

Le cycle cellulaire analysé par micro-injection dans les cellules somatiques des mammifères : rôles distincts des cyclines A et B

Le cycle cellulaire connaît un renouveau d'intérêt depuis que la convergence des approches génétiques (sur le cycle de division de la levure) et biochimiques (sur la maturation des ovocytes d'invertébrés marins et d'amphibiens) a permis d'identifier un inducteur mitotique universel : la protéine kinase p34^{cdc2} [1-3]. Bien que les deux types de systèmes initialement privilégiés dans ces études puissent paraître éloignés de toute implication ou retombée médicale, une meilleure connaissance des différents mécanismes qui ouvrent ou verrouillent les voies d'activation de la division cellulaire est d'une importance et d'un intérêt évidents. A cet égard, il est paradoxal de constater que la plupart des travaux sur ce thème dans les cellules mammifères sont essentiellement conduits sur une lignée cellulaire transformée (cellules Hela). Les expériences décrites dans cet article ont été menées sur un système de cellules fibroblastiques en culture (REF52, *rat embryo fibroblast*) non immortalisées et non transformées. L'état non transformé de ces cellules est garanti principalement par deux critères : l'absolue dépendance vis-à-vis de facteurs de croissance exogènes et l'arrêt de croissance par inhibition de contact. Le corollaire de ces propriétés est de permettre une méthode simple de synchronisation dans le cycle de division cellulaire, sans recours à l'usage de produits antimitotiques particuliers. Il suffit, en effet, de transférer les cellules dans un milieu de culture sans facteurs de croissance (sans sérum), pour une durée d'au moins un cycle de division (24 à 30 heures), pour obtenir une population de cellules (plus de 95 %) arrêtées à l'état « quiescent » (aussi appelé G0). Lors de l'addition de sérum, ces cellules réinitient un cycle de division de façon

synchrone. Ce cycle cellulaire, se déroulant sur une période d'environ 24 à 27 heures, est constitué de quatre phases successives : G1, précédant la phase de réplication de l'ADN (15 à 17 heures) ; S, synthèse de l'ADN (3 à 4 h) ; G2, précédant la mitose (5 à 6 h) et M, division mitotique (40 à 60 min) (voir figure 1, p. 376).

Notre approche pour étudier les mécanismes de régulation contrôlant ces différentes phases dans les cellules mammifères, a consisté à moduler, par micro-injection, le niveau intracellulaire de différents effecteurs potentiellement impliqués dans ces mécanismes. Les conséquences de ces perturbations spécifiques sur la progression dans le cycle de division ainsi que sur la morphologie et le métabolisme cellulaires sont alors examinées. Nous avons en particulier utilisé cette approche pour examiner les fonctions potentielles d'une classe de protéines récemment identifiées : les cyclines, dont l'importance dans le contrôle du cycle cellulaire est de plus en plus documentée. Initialement décrites comme des protéines s'accumulant périodiquement durant les premiers cycles de division d'œufs d'oursin, deux principales classes de ces protéines, A et B, distinguées par leur degré d'homologie de séquence, ont été identifiées de la levure à l'homme et ont toutes en commun de présenter un profil d'expression qui se modifie cycliquement lors de la division cellulaire [4, 5]. Toutes sont capables de s'associer à la protéine p34^{cdc2} ou à des protéines apparentées, représentant ainsi une sous-unité régulatrice de l'activité kinase p34^{cdc2}. Cependant, le rôle précis de chaque type de complexe reste encore largement incompris. **Cycline B et induction mitotique** L'induction et le déroulement de la mitose sont certainement les processus

