

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université 08 Mai 45 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre
et de l'Univers
Département de Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire, Biologie Moléculaire
des Procaryotes

**Recherche de partenaires des kinases mitotiques
Cdk1 et Cdk2 impliqués dans leur régulation au cours
de la mitose embryonnaire chez *Xenopus laevis***

Présenté par : Bilal DJEGHOUT

Co-encadré par :

Benouareth Djamel Eddine
Kubiak Jacek

(Pr. Univ. Guelma)
(DR2. CNRS, IGDR
et Univ. Rennes1)

Devant le jury composé de :

Président : Benerabaiha Romaila S.
Examineur : Merabet Rym

(M.A.A Univ. Guelma)
(M.A.A Univ. Guelma)

Juin 2013



En convention avec :
UMR 6290 CNRS Institut de Génétique et Développement de Rennes
Equipe Cycle Cellulaire
Faculté de médecine, Université de Rennes 1, France.

Remerciements

igdr **Institut de Génétique
et Développement
de Rennes**



Je tiens à remercier tout d'abord mon maître de stage Jacek KUBIAK docteur chercheur à l'Institut de Génétique et Développement de Rennes, de m'avoir accepté comme stagiaire et encadré durant ces trois mois et pour sa rigueur scientifique, sa disponibilité et ses qualités humaine.

Je remercie Monsieur le directeur Claude Prigent de m'avoir accepté dans cet institut (Institut de Génétique et Développement de Rennes). Je remercie également tout le personnel de l'institut de m'avoir accueilli durant ce stage.

Je tiens aussi à remercier Professeur Djamel Eddine BENOURETH pour m'avoir Co-encadré, soutenu et conseillé tout au long de mes années d'études universitaires.

Je remercie également le thésard Mohammed ELDIKA de m'avoir aidé à réaliser mes manipulations dans le laboratoire.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury qui ont bien accepté de nous honorer et de valoriser ce travail.

Je remercie aussi tous ceux qui m'ont enseignés et m'ont permis d'arriver là où je suis.

Enfin et avant de vous présenter mon mémoire je tiens à remercier toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

M : Bilal DJEGHOUT

Dédicace :

Je dédie ce travail :

- A la mémoire de mon Grand père Salah.
- A mes très chers parents.
- A ma sœur Ahlem et mon frère Walid.
- A mon neveu Adam et son Papa Walid.
- A tous les membres de ma famille.
- A tous mes amis et mes collègues.

Bilal

Liste des figures	Page
Figure 1 : La découverte des cellules.....	3
Figure 2 : Structure d'une cellule d'eucaryotes.....	5
Figure 3 : Les étapes de la phase M mitotique.....	9
Figure 4 : La structure des kinases cycline-dépendantes.....	13
Figure 5 : La structure des cyclines.....	15
Figure 6 : Complexe Cycline-Cdk.....	16
Figure 7 : L'origine structurale de l'activation des Cdk.....	18
Figure 8 : La prolifération des cellules de mammifères en culture.....	19
Figure 9 : La morphologie des cellules de levure arrêtée par un cdc mutation.....	20
Figure 10 : Un œuf mature du <i>Xenopus</i> prêt pour la fertilisation.....	21
Figure 11 : L'étude du cycle cellulaire dans un système acellulaire.....	22
Figure 12 : Croissance des ovocytes et le clivage de l'œuf chez <i>Xenopus laevis</i>	23
Figure 13 : L'extrait acellulaire Fonctionnel.....	26
Figure 14 : Détection de la mitose.....	34
Figure 15 : Précipitation P9.....	35
Figure 16 : Immuno-précipitation de la Cdk1.....	37
Figure 17 : Voie de l'inhibition de complexe Cdk1/cycline B.....	40
Figure 18 : Précipitation avec Billes p9.....	42

Liste des abréviations

A.L.P: alcaline phosphatase

ADN: Acide désoxy nucléotidique

AEBSF: Aminoethyl benzenesulfonyl fluoride hydrochloride

APC/C: Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome

Apc3: Anaphase Promoting Complex 3

ARN: Acide désoxy ribonucléotidique

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP: Adénosine Triphosphate

ATR: ATM and Rad3-related

BSA: Bovine Serum Albumin

Bub: Budding Uninhibited by Benzimidazole

CAK: Kinase Activatrice des CDKs

Camk2: CALcium/calmoduline dependant Kinase II

Cdc: Cell division cycle protein homolog

Cdc2 : Cell Division Control protein 2 homolog

Cdh1: Cdc20 Homolog 1

Cdk: Cyclin Dependant Kinase

CDKs: Cyclin-Dependent Kinases

Chk1: CHeckpoint kinases 1

CHX: Cycloheximide

CIP: CDK Interacting Protein

CKI: Inhibiteurs de Cd K CSF : CytoStatic Factor

CRB: Centre de ressources biologiques de Rennes

CSF: CytoStatic Factor

DDCP: DNA Damage CheckPoint

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DTT: DiThioThréitol

E1: enzyme de l'activation de l'ubiquitine

E2 : enzyme de conjugaison de l'ubiquitine

E2F: Elongation Factor 2

E3: ubiquitine-ligase

ECF: Enhanced ChimioFluorescence

EDTA : Ethylene-diamine-tetra-acetic acid

EGTA: Ethylene Glycol-bis-tetra acetic acid

Emi: Endogenous Meiotic Inhibitor

EP45: Estrogen regulated Protein 45 kDa

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

Erp1: Emi related protein 1

G0: Gap 0

G1: Gap 1

G2: Gap 2

GST: Glutathione-S-Transferase

HCG: Hormone Gonadotrope Chorionique.

HCl : chlorure d'hydrogène

Hepes : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

IgG: Immunoglobuline de type G

IP : Immuno-Précipitation

KCL : Chlorure de potassium

KDa: kilo Dalton

L: Litre

LGB: Lower Gel Buffer

M: Mitose

Mcm: Mini chromosome maintenance

MgCl₂ : chlorure de magnésium

MII: Métaphase II

mM: millimolaire

MOPS: morpholino propanesulfonic acid

MPF: M-phase Promoting Factor

NaCl : chlorure de sodium

NaF: ortho-vanadate de sodium

NASCO: National Agricultural Supply Company

NCTD: Norcantharidine

Nonidet P-40: octyl-phenoxy poly-ethoxy ethanol

omen : oocyte maturation enhancer

ORC: Origin Recognition Complex

P27Xic1: poids moléculaire égale à 27 KDa *Xenopus* inhibiteur de Cdk

P: Phosphore

PBST: Phosphate Buffered Saline Tween-20

PH : potentiel hydrogène

PP2A: Protein Phosphatase 2

PSTAIRE: -Proline-Sérine-Thréonine-Alanine-Isoleucine-Arginine-Glutamine-

Rpm: round per minute (tour par minute)

S: Synthèse

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

TBST: Tris-Buffered Saline and Tween 20

Thr: Thréonine

TRIS: trishydroxyméthylaminométhane ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

Tyr: Tyrosine

UFE: Unfertilised eggs (œufs non fécondés)

UGB: Upper Gel Buffer

UV: Ultra-Violet

XB : Xenopus Buffer

γ: gamma

° C : degrés de celsius

μg : microgramme

μM: micromètre

μL: microlitre

Sommaire	Pages
Introduction	1
Chapitre I : Le cycle de la division cellulaire	
I.1 La cellule	2
I.1.1 Historique : découverte de la cellule.....	2
I.1.2 Propriétés fondamentales des cellules d'eucaryotes.....	3
I.2 Le cycle cellulaire	6
I.2.1 Découverte du cycle cellulaire.....	6
I.2.2 Les événements du cycle cellulaire.....	6
Chapitre II : La régulation moléculaire du cycle cellulaire	
II.1 Les principaux signaux du cycle cellulaire	11
II.1.1 Les cyclines-dépendant kinases.....	11
II.1.1.1 Structure et fonction des kinases cycline-dépendantes...11	
II.1.2 Les cyclines.....	13
II.1.2.1 Les cyclines mitotiques.....	15
II.1.3 Le complexe cycline/Cdk.....	16
II.1.3.1 Les kinases activatrices des Cdk CAK.....	17
II.1.3.2 Les phosphatases.....	17
Chapitre III : Les organismes modèles et l'analyse du cycle cellulaire	
III.1 L'analyse du cycle cellulaire chez les eucaryotes	19
• Les cellules mammifères en culture	19
• Les embryons des mouches	20
• Les levures unicellulaires	20
• Les embryons de grenouilles : <i>Xenopus laevis</i>	21

III.2 les méthodes de l'analyse du cycle cellulaire	23
Partie pratique :	
Objectif	25
I. Matériel et méthodes	25
I.1 Modèle d'étude.....	25
I.2 Collecte des œufs et activation.....	25
I.3 Extrait acellulaire fonctionnel.....	26
I.4 Electrophorèse, anticorps et Western Blot.....	27
I.5 Mesure de l'activité histone H1-Kinase (<i>in vitro</i>).....	30
I.6 Précipitation avec les billes p9.....	30
I.7 Immuno-Précipitation de la Cdk1.....	31
II. Résultats	33
• Détection de la mitose.....	33
• L'activité histone H1-Kinase.....	34
• Cdc6 et p27Xic1 sont associés avec Cdk1/Cdk2.....	34
• Immuno-précipitation de la Cdk1.....	36
III. Discussion	39
• Voie de l'inhibition du complexe Cdk1/Cycline B2.....	39
• L'histone h1 est un substrat de Cdk1.....	40
• La quantité de Cdc5 associée à Cdk diminue durant la phase M	41
• Cdc6 et p27Xic1 sont majoritairement associés avec Cdk mais pas avec Cdk1	42
Conclusion	44

*«La connaissance s'acquiert par
l'expérience, tout le reste n'est
que de l'information».*

Albert Einstein

Introduction :

La division cellulaire est la seule voie vers l'immortalité, se diviser pour survivre et pour transmettre la vie. Mais, la division cellulaire ne se produit que dans certaines conditions, elle est en effet très rigoureusement contrôlée. Pour une cellule, ne pas se diviser signifie vieillir et mourir, mais se diviser de manière incontrôlée aboutit à une instabilité génétique et aux cancers (Prigent, 2008).

Les ovocytes d'amphibiens ont été un excellent modèle permettant la découverte des principes de base de la réglementation de la phase M du cycle cellulaire. Aussi, la plupart des molécules régulant l'entrée, le maintien et la sortie en phase M ont été identifiées à l'aide du modèle expérimental amphibien *Xenopus laevis* (Masui et al., 1971).

MPF (M-Phase Promoting Factor) a été identifié comme un complexe de kinase cycline-dépendantes 1 (Cdk1) et sa sous-unité régulatrice cycline B2. L'activité kinase du complexe MPF est essentielle pour permettre le passage des cellules en phase M. Ce complexe se forme lors de l'accumulation de cycline B2 dans le cytoplasme cellulaire au cours de la phase G2 et est activé peu avant la phase M par déphosphorylation de Cdk1 par la phosphatase Cdc25 (Masui et al., 1971).

Il existe une autre protéine Cdk très semblable à Cdk1, à savoir Cdk2. Le rôle de Cdk2 dans le déroulement de la phase M est très peu connu.

Dans ce contexte, le projet principal qui m'a été confié dans le cadre de mon stage de Master 2 était comment la protéine Cdc6 s'associe avec Cdk1 et éventuellement avec Cdk2. Alors, la question que nous souhaitons aborder est double : [1] comment Cdc6 s'associe avec la/les Cdk ? [2] est-ce que la protéine Cdc6 est un véritable inhibiteur de Cdk ou joue-t-elle un rôle d'intermédiaire qui apporte un inhibiteur spécifique de Cdk ? Nous avons testé un rôle potentiel comme p27Xic1 inhibiteur de la protéine Cdk.

Dans notre étude on va utiliser différentes approches affinitaires par la précipitation des Cdk1 et Cdk2 et les protéines régulatrices associées avec ces deux dernières suivie par SDS PAGE.

Chapitre I : Le cycle de la division cellulaire

I.1 la cellule :

« La cellule est l'unité de base de tout être vivant. Tout organisme, du plus simple au plus perfectionné est constitué de cellules, parfois une seule, parfois plusieurs dizaines, voire plusieurs milliards de types différents comme chez l'homme » (Dupont, 2007).

I.1.1 Historique : Découverte de la cellule

La découverte formidable des propriétés des surfaces des courbes en verre, la modification du trajet de la lumière et la formation des images par l'homme n'a pas une date clairement connue. Au treizième siècle, l'homme a pu fabriquer premières lunettes en Europe, et c'était à la fin de ce siècle que les premiers microscopes sont apparus (composés de deux lentilles). Quelques années après le dix-septième siècle, une équipe de scientifiques d'avant-garde ont révélé tout un monde qui n'aurait jamais été vu à l'œil nu, en utilisant des microscopes construits par eux-mêmes (Karp, 2004).

Robert Hooke, un microscopiste anglais qui à l'âge de 27 ans a découvert les cellules (Fig. 1) ; il a pu observer les parois des cellules vides dans un tissu végétal mort, ces parois étaient à l'origine produites par des cellules vivantes. (Karp, 2004).

Trois siècle plus tard et grâce à la naissance de la microscopie qui est devenue progressivement une des principales techniques d'études de la matière vivante, était la naissance de la biologie cellulaire (Maillet, 2006).

En 1838, Schleiden et Schwann ont affirmé que la cellule est l'unité structurale de tous les organismes vivants grâce au progrès de l'optique et la découverte des lentilles achromatiques. Cette « théorie cellulaire est une des généralisations des plus fructueuses de la pensée biologique » (H.Firket) (Maillet, 2006).

En 1859, Virchow a exposé ses idées dans un ouvrage qu'il a publié ; le résultat de ses recherches se résumant par cet adage « omnis cellula e cellula »

« toute cellule provient d'une cellule » et cette phrase « là où apparaît une cellule, il doit y avoir eu une autre cellule auparavant » (Maillet, 2006).



Fig. 1 : La découverte des cellules. Robert Hooke a utilisé ce microscope pour sa première observation des cellules. (Détails) montre le dessin de Hooke à partir d'une mince tranche de liège, qui montre le réseau de cellules qui est en forme de rayon de miel (Maillet, 2006).

I.1.2 Propriétés fondamentales des cellules eucaryotes:

Le principal organite de la cellule d'eucaryotes, clairement visible, est son noyau, avec un diamètre d'environ $5\mu\text{m}$; il contient l'information génétique de la cellule (Fig. 2). Le noyau de la cellule d'eucaryotes prend la forme d'une série de molécules d'ADN non refermés par elles-mêmes.

C'est dans le noyau que l'ADN se réplique et est transcrit en ARN, ce dernier est traduit en protéines aux seins de ribosomes dans le cytoplasme (Geoffrey, 1999).

Dans le cytoplasme de la cellule d'eucaryotes et dehors du noyau, il y a toute une série d'organites bordés d'une membrane, chacun doué d'une activité métabolique propre (Fig. 2).

L'efficacité métabolique est due à ce que le cytoplasme est réparti entre organite et cytosol. Parmi ces organites, la mitochondrie qui est présente dans presque toutes les cellules d'eucaryotes et joue un rôle crucial dans la fourniture d'énergie, elle est le siège du métabolisme oxydant et produit la majeure partie de l'ATP issu de l'énergie récupérée de la dégradation des molécules organiques (Geoffrey, 1999).

