

BIOLOGIE CELLULAIRE VEGETALE

LE CYTOSQUELETTE DES EUCARYOTES

Le cytosquelette est une structure constituée par des filaments non spécifiques (communs à toutes les cellules), des microfilaments d'actine, des filaments intermédiaires spécifiques de certaines cellules (GFAP, Glial Fibrillary, Acidic Protein = Protéine acide des cellules gliales; cytokératine des tissus épithéliaux, neurofilaments des tissus nerveux), et des microtubules formés de tubuline alpha et beta.

Tous ces éléments n'ont pas uniquement un rôle de squelette : en association avec d'autres protéines, ils assument d'autres fonctions, telles que les mouvements de déplacement, et ils possèdent des facultés très importantes d'adaptation.

Les microfilaments d'actine se trouvent à la périphérie des cellules eucaryotes, les microtubules ont une disposition radiaire à l'intérieur de la cellule et les filaments intermédiaires sont des structures qui permettent les jonctions avec d'autres cellules (doc.1).

Toutes ces sous-unités donnent des polymères rendus visibles dans les cellules.

Dans les cellules animales on peut trouver de la vimentine qui est une molécule filamenteuse intermédiaire, caractéristique des cellules d'origine mésenchymateuse (doc .2b).

Dans les cellules végétales (doc.2c) on peut observer les cellules à différents stades du cycle cellulaire grâce à l'organisation des microtubules qui diffère selon le stade du cycle. En faisant une coupe en Z on peut alors observer des cellules dans des stades différents.

LES TUBULINES ET LEURS PROTEINES ASSOCIEES

LA FAMILLE DES TUBULINES

Il existe plusieurs types de tubulines : α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η classés selon leurs homologues de séquence. On peut faire des comparaisons de tubulines.

Les **microtubules** sont constitués essentiellement de **tubulines α et β** . Les autres familles de tubulines sont distribuées dans les cellules spécifiques ou situées dans des régions spécifiques comme pour la **tubuline γ** que l'on retrouve dans les **centrosomes** des cellules eucaryotes.

FtsZ est l'ancêtre des tubulines, c'est le précurseur capable de former des polymères sous forme filamenteuse comme des microtubules.

Au sein des tubulines α et β il y a un nombre variable de gènes avec des variations isotypiques : chez l'homme par exemple il y a 8 gènes d' α -tubuline et 5 gènes de β -tubuline.

Il existe **six classes de β -tubuline** qui diffèrent par des mutations ponctuelles d'acides aminés :

- **Classe I et IVb** : expression constitutive ;
- **Classe II** : prédominante dans le cerveau, les cellules normales et tumorales mammaires ;
- **Classe III, Iva et VI** : variables au cours du développement et prédominantes dans les cellules cancéreuses ;
- **Classe V** : exclue les neurones.

Selon les cellules, d'autres tubulines prennent le relais.

Les tubulines sont constituées d'une succession de **feuilletts β** et d'**hélices α** .

Dans une expérience de modulation intrinsèque de la dynamique des microtubules selon leur composition isotypique, on constate que dans un dimère $\alpha\beta$ de tubuline, la modification de la sous-unité β induit une modification de la vitesse intrinsèque de croissance du polymère.

LES MAPS STRUCTURALES

Le tissu cérébral est riche en tubuline (20 mg/ml) qui se dépolymérise lors de la centrifugation. Dans le surnageant S on sépare les protéines solubles, dans le culot C on sépare les débris cellulaires et les protéines membranaires. On chauffe puis on centrifuge pour éliminer les protéines solubles avant de porter le mélange à froid pour dépolymériser les microtubules. En répétant trois fois ces étapes, les tubulines se séparent lors de l'électrophorèse. Mais les facteurs protéiques restent associés aux microtubules malgré les centrifugations. Ils ont un haut poids moléculaire.

On peut séparer les facteurs protéiques associés aux microtubules (MAPs) et donc purifier les tubulines sur une **colonne échangeuse d'anions** car les microtubules restent plus longtemps fixés à la colonne que les MAPs : élution des tubulines à 0,7M de NaCl / élution des MAPs de 0,15 à 0,45M de NaCl.

Assemblage de tubuline in vitro en présence de MAPs :

Au dessus de la concentration critique il y a croissance et formation de polymères de tubulines, en dessous de cette concentration il y a dépolymérisation des polymères. Lorsqu'on ajoute des MAPs, on constate que la concentration critique baisse, ce qui signifie que **les MAPs favorisent la polymérisation des microtubules et stabilisent les polymères par pontage.**

Ex : MAP 65 (65kD) uniquement dans les cellules végétales ; MAP U universelle des cellules eucaryotes. Il y a un panel de protéines connues spécifiques d'une cellule particulière, d'un organisme ou totalement ubiquitaire.

Il y a formation de **liens réguliers** entre les tubulines par les MAPs, les microtubules ne sont pas collés.

SYNTHESE DES DIMERES DE TUBULINE

Les dimères de sous-unités α/β sont véhiculés par des **facteurs d'assemblage**. α et β sont toujours associés à un ou plusieurs cofacteurs permettant l'association de ces deux sous-unités pour libérer de manière soluble uniquement des dimères. Il y a au moins cinq facteurs d'assemblage des dimères α/β .

SITES DE NUCLEATION DES POLYMERES

La nucléation et l'élongation des microtubules se font à partir du centrosome lors de l'interphase. Cela a été observé grâce à la fusion de la partie codante du gène de la tubuline avec du GFP.

Toutes les MAPs se lient aux microtubules, elles possèdent toutes la séquence **MBD** qui reconnaît la tubuline. On peut alors fusionner la séquence MBD avec du GFP pour observer la nucléation.

Structure du centrosome dans les cellules animales :

Il y a deux **centrioles** constitués de neuf triplets de microtubules et une **zone péricentriolaire** qui possède le site d'initiation des microtubules. Dans le centrosome on trouve de la tubuline γ et dans les fuseaux mitotiques on trouve de la tubuline α .

Chez les champignons il y a deux zones de modification de densité de l'environnement nucléaire qui correspondent à des **corps polaires**.

Dans les cellules végétales il n'y a pas de structure particulière et pourtant il y a des microtubules. Au niveau de l'ensemble de la surface du noyau, on trouve de la γ -tubuline qui pourrait provenir de la dispersion des centres organisateurs/initiateurs de la polymérisation des microtubules.

LES COMPLEXES DE NUCLEATION

Le complexe de nucléation est constitué de deux complexes distincts : les **petits complexes** (complexe nucléateur minimal = gamma-Tubulin Small Complex) sont constitués de γ -tubuline, de GCP2 et de GCP3 et ils sont liés à une extrémité des microtubules ; le **grand complexe** (complexe de nucléation = gamma-Tubulin Ring Complex) est constitué de GCP4, GCP5 et GCP6 et il est fixé aux petits complexes.

Chez les levures il y a uniquement le petit complexe alors que chez les eucaryotes on trouve toutes les protéines du grand complexe.

