

H O R I Z O N

*L'expérience de la **R**éussite*

Médecine PCEM 1

BIOLOGIE CELLULAIRE

Le cycle cellulaire

Professeur : Julien S.

Le cycle cellulaire

1. Généralités

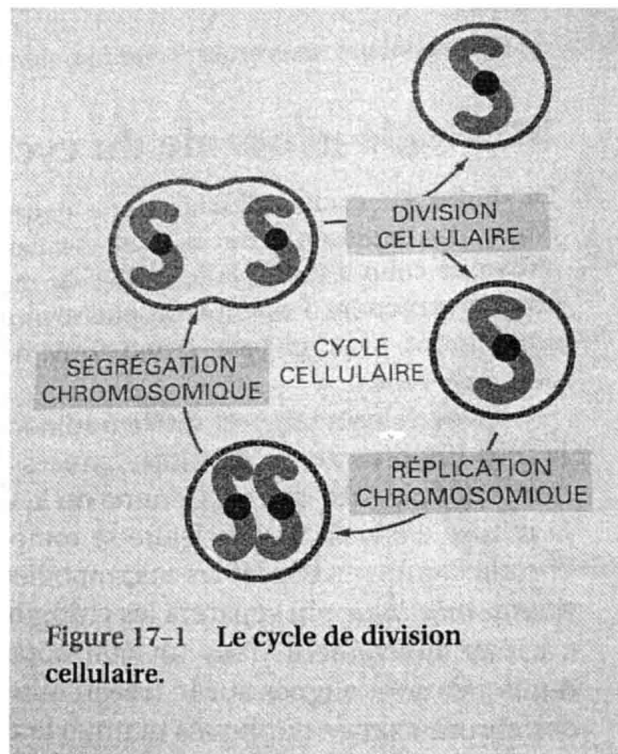


Figure 17-1 Le cycle de division cellulaire.

- Les cellules se reproduisent en multipliant leurs composants et en se divisant.
- Chez les unicellulaires,
 - chaque division aboutit à deux nouveaux organismes.
- Chez les multicellulaires,
 - ces divisions sont nécessaires à la formation d'un individu et au remplacement des cellules perdues par mort cellulaire (physiologique ou accidentelle).
- D'une cellule unique, l'œuf, par divisions cellulaires successives, on forme un être humain,
 - avec chez l'adulte 10^{14} cellules.
- On sait également que plusieurs milliers de cellules apparaissent toutes les secondes, pour maintenir le statu quo du nombre de cellules.
 - Exemple classique : les cellules de l'épithélium cutané desquament mais sont remplacées par de nouvelles.
- Une des manifestations du vieillissement cellulaire est une moins bonne capacité du renouvellement.
- Toutes les cellules ne se divisent pas :
 - certaines sont dites à l'état post-mitotique ou quiescent. Celles ci ne seront donc pas remplacées en cas de mort cellulaire.
- Une cellule possède un potentiel de prolifération limité : après un certain nombre de divisions, on observe la sénescence cellulaire (état post-mitotique).
- Une exception : les cellules souches, qui ont une capacité de prolifération illimitée, et qui sont capables de s'auto-renouveler ou de se différencier en certains types cellulaires. Une fois différenciées, leurs capacités de prolifération est limitée.
- Chez l'organisme multicellulaire, toutes les cellules ne se divisent pas à un même rythme. Pendant l'embryogenèse la croissance différentielle des cellules permet les mouvements morphogénétiques.
- Pour chaque division, la cellule suit le même processus : c'est le cycle cellulaire. Pendant le cycle, les cellules doivent :

- dupliquer leur ADN nucléaire,
- dupliquer leur centrosome
- dupliquer leurs constituants cytoplasmiques.
- la majorité des cellules doublent leur masse et dupliquent tous leurs organites à chaque cycle.
- une exception : les divisions de segmentation chez l'embryon, où il n'y a pas de croissance cytoplasmique.

