

# Comment mettre en route un cycle de réplication de l'ADN chez les eucaryotes ?

Stéphane Chevalier  
Nathalie Chevalier

## Société Française de Génétique

### Président

Jean Générmont, Université Paris XI, Orsay

### Secrétaire général

Michel Werner, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette

### Trésorière

Cécile Fairhead, Institut Pasteur, Paris

### Vice-présidents

Roland Berger, Institut de Génétique Moléculaire, Paris

Alain Berheim, Institut Gustave-Roussy, Villejuif

Claude Chevalet, INRA, Centre de Recherches de Toulouse

Serge Potier, Université Louis-Pasteur, Strasbourg

Hervé Thiellement, INRA, DGAP, Versailles

### Autres membres du bureau

Anne Cambon-Thomsen, CNRS Toulouse

Lionel Larue, Institut Curie, Orsay

Marc Lipinski, Institut Gustave-Roussy, Villejuif

Louise Telvi, Hôpital Saint-Vincent-de-Paul, Paris

*Prière d'adresser toute correspondance au Secrétariat général de la SFG, Michel Werner, Service de biochimie et de génétique moléculaire, CEA Saclay, bâtiment 142, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.*

### Comité de rédaction

A. Bernheim

M. Bolotin-Fukuhara

M. Fellous

J. Générmont

M.C. Hors-Cayla

B. Michel

R. Motta

A. Nicolas

M. Solignac

S. Sommer

P. Thuriaux

D. de Vienne

### Secrétaire

M.-L. Prunier

Le cycle cellulaire comporte deux phases majeures : la phase de division cellulaire (phase M ou mitose) et l'interphase. L'interphase est composée de la phase de réplication de l'ADN (phase S) et de deux phases intercalaires (G1 et G2). La phase G1 correspond à une période de synthèse protéique intense responsable de la croissance cellulaire. Elle précède la phase S au cours de laquelle la cellule produit une copie exacte de son génome. La cellule entre alors en phase G2 pendant laquelle les chromatides-sœurs restent appariées. En phase M, les chromatides-sœurs se séparent pour donner naissance à deux cellules filles identiques entre elles, et identiques à la cellule initiale. La réplication des chromosomes est bidirectionnelle et débute en de très nombreux sites sur l'ADN. La répartition des fourches de réplication sur le génome est un processus finement contrôlé assurant la duplication complète du génome au cours d'un cycle cellulaire. Un défaut dans la coordination des événements qui contrôlent ce processus entraînerait, soit une « sur-réplication », soit une « sous-réplication » de certaines sections du génome et donc une instabilité génétique. En 1963, Jacob, Brenner et Cuzin proposaient le modèle du réplicon afin d'expliquer comment est contrôlée la réplication de l'ADN [1]. Ce modèle suggère l'existence d'une protéine « initiatrice » agissant sur une séquence nucléotidique précise, le « réplicateur », qui permet la mise en route de la réplication de l'ADN (figure 1). Le terme « réplicateur » est souvent utilisé pour désigner une origine de réplication (ori). De nombreux complexes protéiques, impliqués dans

le contrôle du début de la réplication, s'associent à ces origines.

L'identification du complexe protéique ORC (*origin recognition complex*), s'associant spécifiquement aux origines de réplication de la levure *Saccharomyces cerevisiae* [2] a permis de caractériser les protéines homologues chez les métazoaires. Dans toutes les espèces étudiées, le complexe ORC interagit avec d'autres protéines s'associant également à la chromatine [3]. Parmi celles-ci, la protéine Cdc6 est nécessaire au déclenchement de la réplication [4]. Les protéines de la famille des MCM

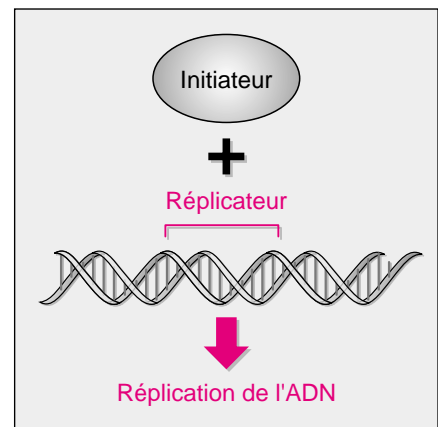


Figure 1. **Le modèle du réplicon.** Ce modèle propose qu'une protéine « initiatrice » vienne s'associer à une séquence spécifique de l'ADN nommée « réplicateur » [1]. La combinaison des modes de régulation en cis et en trans permet à d'autres protéines de s'associer à la chromatine et, ainsi, de mettre en route la réplication de l'ADN.

(*mini-chromosome maintenances*) s'associent aussi à la chromatine. Dans le système acellulaire des extraits d'œufs de xénope, qui récapitule *in vitro* les événements du cycle cellulaire qui interviennent *in vivo*, les protéines MCM font partie de l'activité RLF (*replication licensing factor*) qui est un facteur nécessaire au déclenchement de la réplication. Le RLF « prépare » les origines à être répliquées et empêche qu'une même section du génome soit re-répliquée au cours d'un même cycle cellulaire [5, 6].

Les phases S et M du cycle cellulaire des eucaryotes sont contrôlées par l'activation périodique de complexes composés d'une sous-unité catalytique : une protéine-kinase Cdk (*cyclin-dependent kinase*), et d'une sous-unité régulatrice : une cycline. En l'occurrence, la mitose est contrôlée par une activité biochimique retrouvée chez toutes les espèces étudiées : le MPF (*M-phase ou mitosis promoting factor*) qui est composé de la protéine-kinase Cdc2 associée à une cycline de type B. Le SPF (*S-phase promoting factor*) a été défini par analogie au MPF mais la situation paraît plus compliquée car plusieurs Cdk associées à différentes cyclines sont capables de provoquer l'entrée en phase S [7].

Nous indiquerons, dans cette revue, les progrès récents effectués pour identifier les origines de réplication chez les métazoaires. Puis nous présenterons les nombreux complexes protéiques impliqués dans le contrôle de l'entrée en phase S. Enfin, sera discutée l'importance des complexes Cdk/cycline dans le contrôle de la réplication de l'ADN.

