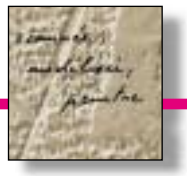
m/s 2000

médecine/sciences 2000; 16: 461-8



Le temps du cycle cellulaire

Christian Le Peuch
Marcel Dorée

C. Le Peuch, M. Dorée: CRBM, Cnrs UPR 1086, 1919, route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

▶ Les transitions du cycle, lors desquelles chaque cellule prend la décision de poursuivre ou de s'arrêter, sont contrôlées par une série de protéine-kinases dépendantes des cyclines. L'activité de ces kinases dépend d'une variété de mécanismes réversibles ou irréversibles qui orientent et limitent la prolifération des cellules au cours du temps. Ces mécanismes jouent un rôle crucial dans le développement, puisque l'historique des cycles précédents semble fournir à chaque cellule de l'organisme un indicateur de position jouant un rôle décisif dans la différenciation et l'organogenèse. Nos cycles cellulaires sont comptés, ils font l'objet de régulations programmées au cours du développement embryonnaire, et participent à la sénescence et à la mort cellulaire. Les cancers résultent souvent d'un dysfonctionnement de leurs mécanismes de régulation. ◀

Au cours de la première moitié du XIXe siècle, il a été établi que toutes les plantes et tous les animaux sont constitués de cellules, qui proviennent d'autres cellules par le processus de division cellulaire produisant deux cellules filles à partir d'une cellule mère *(figure 1)*. Le cycle cellulaire est l'ensemble des événements responsables de la duplication de la cellule. Il permet donc le maintien d'une information génétique constante en quantité et qualité (sauf en cas de mutation) au niveau des chromosomes, malgré la duplication des cellules de génération en génération.

Au cours de la reproduction sexuée, la fusion d'un œuf et d'un spermatozoïde produit un noyau unique contenant la somme de leurs chromosomes respectifs. Ce nombre n'est cependant pas le double de celui d'une cellule somatique banale. En effet, les cellules précurseurs des œufs et des spermatozoïdes subissent un processus réductionnel appelé méiose, constituée d'une série de deux cycles cellulaires très particuliers: au cours du premier, la réplication des chromosomes a lieu, mais les chromatides ne se séparent pas à l'anaphase; au cours du second, il n'y a pas de duplication des chromosomes, et ce sont les chromatides restées associées dans le cycle précédent qui se séparent. L'œuf et le spermatozoïde, produits de ces deux cycles particuliers, contiennent donc deux fois moins de chromosomes (n) que les cellules somatiques (2n), et la fécondation, qui réunit n chromosomes d'origine maternelle (l'œuf) et n chromosomes d'origine paternelle (le spermatozoïde) rétablit le nombre diploïde de chromosomes (2n) des cellules somatiques.

Le cycle cellulaire est représenté de façon symbolique par une roue (la roue du temps) qui souligne son caractère périodique *(figure 2)*. Les deux événements majeurs du cycle y sont représentés: la mitose (ou phase M, afin d'y inclure son équivalent lors de la méiose) et la réplication de l'ADN des chromosomes (ou phase S: synthèse d'ADN). La phase S n'occupe qu'une partie de l'interphase: celle-ci inclut aussi entre M et S une phase dite G1 (G pour *gap*) et une phase dite G2 entre S et M.

La division d'une cellule en une paire de cellules filles génétiquement identiques dépend de l'exactitude de la réplication des chromosomes et de

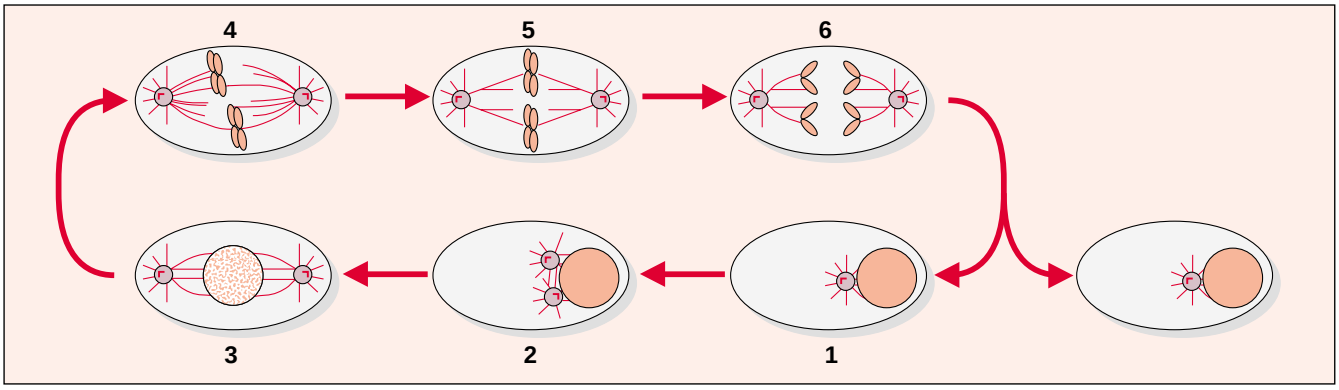


Figure 1. ***Succession des étapes de la division cellulaire au cours du temps.*** *En interphase (1), la cellule duplique le couple de centrioles, situé au centre du centrosome et chacun de ses chromosomes en deux chromatides sœurs qui restent attachées l'une à l'autre. En début de mitose (2), deux centrosomes s'organisent à partir des centrioles dupliqués, puis ils se séparent (3), participant à l'élaboration d'une nouvelle structure constituée de microtubules appelée fuseau mitotique et dont ils constituent les pôles. Les chromosomes captent les extrémités de certains microtubules (4) et se rassemblent dans le plan de symétrie du fuseau bipolaire (5, métaphase). Puis le fuseau sépare les chromatides de chaque chromosome (6, anaphase) de telle sorte que deux lots de chromosomes (les chromatides acquièrent le nom de chromosomes après la ségrégation qui les individualise) identiques se retrouvent dans deux territoires distincts qui vont devenir deux noyaux. Enfin, la cellule se divise en deux parties, chacune (1) contenant un noyau et la moitié environ du cytoplasme total et des organites qu'il contient (si la division est égale).*