*Les microtubules polymérisent à partir de centres organisateurs **MTOC** : chez les plantes il y a de la γ -tubuline autour du noyau et dispersée en périphérie, dans les cellules animales le centre initiateur est localisé **dans le centrosome**.*

LE CYTOQUELETTE D'ACTINE ET SES MOTEURS ASSOCIES

ASSEMBLAGE POLARISE DE MONOMERES D'ACTINE

L'actine s'auto-assemble à l'aide d'une série de réactions bimoléculaires. Les filaments d'actine se font et se défont par adjonction et disjonction de sous-unités aux deux extrémités du polymère. Les réactions aux deux extrémités ont des constantes de vitesse différentes. L'association des sous-unités s'effectue rapidement aux deux extrémités. La dissociation des sous-unités est relativement lente aux deux extrémités.

L'extrémité la plus dynamique est associée à la myosine.

LOCALISATION CELLULAIRE

Les câbles d'actine sont bien rigides.

Chez la levure, les filaments d'actine forment des polymères filamenteux en agrégats ponctués ; dans les cellules animales, les filaments d'actine sont présents à la périphérie de la cellule et ne s'associent pas en faisceaux parallèles ; dans les cellules végétales on peut observer que les filaments d'actine sont localisés aux endroits où ils n'y a pas de microtubules.

Pour observer les filaments d'actine, on peut réaliser un **immunomarquage** anti-actine par de l'or colloïdal. La **rhodamine phalloïdine** possède une forte affinité pour les filaments d'actine mais bloque leur dynamique. Elle est utilisée pour leur coloration rouge.

Dans les cellules végétales, la séparation des cellules filles en télophase se fait grâce aux filaments d'actine ; dans les cellules animales leur orientation est différente en cytotécine, ils sont organisés en **anneaux contractiles** perpendiculairement aux microtubules et la contraction est réalisée grâce aux microfilaments de myosine (comme pour la contraction musculaire).

LES PROTEINES MOTRICES LIANT L'ACTINE

Les protéines motrices liant l'actine peuvent être la **myosine** ou la **minimyosine**. Elles réalisent des **micro-contractions** par déplacement de la tête catalytique de la myosine sur une localisation particulière du filament d'actine grâce à l'hydrolyse de l'ATP en ADP. Il y a une forte interaction entre la myosine et l'actine en présence d'ADP alors qu'il y a dissociation lorsque la tête catalytique fixe de l'ATP.

Il existe deux classes de myosine bien caractérisées chez les plantes :

- Les **myosines II** (les plus conventionnelles) induisent un déplacement des filaments d'actine du + vers le - ;
- Les **myosines I** déplacent des vésicules le long d'un filament d'actine vers l'extrémité +, mais elles peuvent aussi être responsable du déplacement des filaments d'actine dans la cellule lorsqu'elles sont fixées à la membrane.

AUTRES PROTEINES ASSOCIEES A L'ACTINE

- **Fimbrine** : monomère qui permet l'association ou la formation de faisceaux (en faisant des « ponts ») ;
- **α -actinine** : multimère permettant également l'association ou la formation de faisceaux ;
- **tropomyosine** : joue un rôle dans la contraction musculaire ;
- **filamine** : dimère permettant la formation de réseau entrecroisé ;
- **gelsoline** : fragmente l'actine ;
- **profiline** : inhibe l'association en polymère des sous-unités de l'actine (pendant le transport de l'actine dans le cytosol par exemple).

EFFETS DE DROGUES SUR LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE DES CELLULES ANIMALES

La **rhodamine phalloïdine** révèle l'actine périphérique alors que la **cytochalasine B** ou la **latrunaline** révèlent les structures ponctuées ou les filaments d'actine au moment de la télophase dans les cellules.

L'actine se dépolymérise dans les cellules animales au cours de la mitose, elle n'est présente qu'en interphase et en télophase. Dans les cellules végétales, les filaments d'actine sont constamment présents.

ACTINE ET MOTILITE CELLULAIRE DE LA CELLULE ANIMALE

Le complexe ARP2/3 permet l'organisation ramifiée des polymères dans le cortex. Au milieu de la cellule, les filaments d'actine sont dépolymérisés, les monomères sont transportés vers la membrane plasmique grâce à la profiline qui inhibe leur réassociation. Ces réactions sont dues à un stimulus extracellulaire et la polymérisation du filament d'actine près de la membrane plasmique permet à celle-ci d'être poussée vers l'extérieur.

LES FILAMENTS INTERMEDIAIRES

Les filaments intermédiaires sont des **polymères flexibles** mais résistants qui fournissent un support mécanique aux cellules, en prévenant en particulier l'étirement excessif des cellules dans les tissus des organismes supérieurs.

ORGANISATION DES POLYMERES

Les filaments intermédiaires ont un diamètre de 10 nm en moyenne et présentent jusqu'à 16 superenroulements sur une coupe transversale. Ils sont **constitués de dimères moléculaires antiparallèles** à quatre chaînes, non polaires; c'est pourquoi les filaments intermédiaires sont généralement considérés comme étant **apolaires**.

ASSEMBLAGE DE POLYMERES

Les sous-unités solubles de filaments intermédiaires dissociés s'auto-assemblent spontanément en structure ressemblant à des filaments intermédiaires, en quelques minutes dans les conditions physiologiques in vitro. L'assemblage est hautement favorisé, à en juger par la faible concentration critique. **Les sous-unités s'ajoutent** à la fois **aux extrémités** et **sur les côtés** du polymère, contrairement aux filaments d'actine et aux microtubules qui ne s'allongent qu'à leurs extrémités.

CLASSIFICATION DES FILAMENTS INTERMEDIAIRES

Ils sont classés en **cinq catégories**. Ils possèdent des homologies de séquences mais sont constitués de différents composants peptidiques et sont localisés à différents endroits.

STRUCTURE MOLECULAIRE COMPARABLE DES FILAMENTS INTERMEDIAIRES

Ils possèdent tous un domaine central identique, les blocs monomériques possèdent une organisation tridimensionnelle proche mais leur domaine N et C-term sont différents.

- Les **kératines** (type I) : les cytokératines sont présentes dans 95% des protéines de l'épiderme. Elles jouent un rôle dans la cohésion et le maintien de l'intégrité des tissus épithéliaux. Ce sont des polymères formés d'une vingtaine de sous-unités acide et basique qui forment des dimères puis des tétramères.
- Les **vimentines** (type II) : en mitose il y a dépolymérisation des filaments intermédiaires et les sous-unités ont tendance à s'agréger.
- Les **neurofilaments** (type III) : présents dans les neurones, ils sont transportés par un mouvement antérograde vers l'extrémité de l'axone.
- Les **lamines** (type IV) : ils se trouvent à la surface des noyaux. Elles sont impliquées dans la forme du noyau, dans l'organisation spatiale des pores nucléaires, dans la régulation de la transcription, dans la réplication de l'ADN, dans l'ancrage de la chromatine interphasique.

BIOLOGIE CELLULAIRE VEGETALE

LE CYCLE CELLULAIRE

INTRODUCTION

Au cours du développement, des signaux externes et internes transmettent à la cellule des informations qui vont lui permettre de réguler son activité :

- **Proliférer** : se multiplier, passer successivement les différentes étapes du cycle cellulaire ;
- **Se différencier** : arrêter la multiplication cellulaire ;
- **Se suicider** : emprunter la voie de l'apoptose.