### Les origines de réplication

Chez la levure *S. cerevisiae*, les origines de réplication ont été précisément caractérisées et nommées ARS (*autonomously-replicating sequences*). Les ARS contiennent une séquence minimale de 11 nucléotides nommée ACS (*ARS consensus sequence*) qui permet la formation des fourches de réplication [3]. Cependant, les origines de réplication chez les métazoaires ne sont pas aussi bien définies que chez la levure *S. cerevisiae*.

Chez l'amphibien *Xenopus laevis*, la transcription des gènes est inactive au cours des 12 premiers cycles cellulaires de l'embryon. Dans ce contexte particulier, les gènes des ARN ribosomiques (*ARNr*) ne sont donc pas transcrits et le début de la réplication de ces gènes est indépendant d'une séquence nucléotidique spécifique. Puis, quand l'embryon atteint le stade blastula, la transcription des gènes *ARNr* devient active et la fréquence de déclenchement dans les unités de transcription diminue, alors qu'elle reste stable dans les espaces intergéniques [8]. Ces études effectuées dans un système embryonnaire indiquent que la localisation des origines de réplication sur le génome peut être définie, soit par les changements de structure de la chromatine qui déterminent les régions de transcription, soit par le processus de transcription lui-même.

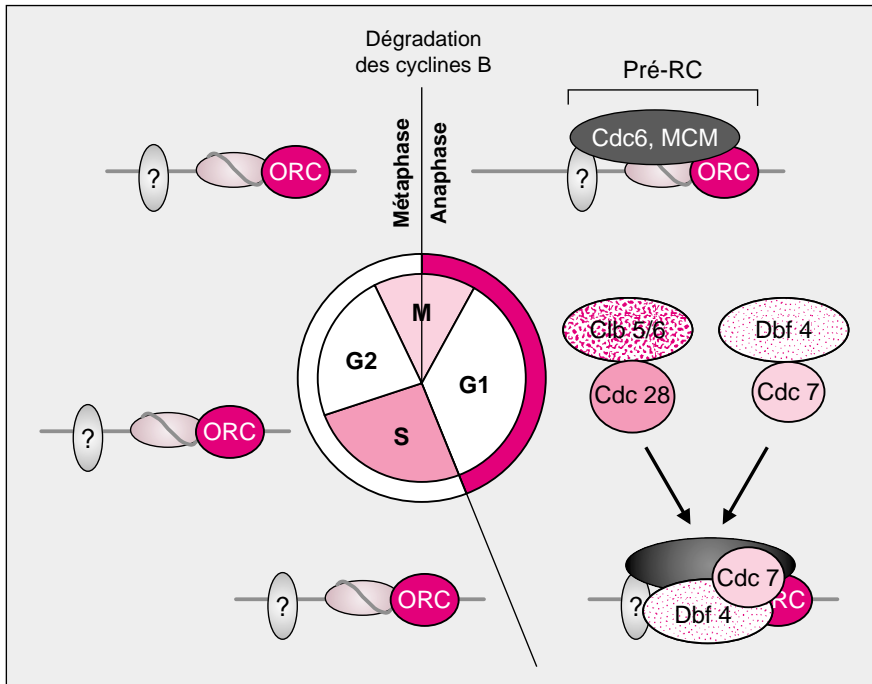
Dans le groupe de gènes codants pour la  $\beta$ -globine humaine, le déclenchement de la réplication à une origine donnée semble indépendant du processus de transcription. Une origine de réplication a été définie dans une région de 2 kilobases dans le locus de la  $\beta$ -globine humaine [9]. Située à 50 kilobases en amont de cette origine, une région (LCR pour *locus control region*) contrôle la transcription, la structure de la chromatine et la réplication du locus (*m/s n° 3, vol. 8, p. 255*). Une insertion dans le LCR inhibe la transcription mais n'a aucun effet sur la réplication. En revanche, une délétion naturelle du LCR, intervenant dans un cas particulier de thalassémie, inhibe la réplication à partir de cette origine mais le locus est tout de même répliqué à partir d'une origine située en aval [10]. Cela indique que l'interaction entre des séquences éloignées les unes des autres est nécessaire pour mettre en route la réplication de l'ADN.

Des expériences de transfert de noyaux de cellules CHO (*chinese hamster ovary*) dans des extraits d'œufs de xénope suggèrent que la structure des noyaux influe également sur la spécification des origines de réplication. La région qui contient l'origine utilisée dans les

cellules CHO, pour la réplication du gène de la dihydrofolate réductase (DHFR), est nommée ori  $\beta$ . Quand des noyaux isolés des cellules CHO sont incubés dans des extraits d'œufs, la réplication de l'ADN commence à ori  $\beta$ . Cependant, si l'enveloppe nucléaire des noyaux est perméabilisée, le début de la réplication n'est pas limité à ori  $\beta$  [11]. D'autres expériences, utilisant des noyaux isolés de cellules CHO à différents stades au cours de la phase G1 puis incubés dans des extraits d'œufs de xénope, ont montré que la spécification des origines de réplication intervient au cours de la phase G1 [12]. L'ensemble de ces résultats récents suggère que la localisation d'une origine de réplication sur le génome est définie non seulement par des séquences nucléotidiques spécifiques mais également par les contraintes exercées par les structures propres à la chromatine. En conséquence, le fait même que les métazoaires utilisent des séquences nucléotidiques précises sur le génome comme origines de réplication reste soumis à controverse.

### Le complexe protéique ORC

Le complexe ORC a été identifié chez *S. cerevisiae* par sa capacité de s'associer aux origines de réplication (*figure 2*). Le complexe ORC est composé de six sous-unités dont les gènes ont tous été clonés [3, 4]. L'importance du complexe ORC pour la réplication a été mise en évidence grâce à des mutants thermosensibles des gènes *ORC2* et *ORC5* qui n'entrent pas en phase S à la température restrictive [13, 14]. Les expériences d'empreintes génomiques chez *S. cerevisiae* ont montré, d'une part, que le complexe ORC est associé aux origines tout au long du cycle cellulaire et, d'autre part, que d'autres protéines s'associent aux origines pour former un complexe de pré-réplication en phase G1 (pré-RC, *figure 2*) [15]. Le complexe pré-RC est défini comme un complexe composé de plusieurs protéines qui s'associent aux origines de réplication en fin de mitose jusqu'à la transition G1/S. Le complexe pré-RC est