D'autres compartiments métaboliques, le lysosome et le peroxysome sont destinés respectivement à la destruction de certaines macromolécules à plusieurs réactions d'oxydation (Fig. 2) (Geoffrey, 1999).

La cellule d'eucaryotes est mille fois plus volumineuse que la cellule de procaryotes ; la grande taille et la complexité de la cellule d'eucaryotes leurs permettent la mise en place des protéines néo-synthétisées y représentent une tâche énorme (Geoffrey, 1999).

Le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, deux organites cytoplasmiques, sont spécialisés dans le tri et le transport des protéines de sécrétion et des protéines qui seront incorporées dans la membrane plasmique et dans le lysosome (Geoffrey, 1999).

Le cytosquelette, un des structures les plus importantes dans la cellule d'eucaryotes, il est un réseau de filaments protéiques tendus à travers le cytoplasme ; ce cytosquelette, l'échafaudage de la cellule lui impose sa forme et soutient son cytoplasme, il garantit aussi les déplacement de la cellule dans son ensemble, ainsi que le transport et la mise en place des organites et d'autres structures, notamment la migration des chromosomes au moment de la mitose (Fig. 2) (Geoffrey, 1999).

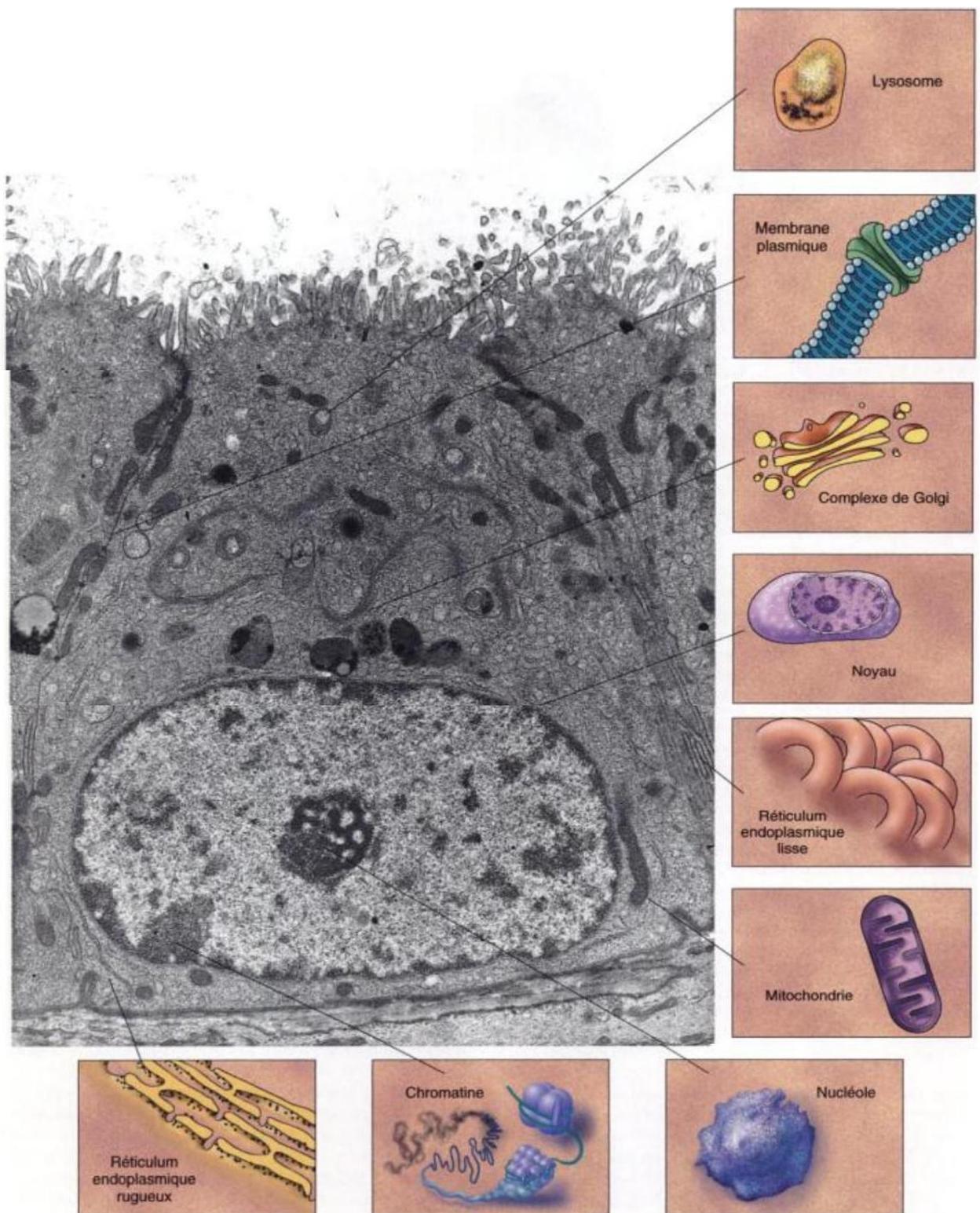


Fig. 2 : Structure d'une cellule d'eucaryotes. « La structure interne diffère beaucoup d'un organisme à l'autre. Cette cellule épithéliale délimite une portion du canal reproducteur mâle chez le rat. Divers organites sont localisés et représentés schématiquement en bordure de la figure » (Karp, 2004).

I.2 Le cycle cellulaire :

I.2.1 Découverte du cycle cellulaire :

Le cycle cellulaire est une série d'évènements, avec une organisation bien déterminée qui conduit à la division d'une cellule. Ce processus biologique fondamental a été décrit en 1882 par Walter Flemming. Selon les observations de Flemming, le cycle cellulaire est divisé en deux phases : la mitose et l'interphase (Marteil, 2010).

Le terme Mitose vient du mot grec *mito* signifiant filament ; une caractéristique de l'apparence filiforme des chromosomes pendant cette phase. Alors que le nom d'interphase ou phase de repos est attribuée à la deuxième étape, en raison de l'apparente inactivité des cellules en dehors de la mitose (Marteil, 2010).

Depuis la moitié du 20^{ème} siècle, le cycle cellulaire est enfin divisé en quatre étapes : la phase G1, la phase S, la phase G2 et la phase M (mitose ou méiose) (figure 3). Pour la plupart des cellules d'eucaryotes, la durée du cycle cellulaire est entre 10 et 30 heures, mais selon le type cellulaire et l'état de développement (Marteil, 2010).

I.2.2 Les évènements du cycle cellulaire :

La fabrication de la matière vivante est assurée par la division cellulaire qui constitue l'évènement de base de ce processus biologique. La matière vivante construite peut être plus ou moins complexe ou organisée selon l'espèce (Galas et *al.*, 2008).

Dans l'étude du cycle cellulaire et les mécanismes de la division cellulaire, plusieurs modèles unicellulaire ont été utilisé (levure), mais également pluricellulaires (ovocytes de Xénope, ovocytes d'Etoile de mer, embryons de Drosophile et embryons d'Oursins) (Galas et *al.*, 2008).

« La duplication et la ségrégation des chromosomes se déroulent lors des phases distinctes du cycle cellulaire, généralement séparées par intermède » (Galas et *al.*, 2008).

Les phases du cycle cellulaire d'eucaryotes peuvent être définies à partir des événements chromosomiques. Le cycle commence par la phase S où l'ADN est répliqué et les chromosomes sont dupliqués. Tout cela commence au niveau de sites spécifiques de l'ADN, ces sites sont répartis en un nombre élevé le long du chromosome, appelés origine de réplication.

Des protéines spécifiques ouvrent la double hélice de l'ADN à l'extérieur à partir de l'origine de réplication, dans les deux sens pour copier les deux brins d'ADN. Ce processus nécessite une augmentation de la synthèse de protéines comme les histones qui enroule l'ADN sous forme de chromosome. D'autres protéines interviennent aussi durant la phase S, sont disposées le long des chromosomes dupliqués, sont appelées chromatides sœurs (Morgan, 2010).

La mitose permet la distribution équitable des chromosomes dupliqués entre les noyaux des cellules filles. Dès l'initiation de la mitose, les paires de chromatides sœurs sont attachées au fuseau mitotique et forment un ensemble bipolaire de polymères protéiques appelés microtubules (Morgan, 2010).

Les chromatides sœurs de chaque paire sont reliées aux microtubules venant des pôles opposés du fuseau, pendant la métaphase. A l'anaphase, la cohésion entre les chromatides sœurs est détruite, résultant donc leur séparation. Les chromatides séparées migrent à travers le fuseau vers les pôles opposés de la cellule mère (ségrégation des chromatides sœurs) engendrant l'empaquetage des deux groupes de chromosomes dans les noyaux des cellules filles (Morgan, 2010).

La formation des cellules filles se fait par la cytokinèse, c'est lorsque la cellule mère se divise elle-même. L'apparence de ce dernier événement varie beaucoup d'un organisme à un autre, la mise en place d'une nouvelle membrane plasmique est nécessaire dans toutes les cellules (et dans certains cas celle d'une nouvelle membrane est guidée par un anneau contractile de filaments d'actine et de protéines motrices de myosine mis en place entre les membranes plasmiques au niveau du site de division de la cellule (Fig. 3). Une fois cet anneau se contractile, le cycle cellulaire s'active et les deux cellules filles sont séparées (Morgan, 2010).

Plus les phases S et M, il y a des phases supplémentaires connues sous le nom d'intermèdes (gap en anglais). La phase G1 est la première phase d'intervalle qui déroule avant la phase S, alors que la phase G2 se déroule avant la phase M (Morgan, 2010).

Le rôle principal des phases G, c'est qu'elles permettent à la cellule de croître, ce qui nécessite généralement une durée longue par rapport à la duplication et la ségrégation des chromosomes (Morgan, 2010).

Le plus important dans ces phases d'intervalles est qu'au cours des quelles que la progression vers le stade suivant du cycle cellulaire est faite, parce que le cycle est contrôlé par de nombreux signaux intra- et extracellulaires (Morgan, 2010).

La phase G1 est le moment que la majorité des cellules vont s'engager dans la voie de la division ou sortir du cycle cellulaire, car c'est une période de régulation particulièrement importante. Lorsque les conditions de croissances sont défavorables ou en réponse à des signaux inhibiteurs, les cellules peuvent s'arrêter en G1 pendant de longues périodes ou même entrer dans un état prolongé de non-division appelé G0 (G zéro) (Morgan, 2010).

La phase G2 est une phase de croissance et de préparation à la mitose. A la fin de la phase G1 et de la phase G2, il existe ce qu'on appelle des points de contrôle, ou « check-points », où la cellule contrôle que tout est parfaitement mis en place pour que respectivement la réplication de l'ADN et la mitose se déroulent normalement (Morgan, 2010).

« Les composants cytoplasmiques sont dupliqués au cours du cycle cellulaire » (Morgan, 2010).

Au cours du cycle cellulaire, la plupart des protéines, ARN et autres macromolécules cellulaire sont synthétisées en continu. Au moment de cytokinèse, ces composants sont répartis d'une façon équitable dans les cellules filles, lorsque la cellule mère se rétrécit en son milieu (Morgan, 2010).

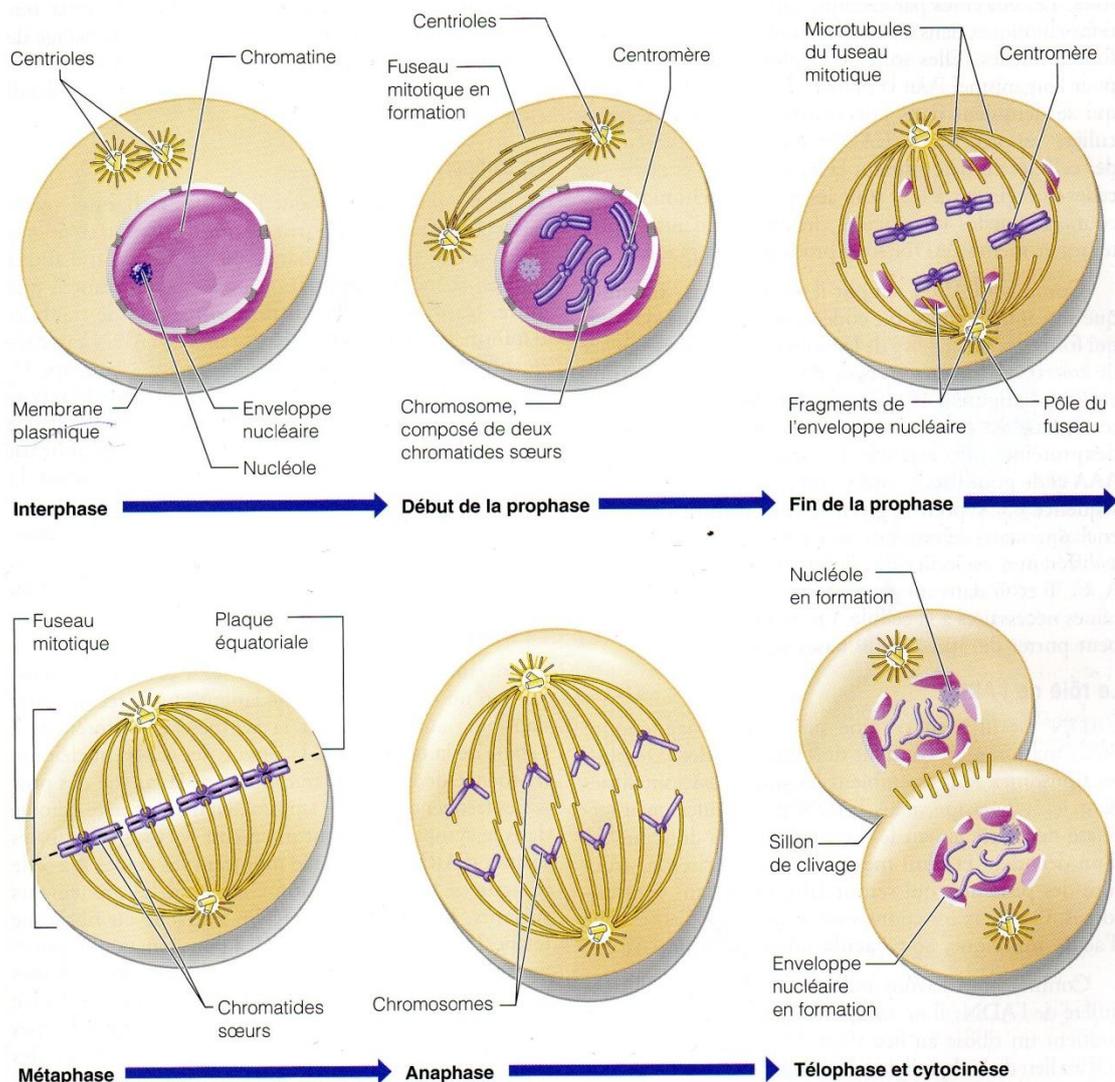


Fig. 3 : Les étapes de la phase M mitotique. En prophase, l'ADN se condense et les deux centrosomes se séparent avec la rupture de l'enveloppe nucléaire. Les chromosomes s'alignent sur la plaque métaphasique, le fuseau bipolaire est alors constitué de trois types de microtubules. En anaphase, les chromatides sœurs migrent vers les pôles opposés de la cellule. Lors de la télophase les chromatides sœurs se décondensent et l'enveloppe nucléaire se reforme. La cytotélerèse commence dès l'anaphase avec la formation du sillon de division, et c'est là que la cellule se prépare à l'étape la plus critique de son cycle ; la cytokinèse, la séparation physique des deux cellules filles qui implique la rupture de la membrane plasmique. (Elaine, 2008).

