

Université Bordeaux Segalen

Année 2013

Thèse n°2084

Thèse

pour le

Doctorat de l'Université Bordeaux 2

Ecole doctorale : Sciences de la Vie et de la Santé

Mention : Science, Technologie, Santé

Spécialité : Génétique

Présentée et soutenue publiquement

Le 6 décembre 2013

Romain MITTEAU

Né le 26 décembre 1986 à Talence

**REGULATION PAR LA PHOSPHORYLATION
D'UN MODULE RHO GTPASE DANS LA
LEVURE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Sous la direction du Dr. Derek McCusker

Membres du Jury :

M. Christophe CULLIN, Professeur Universitaire, Bordeaux

Président

M. Robert ARKOWITZ, Directeur de Recherche CNRS, Nice

Rapporteur

Mme Marie-Hélène CUIF-LORDEZ, Maître de Conférence, Paris sud

Rapporteur

M. Derek MCCUSKER, Chargé de Recherche CNRS, Bordeaux

Directeur de thèse

M. Francois DOIGNON, Professeur Universitaire, Bordeaux

Membre invité

En premier lieu, je remercie le Dr Derek McCusker de m'avoir offert l'opportunité de pouvoir réaliser cette thèse dans son laboratoire. De part ses conseils il m'a permis de conduire ces travaux pendant trois ans.

Au cours de ces trois années j'ai pu côtoyer et interagir au sein du laboratoire avec différentes personnes qui m'ont accompagné au cours de ce travail.

Je tiens à remercier le Dr Christophe Velours qui était là au début de ces travaux et auprès de qui j'ai pu améliorer ma vision de la purification, car après tout Christophe était LE "purificateur".

Je tiens à remercier le Dr Mini Jose-Deepak, qui m'a aidé lors de l'utilisation du microscope.

Je tiens aussi à remercier le Dr Sylvain Tollis qui, au delà de ses nombreux concerts auxquels j'ai eu la chance d'assister, a stimulé mon imagination pour la mise en place de certaines expériences.

Je tiens aussi à remercier Aurélie Massoni-Laporte (Bout bi) pour sa gentillesse et sa bonne humeur au quotidien.

Je tiens à remercier plus particulièrement le Dr McCusker, le Dr Tollis et Mme Massoni-Laporte pour m'avoir conseillé sur la mise en forme de ce manuscrit.

Je remercie le Pr Cullin, le Dr Arkowitz et le Dr Cuif-Lordez d'avoir gentiment accepté de donner de leur temps pour juger ces travaux.

Je remercie aussi les membres des équipes Royou, Fribourg et LMS pour les discussions et les conseils qu'ils ont pu dispenser au cours de ces travaux.

Je remercie aussi les personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler au Synchrotron SOLEIL, le Dr Fox, le Dr Wien et le Dr Perez, qui m'ont aidé à mieux comprendre les techniques qu'ils utilisent au quotidien et que j'ai utilisé au Synchrotron.

Je remercie aussi le Dr Di Primo pour ses conseils lors de l'utilisation de la SPR et surtout du nanodrop.

C'est une pensée que j'envoie aux membres du laboratoire RDPR qui m'ont initié à la vie en laboratoire.

Sans mes parents, pour le soutien et l'aide qu'ils m'ont toujours donné, ces travaux n'auraient pu être réalisés, et je les en remercie.

Je remercie aussi tous mes amis (ils se reconnaîtront...) pour tous les bons moments passés à l'extérieur du laboratoire.

Enfin, je tiens à remercier celle qui est à mes côtés et arrive à me supporter depuis tant d'année, Elodie.

Abbreviations

ADN	acide desoxyribonucléique
APS	ammonium persulfate
ATP	adénosine 5' triphosphate
BSA	bovin serum albumin
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
GAP	GTPase activating protein
GDP	guanosine 5' diphosphate
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GTP	guanosine 5' triphosphate
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LiAC	acétate de lithium
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyéthylène glycol
PMSF	phenyl methyl sulfoxyde fluoride
rpm	rotation par minute
SDS	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Temed	tetramethylethylenediamine
Tris	tris hydroxyméthylaminométhane
UV	ultra violet

The eukaryotic cell cycle is characterized by abrupt and dynamic changes in cellular polarity as chromosomes are duplicated and segregated. Those dramatic cellular events require coordination between the cell cycle machinery and polarity regulators. The mechanisms underlying this coordination are not well understood. In the yeast *S. cerevisiae*, as in other eukaryotes, the GTPase Cdc42 plays an important role in the regulation of cell polarity. Cdc42 regulators constitute a GTPase module that undergoes dynamic phosphorylation during the cell cycle by conserved kinases including Cyclin-Dependent Kinase 1 (Cdk1) and p21-activated kinase (PAK). These kinases and substrates may link cell polarity to the cell cycle progression. Using *in vitro* approaches, we have reconstituted the phospho-regulation of the Cdc42 Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF), Cdc24. We have identified a possible mechanism of Cdc24 regulation involving a scaffold-dependent increase in Cdc24 phosphorylation by Pak and Cdk1. This phosphorylation moderately increases the affinity of Cdc24 for another GTPase module component, the scaffold Bem1. Moreover, by testing the effect of other GTPase module components on the phosphorylation of Cdc24, and thus on its interaction with the scaffold, we identified an antagonistic function for the GTPase Activating Protein (GAP) Rga2. Our *in vivo* data of *rga2* mutants suggest that Rga2 phosphorylation by Cdk1 inhibits its GAP activity. We propose a tentative model to explain the inhibition of Cla4 by Rga2 and its presence in a complex containing Cdc24 and Bem1. The presence of the GAP protein in the complex may be a mechanism that reduces Cdc24 phosphorylation in case of a mistargetting of the complex in order to downregulate the GEF/Scaffold dimer. Since the PAK component of the GTPase module is itself activated by Cdc42 activity, our results are consistent with a model in which inputs from the cell cycle lead to auto-amplification of the Cdc42 GTPase module. In *S. pombe*, polarised growth requires a gradient of activation of Cdc42 due to GEF and GAP segregation. Here we show that all Cdc42 GAPs localise to the polarised site during the cell cycle. Those localisations are consistent with a requirement of Cdc42 cycling to maintain a polarity cap. Our results may suggest that Cdc42 GAPs localisations in *S. cerevisiae* are different from current knowledge in *S. pombe*.

SOMMAIRE

Introduction	1
1) Qu'est ce que le cycle cellulaire ?	2
2) Historique de la découverte des kinases cyclines dépendantes	5
3) Les kinases	7
4) Quels sont les exemples de phosphorylations multiples?	9
a. Comment la protéine Sic1 est-elle régulée pour initier l'entrée en phase S?	10
b. Comment la protéine Swe1 est-elle régulée pour permettre l'entrée en Mitose?	12
5) Quels sont les acteurs de la polarité cellulaire ?	15
6) Comment peuvent être liés le cycle cellulaire et la polarité ?	19
a. Exemple de lien entre la polarité cellulaire et le cycle cellulaire chez <i>Caenorhabditis elegans</i> .	19
b. Exemples de lien entre la polarité cellulaire et le cycle cellulaire chez <i>Drosophila melanogaster</i> .	20
c. Exemple de formation de l'anneau contractile nécessaire à la cytokinèse.	21
7) Cdc42 et les voies que la GTPase régule.	23
8) Comment Cdc42 peut-elle être active en un point précis de la membrane plasmique seulement, pour pouvoir établir la polarité ?	25
a. Les protéines Cdc24 et Bem1	26
b. Modèle de l'autoamplification du signal d'activation de Cdc42	28
Objectifs de ces travaux de thèse.	32
Matériels et méthodes	33
1) Matériels biologiques utilisés lors de ces études	34
a. Souches de levures utilisées au laboratoire	34
b. Souches de bactéries utilisées au laboratoire	35
2) Milieux utilisés en microbiologie	36
a. Milieux bactériologiques	36
b. Milieux pour les levures	37
3) Manipulation des acides nucléiques	40
a. Réaction en chaîne par polymérase (PCR)	40
b. Mutagénèse dirigée	41
c. Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose	42
d. Purification d'ADN après électrophorèse en gel d'agarose	42
e. Purification d'ADN plasmidique	43
f. Mesure de la concentration en ADN présent dans les échantillons	43
g. Digestion des échantillons d'ADN par des endonucléases de restriction	43
h. Ligation des échantillons d'ADN	43
i. Transformation d'ADN dans les bactéries compétentes	44
j. Préparation de cellules compétentes à la transformation.	44
k. PCR sur colonie	45
l. Purification d'ADN génomique de levure	45
m. Précipitation de l'ADN par phénol/Chloroforme	46
n. Transformation de levure	46
4) Manipulation des protéines	47
a. Préparation des culots bactériens pour effectuer les purifications de protéines recombinantes	47
b. Chromatographie d'affinité par le nickel (IMAC)	47
c. Chromatographie d'affinité par glutathion sepharose	49

d.	Concentration des protéines	50
e.	Chromatographie d'exclusion de taille	50
f.	Purifications des protéines Cdc24-6his et GST-Bem1	50
g.	Mesure de la concentration des protéines	52
h.	Électrophorèse en SDS-PAGE	53
i.	Coloration des gels	54
j.	Immunodétection des protéines (western blot)	56
k.	Résonance plasmonique de surface	58
l.	purification par TAP tagging	59
5)	Constructions réalisées au cours de ces travaux	62

Chapitre I: Préparation et caractérisation des différentes protéines nécessaires à l'étude de la phosphorylation *in vitro* de Cdc24. **65**

A)	Production des protéines recombinantes Cdc24-6his et GST-Bem1	66
a.	Nos constructions permettent-elles d'exprimer ces protéines dans <i>E.coli</i> ?	66
b.	Pouvons-nous purifier les protéines recombinantes Cdc24-6his et GST-Bem1?	66
c.	Dans quelle solution de stockage les protéines Cdc24-6his et Bem1 sont elles les plus stables?	67
d.	Cdc24 et Bem1 sont-elles dénaturées sous l'effet d'une augmentation de température?	69
e.	Les protéines recombinantes Cdc24 et Bem1 peuvent-elles interagir ensemble?	71
B)	Production des kinases Cla4 et Cln2/Cdk1 en vue des tests enzymologiques?	73

Chapitre 2: Etude *in vitro* de l'effet du module GTPase sur la phosphorylation de Cdc24 et ses conséquences. **76**

A)	La phosphorylation de Cdc24 par Cla4 requiert elle un repliement correct de Cdc24?	78
B)	La protéine Bem1 a-t-elle un effet sur la phosphorylation de Cdc24 par Cla4?	79
C)	Les réactions contenant Bem1 atteignent-elles des états de phosphorylation supérieurs ?	80
D)	L'autoactivation de Cla4 est elle nécessaire à la phosphorylation de Cdc24?	82
E)	Modélisation mathématique des processus régulant la phosphorylation de Cdc24 par Cla4.	83
F)	Quel est l'effet de la GTPase Cdc42 sur la phosphorylation de Cdc24 par Cla4?	88
G)	Ces différents effets sont ils spécifiques à Cla4, ou concernent ils tous les sites phosphorylables sur Cdc24 ?	90
H)	La kinase Cln2/Cdk1 active-t-elle Cla4?	90
I)	La phosphorylation de Cdc24 affecte-t-elle sa capacité à interagir avec Bem1?	92
J)	La protéine Rga2 a-t-elle un effet sur la phosphorylation de Cdc24 par Cla4?	94

Chapitre 3: Dynamique et phosphorylation des GAPs régulant Cdc42 au cours du cycle cellulaire. **98**

A)	Quel est l'effet des mutations pour la phosphorylation de Rga2 par Cln2/Cdk1?	101
B)	Peut-on observer ce phénotype lorsque les formes mutantes sont intégrées au locus?	103
D)	Les GAP colocalisent elles avec les domaines endocytiques?	105
E)	Quelle est la localisation des GAP en fonction de Cdc42 activé?	108

Chapitre 4: Etude préliminaire de la structure de la protéine d'échafaudage, Bem1. **111**

Discussion **117**

1)	Génération des produits nécessaires à l'étude de la phosphorylation de Cdc24.	118
a.	Caractérisation des protéines recombinantes	118
2)	Etude de la régulation de la phosphorylation de Cdc24.	120

<i>b.</i>	<i>D'autres protéines régulent la phosphorylation de Cdc24.</i>	124
4)	Modèle de régulation de Cdc24 au cours de la mise en place de la polarité cellulaire.	129
5)	Des mutants <i>rga2</i> pour la phosphorylation par Cln2/Cdk1 suggèrent un défaut de polarisation.	130
<i>a.</i>	<i>rga2-ps2 présente un effet additif avec un mutant cdc24</i>	130
<i>b.</i>	<i>Des mutants RGA2 pour la phosphorylation présentent un phénotype suggérant un défaut de polarisation.</i>	130
6)	La localisation générale des protéines GAP de Cdc42 semble similaire aux zones de polarisation.	131
<i>a.</i>	<i>Les protéines GAPs de Cdc42 localisent dynamiquement aux sites de polarisation au cours du cycle cellulaire.</i>	132
<i>b.</i>	<i>Les protéines GAPs et les domaines d'endocytose semblent mutuellement exclusifs.</i>	132
<i>c.</i>	<i>Les GAPs semblent localiser avec la forme active de Cdc42.</i>	133
7)	L'étude structurale de Bem1 est importante mais peu concluante pour le moment.	134

Références

136

Introduction

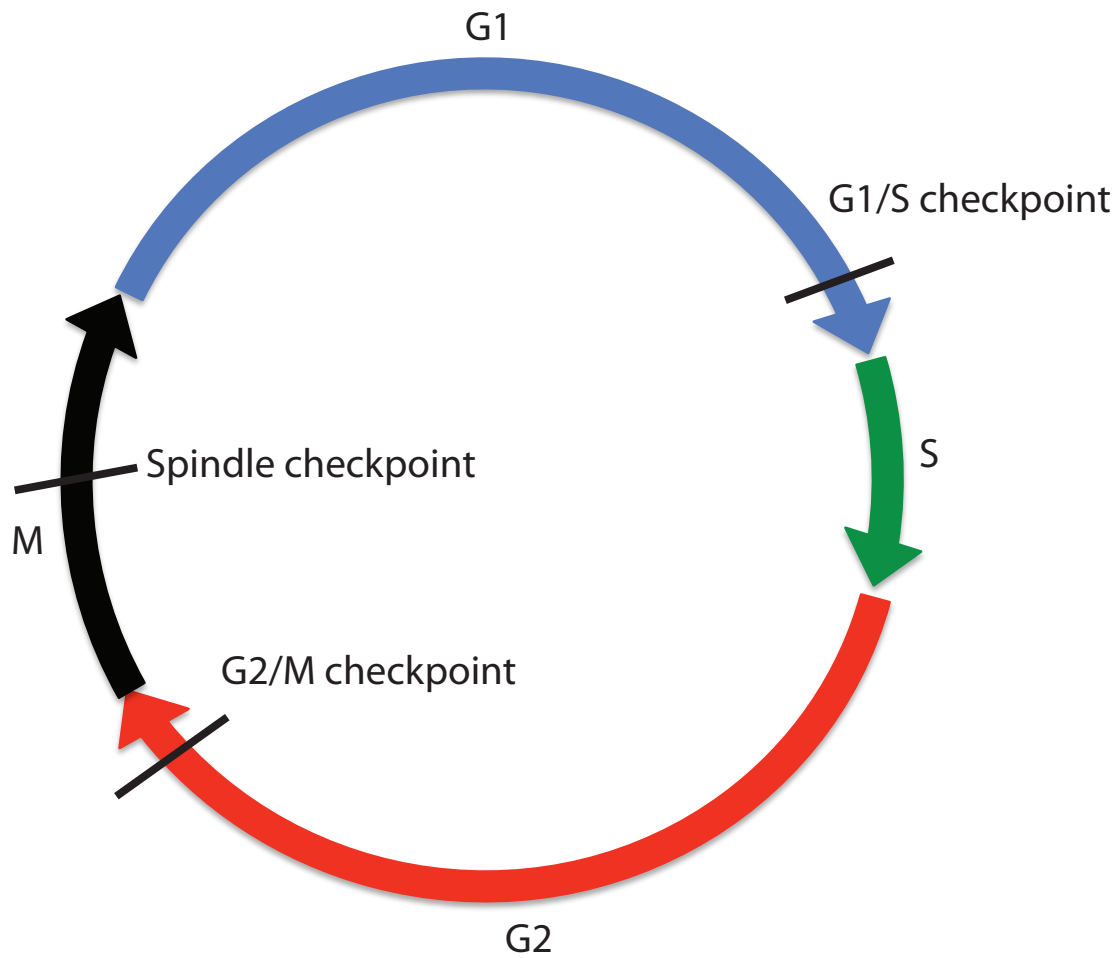


Figure 1. Schematic representation of the cell cycle.