leur ségrégation. La fidélité du processus implique qu'avant de se diviser, une cellule s'assure que les chromosomes ont ségrégé correctement. De même, avant de séparer ses chromosomes, elle doit s'assurer que la réplication de leur ADN est terminée. D'une façon générale, le démarrage d'événements tardifs semble dépendre de l'achèvement d'événements plus précoces. Notre connaissance intuitive de ces dépendances temporelles est confirmée, dans une certaine mesure, par la perturbation expérimentale ou accidentelle d'événements spécifiques du cycle au moyen d'agents chimiques ou de mutations. Par exemple, l'inhibition de la réplication par un poison de l'ADN polymérase, tel que l'aphidicoline, empêche la ségrégation des chromosomes et la division cellulaire dans la plupart des types cellulaires. Bien que ces relations de dépendance temporelles semblent suggérer que chaque événement déclenche celui qui le suit, cette conception (dite « en dominos ») ne révèle pas la nature profonde du cycle cellulaire. En réalité, celui-ci est plutôt contrôlé par un mécanisme d'horlogerie central fondamentalement indépendant des événements intrinsèques du cycle, même si cette horlogerie est asservie de façon sophistiquée, mais secondaire, aux événements du cycle.

La logique du cycle

En premier lieu, puisque le cycle apparaît comme une roue où alternent phase S et phase M, la réplication de l'ADN est-elle une condition préalable à la mitose et, réciproquement, l'exécution de la mitose du cycle précédent est-elle nécessaire à la réplication ?

La réplication de l'ADN, prélude à la mitose ?

En principe, une cellule qui se divise sans avoir préalablement répliqué son ADN produit des cellules filles non viables, puisque chacune a perdu au moins une partie de l'information génétique nécessaire au maintien des structures cellulaires. Cependant, si l'information génétique nécessaire est stockée dans le cytoplasme sous forme d'ARN messagers ou de leurs produits de traduction, rien n'empêche en principe la succession de plusieurs mitoses sans réplication. C'est effectivement ce que l'on observe, par exemple, après la fécondation dans l'embryon d'étoile de mer traité par l'aphidicoline [1]. L'effet observé n'est pas dû à la perturbation du cycle cellulaire par l'aphidicoline, puisqu'on obtient le même résultat en éliminant chirurgicalement le noyau de fécondation [2]. Ces mitoses sans réplication ne sont pas l'apanage des invertébrés, et de telles expériences ont été reproduites chez des vertébrés comme le xénope. Cependant, dans tous les cas, les cycles finissent par s'arrêter (au stade 512/1 024 cellules chez l'étoile et le xénope) et les amas embryonnaires anucléés sont détruits. Il n'est donc pas étonnant que se soient développés au cours de l'évolution des mécanismes de sauvegarde interdisant l'entrée en mitose des cellules n'ayant pas dupliqué (ou ayant dupliqué incomplètement) leur ADN, même si ces mécanismes ne sont pas nécessairement mis en place dès le début du développement embryonnaire, et ne sont donc pas intrinsèquement nécessaires au cycle cellulaire.

La mitose, prélude à la réplication de l'ADN ?

Bien que l'alternance soit le plus souvent observée, elle n'est pas une règle absolue, même dans les conditions physiologiques normales. Chez les invertébrés, et les plantes en particulier, il n'est pas exceptionnel que des cellules entrent dans un cycle (endoréplication) où des phases S répétées se succèdent sans mitose. On obtient alors des cellules polyploïdes, de taille le plus souvent supérieure à celle des cellules diploïdes, qui constituent des tissus spécialisés tels que les glandes

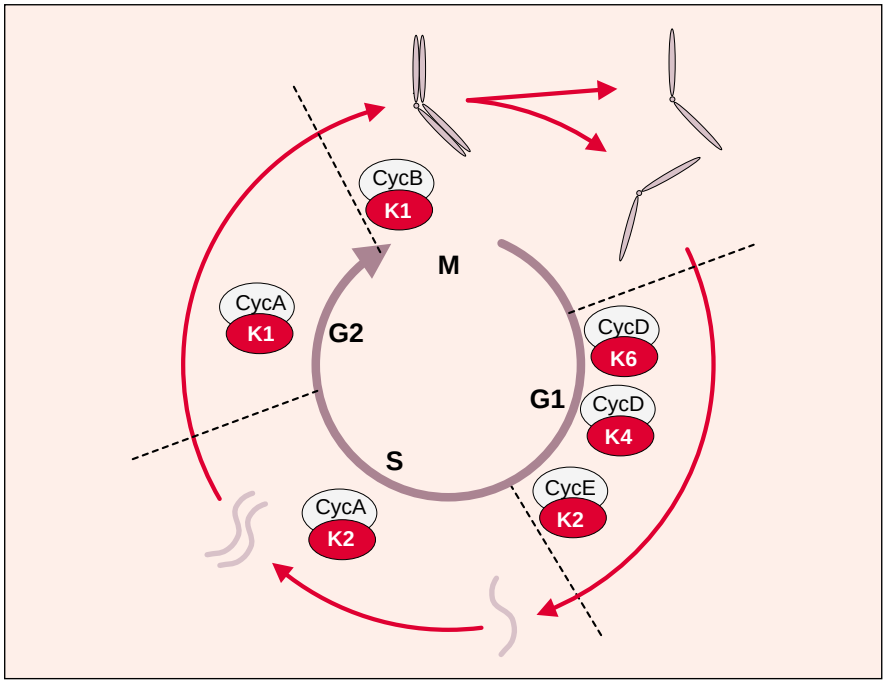


Figure 2. ***Représentation schématique du cycle cellulaire.*** *Les deux événements majeurs du cycle, la duplication des chromosomes en chromatides sœurs qui restent associées au cours de la phase S, et la ségrégation des chromatides condensées au cours de la phase M, sont symbolisés sur le cercle extérieur. Les principaux complexes cdk-cycline qui contrôlent la progression du cycle sont indiqués sur le cercle intérieur.*

salivaires ou les cellules nourricières de l'ovaire chez la drosophile.