« La croissance cellulaire est généralement coordonnée avec la division cellulaire » (Morgan David, 2010).

Dans la majorité des cellules, les événements chromosomiques spécifiques définissant les phases du cycle cellulaire sont couplés au processus de synthèse qui duplique la masse des protéines et des organites de la cellule. Alors, la masse de chaque cellule double mais la taille moyenne des cellules reste constante (Morgan, 2010).

Dans d'autres types cellulaires, la croissance et la division ne sont pas coordonnées. Les ovocytes de mammifères, les neurones et les cellules musculaires sont capables d'une croissance considérable en l'absence de division, alors que les divisions précoces d'un œuf animal fécondé se déroulent sans croissance cellulaire (Morgan, 2010).

Ces exemples montrent que la croissance cellulaire et le cycle cellulaire chromosomique sont des événements régulés de manière indépendante dans certains types, alors que dans d'autres types sont régulés de manière coordonné (Morgan, 2010).

Chapitre II : La régulation moléculaire du cycle cellulaire

II.1 Les principaux signaux de la régulation moléculaire :

Le système de contrôle du cycle cellulaire est constitué d'une série de commutateurs biochimiques qui déclenchent les événements de ce cycle dans l'ordre convenable. Les composants clés de ce système sont les kinases cyclines-dépendantes et leurs régulateurs, qui sont organisés en un réseau régulateur robuste, modulable et réactif vis-à-vis de différentes informations intra- et extracellulaires (Bazile et *al.*, 2007).

II.1.1 Les kinases cycline-dépendantes: Cdk

Les différentes phases du cycle qui ont été rappelées dans le chapitre précédent se succèdent toujours selon la même séquence contrôlée par des régulateurs biochimiques du cycle cellulaire appelés Cdk (cyclin dépendant kinases/ kinases cycline-dépendantes). Ces Cdk interviennent à des moments précis du cycle :

- Au cours de la phase G1 pour permettre la transition G1-S correspondant au début de la réplication de l'ADN.
- Pendant la phase S elle-même pour assurer la poursuite de la réplication au début de la phase G2
- Au moment de la transition G2-M pour conduire au déclenchement et au déroulement de la mitose ([Galas](#) et al., 2008).

II.1.1.1 Structure et fonction des kinases cycline-dépendantes :

Les kinases cycline-dépendantes (Cdk) sont des enzymes dont l'activité nécessite une liaison avec des sous-unités régulatrices (Fig. 4), Elles sont composées de sérine-thréonine kinases de petite taille (environ 34 à 40 kDa) partageant un domaine catalytique commun ([Macias](#), 2007).

Les Cdk ont été décrits comme des enzymes contrôlant les événements du cycle cellulaire, alors que seule une partie des Cdk est directement impliquée dans ces mécanismes ([Macias](#), 2007).

Les Cdk actives phosphorylent leurs substrat spécifiques sur des résidus sérines ou thréonines inclus dans une séquence consensus accessible. Ce sont des cibles qui jouent un rôle direct dans la progression du cycle cellulaire après avoir vu leurs propriétés modifiées par la phosphorylation (Kaldis, 2003).

« Le site actif des kinases cycline-dépendantes est bloqué en l'absence de cycline » (Morgan, 2010).

Toutes les protéines kinases possèdent une structure tertiaire comprenant un petit lobe amino-terminal et un lobe carboxy-terminal plus gros. L'ATP s'intègre étroitement dans la fente située entre les lobes, avec les phosphates orientés vers l'extérieur, vers les bords de la fente. Le substrat protéique se fixe à l'entrée de la fente, interagissant essentiellement avec la surface du lobe carboxy-terminal. Les résidus voisins catalysent le transfert du phosphate γ -terminal de l'ATP sur un oxygène dans le substrat protéique (Morgan, 2010).

Les Cdk présentent la même structure à deux lobes que les autres protéines kinases (Fig. 4) mais avec deux modifications qui les rendent inactives en l'absence de cycline. Ces modifications ont été révélées par des études détaillées de cristallographie de la structure de la Cdk2 humaine. Tout d'abord, une grande boucle flexible – la boucle T ou boucle d'activation – atteint le lobe carboxy-terminal, et en sort pour bloquer la liaison du substrat protéique à l'entrée de la fente du site actif. Ensuite dans la Cdk inactive, plusieurs chaînes latérales d'acides aminés importants dans le site actif sont positionnées de manière incorrecte, de sorte que les phosphates de l'ATP ne présentent pas l'orientation idéale pour la réaction kinasique. L'activation de la Cdk nécessite donc des changements structuraux importants dans leur site actif (Ubersax *et al.*, 2003).

Deux hélices alpha jouent un rôle particulièrement important dans le contrôle de l'activité de la Cdk. L'hélice PSTAIRE, hautement conservée, située dans le lobe supérieur de la kinase (également appelée hélice alpha 1) interagit directement avec la cycline et se déplace vers l'intérieur lors de la fixation de la cycline, entraînant la réorientation des résidus qui interagissent avec les phosphates de l'ATP. La petite hélice L12, située juste avant la boucle T dans la séquence primaire, change de structure pour devenir un brin bêta au moment

de la fixation de la cycline, ce qui contribue également à la reconfiguration du site actif et de la boucle T (Ubersax et *al.*, 2003).

La structure de la cdk2 humaine (Fig. 4), déterminée par cristallographie aux rayons X. Comme d'autres protéines kinases, la cdk2 est constituée de deux lobes : un lobe amino-terminal plus petit (en haut) constitué du feuillet beta et de l'hélice PSTAIRE et d'un gros lobe carboxy-terminal (en bas) essentiellement formé d'hélice alpha. Le substrat l'ATP est figuré sous forme éclatée. Il est situé profondément dans la fente du site actif entre les deux lobes. Les phosphates sont orientés vers l'extérieur, vers les bords de la fente, qui est bloquée dans cette structure par la boucle T (indiqué en vert) (Ubersax et *al.*, 2003).

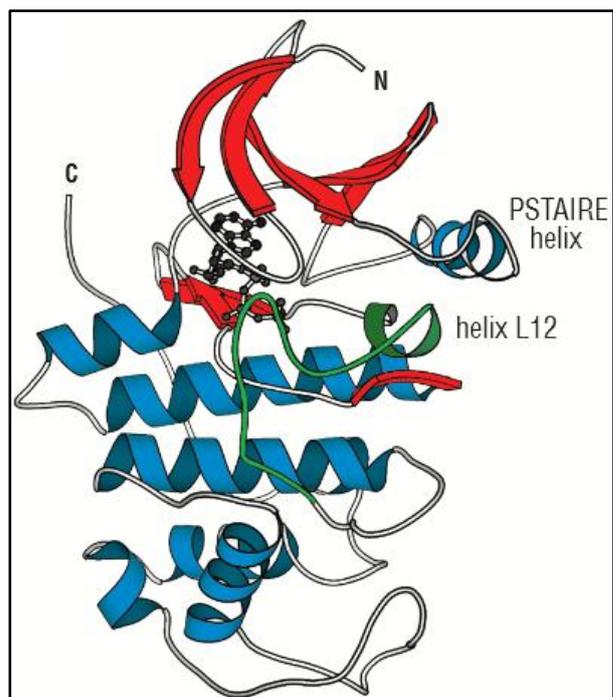


Fig. 4 : La structure des kinases cycline-dépendantes.
(Ubersax et *al.*, 2003).

II.1.2 Les cyclines :

« Les cyclines sont les déterminants clés de l'activité des Cdk »
(Morgan, 2010).

Les cyclines sont des protéines beaucoup moins conservées que les Cdk, mais elles ont en commun de se lier et d'activer les Cdk grâce à un domaine d'une centaine d'acides aminés appelé *cyclin box* et qui lui est conservé (Fig. 5).

Elles subissent des variations de concentration extrêmement fines et rapides, essentiellement par régulation de l'expression de leurs gènes et de leur dégradation protéolytique, ce qui permet d'assurer les variations d'activité des Cdk indispensables au bon déroulement du cycle cellulaire (Kim et *al.*, 2007).

Les cyclines intervenant dans les mécanismes du cycle cellulaire sont généralement classées en quatre groupes selon leur rôle et le moment du cycle ou elles sont actives :

- **Les cyclines G1 :**

Les cyclines qui se fixent aux Cdk et déclenchant l'entrée de la cellule dans un nouveau cycle cellulaire au point « Start » et qui les activent. Leur concentration dépend du taux de croissance de la cellule ou des signaux inducteurs de croissance plutôt que de la phase du cycle cellulaire (Kim et *al.*, 2007).

- **Les Cyclines G1/S :**

Les cyclines qui activent les Cdk stimulant le passage à travers le point de contrôle « Start » ; leur concentration atteint son maximum vers la fin de la phase G1 (Kim et *al.*, 2007).

- **Les cyclines S :**

Les cyclines qui activent les Cdk nécessaires à la synthèse d'ADN. Leur concentration augmente et reste élevée au cours de la phase S, de l'intermède G2 et au début de la mitose (Kim et *al.*, 2007).

- **Les cyclines M :**

Les cyclines qui activent les Cdk nécessaires à l'entrée en mitose. Leur concentration augmente à l'approche de la mitose et atteint un sommet en métaphase (Kim et *al.*, 2007).

La même cycline peut exercer différentes fonctions, avoir une expression variable dans le temps suivant le type cellulaire dans lequel elle est exprimée, ou encore contribuer au contrôle de plusieurs processus du cycle cellulaire (Morgan, 2010).

La structure de la cycline A humaine (Fig. 5). Toutes les cyclines semblent avoir une structure tertiaire similaire appelée motif cycline (cyclin fold en anglais). Comporte une partie centrale formée de deux domaines compacts contenant chacun cinq hélices alpha (Brown et *al.*, 1995).

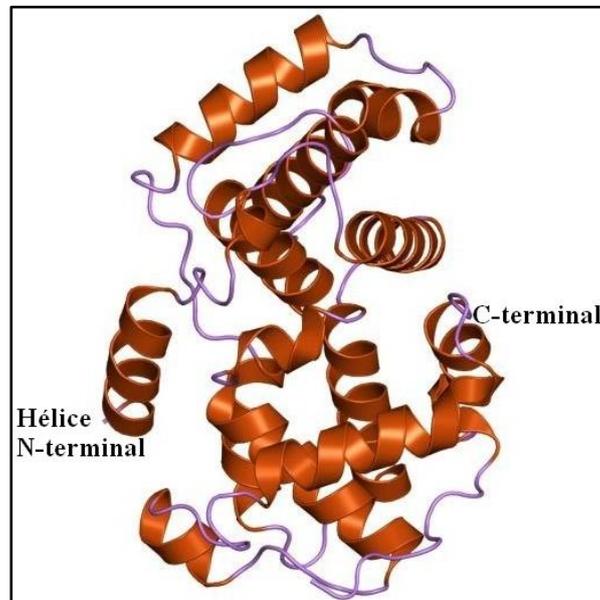


Fig. 5 : La structure des cyclines. (Brown et *al.*, 1995).

II.1.2.1 Les cyclines mitotiques :

Les cyclines mitotiques comprennent la cycline A et la cycline B. Elles possèdent une séquence d'acides aminés partiellement conservée (dénommée destruction box) située en partie N-terminale, indispensable à leur destruction rapide et soudaine spécifiquement pendant la mitose. Cette destruction se fait par la voie de la protéolyse dépendante de l'ubiquitine. Le taux des cyclines mitotiques augmente progressivement au cours des phases S et G2 pour atteindre un pic en mitose. Les cyclines A et B interagissent toutes les deux avec la kinase Cdk1 pour déclencher la mitose et la dégradation de ces deux protéines est nécessaire pour que la cellule sorte de la mitose. Cependant, la synthèse et la destruction de la cycline A ont toujours lieu en avance par rapport à la cycline B (Wang et *al.*, 1990).

II.1.3 Le complexe Cdk/Cycline au cours du cycle cellulaire :

Les complexes Cdk-cyclines contrôlent le cycle cellulaire à mesure que leur identité et composition changent. Une fois la phase S est commencée les cyclines de G1 seront dégradées. La phase M est ensuite induite par la synthèse des cyclines mitotiques A et B (Fig. 6).

Ces cyclines sont dégradées pendant la mitose pour assurer que pendant G1 ou S la cellule ne commence pas la mitose (Glotzer et al, 1991).

La boucle T bloque les sites actifs des Cdk (Fig. 7), la liaison des cyclines active les Cdk en déplaçant la boucle T de l'entrée du site actif, il semble que cet effet n'est pas suffisant pour l'activation complète des Cdk. Une phosphorylation au niveau de la boucle T provoque l'ajustement final pour activer les Cdk (Sherr et al, 1999).

Cette figure montre un complexe actif Cdk2/Cycline A ; association avec la Cycline A ($K_d = 50$ nM) et phosphorylation de la Thr 160 par la kinase CAK (Brown et al, 1999).

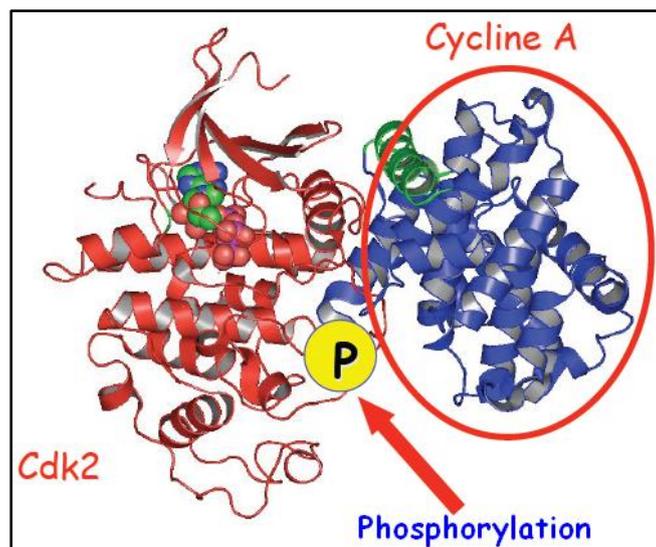


Fig. 6 : Complexe Cycline-Cdk. (Brown et al, 1999).

II.1.3.1 Les kinases activatrices des Cdk : CAK

La fixation de la cycline seule ne suffit pas à l'activation complète des Cdk impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire. L'activation intégrale d'une Cdk et la fonction normale de la Cdk dans la cellule nécessite également la phosphorylation d'un résidu thréonine adjacent au site actif de la kinase. La phosphorylation au niveau de ce site est catalysée par des enzymes appelées kinases activatrices des Cdk (CAK pour Cdk-activating kinases en anglais) (Morgan, 2010).

La phosphorylation est un changement réversible utilisé pour modifier l'activité d'une enzyme lorsque les conditions changent. Mais, l'activation des Cdk par la phosphorylation ne semble pas obéir à cette règle. L'activité des CAK est maintenue à un taux constant et élevé pendant tout le cycle cellulaire alors que la voie du contrôle de ce mécanisme reste inconnue (Morgan, 2010).

De ce fait, la phosphorylation activatrice peut être considérée comme une simple modification post-traductionnelle nécessaire à l'activité enzymatique (Morgan, 2010).