Each phase of the cell cycle is represented by an arrow. G1 phase is blue, S phase is green, G2 phase is red and M phase is black. The different cell cycle checkpoints are represented by a line. Schema based on "le cycle cellulaire", Morgan, edition de boeck

La transmission de la vie repose sur la fiabilité de la division cellulaire, qui, lorsqu'elle s'effectue dans de bonnes conditions, permet la conservation du patrimoine génétique de l'espèce d'une génération de cellules à la suivante. Il est alors apparu que la régulation du cycle, au cours duquel les cellules croissent pour finalement se diviser avant de croître à nouveau, était cruciale à un grand nombre de fonctions cellulaires. En conséquence, sa dérégulation est impliquée dans de nombreuses maladies, allant des maladies neurodégénératives au cancer. La compréhension des mécanismes fondamentaux qui régissent le fonctionnement du cycle de croissance et de division chez les cellules eucaryotes est donc un pré-requis indispensable pour relever les défis posés par la médecine moderne. Les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent dans ce contexte, via l'investigation de processus cellulaires fondamentaux dans l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae*.

1) Qu'est ce que le cycle cellulaire ?

Le cycle cellulaire est l'ensemble des événements nécessaires à la reproduction d'une cellule. Les acteurs du cycle cellulaire contrôlent la duplication du contenu d'une cellule mère qui conduit à la transmission de ce patrimoine aux deux cellules générées suite à sa division. Le cycle des cellules eucaryotes est composé de quatre phases: G1, S, G2 et M (Figure 1). Les cellules qui viennent d'être engendrées par la division possèdent, au début de la phase G1, la moitié des composants que possédait leur génitrice avant la mitose. Elle va donc passer un certain temps à produire tous les facteurs nécessaires à sa fonction. C'est la phase G1. Cette étape est requise pour la production de protéines mais aussi de membrane: la cellule augmente de volume pour se préparer à une nouvelle division. Le passage entre la phase G1 et la phase suivante est sous la dépendance d'un point de contrôle qui permet la vérification de l'intégrité de l'ADN avant de répliquer le génome (Zetterberg, Larsson et al. 1995). La cellule vérifie que toutes les conditions sont réunies pour progresser dans le cycle. La phase S est l'étape au cours de laquelle la cellule duplique son matériel génétique, afin de transmettre une copie entière et intacte du génome à chaque cellule fille à venir. La phase suivante, appelée G2, est également une phase de croissance où la production de protéines vise essentiellement à

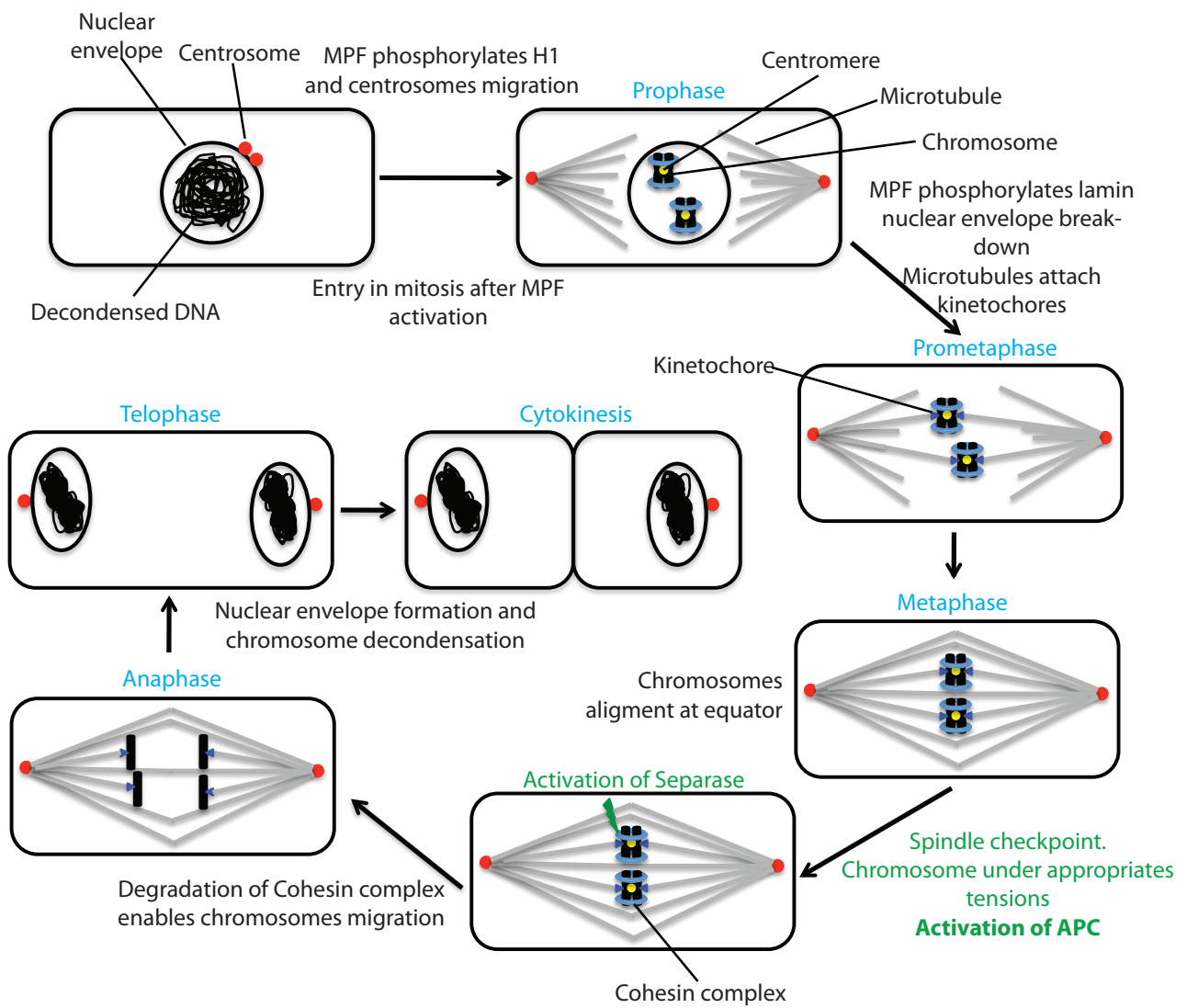


Figure 2. Schematic representation of Mitosis.

The different phases of mitosis are written in cyan. Spindle checkpoint is labeled in green.

Based on Raleigh et al., 2000; Labbe et al., 1989; Meraldi et al., 2002; Ward and Kirschner, 1990; Nicklas and Ward, 1994; Hardwick et al., 1999; Ciosk et al., 1998; Yang et al., 2007; Liu and Onuchic, 2006; Haraguchi et al., 2000.

préparer la mitose (M). La transition entre la phase G2 et la phase M est gouvernée par un autre point de contrôle impliquant le Mitosis-Promoting Factor (MPF, composé de la cycline B associé à Cdk1). Ce point de contrôle permet de vérifier que la réplication de l'ADN est terminée et que des lésions de l'ADN ne sont pas présentes, ce contrôle est directement lié à l'activation du MPF (Raleigh and O'Connell 2000).

La mitose est composée de plusieurs phases qui contrôlent les mécanismes nécessaires à l'héritage à l'identique du patrimoine génétique des cellules filles résultant de la division (Figure 2). Tout d'abord, lors de la prophase la chromatine se condense pour former les chromosomes suite à la phosphorylation des histones H1 par le complexe MPF (Labbe, Picard et al. 1989). A ce stade les chromosomes sont composés de deux chromatides sœurs reliées en une région appelée le centromère. Le cytosquelette de microtubules se réorganise également. En effet initialement positionnés à la périphérie du noyau, les centrosomes migrent en deux points diamétralement opposés de la cellule grâce aux filaments d'actine et de la myosin-II (Meraldi and Nigg 2002). Les microtubules sont projetés depuis les centrosomes vers le centre de la cellule par polymérisation de dimères de Tubulin- α et Tubulin- β .

Lors de l'étape suivante, la prométaphase, l'enveloppe nucléaire se dissout (ce n'est pas le cas dans la levure) sous l'effet de la phosphorylation des lamines (qui forment des filaments situés sur la face interne du noyau et essentiels à l'intégrité de la membrane nucléaire) par le MPF (Ward and Kirschner 1990). Une structure appelée kinétochore se forme au niveau des centromères des chromosomes. Ces structures, présentes à deux par centromère, s'apparient aux microtubules dit « kinétochoriens » et relie ainsi chaque chromatide à un pôle différent (Nicklas and Ward 1994). Ce phénomène permettra notamment la ségrégation d'une copie de chaque chromosome par cellule fille. D'autres microtubules non appariés aux kinétochores s'associent pour former le fuseau mitotique.

Lors de la métaphase, les chromosomes se positionnent sur le plan équatorial de la cellule. Cet alignement est engendré par la tension générée par l'attachement des kinétochores aux microtubules kinétochoriens en provenance de deux pôles opposés dans la cellule (Nicklas and Ward 1994).

Le passage entre la métaphase et l'anaphase est gouverné par un dernier point de contrôle appelé spindle checkpoint. La cellule vérifie l'attachement approprié de chaque chromatide sœur à un centrosome (Hardwick, Li et al. 1999). Le passage en anaphase est permis par l'activation de l'anaphase promoting complex (APC). Cette activation résulte dans la désactivation du MPF nécessaire à l'accomplissement de la mitose. Par ailleurs une autre protéine est dégradée sous l'effet de l'APC : la Securin. Cette protéine inhibe une protéase, la Separase, qui clive un complexe multiprotéique impliqué dans la cohésion des chromatides sœurs, le complexe Cohesin (Ciosk, Zachariae et al. 1998).

Lors de l'anaphase les chromatides sœurs sont tirées à chaque pôle de la cellule grâce à des moteurs dépendants de l'ATP (les dynéines) au niveau des kinétochores (Yang, Tulu et al. 2007) mais aussi grâce à la dépolymérisation des microtubules kinétochoriens (Liu and Onuchic 2006).

Enfin, lors de la dernière étape, la télophase, l'enveloppe nucléaire est régénérée (Haraguchi, Koujin et al. 2000) à chaque pôle pour protéger les chromosomes qui se décondensent.

La dernière étape de la mitose est la cytokinèse. Lors de cette étape les cellules se séparent grâce à l'action d'un anneau contractile formé d'actine et de myosine. Cette contraction est régulée par la GTPase RhoA.

La mitose permet d'assurer que chaque cellule fille hérite correctement d'une copie préservée du patrimoine génétique.

Au vu de son importance cruciale dans la vie d'une cellule et des organismes pluricellulaires, la progression dans le cycle cellulaire nécessite d'être finement régulée. Certaines protéines contrôlent directement l'avancement dans le cycle cellulaire. Les kinases cyclines-dépendantes (Cdk) jouent un rôle clé dans la plupart des étapes du cycle. Ces kinases ne peuvent avoir une activité que lorsqu'elles interagissent avec leurs sous-unités régulatrices, les cyclines (Jeffrey, Russo et al. 1995). L'expression de ces cyclines oscille alternativement lors des différentes phases du cycle cellulaire. Ces oscillations sont la conséquence de boucles d'autoamplification qui permettent de réaliser des changements d'états abrupts de la cellule. Les cyclines confèrent ainsi aux Cdk la possibilité de phosphoryler des substrats spécifiques, et par

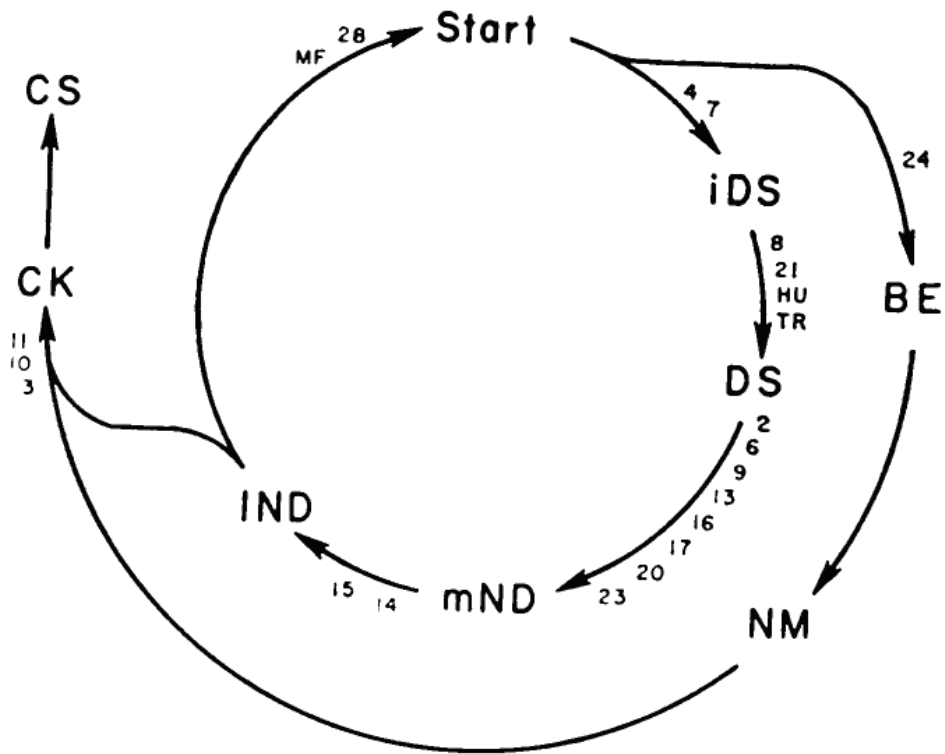


Figure 3. Circuitry of *S. cerevisiae* cell cycle presented in "Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast" published in 1974 by Hartwell *et al.*

Hartwell *et al.* presented their interpretation of the *S. cerevisiae* cell cycle events based on the mutants phenotype they described, this is Figure 3 of the article. The different numbers labelling the transitions in the cell cycle are the CDC gene numbers that block before the event they conduct.