Durée du cycle et signification des phases G1 et G2

Dans la plupart des cellules, le cycle cellulaire est couplé aux activités biosynthétiques et à la croissance. Là encore, les cellules embryonnaires font souvent exception : grâce à l'accumulation d'ARN messagers maternels et de leurs produits de traduction, ces cellules géantes enchaînent, souvent dès la fécondation, une série de divisions sans croissance qui sont alors très rapides (30 minutes chez le xénope). Ces cycles se déroulent en l'absence de phases G1 et G2. La durée du cycle s'allonge considérablement dans les cellules en croissance et cet allongement porte essentiellement sur l'interphase. Chez la levure *S. cerevisiae*, la quasi-totalité de la croissance a lieu pendant la phase G1 ; la cellule entre en mitose dès que la réplication de l'ADN est terminée. Chez la levure *S. pombe*, la quasi-totalité de la croissance a lieu en G2, et la réplication est déclenchée dès l'achèvement de la mitose. Chez les eucaryotes supérieurs, le couplage entre croissance et déclenchement de la réplication à l'issue de la phase G1 dépend d'un réseau de régulations transcriptionnelles qui intègre des signaux dont l'origine est extracellulaire. Si l'activité transcriptionnelle est insuffisante, la durée de la phase G1 s'allonge considérablement. A l'heure actuelle, on ignore tout du couplage entre croissance et cycle cellulaire au cours de la phase G2.

Le cycle cellulaire : une horloge à cdk

Au cours du cycle, la croissance s'effectue de façon plus ou moins uniforme dans le temps, le seul accident majeur étant la scission en deux territoires à l'issue de la mitose. A l'inverse, la progression du cycle cellulaire est contrôlée au niveau de ses transitions (G1/S, G2/M, M/G1) par les variations d'activité de protéine-kinases spécialisées. Celles-ci sont constituées de deux sous-unités : une sous-unité catalytique appartenant à la famille des cdk *(cyclin dependent kinases)* et une sous-unité régulatrice, nécessaire à l'activité, appartenant à la famille des cyclines [3]. Le premier de ces complexes cdk1-cycline B, encore appelé MPF *(M-phase promoting factor)* a été identifié [4] grâce à un modèle dans lequel la suspension du temps du cycle (qui peut parfois durer plusieurs dizaines d'années chez la femme) est associée à l'arrêt en phase G2 des ovocytes jusqu'à ce qu'un signal hormonal ne remette en route le mécanisme de transition G2/M du cycle cellulaire. Chez l'homme, neuf membres de la famille des cdk ont été identifiés, et il existe autant de groupes de cyclines, chacun comportant plusieurs variants. Bien que certains complexes cdk-cycline n'aient pas de fonction connue au niveau du cycle cellulaire, la possibilité pour un cdk donné de s'associer à plusieurs cyclines permet d'obtenir un répertoire sophistiqué de combinaisons, qui participent également à la régulation du cycle cellulaire *(figure 2)*. Il n'entre pas dans le cadre de cet exposé de décrire en détail les fonctions et les cibles de ces différents complexes (pour revue, *voir* [5, 6]). Mis à part le complexe cdk1/cycline B, dont les variations d'activité contrôlent l'entrée et la sortie de mitose, le plus important est cdk2/cycline E. Son activation est universellement requise pour l'assemblage de la machinerie de réplication de l'ADN et l'entrée dans la phase S, et son inactivation est indispensable à la réactivation des origines de réplication lors du cycle suivant [7].

Lors de chaque transition du cycle cellulaire, l'activité des complexes cdk-cycline est contrôlée sur le plan biochimique, au niveau de l'expression de leurs constituants (contrôles transcriptionnels et traductionnels), au niveau de leur assemblage, et au niveau de modifications qu'ils subissent une fois assemblés. Par exemple, l'expression de la cycline E est essentiellement déclenchée en fin de phase G1 par l'inactivation d'un complexe répresseur multiprotéique comportant (entre autres) un membre de la famille E2F (E2F4) associé à DP1 et une « protéine poche » proche de pRb [8]. Le mécanisme d'inactivation du répresseur n'est pas connu, mais

pourrait faire intervenir l'activité de complexes cdk-cycline activés plus précocement (par exemple cdk4-cycline D), au moins lorsque la transition G1/S est déclenchée par un signal mitogénique extracellulaire. Les contrôles post-traductionnels s'exerçant sur cdk1-cycline B lors de la transition G2/M sont présentés dans la *figure 3*.

Contrairement à de nombreuses protéine-kinases, les complexes cdk-cyclines ne s'autophosphorylent pas au niveau de la sous-unité catalytique. Néanmoins, celle-ci est phosphorylée dans les complexes actifs, et la kinase responsable (CAK : *cdk-activating kinase*) est elle-même un complexe cdk-cycline (cdk7-cycline H-MAT1 [9]). L'activité de cdk2-cycline E et cdk1-cycline B est également contrôlée négativement par la phosphorylation de résidus thréonine et tyrosine du cdk (T14 et Y15 dans cdk1). Un autre contrôle négatif est exercé par des inhibiteurs protéiques tels que $p27^{KIP1}$ ou $p21^{CIP1}$, dont l'expression est contrôlée positivement par le facteur de transcription p53 [10]. Alors que l'inhibition des complexes cdk-cycline par phosphorylation est réversible, et fait intervenir des phosphatases spécifiques de la famille cdc25, la protéolyse de la sous-unité cycline, qui a lieu au niveau des protéasomes après « étiquetage » des cyclines est irréversible. Cet étiquetage est strictement contrôlé au cours du cycle cellulaire par les variations d'activité de complexes multimoléculaires dont la fonction est d'attacher des chaînes d'ubiquitine aux cyclines, en programmant ainsi leur destruction [11]. Dans le cas de cdk1-cycline B, l'ubiquitine ligase est l'APC *(anaphase-promoting complex)*; dans le cas de cdk2-cycline E, il s'agit d'un complexe SCF *(Skp1/Cdc53/F box protein)* [12, 13].