pour lesquels la fonction des cyclines est la mieux documentée. La cycline B s'associe à la protéine kinase p34^{cdc2} pour former le MPF (*maturation promoting factor*), activité nécessaire et suffisante pour induire, en l'absence de toute synthèse protéique, une mitose complète lors de la maturation des ovocytes et au cours des divisions embryonnaires précoces chez les eucaryotes [1-3, 6]. Dans les cellules somatiques en culture, la synthèse de la cycline B est détectée uniquement en fin de phase G2, aussi bien dans les cellules Hela [8] que dans les fibroblastes normaux (nos observations non publiées). La protéine s'accumule d'abord dans le cytoplasme avant la mitose, puis passe dans le noyau en prophase avant la rupture de l'enveloppe nucléaire (voir figure 1). Dans les cellules en interphase, nous avons montré que la micro-injection de la kinase p34^{cdc2} purifiée, associée à la cycline B, induit des réarrangements structuraux et du cytosquelette similaires à ceux observés lors de l'entrée en prophase mitotique [7]. Ces effets sont cependant insuffisants pour induire une mitose prématurée des cellules en interphase. On n'observe, en effet, ni la formation d'un fuseau mitotique de microtubules ni la dissolution de l'enveloppe nucléaire, deux événements qui accompagnent une induction mitotique complète. De façon similaire, la micro-injection de la cycline B seule, en produisant une activation de la kinase p34^{cdc2} endogène, induit un phénotype prémitotique identique à celui obtenu après micro-injection de la protéine kinase p34^{cdc2} purifiée (Lamb *et al.*, observations non publiées).

Dans l'ensemble, ces résultats confirment clairement, dans les cellules somatiques, le rôle essentiel de la cycline B dans l'activation de la kinase