**Figure 2. Modèle proposant les différentes interactions protéiques au niveau d'une origine de réplication chez la levure *S. cerevisiae*.** (Adapté de [15].) Le complexe ORC (origin recognition complex), et parfois un nucléosome, sont associés aux origines de réplication tout au long du cycle cellulaire. En anaphase, les cyclines mitotiques sont dégradées et un complexe de pré-réplication (pré-RC) est formé. La protéine Cdc6 est synthétisée en début de phase G1 et vient s'associer au complexe ORC. Puis les MCM (mini-chromosome maintenance) s'associent à la chromatine et participent sans doute à la formation du pré-RC. Les protéines impliquées ne sont pas toutes identifiées. En phase G1, les sous-unités régulatrices Clb5/6 et Dbf4 des protéine-kinases Cdc28 et Cdc7 sont synthétisées et les complexes Cdc28-Clb5/6 et Cdc7/Dbf4 sont formés. Dbf4 s'associe alors à la chromatine et permet probablement l'activation du complexe pré-RC par la kinase Cdc7. Les complexes Cdc28/Clb et Cdc7/Dbf4 activent le démarrage de la réplication mais leur mode d'action, en parallèle ou en cascade, reste inconnu. L'identification des mécanismes d'action et les substrats de ces complexes devrait permettre de comprendre comment ils induisent la réplication. Lorsque la cellule entre en phase S, les complexes pré-RC sont dissociés et l'ADN est répliqué.

déstabilisé quand débute la réplication de l'ADN [3].

Des homologues des gènes *ORC1-6* ont été identifiés chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, le xénope et l'homme et les complexes composés des six sous-unités ORC1-6 ont été purifiés chez la drosophile et le xénope [3, 16, 17]. Des études biochimiques, dans le système acellulaire des extraits d'œufs de xénope, ont montré que les protéines ORC1 et ORC2 de xénope sont essentielles au déclenchement de la réplication [17, 18]. Ces résultats suggèrent que les mécanismes de reconnaissance des

origines de réplication ont été conservés de la levure à l'homme.

### Les protéines Cdc6 et Cdc18

On a identifié des protéines supplémentaires s'associant au complexe ORC: la protéine Cdc6 chez *S. cerevisiae* et son analogue, nommé Cdc18, chez *S. pombe* sont nécessaires au déclenchement de la réplication de l'ADN. Ce sont des protéines instables qui s'accumulent en phase G1 et sont dégradées quand la cellule entre en phase S [19, 20]. Le cycle cellulaire des souches de levures

mutantes pour les gènes *CDC6* et *CDC18* est arrêté avec des sections d'ADN non répliquées. En outre, la surexpression de *Cdc18* chez *S. pombe* réduit le cycle cellulaire à une succession de phases S [20].

Il est fort probable que les protéines Cdc6 et Cdc18 contrôlent l'entrée en phase S directement au niveau des origines de réplication. En effet, l'expression du gène *Cdc6* est nécessaire à la formation des complexes de pré-réplication en phase G1 (figure 2) [21] et des interactions biochimiques entre ORC et Cdc6 chez *S. cerevisiae* et Cdc18 chez *S. pombe* ont été décrites [22, 23].

Les analogues de *Cdc6* ont également été identifiés chez le xénope et chez l'homme [24, 25]. La protéine Cdc6 n'est pas considérée comme une sous-unité du complexe ORC car elle n'est pas co-purifiée avec ce dernier [16, 17]. Dans les extraits d'œufs de xénope, la protéine Cdc6 est nécessaire au déclenchement de la réplication et s'associe à la chromatine avant la phase S [24]. Dans ce système, la présence de protéine ORC2 sur la chromatine est nécessaire pour que Cdc6 s'associe à la chromatine [24]. L'association, au préalable, des protéines ORC et Cdc6 à la chromatine permet celle d'une autre famille de protéines: les MCM.

### La famille des protéines MCM

La famille des MCM (*mini-chromosome maintenances*) comprend six protéines (Mcm2-7) qui ont été retrouvées dans toutes les espèces étudiées [6]. Des études chez la levure *S. cerevisiae* ont révélé l'importance des MCM dans le contrôle de la réplication de l'ADN: les souches mutantes pour les gènes *MCM* sont incapables de répliquer l'ADN de plasmides possédant une origine de réplication. On a également suggéré que les MCM participent à l'établissement des complexes de pré-réplication (figure 2) [3].

Par ailleurs, des expériences d'immunolocalisation en fluorescence dans les cellules de mammifère en culture ont montré que les protéines MCM sont localisées dans les noyaux des cellules. L'immunolocalisation des MCM dans les noyaux n'est pas uni-

forme et montre, au contraire, que les protéines MCM forment des agrégats, nommés *foci*, sur la chromatine en phase G1 et S. Ces *foci* de protéines MCM ne correspondent pas aux sites actifs de réplication [26], ce qui suggère qu'une fonction des MCM est d'indiquer à la machinerie de réplication (ADN polymérase) les sections du génome qui ne sont pas encore répliquées.