Les variations d'activité des complexes cdk/cycline sont parfois dépendantes de la fin d'événements plus précoces du cycle cellulaire. Certains mécanismes de contrôle *(checkpoint)* renforcent cette dépendance, en activant des freins de la progression du cycle cellulaire [14]. Par exemple, l'ADN endommagé provoque un arrêt du cycle en phase G1 (tant que la réparation n'est pas réalisée) en augmentant l'expression de p53 et donc l'accumulation de p21 [10]. Un défaut de réplication de l'ADN empêche la déphosphorylation des résidus inhibiteurs de cdk1-cycline B et maintient la kinase inactive, empêchant ainsi la transition G2/M [15]. L'activation des *checkpoints* de réplication et de réparation de l'ADN peut également entraîner la mort programmée (apoptose) de la cellule. Celle-ci, devenue dangereuse pour l'organisme pluricellulaire, prend alors la décision, qui s'apparente à un suicide, de se détruire par des mécanismes spécifiques [16]. La ségrégation des chromatides lors de la transition métaphase-anaphase requiert l'activation de l'APC : or cette activation est bloquée par un inhibiteur protéique (Mad 2) tant qu'il existe au moins une paire de chromatides sœurs n'ayant pas réalisé l'attachement bipolaire au fuseau mitotique [17]. L'analyse des mécanismes de *checkpoint*, qui représente un objectif majeur des recherches actuelles, conduit à proposer une théorie unifiée du cycle cellulaire dans laquelle la conception « en dominos » ne s'oppose plus, mais est complémentaire de la conception de l'oscillateur central.

Les cancers résultent souvent d'une dérégulation de ces mécanismes de *checkpoint*. C'est le cas de certains cancers colorectaux associés à une instabilité chromosomique et à la présence d'un nombre anormal de chromosomes. Dans ce cas, la perte de *checkpoint* est due à l'inactivation du gène *BUB1* [18]. L'ataxie-télangiectasie (A-T) est également fréquemment due à l'inactivation d'un gène *(ATM)* impliqué dans des mécanismes de *checkpoint* contrôlant les transitions G1/S et G2/M [19].

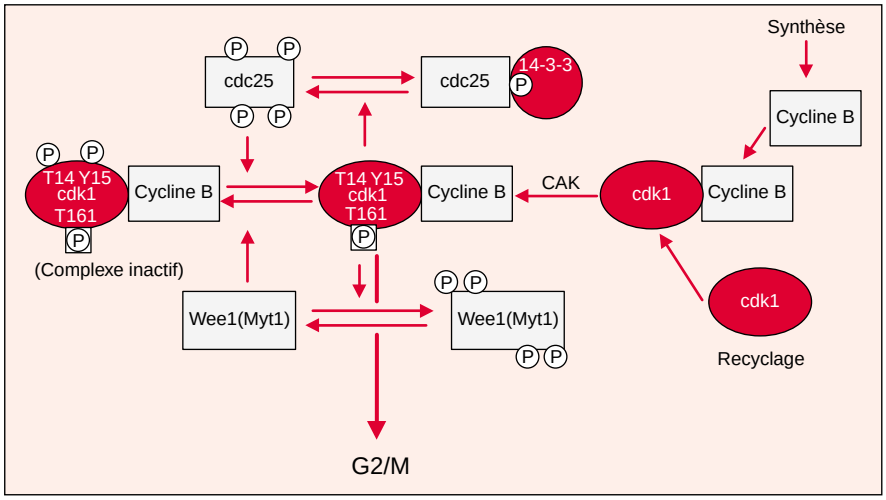


Figure 3. ***Contrôle post-traductionnel de l'activation de la protéine-kinase cdk1-cycline B lors de la transition G2/M du cycle cellulaire.*** *La cycline B nouvellement synthétisée s'associe à cdk1 en excès pour former des complexes cdk1-cycline B dont la concentration croît alors au cours du temps. Ces complexes sont activés par phosphorylation du résidu T161 de cdk1 par la kinase cdk7-cycline H-MAT1 (CAK). Tant que la concentration en complexes actifs cdk1-cycline B reste inférieure à un seuil critique, la kinase Wee1 (ou/et Myt 1) phosphoryle cdk1 sur les résidus T14 et Y15 et inactive cdk1-cycline B. Lorsque le niveau d'activité de cdk1-cycline B atteint le seuil critique, cette kinase inactive Wee1/Myt1, directement ou indirectement, et active la phosphatase cdc25 par un processus mal compris impliquant probablement sa phosphorylation et sa dissociation de l'inhibiteur 14-3-3. Une fois activé, cdc25 déphosphoryle les résidus inhibiteurs de cdk1, ce qui augmente de façon brutale l'activité de cdk1-cycline B (MPF) qui déclenche les événements de la transition G2/M.*

Nos cycles sont-ils comptés ?

La *figure 2* suggère que le cycle cellulaire se déroule semblable à lui-même, indéfiniment, telle la roue du temps. Il s'agit cependant là d'une représentation symbolique faisant abstraction, entre autres, des

contraintes exercées par les programmes de développement au niveau d'un organisme pluricellulaire.

Variations du cycle au cours du développement embryonnaire

Chez les êtres multicellulaires, qui peuvent compter jusqu'à 10^{15} cellules, la finalité biologique majeure de l'individu est d'acquérir, puis de maintenir, sa forme et ses performances. Une série de divisions successives stéréotypées ne saurait produire qu'un nombre de structures très limité si elles avaient lieu selon un processus identique pour toutes les cellules issues de l'œuf. L'incroyable diversité des formes et des structures du vivant est rendue possible par les nombreuses variations du cycle cellulaire au cours du développement. Si l'on prend l'exemple de la mouche du vinaigre (drosophile), celle-ci se développe à partir d'un œuf de grande taille ne subissant pas de croissance au cours de l'embryogenèse, qui produit ensuite la larve (asticot), représentant une forme de transition où la croissance reprend, dans l'attente de la métamorphose dont émergera l'adulte (imago). Chez l'embryon précoce (*voir figure 4*, 13 premiers cycles) les cycles simplifiés, extrêmement rapides (8,5 minutes pour les 9 premiers), se réduisent à une succession de phases S et M. Chez l'embryon tardif (cycles 14 à 16), les cycles se compliquent par l'apparition de la phase G2, liée à la dégradation de l'inducteur mitotique cdc25 et au démarrage de la transcription qui permet, parallèlement à cdc25, l'expression de gènes exerçant une fonction inhibitrice sur l'inducteur mitotique. La phase G2 apparaît car MPF est inhibé de façon transitoire par phosphorylation des résidus T14 et Y15 de cdk1.