II.1.3.2 Les phosphatases :

Il faut toujours penser en biologie moléculaire que chaque protéine régulée par phosphorylation est aussi régulée par déphosphorylation ([Galas et al.](#), 2008).

La caractérisation des phosphatases a toujours été retardée par rapport à la caractérisation des kinases. Les phosphatases, comme la cdc25 à double spécificité (phospho-tyrosine et phospho-sérine/thréonine) activent les kinases régulatrices du cycle cellulaire (les Cdk) et contrôlent ainsi le déclenchement de l'entrée en mitose et la prolifération ([Galas et al.](#), 2008)..

Il y a d'autres phosphatases comme les Wee1 qui activent les complexes cycline/Cdk par déphosphorylation, ces enzymes vont permettre dans un second temps l'activation du complexe en déphosphorylant deux acides aminés (la Thr14 et la Thr15), autorisant ainsi la liaison de l'ATP dans le site catalytique, permettant l'entrée en mitose rapide et irréversible grâce à une boucle d'autoactivation ([Galas et al.](#), 2008).

Ces deux enzymes (Cdc25 et Wee1) sont en effet régulées par leur propre substrat de mitose : le complexe M/Cdk (cycline B/Cdk1) ([Galas et al., 2008](#)).

La phosphorylation (Fig. 7) permet à la boucle T d'interagir efficacement avec un substrat protéique contenant la séquence consensus SPXX (en rose). La proline en deuxième position dans la séquence interagit avec le squelette de la boucle T, alors que le résidu lysine chargé positivement en quatrième position (K^+) interagit avec le phosphate chargé négativement présent sur T160. L'oxygène de l'hydroxyle du résidu sérine (S) dans le substrat est désormais positionné pour une attaque nucléophile sur le phosphate γ de l'ATP, qui est catalysée par plusieurs chaînes latérales d'acides aminés dans la région du site actif (Morgan, 2010).

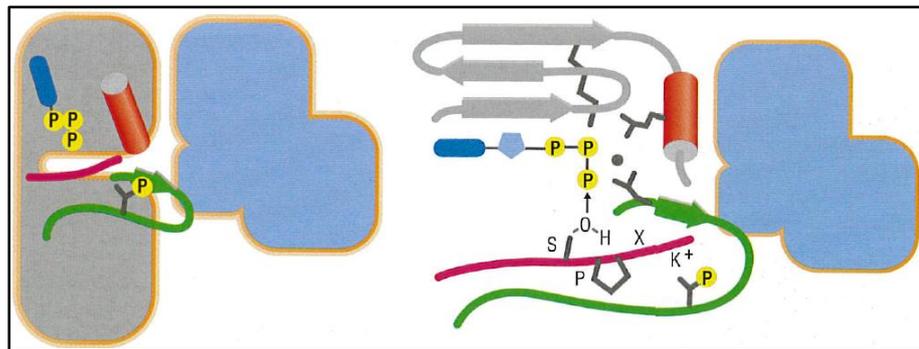


Fig. 7 : L'origine structurale de l'activation des Cdk. (Morgan, 2010).

Comme les composants du système de contrôle du cycle cellulaire sont assemblés en commutateurs biochimiques, de nombreux événements doivent être déclenchés suivant un mode de tout ou rien. Il serait désastreux que des réactions telles que la duplication des chromosomes ou l'assemblage du fuseau soient partiellement réalisées et abandonnées avant leur terme. Le système de contrôle du cycle cellulaire a donc été élaboré pour que les transitions soient évidentes et irréversibles, de sorte que chaque amorçage d'un événement du cycle cellulaire déclenche des mécanismes garantissant le déroulement rapide et complet de cet événement (Morgan, 2010).

Chapitre III : Les organismes modèles et l'analyse du cycle cellulaire

III.1 L'analyse du cycle cellulaire chez les eucaryotes :

« Les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire sont similaires chez tous les eucaryotes » (Morgan, 2010).

Toutes les cellules eucaryotes utilisent une machinerie similaire pour leur duplication et leur division, et toutes ont un système de régulation similaire contrôlant le déroulement et la coordination des événements du cycle cellulaire. Il est donc possible d'obtenir une vue globale de la régulation du cycle cellulaire en étudiant la division des cellules d'espèces très différentes, et en exploitant ainsi les avantages expérimentaux de chacune d'elles (Morgan, 2010).

Les organismes modèles les plus communément utilisés sont :

- **Les cellules de mammifères en culture :**

Les lignées de cellules en culture permettent d'analyser la régulation du cycle cellulaire chez les mammifères (Fig. 8). Les expériences sur des êtres humains sont impossibles, il est nécessaire d'étudier des systèmes de mammifères qui peuvent être manipulés en laboratoire. Les plus utilisés sont les cellules saines ou tumorales, de souris ou d'humain, qui ont été prélevées et mises en culture sur des boîtes de Pétri en présence de nutriments et autres facteurs essentiels (Wolpert et *al.*, 2002).

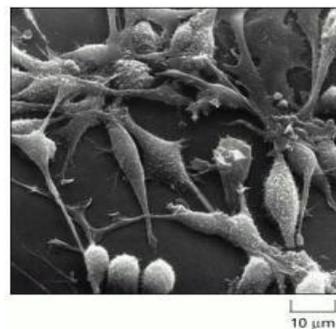


Fig. 8 : La prolifération des cellules de mammifères en culture. Les cellules de cette micrographie électronique à balayage sont des fibroblastes de rat (Albert et *al.*, 2008).

- **Les embryons des mouches :**

La régulation de la division cellulaire chez les organismes pluricellulaires peut être analysée génétiquement chez la drosophile. La mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* est un organisme modèle important, particulièrement utile dans l'étude des mécanismes contrôlant la croissance et la division cellulaire dans les tissus en développement. La drosophile possède un temps de génération relativement court, un génome entièrement séquencé et une génétique bien connue qui peuvent être utilisées pour créer des mutants et analyser les fonctions des gènes *in vivo* (Morgan David, 2010).

- **Les levures unicellulaires :**

Les levures se multiplient par bourgeonnement ou par fission fournissent un système performant pour l'analyse génétique du contrôle du cycle cellulaire eucaryote. Leur grand intérêt réside dans la simplicité dans l'analyse génétique (Morgan, 2010).

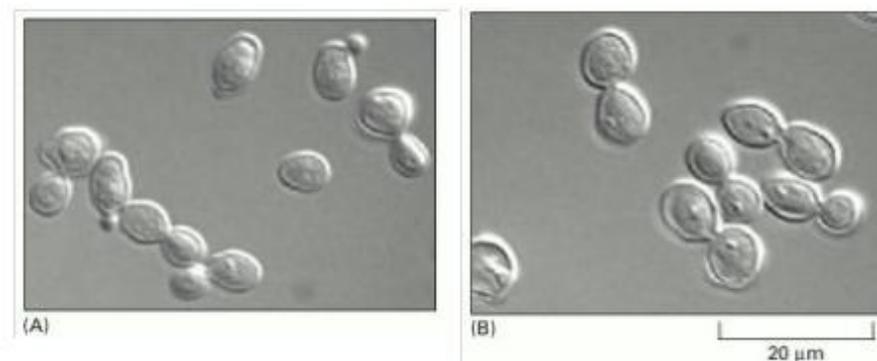


Fig. 9 : La morphologie des cellules de levure arrêtée par un cdc mutation. (A) dans une population normale de la prolifération des cellules de levure, les bourgeons sont de taille variable selon le stade du cycle cellulaire. (B) Dans un mutant *cdc15* grandi à la température restrictive, cellules complètes anaphase mais ne peuvent pas compléter la sortie de la mitose et la cytokinèse. En conséquence, ils arrêtent régulièrement avec les grosses têtes, qui sont caractéristiques de la phase tardive de M (Albert et *al.*, 2008).

- **Les embryons de grenouilles : *Xenopus laevis***

Les cycles embryonnaires du *Xenopus laevis* ont été importants pour la découverte des composantes essentielles et du comportement du contrôle du cycle cellulaire. Un avantage clés des œufs (Fig. 10) est leur grande taille ; l'œuf fécondé de l'xénope mesure environ un millimètre de diamètre et il est facile d'y injecter des substances-test afin de déterminer leur effet sur l'avancée dans le cycle cellulaire (Albert et *al.*, 2008).

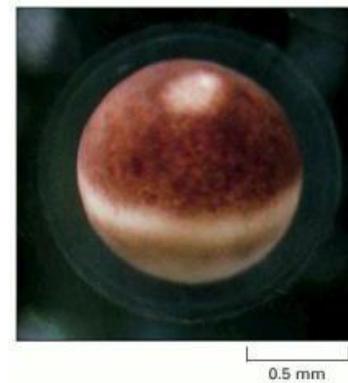


Fig. 10. Un œuf mature du *Xenopus* prêt pour la fécondation. La tache pâle près du haut indique l'emplacement du noyau, ce qui a provoqué le déplacement du pigment brun dans la couche de surface du cytoplasme de l'œuf. Bien que ce ne soit pas visible sur la photo, l'enveloppe nucléaire est en panne au cours du processus de maturation des ovules (Albert et *al.*, 2008).

Il est également possible de préparer du cytoplasme quasiment pur à partir de ces œufs et de reconstituer de nombreux événements du cycle cellulaire dans les tubes à essai (Fig. 11). Ces extraits du cycle cellulaire fournissent un système simple et étroitement contrôlé dans lequel les événements du cycle cellulaire peuvent être observés et manipulés (Albert et *al.*, 2008).

Alternativement, même sans les noyaux de sperme la progression en cycle cellulaire peut être suivi grâce aux marqueurs protéiques du cycle

cellulaire (par exemple la phosphorylation de protéines) au par la mesure des activités spécifiques (par exemple activité de l'histone H1 kinase lors de la phase M) (Kubiak, communication personnelle).

Un grand lot d'œufs de grenouilles activés est défoncé par centrifugation douce (Fig. 11), qui sépare également le cytoplasme de l'autre composant de la cellule. Le cytoplasme non dilué est recueilli, et des noyaux de spermatozoïdes peuvent être ajoutés à cela, en parallèle avec l'ATP. Les noyaux de sperme se décondensent, puis passent par des cycles répétés de réplication de l'ADN et la mitose, ce qui indique que le système de contrôle du cycle cellulaire est en fonctionnement en cet extrait cytoplasmique acellulaire (Albert et *al.*, 2008).

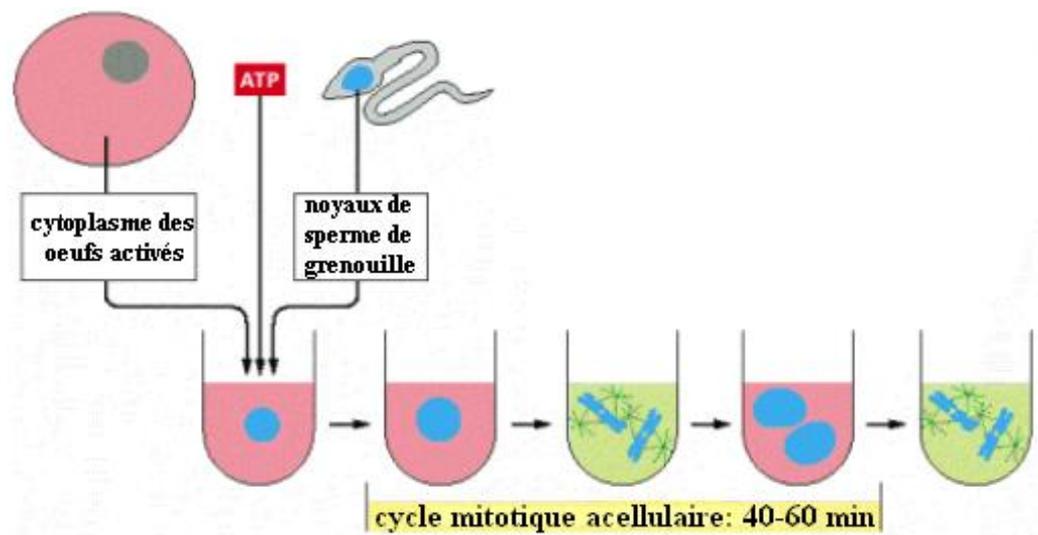


Fig. 11 : L'étude du cycle cellulaire dans un système acellulaire.
(Albert et *al.*, 2008).

- **L'importance biologique de *Xenopus Laevis* :**

Xenopus laevis (fig.12) est une ressource unique pour les deux domaines essentiels en biologie des vertébrés : le développement embryonnaire précoce et de la biologie cellulaire :

- Dans le premier cas, *Xenopus laevis* a ouvert la voie à l'identification des mécanismes de décisions au début de destin, structuration

du plan du corps des vertébrés de base et l'organogenèse tôt (Gilbert, 2004).

- Contributions à la biologie cellulaire et la biochimie incluent le travail séminal sur la réplication des chromosomes, assemblage de la chromatine, la réplication nucléaires et aussi le contrôle du cycle cellulaire dans la reconstruction *in vitro* (Gilbert, 2004).

Le xénope est devenue un modèle vertébré majeur pour la recherche en biologie cellulaire et développementale qui est soutenu par la plupart des instituts de recherche dans le monde. Les informations accumulées de ces études fournissent une puissante assise pour les travaux futurs (Gilbert, 2004).

L'ovocyte grandit sans se diviser pendant plusieurs mois dans l'ovaire de la grenouille mère et mûrit finalement dans un ovule (Fig. 12). Après la fécondation, l'œuf se divise très rapidement formant un têtard multicellulaire dans un jour ou deux. Les cellules deviennent progressivement plus petites avec chaque division, et l'embryon conserve la même taille. La croissance ne démarre que lorsque le têtard commence à s'alimenter (Albert et *al.*, 2008).

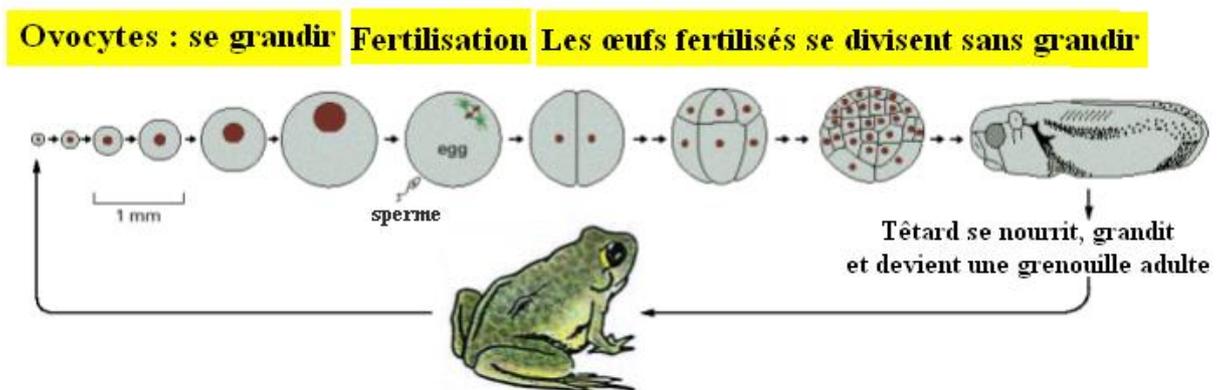


Fig. 12. Croissance des ovocytes et le clivage de l'œuf chez *Xenopus laevis*. (Albert et *al.*, 2008).