2. Notion de cycle cellulaire

La durée du cycle varie en fonction du type cellulaire mais on le divise toujours en deux étapes : **mitose** et **interphase**.

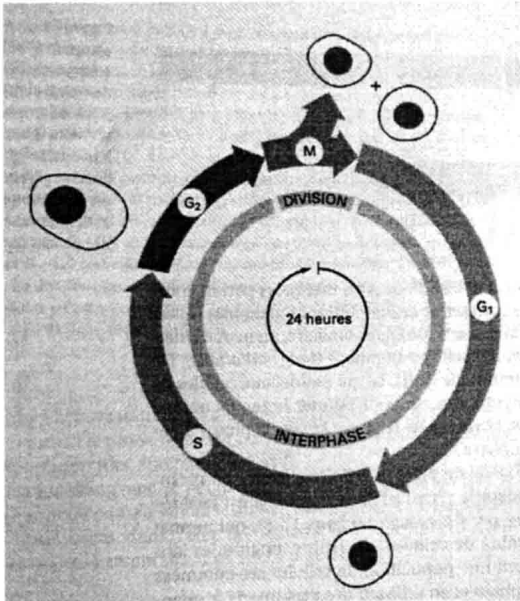


Figure 17-3 Les quatre phases successives du cycle d'une cellule eucaryote standard. Pendant l'interphase, la cellule croît de façon continue ; pendant la phase M, elle se divise. La réplication de l'ADN est confinée à la phase S de l'interphase. La phase G₁ est l'intervalle entre la phase M et la phase S ; G₂ est l'intervalle entre la phase S et la phase M.

- L'interphase est la période où la cellule se prépare à la prochaine division cellulaire et assure ses fonctions physiologiques.
- La mitose est la période où la cellule se divise
- La durée de la mitose varie peu : environ une heure.
- Mais la durée de l'interphase varie de presque rien (segmentation) à plusieurs années (cellules hépatiques) ou 1 à 2 jours (cellule de l'épithélium du tube digestif).

cycle cellulaire standard



cycle cellulaire embryonnaire précoce

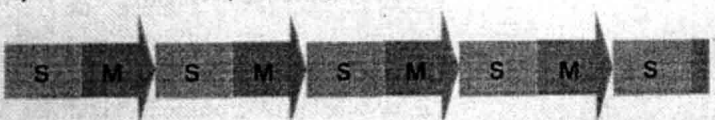


Figure 17-4 Le cycle cellulaire standard comparé avec le cycle de cellules embryonnaires précoces. Dans un cycle de cellules embryonnaires précoces, il n'y a pas de croissance ; ainsi, à chaque division, chacune des deux cellules filles a une taille égale à la moitié de celle des cellules parentales. La durée du cycle est extrêmement courte, et les phases S et M alternent sans l'intervention des phases G₁ ou G₂.

Ces phases sont définies en microscopie optique :

- La mitose est le seul stade où les chromosomes sont visibles.

- Pendant l'interphase on observe une croissance lente de la cellule par renouvellement et duplication des composants cytoplasmiques et nucléaires. L'interphase est divisée en trois étapes : **G1, S et G2**.
 - G1 et G2 sont des phases intermédiaires (G=gap).
 - S est la phase de duplication de l'ADN nucléaire

2.1. Méthode d'étude du cycle cellulaire

2.1.1. Cytophotométrie

Les cellules sont **fixées** puis marquées avec **un colorant spécifique de l'ADN** : acridine orange ou Hoescht 33258, de façon à ce que la **concentration de colorant soit proportionnelle à la concentration d'ADN**. La culture est balayée par une lumière monochromatique incidente. C'est la lumière émise. La cellule photoélectrique mesure **l'intensité de coloration de chaque noyau** ; les modifications électriques sont alors mesurées par un galvanomètre. On peut alors obtenir pour chaque mesure l'image photo de la cellule étudiée et ainsi **déterminer son état selon sa quantité d'ADN**.