Au cours de cette phase du développement, on peut identifier, chez l'embryon tardif, des groupes de cellules, appelés domaines mitotiques [21], dans lesquels chaque cellule entre en mitose de manière synchrone, mais asynchrones vis-à-vis de celles des cellules des autres domaines. Au cours du cycle 14 par exemple, on peut distinguer 25 domaines mitotiques qui diffèrent par le temps d'activation de cdc25. Des cellules dont le destin est le même au terme du développement appartiennent au même domaine mitotique, tandis que des types cellulaires différents suivent des cycles cellulaires décalés dans le temps. Les gènes qui spécifient le lignage et les destinées cellulaires dans l'embryon de drosophile doivent donc également contrôler la chronologie du cycle cellulaire : ils le font en particulier au niveau de la transcription de cdc25.

A l'issue du 16e cycle, les cellules des différents domaines mitotiques cessent de se diviser après la phase M (à un petit nombre d'exceptions près, dont celui des neuroblastes). Cet arrêt est dû à la chute de l'activité transcriptionnelle du gène de la cycline E et à l'augmentation de la transcription d'un inhibiteur (de la famille CIP/KIP) de cdk2-cycline E. Bien qu'elles ne se divisent plus, la plupart de ces cellules ne sont pas définitivement arrêtées, mais oscillent entre G1 et S, produisant des chromatides ou des fragments de chromatides qui ne se séparent pas et s'accumulent sur place [7]. Ces cycles d'endoréplication produisent les cellules polyploïdes, des glandes salivaires, des corps gras de l'intestin, des tubes de Malpighi, etc.

Dans certains territoires issus de domaines mitotiques arrêtés en G1, d'autres territoires appelés disques imaginaux, comportant 10 à 50 cellules à l'origine, entreront à nouveau en prolifération dans la larve lorsque celle-ci aura substantiellement augmenté sa masse [22]. Puisque, par ailleurs, les cellules des disques imaginaux gardent une taille constante au cours de leur prolifération, qui multiplie par $10^3/10^4$ leur effectif, la croissance devient alors un facteur limitant du cycle, alors qu'elle ne l'était pas dans les cycles embryonnaires : la phase G2 réapparaît. Ces disques imaginaux sont à l'origine des organes de l'imago, tels qu'ils apparaîtront à la métamorphose.

La richesse des informations fournies par les études chez la drosophile ne doit pas nous faire oublier la contribution des autres organismes à la compréhension des mécanismes utili-

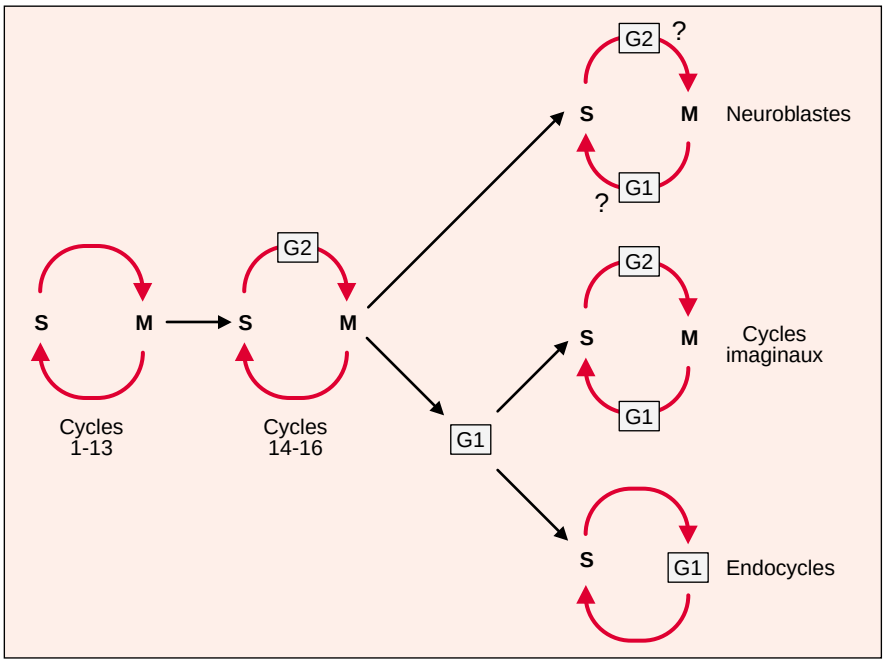


Figure 4. ***Variation des cycles cellulaires au cours du développement de la drosophile (schéma simplifié).*** *Les premiers cycles après la fécondation ne comportent pas de phase G, les cycles 14 à 16 comportant une phase G2, pas de phase G1. Les cycles se diversifient par la suite : les cellules des disques imaginaux, à l'origine des organes de l'adulte, ont un cycle complet, avec phases G1 et G2. D'autres cellules, dont les cycles sont réduits à une alternance G1/S, cessent de se diviser et deviennent donc polyploïdes. Le cycle des neuroblastes reste mal connu.*