Les étapes du cycle cellulaire :

- **Phase G1** : phase d'augmentation cellulaire, croissance des cellules = augmentation de leur masse ;
- **Phase S** : phase de réplication de l'ADN ;
- **Phase G2** ;
- **Phase M** : la mitose avec la division nucléaire et la division cytoplasmique.

Le cycle chromosomique :

- Phase G1 : Noyau interphasique ;
- Phase S : **duplication** ;
- Phase G2 : **condensation** des chromosomes ;
- Phase M : **métaphase** (alignement des chromosomes), **anaphase** (séparation des chromatides), **télophase** (décondensation des chromosomes).

La durée du cycle dépend des organismes : entre 10 et 30 h pour les cellules de mammifères et de plante, 2 et 3h pour les levures et 20 min pour les cellules embryonnaires.

On peut suivre le cycle chromosomique grâce à la coloration de l'ADN.

Les contrôleurs :

Ils existent des contrôleurs qui autorisent les cellules à passer d'une étape à une autre.

- **Contrôleur G1** : la cellule examine si son ADN est endommagé, la cellule assez grande et si l'environnement est favorable. Il y a duplication de l'ADN ;
- **Contrôleur G2** : avant l'entrée en mitose il faut vérifier si tout l'ADN est répliqué et si la cellule est assez grande. Il y a alors formation du fuseau mitotique ;
- **Contrôleur M** : si tous les chromosomes sont connectés au fuseau microtubulaire il y a séparation des chromosomes et du cytoplasme.

En phase S on peut faire un test en synthétisant des copies d'ADN avec de la thymidine tritiée.

Lorsqu'on fusionne une cellule de phase S avec une cellule de phase G1, le noyau de la cellule en phase G1 entre en phase S car il y a un facteur dans le cytoplasme de la cellule en phase S qui induit la transformation ; lorsqu'on fusionne une cellule de phase S avec une cellule de phase G2, le noyau en phase S poursuit son programme ; lorsque on fusionne une cellule de phase G1 avec une cellule de phase G2, le noyau de la cellule G1 poursuit lui aussi son programme. Cela signifie qu'il y a un signal uniquement en phase S qui induit la duplication de l'ADN.

Le facteur **MPF** (Mitosis Promoting Factor), qui favorise l'entrée en mitose, a été identifié grâce à l'ajout de cytoplasme d'une cellule en phase M dans une cellule en interphase. Il y a eu formation du fuseau mitotique dans ces cellules ce qui veut dire que **le cytoplasme de cellule en métaphase induit la formation du fuseau dans les cellules interphasiques.**

LES MECANISMES DE CONTROLE

Il y a deux grands mécanismes de modifications post-traductionnelles qui contrôlent les étapes du cycle cellulaire :

- La **phosphorylation/déphosphorylation** : le **complexe cycline-CDK est phosphorylé et induit des voies d'activation ou d'inhibition** des protéines effectrices en fonction du substrat sur lequel se fait l'action ;
- La **poly-ubiquitination** : de la cycline par des complexes enzymatiques (E1-E3) qui la conduisent vers les voies de dégradation de protéines cibles via le protéasome. Ce processus est irréversible.

Mutants de gènes qui contrôlent le cycle cellulaire :

On aborde l'étude du cycle cellulaire par la recherche de mutants bloqués dans le cycle cellulaire pour n'analyser que les cellules qui se trouvent dans le cycle. Tous les mutants issus de la hausse de température sont bloqués au même stade peu importe la phase dans laquelle ils se trouvaient : le cycle s'arrête donc à un point de contrôle.

DECOUVERTE DES GENES CDC PAR COMPLEMENTATION DES MUTANTS

CDC : Cell Division Cycle

On ajoute des plasmides portant différents gènes mutés dans différentes colonies bactériennes : si le plasmide ajouté comporte un gène muté qui ne correspond pas au gène responsable de l'arrêt du cycle en phase G1, le cycle s'arrête ; si le cycle cellulaire continue au-delà de la phase G1 cela signifie que le plasmide ajouté a été muté au niveau du gène responsable de l'arrêt du cycle. Le gène **CDC2** (protéine kinase) est donc responsable de **l'arrêt du cycle en G1.**

De cette manière il a été mis en évidence deux points de contrôle : Start et mitose.

LES KINASES CYCLINE-DEPENDANTES

L'analyse génétique du cycle cellulaire de la levure de fission *Schizosaccharomyces pombe* a permis d'identifier un gène appelé *cdc2*, *cdc28* chez *S. cerevisiae* et Cdk1 ou p34^{cdc2} chez les mammifères. L'homme possède plus de dix protéines kinases distinctes apparentées à p34cdc2. Pour être actives, ces enzymes doivent chacune s'associer à une sous-unité régulatrice appelée **cycline**. C'est pourquoi elles ont été baptisées kinases dépendantes des cyclines (**CDK**).

L'unité catalytique du complexe enzymatique transfère un groupement phosphate sur une sérine ou une thréonine d'une protéine cible (phosphorylation). Les **CDK** régulent la progression dans le cycle cellulaire. Leur activité est régulée par l'association avec une sous-unité régulatrice (cycline) dont la protéolyse les inactive et des phosphorylations activatrices et inhibitrices induites par d'autres CDKs.

Structure et domaines de CDK2 :

La signature des CDKs est le motif PSTAIRE. En dessous, la boucle T est le motif phosphorylable.

LES CYCLINES

Les cyclines forment un groupe de protéines diverses dont la taille est comprise entre 35 et 90 kD, et dont la structure de base est constituée de deux domaines symétriques centraux comportant cinq hélices α . Certaines cyclines sont actives pendant la phase G1, d'autres au cours de la phase G2 et d'autres encore au cours de la phase M ; certaines peuvent exercer leur fonction en dehors du cycle cellulaire.

Lorsqu'une cycline se fixe, la boucle T est phosphorylée et change de conformation ce qui laisse accessible le site catalytique. L'activité des CDKs n'est possible qu'en association avec une cycline.

Chez la levure, la fonction cellulaire de la CDK est déterminée par le type de sous-unité régulatrice (cycline) qui se fixe.

ACTIVITE DES COMPLEXES CDK-CYCLINE

Il y a tout d'abord synthèse d'une cycline et d'une CDK inactive, l'activation de la CDK se fait grâce à la phosphorylation d'un résidu conservé (Thr) dans la boucle T. Le complexe actif phosphoryle alors un substrat.

Modèle universel de régulation du cycle cellulaire :

Ce modèle est généralisé à tous les eucaryotes : l'**activité kinase CDK-cycline mitotique** est nécessaire à l'entrée en mitose alors que l'**activité kinase CDK-cycline G1 et S** est nécessaire au passage de la phase G1 à la phase S.

Les quatre voies de régulations de l'activité des complexes :

- Synthèse et destruction des cyclines, des CKI (inhibiteurs des CDK) et d'autres régulateurs ;
- Phosphorylation/déphosphorylation de la kinase CDK ;
- CKI associés au complexe CDK-cycline ;
- Localisation subcellulaire des CDKs et de leurs régulateurs (wee1, cdc25).

REGULATION DES CDKS PAR DES INHIBITEURS (CKI)

Les CKI peuvent être spécifiques de CDK particulières du fait de la liaison de celles-ci à des cyclines spécifiques. Ils se fixent sur la CDK et sur la cycline.