2.1.2. Cytofluorométrie de flux

Le principe est le même. La différence est que cette technique permet de **travailler avec des cellules vivantes** et marquées par un **colorant fluorescent** comme précédemment. Après coloration les cellules sont mises en suspension, passées une à une dans un fin capillaire où un faisceau laser est orienté : c'est la lumière incidente. Les cellules émettent une lumière **proportionnelle à la quantité d'ADN** de leur noyau. La lumière émise est mesurée avec une cellule photoélectrique, ce qui permet d'établir une courbe du **nombre de cellules en fonction de leur quantité d'ADN**. La courbe obtenue présente deux pics, soit trois populations cellulaires A, B et C.

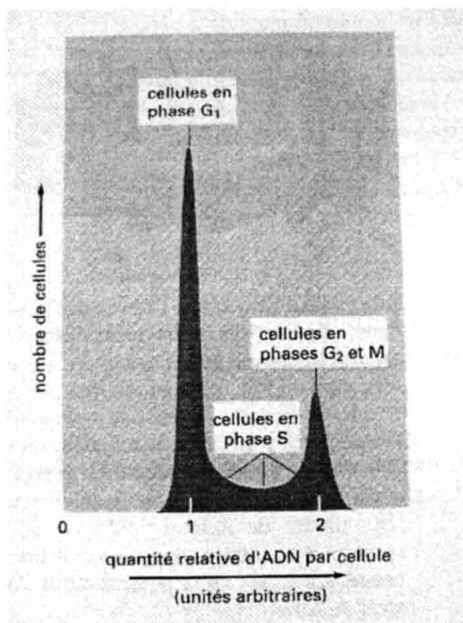
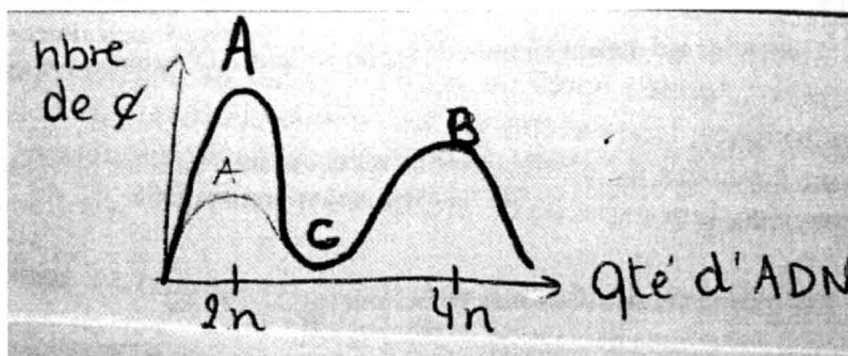


Figure 17-6 Analyse du contenu de l'ADN avec un trieur de cellules activé par fluorescence (FACS). Le graphique montre les résultats types obtenus pour une population cellulaire en croissance lorsque le contenu en ADN de chacune des cellules est déterminé par un trieur de cellules activé par fluorescence (voir Figure 4-31). Il est utilisé ici simplement pour effectuer des mesures sur des cellules isolées et non pour les trier. Les cellules sont marquées avec un colorant qui devient fluorescent lorsqu'il se lie à l'ADN, de sorte que le taux de fluorescence est directement proportionnel à la quantité d'ADN contenue dans chaque cellule. Les cellules se répartissent en trois catégories : celles qui ont un complément d'ADN non répliqué (une unité arbitraire), et qui sont par conséquent en phase G₁, celles qui ont un complément d'ADN complètement répliqué (deux unités arbitraires), et qui sont en phase G₂ ou M, et celles qui ont une quantité intermédiaire d'ADN et qui sont en phase S. La distribution des cellules dans le graphique ci-contre indique que le nombre de cellules est plus important en G₁ qu'en G₂ + M, impliquant que G₁ est plus longue que G₂ + M dans cette population.