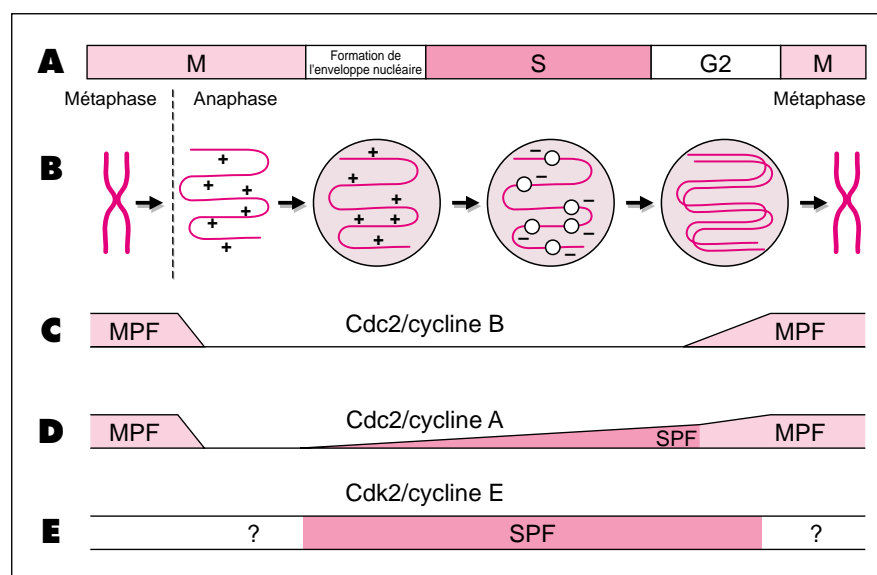
Des études utilisant des extraits d'œufs de xénope ont confirmé l'importance des protéines MCM dans le déclenchement de la réplication [27-29]. En effet, les MCM contribuent à l'activité RLF (*replication licensing factor*) nécessaire au déclenchement de la réplication dans ce système biologique [6]. Le modèle du RLF a été proposé pour expliquer comment l'ensemble de l'ADN d'une cellule est répliqué une seule et unique fois pendant un cycle cellulaire [5] (*figure 3B*). En effet, le RLF est nécessaire au déclenchement de la réplication, puis il est détruit ou inactivé, ce qui évite ainsi de répliquer à nouveau la même section de l'ADN au cours d'un cycle cellulaire. Le RLF a été séparé en deux activités biochimiques: RLF-M et RLF-B [27]. Les protéines MCM contribuent à l'activité RLF-M, et les protéines qui composent l'activité RLF-B sont en cours d'identification (J.J. Blow, communication personnelle). Les protéines MCM s'associent à la chromatine juste avant la phase S puis s'en détachent au cours de la phase S [27, 28]. L'association des protéines MCM à la chromatine dépend de l'activité de RLF-B ainsi que de la présence sur la chromatine des protéines ORC et Cdc6 [17, 27, 30]. Elle dépendrait aussi de l'état de phosphorylation des protéines MCM au cours du cycle cellulaire. En particulier, la protéine Mcm4 de xénope est hyperphosphorylée en métaphase, déphosphorylée en anaphase puis, de nouveau, partiellement phosphorylée en G1 lorsqu'elle s'associe à la chromatine [31]. L'hyperphosphorylation de Mcm4 en métaphase peut être mimée par l'ajout de cycline B (la sous-unité régulatrice de Cdc2), ce qui indique que Mcm4 pourrait être un substrat du complexe Cdc2/cycline B (MPF)

en mitose [31]. L'activité du complexe RLF-M est relativement constante au cours du cycle cellulaire, ce qui suggère que l'hyperphosphorylation de Mcm4 par le MPF n'a sans doute pas d'effet inhibiteur sur RLF-M [32]. En revanche, RLF-B est périodiquement activé au cours du cycle cellulaire: inactif en métaphase, il est activé en anaphase puis désactivé en interphase. Un inhibiteur de l'activité RLF-B est présent en métaphase et cet inhibiteur est, soit le complexe

Cdc2/cycline B, soit une protéine à l'activité contrôlée par ce complexe [32]. Malgré toutes ces informations, la nature des complexes formés par les protéines MCM ainsi que leurs fonctions restent à préciser.

### Le complexe Dbf4/Cdc7 et le gène *Cdc45* chez *S. cerevisiae*

Parmi les nombreux gènes identifiés chez la levure *S. cerevisiae* comme nécessaires à l'entrée en phase S, il



**Figure 3. Le RLF (replication licensing factor) et le SPF (S-phase promoting factor) contrôlent le début de la réplication dans les extraits d'œufs de xénope.** (A) Les différentes phases du cycle cellulaire. (B) Schéma représentant le modèle du RLF. (C) Activité kinase du complexe Cdc2/cycline B. (D) Activité kinase du complexe Cdc2/cycline A. (E) Activité kinase du complexe Cdk2/cycline E. L'activité MPF (M-phase promoting factor), contrôlant la mitose, est apportée par les complexes Cdc2/cycline B (C) et Cdc2/cycline A (D). La désactivation rapide de MPF à la transition métaphase/anaphase est due à la dégradation rapide de ces cyclines mitotiques. Au même moment, les chromosomes se décondensent et le RLF vient activer (+) les origines de réplication (B). Une enveloppe nucléaire se forme ensuite autour de l'ADN pour former un noyau. L'activité RLF ne peut pas traverser cette enveloppe (B). L'activité kinase du complexe Cdk2/cycline E est constante au cours du cycle cellulaire et constitue une activité SPF (E). Au fur et à mesure de sa synthèse au cours de l'interphase, la cycline A apporte d'abord une activité SPF puis elle participe à l'activité MPF (D). Le début de la réplication a lieu sous l'impulsion du SPF aux origines qui ont été préparées par le RLF (les fourches de réplication sont représentées par des ovales (B)). L'ADN des noyaux en phase G2 est entièrement répliqué et la désactivation du RLF (-) évite les phénomènes de réplication surnuméraire de l'ADN (B). Le complexe Cdc2/cycline B n'a pas d'activité SPF mais il permet la transition G2/M et peut être aidé en cela par l'activité kinase associée à la cycline A (C, D). Sous l'action du MPF, les noyaux entrent en mitose, ce qui provoque la rupture de l'enveloppe nucléaire et la condensation des chromosomes (C). La fonction de l'activité kinase du complexe Cdk2/cycline E en mitose reste inconnue.

est utile de mentionner les gènes *Cdc7* et *Dbf4*. Des études génétiques suggèrent que le gène *Cdc7* interagirait à la fois avec les gènes *ORC* et *Cdc28* [33, 34], *Cdc28* étant l'analogue de *Cdc2* chez la levure *S. cerevisiae*. Quant à la protéine *Dbf4*, elle a été isolée lors d'un criblage des protéines qui interagissent avec les origines de réplication [35]. La protéine *Dbf4* est la sous-unité régulatrice de la kinase *Cdc7* [36]. Ce complexe a une activité maximale à la transition G1/S et pourrait donc participer avec *Cdc28* à l'activation des complexes pré-RC (figure 2). Les cibles de *Cdc7* ne sont pas encore définies mais un rapport récent indique que les protéines MCM sont des substrats probables de cette protéine-kinase [37].

Enfin, le gène *Cdc45* est essentiel au déclenchement de la réplication chez *S. cerevisiae* et il a été montré que l'expression de l'ARNm correspondant est maximale à la transition G1/S [38]. De plus, on a montré par des expériences génétiques que le gène *CDC45* interagit avec des gènes des familles des *MCM* et des *ORC* [39]. La fonction de la protéine *Cdc45* dans le contrôle de l'entrée en phase S reste à préciser.