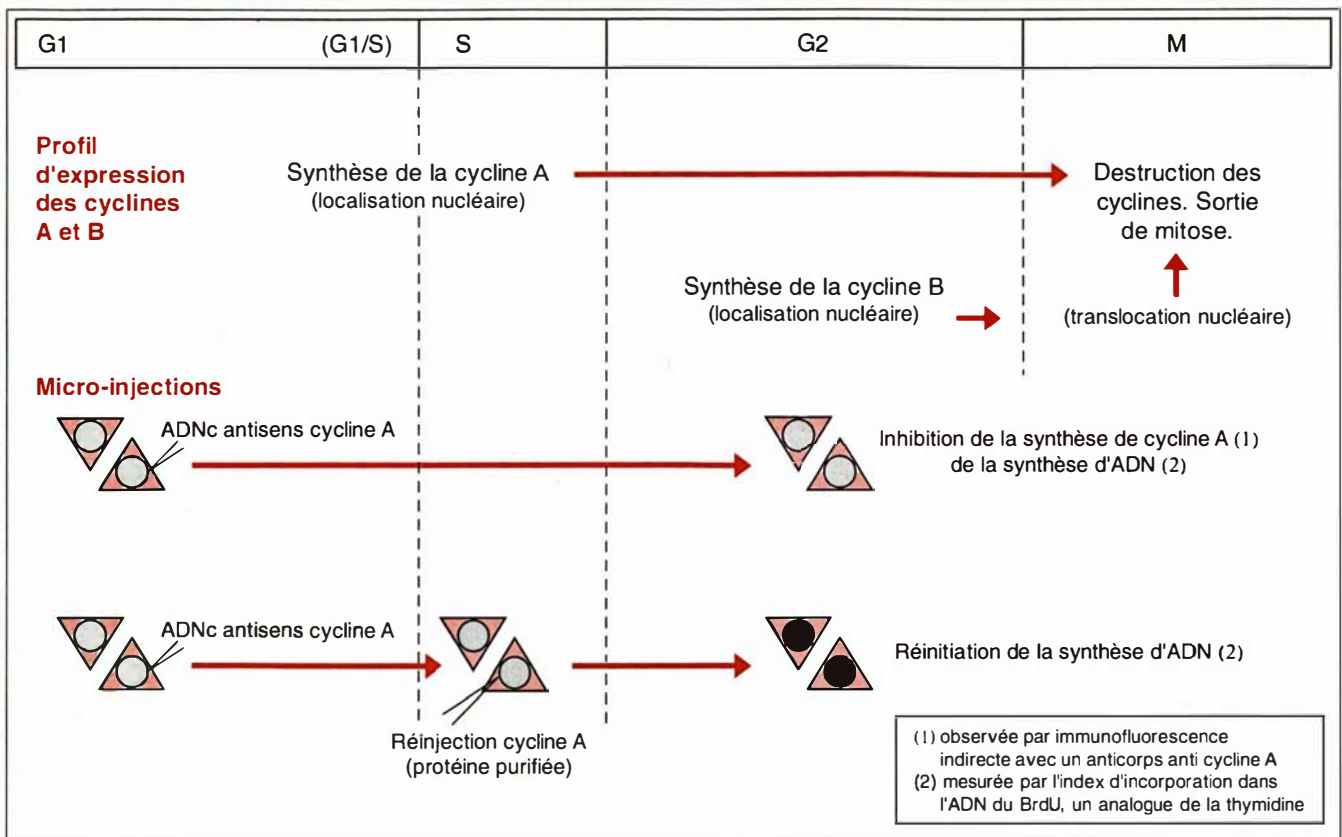


Figure 1. Schéma des expériences de micro-injection analysant le rôle de la cycline A en phase S dans les cellules mammifères.

$p34^{cdc2}$ et l'induction de la mitose. Il apparaît cependant que, contrastant avec les observations faites sur les ovocytes et lors des divisions embryonnaires précoces, la cycline B n'est pas suffisante pour induire une mitose prématurée. Ainsi, d'autres voies de régulation sont-elles mises en place dans les cellules somatiques, dont l'activation-inactivation est nécessaire pour produire une induction mitotique complète. A cet égard, nos observations utilisant la micro-injection d'un inhibiteur spécifique de la protéine kinase AMPc-dépendante (kinase A) montrent que l'inactivation de cette kinase fait partie intégrante du processus d'induction mitotique et agit de façon complémentaire à l'activation de $p34^{cdc2}$ [9]. On observe en effet une rapide condensation de la chromatine dans les cellules où l'activité de la kinase A a été spécifiquement inhibée par micro-injection de son inhibiteur PKI. De plus, la co-injection de la kinase mitotique $p34^{cdc2}$ et de PKI

induit une dissolution complète de l'enveloppe nucléaire, un événement qui n'est observé avec aucun des deux composants injectés séparément. Il semble, par conséquent, que l'orchestration des différents réarrangements qui accompagnent l'entrée en mitose (condensation de la chromatine, compaction de la forme cellulaire, dissolution de la membrane nucléaire et formation d'un fuseau mitotique) fasse appel, non seulement à la phosphorylation de certains sites protéiques par la kinase $p34^{cdc2}$, mais aussi à la déphosphorylation conjointe d'autres sites sur les substrats clés impliqués dans ces réarrangements.

Cycline A et contrôle de la phase S

Face à ce rôle « mitotique » de $p34^{cdc2}$ et de la cycline B, il devient maintenant de plus en plus clair que d'autres points de régulation au cours du cycle cellulaire impliquent l'interaction de $p34^{cdc2}$ — ou de protéines apparentées — avec différentes classes de sous-unités cyclines. A ce titre, nombre

d'observations récentes ont permis de mieux resserrer le rôle potentiel joué par la cycline A au cours du cycle cellulaire. Dans les cellules somatiques de mammifères en culture, la cycline A est exprimée beaucoup plus précocement que la cycline B, puisque son expression est détectée, aussi bien au niveau de son ARN messager que la protéine, dès la transition G1/S [8, 10]. Cette expression précoce est associée à une localisation strictement nucléaire, une autre caractéristique qui la distingue nettement de la cycline B. Outre son profil d'expression, plusieurs observations suggéraient un rôle possible de la cycline A dans le processus de répllication de l'ADN. D'une part, dans des extraits d'œufs de xénope, la déplétion de l'activité kinase $p33^{cdc2}$ ($p33^{cdc2}$ est une protéine apparentée à $p34^{cdc2}$ qui s'associe à la cycline A dès la phase S [8]) a pour conséquence d'inhiber la synthèse d'ADN [11]. D'autre part, d'Urso *et al.* [12] ont purifié un facteur appelé RF-S, à par

tir de cellules Hela en phase S, capable d'activer la synthèse d'ADN dans des extraits cellulaires en phase G1. RF-S contient, outre p34^{cdc2}, la cycline A. Enfin, la déplétion de la cycline A d'extraits d'œufs de xénope entraîne la perte des mécanismes de contrôle qui assurent le bon déroulement de la phase S avant l'entrée en mitose [13].