Quand on examine les cellules, on observe que A et C sont en interphase : A est en G1 et C en S. Les cellules de la population B sont en interphase G2 ou en mitose.

Ces observations permettent de conclure

- que la **duplication de l'ADN se fait pendant l'interphase**
- et de calculer un **index mitotique**, rapport du **nombre de cellules en mitose sur le nombre total de cellules de la population observée**. Cet index permet d'évaluer la vitesse de division des cellules, qui varie en fonction du type cellulaire, des conditions de culture et de l'âge de la culture.

B peut varier en taille : une population à croissance rapide à une population B plus importante qu'une population à croissance lente.

Si la population étudiée est post-mitotique, on n'observe pas de population B ni C.

On peut également trier les cellules en fonction de leur ADN (ou marquer à l'aide d'anticorps les cellules pour les trier en fonction de caractéristiques membranaires.)

2.1.3. Autoradiographie après marquage à la thymine tritiée

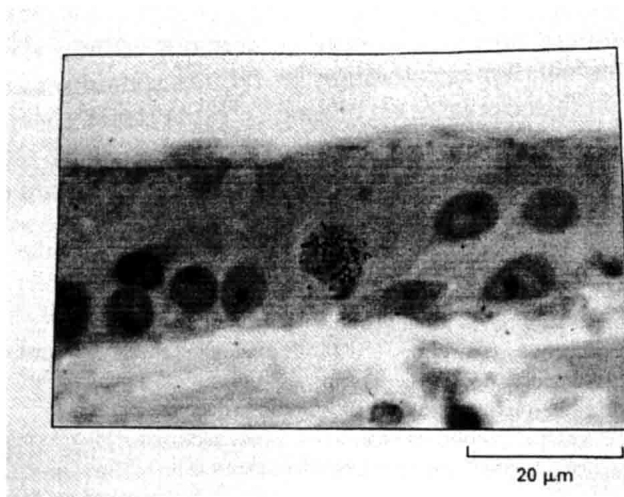


Figure 17-5 Marquage de cellules en phase S par autoradiographie. Les tissus ont été incubés pendant une courte période en présence de ^3H -thymidine. Les grains d'argent (*points noirs*), révélés par l'émulsion photographique sur le noyau, indiquent que la cellule a incorporé de la ^3H -thymidine dans son ADN, et qu'elle s'est donc trouvée en phase S à un certain moment de la période de marquage. Dans cet échantillon, montrant l'épithélium sensoriel de l'oreille interne, la présence de cellules en phase S est à l'évidence une prolifération cellulaire survenant en réponse à des lésions. (Avec l'autorisation de Mark Warchol et de Jeffrey Corwin.)

La thymine tritiée est une thymine dont un hydrogène est remplacé par un atome de tritium, isotope radioactif de l'hydrogène, émetteur β . Son incorporation dans des cellules peut être détectée par autoradiographie.

- A partir d'une culture cellulaire asynchrone,
- On ajoute au milieu de culture de la thymine tritiée. On la laisse 15 minutes (plus ou moins selon l'expérience)
- Puis on lave les cellules pour en ôter l'excès.
- On fixe les cellules puis on les recouvre d'une émulsion photosensible.
- Après quelques semaines on développe et colore les cellules fixées.
- Leur radioactivité est observable par l'apparition de grains d'argent dans l'émulsion, au-dessus des noyaux qui ont incorporé T^* ,
- C'est-à-dire seules les cellules qui étaient en train de répliquer leur ADN pendant le marquage, les cellules en phase S.

On a montré que **les cellules en mitose** n'incorporent pas la T^* ce qui prouve qu'elles **ne répliquent plus leur ADN**. Comme on observe que toutes les cellules en interphase n'incorporent pas T^* , on déduit que **la phase S ne dure pas pendant toute l'interphase**.