The different event the authors describe are:

iDS: initiation of DNA Synthesis, DS: DNA Synthesis, mND: medical Nuclear Division, IND: late Nuclear Division, BE: Bud Emergence, NM: Nuclear Migration, CK: Cytokinesis and CS: Cell Separation.

conséquent de réguler des voies de signalisation différentes, ou les mêmes voies différemment.

2) Historique de la découverte des kinases cyclines dépendantes

La mise en place de cribles génétiques utilisant des mutants thermosensibles a mis en évidence que les produits de certains gènes étaient impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Ces travaux menés par Hartwell chez *S. cerevisiae* (Hartwell, Culotti et al. 1970) et par Nurse chez *S. pombe* (Nurse 1975), ont permis de réaliser une chronologie des événements composant le cycle cellulaire au travers de mutants qui bloquaient l'avancement dans le cycle lors de phases spécifiques en se basant sur les phénotypes des mutants à l'arrêt. Par exemple, Hartwell *et al.* ont décrit le circuit du cycle cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 3) (Hartwell, Culotti et al. 1974). Celui-ci se compose de deux voies progressant parallèlement suite à une étape commune, START, contrôlée par le produit du gène *CDC28*. La première voie conduit à l'émergence du bourgeon suivi de la migration du noyau, le tout sous le contrôle du produit du gène *CDC24*. La seconde voie amène à l'initiation de la synthèse de l'ADN, suivie de la division nucléaire. Les deux voies convergent pour aboutir à la cytokinèse puis à la séparation des cellules (Figure 1). Par la suite, Nasmyth et Nurse ont aussi disséqué le cycle cellulaire de *S. pombe* (Nurse, Thuriaux et al. 1976). Ces différents travaux ont conduit à la découverte de gènes dont les produits étaient impliqués dans le passage aux différentes étapes du cycle cellulaire, *CDC28* chez *S. cerevisiae* et *CDC2* chez *S. pombe*. L'avènement de la biologie moléculaire a permis des études plus poussées afin de caractériser les produits de ces gènes. Suite à la découverte de similarités de séquence avec des protéines kinases connues, il a été confirmé que *CDC28* et *CDC2* codaient des protéines présentant une activité kinase (Reed, Hadwiger et al. 1985; Simanis and Nurse 1986). La découverte que des mutants thermosensibles de ces gènes pouvaient être complétés par des cDNA humains a permis de mettre en évidence l'existence de ces acteurs conservés depuis la levure jusqu'à l'homme. La complémentation fonctionnelle souligne la forte conservation de ce processus de régulation du cycle cellulaire (Lee and Nurse 1987; Wittenberg and Reed 1989). Suite à l'identification de ces éléments majeurs dans la régulation de la

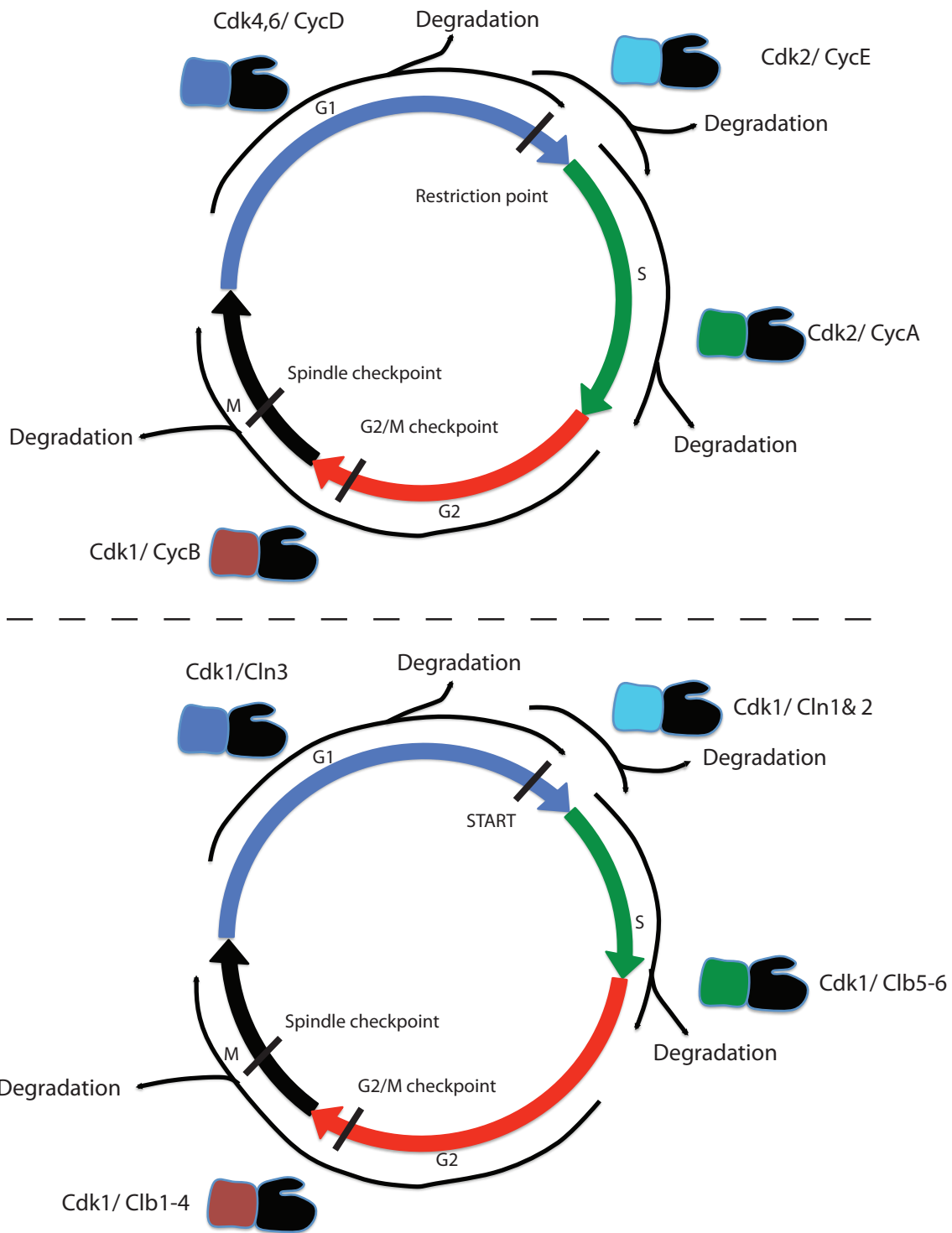


Figure 4. Cyclic expression of Cyclin in Metazoan and Yeast Cells (based on "Rb, who it's not just for metazoans anymore" published by Cooper, 2006).

The upper panel shows the expression of different cyclins associated to Cdks during the Metazoan cell cycle. The bottom panel shows the expression of different cyclins associated to Cdk1 during the *S. cerevisiae* cell cycle. The expressions of the different cyclins are shown as arrows.

progression dans le cycle cellulaire ainsi que leur mode d'action, une question restait en suspens. Comment leur activité peut-elle être régulée au cours du cycle cellulaire sachant que l'abondance de ces protéines reste constante au cours du cycle cellulaire ?

Une avancée majeure dans la compréhension de la régulation de ces protéines fut la découverte de protéines appelées Cyclines. Evans *et al.* firent une découverte surprenante lorsqu'ils étudièrent la synthèse protéique d'embryons d'oursins après fertilisation. Au delà des protéines synthétisées grâce aux ARN messagers provenant de la mère, ils mirent en évidence des protéines dont la synthèse avait lieu après la fertilisation et dégradées à chaque division. Ils appelèrent ces protéines Cyclines, du fait leur abondance cyclique au cours du cycle cellulaire (Figure 4) (Evans, Rosenthal et al. 1983). D'autres travaux ont permis de caractériser l'association d'une protéine à Cdc2 chez l'homme, la protéine p62 ou cycline B. Celle-ci a été montrée comme nécessaire à l'activation de Cdc2 lors de l'entrée en mitose (Brizuela, Draetta et al. 1989; Draetta and Beach 1989). Ce complexe a été mis en évidence comme étant le M-phase promoting complex (MPF, M pour maturation ou mitose). Les travaux de Murray *et al.* ont montré que ce complexe devait être inactivé au cours de la mitose pour permettre sa complétion, c'est la destruction de la cycline B qui permet le passage du spindle checkpoint (Murray, Solomon et al. 1989). Dans la levure, l'étude de la cycline Clb1 (aussi appelée Scb1) par Ghiara *et al.* a amené de nouvelles informations concernant la régulation de ce complexe au cours de la mitose. En utilisant un mutant ne possédant pas la partie amino-terminale, les auteurs ont mis en évidence un défaut de complétion de la mitose (Ghiara, Richardson et al. 1991). Ce résultat est similaire aux observations réalisées par Murray *et al.* (Murray, Solomon et al. 1989), qui ont mis en évidence la stabilisation d'une forme tronquée de la cycline B dans des lysats d'embryon de Xénope ainsi qu'un arrêt de la mitose lors de la métaphase. La partie amino-terminale de certaines cyclines contiennent une séquence appelée cyclin destruction box. La délétion ou le changement de cette séquence entraîne une modification de la stabilité des cyclines (Klotzbucher, Stewart et al. 1996; Yamano, Tsurumi et al. 1998). Une autre partie des cyclines, appelée séquence

PEST, est supposée comme impliquée dans la dégradation rapide de certaines protéines (Rogers, Wells et al. 1986).

Ainsi, le complexe MPF permet l'entrée en mitose en affectant diverses voies lorsqu'il est activé (voir la partie sur la régulation de Swe1), alors que son inactivation permet la complétion de la mitose. Cette dernière étape est dépendante de la dégradation de la cycline associée médiée par l'anaphase promoting complex.

Cependant les cyclines ne sont pas requises uniquement dans la transition G2/M. En effet d'autres cyclines ont été identifiées comme impliquées dans la transition G1/S. Celles-ci ont dans un premier temps été mises en évidence dans la levure *S.cerevisiae* par Hadwiger *et al.*. Les auteurs ont découvert deux gènes dont la surexpression des produits permettait de compléter une mutation conditionnelle de *CDC28*, *CLN1* et *CLN2* (Hadwiger, Wittenberg et al. 1989) en plus de la caractérisation d'un mutant dominant de *CLN2* abrogeant l'arrêt du cycle cellulaire en G1 en absence de source d'azote. En effet le mutant mis en évidence présentait un arrêt de croissance, comme le contrôle, mais présentait également une contenance en ADN et un taux de bourgeonnement plus élevés, témoins d'un arrêt du cycle après la phase G1. De plus, en condition normale de croissance ce mutant présentait une taille inférieure au contrôle. Ces travaux furent les premiers à mettre en évidence l'effet de Cycline en fin de phase G1 lors du passage du point de contrôle pour l'entrée en phase S. Ce checkpoint est ce qu'avait introduit Hartwell comme le point START dans le cycle cellulaire (Hartwell, Culotti et al. 1974). Lew et al. ont par la suite trouvé, par complémentation de mutant pour *CLN1*, *CLN2* et *CLN3*, de nouvelles cyclines à l'aide d'un crible de banque de cDNA humains. Les cyclines C, D et E furent ainsi découvertes chez l'homme (Lew, Dulic et al. 1991).

3) Les kinases

Les kinases sont des enzymes qui catalysent la réaction de phosphorylation, c'est-à-dire le transfert du groupement phosphate PO_3^- en position γ de l'ATP sur une protéine. La modification physique de la protéine résultant de cette phosphorylation peut avoir des effets très divers sur les

propriétés de la protéine, et réguler son interaction avec d'autres protéines ou lipides, son activité ou sa localisation (Cohen 2000). La phosphorylation est un processus réversible : la réaction de déphosphorylation est catalysée par des protéines appelées phosphatases. Le niveau de phosphorylation d'une protéine dépend donc d'une balance entre l'activité des kinases et des phosphatases qui peuvent reconnaître ses sites de phosphorylation spécifiques. La réversibilité de cette modification en fait l'outil idéal pour contrôler les événements du cycle cellulaire. Par exemple l'entrée en anaphase est dépendante de l'activation de l'APC et de l'inhibition de Cdk. Bouchoux et Uhlmann ont mis en évidence que la balance entre l'activité Clb2/Cdk1 et Cdc14 (une phosphatase antagoniste) était importante pour la chronologie de déphosphorylation des substrats de la kinase parallèlement à une compétition entre ceux-ci (Bouchoux and Uhlmann 2011). Cette balance entre la phosphorylation et la déphosphorylation permet la progression dans la mitose et régule les substrats distinctement lors de différentes phases. Les substrats utilisés dans leurs travaux sont Fin1, Sli15 et Orc6, ils sont tous initialement phosphorylés par Clb2/Cdk1. La déphosphorylation de Fin1 et Sli15 par Cdc14 permet la stabilisation des spindle pole bodies (centrosomes chez *S.cerevisiae*) lors de l'anaphase. La déphosphorylation de Orc6 est elle en revanche requise pour la réplication de l'ADN lors de la phase S suivante. Ainsi la déphosphorylation de ces protéines ne doit pas avoir lieu aux mêmes phases du cycle cellulaire. Cependant les modifications de ces substrats sont gouvernées par le même couple kinase/phosphatase. Les auteurs ont mis en évidence que non seulement le ratio kinase/phosphatase est impliqué dans la régulation de ces substrats mais qu'une compétition entre les substrats s'additionne à cela, Fin1 et Sli15 étant prioritairement déphosphorylés dans une même réaction contenant Orc6. Les mécanismes décrits dans ces travaux illustrent la sophistication de cette modification post-traductionnelle. La phosphorylation permet la modulation des caractéristiques d'une protéine, la réversibilité de ce processus en fait un outil avantageux pour la cellule qui peut allumer ou éteindre un signal rapidement.