sés pour moduler ou mettre un terme au cycle cellulaire au cours du développement.
Chez les mammifères, par exemple, la transgénèse a permis d'évaluer le rôle d'inhibiteurs des cdk tels que p21 et p27 dans le développement de la souris. Malgré les similitudes structurales de ces inhibiteurs, les phénotypes des souris chez lesquelles ces gènes ont été invalidés *(knock-out)* sont très différents. De manière inattendue, les souris déficientes en p21 se développent normalement et ne montrent pas de prédisposition au développement de cancers. Au contraire, les souris déficientes en p27 sont plus grandes que les témoins sauvages [23]. De plus, une hyperplasie est observée au niveau de plusieurs organes, comme le thymus et la rétine, qui expriment des niveaux élevés de p27 chez les animaux témoins. Ces phénotypes montrent que p27 contrôle négativement le cycle cellulaire dans ces organes.
Puisque l'entrée en différenciation d'une cellule se produit souvent après un nombre de divisions défini et prédictible, il a été proposé que ses précurseurs utilisent une horloge intrinsèque qui compte non le temps sidéral mais le nombre de divisions. Cette hypothèse a été étudiée à partir de cultures clonales de cellules précurseurs d'oligodendrocytes, responsables de la myélinisation du système nerveux central [24, 25]. Il a été ainsi montré que, cultivées à 33 °C, les cellules précurseurs se divisent plus lentement, mais cessent de se diviser et se différencient plus tôt, après un nombre de divisions plus réduit, que lorsqu'elles sont cultivées à 37 °C. Cela indique que l'horloge ne compte pas les divisions cellulaires, mais mesure le temps d'une autre manière. La protéine $p27^{KIP1}$ s'accumule plus vite à 33 °C qu'à 37 °C dans ces cellules, probablement parce que sa dégradation décroît davantage que sa synthèse lorsque l'on passe à 33 °C. Or la dégradation de $p27^{KIP1}$ semble dépendre d'un complexe SCF. Il est donc intéressant de remarquer que, chez *Caenorhabditis elegans,* des mutants de perte de fonction de CUL-1, l'homologue chez ce nématode de Cdc53 (un constituant de SCF), ont une différenciation retardée et parviennent à l'état adulte avec un nombre de cellules supérieur aux individus témoins [26]. Il est donc possible que nos cellules mesurent le temps et décident de se différencier en évaluant l'accumulation de petits inhibiteurs des CDK.

Vieillissement cellulaire et sénescence réplicative

Même lorsque les cellules sont débarrassées des contingences changeantes qui s'exercent sur chacune d'entre elles dans un organisme en développement, comme lors de la mise en culture à l'état dissociées, elles n'oublient pas leur histoire. Les cellules n'exécutent alors qu'un nombre limité de cycles, défini selon l'espèce, et contrôlé par des mécanismes de régulation intrinsèques aux cellules. Ce n'est que lorsque ces mécanismes sont déréglés qu'une cellule échappe à la limite imposée et devient en ce sens « immortelle » en se diluant dans sa descendance, le symbole du cycle devenant alors réalité. Malgré les apparences, les êtres unicellulaires n'échappent pas à la règle. Chez la levure de bière par exemple *(Saccharomyces cerevisiae)*, la division par bourgeonnement d'une cellule (dite cellule mère) produit une cellule fille plus petite, qui grandit et devient elle-même cellule mère de première génération au cycle suivant, la cellule d'origine continuant à se diviser par le même processus. Les analyses de pedigree [20] montrent que chaque cellule mère cesse définitivement de se diviser et meurt après une vingtaine de cycles : à chaque cycle, une fraction constante de la population est donc éliminée *(figure 5)*. Maintenues en culture dans des conditions ne permettant pas la différenciation, les cellules des organismes multicellulaires finissent également par épuiser leur potentiel prolifératif et perdent l'aptitude à répliquer leur ADN. Ce phénomène est nommé sénescence réplicative. Cependant, dans un organisme, la plupart des cellules sortent du cycle cellulaire et se différencient avant d'avoir épuisé leur potentiel prolifératif. Chez l'adulte, les tissus ayant conservé une capacité régénérative peuvent entrer en sénescence réplicative, mais les populations postmitotiques telles que les neurones, ne le peuvent pas, bien qu'ils puissent vieillir. La mise en culture de fibroblastes, de kératino-

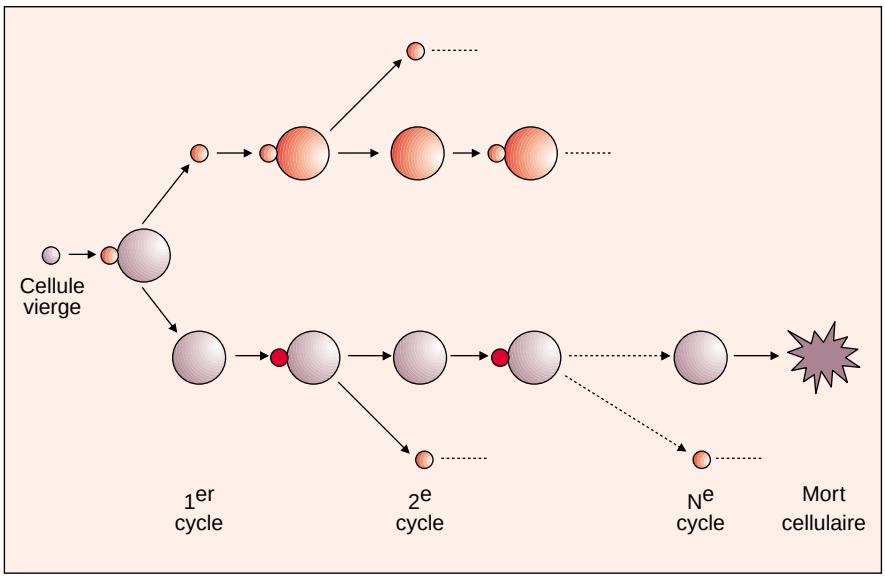


Figure 5. ***Mise en évidence de la sénescence réplicative par analyse de pedigree chez la levure de bière.*** *Une cellule vierge (bourgeon qui ne s'est jamais divisé) est représentée en bistre. Elle grandit et, à sa première division, produit une nouvelle cellule vierge (représentée en rouge ainsi que sa descendance) et une cellule mère de première génération (bistre) qui entre à nouveau en division. La probabilité pour que la cellule mère continue à se diviser diminue au fur et à mesure que les cycles se succèdent. Après un nombre de cycles caractéristique de la lignée (une vingtaine environ), la cellule mère cesse de répliquer son ADN (sénescence réplicative) et meurt.*

cytes, de cellules endothéliales de la cornée, de lymphocytes ou de cellules épithéliales du cristallin à partir d'individus dont les âges varient du stade fœtus à l'âge centenaire a montré que le nombre de doublements de population possibles en culture cellulaire diminue de 0,2 par an, en moyenne [27]. Ces résultats suggèrent que la sénescence réplicative existe réellement *in vivo*. L'utilisation d'un colorant histologique spécifique des cellules sénescentes *in vitro* permet de mettre en évidence certaines cellules dans les coupes de tissus, et la corrélation avec l'âge du donneur est excellente. Quelle est donc la nature de l'horloge cellulaire qui compte le temps et décide de l'entrée en sénescence réplicative ?