Cette méthode permet de mesurer la durée des phases de façon précise.

2.1.4. L'immunocytochimie

Elle utilise la **bromodésoxyuridine**, BrdU, analogue structural synthétique de la thymine et qui s'incorpore donc à l'ADN pendant la phase S. Avec un anticorps spécifique, on peut la détecter, en ayant préalablement marqué l'anticorps avec un fluorochrome ou une peroxydase.

- On ajoute la BrdU sur une culture cellulaire pendant un temps déterminé
- Puis on lave la culture.
- Enfin, on marque le tout aux anticorps anti-BrdU.
- Seules les cellules en phase S durant l'exposition à la BrdU sont marquées.

Une telle méthode a plusieurs avantages sur la précédente :

- On peut l'utiliser *in vitro* ou *in vivo* : on peut alors voir le **taux de renouvellement d'un tissu**
- Elle est plus rapide : quelques heures seulement
- Elle évite l'utilisation de produits radioactifs

3. Les différentes phases du cycle cellulaire

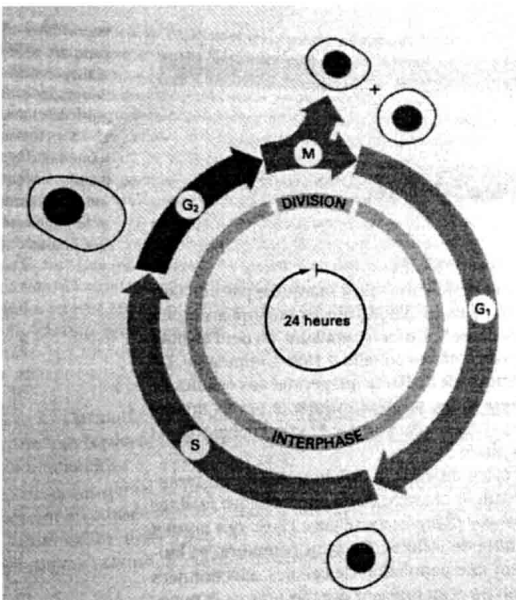


Figure 17-3 Les quatre phases successives du cycle d'une cellule eucaryote standard. Pendant l'interphase, la cellule croît de façon continue ; pendant la phase M, elle se divise. La répllication de l'ADN est confinée à la phase S de l'interphase. La phase G₁ est l'intervalle entre la phase M et la phase S ; G₂ est l'intervalle entre la phase S et la phase M.

Mis à part la segmentation où les phases G₁ et G₂ sont quasi inexistantes, le cycle cellulaire comporte toujours quatre phases. L'interphase regroupe les phases G₁, S et G₂. La quatrième phase est la **mitose M**.

3.1. Phase G₁

Elle est aussi appelée **phase pré-répllicative**. C'est le temps qui s'écoule entre la naissance de la nouvelle cellule (fin de mitose) et le moment où elle commence à répliquer son ADN.

Pendant cette phase,

- Le noyau a **une quantité constante d'ADN : 2N**.
- C'est une phase où la synthèse d'ARN et la synthèse protéique sont très actives. Leur quantité est en constante augmentation.
- C'est également la phase où la **cellule remplit ses fonctions physiologiques**.

Sa durée est extrêmement variable en fonction du type cellulaire et des conditions d'environnement (absence ou présence de facteurs de croissance ou de différents nutriments).

Au contraire de l'ADN nucléaire synthétisé uniquement en phase S, la plupart des protéines sont synthétisées de façon continue pendant toute l'interphase. Il y a un arrêt de la synthèse d'ARN en début de prophase.

G1 correspond à une synthèse très importante.

Mais il y a des exceptions : les histones ne sont synthétisées qu'en phase S, leur fonction étant très liée à la réplication de l'ADN. Elle est inhibée par un agent chimique lié à l'ADN, qui provoque l'arrêt immédiat si la synthèse a débuté.