Chez les eucaryotes, il existe différents types de kinases, selon les acides aminés qu'elles sont en mesure de phosphoryler : les sérine/thréonine kinases, et les tyrosine kinases chez les eucaryotes (Manning, Plowman et al. 2002). La

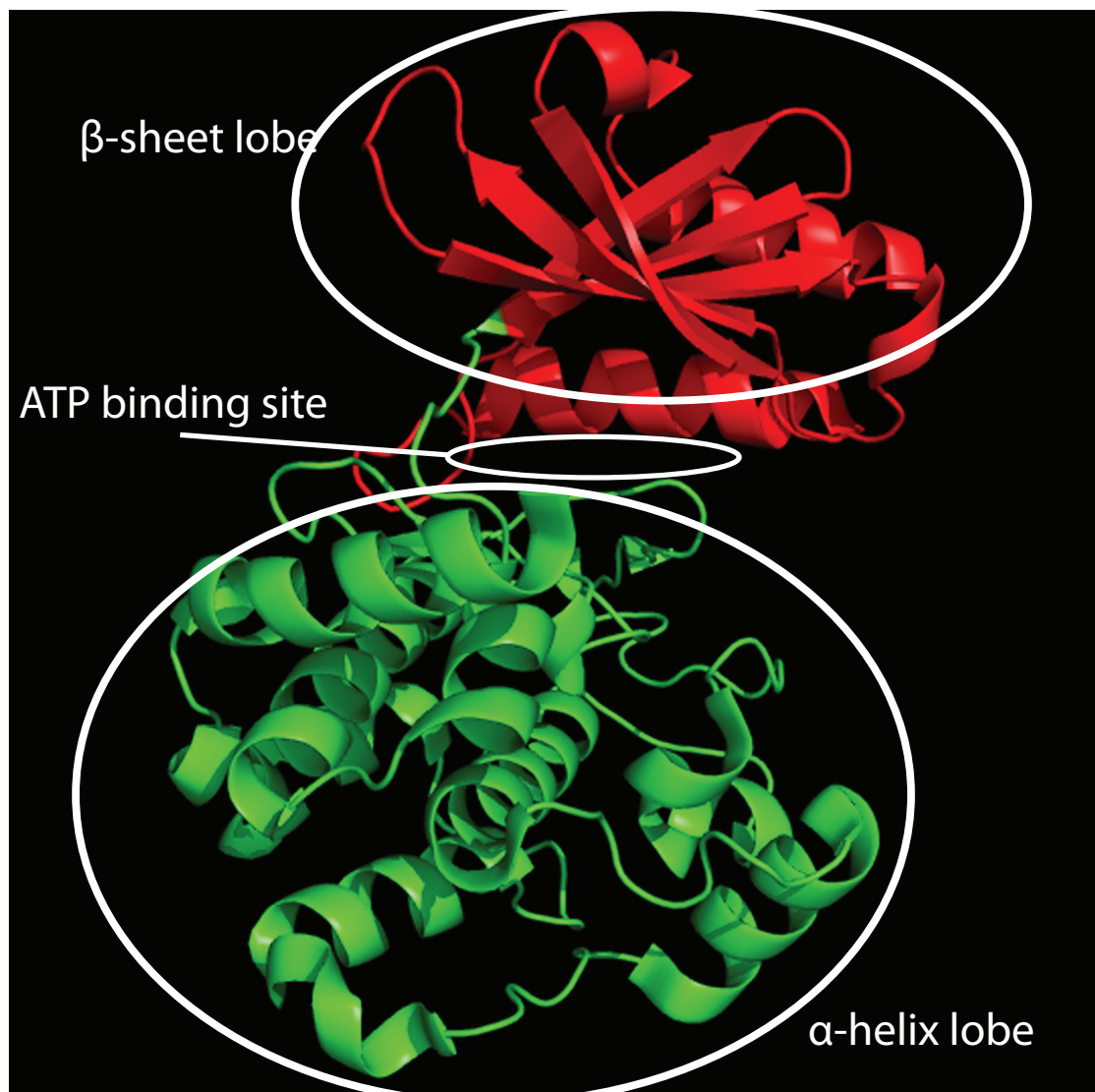


Figure 5. Representation of a kinase domain based on PAK1 kinase domain structure ("Structural insights into the autoactivation mechanism of p21-activated protein kinase" published by Wang *et al.*, 2011).

The β -sheet lobe is colored in red and the α -helix lobe is colored in green. The ATP binding site is localised at the interface between the two lobes.

majorité des kinases reconnaissent des sites de phosphorylation dits « consensus », à savoir une séquence spécifique d'acides aminés, ce qui leur permet de phosphoryler uniquement des substrats caractéristiques (Ubersax and Ferrell 2007). Cette spécificité de reconnaissance est la conséquence même de la séquence d'acides aminés entourant la poche catalytique de la kinase, et de la structure physique qu'ils forment au sein de l'enzyme. En effet, les acides aminés de la kinase forment des liaisons hydrogènes ou hydrophobes avec le site reconnu du substrat. Il peut cependant arriver que certains sites non consensus soient phosphorylés, ou que des protéines présentant ces sites consensus ne soient pas des substrats avérés de la kinase. Les domaines conférant l'activité kinase sont fortement conservés sur le plan structural (Figure 5)(Hanks and Hunter 1995). Ils sont organisés en deux lobes, avec en amino-terminal un lobe composé de feuillets β et en carboxy-terminal un lobe composé d'hélices α (Ubersax and Ferrell 2007). L'ATP se positionne à l'interface entre les deux lobes avec les groupements phosphate orientés vers l'extérieur où se positionne la protéine substrat. Au cours du cycle cellulaire, de nombreuses protéines peuvent être phosphorylées sur plusieurs sites. Cela permet de générer un nombre important de formes phosphorylées du substrat, nombre qui augmente très rapidement avec le nombre de sites de phosphorylation (Cohen 2000). Dans de nombreux cas, il a été démontré que la phosphorylation du substrat sur des sites multiples confère aux voies de signalisation que le substrat régule un fonctionnement de type « interrupteur moléculaire » : la réponse de la voie au stimulus de la phosphorylation est alors fortement non linéaire, hypersensible aux changements de niveau de phosphorylation.

4) Quels sont les exemples de phosphorylations multiples?

Ce type de réponse « tout ou rien » est parfaitement adapté à la progression dans le cycle cellulaire, où les transitions entre phases se doivent d'être abruptes, parfaitement définies et résolues dans le temps et l'espace. Par exemple, la cellule doit synchroniser dans le temps les activités des deux grandes familles de cyclines (cyclines G1 et cyclines de type B) et leur association aux Cdk. En effet, la cellule ne doit répliquer son génome qu'une fois par cycle cellulaire, uniquement lorsqu'elle a atteint une certaine taille (volume). Ainsi, c'est l'expression des

cyclines G1, *CLN2* et *CLN1*, qui va permettre la sortie de la phase G1 alors que les complexes Cdk1/Clb5 vont ensuite déclencher la réplication en début de phase S. Les ARN messagers permettant l'expression des cyclines Cln1 et Cln2 sont transcrits par le facteur de transcription SBF (Swi4 et Swi6). Ce complexe est inhibé par la protéine Whi5. Lorsque les conditions de croissance et le niveau métabolique cellulaire sont favorables, la cycline Cln3 est exprimée (Schneider, Zhang et al. 2004). Lorsqu'elle est complexée avec Cdk1 cette cycline permet la phosphorylation de Whi5 et la levée de la répression du complexe SBF (Costanzo, Nishikawa et al. 2004). Cln2 et Cln1 inactiveront alors encore plus de Whi5, favorisant leur propre expression (Skotheim, Di Talia et al. 2008). Les deux cyclines permettent aussi l'activation du complexe transcriptionnel MBF (Mbp1 et Swi6) nécessaire à l'expression de gène impliqué dans la phase S, notamment les Cyclines Clb5 et Clb6 (Schwob and Nasmyth 1993). Cette transition est appelée START, il s'agit d'un engagement irréversible de la cellule dans le cycle cellulaire.

Cependant ces deux groupes de cyclines ne sont pas requis aux mêmes moments. L'activité Cdk liée à Clb5 et Clb6 n'a pas lieu d'être en même temps que celle dépendante des Cln. Pourtant la production de Clb5 et Clb6 a lieu suite à l'inactivation de Whi5, bien avant que ces cyclines ne soient nécessaires. Comment ces deux types de cyclines peuvent elles être présentes en même temps? Comment la cellule gère-t-elle le passage entre les phases régulées par ces différents types de cyclines?

a. Comment la protéine Sic1 est-elle régulée pour initier l'entrée en phase S?

Des études menées chez la levure bourgeonnante ont montré que dans cet organisme la transition G1/S reposait sur la phosphorylation multi-sites d'un inhibiteur du complexe Cdk1/Clb5, la protéine Sic1. Cette protéine est exprimée en fin d'anaphase, inhibant le complexe Cdk1/Clb2 mitotique ce qui favorise la division cellulaire. Cette diminution dans l'activité Cdk1 mitotique est majoritairement provoquée par la destruction des Clb2 suite à l'activation de l'APC. Sic1 interagit directement avec les complexes Clb2/Cdk1 résiduels, inhibant toute accessibilité à ses substrats. Parmi les substrats de Clb2/Cdk1 se

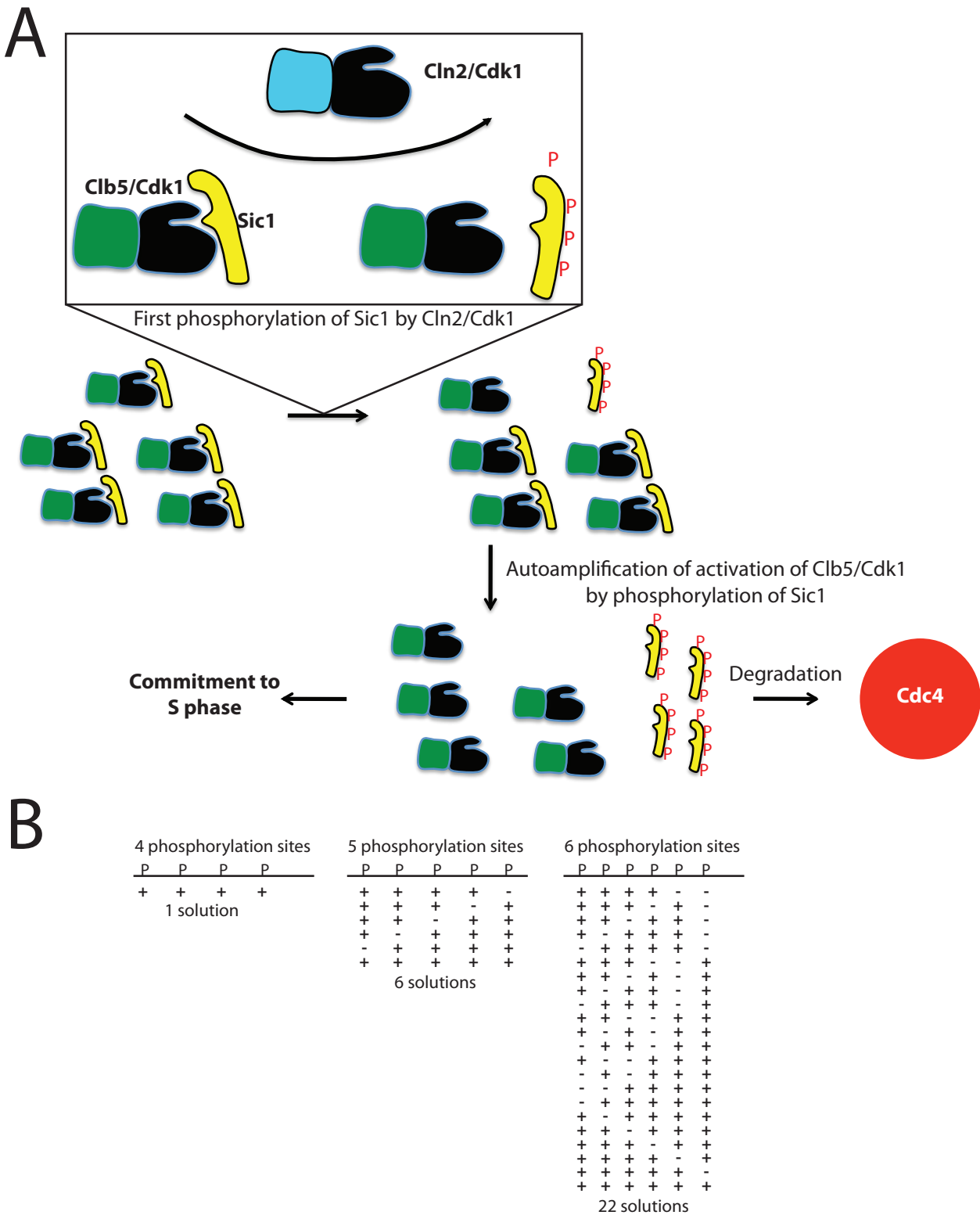


Figure 6. Sic1 multistate phosphorylation enabling activation of Clb5/Cdk1

(A) Schematic representation of Sic1 multistate phosphorylation. Initiation of Sic1 phosphorylation is dependent upon Cln2/Cdk1 activity. Free Clb5/Cdk1 autoamplify its activation by phosphorylating Sic1 protein in complex with other Clb5/Cdk1. Phosphorylated Sic1 interacts with Cdc4 and is targeted to degradation.

Based on Feldman, Correll *et al.*, 1997, Cell; Nash, Tang *et al.*, 2001, Nature; Harper, 2002, Trends Cell Biol; Koivomagi, Valk *et al.*, 2011, Nature.

(B) Schematic representation explaining the requirement for 6 phosphorylation sites to provide efficient response by 4 phosphorylated residues (Based on Annan, Huddleston *et al.*, 2001, Anal Chem).

trouve le facteur de transcription Swi5 dont la phosphorylation inhibe l'activité. Ce facteur de transcription transcrit l'ARN messager contenant le cadre de lecture de Sic1; Sic1 en inhibant Clb2/Cdk1 lève alors cette inhibition et promeut ainsi sa propre expression (Moll, Tebb et al. 1991). Le signal de fin d'anaphase est ainsi rapidement amplifié. Après la division cellulaire, Sic1 interagit avec le complexe Clb5/Cdk1 ce qui permet l'inhibition du complexe kinase. En effet l'abondance de Clb5 augmente progressivement lors de la phase G1 mais son activité n'est requise que pour la réplication de l'ADN nécessaire à la préparation de la division suivante. C'est à la transition G1/S que Sic1 est phosphorylée sur de multiples sites (panel A de la Figure 6) (6 sites phosphorylables sont nécessaires au minimum), permettant l'interaction de Sic1 avec la protéine Cdc4. Cette protéine s'associe alors avec les protéines Skp1 et Cdc53 pour former une ubiquitine ligase E3, le complexe SCF (F pour F-Box protein, qui est Cdc4). Cela engendre une ubiquitination de Sic1 phosphorylée et sa dégradation, mettant fin à l'inhibition de Clb5/Cdk1 (Feldman, Correll et al. 1997; Nash, Tang et al. 2001; Harper 2002; Koivomagi, Valk et al. 2011). Ce signal de dégradation de Sic1 est initié par l'activité des complexes cyclines G1/Cdk (Cln/Cdk), puis amplifié par les complexes Clb5/Cdk1 libérés par la dégradation de Sic1, et qui peuvent ainsi aller phosphoryler d'autres molécules de Sic1. Ainsi la phosphorylation multiple de Sic1 résulte en une boucle d'auto-activation de Clb5/Cdk1, qui induit sa dégradation complète via une interaction avec un composant d'un complexe d'ubiquitination. Une fois cette boucle activée, la cellule avance irrémédiablement en phase S pour commencer la réplication de l'ADN.