### Les complexes Cdk/cycline des levures *S. pombe* et *S. cerevisiae*

Chez la levure *S. pombe*, la protéine-kinase *Cdc2* contrôle les transitions G1/S et G2/M. Le gène *Cdc13* code pour une cycline de type B qui est faiblement exprimée en phase S puis synthétisée abondamment en phase G2 (figure 4). *Cdc13* s'associe à *Cdc2* pour contrôler la transition G2/M. En phase G1, un polypeptide, nommé *Rum1*, qui est un inhibiteur spécifique de la protéine-kinase *Cdc2* évite l'activation prématurée du complexe *Cdc2/Cdc13* [40]. La synthèse d'une autre cycline, nommée *Cig2*, est maximale en fin de phase G1. L'activité du complexe *Cdc2/Cig2* provoque l'entrée en phase S (figure 4). Si le gène de la cycline *Cig2* est délété, une faible activité kinase du complexe *Cdc2/Cdc13* permet l'entrée en phase S alors qu'une forte activité de ce complexe permet

l'entrée en phase M [41, 42] (figure 4). L'activité de la kinase *Cdc2* permet donc à la cellule de déterminer si elle doit entrer en phase S ou en phase M.

Une autre fonction des complexes Cdk/cycline chez *S. pombe* est d'empêcher que les cellules re-répliquent leur contenu en ADN plus d'une fois par cycle cellulaire. Pour les souches de cette levure qui ont le gène *Cdc13* délété ou qui sont des mutants thermosensibles des gènes *Cdc2* et *Cdc13*, des phases de réplication successives interviennent en absence de phase M, entraînant une augmentation de la ploïdie\* des cellules. La surproduction de *Rum1*, qui inhibe la protéine-kinase *Cdc2*, a le même effet [40] (figure 4). En l'absence de complexe *Cdc2/Cdc13* actif, la cellule effectue donc une phase S probablement sous le contrôle du complexe *Cdc2/Cig2*. Dans ce contexte, il semble qu'aucun signal n'indique à la cellule qu'elle est en phase G2 et son génome est donc répliqué à nouveau. Comme la surproduction de *Rum1* induit l'accumulation de la protéine *Cdc18* et permet la survie des cellules dont le gène *Cdc18* est délété, il est probable que le complexe *Cdc2/Cdc13* empêche une nouvelle réplication de l'ADN en contrôlant négativement la synthèse de la protéine *Cdc18* [43]. Chez la levure *S. cerevisiae*, la protéine-kinase *Cdc28*, l'analogue de *Cdc2*, forme un dimère avec une des cyclines *Clb1-4* (de type B) pour contrôler la phase M. *Cdc28* s'associe à l'une des cyclines *Clb5* ou *Clb6* pour permettre l'entrée en phase S (figure 2) [44]. L'activité de la protéine-kinase *Cdc28* doit être inhibée pour que la protéine *Cdc6* accomplisse son rôle dans le déclenchement de la réplication. En effet, la surproduction de *Sic1*, un polypeptide inhibiteur spécifique de la protéine-kinase *Cdc28*, induit la formation des complexes pré-RC et une nouvelle réplication de l'ADN au cours du même cycle cellulaire [45]. L'ensemble des résultats accumulés dans les différents systèmes d'étude indique que les protéines *Cdc18* chez

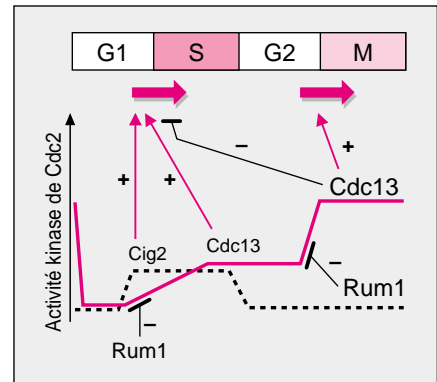


Figure 4. **Modèle de la régulation du cycle cellulaire par la protéine-kinase *Cdc2* chez *S. pombe*.** Chez la levure *S. pombe*, la synthèse de la cycline *Cig2* (en traits noirs discontinus) est maximale en fin de phase G1 et le complexe *Cdc2/Cig2* provoque l'entrée en phase S. *Cig2* est dégradée en phase G2. La cycline *Cdc13* (trait rouge) est faiblement produite en phase S, fortement synthétisée en phase G2, puis dégradée en sortie de mitose (trait rouge continu). *Cdc13* s'associe à *Cdc2* et l'activité kinase maximale du complexe *Cdc2/Cdc13* contrôle la transition G2/M. En l'absence de *Cig2*, une faible activité du complexe *Cdc2/Cdc13* permet l'entrée en phase S (flèche rouge). En revanche, en l'absence de *Cdc13* la cellule n'entre pas en phase M et l'ADN est répliqué à nouveau (la seconde flèche rouge indique le passage en phase M). En phase G1, le polypeptide *Rum1*, qui est un inhibiteur spécifique de la protéine-kinase *Cdc2*, évite l'activation prématurée du complexe *Cdc2/Cdc13*. La surexpression de *Rum1* inhibe l'activité kinase du complexe *Cdc2/Cdc13* et provoque également une nouvelle réplication de l'ADN, probablement sous le contrôle du complexe *Cdc2/Cig2*. La première flèche rouge horizontale figure la transition G1/S et la seconde, la transition G2/M. Ce sont ces transitions qui sont contrôlées par les différentes protéines comme indiqué.

*S. pombe*, *Cdc6* chez *S. cerevisiae* et les protéines composant le système RLF chez le xénope sont probablement des substrats du complexe *Cdc2/cycline B*. Cela suggère que les protéine-kinases Cdk évitent une nouvelle réplication de l'ADN au cours d'un

\* Nombre de lots de chromosomes.

même cycle cellulaire, soit en bloquant, au cours des phases G2 et M, l'accumulation de facteurs nécessaires au début de la réplication au niveau des origines de réplication, soit en inhibant l'activation de ces facteurs.

### Les complexes Cdk/cycline chez les métazoaires

Dans les extraits d'œufs de xénope, au moins deux signaux différents sont nécessaires au déclenchement de la réplication de l'ADN [6]. D'abord, le RLF prépare les origines de réplication et empêche l'ADN de re-réplicuer au cours du même cycle cellulaire (voir ci-dessus). Ensuite, le SPF (*S-phase promoting factor*) active le début de la réplication aux origines préparées par le RLF. Chacun des complexes Cdk2/cycline E, Cdk2/cycline A et Cdc2/cycline A possède une activité SPF [46]. De plus, le complexe Cdc2/cycline A peut compenser un déficit en cycline E et la protéine-kinase Cdc2 peut, dans certaines conditions, compenser un déficit en kinase Cdk2 [46, 47]. Une faible activité kinase associée à la cycline A provoque l'entrée en phase S et une forte activité provoque l'entrée en mitose [46] (figure 3D), de manière similaire à la cycline Cdc13 chez *S. pombe* (figure 4).