Une autre exception est celle de la thymidine triphosphate : les gènes codant pour l'enzyme de son anabolisme sont transcrits pendant le passage G1 à S. si on inhibe la synthèse de l'ADN, il n'y a pas synthèse de cette enzyme : le lien est étroit.

La phase G1 correspond également à la décision de la cellule de progresser dans le cycle cellulaire. Il y existe un point de restriction, si elle le passe, elle effectue l'ensemble du cycle. C'est un point majeur de contrôle du cycle (mais pas le seul). Passé ce point, pas de retour en arrière : le cycle cellulaire est enclenché jusqu'à la prochaine phase G1. S'il elle n'en est pas capable, elle meurt.

3.2. Phase S

C'est la période de **réplication de l'ADN**. Elle succède à la phase G1. Durant la phase S, la quantité d'ADN du noyau est doublée : de 2N à 4N.

C'est également pendant la phase S que **les centrioles** du centrosome **débutent leur duplication**.

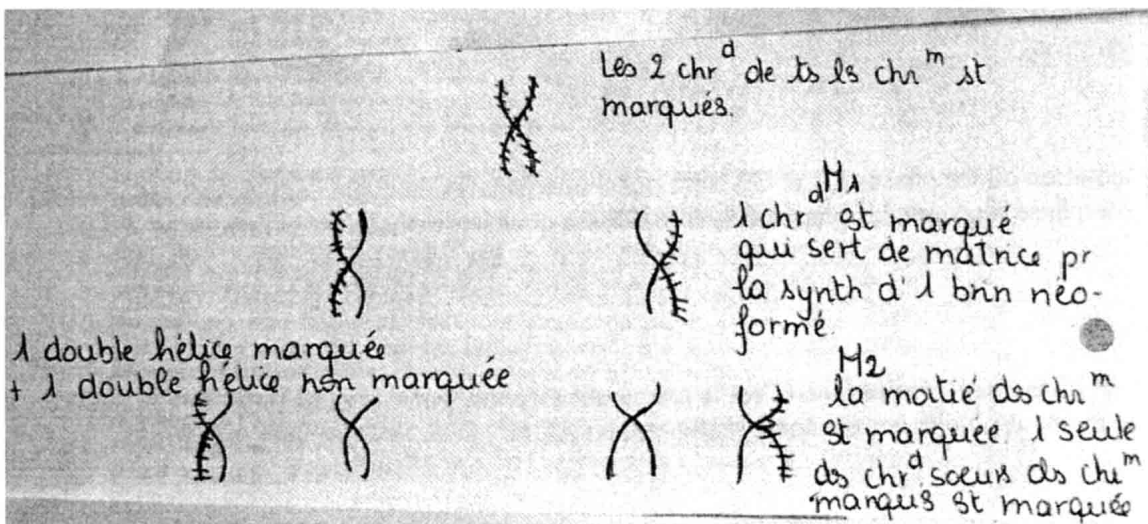
3.2.1. Modalités de synthèse de l'ADN

a) Expérience de Taylor :

Elle permet de montrer que la **réplication de l'ADN est semi-conservatrice**.

Il y a donc un lien entre la duplication des chromosomes et la réplication de l'ADN.

- Cette expérience nécessite une population cellulaire synchrone.
- Elle est réalisée sur trois cycles cellulaires successifs.
 - Le premier est fait en un milieu de culture contenant de la T*.
 - Les suivants sont fait après lavage dans un milieu de culture non radioactif
- On fixe les populations cellulaires à M1, M2 et M3.
- Le résultat de l'autoradiographie montre :



Cette expérience a donc montré que la réplication de l'ADN est **semi-conservatrice**, chaque brin de la double hélice servant de modèle pour la synthèse d'un nouveau brin.

Donc on obtient **un brin matrice + un brin néo-synthétisé**.

b) unité de réplication

- La longueur moyenne d'une molécule d'ADN est de 4 cm chez l'homme.