Les raisons qui expliquent la nécessité de six sites de phosphorylation sur la protéine Sic1 pour initier la transition G1/S sont multiples. Premièrement la présence de ces sites pourrait être un senseur de l'activité globale de Cln/Cdk1, plus l'activité de cette kinase est forte (l'expression des cyclines Cln permet l'augmentation de leur concentration intracellulaire) plus Sic1 sera phosphorylée (Deshaies and Ferrell 2001). Deuxièmement, la nécessité d'avoir 6 sites phosphorylés pour interagir avec Cdc4 ne semble pas primordiale. En effet Annan *et al.* ont mis en évidence que *in vivo*, les phosphopeptides contenant 4 sites phosphorylés étaient les plus présents dans des conditions où Sic1 ne pouvait pas être dégradé (Annan, Huddleston et al. 2001). Si la dégradation de

Sic1 nécessite la phosphorylation de 4 résidus, la réponse à ce signal ne sera pas la même si 4, 5 ou 6 sites sont phosphorylables. Dans le cas de 4 sites potentiels, seulement un état de phosphorylation remplit les critères requis à l'interaction avec Cdc4. Si Sic1 peut être phosphorylée en 5 sites, le nombre d'états possibles à 4 résidus phosphorylés au minimum devient 6. Si le nombre de résidus phosphorylables devient 6, alors le nombre d'état devient 22 (panel B de la Figure 6). Donc ce mécanisme implique une réponse ultrasensible dépendante de la concentration en Cln/Cdk1. Une fois le processus commencé, Clb5/Cdk1 commence à être désinhibé et phosphoryle plus de Sic1 (Koivomagi, Valk et al. 2011), cela correspond à une activation de type exponentielle du complexe et donc à une transition abrupte en phase S.

Par ailleurs les Clb/Cdk1 inhibent également la synthèse des cyclines G1, qui sont à l'origine du signal initial de leur propre activation. En effet Clb1 et Clb2 inhibent directement la transcription par le complexe SBF (dont CLN1 et CLN2). De plus Clb1 et Clb2 favorisent la transcription de leurs ARN messagers (Amon, Tyers et al. 1993). Ce système constitue une boucle d'auto-activation irréversible qui permet de passer d'un état à un autre.

b. Comment la protéine Swe1 est-elle régulée pour permettre l'entrée en Mitose?

Comme l'entrée en phase S, l'entrée en Mitose est un évènement unique dans le cycle cellulaire. Ce point de contrôle requiert des conditions appropriées, qui lorsqu'elles sont remplies permettent une entrée rapide et irréversible en Mitose. L'entrée en mitose est dépendante de l'activation des complexes Cyclines mitotiques/Cdk1 (Gautier, Norbury et al. 1988; Labbe, Picard et al. 1989; Langan, Gautier et al. 1989). Le niveau d'expression des cyclines mitotiques augmente linéairement au cours du cycle (Evans, Rosenthal et al. 1983), mais les complexes qu'elles forment avec Cdk1 ne sont fortement actifs que lors de l'entrée en Mitose. Cette caractéristique suggère un mécanisme de régulation des complexes Cyclines mitotiques/Cdk1 qui permet une amplification rapide de leur activité kinase. Cette activation est un processus qui implique la phosphorylation de Cdk1 sur un résidu tyrosine fortement conservé (Y19 chez *S. cerevisiae* et Y15 chez les autres eucaryotes) (Gould and Nurse 1989; Featherstone and Russell 1991; Harvey and Kellogg 2003). La phosphorylation de ce résidu inhibe

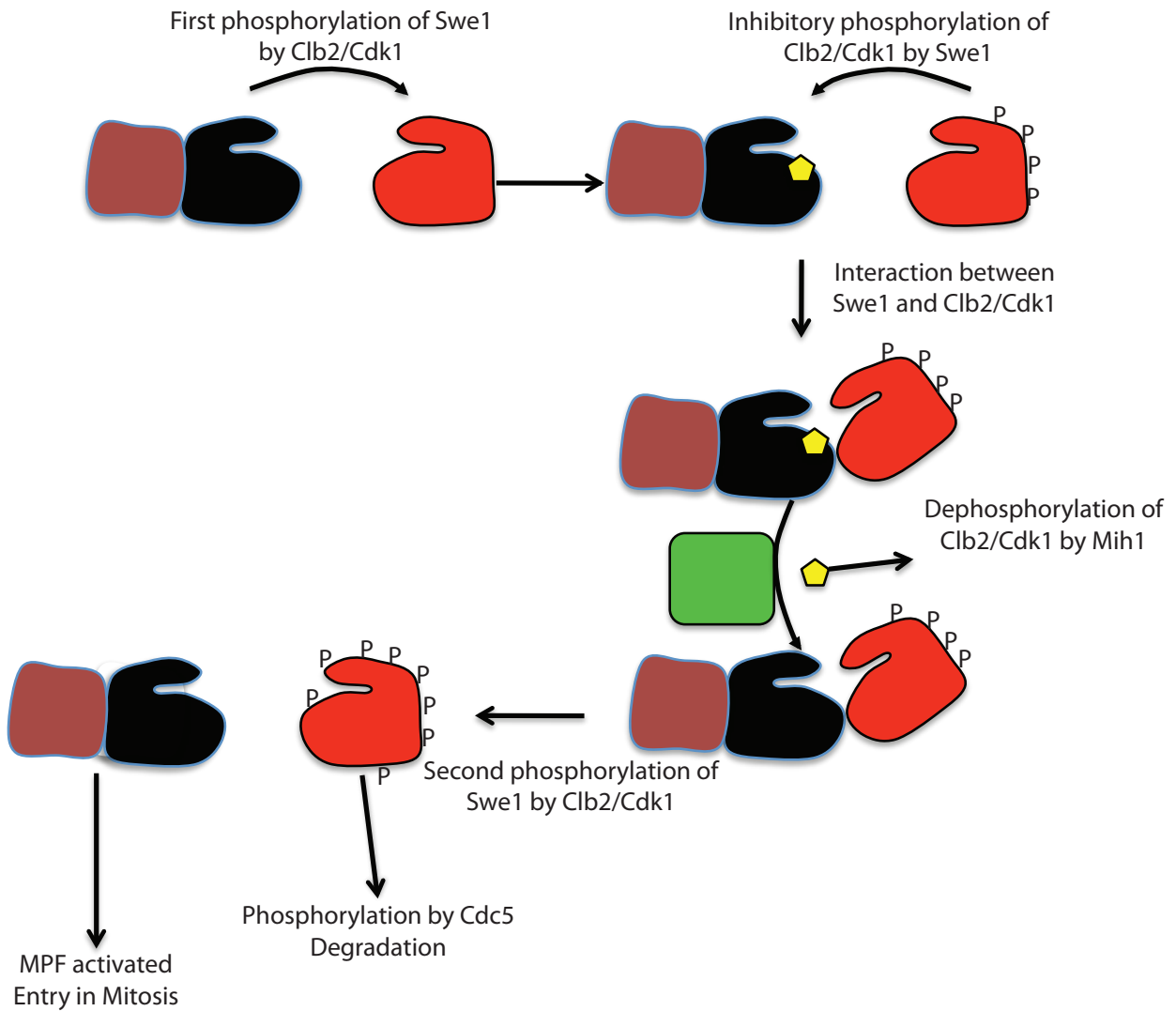


Figure 7. Regulation of Swe1 kinase

Schematic representation of Swe1 multistate phosphorylation. First multiphosphorylation of Swe1 by Clb2/Cdk1 enables inhibition of Clb2/Cdk1 by an inhibitory phosphorylation of Cdk1 by Swe1 and allows interaction between the proteins. When Cdk1 inhibitory phosphorylation is removed by Mih1, Clb2/Cdk1 increases the phosphorylation level of Swe1 resulting in the release of Swe1. Swe1 will be degraded after a last phosphorylation by Cdc5. Activation of Clb2/Cdk1 (MPF) results in entry in Mitosis.

Based on Gould and Nurse, 1989, Nature; Featherstone and Russell, 1991, Nature; Harvey and Kellogg, 2003, Curr Biol; Simpson-Lavy and Brandeis, 2010, Cell Cycle.

l'activité kinase de Cdk1 et est réalisée par les kinases de la famille Wee1. Le processus inverse qui vise à ôter cette phosphorylation est catalysé par une phosphatase de la famille Cdc25 (Mih1 chez *S. cerevisiae*) (Gautier, Solomon et al. 1991; Harvey and Kellogg 2003). Sur le plan phénotypique les cellules entrent en mitose prématurément lorsque la kinase Wee1 n'est pas active (délétion ou mutant thermosensible). Ce phénotype est observable par le fait que chez *S. pombe* les cellules entrent en mitose avec des tailles inférieures à la souche sauvage (Nurse, Thuriaux et al. 1976). De même chez *S. cerevisiae* la taille de la cellule fille dans une souche Δ *swe1* est inférieure à la souche contrôle (Harvey and Kellogg 2003). Par ailleurs, des souches mutées pour la phosphatase antagoniste présentent un phénotype inverse, la cellule est plus grande lorsqu'elle entre en division chez *S. pombe* et le bourgeon est plus gros chez *S. cerevisiae* (Nurse, Thuriaux et al. 1976; Harvey and Kellogg 2003).

Ce mécanisme permet de contrôler l'activité Cyclines mitotiques/Cdk1 et ainsi garantir que l'entrée en mitose est réalisée lorsque les conditions requises sont remplies.

L'entrée en mitose nécessite donc une activation abrupte des complexes Cdk/Cyclines mitotiques préexistants sous forme inhibés. Chez *S. cerevisiae* cette activation rapide se fait via un substrat acceptant de multiples phosphorylations, catalysées entre autres par Cdk1/Clb2: la kinase Swe1. Swe1 répond en effet à l'augmentation du niveau d'expression de Clb2 pendant la phase G2 du cycle cellulaire au cours de laquelle Swe1 est phosphorylée par Cdk1/Clb2 jusqu'à un niveau intermédiaire (Figure 7). A ce niveau de phosphorylation, Swe1 phosphoryle rétroactivement Cdk1 sur le résidu critique tyrosine 19, dont le niveau global de phosphorylation dépend de la balance entre l'activité de Swe1 et celle de la phosphatase Mih1. Cette première phosphorylation de Swe1 par Cdk1 a un double effet : induire l'inactivation du complexe Cdk au travers de la modification de la tyrosine, et le séquestrer en formant un complexe trimoléculaire Cdk1/Clb2/Swe1 (Harvey, Charlet et al. 2005). L'activité de Mih1 est sous le contrôle de son état de phosphorylation par la Casein kinase et la phosphatase PP2A (Pal, Paraz et al. 2008). Lorsque le niveau d'activité phosphatase de Mih1 augmente, Cdk1/Clb2 tend à être activé. Cela engendre une phosphorylation massive de Swe1 en de nombreux sites, permettant la

déstabilisation du complexe triprotéique. Par ailleurs la forme hyperphosphorylée de Swe1 interagit alors avec la kinase Cdc5. Cette interaction et la phosphorylation finale de Swe1 par Cdc5 résultent en la dégradation de Swe1 suite à une ubiquitination (Simpson-Lavy and Brandeis 2010).

Lorsque la levée de l'inhibition de quelques complexes Cdk1/Cyclines a lieu, ceux-ci pourront phosphoryler d'autres Swe1 toujours complexées. Ce processus permet d'amplifier rapidement l'activation de Cdk1/Cycline et d'initier une boucle d'activation autoamplificatrice au travers de la phosphorylation multiple de la kinase Swe1. Cette activation abrupte de l'activité kinase des complexes Cdk1/Cycline mitotique permet l'avancée en phase mitotique.

Ces différentes études montrent l'importance de la phosphorylation dans la régulation du cycle cellulaire, qui repose sur une séquence bien précise d'activation « tout ou rien » de différents complexes cyclines/kinases. Les deux exemples de phosphorylation multiple illustrent comment un changement radical de régime peut être contrôlé par ce mécanisme. Par ailleurs la phosphorylation multiple semble être un senseur de l'activité globale de la kinase qui la régule, ce qui permet une régulation fine du substrat. De ces réponses tout ou rien du substrat résultent de forts changements dans la signalisation cellulaire. Ce mécanisme lié à des réponses autoamplifiées confère aux cellules la possibilité de générer des changements intracellulaires radicaux.

Les exemples cités précédemment mettent en lumière la nécessité de changements abrupts dans l'activation de Cdk1. Ces changements radicaux permettent, par exemple, la duplication et la ségrégation du génôme. Parallèlement à cela, la cellule subit des changements tout aussi rapides de son architecture afin de faciliter la croissance cellulaire et la division. Par exemple le passage du point de contrôle G1/S permet à la cellule de progresser en phase S uniquement lorsque les conditions de croissance et métaboliques sont favorables. Un autre exemple concerne l'activité de Swe1. Celle-ci est supposée comme étant régulée par des signaux de la croissance cellulaire et de la morphogénèse, permettant l'entrée en mitose uniquement lorsque la cellule

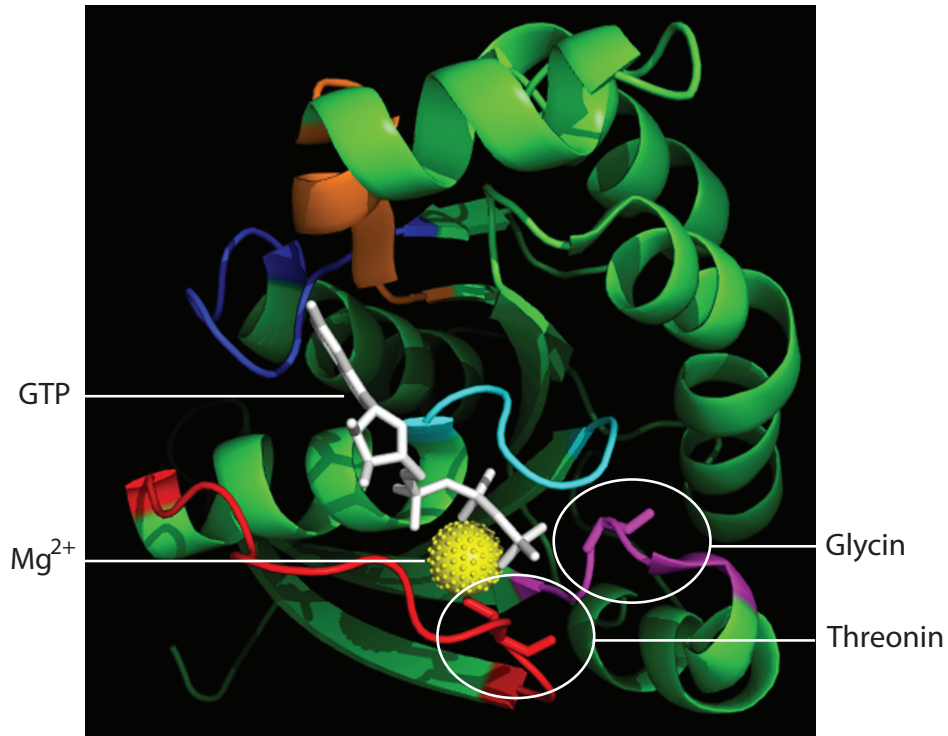
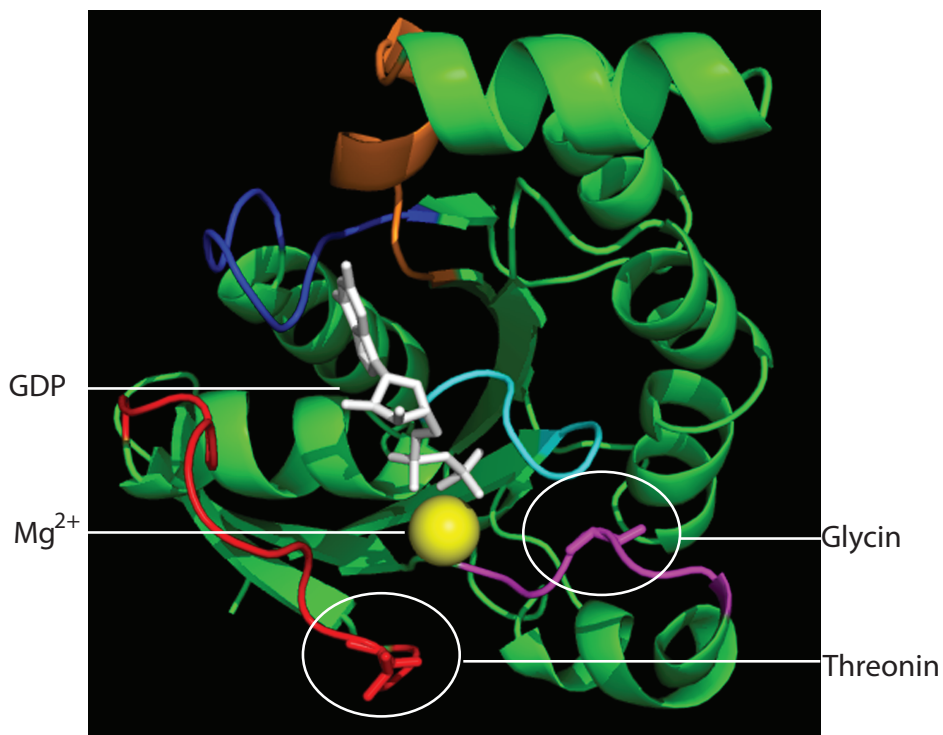
A**Active form of Cdc42****B****Inactive form of Cdc42**

Figure 8. Cdc42 GTPase structure in active and inactive form

(A) Active form of human Cdc42. Structure from Garrard *et al.*, 2003, EMBO.