Il existe **deux classes** de CKI :

- **Cip/Kip** : p21, p27, p57, Sic1 qui inhibe les complexes CDK1-, CDK2, CDK4/6-cyclines spécifiquement ;
- **Ink4** : p16, p15, p18, p19 inhibe les complexes CDK4/6-cyclines D.

La famille des protéines Cip/Kip (Cycline/Kinase Inhibitor Protein) :

Il y a d'abord formation des complexes CDK4-ClnD1, CDK2-ClnE..., puis blocage par les inhibiteurs p21, p27...

Ex : Sic1 bloque l'initiation de la phase S en inhibant le complexe CDC28-Cln5,6 jusqu'à ce que le complexe CDC28-Cln1,2 soit suffisamment exprimé pour inhiber Sic 1 et ainsi induire le bourgeonnement et la duplication du SPB (*Spindle Pole Body*, équivalent du centrosome) puis la réplication de l'ADN.

CDC28-Cln1,2 phosphoryle Sic1 qui sera multi-ubiquitinylé et donc dégradé par le protéasome.

La famille des protéines Ink4 (Inhibitors of Kinase 4) :

Les inhibiteurs se fixent directement sur les CDK4 avant la formation du complexe avec la ClnD1.

Régulation du cycle cellulaire lors de dommages à l'ADN : rôles de p53 et p21

p53 est un gène suppresseur de tumeur qui est activé lors de cassure dans l'ADN, c'est un facteur de transcription qui induit la transcription et la traduction de p21 (CKI). p21 inhibe alors l'activité des complexes CDK-Cln et la réplication est bloquée jusqu'à la réparation de l'ADN.

REGULATION DES PASSAGES G1-S ET G2-M

PASSAGE G1-S

En G1, la transcription des gènes de la phase S n'est pas activée. Le Rb (rétinoblastome) est un répresseur de la transcription et pendant la phase G1, le Rb se lie à E2F (facteur de transcription) et bloque l'ARN polymérase. La CDK4-ClnD1 et CDK2-ClnE vont sur-phosphoryler Rb qui perd son affinité pour E2F. La transcription peut alors débuter et la cellule entre en phase S.

Rb contrôle la prolifération cellulaire :

Rb se inhibe le facteur de transcription, une voie de signalisation activée par un facteur de croissance active le complexe CDK-Cln qui phosphoryle Rb perdant son affinité pour le facteur de transcription.

Présence des cyclines et des CDKs en G1-S :

La cycline E est présente entre la fin de la phase G1 et la phase S, la cycline A est présente dans la phase S. Les concentrations en CDK sont similaires tout au long des phases ce qui montre que c'est la cycline qui régule les phases et qui permet à la CDK de faire son travail à un moment du cycle cellulaire.

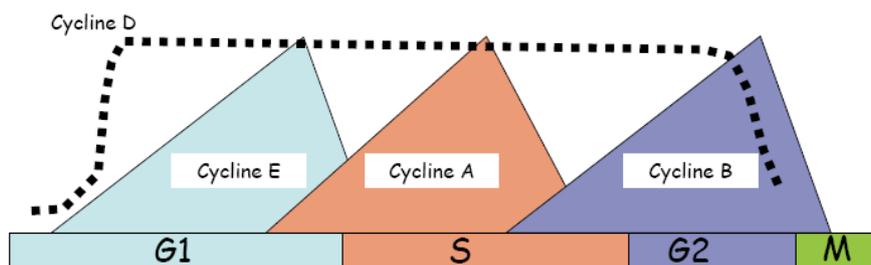
PASSAGE G2-M

Dans un extrait de **cellules asynchrones** il y a peu de Cdc25A phosphorylé à cause d'une faible activité de phosphorylation ; lors de l'ajout de **roscovitine** la phosphatase Cdc25A n'est plus du tout phosphorylée puisque la roscovitine inhibe l'activité du complexe CDK1-ClnB.

Pendant la **mitose**, le complexe CDK1-ClnB est fortement déphosphorylé par la phosphatase Cdc25A et on peut observer une forte présence de ^{32}P .

Si on réalise une immunoprécipitation de CDK1 par un anticorps ClnB on peut observer que la CDK1/ClnB n'est pas sous la même forme dans les cellules asynchrones que dans les cellules en mitose. En effet, dans les cellules asynchrones, la CDK1 est surphosphorylée donc inactive et elle ne peut pas phosphoryler la Cdc25A.

REGULATION DES CYCLINES AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE



La synthèse et la destruction de la cycline B régule les premiers cycles cellulaires embryonnaires :

En présence de RNase, la synthèse de **ClnB** est abolie et il n'y a pas d'activité **MPF** ; si on ajoute un ARNm ClnB on retrouve une activité MPF en parallèle avec les concentrations de ClnB et si on ajoute un ARNm ClnB non dégradable on constate que l'activité MPF reste constante.

La cycline B possède une *destruction box* et un signal de rétention cytoplasmique qui contient un signal d'export nucléaire qui permet à la protéine de changer de localisation. Elle est continuellement synthétisée au cours du cycle cellulaire. Elle entre dans le noyau en fin de phase G2 et s'associe à la CDK1. Le complexe permet la phosphorylation de la **Cdc25** qui active **MPF**. Il y a destruction des protéines d'attachement des chromatines et donc passage de la métaphase à l'anaphase. Le facteur MPF (*M-phase Promoting Factor*) active l'ubiquitination de la cycline B qui est alors dégradée par le protéasome. Le facteur MPF devient inactif et la cellule sort de mitose et repasse en phase G1.

Que régule MPF ?

- Les **histones H1 et H3** impliqués dans la condensation des chromosomes ;
- Les **lamines nucléaires** qui, une fois phosphorylés par MPF, provoquent leur désassemblage et donc la rupture de l'enveloppe nucléaire en fin de prophase ;
- L'**Anaphase Promoting Complex (APC)** qui induit la destruction des sécurines et le passage en anaphase puis la destruction de la cycline B et le passage en télophase ;
- L'**HsEg5**, une protéine « kinesine-related motor » associées aux centrosomes, aux microtubules chinétochoriens et interpolaire ;
- La **sous-unité régulatrice de la myosine II (LC20)** qui inhibe la myosine ATPase actine dépendante ;
- La **nucléoline** impliquée dans la décondensation de la chromatine.

LES COMPLEXES SCF ET APC/C

Deux classes d'**ubiquitine-ligases E3** sont importantes pour le contrôle du cycle cellulaire. Le **complexe SCF** est important pour l'entrée en phase S et le **complexe APC/cyclosome** est important pour la sortie de mitose.

L'association d'un de ces complexes à la cible permet l'ajout d'ubiquitine sur cette cible et induit sa dégradation par le protéasome. Chaque cible dégradée possède une **séquence consensus** : les séquences consensus des cyclines D-box et Ken-box permettent leur dégradation ciblée.