La cycline E est stable tout au long du cycle cellulaire dans les extraits d'œufs de xénope, ce qui suggère que le complexe Cdk2/cycline E jouerait également un autre rôle en phase G2 ou M, différent de son rôle en phase S [48] (figure 3E). Effectivement, la kinase Cdc2 nécessaire à l'entrée en phase M peut être activée par Cdk2 [49]. L'ensemble de ces données suggère que le complexe Cdk2/cycline E produit une activité SPF basale, et que le complexe Cdc2/cycline A contribue à l'activité SPF lorsque la cycline A commence à être traduite, pour ensuite participer à l'activité MPF (figure 3D, E).

Dans les cellules de mammifère en culture, l'injection d'anticorps anti-Cdk2 ou l'expression d'un mutant dominant négatif de cette protéine-kinase inhibe la progression en phase S [50]. Par ailleurs, il n'est pas exclu que la protéine-kinase Cdc2 joue un

rôle dans le contrôle de l'entrée en phase S des cellules de mammifères puisque l'injection d'anticorps anti-Cdc2 dans les lymphocytes T inhibe l'entrée en phase S [51]. La protéine-kinase Cdk2 forme des complexes avec la cycline E et la cycline A dans les fibroblastes en phase S [52, 53]. L'injection d'anticorps anti-cycline A, ou anti-cycline E, empêche les cellules d'entrer en phase S [54, 55] et la sur-expression des cyclines A, ou E, dans les cellules en culture induit l'entrée prématurée en phase S [56, 55].

Un nouveau système acellulaire permet d'étudier *in vitro* la transition G1/S au cours du cycle cellulaire somatique [57]. Dans ce système, des noyaux isolés de cellules HeLa sont mis en présence de fractions protéiques provenant des mêmes cellules. L'ADN est répliqué pour 10 % à 35% des noyaux en phase G1 (dépendant de leur position dans la phase G1) quand ils sont mis en présence d'extraits cytoplasmiques et nucléaires de cellules en phase S. Les extraits nucléaires en phase S peuvent être remplacés par les complexes Cdk2/cycline E et Cdk2/cycline A [57], suggérant que ces deux complexes doivent fonctionner en synergie pour éviter que les noyaux en phase G1 entrent en phase S.

### Les partenaires des complexes Cdk/cycline pour l'entrée en phase S

Malgré les progrès effectués récemment dans l'étude des mécanismes qui contrôlent l'entrée en phase S, les substrats physiologiques des différents complexes Cdk/cycline ne sont pas identifiés. Cependant, des expériences d'immunoprécipitation à partir de cellules de mammifères en culture ont montré que ces complexes s'associent à d'autres protéines. En fin de phase G1, le facteur de transcription E2F, responsable de l'expression de gènes nécessaires à l'entrée en phase S, s'associe au complexe Cdk2/cycline E pour être activé [58]. En phase S, la cycline E est remplacée par la cycline A et le complexe Cdk2/cycline A phosphoryle directement E2F pour, cette fois, inhiber son activité [58, 59]. Dans les cellules transformées, les protéines

p19<sup>Shp1</sup> and p45<sup>Shp2</sup> sont associées au complexe Cdk2/cycline A et la protéine p45<sup>Shp2</sup> serait importante pour que la réplication ait lieu [60]. Dans les fibroblastes normaux, le complexe Cdk2/cycline A est associé au co-facteur PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) de l'ADN polymérase  $\delta$ , nécessaire à la réplication de l'ADN. Le complexe Cdk2/cycline A s'associe également au polypeptide p21<sup>Cip1</sup> qui est un inhibiteur spécifique des protéine-kinases de la famille des Cdk [61].

De nombreux polypeptides inhibiteurs des complexes Cdk/cycline ont été mis en évidence dans toutes les espèces étudiées [61]. Ces inhibiteurs permettraient la coordination des activités Cdk/cycline au cours du cycle cellulaire. La perte ou le dysfonctionnement de ces molécules inhibitrices pourrait entraîner une prolifération cellulaire incontrôlée ou la désorganisation des phases du cycle cellulaire. Par exemple, le polypeptide p21<sup>Cip1</sup> a été identifié simultanément comme une protéine liant et inhibant les Cdk et comme le produit d'un gène dont la synthèse est induite par la protéine p53, un suppresseur de tumeur et, enfin, comme une protéine qui est synthétisée en excès dans les cellules sénescentes [61]. Dans les extraits d'œufs de xénope, p21<sup>Cip1</sup> est un inhibiteur de Cdk2 et du SPF. L'inhibition de la réplication dans les extraits traités par p21<sup>Cip1</sup> peut être levée si une des cyclines, E ou A, est rajoutée à ces extraits [62, 63]. La convergence des résultats obtenus dans des modèles d'études différents devrait permettre d'identifier les substrats physiologiques des complexes Cdk/cycline possédant une activité SPF. Ces substrats sont vraisemblablement localisés dans les noyaux des cellules et/ou associés à la chromatine et les protéines ORC, Cdc6 et MCM représentent évidemment de bons candidats.

### Conclusion

La mise en route de la réplication des chromosomes eucaryotes est un processus multi-étapes, impliquant de nombreuses activités biochimiques finement contrôlées avant

même que le premier nucléotide ne soit incorporé dans le brin d'ADN naissant. Ces étapes commencent à être comprises grâce aux études visant à identifier les protéines qui s'associent à la chromatine. Les protéines ORC, MCM, Cdc6, Cdk/cycline, qui permettent aux chromosomes d'être répliqués une seule fois au cours d'un même cycle cellulaire, ont été conservées au cours de l'évolution. L'étude des interactions entre ces différentes protéines ainsi que l'analyse de leurs fonctions devrait permettre de comprendre comment les origines de réplication sont définies chez les métazoaires ■

#### Remerciements

Nous remercions le Pr Bernard Ducommun pour nous avoir suggéré d'écrire cette revue, et le Dr Chantal Desdouets pour sa lecture critique du manuscrit. Nous présentons nos excuses à nos collègues dont les travaux n'ont pas été cités par manque de place.