(B) Inactive form of human Cdc42. This structure is G12V mutant of Cdc42. Structure from Rudolph *et al.*, 1999, Protein Sci.

GTP or GDP are colored in white. Magnesium ion is shown in yellow. G1, G2, G3, G4 and G5 footprints are colored in cyan, red, purple, orange and blue, respectively. Threonine and glycine residues (in G2 and G3, respectively) are surrounded in white. Those views illustrate the structural changes between active and inactive forms.

présente les caractéristiques requises. Cela montre que l'avancement dans le cycle cellulaire n'est pas réalisé sans un contrôle de la croissance de la cellule. Comment la cellule coordonne la localisation et la quantité de matériel requis pour la croissance avec la progression du cycle cellulaire contribue à la forme adoptée par la cellule. Cela représente une question majeure qui n'est pas totalement comprise dans la biologie du cycle cellulaire.

La progression dans le cycle cellulaire est étroitement liée à des changements de propriétés de la cellule dans l'espace, via le contrôle de ce qui est appelé la polarité cellulaire. La polarité cellulaire est l'organisation asymétrique des composants. Elle est requise dès lors que la cellule a besoin, pour assurer ses fonctions, de se déformer, de migrer, ou d'organiser spatialement ses organelles comme c'est le cas lors de la préparation à la mitose. Toutes les cellules eucaryotes créent à un moment ou à un autre de leur vie une asymétrie pour remplir différentes fonctions, depuis la levure dont la croissance devient anisotrope durant le cycle cellulaire jusqu'aux cellules souches des mammifères qui ségrégent asymétriquement des facteurs de différenciation.

5) Quels sont les acteurs de la polarité cellulaire ?

Les GTPases de la superfamille des Ras, sont des interrupteurs moléculaires. Elles peuvent aussi être appelées petites protéines G. La structure des domaines GTPasiques est fortement conservée dans le vivant. En effet le domaine d'interaction au guanosine triphosphate présente une signature caractéristique (la structure de Cdc42 chez l'homme est présentée dans la Figure 8, sous forme active et inactive (Rudolph, Wittinghofer et al. 1999; Garrard, Capaldo et al. 2003)). Il est composé de 6 feuillets β et 5 hélices α . Les GTPases présentent 5 empreintes caractéristiques appelées G1 à G5. G1 est la séquence permettant l'interaction avec le groupement phosphate, cette séquence est communément appelée P-loop (Saraste, Sibbald et al. 1990), elle est aussi retrouvée dans les ATPases. G2 et G3 interagissent avec le phosphate γ du GTP. Ces deux sites sont généralement situés dans des régions appelées switch I et II respectivement (Pai, Kabsch et al. 1989; Milburn, Tong et al. 1990; Pai, Krengel et

al. 1990). Cependant la position dans la séquence primaire des sites G2 et G3 peut varier et ceux-ci peuvent être situés dans d'autres repliements de la protéine comme par exemple dans les GTPases de la famille Rab, où G2 et G3 sont situés après les feuillets $\beta 5$ et $\beta 6$ respectivement (Stenmark and Olkkonen 2001). Par ailleurs le site G3 contient un acide aspartique qui, en interagissant avec un ion Mg^{2+} , permet l'hydrolyse du phosphate γ et qui est impliqué dans la maintenance du nucléotide dans la GTPase. G4 et G5 sont impliquées dans la reconnaissance spécifique des guanines (Bourne, Sanders et al. 1991). L'interaction avec un phosphate en position γ permise par une thréonine et une glycine (dans G2 et G3 respectivement) induit un changement structural des switchs permettant l'accessibilité aux effecteurs (Pai, Kabsch et al. 1989).

La superfamille des Ras regroupe cinq différentes familles: Ras, Rab, Arf, Ran et Rho (Takai, Sasaki et al. 2001). Les petites protéines G sont spécialisées dans la régulation de différents processus tels que l'expression génique, le trafic vésiculaire ou la mise en place dynamique du cytosquelette par exemple. Les Rho GTPases contrôlent ce dernier processus et sont ancrées aux membranes grâce à une prénylation, c'est à dire l'ajout d'un acide sur une cystéine, en carboxy-terminal (Omer and Gibbs 1994). Il existe 6 Rho GTPases dans la levure *S. cerevisiae*, Cdc42 et Rho1 à Rho5. Les GTPases présentent une faible activité GTPasique intrinsèque. Cependant, elles sont actives (et peuvent interagir avec leurs effecteurs en aval) seulement lorsqu'elles sont liées au GTP (Bishop and Hall 2000). Ceci explique la nécessité de réguler la balance entre les formes liées au GTP et au GDP. Pour cela l'hydrolyse du GTP en GDP est catalysée par des protéines appelées GTPase Activating Protein (GAP) (Ahmadian, Hoffmann et al. 1997). Le processus inverse, qui consiste au passage sous forme GTP est permis par des Guanines nucléotides Exchange Factor (GEF). Ces protéines favorisent le relarguage du GDP et permettent l'incorporation du GTP dont les concentrations intracellulaires sont très supérieures au GDP ce qui permet l'activation de la GTPase. En plus de ces protéines régulatrices, les protéines Rho GDI permettent de bloquer les protéines Rho sous formes GDP tout en les extrayant des membranes (Ueda, Kikuchi et al. 1990; Hori, Kikuchi et al. 1991). Les protéines GAP et GEF sont elles-mêmes contrôlées et sont souvent, respectivement, suppresseur de tumeur et oncogènes.

Dbl fut la première protéine GEF caractérisée, dans des cellules de mammifère. Elle fut identifiée comme étant un oncogène. Cette protéine montra une forte similarité de séquence avec une protéine dont le gène fut découvert lors du crible réalisé par Hartwell, *CDC24* (Ron, Zannini et al. 1991). Ce gène s'est avéré être impliqué dans la morphogénèse de *S. cerevisiae* (Sloat, Adams et al. 1981). Il avait par ailleurs été mis en évidence qu'une mutation affectant *CDC24* pouvait être complétée par une surexpression d'un autre gène mis en lumière lors du crible d'Hartwell, *CDC42* (Bender and Pringle 1989). Il fut par la suite découvert que l'oncogène Dbl pouvait catalyser l'échange du GDP en GTP de Cdc42 humaine (Hart, Eva et al. 1991). Le domaine nécessaire à cette activité fut appelé DH (pour Dbl Homology) (Hart, Eva et al. 1994). Pour permettre le relargage du GDP, les protéines GEF induisent un changement conformationnel de la GTPase. Les protéines GEFs interagissent et déplacent les régions des GTPases appelées switchs. Cela résulte en une déstabilisation de l'interaction avec le Mg^{2+} et le nucléotide, favorisant son relargage (Worthylake, Rossman et al. 2000).

De nombreux exemples de RhoGEF ont été identifiés comme étant régulées intramoléculairement. En effet un grand nombre de ces protéines ont été décrites comme étant autoinhibées. La perte de ces signaux de régulation a été démontrée comme impliquée dans la transformation cellulaire. Les oncogènes Dbl, Ect2 ou encore Vav1 en sont les parfaits exemples. La délétion de la partie amino-terminale de Dbl a été identifiée comme cruciale dans sa capacité oncogénique (Ron, Graziani et al. 1989). Ect2 fut identifiée lors d'un crible d'ADN complémentaire réalisé dans le but de découvrir de nouveaux facteurs de transformation. L'ADN complémentaire isolé fut une troncation qui possédait uniquement la partie carboxy-terminale (Miki, Smith et al. 1993). Vav1 est un représentant des protéines RhoGEF Vav. Il a été mis en évidence que la délétion d'un domaine hélice-boucle-hélice était impliquée dans une autoinhibition de ces protéines (Katzav, Cleveland et al. 1991). Une de ces hélices peut interagir avec le domaine DH et donc bloquer l'accès à la GTPase. La phosphorylation d'une tyrosine (Y174) permet de déstabiliser l'interaction et donc d'activer la protéine GEF. Par ailleurs Yu et al. ont démontré que le processus d'activation de Vav1 impliquait une autre phosphorylation. En effet le domaine CH interagit avec les

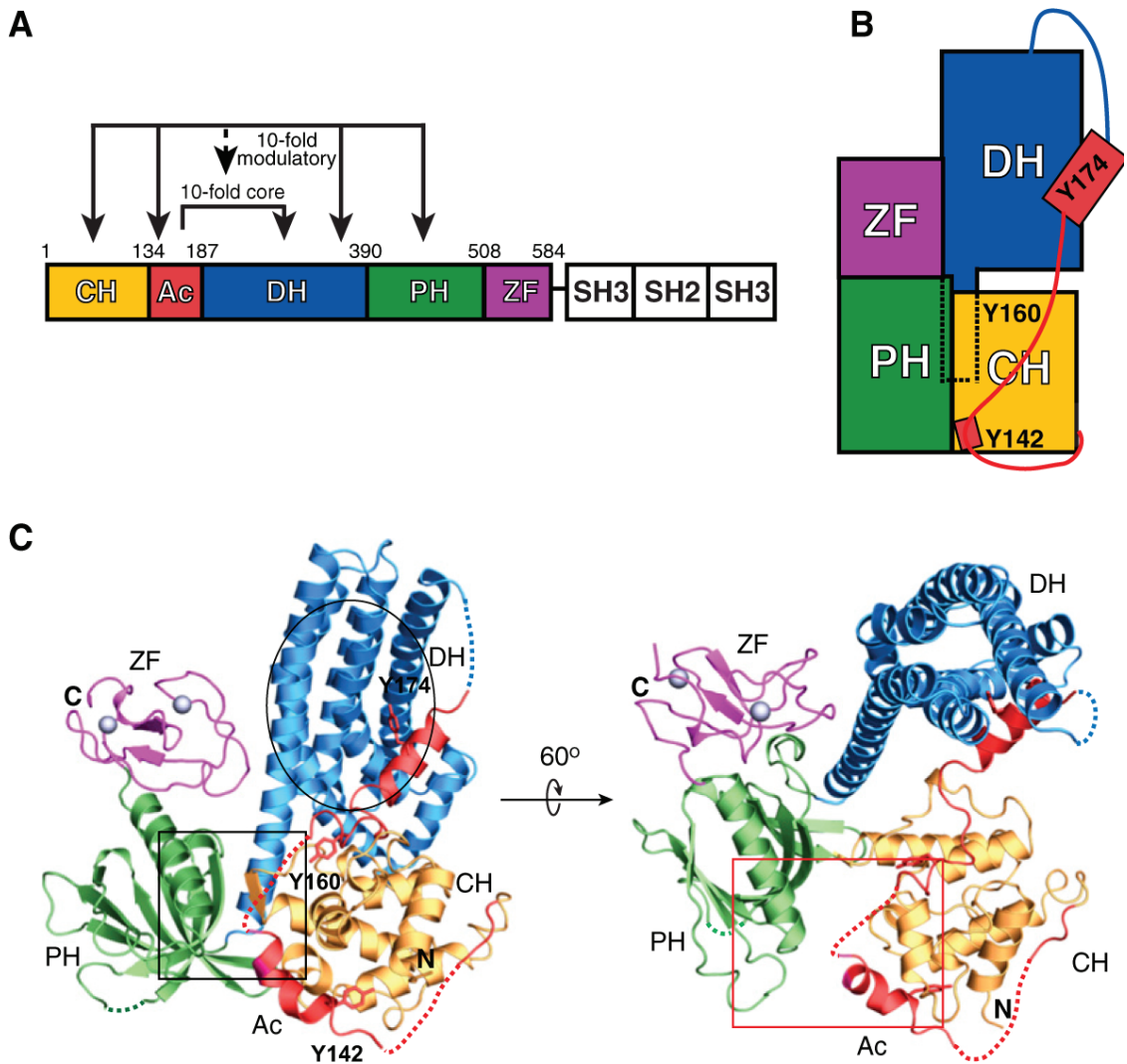


Figure 9. Representation of Vav1 protein in its autoinhibited conformation

The figure comes from "Structural and energetic mechanisms of cooperative autoinhibition and activation of Vav1" published by Yu *et al.*, 2010.

Inhibitory helix (red) interacts with Dbl homology domain (DH) of Vav1. The helix is part of the Acidic domain (Ac) and is maintained by interaction of Calponin Homology domain (CH) with Dbl Homology domain (DH) and Pleckstrin Homology domain (PH).

Relief of autoinhibition is triggered by multiple phosphorylation of Acidic domain on tyrosines 142, 160 and 174. The last one is crucial for destabilisation of interaction between the helix and the Dbl Homology domain (DH).

domaines DH et PH. Cette interaction permet le maintien de l'hélice au contact du domaine DH et donc de l'inhibition de l'activité GEF de la protéine. La phosphorylation des résidus Tyrosines 142 et 160 dans le domaine hélice-boucle-hélice, décrit par Katzav *et al.* inhibe l'interaction du domaine CH avec les domaines DH et PH. Cela permet l'accessibilité de la tyrosine 174 aux kinases nécessaires à son activation (Figure 9) (Yu, Martins et al. 2010).

Ainsi les protéines RhoGEFs sont dans un grand nombre d'exemple autoinhibées, et la levée de cette autoinhibition permet l'activité GEF.