Exemple de cycline B non dégradable :

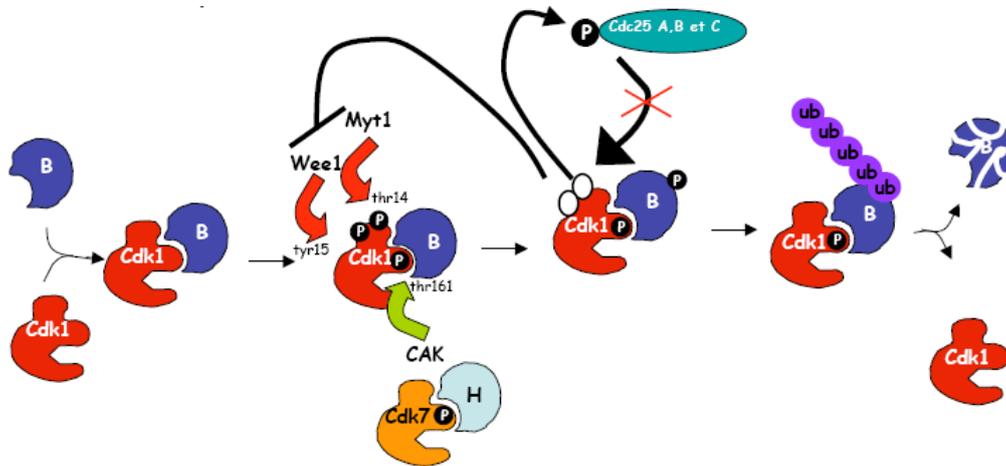
S'il n'y a plus de D-box dans séquence de la cycline B à cause de la mutation d'un acide aminé, l'ubiquitine ne se fixe plus et il y a arrêt mitotique et pas de passage en télophase.

Chez les végétaux il existe aussi plusieurs cyclines responsables du bon déroulement du cycle cellulaire.

Résumé : Cycline

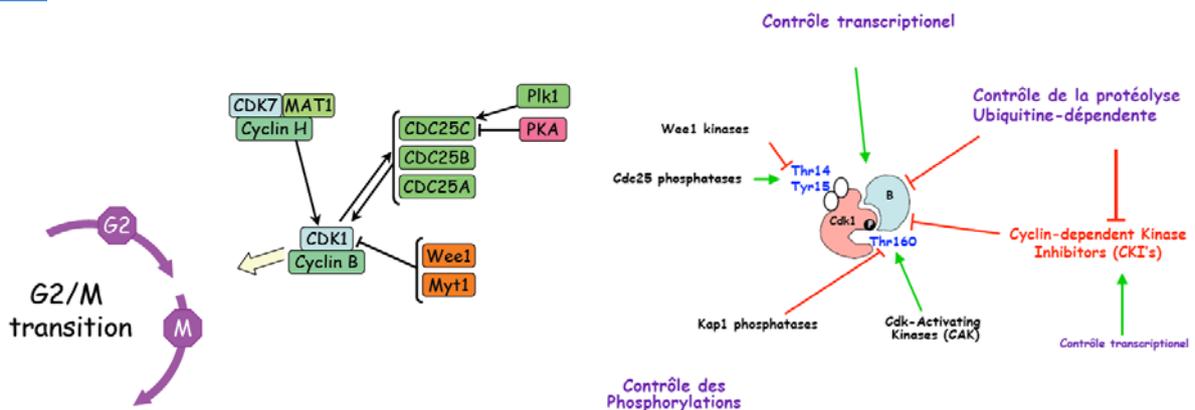
- c'est l'unité régulatrice du complexe ;
- elle est spécifique à chaque étape du cycle ;
- elle possède un domaine conservé de liaison à la CDK (Cyclin box) ;
- elle possède deux domaines de liaison de l'ubiquitine (D-box, Ken-box) ;
- chaque cycline est synthétisée et dégradée au cours d'une étape définie du cycle cellulaire.

Des complexes CDK-Cln sont eux-mêmes substrats de kinases et phosphatases, jouant un rôle activateur ou répresseur :



- CAK phosphoryle le substrat CDK1-ClnB en Thr161 qui est indispensable à l'activité du complexe actif, mais Wee1 et Myt1 phosphorylent respectivement Tyr15 et Thr14, la complexe **CDK1-ClnB** est hyperphosphorylé et **inactif**.
- La phosphatase Cdc25 élimine les phosphates en position inhibitrice ce qui **active** le complexe **CDK1-ClnB**.
- Le complexe CDK1-Cln B **phosphoryle** à son tour **Cdc25** pour qu'elle devienne **inhibitrice** et il **inactive les kinases** Myt1 et Wee1 pour permettre aux autres complexes alentours de ne pas être inactivés.
- La **cycline B** est ensuite **dégradée** par ubiquitination et le **complexe** est **inactivé**.

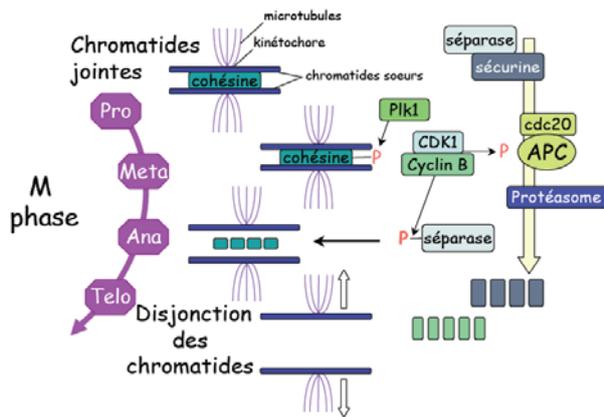
Bilan :



LE CONTROLE DE LA MITOSE

A partir du pôle fuseauriel, il y a polymérisation des microtubules qui s’associent au centromère. Les microtubules non associés se dépolymérisent de façon à ce que tous les microtubules soient associés au centromère.

La force du mouvement des chromosomes vers les pôles est générée aux kinétochores en proméphase : la polymérisation/dépolymérisation permet les mouvements de la chromatine lors de la méiose (lorsqu’il y a polymérisation d’un côté, il y a dépolymérisation de l’autre).

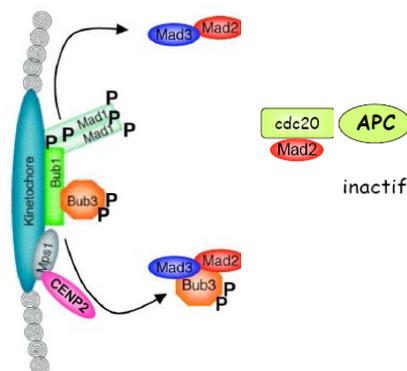
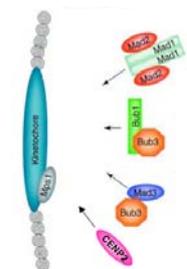


Les chromatines des chromosomes sont retenues entre elles par de la **cohésine** en **prophase**. Lorsque cette cohésine est **phosphorylée** par Plk1 en **métaphase**, elle devient sensible à une enzyme de dégradation : la séparase. Cette séparase se trouve sous forme inactivée par la sécurine dans la cellule, elle est activée par phosphorylation grâce à la cycline B. En **anaphase**, la **séparase** dégrade la cohésine et la sécurine est dégradée par le complexe APC^{Cdc20}. Il y a **disjonction des chromatines** et ubiquitination du complexe CDK1-ClnB pour le **passage en phase G1**.