III.2 Les techniques d'analyse du cycle cellulaire :

Lorsqu'on effectue une analyse expérimentale du cycle cellulaire, on a le plus souvent besoin de savoir à quel stade se trouvent les cellules étudiées. Donc, il faut souvent synchroniser une population de cellules à un stade particulier du cycle cellulaire, pour pouvoir analyser les caractéristiques biochimiques de ce stade (Morgan, 2010).

Il existe plusieurs méthodes, mais en général elles impliquent un traitement des cellules par une substance chimique ou une hormone, ou encore un changement d'une condition environnementale (comme la température dans le cas des mutants thermosensibles) qui bloque la progression à un stade spécifique de la division. Dans l'idéal, ces arrêts sont réversibles, de sorte que le retrait de la condition ayant provoqué l'arrêt permet la reprise du cycle cellulaire au stade suivant (Morgan, 2010).

Ces méthodes posent deux problèmes :

- Tout d'abord, l'avancée dans le cycle cellulaire n'a jamais lieu à la même vitesse dans toutes les cellules de la population. Pour cette raison, le synchronisme de la progression dans le cycle cellulaire est rapidement perdu lorsqu'on lève le blocage (Morgan, 2010).
- Par ailleurs, des arrêts induits artificiellement tels que ceux produits par des mutations conditionnelles ou des inhibiteurs de la synthèse de l'ADN et de la fonction du fuseau, ne sont jamais équivalentes à l'état naturel d'une cellule passant par ce stade dans le cycle cellulaire (Morgan, 2010).

Donc, des méthodes non invasives sont préférables dans ce cas. Des informations utiles peuvent souvent être obtenues grâce à une analyse microscopique des cellules isolées dans une population asynchrone et non traitée (Morgan, 2010).

L'objectif dans cette étude est l'identification des protéines associés aux Cdk (Cdk1 et Cdk2) à l'entrée, progression et à la sortie de la phase M.

L'étude a été faite au sein de l'équipe « Cycle Cellulaire » à l'Institut de Génétique et Développement de Rennes, Dont les principaux axes sont de comprendre comment les protéines inhibitrices Cdc6 et p27Xic1 interagissent avec ces deux Cdk afin de les réguler au cours de la mitose embryonnaire chez *Xenopus laevis*.

I. Matériel et méthodes :

I.1 Modèle d'étude :

Les expériences sont réalisées sur des embryons de femelles *Xenopus laevis* qui proviennent de NASCO (Fort Atkinson, Wisconsin USA) et du CRB de Rennes. On a induit l'ovulation de l'xénope par injection de 500 unités d'hCG (hormone gonadotrope chorionique) dans leurs sacs lymphatiques dorsaux, cette manipulation est effectuée aux alentours de 16h30 de la veille de la manipulation.

Les xénopes sont mises individuellement dans des portes-xénopes pour toute la nuit à 21°C dans la solution de NaCl [110 mM]. Les œufs non fécondés (UFE ; Unfertilized eggs) récupérés sont bloqués en Métaphase II de la méiose.

I.2 Collecte d'œufs et activation :

La collecte des œufs est faite le matin, alors les œufs pondus pendant la nuit sont lavés par une solution de NaCl [110 mM] et ensuite par un tampon XB (KCl [0,1 mM], Hepes [10 mM], MgCl₂ [1 mM] ; PH 7,6) au quel du CaCl₂ [100 mM] est ajouté.

Les UFE sont mélangés avec du tampon XB + cystéine (2%) (PH 7,4) = pendant 5-8 minutes. Ils sont rincés avec les solutions NaCl [110 mM], puis d'XB. Les œufs sont ensuite laissés en repos pendant 5 minutes.

Les UFE subissent une activation parthénogénétique par l'ajout de l'ionophore calcique A23187 [0,5 µg/ml tampon XB] pendant 1 minute 30, puis des lavages multiples avec le tampon XB.

L'activation se traduit par une contraction corticale, suivie d'un changement d'orientation des œufs (pôle animale vers le haut et le pôle végétale vers le bas). Les embryons parthénogénétiques ainsi obtenus sont incubés à 21°C (Polystat ; Fscher Bioblock Scientific) pendant 1 heure afin de progresser dans le premier cycle cellulaire et de pouvoir étudier la première mitose embryonnaire.

I.3 Extrait acellulaire fonctionnel :

Après l'incubation à 21°C, les embryons sont transférés à 4°C dans des tubes Beckman avec adaptateurs. Ensuite, du tampon XB supplémenté de cytochalasine [2,5 g/L] et d'inhibiteurs de protéase (AEBSF [0,1 mM], aprotinine [10 g/L], pepstanine [5 g/L], leupeptine [10 g/L], chymostatine [10g/L]) est ajouté. Les embryons sont centrifugés une première fois à 4°C avec une vitesse de 750 rpm pour les tasser et éliminer le reste de tampon.

A l'aide d'une pince propre, on attrape le tube et on enlève l'excès XB, éventuellement les œufs lysés.

Ensuite, on subit une deuxième centrifugation pendant 14 minutes à 10000 g et à 4°C afin de séparer les lipides (couche supérieure), le cytoplasme (couche intermédiaire) et la couche inférieure composée de pigment, de plaquettes vitelline (Fig. 13).

Le cytoplasme (extrait acellulaire) est prélevé à l'aide d'une aiguille à travers la paroi du tube (Fig. 13) et est centrifugé pendant 12 minutes à 10000 g et à 4 °C pour le clarifier.



Fig. 13. L'extrait acellulaire fonctionnel. (1) les lipides, (2) le cytoplasme (3) pigment et plaquettes vitelline.

En parallèle, un tube d'épendof de 2,2 mL contenant des inhibiteurs de protéases (3,5µl cytochalasine, 3,5 µl AEBSF, 0,7 µl A.L.P Chymo) est préparé, l'extrait est introduit dans l'épendof et est mélangé doucement. L'épendof est ensuite centrifugé par une centrifugeuse de paillasse à une vitesse de 10000 rpm à 4°C pendant 12 minutes.

L'extrait est ensuite incubé dans un thermoplongeur à 21°C et 2 µl d'extrait sont prélevés toutes les 4 min de t=0 à t=80 min afin d'étudier la première mitose embryonnaire. Les extraits sont destinés au Western Blotting.

I.4 Electrophorèse, anticorps et Western Blot :

- **Préparation des gels :**

Les gels préparés sont de polyacrylamide de 8% en présence de SDS (SDS-Page), pour cela, on prépare deux gels de séparation (1,6 mL Acryl/Bis 29 :1 [40%], 2mL LGB [4X], 4,4 mL H₂O, 80 µL Ammo Pers [10%], 8 µL Temed) que seront mis à l'aide d'une pipette dans la partie inférieure de la plaque et deux gels de concentration de 5% (0,5 mL Acryl/Bis 29 :1 [40%], 0,8 mL UGB [4X], 2 mL H₂O, 30 µL Ammo Pers [10%], 3 µL Temed) que seront mis dans la partie supérieure de la plaque (pour préparer deux plaques de migration).

Une fois les gels de concentration sont versés on met un peigne en plastique dedans pour créer les puits des dépôts pour nos échantillons. On doit laisser les gels pendant environ ½ heure pour se gélifier, pour cela une petite quantité des deux gels qui reste dans les tubes où on les a préparé peut servir comme un témoin (le gel sous le peigne polymérise plus vite que le gel dans le tube à cause d'absence de l'air).

- **Dépôt des échantillons :**

D'abord, un tampon de migration est préparé (Tris base [25 mM], Glycine [292 mM] et SDS 1%). Après que les gels sont complètement gélifiés, les deux gels (entre les plaques de verre) sont mis dans une cuve BIO RAD MINI PROTEAN II™ et le tampon de migration est versé

dans la cuve jusque à atteindre le niveau maximale de toutes les deux plaques.

Les échantillons sont préparés (13 μ L Laemmli [4X], 2 μ L de l'extrait) dans chaque tube d'épendrof notés respectivement de t=0 jusqu'à t=56. Les échantillons sont mis à dénaturer à une température égale à 95°C pendant 5 minutes.

À l'aide d'une pipette, les échantillons sont déposés, le premier puits de chaque plaque contient un marqueur de poids moléculaire (coloré). Tout les puits doivent contenir le même volume des échantillons pour que la quantité des protéines soit égale dans tous les échantillons à analyser et que la migration soit équilibrée.

La cuve est ensuite fermée et les protéines des échantillons sont mises à une migration dans les gels à 200 V, 18 mA pour une heure de temps jusqu'à que les dépôts atteignent le bord inférieur de la lame et sortent du gel.

Les conditions sont toujours à 4°C, donc les échantillons doivent rester dans la glace tout le temps des manipulations.

- **Transfert sur membrane de nitrocellulose :**

Après 1 heure du temps et lorsque les dépôts sont migrés jusqu'à qu'ils sortent du bord de la lame en verre, on arrête le générateur, on récupère les deux lames et on élimine le gel de concentration.

On récupère notre gel de séparation contenant les protéines séparées et grâce à un nouvel appareil amélioré par BIO RAD (*Trans-Blot® Turbo™*), le transfert se fait dans 7 minutes.

A l'aide d'une pince, on récupère notre gel et on le dépose sur la membrane de nitrocellulose, la membrane est ensuite couverte pour former un « sandwich » (papier whatman, membrane, gel et Mousse) et mise dans la cassette qui sera mise dans l'appareil *Trans-Blot® Turbo™* pendant 7 minutes à 2,5 A et 25 V.

- **Lavage des membranes :**

Après le transfert, les membranes sont introduites dans une boîte (la face au contact du gel sur le dessus) et sont colorées par le rouge ponceau et sont mises sous agitation pour quelques minutes.

Puis, les membranes sont colorées par le rouge ponceau et se sont agitées pour quelques minutes afin de fixer les protéines transférées sur la membrane. Les membranes sont lavées après trois fois par PBS pour éliminer l'excès du rouge ponceau.

- **Incubation des membranes avec les anticorps :**

Les membranes sont ensuite décolorées à l'eau distillée et sont incubées avec un anticorps primaire dilué dans du PBST en présence de BSA 3% et d'azide de sodium ($1/10000^{\text{e}}$) pendant 1 heure 30 minutes à température ambiante ou toute une nuit à 4°C .

Différents anticorps ont été utilisés : anti-Cdk1, anti-PSTAIR (qui reconnaît les deux protéines Cdk : Cdk1 et Cdk2), anti-Cdc27, anti-Mcm4, anti-Cdc6, anti-p27Xic1, anti-cyclin A1 et anti-cyclin B2.

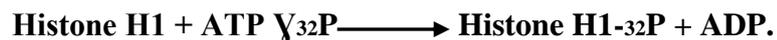
Ensuite, les membranes sont incubées pendant 1 heure avec un anticorps secondaire anti-IgG lapin ou anti-IgG souris couplé à la phosphatase alcaline qui est dilué au ($1/10000^{\text{e}}$) dans du tampon PBST et 5% de lait.

La révélation s'effectue grâce à l'émission de fluorescence de l'ECF à 540-560 nm obtenue par clivage de l'un de ses groupements phosphate par la phosphatase alcaline.

Les membranes sont digitalisées par un scanner (Storm Imager : Molecular Dynamics) et les résultats sont quantifiés par le logiciel ImageQuant.

I.5 Mesure de l'activité histone H1-Kinase (*in vitro*) :

18 μL de tampon « MPF » (β glycérophosphate [8 mM], fluorure de sodium [50 mM], EGTA [20 mM], Hepes [20 mM], MgCl_2 [15mM] et DTT [1mM]) sont ajoutés à 2 μL d'extraits mitotiques. 10 μL de ce mélange sont prélevés et sont ajoutés à 15 μL d'une solution composée d'histone H1 [10 μg], d'ATP froid [0,8 mM] et d'ATP $\gamma^{32}\text{P}$ [0,1 μCi , 6000 Ci/M]. La réaction suivante permettant de mesurer l'activité H1-kinase s'effectue par incubation de la solution à 30 °C pendant 30 minutes dans le même volume et avec la même quantité d'extrait et du tampon dans tous les échantillons :



La réaction est arrêtée par l'ajout de 5 μL de Laemmli. Ensuite, les échantillons sont déposés sur un gel SDS-PAGE 10%. Après migration, les gels sont fixés par un mélange éthanol 30% et acide acétique 10% dans l'eau.

Les membranes sont ensuite colorées par du bleu de Coomassie sous agitation pour quelques minutes. Puis, elles sont décolorées par lavage avec PBS (le colorant reste accroché aux protéines) afin de contrôler les quantités des protéines dans les gels.

Les gels sont séchés et exposés 12 heures sur un écran Phosphor-Imager qui est scanné par le Storm Imager. Les résultats obtenus sont quantifiés par le logiciel ImagQuant.

L'activité histone H1-Kinase de Cdk1 est mesurée par quantité d'ATP radioactif incorporée au sein de l'histone H1, visible dans le gel sous forme de double bande.

I.6 Précipitation avec les billes P9 :

Les billes p9 sont connus de précipiter les deux Cdk présentes dans l'extrait d'embryons de xénope, Cdk1 et Cdk2. Des billes p9 sépharose assortis et des billes de sépharose nues ont été pré-équilibrées pour la pré-compensation en tampon d'homogénéisation (MOPS [25 mM], pH 7,2, glycérophosphate [60 mM], EGTA [15 mM], MgCl_2 [15 mM], DTT [2 mM], NaF [1 mM] et ortho-vanadate de sodium [1 mM]) avec les inhibiteurs de la protéase et 1% de BSA pendant une nuit à 4°C.

Billes de sépharose nue (200 μ L par extrait de protéine) ont été incubés avec 20 μ L des extraits de protéines et agités pendant 2 h à 4° C. Après centrifugation (1300 \times g, 3 min, 4°C), les surnageants ont été mélangés à 200 μ L de billes ou de billes nues p9 (contrôle négatif) et agité pendant 2,5 h à 4° C.

Après centrifugation (1300 \times g, 3 min, 4° C), le surnageant (30 μ L) ont été recueillies pour Western blot (fraction non liée) et les billes p9 ont été lavées quatre fois avec 5 ml de tampon de lavage (Tris-HCl pH 7,4, NaF [5 mM], NaCl [250 mM], EDTA [5 mM], EGTA [5 mM], 0,1% de Nonidet P-40) avec les inhibiteurs de protéase.

Les protéines ont été éluées avec 150 μ L de Laemmli et chauffé à 85° C pendant 5 min et sont vortexés. Les échantillons sont mis à migration dans un gel polyacrilamides à 12% pour Western blotting.

1.7 Immuno-Précipitation de la Cdk1 : par Affi-Prep billes de protéine A

Cette précipitation permet de précipiter spécifiquement Cdk1 et pas Cdk2. Afin d'immuno-précipiter la Cdk1 à l'entrée, lors de la progression et à la sortie de la phase M, nous avons utilisé le même extrait acellulaire. Affi-Prep billes de protéine A ont été lavées trois fois avec du TBS-Triton X100 (50 mM Tris-HCl, NaCl 150 mM, 0,01% de Triton X100, pH 7,5).

Les billes ont ensuite été pré-équilibrées avec anticorps polyclonaux de lapin dirigé contre XlCdk1 peptide C-terminal. Puis, elles sont laissées une nuit à 4°C dans du TBS-Triton X100, additionné d'inhibiteurs de protéases et ortho-vanadate de sodium. Nous avons choisi cet anticorps, car il a déjà été utilisé avec succès pour immuno-précipiter spécifiquement Cdk1 de *Xenopus laevis* ovocytes (Krasinska et al., 2008).