Par ailleurs de nombreux exemples de régulation par la phosphorylation des protéines GEFs ont été décrits chez les eucaryotes supérieurs. Par exemple lorsque la protéine β -Pix interagit avec la protéine 14-3-3 β , β -Pix est phosphorylée par la PKA. Ces interactions et phosphorylations résultent en une diminution de l'activité GEF envers la Rho GTPase Rac1 (Chahdi and Sorokin 2008). De même la protéine GEF-H1 lorsqu'elle est phosphorylée par la kinase Par1 présente une activité diminuée envers RhoA (Yoshimura and Miki 2011). La phosphorylation de la GEF Syx par la kinase PKD permet l'interaction avec la protéine 14-3-3 ce qui diminue son activité GEF sur RhoA (Ngok, Geyer et al. 2013). La phosphorylation de la protéine GEF Lfc par la kinase PKA est permise par son interaction avec la protéine AKAP21. Cette phosphorylation engendre une interaction avec la protéine 14-3-3 et diminue l'activité GEF de Lfc envers RhoA (Meiri, Greeve et al. 2009).

Les protéines GAPs peuvent aussi être régulées via la phosphorylation. En effet MgcRacGAP, qui agit sur les GTPase Cdc42 et Rac1 est connue pour changer de spécificité de substrat lorsqu'elle est phosphorylée par AuroraB afin d'agir sur RhoA (Minoshima, Kawashima et al. 2003). La phosphorylation de p190RhoGAP permet d'augmenter son activité et d'interagir avec p120RacGAP *in vivo* (Roof, Haskell et al. 1998). Pareillement, FilGAP lorsqu'elle est phosphorylée par ROCK semble être stimulée positivement (Ohta, Hartwig et al. 2006). Il existe aussi des exemples où la phosphorylation peut inhiber l'activité GAP. Par exemple CdGAP présente moins d'activité sur Rac1 lorsqu'elle est phosphorylée par la kinase ERK MAPK (Tcherkezian, Danek et al. 2005).

Ces différents exemples montrent que des études des mécanismes de la régulation des GTPases sont importantes pour comprendre le processus fondamental de la régulation de la polarité cellulaire.

Cependant certaines questions restent en suspens. Comment des changements de polarité peuvent-ils être coordonnés avec la progression dans le cycle cellulaire ? En d'autres termes, comment la cellule coordonne-t-elle ses actions dans l'espace (polarité) et dans le temps (cycle) ?

6) Comment peuvent être liés le cycle cellulaire et la polarité ?

a. Exemple de lien entre la polarité cellulaire et le cycle cellulaire chez *Caenorhabditis elegans*.

Cette question très vaste et complexe a déjà été abordée par de nombreuses études, dans différents organismes. Ces études ont permis de mettre en évidence certains traits de la relation qui lie cycle cellulaire et polarité. Par exemple, l'embryon précoce de *Caenorhabditis elegans* présente des divisions cellulaires asymétriques et asynchrones sans phases G1 et G2. Ces divisions produisent plusieurs types de cellules somatiques (AB, E, MS, C, D et P4), dont la répartition spatiale annonce la structuration de l'embryon (Rose and Kemphues 1998). Par exemple, la première division produit des blastomères de différentes tailles et constitutions, appelés AB et P1. Ces deux cellules se diviseront ensuite de manière asynchrone, formant ainsi un axe antéro-postérieur dont les cellules constituantes sont de nature (et de destinée) différente (respectivement, AB pour les cellules antérieures, P pour les postérieures). La polarité de ces divisions asymétriques est régulée par les protéines codées par les gènes PAR (PARTitioning defective, Par1 à P6), et l'aPKC (Atypical Protein Kinase C) (Nance 2005; Noatynska and Gotta 2012). Ces protéines déterminent l'axe antéro-postérieur bien en amont des premières divisions. Dès la fécondation, la signalisation en provenance du spermatozoïde résulte en une localisation préférentielle de Par3, Par6 et aPKC au point d'entrée du spermatozoïde, qui deviendra le futur pôle antérieur, et de Par1 et Par2 à l'opposé (futur pôle postérieur) (Cowan and Hyman 2007). Les localisations opposées de ces protéines résultent d'une exclusion mutuelle : Par1 phosphoryle Par3 empêchant

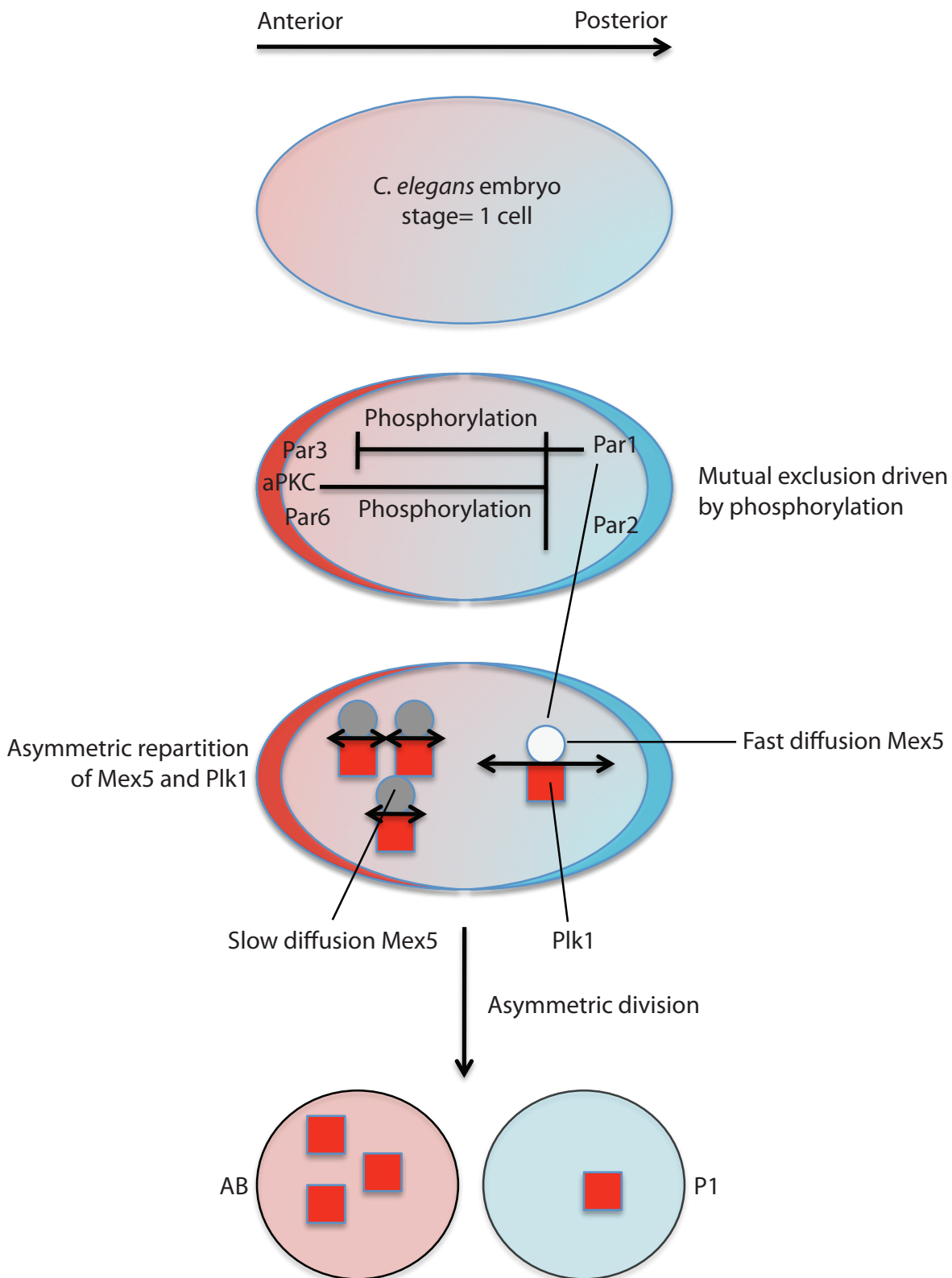


Figure 10. Asymmetric division in *C. elegans* embryo.

Cell polarity in *C. elegans* embryo drives to production of two different blastomeres. One of those will be deprived in Plk1, resulting in a delay of next cell division.

At the posterior side of the cell, Par1 protein phosphorylates Mex5 protein which interacts with Plk1 and RNA in slowly diffusing complex. This phosphorylation triggers its release from RNA complex, allowing fast diffusion of the complex that will enrich the protein Mex5 in complex with Plk1 at anterior side where it will bind again RNA to form low diffusion complex. This mechanism will generate a gradient of Plk1 from anterior to posterior side. In the next cell cycle, AB cell will divide before P1 cell because of different Plk1 concentrations.

Based on Nance, 2005, Bioessays; Noatynska and Gotta, 2012, Essays Biochem; Cowan and Hyman, 2007, Development; Motegi, Zonies *et al.*, 2011, Nat Cell Biol; Tenlen, Molk *et al.*, 2008, Development; Nishi, Rogers *et al.*, 2008, Development.

une localisation postérieure de cette dernière (Hao, Boyd et al. 2006), alors qu'aPKC phosphoryle Par1 et Par2 provoquant un effet similaire d'exclusion de la partie antérieure (Motegi, Zonies et al. 2011). Via des mécanismes bien identifiés, la localisation de Par1 génère dans la première cellule des gradients de protéines clés du cycle cellulaire, imposant ainsi différentes concentrations de protéines essentielles à la progression du cycle dans les cellules filles (Tenlen, Molk et al. 2008). En effet la protéine kinase Par1 phosphoryle une protéine cytoplasmique, Mex5, qui forme un complexe peu diffusif contenant de l'ARN. La phosphorylation de cette protéine permet sa dissociation de l'ARN au niveau postérieur de la cellule. Ce mécanisme de relargage de Mex5 permet à la cellule de générer un gradient de Mex5 dans le sens antéro-postérieur. De plus la protéine Mex5 peut interagir avec la kinase Plk1 (POLO like kinase 1) ce qui génère naturellement un gradient de cette kinase depuis la partie antérieure (Nishi, Rogers et al. 2008). Plk1 est un activateur de la phosphatase Cdc25. Celle-ci active Cdk1 en déphosphorylant un résidu inhibiteur sur la kinase. La localisation polarisée de Plk1 et Cdc25 engendre une plus forte concentration de ces protéines dans la cellule AB comparé à la cellule P1 (Figure 10) (Rivers, Moreno et al. 2008). Ces différentes concentrations en Plk1 et Cdc25 après la première division permettent à la cellule AB d'avoir un cycle cellulaire plus court que la cellule P1. Ainsi, des localisations polarisées des protéines PAR résultent, via un effet direct de la polarité sur la vitesse du cycle cellulaire et la chronologie des divisions, une asymétrie intrinsèque dans l'embryon, sur laquelle repose toute la morphogénèse de l'organisme adulte.

b. Exemples de lien entre la polarité cellulaire et le cycle cellulaire chez *Drosophila melanogaster*.

Ce type de mécanisme n'est pas spécifique à *C. elegans*. Ainsi, chez *Drosophila melanogaster*, la lignée germinale des mâles provient de la différenciation de cellules souches placées dans une niche appelée HUB. Lors de la division de ces cellules (appelées mGSCs, pour « male germline stem cells »), la rétention d'une des cellules filles dans la niche est nécessaire pour conserver ce "stock" que constitue le HUB. Pour cela la cellule positionne un de ses centrosomes du côté du HUB et l'autre de manière diamétralement opposée afin que la cellule puisse se différencier à l'écart de la niche (Yamashita, Mahowald et

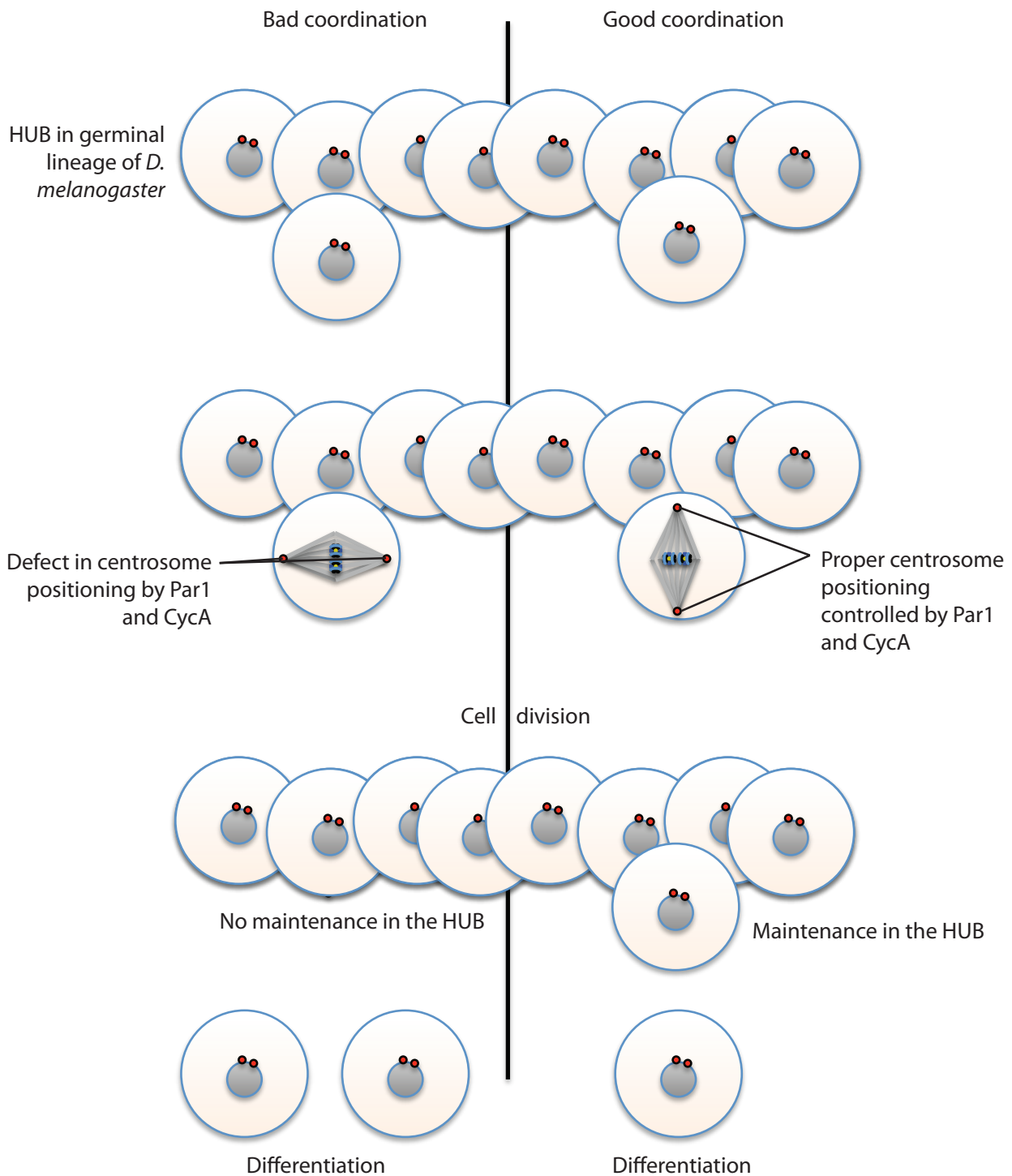


Figure 11. Exemple of coordination between cell cycle and cell polarity in *D. melanogaster*

During cell division of HUB cell in *D. melanogaster* germinal lineage, centrosomes positioning is controlled by Par1 and CycA proteins. Deprivation of one of those proteins leads to defect in centrosome positioning and loose in the HUB cell pool due to differentiation of cell. In contrast, appropriate centrosomes positioning leads to the maintenance of one daughter cell in the HUB.