#### Références

- Jacob F, Brenner S, Cuzin F. On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1963; 28: 329-48.
- Bell SP, Stillman B. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 1992; 357: 128-34.
- Diffley JFX. Once and only once upon a time: specifying and regulating origins of DNA replication in eukaryotic cells. *Genes Dev* 1996; 10: 2819-30.
- Rowles A, Blow JJ. Chromatin proteins involved in the initiation of DNA replication. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7: 152-7.
- Blow JJ, Laskey RA. A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature* 1988; 332: 546-8.
- Chong JPY, Thommes P, Blow JJ. The role of MCM/P1 proteins in the licensing of DNA replication. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 102-6.
- Chevalier S, Blow JJ. Cell cycle control of replication initiation in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 815-21.
- Hyrien O, Maric C, Méchali M. Transition in specification of embryonic metazoan DNA replication origins. *Science* 1995; 270: 994-7.
- Kitsberg D, Selig S, Keshet I, Cedar H. Replication structure of the human beta-globin gene domain. *Nature* 1993; 366: 588-90.
- Aladjem M, Groudine M, Brody L, Dieken E, Fournier R, Wahl G, Epner E. Participation of the human beta-globin locus control region in initiation of DNA replication. *Science* 1995; 270: 815-9.
- Gilbert DM, Miyazawa H, Depamphilis ML. Site-specific initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extract requires nuclear structure. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2942-54.
- Wu JR, Gilbert DM. A distinct G(1) step required to specify the chinese-hamster DHFR replication origin. *Science* 1996; 271: 1270-2.
- Fox CA, Loo S, Dillin A, Rine J. The origin recognition complex has essential functions in transcriptional silencing and chromosomal replication. *Genes Dev* 1995; 9: 911-24.
- Loo S, Fox CA, Rine J, Kobayashi R, Stillman B, Bell S. The origin recognition complex in silencing, cell cycle progression and DNA replication. *Mol Biol Cell* 1995; 6: 741-56.
- Diffley JF, Cocker JH, Dowell SJ, Rowley A. Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins *in vivo*. *Cell* 1994; 78: 303-16.
- Gossen M, Pak DTS, Hansen SK, Acharya JK, Botchan MR. A Drosophila homolog of the yeast origin recognition complex. *Science* 1995; 270: 1674-7.
- Rowles A, Chong JPY, Brown L, Howell M, Evan GI, Blow JJ. Interaction between the origin recognition complex and the replication licensing system in *xenopus*. *Cell* 1996; 87: 287-96.
- Carpenter PB, Mueller PR, Dunphy WG. Role for a *Xenopus* Orc2-related protein in controlling DNA replication. *Nature* 1996; 379: 357-60.
- Piatti S, Lengauer C, Nasmyth K. Cdc6 is an unstable protein whose de novo synthesis in G(1) is important for the onset of S-phase and for preventing a reductional anaphase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1995; 14: 3788-99.
- Nishitani H, Nurse P. p65(Cdc18) plays a major role controlling the initiation of DNA replication in fission yeast. *Cell* 1995; 83: 397-405.
- Cocker JH, Piatti S, Santocanale C, Nasmyth K, Diffley JFX. An essential role for the cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast. *Nature* 1996; 379: 180-2.
- Liang C, Weinreich M, Stillman B. ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome. *Cell* 1995; 81: 667-76.
- Grallert B, Nurse P. The ORC1 homolog *orp1* in fission yeast plays a key role in regulating the onset of S phase. *Genes Dev* 1996; 10: 2644-54.
- Coleman TR, Carpenter PB, G. DW. The *Xenopus* Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts. *Cell* 1996; 87: 53-63.
- Williams RS, Shohet RV, Stillman B. A human protein related to yeast Cdc6p. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 142-7.
- Krude T, Musahl C, Laskey RA, Knippers R. Human replication proteins Hcdc21, Hcdc46 and Plmcm3 bind chromatin uniformly before S phase and are displaced locally during DNA replication. *J Cell Sci* 1996; 109: 309-18.
- Chong JPY, Mahbubani MH, Khoo CY, Blow JJ. Purification of an Mcm-containing complex as a component of the DNA replication licensing system. *Nature* 1995; 375: 418-21.
- Kubota Y, Mimura S, Nishimoto S, Takisawa H, Nojima H. Identification of the yeast MCM3-related protein as a component of *Xenopus* DNA replication licensing factor. *Cell* 1995; 81: 601-9.
- Madine MA, Khoo CY, Mills AD, Laskey RA. MCM3 complex required for cell cycle regulation of DNA replication in vertebrate cells. *Nature* 1995; 375: 421-4.
- Coleman TR, Carpenter PB, Dunphy WG. The *Xenopus* cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts. *Cell* 1996; 87: 53-63.
- Coue M, Kearsey SE, Mechali M. Chromatin binding, nuclear localization and phosphorylation of *Xenopus* Cdc21 are cell cycle dependent and associated with the control of initiation of DNA replication. *EMBO J* 1996; 15: 1085-97.
- Mahbubani HM, Chong JPY, Chevalier S, Thommes P, Blow JJ. Cell cycle regulation of the replication licensing system: involvement of a Cdk-dependent inhibitor. *J Cell Biol* 1997; 136: 125-35.
- Hardy C. Characterization of an essential Orc2p-associated factor that plays a role in DNA replication. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 1832-41.
- Ohtoshi A, Arai K, Masai H. Genetic interactions between CDC7 and CDC28: Growth inhibition of cdc28-1N by Cdc7 point mutants. *Genes Cells* 1996; 1: 895-904.
- Dowell SJ, Romanowski P, Diffley JFX. Interaction of Dbf4, the Cdc7 protein-kinase regulatory subunit, with yeast replication origins *in vivo*. *Science* 1994; 265: 1243-6.
- Jackson AL, Pahl PMB, Harrison K, Rosamond J, Sclafani RA. Cell cycle regulation of the yeast Cdc7 protein-kinase by association with the Dbf4 protein. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 2899-908.
- Hardy CFJ, Dryga O, Seematter S, Pahl PMB, Sclafani RA. mcm5/cdc46-bob1 bypasses the requirement for the S phase activator Cdc7p. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3151-5.
- Hardy CFJ. Identification of Cdc45p, an essential factor required for DNA replication. *Gene* 1997; 187: 239-46.
- Zou L, Mitchell J, Stillman B. CDC45, a novel yeast gene that functions with the origin recognition complex and Mcm proteins in initiation of DNA replication. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 553-63.
- Moreno S, Nurse P. Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the *rum1* gene. *Nature* 1994; 367: 236-42.
- Fisher DL, Nurse P. A single fission yeast mitotic cyclin-B p34(Cdc2) kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G(1) cyclins. *EMBO J* 1996; 15: 850-60.
- Martin-Castellanos C, Labib K, Moreno S. B-type cyclins regulate G(1) progression in fission yeast in opposition to the p25(Rum1) Cdk inhibitor. *EMBO J* 1996; 15: 839-49.
- Jallepalli PV, Kelly TJ, Rum1 and Cdc18 link inhibition of cyclin-dependent kinase to the initiation of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev* 1996; 10: 541-52.
- Schwob E, Bohm T, Mendenhall MD, Nasmyth K. The B-type cyclin kinase inhibitor p40(Sic1) controls the G1 to S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 1994; 79: 233-44.