Le deuxième jour, Les extraits protéiques ont été centrifugés à 10000 g pendant 15 min à 4° C. Les volumes d'extraits protéiques ont été ajustées à 2 mL avec le tampon IP contenant des inhibiteurs de protéase, et un aliquote de 15 μ L ont été recueillies pour l'analyse par Western blot.

Après trois brefs lavages avec le tampon IP (200 μ L par extrait de protéine), les billes ont été incubées avec des extraits de protéines et le mélange a été agité pendant 2 h à 4°C au pré-clair de l'extrait.

Le mélange des extraits d'œufs a été ensuite centrifugé à 4000 rpm, 3 min, 4° C. Les surnageants ont été mélangés avec 100 μ L de billes nues pour le contrôle négatif IP ou d'Affi-prep protéine A réticulés avec des anti-Cdk1. (diméthyl pimelimidate dichlorhydrate a été utilisé comme agent de réticulation).

Le mélange est préalablement lavé deux fois avec un tampon d'homogénéisation et on agite pendant 2 heures 50 minutes à 4° C.

Après centrifugation (1300 \times g, 3 min, 4° C), les surnageants ont été conservés pour le deuxième tour. Les culots ont été lavés trois fois avec 1,5 ml de TBS-Triton.

Les protéines ont été éluées billes en utilisant 100 μ L de glycine [100 mM], pH 2,0. Les protéines éluées ont été congelées à -20° C et les billes ont été éluées pour la deuxième fois à la glycine et lavées trois fois par TBS-TritonX100 et deux fois avec un tampon IP.

La ronde supplémentaire a été réalisée comme décrit précédemment par incubation du surnageant de la première ronde avec les billes. On a ajouté 40 μ L de Laemmli et une goutte de 1 M Tris-HCl, pH 9,2 aux protéines éluées.

Les échantillons ont été chauffés à 85° C pendant 5 minutes, vortexés, centrifugés puis, analysés par Western blot. Différents anticorps ont été utilisés : anti-Cdk1, anti-Cdk2, anti-p27Xic1 et anti-Cdc6.

II. Résultats :

Après la réalisation de l'extrait acellulaire, nous avons appliqué deux approches différentes pour identifier les protéines liées au deux Cdk présentes dans l'extrait, la Cdk1 et Cdk2.

- La première approche est basée sur la précipitation des Cdk via billes p9.
- La seconde est une immuno-précipitation classique de la Cdk1 (et pas Cdk2) en utilisant un anticorps spécifiques anti-Cdk1.

Cette analyse a été utilisé pour identifier les protéines associés aux Cdk à l'entrée, progression et à la sortie de la phase M, lorsque la kinase est en train d'être activée, pleinement active, et au cours de son inactivation. Les expériences ont été répétées plusieurs fois pour établir la méthode.

- **Détection de la mitose :**

L'Activation des œufs a été vérifiée par la suivi de l'état de phosphorylation de MCM4 et de la Cdc27 par immuno-blot d'extraits d'œufs prélevés à 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 minutes d'incubation à 21°C (Fig. 14).

On a observé une phosphorylation de la Cdc27 et de la MCM4 (tous les deux sont des substrats directs de la kinase Cdk1) à 24 et 28 minutes après le début de l'incubation qui se manifeste après électrophorèse SDS-PAGE par l'apparition d'une bande de migration lente (la forme phosphorylée de la protéine) (Fig. 14).

Ceci signale l'activation de la kinase Cdk1 et l'entrée de l'extrait en phase M. Après 28 minutes de l'incubation, les protéines Cdc27 et MCM sont déphosphorylées (retournant à l'état initial d'une bande de migration rapide).

Pour renforcer les résultats obtenus avec la Cdc27 et MCM4, nous avons visualisé la Cycline A1 et la Cycline B2 par Western blot dans le même extrait.

Les résultats obtenus montrent la présence des deux Cyclines A1 et B2 de t=0 minutes jusqu'à t=28 minutes (Fig. 14). La disparition de ces protéines après 28 min d'incubation s'explique par la dégradation de la cycline B2 et de la cycline A1 à la sortie de la phase M par la voie de protéolyse (M.Sullivan et al., 2007).

- **L'activité histone H-1 kinase :**

L'activité histone H1-Kinase, qui reflète l'activité de Cdk1, est mesurée par la quantité d'ATP radioactif incorporée au sein de l'histone H1 lors de la réaction conduite *in vitro*, visible dans le gel sous forme d'une double bande. Ce test montre aussi une phosphorylation importante de l'histone H1 à t=24 minutes, assurant les résultats obtenus avec MCM4, Cdc27, Cycline A1 et la Cycline B2 (Fig. 14).

La courbe au dessous montre l'activité kinasique Histone H1 qui monte à son maximum à l'entrée en phase M à t=24 minutes, puis elle est diminuée lors de la sortie de la phase M t=28 minutes et elle revient à son niveau basal après.

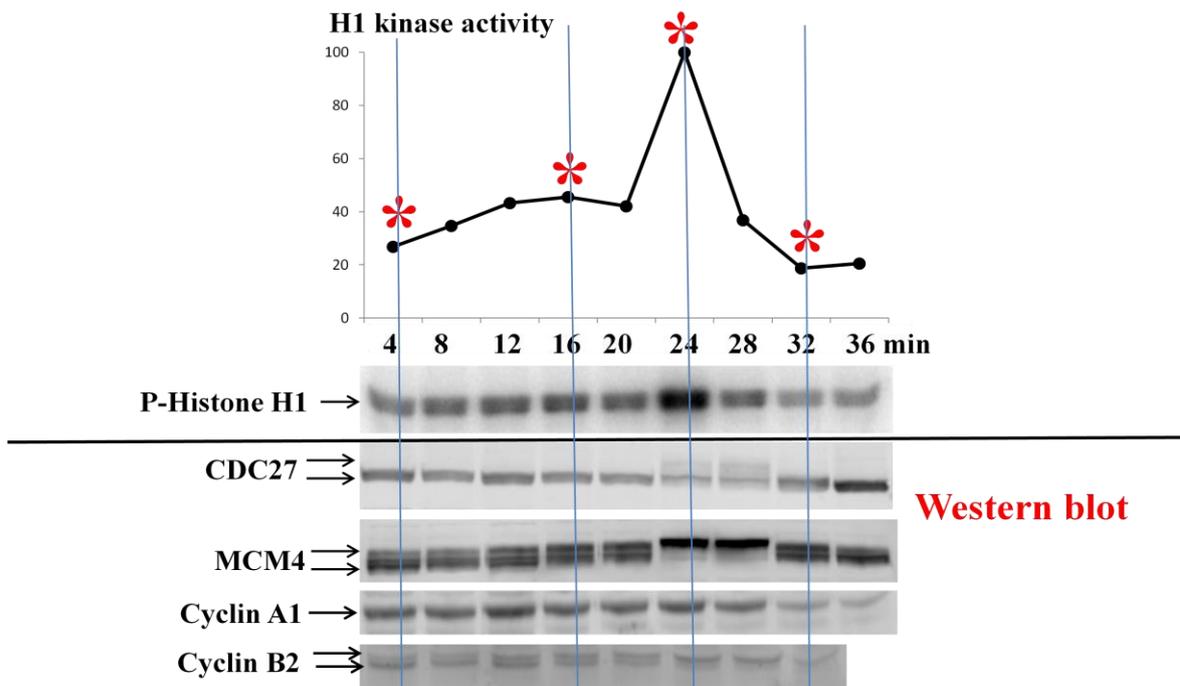


Fig. 14 : Détection de la mitose. Le profil de l'activité histone H1 kinase correspond au profil électrophorétique obtenu après une SDS-PAGE des extraits acellulaires blottés avec la Cdc27, MCM4, Cycline A1 et Cycline B2. Les quatre étoiles en rouge montrent les échantillons d'extrait qui seront ensuite utilisés pour les précipitations avec les billes de p9 et immuno-précipités avec anti-Cdk1.

- **Les inhibiteurs Cdc6 et p27Xic1 sont associés avec Cdk1/Cdk2 :**

Les billes p9 qui ont une forte affinité pour les Cdk. Elles accrochent donc Cdk1 et une autre Cdk présente en petite quantité dans l'extrait, la Cdk2. Ces billes accrochent aussi les protéines qui sont associées avec les deux Cdk, comme Cdc6 (Marteil et al., 2012).

Alors, le blot Anti-Cdc6 de la précipitation p9 confirme que la protéine Cdc6 est présente sur les billes, donc associée au Cdk. On remarque que la quantité de Cdc6 est stable entre 4 et 16 minutes et elle diminue significativement à $t=24$ minutes (phase M) pour revenir au niveau élevé après ($t=32$ minutes) (Fig. 15, flèche Cdc6).

Parallèlement, la précipitation p9 analysée avec l'anticorps-anti PSTAIR (qui réagit avec Cdk1 et Cdk2) montre la présence importante et stable de Cdk1 ainsi que les résidus de Cdk2 tout au long de l'expérience, avant, pendant et après la phase M (Fig. 15, flèches Cdk1 et Cdk2).

La précipitation p9 montre que la Cycline B2 et la Cycline A1 associées au Cdk1 et Cdk2 sont toutes les deux présentes avant et pendant la phase M ($t=4$ min jusqu'à $t=24$ min).

Puis, les cyclines A1 et B2 sont dégradées après la mitose et les quantités de Cdk sont toujours stables (Fig. 15, flèches Cycline A1 et Cycline B2).

La précipitation p9 révélée par Western blot avec Anti-p27Xic1, qui est connu comme un inhibiteur de Cdk1 durant la phase S du cycle cellulaire (Arnaud Besson et al., 2008) montre l'association de ce dernier avec les Cdk précipitées par p9 avant et après la phase M ($t=4$ min, $t=16$ min et $t=32$ min).

Alors que pendant la phase M ($t=24$ min) la p27Xic1 est presque complètement absente, donc dissociée de Cdk (Fig. 15, flèche p27Xic1).

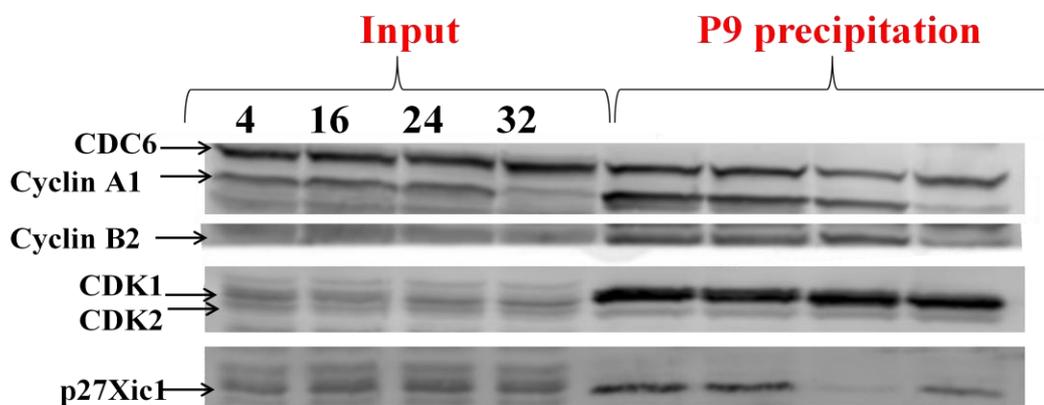


Fig. 15. Précipitation P9 : Le profil électrophorétique obtenu après une précipitation avec billes p9 avec anti-Cdc6, anti-Cdk1, anti-Cdk2, anti-Cycline A1, anti- Cycline B2 et anti-p27Xic1.

Le « Input » est l'extrait utilisé pour la précipitation donnée. C'est un contrôle de ce qui est dans l'extrait au départ. On voit dedans par Western blot combien il y avait de la protéine d'intérêt (par exemple de la Cdc6 ou de Cdk1). Après la précipitation on voit combien de la protéine (par exemple Cdc6) est associé avec les Cdk1 et Cdk2 que nous avons précipité (Fig. 15, Input).

La quantité de Cdc6 dans « Input » est stable. Mais, après la précipitation avec les billes p9 on voit que les quantités respectives de Cdk1 et de Cdk2 sont égales mais les quantités de Cdc6 ne sont pas (moins dans l'échantillon mitotique).

Ceci montre que malgré la présence égale de Cdc6 dans tous les échantillons de « Input », il y a moins de Cdc6 associée avec les Cdk lors de la phase M (Fig. 15, Input).

- **Immuno-Précipitation de la Cdk1 : par billes Affi-Prep de protéine A couplés à l'anticorps anti-Cdk1 :**

Le but de cette expérience était d'analyser si les protéines Cdc6 et p27Xic1 sont associées à la Cdk1 ou bien à la Cdk2, car l'anticorps anti-Cdk1 précipite spécifiquement que la Cdk1 (avec les protéines associées) et pas Cdk2.

De plus, l'utilisation de cette méthode « Cross-linking » d'anticorps avec les billes a permis de se débarrasser des immunoglobulines lors de l'analyse de résultats par Western blot (Gent et al., 2001).

Cette méthode a bien permis de précipiter la protéine Cdk1 mais pour une raison inconnus nous avons moins de cette protéine dans les points de 16 et de 24 min pendant que les quantités de Cdk1 ne change pas au cours de cette période (Fig. 16). Ceci est visible sur le Western blot de gauche, dans le « Input ».

Il est probable que nous avons perdu un peu de matériel immuno-précipité lors de cette manipulation aux points de 16 et de 24 min (Fig. 16). Il faut donc refaire cette manipulation pour avoir les résultats probants.

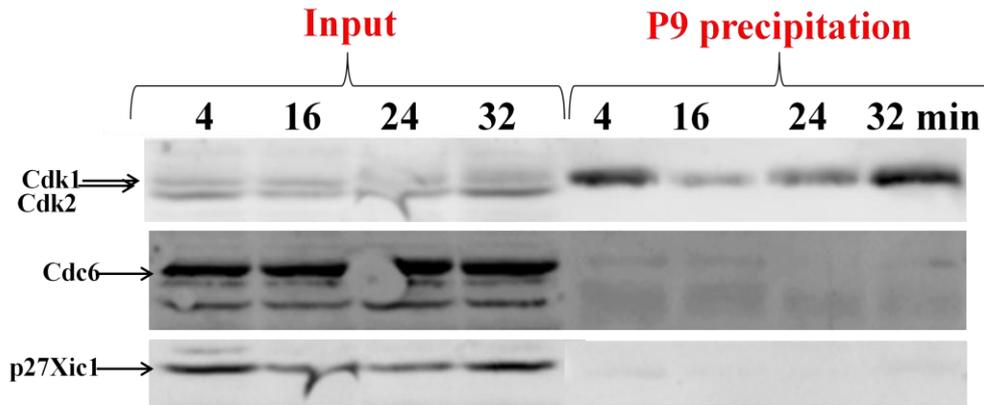


Fig. 16 : Immuno-précipitation de la Cdk1 avec anti-Cdk1 et l'association de cette protéine avec Cdc6 et p27Xic1.

