

TP B10. Chromosomes, mitose et méiose

Eléments de correction

III. Mise en évidence d'un contrôle du cycle cellulaire

1. Mise en évidence d'une régulation du cycle cellulaire

- **A partir du document 3, proposez des hypothèses sur le mode de régulation de l'entrée en mitose**

On injecte un extrait de cytoplasme d'une cellule en mitose à une cellule en interphase : on observe une mitose. Si on injecte le cytoplasme d'une cellule en interphase à une cellule en interphase, on n'observe pas de mitose. Conclusion : la cellule en mitose est en mitose à cause d'un facteur cytoplasmique actif. Ce facteur peut être une protéine (c'est souvent le cas) ou non.

- **Comment pourrait-on les vérifier ?**

Pour montrer s'il s'agit d'une protéine, on peut chauffer le cytoplasme de la cellule initialement en mitose afin de dénaturer ses protéines, pour tester si l'effet d'induction de la mitose est toujours observé.

On peut montrer que le facteur recherché est un hétérodimère CDK-cycline.

2. Identification de mutants du contrôle du cycle cellulaire

- **Expliquer comment ce protocole permet d'isoler des mutants thermosensibles du cycle cellulaire.**

On utilise la partie gauche du document 4. L'agent mutagène provoque l'apparition de nombreuses mutations aléatoires dans le génome des levures étudiées. Après mutagenèse, on met en culture les levures éventuellement mutées à 23°C (température permissive). Après quelques heures, chaque levure isolée a formé une colonie ; on réplique la boîte initiale avec un dispositif ressemblant à tampon, permettant ainsi de faire deux boîtes ayant exactement les mêmes colonies et au même endroit. On cultive chacune des deux boîtes à une température de 23°C (permissif) et 36°C (non permissif) respectivement. Si certaines colonies manquent sur la 2^e boîte, mais pas sur la 1^{ère}, c'est que les levures considérées ont une mutation arrêtant le cycle cellulaire, mais qui ne s'exprime qu'à 36°C : il s'agit donc bien d'un mutant thermosensible du cycle cellulaire.

- **Dans l'expérience de complémentation :**

- × **Quel est l'intérêt d'utiliser des levures de génotype *ura3-* et un plasmide portant le gène sauvage *URA3* ?**

Le plasmide utilisé pour la complémentation contient le gène sauvage *URA3*, permettant aux cellules qui le portent de synthétiser l'uracile. On utilise des levures *ura3-*, que l'on cultive sur un milieu pauvre en uracile. De cette façon, seules les cellules ayant acquis le plasmide peuvent se développer : cela permet de tuer les levures non transgéniques, qui ne sont pas intéressantes pour l'expérience de complémentation.

- × **Expliquez comment l'expérience de complémentation permet de connaître le gène à l'origine du phénotype mutant.**

On introduit dans les mutants des fragments de génome de levure, intégrés dans un plasmide. Les mutants ayant reçu, par hasard, le gène sauvage (sur le plasmide) correspondant au gène muté (dans le génome nucléaire) se développent, pas les autres : elles ont été complétées (ou « *rescuées* », de *rescue* « sauver » en anglais). Il suffit ensuite de **séquencer** la partie du génome qui est dans le plasmide pour identifier le gène. Il s'agit bien d'une complémentation, puisque le gène sauvage du plasmide permet d'apporter un complément pour le gène qui a été muté dans le génome nucléaire.

- **Caractériser le phénotype mutant.**

Document 5. Les cellules dans lesquelles s'exprime la mutation sont deux à quatre fois plus longues que les cellules à phénotype sauvage. On en déduit que les cellules mutées sont bloquées dans une phase de croissance (phase G1 ou phase G2).

Document 6. Pour les cellules cultivées à température permissive, on voit deux pics, correspondant à deux populations de cellules : à gauche, des cellules ayant une petite quantité d'ADN, notée q , et à droite, des cellules ayant une quantité double d'ADN, notée $2q$. On interprète ces deux populations comme étant les cellules en phase G1 (avant réplication) et en phase G2 (après réplication) respectivement. On note par ailleurs un nombre conséquent de cellules ayant une quantité d'ADN intermédiaire entre ces deux pics : on les interprète comme étant les cellules en phase S.

Pour les cellules cultivées dans des conditions de température non permissive, on observe une accumulation de cellules de quantité d'ADN $2q$, et une population quasiment inexistante de cellules de quantité d'ADN q : cela montre que les cellules sont bloquées en phase G2.

On en déduit que la mutation empêche le passage de la phase G2 à la phase M (mitose), **donc le gène permet le contrôle de l'entrée en mitose.**

- **A l'aide des documents 5 à 8, expliquez le phénotype observé, et proposez un modèle de la régulation du cycle cellulaire par CDK1.**

Document 7. Gauche : l'ARNm Cdk1 est détecté à température forte ou faible, chez le mutant comme le sauvage (l'*northern blot* permet de connaître le niveau d'expression du gène Cdk1).

Droite : la protéine Cdk1 est détectée à température forte ou faible, chez le mutant comme le sauvage, mais on constate que le niveau d'expression est plus réduit pour le mutant à 39°C. Sachant que l'ARN était présent, on peut penser que la protéine est thermolabile (détruite par la chaleur). **La mutation correspondrait donc ni à l'absence d'ARN, ni à l'absence de protéine, mais à la formation d'une protéine instable à haute température.**

Document 8. On constate que des dizaines de protéines sont phosphorylées pour la piste Cdk1-Clb2, et aucune en l'absence de Cdk1-Clb2. Donc Cdk1-Clb2 est capable de phosphoryler un grand nombre de protéines dans la cellule. C'est probablement cette activité **kinase** qui explique son rôle.

On peut alors établir le modèle suivant : Cdk1 est une CDK (*cyclin dependent kinase*) qui interagit avec la cycline Clb2. Son rôle consiste en la phosphorylation de nombreux acteurs protéiques (plusieurs dizaines de protéines différentes). Ces nombreuses phosphorylations entraîneraient l'activation ou l'inhibition des protéines concernées, qui permettraient l'entrée en mitose de la cellule. Dans le cas du mutant, le gène de la kinase Cdk1, bien que transcrit et traduit, est à l'origine d'une protéine thermolabile. Dans le cas de températures basses, elle peut effectuer son rôle ; en revanche, elle est détruite à haute température, permettant donc au phénotype mutant de s'exprimer.