Ces observations nous ont conduits à examiner le rôle de la cycline A au cours de la phase S, en utilisant comme principale approche la micro-injection dans des fibroblastes normaux [10]. Nous avons pu montrer que la micro-injection, dans des cellules en phase G1, d'anticorps spécifiques dirigés contre la cycline A humaine ou de plasmides codant pour un ADN complémentaire (ADNc) antisens cycline A (sous le contrôle d'un promoteur eucaryote fort) entraîne une inhibition de la synthèse d'ADN dans les cellules injectées (voir figure). Cette incapacité des cellules à initier la phase S est corrélée à l'absence de l'expression nucléaire de la cycline A dans les cellules injectées avec l'ADNc antisens. La spécificité de cet effet inhibiteur de l'injection d'ADNc antisens cycline A est démontrée par deux résultats : (1) la seule réinjection de cycline A purifiée dans les cellules préalablement injectées avec l'ADNc antisens suffit au redémarrage de la synthèse d'ADN ; (2) l'injection de cycline B dans les cellules inhibées par l'injection d'ADNc antisens cycline A ne permet pas, contrairement à la cycline A, une levée de l'inhibition de la synthèse d'ADN. En outre, des observations similaires ont été obtenues dans un système cellulaire différent (cultures primaires d'hépatocytes) [14]. Ces résultats témoignent d'un rôle capital et spécifique de la cycline A dans le processus de réplication de l'ADN. Ils illustrent également les nombreuses applications potentielles de la technique de micro-injection d'ADNc antisens. Il est en effet possible de démontrer, par la réinjection d'une protéine purifiée, la spécificité de l'effet obtenu en neutralisant l'expression de cette protéine.

Bien que les expériences précédemment décrites illustrent clairement l'implication de la cycline A en phase S, son rôle précis dans le processus de réplication de l'ADN reste à élucider. Dif-

férents travaux récents ont mis en évidence l'interaction de la cycline A avec deux types de facteurs ayant un rôle clé dans le contrôle de la prolifération.

1. D'une part, la cycline A est trouvée en association avec une famille de protéines définies comme anti-oncogènes : p53, p105^{Rb} et p107, qui fonctionnent comme des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire, vraisemblablement en contrôlant la transcription de gènes impliqués dans l'entrée en phase S [15, 16]. L'activité de ces anti-oncogènes pourrait être modulée par leur phosphorylation qui présente deux caractéristiques : (a) elle est dépendante du cycle cellulaire, n'apparaissant qu'à partir de la transition G1/S ; (b) le médiateur principal de cette phosphorylation est la protéine kinase p34^{cdc2}, ou une kinase apparentée p33^{cdk2}, que l'on trouve spécifiquement associée à la cycline A [15, 16].

2. D'autre part, la cycline A interagit avec le facteur de transcription cellulaire E2F, également appelé DRTF1, dans des cellules en phase S [17-19]. L'activité de E2F est contrôlée négativement *via* son association avec des anti-oncogènes, association qui est déplacée par les oncogènes viraux grand T de SV40 et E1A d'adénovirus (*m/s n° 8, vol. 7, p. 864*) [20, 21, 24].

L'ensemble de ces observations suggère que le complexe p33^{cdk2}-cycline A serait capable d'activer E2F par phosphorylation des anti-oncogènes qui s'y trouvent liés. De plus, son association à E2F pourrait permettre de cibler p33^{cdk2}-cycline A vers d'autres facteurs impliqués dans la réplication de l'ADN, qu'elle activerait par phosphorylation [19]. Ce rôle de la cycline A dans la synthèse de l'ADN suggère qu'elle puisse constituer une cible potentielle des dérèglements survenant dans la transformation cellulaire. Plusieurs observations viennent en effet à l'appui d'une telle hypothèse. Une copie du génome du virus de l'hépatite B a été retrouvée insérée dans le gène de la cycline A dans un cas d'hépatocarcinome humain [22]. De plus, l'oncogène PRAD1 — sur-exprimé dans certaines tumeurs — codé pour une protéine présentant de nombreuses similarités avec les cyclines [23]. Finalement, le produit du gène E1A de l'adénovirus présente la

caractéristique de se lier à la cycline A et à p105^{Rb}, et de les dissocier du complexe E2F (*m/s n° 8, vol. 7, p. 864*) [24]. Ce détournement de la fonction de protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire serait ainsi à la base du processus de transformation ■

Franck Girard

Ned Lamb

Anne Fernandez

CRBM, Cnrs-Inserm, unité de biologie cellulaire, BP 5051, 34033 Montpellier Cedex, France.

