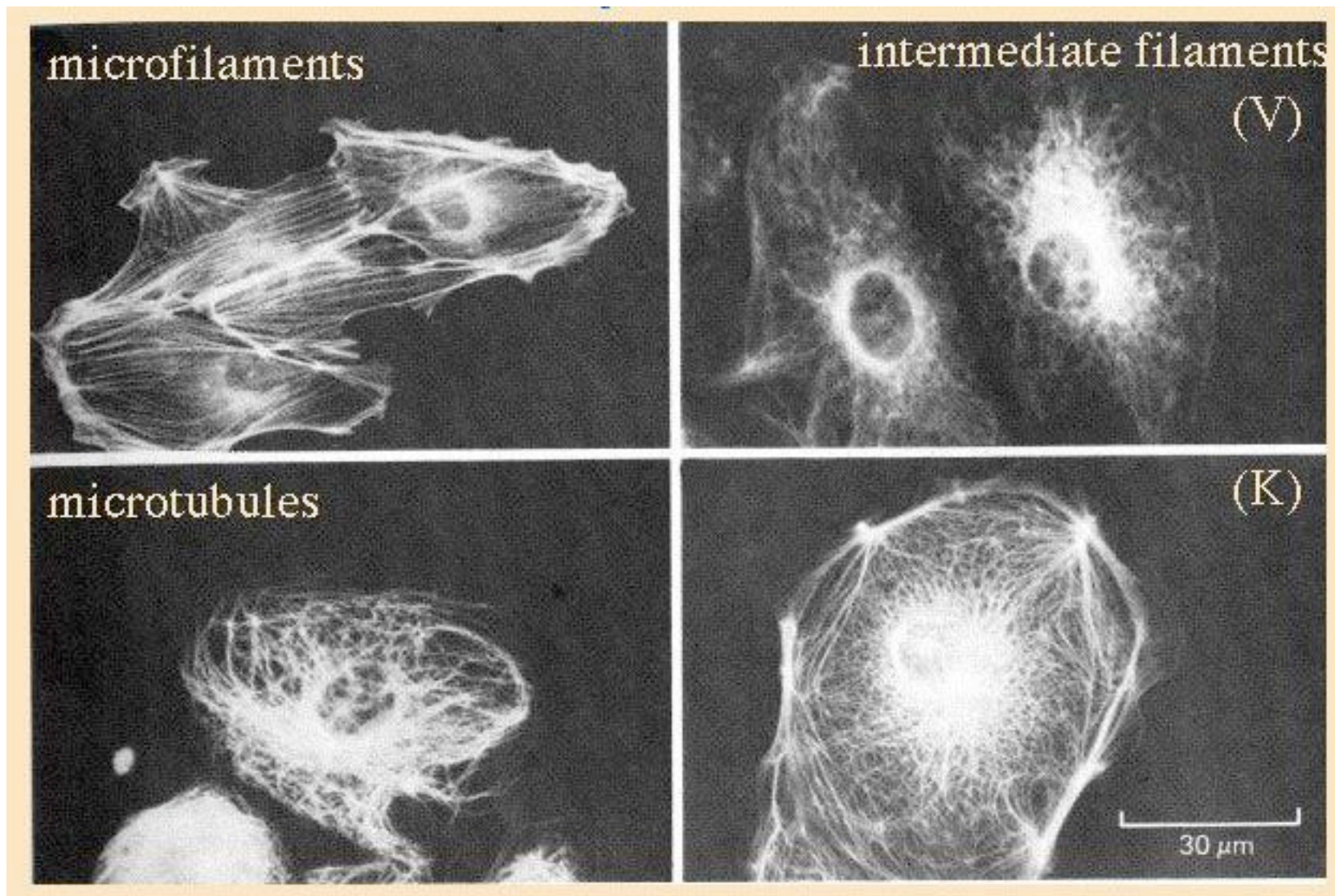
Rôle des lamines



Elles sont impliquées dans :

- la forme du noyau
- l'organisation spatiale des pores nucléaires
- la régulation de la transcription
- la replication de l'ADN
- l'ancrage de la chromatine interphasique

Résumé : Les Cytosquelettes de cellules animales



Rat kangaroo epithelial cells