L’anaphase est dominée par le mouvement ordonné des chromatides sœurs en direction des pôles opposés du fuseau, qui résulte de l’action combinée des protéines motrices et des changements de longueur des microtubules. Les mouvements des chromosomes lors de l’anaphase comportent deux composantes majeures. L’**anaphase A**, qui constitue le mouvement des chromatides sœurs en direction des pôles du fuseau, nécessite un raccourcissement des fibres kinétochoriennes. L’**anaphase B** correspond à l’élongation du fuseau et la séparation des pôles de fuseau.

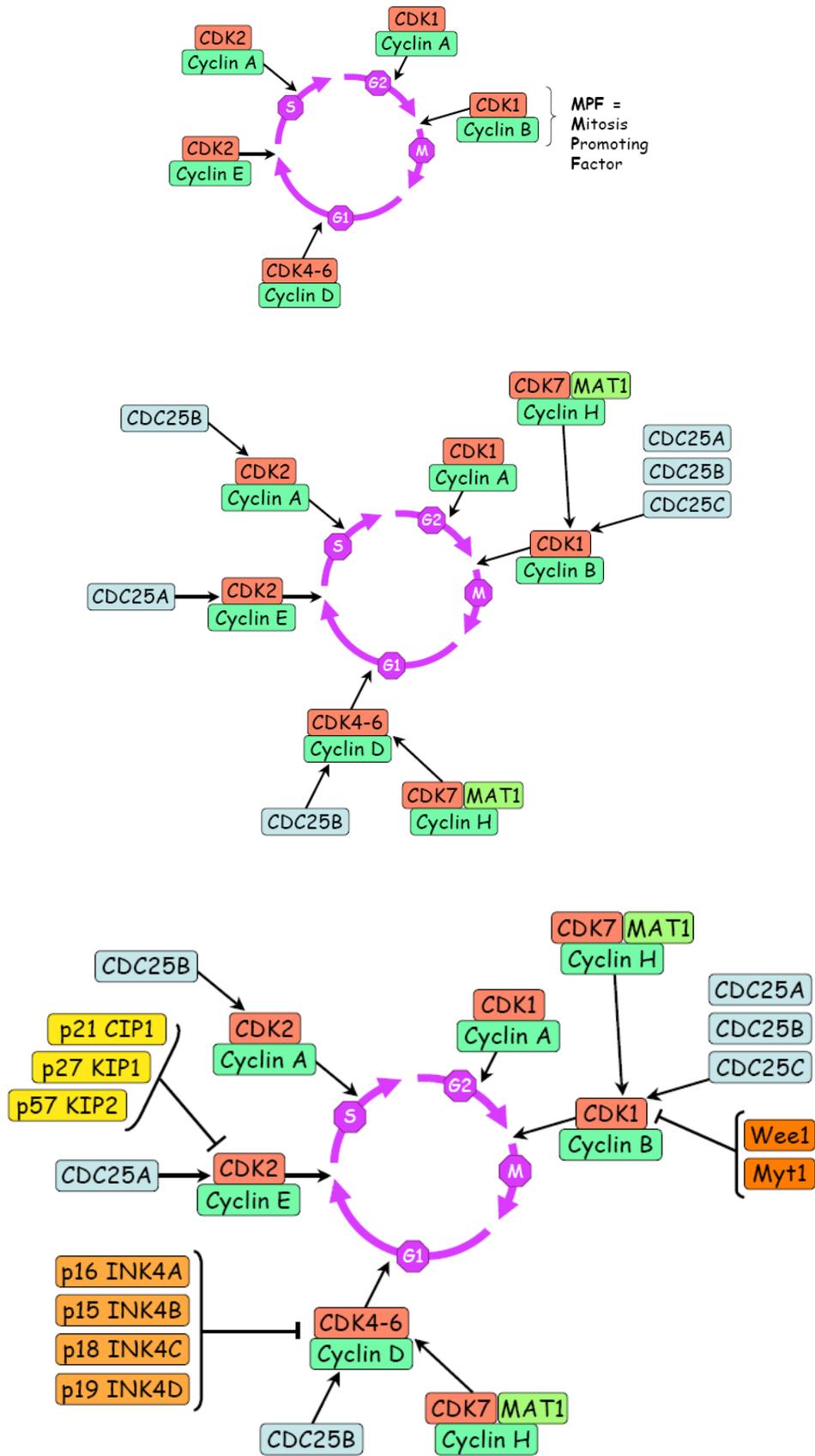
Les protéines du kinétochores sont impliquées dans le contrôle de l’assemblage du fuseau mitotique :

Les kinases **BUB** régulent une protéine appelée Mad1p (protéine de l’arrêt défectueux de la mitose, *Mitotic Arrest-Defective protein*) qui, à son tour, active une protéine appelée Mad2p. Le Mad2p activée inhibe le début de l’anaphase en interagissant avec Cdc20, facteur clé de reconnaissance du substrat pour l’APC/C. L’APC/C est une ligase liant l’ubiquitine aux protéines, qui marque les protéines cibles en vue de leur destruction par les protéasomes en les décorant d’ubiquitine. Ses substrats clés comprennent notamment une protéine appelée sécurine, ainsi que la cycline B.



D’après le modèle de fonctionnement du point de contrôle de la métaphase actuellement proposé, tandis que les cellules entrent en mitose, les protéines **BUB** et **MAD** se lient à tous les **kinétochores** et activent la protéine **Mad2p** qui s’associe au complexe APC/C^{Cdc20} et le maintien inactif. Un par un, tandis que les chromosomes s’attachent au fuseau selon une orientation bipolaire, les signaux inhibiteurs disparaissent. Ce n’est que lorsque le dernier chromosome a atteint un attachement correct que la dernière source de complexes Mad2p inhibiteurs s’éteint. Du fait que les complexes Mad2p ont de courtes durées de vie, l’inhibition de l’APC/C^{Cdc20} cesse peu de temps après, déclenchant ainsi le début de l’anaphase.

BILAN



BIOLOGIE CELLULAIRE

CULTURES CELLULAIRES VEGETALES ET REGENERATION DES PLANTES

TOTIPOPOTENCE DES CELLULES VEGETALES

Toutes les cellules ne sont pas totipotentes, certaines sont bien différenciées mais il y a un grand nombre de cellules encore capables de se différencier en une plante entière.

In vitro, chaque petite pousse séparée donne une nouvelle plante. Les cellules présentes au niveau des racines ont la capacité de se différencier en pousses ou racines.

Les cellules végétales, prélevées sur un organe quelconque d'une plante, possèdent la capacité de régénérer un individu complet identique à la plante mère. C'est la totipotence des cellules végétales. Elle repose sur l'aptitude à la dédifférenciation : les cellules peuvent redevenir des cellules simples, non spécialisées et se différencier ensuite pour donner à nouveau les différents types de cellules spécialisées.

HISTORIQUE DE LA CULTURE *IN VITRO*

- **1934, White** : culture de racines de tomates dans un milieu contenant : eau, sels minéraux, extraits de levure, sucre et **auxine** (seule hormone végétale connue à l'époque) ;
- **1939, Gautheret** : développement indéfini d'un cal de cellules dédifférenciées à partir d'un fragment de racine de carotte (1^{ère} culture *in vitro*) ;
- **1962, Murashige et Skoog** : 1^{er} **milieu de base** pour la culture *in vitro* : sels minéraux (macro- et microéléments), sucres (saccharose), vitamines (Vit. B), hormones (**auxines** et **cytokinines**), tamponné à pH 5,5. Il faut contrôler la température, la lumière et l'hygrométrie.