Cependant, l'analyse par Western blot de la présence des protéines Cdc6 et de p27Xic1 dans les mêmes échantillons de protéines immuno-précipitées conduit aux conclusions suivantes :

1. La quantité de Cdc6 immuno-précipitée avec Cdk1 est très faible par rapport à la quantité précipitée par les billes p9 qui précipitent les deux protéines Cdk1 et Cdk2 et les protéines associées avec eux. Ceci peut suggérer que la majorité de la protéine Cdc6 et de p27Xic1 est associée avec la protéine Cdk2 et pas avec Cdk1. Cependant, les quantités plus faibles de Cdc6 sont toujours détectables dans la précipitation de Cdk1 seule. Ceci confirme un certain niveau d'association Cdc6/Cdk1.

2. Malgré une faible présence détectée de Cdk1 à 16 min (lors de l'entrée en phase M) la bande de la protéine Cdc6 est bien visible dans le culot précipité (Fig. 16). Ceci pourra signifier que l'association de la protéine Cdc6 avec Cdk1 augmente spécifiquement lors de cette période de la phase M.

3. Malgré l'augmentation du signal provenant de la protéine Cdk1 à 24 min on ne trouve pas ni de Cdc6 ni de p27Xic1 associées (Fig. 16). Ceci permet de penser que la Cdk1 n'est pas associée avec ces protéines lors de la phase M, quand l'activité de Cdk1 est au maximum.

4. L'association de Cdc6 et de p27Xic1 avec Cdk1 est de nouveau détectable à 32 min, alors à la sortie de la phase M (Fig. 16).

L'ensemble des résultats de cette expérience et de l'expérience précédente avec les billes p9 suggère que Cdc6 et p27Xic1 sont associées surtout avec Cdk2 et en petite quantité avec Cdk1.

De plus, l'association de Cdc6 et de p27Xic1 avec Cdk1, même si elle est très faible, suit un pattern similaire qu'avec Cdk2 (Fig. 16).

La présence importante de ces protéines dans les culots obtenus par la précipitation avec les billes p9 (qui précipitent Cdk1 et Cdk2) et la faible présence dans les culots obtenus avec immuno-précipitation de Cdk1 suggère que la majorité de ces deux protéines est associée avec Cdk2 et pas avec Cdk1.

III. Discussion :

La régulation du cycle cellulaire comprend un réseau de plusieurs kinases et phosphatases. Cdk1 est une kinase importante nécessaire à la fois pour la phase S et de la progression de la phase M (Endicott et *al.*, 1994).

L'identification à la fin du XX siècle de la Cdk1 comme un régulateur majeur du cycle cellulaire a fait la connaissance de son propre règlement un sujet fascinant. L'utilisation de l'extrait acellulaire de *Xenopus laevis* a eu un impact important sur ces études (Endicott et *al.*, 1994).

La phosphorylation de MCM4 directement par Cdk1 est impliquée dans la régulation de la synthèse de l'ADN. Elle empêche la réplication de l'ADN lors de la phase M (Nguyen et *al.*, 2001). MCM4 fait partie d'une famille de protéines appelé MCM pour « Mini-Chromosome Maintenance » composée de six protéines apparentées qui sont conservés chez tous les eucaryotes (Susan et *al.*, 2004).

Nous avons détecté cette phosphorylation mitotique grâce au changement de migration électrophorétique de la protéine MCM4 phosphorylée par Western blot afin de l'utiliser comme marquer de la phase M.

D'autre part, nous avons utilisé la phosphorylation de Cdc27, aussi substrat directe de Cdk1, comme un marquer alternative de la phase M. Cdc27 fait partie de Anaphase Promoting Complexe/Cylosome . L'activité de cette ubiquitine ligase très complexe est contrôlée par la phosphorylation d'entre autres de la protéine Cdc27 (Zhang et *al.*, 2013).

- **Voie de l'inhibition de complexe Cdk1/cycline B2.**

Le complexe Cdk1/Cycline B2 est inactivé grâce à la séparation entre Cdk1 et la cycline B suivi par la dégradation protéolytique de cette dernière par la voie de UPS (Ubiquitine-Proteasome-System).

Le profil électrophorétique montré précédemment dans la figure 16 concernant le suivi de la cycline B2 nous confirme la détection de la mitose par Mcm4 et Cdc27, parce que cette protéine est aussi un marquer mitotique : elle est phosphorylée lors du début de la phase M et ainsi subit un changement de la migration électrophorétique dans le SDS-PAGE et ensuite elle est dégradée lors de la phase M.

Poly-ubiquitination procède via multiple tours de l'ubiquitination au cours

de laquelle l'extrémité COOH d'une nouvelle molécule d'ubiquitine forme une liaison iso-peptide avec le résidu de lysine de l'ubiquitine préalablement attachée au substrat. Ce processus est médié par trois enzymes agissant de manière séquentielle (E1, E2 et E3, le dernier étant une ubiquitine ligase) (Fig. 17).

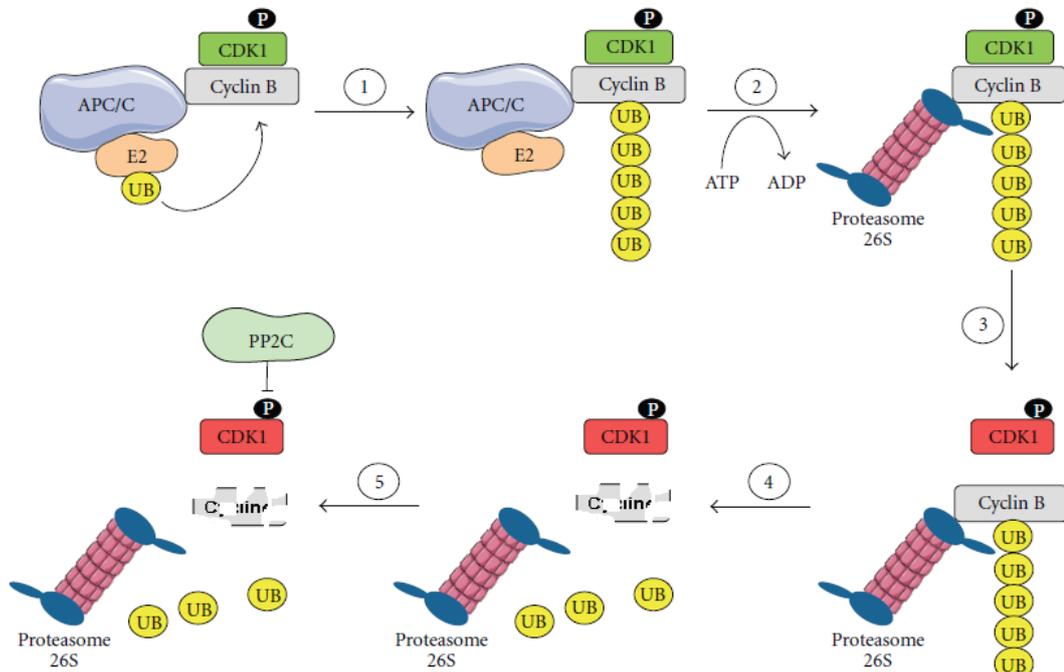


Fig. 17 : Voie de l'inhibition de complexe Cdk1/cycline B. le complexe APC en association avec l'enzyme E2 fixe une chaîne d'ubiquitines sur la cycline B2, ceci dirige le complexe entier au protéasome et ensuite entraîne la dissociation de la cycline B2 de Cdk1 engendrant la dégradation de la cycline B2 par voie la de protéolyse (Kubiak et El Dika, 2011).

- **L'histone H1 est un substrat de Cdk1.**

Grâce au test *in vitro* de l'histone H1 Kinase, on a pu mesurer l'intensité du transfert d'un phosphate marqué ATP γ ³²P a un receveur Histone H1. Nous avons utilisé ce test afin de mesurer l'activité du complexe Cdk1/cycline B2. En effet, cette kinase est responsable de la majorité de l'activité histone H1 kinase dans l'extrait acellulaire mitotique (Arion D et *al.*, 1988).

L'analyse de la phosphorylation de MCM4, Cdc27, de la cycline B ainsi que la mesure de histone H1 kinase a permis de distinguer différents phases de la phase M avec précision. Ceci a été nécessaire afin d'étudier la dynamique

de l'association des protéines régulateurs potentielles de Cdk1, à savoir Cdc6 et p27Xic1, dans la partie suivante de notre étude.

- **La quantité de Cdc6 associée à Cdk diminue durant la phase M.**

Cdc6 est connu comme un facteur clef du complexe de pré-réplication en phase S, son rôle est de permettre le chargement du complexe MCM sur la chromatine, en association avec le complexe ORC. Outre son rôle essentiel dans la réplication de l'ADN, il a été démontré que la sur-expression de Cdc6 entraîne un retard de la phase M et un allongement de la phase G2 (Anger *et al.*, 2005).

De plus, l'équipe Cycle Cellulaire a trouvé que Cdc6 s'associe avec Cdk1 lors de la phase M (Marteil *et al.*, 2012). Ce facteur aurait potentiellement un rôle inhibiteur, direct ou indirect, sur le complexe Cdk1/Cycline B2. Cette inhibition du MPF pourrait également avoir lieu en fin de mitose et ainsi favoriser la sortie de phase M (Archambault *et al.*, 2003).

Dans notre étude on a précipité les Cdk et les protéines qui sont associées avec via les billes de p9 qui ont une forte affinité aux Cdk1 et Cdk2. Cdk2 est une protéine minoritaire très semblable, mais pas identique, à Cdk1. Son rôle dans le déroulement de la phase M est très peu connu.

Nous montrons que Cdc6 co-précipite avec les billes p9, donc avec ces deux Cdk. La diminution significative de la Cdc6 durant la phase M nous a permis de penser que Cdc6 interagit avec un ou les deux Cdk précipitées essentiellement avant et après la phase M en inhibant cette/ces Cdk. Selon cette hypothèse, l'association Cdk/Cdc6 diminue, mais est toujours détectable, lors de la phase M permettant l'activation totale de cette/ces kinase/s.

Cette situation permettrait une progression en phase M, pendant laquelle l'activité de Cdk1 est requise (Fig. 18, a). Cependant, comme les billes p9 ont une affinité pour les Cdk1 et Cdk2, on ne peut pas affirmer avec laquelle de ces deux kinases, ou avec les deux, Cdc6 peut être associée (Fig. 18, b).

De plus, afin de tester la possibilité que Cdc6 ne soit pas l'inhibiteur directe de Cdk, nous avons analysé le culot de précipitation avec les billes p9 par Western blot pour la présence d'un inhibiteur connu de Cdk, à savoir, la protéine p27Xic1.

L'association de p27Xic1 avec les Cdk précipitées suit celle de Cdc6. De plus, la diminution de l'association Cdk/p27Xic1 lors de la phase M est encore plus accentuée que l'association Cdk/Cdc6. Ceci suggère que p27Xic1 et pas Cdc6 pourra être le vrai inhibiteur de Cdk et Cdc6 pourrait servir dans cette association comme un intermédiaire.

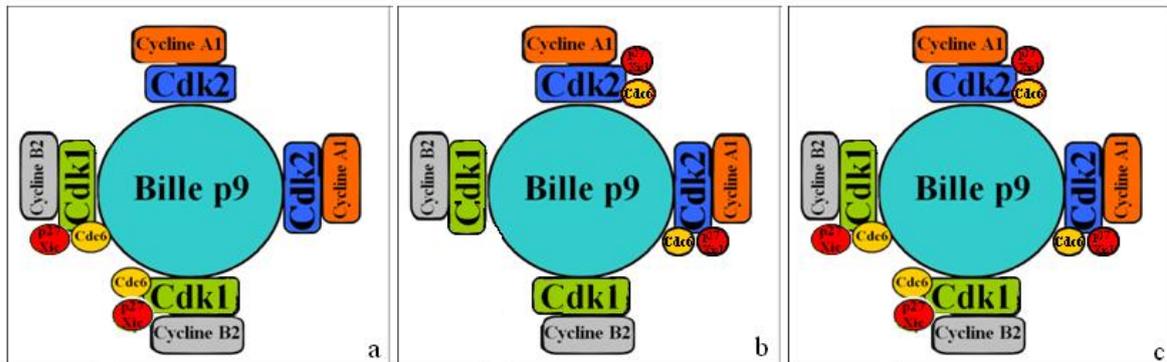


Fig. 18 : Précipitation avec Billes p9. La figure montre les possibilités de la précipitation via billes p9, les inhibiteurs Cdc6 (jaune) et p27Xic1 (rouge) peuvent être associés avec Cdk1 (a) ou bien avec Cdk2 (b) ou avec les deux Cdk en même temps (c).

- **Les protéines Cdc6 et p27Xic1 sont majoritairement associés avec Cdk2 mais pas avec Cdk1.**

Afin de démontrer si Cdc6 et p27Xic1 interagissent plutôt avec Cdk1 ou Cdk2 on a réalisé une immuno-précipitation spécifique de la Cdk1 (et pas de Cdk2) grâce aux anticorps couplés sur les billes Affi-Prep protéine A. La technique de « cross-linking » des anticorps avec les billes utilisée ici a comme avantage qu'elle élimine les IgG des gels d'électrophorèse qui peuvent empêcher la détection de certaines protéines.

Nous avons détecté très peu de Cdc6 et pas du tout de p27Xic1 dans le culot contenant Cdk1 et pas Cdk2. Ce contraste avec l'expérience de précipitation avec les billes p9 suggère fortement que Cdc6 et p27Xic1 sont majoritairement associées à Cdk2 et pas à Cdk1. Ceci a été surprenant pour nous car l'association Cdk1/Cdc6 a été démontée auparavant par la spectrométrie de masse (Marteil et *al.* 2012).

Il semble donc que Cdc6 s'associe majoritairement avec Cdk2 mais elle s'associe aussi avec Cdk1 en plus petite proportion. Afin de vérifier

cette hypothèse Jacek Kubiak et ses collaborateurs vont précipiter Cdk2 et analyser l'association potentielle entre cette kinase et Cdc6 ainsi que p27Xic1.

Il faut aussi refaire l'expérience de précipitation de Cdk1 parce il y avait des petites pertes de protéines immuno-précipitées (diminution de la quantité de Cdk1 précipitée lors de la phase M) probablement à cause d'erreurs de manipulations.

L'ensemble des résultats obtenus suggère que Cdc6 et p27Xic1 sont associées avec Cdk2 et Cdk1 :

- La majorité de Cdc6 semble associée avec Cdk2 et en petite quantité avec Cdk1.
- De plus, l'association de Cdc6 et de p27Xic1 avec Cdk1, même si elle est très faible, suit un pattern similaire qu'avec Cdk2.
 - ❖ Ceci suggère que les deux, Cdk2 et Cdk1 peuvent être inhibés par le même couple Cdc6/p27Xic1 mais avec une efficacité différente. Selon cette hypothèse l'inhibition de Cdk2 serait plus forte que celle de Cdk1.
 - ❖ Les relations entre Cdk2, Cdk1 et Cdc6 et p27Xic1 lors de la progression de la phase M ont été entièrement inconnus auparavant. Ceci nécessite encore une immuno-précipitation de la Cdk2 pour comprendre comment ces deux inhibiteurs interagissent avec cette Cdk.

Conclusion et perspectives :

Afin de comprendre le mécanisme de la régulation de la phase mitotique du cycle cellulaire, nous avons effectué des travaux qui sont basés sur la précipitation des deux Cdk (Cdk1 et Cdk2) présentes dans les embryons d'*Xenopus laevis* et les protéines qui sont associées avec : Cdc6 et p27Xic1 (ainsi que les cyclines B2 et A1 bien connues comme partenaires de ces kinases). Cdc6 et p27Xic1 sont des protéines connues comme des inhibiteurs potentiels de Cdk. L'analyse de la précipitation des deux Cdk et d'une seule, la Cdk1, nous indique que ces deux inhibiteurs sont associés majoritairement avec la Cdk2 et en proportion moins importante avec la Cdk1.