RÉFÉRENCES

1. Dorée M, Le complexe cdc-2-cycline : un facteur universel pour l'entrée en mitose. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 8-9.
2. Le Peuch C. La régulation de la division cellulaire. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 10-7.
3. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990 ; 344 : 503-8.
4. Hunt T. Cell cycle gets more cyclins. *Nature* 1991 ; 350 : 462-3.
5. Norbury C, Nurse P. Cyclins and cell cycle control. *Curr Biol* 1991 ; 1 (1) : 23-4.
6. Dorée M. Control of M-phase by maturation promoting factor. *Curr Op Cell Biol* 1990 ; 2 : 269-73.
7. Lamb NJC, Fernandez A, Watrin A, Labbé JC, Cavadore JC. Microinjection of p34^{cdc2} kinase induces marked changes in cell shape, cytoskeletal organization and chromatin structure in mammalian fibroblasts. *Cell* 1990 ; 60 : 151-65.
8. Pines J, Hunter T. Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell cycle and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 1991 ; 115 : 1-17.
9. Lamb NJC, Cavadore JC, Labbé JC, Maurer RA, Fernandez A. Inhibition of cAMP-dependent protein kinase plays a key role in the induction of mitosis and nuclear envelope breakdown in mammalian cells. *EMBO J* 1991 ; 10 : 1523-33.
10. Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJC. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 1991 ; 67 : 1169-79.

RÉFÉRENCES

11. Blow JJ, Nurse P. A cdc2-like protein is involved in the initiation of DNA replication in *Xenopus* eggs extracts. *Cell* 1990 ; 62 : 855-62.
12. D'Urso G, Marracino RL, Marshak DR, Roberts JM. Cell cycle control of DNA replication by a homologue from human cells of the p34^{cdc2} protein kinase. *Science* 1990 ; 250 : 786-91.
13. Walker DH, Maller JL. Role for cyclin A in the dependance of mitosis on completion of DNA replication. *Nature* 1990 ; 354 : 314-7.
14. Zindy F, Lamas E, Chenivesse X, *et al.* Cyclin A is required in S-phase in normal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1992 ; 182 : 1144-54.
15. Kahn A. L'anti-oncogène p53 : un facteur de transcription lié au cycle cellulaire. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 821-3.
16. Marshall CJ. Tumor suppressor genes. *Cell* 1991 ; 64 : 313-26.
17. Mudryj M, Devoto SH, Hiebert SW, Hunter T, Pines J, Nevins JR. Cell cycle regulation of the E2F transcription factor involves an interaction with cyclin A. *Cell* 1991 ; 65 : 1243-53.
18. Bandara LR, Adamczewski JP, Hunt T, La Thangue NB. Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcription factor. *Nature* 1991 ; 352 : 249-51.
19. Devoto SH, Mudryj M, Pines J, Hunter T, Nevins JR. A cyclin A-protein kinase complex possesses sequence specific DNA binding activity : p33^{cdc2} is a component of the E2F-cyclin A complex. *Cell* 1992 ; 68 : 167-76.
20. Shirodkar S, Ewen M, Decaprio JA, Morgan J, Livingston DM, Chittenden T. The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A : complex in a cell cycle dependent manner. *Cell* 1992 ; 68 : 157-66.
21. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the Rb protein. *Cell* 1991 ; 65 : 1053-61.
22. Wang J, Chenivesse X, Henglein B, Bréchet C. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1990 ; 343 : 555-7.
23. Motokura T, Bloom T, Kim HJ, *et al.* A novel cyclin encoded by a bc11 linked candidate oncogene. *Nature* 1991 ; 350 : 512-5.
24. Giordano A, McCall C, White P, Franza BR. Human cyclin A and the retinoblastoma protein interact with similar but distinguishable sequences in the adenovirus E1A gene product. *Oncogene* 1991 ; 6 : 481-5.

TIRÉS A PART

N. Lamb.