Au cours des dix dernières années, les scientifiques ont accumulé des preuves que les extrémités des chromosomes (télomères) des cellules somatiques humaines raccourcissent avec l'âge. Ce phénomène est lié au fait que la machinerie de réplication de l'ADN est incapable de répliquer les extrémités de molécules d'ADN linéaires. Selon l'hypothèse télomérique [28], l'horloge qui compte le temps et décide de l'entrée en sénescence réplicative est le raccourcissement des télomères qui accompagne la division des cellules somatiques normales *(m/s 1999, n°11, p.1286)*. De fait, l'immortalisation des cellules en culture *(voir ci-dessous)* est associée à l'expression d'un mécanisme de maintien des télomères. L'hypothèse télomérique a par ailleurs reçu un argument de poids avec la démonstration que l'expression ectopique d'une télomérase, l'enzyme qui maintient la taille des télomères, retarde de façon substantielle l'entrée en sénescence réplicative de cellules humaines. D'autres horloges ont cependant été proposées, comme la déméthylation des résidus cytosine de l'ADN [29]. Comme le raccourcissement des télomères, la déméthylation des résidus cytosine a lieu au cours des divisions successives, et ce processus est arrêté dans les cellules immortelles. Une corrélation a également été observée entre l'entrée en sénescence réplicative et l'accumulation de molécules d'ADN circulaire chez la levure [30]. Il est possible que plusieurs types de changements intracellulaires s'accumulent au cours des divisions successives et que la sénescence soit induite dès que l'un deux atteint un certain seuil. Il pourrait alors y avoir plusieurs horloges, même si l'une d'entre elles est « dominante », puisque dans les conditions normales elle atteint le seuil de déclenchement avant les autres.

Immortalisation

On sait depuis longtemps que les virus oncogènes à ADN provoquent l'échappement à la sénescence réplicative et l'immortalisation des cellules en culture [31]. Les virus pour lesquels on dispose du plus d'information sont les polyomavirus (SV40) et les papillomavirus : leur aptitude à permettre l'échappement à la sénescence dépend de l'expression de certaines oncoprotéines qui lient et inactivent les protéines cellulaires p53 et pRb, même si l'inactivation de ces protéines n'est pas suffisante pour l'immortalisation *(m/s 1994, n°2, p. 206)*.

La protéine p53 contrôle l'expression de $p21^{CIP1}$, inhibiteur de nombreux complexes cdk, dont cdk2-cycline E et cdk4-cycline D. Cet inhibiteur du cycle cellulaire bloque la phosphorylation de pRb, nécessaire à l'entrée en réplication. La délétion du gène *p21* augmente de 20 à 30 doublements cellulaires le potentiel prolifératif de fibroblastes humains, et les cellules accumulent réellement p21 lorsqu'elles approchent de la sénescence [32]. Néanmoins, les cellules délétées de p21, et même de pRb, finissent par s'arrêter de proliférer, non par incapacité à se répliquer, mais parce qu'elles meurent au moins aussi vite qu'elles se multiplient. Cet état stationnaire bien différent de la sénescence réplicative est appelé « crise ».

Quelle que soit la nature exacte de la crise, il est important de souligner que l'immortalisation représente l'échappement à la crise et non à la sénescence réplicative. Elle n'est donc pas seulement due à la suppression de l'expression de p53 ou à ses conséquences, comme l'expression de p21. L'activation d'un mécanisme de maintien de la taille des télomères est toujours observée dans les fibroblastes humains immortalisés et l'expression d'une télomérase est suffisante pour immortaliser des fibroblastes humains. A l'inverse, le raccourcissement des télomères continue pendant la période correspondant au gain de potentiel prolifératif provoqué par l'expression de protéines virales inactivant p53 et pRb. Une interprétation plausible de ces résultats pourraît être que p53 (et donc p21) contrôle l'entrée en sénescence et constitue un relais nécessaire à la sénescence réplicative provoquée par le raccourcissement des télomères. L'échappement au raccourcissement des télomères serait impératif pour échapper à la mort cellulaire associée à la crise. Cela pourrait être dû au fait que, si les extrémités des chromosomes ne sont plus protégées par les télomères, l'instabilité génomique devient trop grande. Dans le syndrome de Werner [33], une maladie génétique affectant une hélicase de l'ADN et caractérisée par un vieillissement prématuré des tissus pouvant se diviser, on observe d'ailleurs une vitesse accrue de raccourcissement des télomères associée à d'importantes délétions chromosomiques.

Conclusions

Le regard que nous portons sur le cycle cellulaire s'est profondément modifié au cours de la dernière décennie du XXe siècle. On a longtemps pensé que le cycle cellulaire mettait en jeu des effets dominos où chaque événement provoque celui qui le suit dans le temps, entraînant le cycle dans un mouvement de type uniforme. La conception actuelle est plus nuancée et fait intervenir certaines transitions du cycle faisant l'objet de contrôles sophistiqués, dont les complexes cdk/cycline sont les rouages sur lesquels s'exercent des mécanismes de surveillance, introduisant éventuellement des délais dans l'exécution des transitions et chargés du maintien de l'intégrité du génome. Il est devenu évident que les mécanismes de régulation du cycle cellulaire ont été conservés au cours de l'évolution des cellules eucaryotes. La plupart des complexes multiprotéiques impliqués dans ces mécanismes, comme les complexes cdk/cycline et l'APC, exerçaient certainement déjà les mêmes fonctions chez l'ancêtre commun à la levure et à l'homme.

Au cours de la vie d'un individu, le cycle cellulaire subit des variations spatio-temporelles programmées, d'origine génétique et épigénétique,

permettant le maintien de la forme de l'adulte au sein de l'espèce. La dérégulation de ces programmes peut conduire à des désordres considérables incompatibles avec la survie de l'individu, par exemple au cancer. Chaque cellule ayant pour origine celle qui l'a précédée dans le temps, la variation de ces programmes conduit aussi aux différences morphologiques observées entre individus d'une même espèce et, au-delà de la variabilité individuelle, elle a pu jouer un rôle essentiel dans l'évolution des espèces ■

RÉFÉRENCES

1. Nagano H, Hirai S, Okano K, Ikegami S. Achromosomal cleavage of fertilized starfish eggs in the presence of aphidicolin. *Dev Biol* 1981 ; 85 : 409-15.