Ce milieu rend possible la culture et la prolifération de méristèmes de tiges jusqu'alors réfractaires à la multiplication végétative *in vitro*.

ACTIVATION DE PROCESSUS CELLULAIRES PROGRAMMES

De la cicatrisation lors de blessure à la régénération d'une plante il y a trois étapes :

- La dédifférenciation cellulaire avec un changement des signaux perçus par les cellules ;
- La multiplication cellulaire
- La redifférenciation cellulaire.

Ces résultats sont meilleurs avec des tissus jeunes (embryons zygotiques immatures, hypocotyles et cotylédons de germinations, méristèmes de plantes adultes), des cellules diploïdes plutôt que polyploïdes et pour certaines familles de plantes et génotypes au sein d'une famille.

DEVELOPPEMENT D'EXPLANTS PLURICELLULAIRES

L'organogenèse est la formation de plantule à partir d'un cal avec développement de tissus différenciés.

L'embryogénèse somatique permet le développement initial d'un tissu indifférencié de type embryonnaire puis le développement similaire à celui de l'embryon de la graine. On la dit somatique car elle se produit en absence de toute fécondation. Cependant, lors de leur développement, les embryons somatiques suivent les mêmes étapes que ceux dans les graines obtenues après croisement sexué : globulaire (ronds), cordiforme (en

forme de cœur), torpille (allongés avec croissance bipolaire) et cotylédonaire. La plantule sera capable de régénérer une plante entière.

Dans le cas de l'**embryogenèse zygotique**, une fois que la plantule s'est développée dans la graine, il faut attendre une longue période jusqu'à l'étape de régénération d'une plante entière (après levée de la dormance).

CONDITIONS DE REGENERATION DE PLANTULES

CONDITIONS DE CULTURE

Il faut que le milieu et l'explant soient **aseptisés**.

Dans un milieu de **culture solide** (agarose), les manipulations sont faciles et l'action physique du maillage favorise les divisions et l'ancrage mais il y a diffusion des nutriments d'où la nécessité d'un repiquage fréquent. Dans un **milieu liquide**, les nutriments sont très facilement absorbés mais l'explant manque d'oxygène donc il faut agiter souvent le milieu et les produits toxiques sécrétés par l'explant sont éliminés dans le milieu de culture.

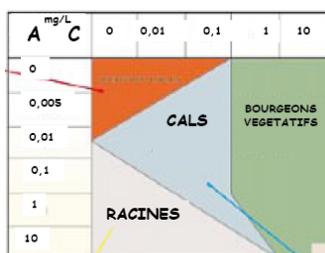
Les repiquages sont indispensables mais dans ce cas il y a une augmentation du risque de perte de la stérilité et contamination du milieu.

ROLE DES HORMONES DANS LA CROISSANCE

Les **auxines** (AIA) sont synthétisés dans le méristème apical des pousses et ont des effets sur l'élongation de la tige, la différenciation et la croissance des racines, la maturation des fruits et ils induisent un phototropisme des feuilles et un géotropisme des racines mais ils inhibent la croissance des bourgeons latéraux.

Les **cytokinines** sont synthétisés dans les cellules à croissance rapide (racines, embryons, fruits) et ont des effets dépendants du taux d'auxine associé, ils induisent un retard de sénescence et favorisent les ramifications (antagonistes de l'auxine).

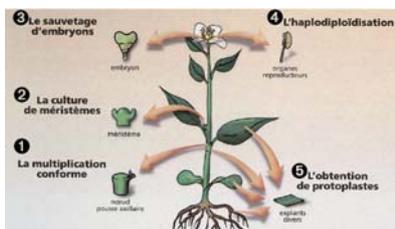
Choix de la balance hormonale :



Selon le **rapport des concentrations** d'auxines et de cytokinines, il y a des **effets différents sur la croissance végétale**. Une faible concentration des deux composés favorise la formation de fleurs, une forte concentration de cytokinines ($A/C = 4$) induit le développement de bourgeons, une forte concentration d'auxine ($A/C = 100$) favorise le développement des racines et une concentration équivalente des deux hormones ($A/C = 10$) favorise la formation de cals.

Il existe différents milieux de culture d'embryons somatiques : MSD40, MSD20, FN Lite, MSM6AC.

APPLICATIONS DE LA CULTURE *IN VITRO*



La **multiplication conforme** d'une plante idéale ; la **culture de méristèmes**, qui sont les seules zones d'une plante qui ne sont jamais infectées par des virus car elles se développent plus vite que la vitesse de déplacement d'un virus, permet de sauver une plante d'intérêt ; le **sauvetage d'embryon** permet l'affranchissement de l'étape de dormance, un développement homogène des embryons et une

réduction de la durée entre deux générations ; l'**haploïdisation** pour inventer une plante personnelle et obtenir une lignée pure à partir de cellules haploïdes. Par exemple, on peut partir d'une culture d'étamines qui se différencie en une plante entière haploïde, mais ce n'est pas idéal vis-à-vis des problèmes environnants puisque la plante est plus fragile ; il faut donc doubler la quantité d'ADN par cellule grâce à des drogues qui empêchent la séparation des chromosomes pour obtenir des cellules diploïdes qui donneront une plante entière diploïde. L'**obtention de protoplastes** (cellules végétales isolées sans paroi) permet d'obtenir de nouvelles plantes ou permet d'incorporer des gènes étrangers (OGM).

Hybridation somatique :

La **fusion de protoplastes** de plantes différentes pourrait donner trois produits de fusion :

- Les **hétérocaryons** seraient constitués d'un mélange des deux cytoplasmes avec les deux noyaux ;
- Les **cybrides** seraient constitués du mélange des cytoplasmes mais avec un seul des deux noyaux ;
- Les **hybrides somatiques** seraient l'hypothèse la plus probable car ils seraient constitués d'un seul noyau contenant les deux informations génétiques et d'un mélange des cytoplasmes. Cela permet la création de nouvelles variétés de plantes.

L'expérience de fusion des protoplastes réalisée par Power en 1970 montre que certains protoplastes ont fusionné pour donner un nouveau noyau contenant un mélange des deux informations génétiques.

Applications de l'hybridation somatique :

Elles ont permis de résoudre et de comprendre certains problèmes comme la résistance aux bactéries et aux parasites. Par exemple dans le cas du croisement entre du pollen de colza avec des ovules de radis mâle stérile, il y a eu transfert de la stérilité mâle accompagné d'une déficience chlorophyllienne et d'une sous production de nectar. L'hybridation somatique a permis de ne garder que la stérilité mâle du radis avec une synthèse chlorophyllienne normale.

Mise en culture de protoplastes :

Les protoplastes ne se divisent que lorsque la paroi a été reformée puis ils forment des cals qui donneront une plante entière.

VARIATION SOMACLONALE

Toutes les plantes régénérées à partir de cultures cellulaires ne sont pas entièrement identiques à la plante mère de départ. Cette variabilité génétique est la **variation somaclonale**.