## Références

45. Piatti S, Bohm T, Cocker JH, Diffley JFX, Nasmyth K. Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a « point of no return » after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast. *Genes Dev* 1996; 10: 1516-31.
46. Strausfeld UP, Howell M, Descombes P, Chevalier S, Rempel R, Adamczewski J, Maller JL, Hunt T, Blow JJ. Both cyclin A and cyclin E have S phase Promoting Factor (SPF) activity in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci* 1996; 109: 1555-63.
47. Chevalier S, Tassan JP, Cox R, Philippe M, Ford C. Both cdc2 and cdk2 promote S phase initiation in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci* 1995; 108: 1831-41.
48. Chevalier S, Couturier A, Chartrain I, Le Guellec R, Beckhelling C, Le Guellec K, Philippe M, Ford CC. *Xenopus* cyclin E, a nuclear phosphoprotein, accumulates when oocytes gain the ability to initiate DNA replication. *J Cell Sci* 1996; 109: 1173-84.
49. Guadagno TM, Newport JW. Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of Cdc2-Cyclin B kinase activity. *Cell* 1996; 84: 73-82.
50. Pagano M, Pepperkok R, Lukas J, Baldwin V, Ansorge W, Bartek J, Draetta G. Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 121: 101-11.
51. Furukawa Y, Pivnicka-Worms H, Ernst TJ, Kanakura Y, Griffen JD. *Cdc2* gene expression at the G1 to S transition in human T lymphocytes. *Science* 1990; 250: 805-8.
52. Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR, Roberts JM. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 1992; 257: 1689-94.
53. Tsai LH, Harlow E, Meyerson M. Isolation of the human *CDK2* gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature* 1991; 353: 174-7.
54. Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJ. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 1991; 67: 1169-79.
55. Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G(1) to S phase transition. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2612-24.
56. Resnitzky D, Hengst L, Reed SI. Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G(1) by p27(Kip1). *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4347-52.
57. Krude T, Jackman M, Pines J, Laskey RA. Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Cell* 1997; 88: 109-20.
58. Lees E, Faha B, Dulic V, Reed SI, Harlow E. Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes Dev* 1992; 6: 1874-85.
59. Krek W, Ewen ME, Shirodkar S, Arany Z, Kaelin WG, Livingston DM. Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* 1994; 78: 161-72.
60. Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, Beach D. p19(Skp1) and p45(Skp2) are essential elements of the cyclin A-Cdk2 S phase kinase. *Cell* 1995; 82: 915-25.
61. Lees E. Cyclin-dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 773-80.
62. Strausfeld UP, Howell M, Rempel R, Maller JL, Hunt T, Blow JJ. Cip1 blocks the initiation of DNA replication in *Xenopus* extracts by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Curr Biol* 1994; 4: 876-83.
63. Jackson PK, Chevalier S, Philippe M, Kirschner MW. Early events in DNA replication require cyclin E and are blocked by p21(Cip1). *J Cell Biol* 1995; 130: 755-69.

### Stéphane Chevalier

*Chercheur postdoctoral, boursier du programme Human Capital and Mobility de la Communauté Européenne. Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3LD, Royaume-Uni.*

### Nathalie Chevalier

*Chargée de mission. Ambassade de France en Grande-Bretagne, Service science et technologie, 6 Cromwell Place, London SW7 2JN, Royaume-Uni.*

### \* ABRÉVIATIONS \*

**ARS**: autonomously replicating sequence  
**ACS**: ARS consensus sequence  
**Cdc**: cell division cycle  
**Cdk**: cyclin dependent kinase  
**CHO**: chinese hamster ovary  
**Cib**: *cycline de type B chez S. cerevisiae*  
**LCR**: locus control region.  
**MCM**: mini-chromosome maintenance  
**MPF**: M-phase ou mitosis promoting factor  
**ORC**: origin recognition complex.  
**PCNA**: proliferating cell nuclear antigen  
**Pre-RC**: pre-replication complex  
**RLF**: *replication licensing factor*  
**SPF**: S-phase promoting factor

## Summary

### How is a cycle of DNA replication initiated in eukaryotes?

Important progress in the understanding of the mechanisms which control the initiation of DNA replication in eukaryotes has been made in the past few years. DNA replication origins have been precisely characterised in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and much effort has been made in trying to identify their counterparts in metazoans. During the cell cycle, many protein complexes associate with replication origins and play a major role in the regulation of DNA replication. The Origin Recognition Complex (ORC) recognises and binds to replication origins throughout the cell cycle. In G1 phase, the Cdc6 protein and the proteins of the MCM family (mini-chromosome maintenance 2-7) also bind to the chromatin. Thus, these protein complexes associate sequentially with the chromatin and are all necessary for DNA replication to initiate. During S phase, dissociation of MCM from the chromatin prevents an origin from firing more than once in a single cell cycle. The Cyclin-dependent kinases (Cdks) provide an overall control of the cell cycle. Indeed, Cdks have at least two important function in regulating DNA replication: Cdks both stimulate the initiation of DNA replication and prevent replication to occur more than once in a single cell cycle. Although the details of these controls remain unclear, recent work indicates that the interaction of the Cdks with Cdc6 and MCM proteins could regulate their binding to the replication origins during the cell cycle.

## TIRÉS À PART

S. Chevalier.