2. Picard A, Harricane MC, Labbé JC, Dorée M. Germinal vesicle components are not required for the cell cycle oscillator of the early starfish embryo. *Dev Biol* 1988 ; 128 : 121-8.

3. Morgan DO. Cyclin-dependent kinases : engines, clocks, and microprocessors. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1997 ; 13 : 261-91.

4. Labbé JC, Capony JP, Caput D, *et al.* MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J* 1989 ; 8 : 3053-8.

5. Nigg EA. Cyclin-dependent protein kinases : key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays* 1995 ; 17 : 471-80.

6. Doree M, Galas S. The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. *FASEB J* 1994 ; 8 : 1114-21.

7. Follette PJ, Duronio RJ, O'Farrell PH. Fluctuations in cyclin E levels are required for multiple rounds of endocycle S phase in Drosophila. *Curr Biol* 1998 ; 8 : 235-8.

8. Le Cam L, Polanowska J, Fabbrizio E, *et al.* Timing of cyclin E gene expression depends on the regulated association of a bipartite repressor element with a novel E2F complex. *EMBO J* 1999 ; 7 : 1878-90.

9. Devault A, Martinez AM, Fesquet D, *et al.* MAT1 (« ménage à trois ») a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and Xenopus CAK. *EMBO J* 1995 ; 14 : 5027-36.

10. Nakayama KI, Nakayama K. Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors : brakes of the cell cycle engine during development. *BioEssays* 1998 ; 20 : 1020-9.

11. Murray A, Hunt T. *The cell cycle : an introduction.* New York : Freeman and Co, 1993 : 251 p.

12. Zacharias W, Nasmyth K. Whose end is destruction : cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 1999 ; 13 : 2039-58.

13. Skowyra D, Koepp DM, Kamura T, *et al.* Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCF-Grr1 and Rbx1. *Science* 1999 ; 284 : 662-5.

14. Hartwell L, Weinert T. Checkpoints : controls that ensure thre order of cell cycle events. *Science* 1989 ; 246 : 629-34.

15. Zeng Y, Piwnica-Worms H. DNA damage and replication checkpoints in fission yeast require nuclear exclusion of the cdc25 phosphatase *via* 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol* 1999 ; 19 : 7410-9.

16. Pola BS, Banzet N, Dall'Ava J, *et al.* Les mitochondries, carrefour entre la vie et la mort cellulaire. *Med Sci* 1998 ; 14 : 18-25.

17. Nicklas RB. How cells get the right chromosomes. *Science* 1997 ; 275 : 632-7.

18. Cahill DP, Lenganer C, Yu J, *et al.* Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998 ; 392 : 300-3.

19. Beamish H, Williams R, Chen P, Lavin MF. Defects in multiple cell cycle checkpoints in ataxia-telangiectasia post-irradiation. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 20486-93.

20. Jazwiaski SM. Longevity, genes and aging. *Science* 1996 ; 273 : 54-9.

21. Foe VE. Mitotic domains reveal early commitment of cells in Drosophila embryos. *Development* 1989 ; 107 : 1-22.

22. Edgar BA, Lehner CF. Developmental control of cell cycle regulators : a fly's perspective. *Science* 1996 ; 274 : 1646-52.

23. Nakayana K, Ishida N, Shirane M, *et al.* Mice lacking $p27^{KIP1}$ display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia and pituitary tumors. *Cell* 1996 ; 85 : 707-20.

24. Gao FB, Durand B, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells count time but not cell divisions before differenciation. *Curr Biol* 1997 ; 7 : 152-5.

25. Bögler O, Noble M. Measurement of time in oligodendrocyte-type 2-astrocytes progenitors is a cellular process distinct from differenciation or division. *Dev Biol* 1994 ; 162 : 525-38.

26. Kipreos ET, Xing JP, He WW, Hedgecock EM. Cul-1 is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family. *Cell* 1996 ; 85 : 829-39.

27. Faragher RGA, Kipling D. How might replicative senescence contribute to human aging ? *BioEssays* 1998 ; 20 : 985-91.

28. Reddel RR. A reassesment of the telomere hypothesis of senescence. *BioEssays* 1998 ; 20 : 977-84.

29. Wilson VL, Jones PA. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science* 1983 ; 220 : 1055-7.

30. Sinclair DA, Guarente L. Extrachromosomal rDNA circles-a cause of aging in yeast. *Cell* 1997 ; 91 : 1033-42.

31. Varmus HE. The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annu Rev Genet* 1984 ; 18 : 553-612.

32. Brown JP, Wei W, Sedivy JM. Bypass of senescence after disruption of $p21^{CIP1}$ gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 1997 ; 277 : 831-4.

33. Watt PM, Hickson ID, Borts RH, Louis EJ. SGS1, a homologue of the Bloom's and Werner's syndrome genes is required for maintenance of genome stability in S. cerevisiae. *Genetics* 1998 ; 144 : 935-49.

m/s 2000

Summary

The time of the cell cycle

Living cells reproduce by duplicating their content and dividing in two. At a minimum, the cell cycle comprises the set of processes that a cell must go through in order to faithfully replicate its DNA and to segregate duplicated chromosomes (mitosis) in two separate daughter cells. Recent data suggest that a central system operates, which is distinct from the machinery performing the essential processes of the mitotic cell cycle. This central clock is regulated at specific checkpoints where feedback signals from the downstream processes can delay the triggering of the next step before the previous one is achieved. This biochemical device of cell cycle control is based on the regulation of the activity of cyclin-dependent protein kinases (cdks). Cyclins bind to cdks and regulate their ability to phosphorylate specific substrates. Moreover, the activity of some cdks, and therefore the ability of a given cell to divide, seems to depend on its « history ». This information could play a crucial role in various processes such as differenciation, organogenesis and senescence.

TIRÉS À PART

M. Dorée.