Cette variation peut être due à l'acquisition de la polyploïdie au fur et à mesure, à l'altération du nombre de chromosomes, au réarrangement des chromosomes avec production de phénotypes anormaux, à la modification du génome, à l'activation de transposons qui modifient l'expression de certains gènes ou à des mutations ponctuelles.

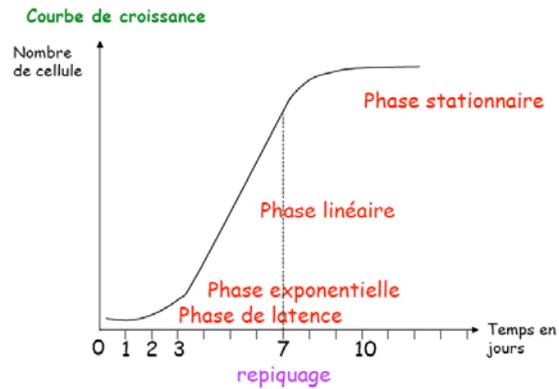
La régénération de plantes a donc des limites : vitrification, albinisme, ...

CULTURES DE SOUCHES CELLULAIRES EN SUSPENSION

Les phases exponentielle et linéaire correspondent à la multiplication cellulaire, la phase stationnaire correspond à un appauvrissement du milieu de culture.

La durée des phases varie selon le type de cellule mais la nature de la courbe reste la même.

Le repiquage est réalisé au plus tard pendant la dernière partie de la phase linéaire.



Applications :

Les souches de tabac BY-2 utilisées n'ont pas de chlorophylles et peuvent donc être observées en fluorescence sans qu'il y ait altération de la couleur par la chlorophylle. Les cellules sont synchronisées pour permettre l'étude du cycle cellulaire. Elles sont sensibles à des drogues ce qui permet de bien les synchroniser.

Cette souche est très utilisée pour la transgénèse.

TRANSGENESE

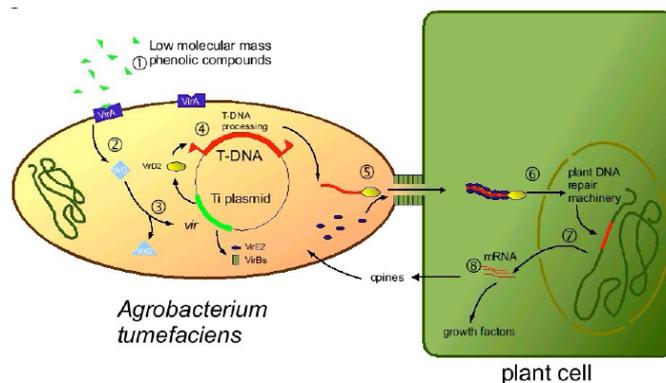
C'est le transfert de gènes d'une espèce à une autre. Cette méthode est utilisée pour l'étude fonctionnelle de gènes d'intérêt, pour l'amélioration des rendements agricoles, pour l'amélioration des qualités nutritionnelles de produits agroalimentaires, pour l'amélioration des plantes à l'origine de produits industriels et pour l'utilisation des plantes comme bioréacteurs.

Mais le site d'intégration du transgène est rarement ciblable ; cela peut conduire à des effets physiologiques non contrôlés. Et les transformants expriment souvent des marqueurs de sélection qui peuvent être transférables à d'autres organismes.

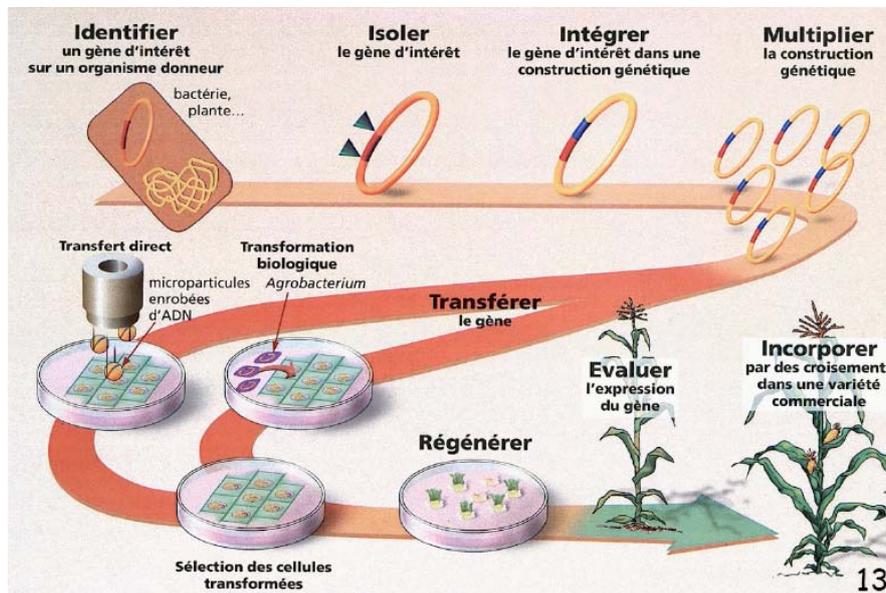
Il existe **trois méthodes** de transfert :

- Electroporation (chocs électriques) ;
- Biolistique (bombardement de microbilles à partir d'un canon à particules) ;
- Agroinfection (la plus efficace).

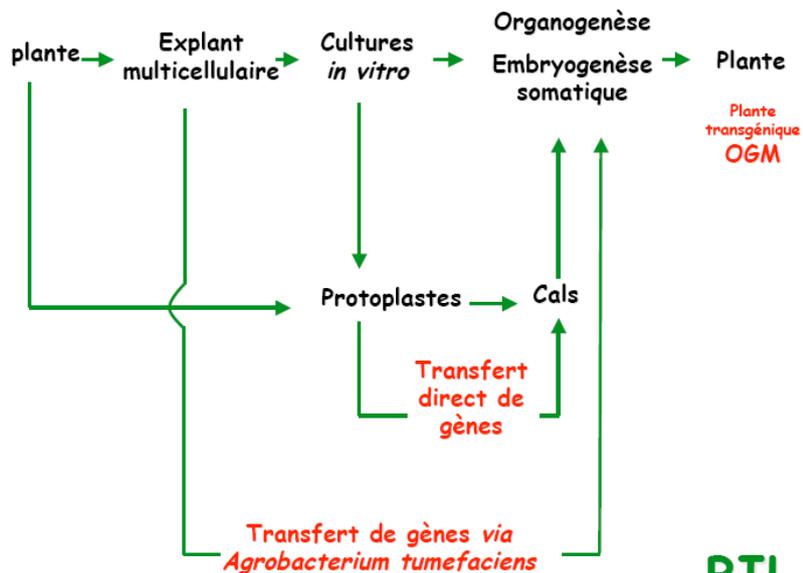
L'agroinfection : *Agrobacterium tumefaciens* possède un plasmide Ti responsable de tumeurs et dont un fragment (ADN-T) s'insère naturellement dans le génome de la plante après avoir été coupé par une enzyme. Il suffit donc de remplacer les gènes de l'ADN-T par des gènes d'intérêt et laisser le mécanisme se faire.



RESUME DES METHODES DE TRANSFORMATION DES PLANTES



BILAN



BILAN