Les résultats obtenus ouvrent une nouvelle hypothèse qui suggère que les deux inhibiteurs Cdc6 et p27Xic1 interagissent avec les deux Cdk (Cdk1 et Cdk2) pour inhiber ces kinases, mais avec une efficacité plus forte pour Cdk2. Ceci révèle d'une façon les relations entre Cdk2, Cdk1, Cdc6 et p27Xic1 lors de la progression de la phase M, qui est jusqu'à présent entièrement inconnue.

Les défauts du contrôle du cycle cellulaire sont très fréquemment associés aux cancers et les protéines qui régulent la progression du cycle cellulaire sont d'excellentes cibles pour la mise au point de drogues anti-cancéreuses. Donc, lorsqu'on arrivera à comprendre les mécanismes de contrôle des Cdk et comprendre comment une dérégulation de ces contrôles peut participer à la carcinogenèse, il sera possible de passer à la fabrication des molécules bio-actives capables d'arrêter la multiplication des cellules cancéreuses.

Références bibliographiques :

- Ängeby K.A.K, Alvarado Galvez C, Pineda-Gurcia L. (2000). Improved sputum microscopy for a more sensitive diagnosis of pulmonary tuberculosis Technical note. *Int. j. tuberc. Lung. dis.* 11 (4): 684-687.
- Arion D, Meijer L, Brizuela L, Beach D. (1988). cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* 55(2):371-8.
- Bettina Khan, Inna Pereverzeva, Elizabeth Whitmire, Martine Coué. (2000). Distinct Phosphoisoforms of the Xenopus Mcm4 Protein Regulate the Function of the Mcm Complex. *Mol. Cell. Biol.* 20 (10): 3667–3676.
- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. (2008). *Moléculaire biology of the cell*, 5th edition. Garland Science Taylor, Francis Group. United States of America.
- Cheryl Tickle, Wolpert Lewis. (2002). *Principles of development*. 2nd edition. Oxford University Press. Oxford.
- Chunmin Wei, Yanni Teng, Benjie Wang, Xiumei Zhang, Guiyan Yuan, Xiaoyan Liu, Rong Li, Ruichen Guo. (2011). Separation and identification of norcantharidin metabolites in vivo by GC–MS method. *Jour. Chro. B.* 879 (20): 1741-1747.
- Elaine Marieb. (2008). *Biologie humaine : Principes d'anatomie et de physiologie*, 8^{ème} édition. Pearson College Division. France.
- Er-Bin Yang, Wen-Ying Tang, Kai Zhang, Li-Yao Cheng, Peter O.P Mack. (1997). Norcantharidin inhibits growth of human HepG2 cell-transplanted tumor in nude mice and prolongs host survival. *Cancer Letters.* 117 (1): 93-98.
- Everardo Macias. (2007). *The Role of CDKs in Normal and Neoplastic Proliferation*. ProQuest. United States of America.
- F Jílek, R Hüttelová, J Petr, M Holubová, J Rozinek. (2000). Activation of pig oocytes using calcium ionophore: effect of protein synthesis inhibitor cycloheximide. *Animal Reproduction Science.* 63 (2): 101-111.
- F. Bazile, A. Pascal, A. Karaiskou, F. Chesnel, and J. Z. Kubiak. (2007). Absence of reciprocal feedback between MPF and ERK2 MAP kinase in mitotic *Xenopus laevis* embryo cell-free extract. *Cell Cycle.* 6 (4): 489–496.

- Gaëlle Marteil. (2010). Etude des mécanismes de régulation de l'entrée et de la sortie de phase M dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. Thèse de doctorat. Université de Rennes1.
- Geoffrey M. Cooper. (1999). La cellule: Une approche moléculaire. De Boeck Supérieur. Bruxelles.
- Gérald Karp. (2004). Biologie cellulaire & moléculaire. De Boeck Supérieur.
- Glotzer M., Murray, Kirschner. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 349,132-138.
- Jacek Z. Kubiak, Mohammed El Dika. (2011). Canonical and Alternative Pathways in Cyclin-Dependent Kinase 1/Cyclin B Inactivation upon M-Phase Exit in *Xenopus Laevis* Cell-Free Extracts. *Enzyme Research*. 11 (1): 8.
- Jean-Louis Dufays, Ghislain Carlier, Myriam De Kesel, Bernadette Wiame. (2013). Progression et transversalité Comment (mieux) articuler les apprentissages dans les disciplines scolaires. Presses univ. de Louvain. Belgique.
- Kyuwon Baek, Raymond S. Brown, Gabriel Birrane, John A. A. Ladias. (2007). Crystal Structure of Human Cyclin K, a Positive Regulator of Cyclin-dependent Kinase 9. *Jour. Mol. Biol.* 366 (2): 563-573.
- M. Sullivan and D. O. Morgan. (2007). Finishing mitosis, one step at a time. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 8 (11): 894–903.
- Marc Maillet. (2006). Biologie cellulaire PCEM1. Elsevier Masson. Paris.
- Masui Y, C. L. Markert C. L. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Jour. Exper. Zool.* 177 (2): 129–145.
- Morgan David. (2010). Cell cycle: principes of Control. De Boeck Supérieur.
- Philipp Kaldis. (2003). The CDK-Activating Kinase (CAK). Springer. New York.
- Scott F. Gilbert. (2004). Biologie du développement. De Boeck Supérieur. Paris.
- Sherr, C. J. & Roberts, J.M. (2004). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512.
- Simon Galas, Simon Descamps, Anne-Maire Martinez. (2008). Le Cycle Cellulaire. De Boeck. France.
- Sophie Dupont. (2007). L'anatomie et la physiologie pour les infirmier(e)s. Elsevier Masson. France.
- Susan L. Forsburg. (2004). Replication Initiation Eukaryotic MCM Proteins: *Beyond*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 (1): 109-131

- Vincent Archambault, Emmanuel J Chang, Benjamin J Drapkin, Frederick R Cross, Brian T Chait, Michael P Rout. (2003). *Targeted Proteomic Study of the Cyclin-Cdk Module*. *Mol. Cell*. 14(6): 699–711.
- Wang J, Chenivesse X, Henglein B, Brechot C. (1990). Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepato-cellular carcinoma. *Nature*. 343, 555-557.
- Welchman R. Luther, Gordon Carl, Mayer Ryan. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 6 (8): 599–609.
- Zhang Z, Yang J, Kong EH, Chao WC, Morris EP, da Fonseca PC, Barford D. (2013). Recombinant expression, reconstitution and structure of human anaphase-promoting complex (APC/C). *Biochem J.* (2): 365-71.

Glossaire :

Anticorps : un anticorps est Substance spécialisée produite par l'organisme qui procure l'immunité contre un antigène spécifique.

Cell-division cycle 25 (Cdc25) : une protéine phosphatase qui active les kinases cycline-dépendantes en retirant un phosphate de résidus spécifiques présents dans le site actif des Cdk (Tyr 15 dans la plupart des Cdk, également Thr 14 chez les animaux).

Chromosomes : Bâtonnet composé de chromatine enroulée ; visible au cours de la division cellulaire.

Cycloheximide : un antifongique qui bloque la synthèse protéique chez les cellules eucaryotes. C'est un inhibiteur à la fois de la phase d'initiation et d'élongation dans la synthèse protéique. Vu son haut niveau de toxicité chez l'humain, il n'est pas utilisé comme antibiotique.

Cytocinèse : division cellulaire. Le processus qui se déroule en fin de phase M par lequel les noyaux dupliqués et les composants cytoplasmiques sont répartis entre deux cellules filles par division de la cellule mère.

Cytoplasme : Tout le matériau compris dans une cellule, à l'exception de celui du noyau.

Cytosol : Un des éléments du cytoplasme ; liquide translucide dans lequel les autres éléments cellulaires se trouvent en suspension.

Cytosquelette : Réseau complexe de structures protéïniques qui s'étend dans le cytosol ; «squelette» et « musculature » de la cellule.

Division cellulaire : Période du cycle cellulaire pendant laquelle la cellule se reproduit ; comprend la mitose et la cytokinèse.

Electrophorèse : est la principale des techniques utilisées en biologie pour la séparation et la caractérisation des molécules, principalement utilisée en biochimie ou biologie moléculaire pour la séparation des protéïnes ou des acides nucléïques.

Enzyme : Protéïne fonctionnelle formée par les cellules vivantes qui joue le rôle de catalyseur dans les réactions chimiques de l'organisme.

Gonadotrope chorionique (hCG) : est une hormone glycoprotéïque produite au cours de la grossesse, fabriquée par l'embryon peu de temps après la conception et plus tard

par le trophoblaste (partie du placenta). Il n'existe des gonadotropines chorioniques que chez les primates (chez l'espèce humaine, il s'agit de la hCG – human chorionic gonadotropin)

G0 : l'état prolongé de non-division qui est atteint depuis la phase G1 lorsque les cellules sont exposées à des conditions extracellulaires nécessitant un arrêt de leur prolifération.

G1 : la phase d'intervalle entre les phases M et S.

G2 : la phase d'intervalle entre les phases S et M.

Kinase activatrice des Cdk (CAK) : une protéine kinase qui active les kinases cyclines-dépendantes en phosphorylant un résidu thréonine (Thr 160 dans la Cdk2 humaine) situé dans la boucle T.

Interphase : la période entre la fin d'une phase M et le début de la suivante.

Lysosome : Organites issus du complexe golgien qui renferment de puissantes enzymes digestives.

Lysozyme : Enzyme présente dans la sueur, la salive et les larmes ; peut détruire certaines bactéries.

Mitose : la division nucléaire, processus qui se déroule en début de phase M pour lequel les chromosomes dupliqués ségrégent le long du fuseau mitotique et sont empaquetés dans les noyaux des cellules filles.

Mitochondries : Organites cytoplasmiques en forme de bâtonnets responsables de la production d'ATP.

Mitose : Division du noyau de la cellule ; est souvent suivie de la division du cytoplasme de la cellule.

Métabolisme : Une des fonctions vitales ; ensemble des réactions chimiques qui ont lieu dans les cellules de l'organisme.

Micro filaments : Un des éléments du cytosquelette qui concourent à la mobilité et aux changements de forme des cellules.

Microtubules : Un des éléments du cytosquelette qui déterminent la forme générale et la répartition des organites.

Nitrocellulose : ou nitrate de cellulose est un produit chimique, explosif, dérivé de la cellulose.

Phase M : la phase du cycle cellulaire pendant laquelle les chromosomes dupliqués ségrégent et sont empaquetés dans les noyaux des cellules filles (mitose) et distribués aux cellules filles (cytocinèse).

Organogénèse : l'organogénèse est l'étape de la formation de l'embryon durant laquelle apparaissent les principaux organes. Chez l'Homme, elle intervient entre la cinquième et la huitième semaine.

Phase S : la phase du cycle cellulaire pendant laquelle la réplication de l'ADN et la duplication de chromosomes ont lieu.

Phosphatase : Une phosphatase est une enzyme dont la fonction est d'enlever un groupe phosphate d'une molécule simple ou d'une macromolécule biologique, par hydrolyse.

Polyacrylamide : un polymère (-CH₂-CH(-CONH₂)-) formé à partir d'acrylamide. Il peut être réticulé en incorporant dans le mélange de polymérisation un dérivé bi-fonctionnel de l'acrylamide.

Ponceau : est un colorant azoïque de synthèse utilisé comme colorant alimentaire (E124²).

Ubiquitine : L'ubiquitine est un petit peptide qui est lié de manière covalente à des résidus de lysine dans les protéines cibles. Les chaînes d'ubiquitines ciblent les protéines pour la dégradation par le protéasome.

Wee1 : une protéine kinase qui inhibe les kinases cycline-dépendantes en phosphorylant un résidu thréonine dans le site actif des Cdk (Tyr 15 dans la plupart des Cdk) ; une protéine kinase apparentée, Myt1, phosphoryle également ce site et une thréonine adjacente (Thr 14) chez les animaux.

Western Blot : Un transfert de protéines également appelé buvardage de western, est une méthode de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique. C'est un outil de diagnostic complémentaire.

Xenopus laevis : *Xenopus laevis* est une espèce d'amphibiens de la famille des Pipidae. En français elle est nommée xénope lisse, xénope du Cap ou Dactylère du Cap.

Résumé:

La progression en phase M du cycle cellulaire est régulée par des protéines kinases cycline-dépendantes (Cdk) dont l'activité est régulée par l'association avec les cyclines et par phosphorylation.

Nous avons précipité Cdk1 et Cdk2 des extraits acellulaires en phase M d'embryons de *Xenopus laevis* et les protéines qui sont associées avec : Cdc6 et p27Xic1 (ainsi que les cyclines A1 et B2). Cdc6 et p27Xic1 sont connues comme des inhibiteurs potentiels de Cdk. Les deux protéines sont associées majoritairement avec la Cdk2 et en proportion moins importante avec la Cdk1. Ceci ouvre une hypothèse que lors de la phase M ces protéines interagissent avec les deux Cdk pour inhiber ces kinases, mais avec une efficacité plus forte pour Cdk2.

Mots clés : Cdc6. Cyclines. Kinases. Extrait acellulaire. p27Xic1. *Xenopus laevis*.

Abstract:

The progression in the M phase of the cell cycle is regulated by cyclin-dependent kinases (Cdk), whose activity is regulated by association with cyclins and by phosphorylation. We precipitated Cdk1 and Cdk2 from cell-free extracts in M phase of *Xenopus laevis* embryos and associated proteins: Cdc6 and p27Xic1 (as well as cyclin A1 and B2). Cdc6 and p27Xic1 are known as potential Cdk inhibitors. The two proteins are predominantly associated with Cdk2 and in smaller proportion with Cdk1. This opens a hypothesis that during M phase these two proteins interact with both of the Cdks to inhibit these kinases, but with a higher efficiency for Cdk2.

Keywords: Cell-free extract. Cyclins. Cdc6. Kinases. p27Xic1. *Xenopus laevis*.

المخلص:

النمو في المرحلة M من الدورة الخلوية منظم من خلال الكيناز التي تعتمد على السيكلين (Cdk)، الذين نشاطهم منظم عن طريق الارتباط مع السيكلين و الفسفرة.

قمنا بترسيب Cdk1 و Cdk2 من المستخلص الشبه خلوي الوظيفي في المرحلة M من اجنة *Xenopus laevis* مع البروتينات المرتبطة: Cdc6 و p27icX1 (اضافة الى السيكلين A1 و السيكلين B2). Cdc6 و p27icX1 معروفان عن انهما مثبطان محتملان لـ Cdk. هذان البروتينان هما في الغالب مرتبطان مع Cdk2 و كذلك بنسبة مماثلة مع Cdk1. هذا يفتح الفرضية أن خلال المرحلة من الانقسام الخلوي، هذان البروتينان يتفاعلان مع كلا من هذين الـ Cdk لتنشيط الكيناز، لكن بكفاءة أعلى مع Cdk2.

كلمات مفتاحية : المستخلص الشبه خلوي الوظيفي. السيكلين. الكيناز. Cdc6. p27icX1. *Xenopus laevis*.