Based on Yamashita, Mahowald *et al.*, 2007, *Science*; Yuan, Chiang *et al.*, 2012, *Dev Biol*.

al. 2007). La localisation des centrosomes est régulée de concert par une protéine de la polarité, Par1 et une protéine du cycle cellulaire, la cycline A qui créent un point de contrôle fonctionnel (Yuan, Chiang et al. 2012). Cette localisation est essentielle au bon positionnement des centrosomes. Lorsque ce signal est défectueux, les centrosomes sont positionnés aléatoirement et les cellules ne se divisent pas perpendiculairement à la niche (Figure 11).

Par ailleurs chez *Drosophila melanogaster*, la lignée des neuroblastes NB6-4 peut être différenciée de deux façons différentes pour former des NB6-4t (thoraciques) ou des NB6-4a (abdominaux), qui à terme génèrent des neurones et des cellules gliales pour la lignée thoracique, et des cellules gliales uniquement pour la lignée abdominale. La raison de cette différence est que la lignée abdominale subit une division symétrique alors que la lignée thoracique subit une division asymétrique résultant de l'expression spécifique de la cycline E dans cette dernière lignée (Schmidt, Rickert et al. 1997; Berger, Kannan et al. 2010). Cette cycline interagit en effet avec le facteur de transcription Prospero, et polarise sa localisation avant la première division du NB6-4t (Choksi, Southall et al. 2006). Suite à cette division, le facteur de transcription ne sera présent que dans une seule des cellules filles, qui deviendra une cellule gliale. En réprimant l'expression du gène codant pour la cycline E, Prospero permet sa répartition uniforme, non polarisée, avant les prochaines divisions cellulaires et donc une absence de différenciation subséquente. L'absence de Prospero dans l'autre cellule permettra la génération de neurones.

c. Exemple de formation de l'anneau contractile nécessaire à la cytokinèse.

Ces exemples chez *C. elegans* et *Drosophila melanogaster* montrent comment la polarité peut influencer l'organisation spatiale de la division cellulaire en aboutissant à différents devenir des cellules. Cependant, le processus de division lui-même requiert une organisation spatiale de la cellule. Par exemple, lors de la séparation des cellules au cours de la cytokinèse, un anneau contractile est formé. Il se compose essentiellement d'actine et de myosine et sa formation est gouvernée par RhoA (Glotzer 2005).

La formation de cet anneau repose sur l'activation de la GTPase RhoA à l'équateur de la cellule après la migration des chromosomes pendant l'anaphase.

L'activation de la GTPase est permise par la protéine activatrice Ect2, localisée au centre du fuseau mitotique. Le recrutement de la protéine GEF est initié par la phosphorylation par Cdk1. Cette phosphorylation a lieu sur la Thréonine 412, ce résidu est situé dans un site permettant l'interaction avec la kinase Plk1. Par ailleurs Cdk1 phosphoryle Ect2 sur la Thréonine 814, affectant son activité GEF (Niiya, Tatsumoto et al. 2006). Il a aussi été démontré que la localisation de la protéine GEF dans cette région dépendait directement de la phosphorylation de HsCyk-4 (un autre nom de MgcRacGAP) par Plk1 (Wolfe, Takaki et al. 2009). Cette phosphorylation permet de générer un site de fixation aux deux domaines BRCA en tandem positionnés en partie amino-terminale.

Par ailleurs, la localisation de la forme active de RhoA à l'équateur est aussi une conséquence de son inhibition préférentielle aux pôles. Cette inhibition est le fruit de deux mécanismes indépendants impliquant les asters, qui bloquent l'activation de RhoA, et de la protéine MP-GAP qui, en favorisant l'hydrolyse du GTP par la GTPase, promeut la forme inactive au détriment de la forme active dans les cellules HeLa. La défaillance de ces facteurs de polarité est néfaste au cycle cellulaire. En effet, une diminution du niveau d'expression de MP-GAP conduit à une forte augmentation des protrusions cellulaires pendant la mitose, parfois suivie d'une défaillance de la cytokinèse. Similairement, la diminution de la taille des asters conduit à une extension de la zone de localisation de RhoA, qui devient plus diffuse, moins précise (Zanin, Desai et al. 2013). Cet exemple montre comment, indépendamment de la destinée de la cellule dans la morphogénèse, la régulation de la polarité est nécessaire à la bonne exécution du cycle cellulaire.

L'étude de l'interaction entre la polarité et le cycle cellulaire constitue le cœur de la thématique traitée au laboratoire. En raison de sa grande malléabilité aux manipulations génétiques et biochimique et de la conservation des mécanismes du cycle cellulaire et de la polarité au cours de l'évolution, le laboratoire a choisi la levure bourgeonnante *S. cerevisiae* pour mener à bien ses études.

Les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent dans ce cadre, et concernent plus particulièrement l'établissement de l'axe de polarité qui précède

et prépare la division, à la transition G1/S du cycle cellulaire. Les phénotypes de certains mutants liés au cycle cellulaire suggèrent que la croissance est contrôlée au cours du cycle cellulaire. En effet, une souche délétée pour le gène *CLN3* présente une taille supérieure à la souche de référence (Wijnen, Landman et al. 2002). Les mutants pour *SWE1* et *MIH1* (*WEE1* et *CDC25* respectivement chez *S. pombe*), présentés précédemment, sont un autre exemple de relation direct entre le cycle cellulaire et le contrôle de la croissance. La croissance polarisée est essentielle pour la génération d'un bourgeon et l'avancement dans le cycle cellulaire chez *S. cerevisiae*. Chez la levure, la mise en place de la polarité cellulaire est finement coordonnée à l'expression des cyclines de la phase G1 (Lew and Reed 1993; Butty, Perrinjaquet et al. 2002; Moffat and Andrews 2004; McCusker, Denison et al. 2007). En effet lors de la transition G1/S du cycle cellulaire, la cellule se polarise en direction d'un point du cortex. La cellule va focaliser le trafic membranaire en direction de ce point afin de générer la cellule fille, appelée bourgeon. *CDC42*, *CDC24* et *CDC28* ont été mis en évidence lors du crible réalisé par Hartwell (Hartwell, Culotti et al. 1970). Ces trois mutants étaient déficients pour la mise en place d'un bourgeon. Cela suggère donc un lien fort entre Cdc24 et Cdc42 qui contrôlent la mise en place de la polarité cellulaire et Cdk1. Il est informatif de constater que la complémentation fonctionnelle d'un mutant *cdc42-1* par son homologue chez l'homme est possible dans la levure bourgeonnante (Shinjo, Koland et al. 1990). Cela montre à quel point cette protéine essentielle est conservée, en effet 80% de la séquence de Cdc42 est identique entre la levure et l'homme. Cette protéine est l'un des acteurs principaux de la mise en place de la polarité cellulaire.

7) Cdc42 et les voies que la GTPase régule.

Chez la levure *S. cerevisiae*, Cdc42 est régulée par une unique GEF, Cdc24, et quatre protéines GAPs: Bem2, Bem3, Rga2 et Rga1. Ces protéines présentent toutes des états de phosphorylation dynamique au cours du cycle cellulaire (Moffat and Andrews 2004; Knaus, Pelli-Gulli et al. 2007; McCusker, Denison et al. 2007; Sopko, Huang et al. 2007). En effet toutes ces protéines sont des substrats des complexes Cdk/cycline G1. Pour établir la polarité cellulaire, Cdc42 doit être activée en un point précis de la membrane plasmique. La

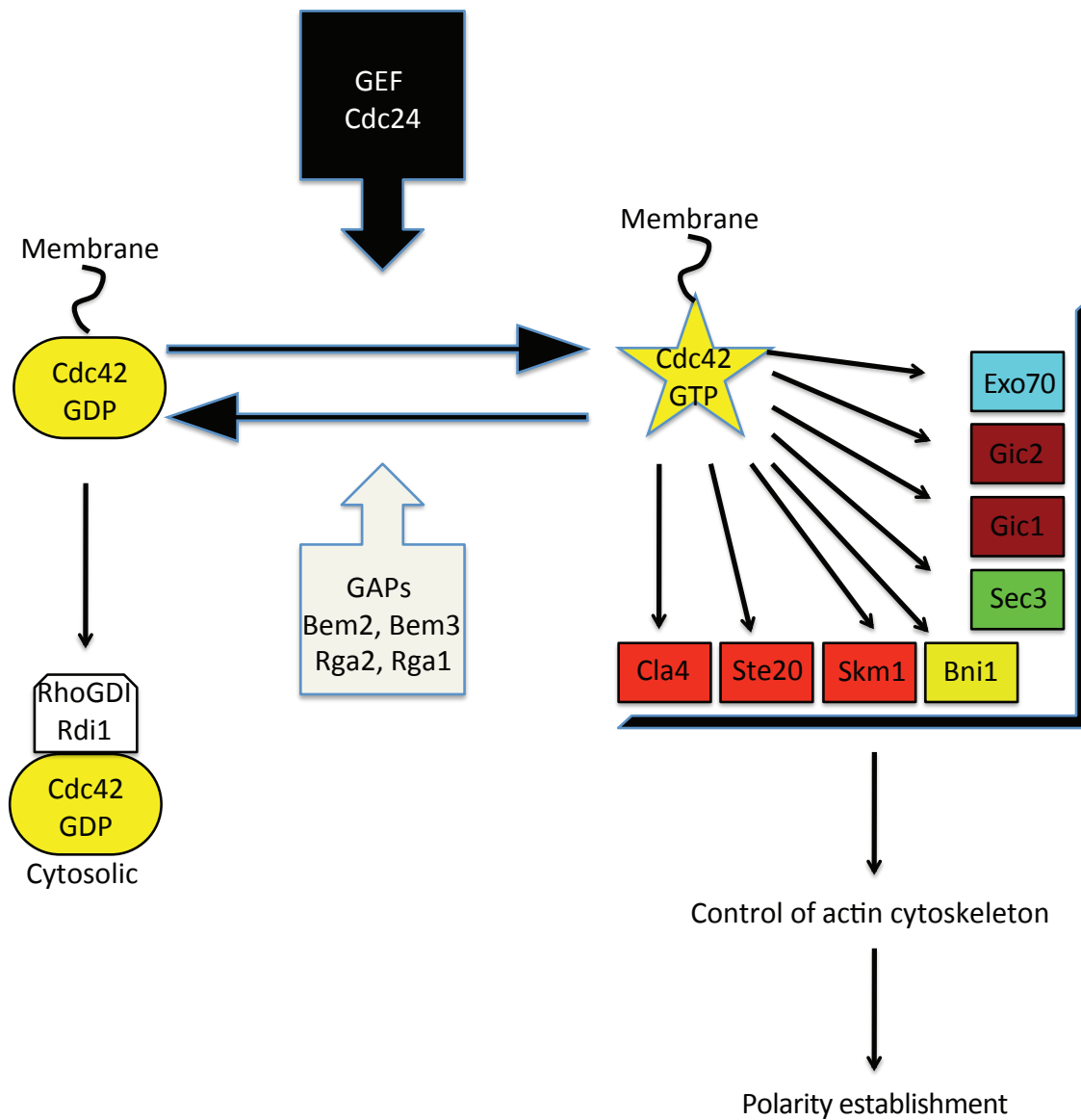


Figure 12. Schematic representation of Cdc42 regulation and pathways controlled by the GTPase

GTPase catalytic activity is increased by GAPs protein (Bem2, Bem3, Rga2 and Rga1) that contribute to inactivation of the GTPase. Activation of GTPase is enabled by released of GDP mediated by GEF protein (Cdc24) and incorporation of GTP. Inactive form of Cdc42 can be extracted from the membrane by Rdi1 protein. Active form of Cdc42 interact with different downstream effectors and controls the actin cytoskeleton.

Based on Leberer et al., 1992; Cvrckova et al., 1995; Simon et al., 1995; Martin et al., 1997; Gulli et al., 2000; Chen et al., 2012; Zhang et al., 2008; Wu et al., 2010; Wu et al., 2010; Moffat et al., 2004; Knaus et al., 2007; McCusker et al., 2007; Sopko et al., 2007; Ueda et al., 1997; Hori et al., 1991.

phosphorylation des régulateurs de la GTPase a lieu au moment de l'établissement de la polarité cellulaire. Cependant les mécanismes moléculaires qui contrôlent les régulateurs de Cdc42 ne sont pas complètement compris.

Outre les GEF et GAP, d'autres protéines interagissent avec Cdc42 lorsqu'elle est dans une conformation liée au GTP, des effecteurs qui transmettent le signal d'activation (Figure 12). Cdc42 interagit avec les kinases Ste20, Cla4 et Skm1 (Leberer, Dignard et al. 1992; Cvrckova, De Virgilio et al. 1995; Simon, De Virgilio et al. 1995; Martin, Mendoza et al. 1997). Ces kinases sont des p21-activated kinases (PAK). Ste20 est impliquée dans la réponse aux phéromones lors de la reproduction sexuée, activant la protéine Ste11, qui est impliquée dans la voie des MAPkinases (Leberer, Wu et al. 1997). Ste20 présente une léthalité synthétique avec une autre kinase PAK, Cla4 (Cvrckova, De Virgilio et al. 1995). Les deux kinases sont requises pour la régulation du cytosquelette d'actine (Holly and Blumer 1999). Il est connu que les kinases de la famille des p21 Activated Kinases peuvent exister dans différentes conformations (Lei, Lu et al. 2000; Lei, Robinson et al. 2005). Pour être activées ces kinases phosphorylent une boucle appelée boucle d'activation située dans leur domaine kinase. Cette boucle, lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, est présente au niveau du site catalytique. Une fois phosphorylée, la boucle est déplacée et permet l'accessibilité des substrats au domaine kinase. Un autre mécanisme permet de maintenir ces kinases dans une forme inactive. En effet ces kinases adoptent une structure dimérique autoinhibée dans laquelle le domaine d'interaction avec la GTPase est présent dans un domaine autoinhibiteur. Un feuillet β en partie amino-terminale de ce domaine permet l'homodimérisation grâce à une interaction antiparallèle. Cette dimérisation permet de stabiliser une boucle située en aval qui maintient la boucle d'autoactivation au niveau du site catalytique. La structure de cette conformation a été résolue pour PAK1. Par analogie de structure avec un autre effecteur de Cdc42, WASP, les auteurs ont modélisé un mécanisme d'activation par la GTPase. Le domaine impliqué dans la maintenance de la conformation dimérisée et autoinhibée interagit avec la GTPase, permettant un déplacement de la boucle autoinhibitrice et *in fine* à l'activation de la kinase.

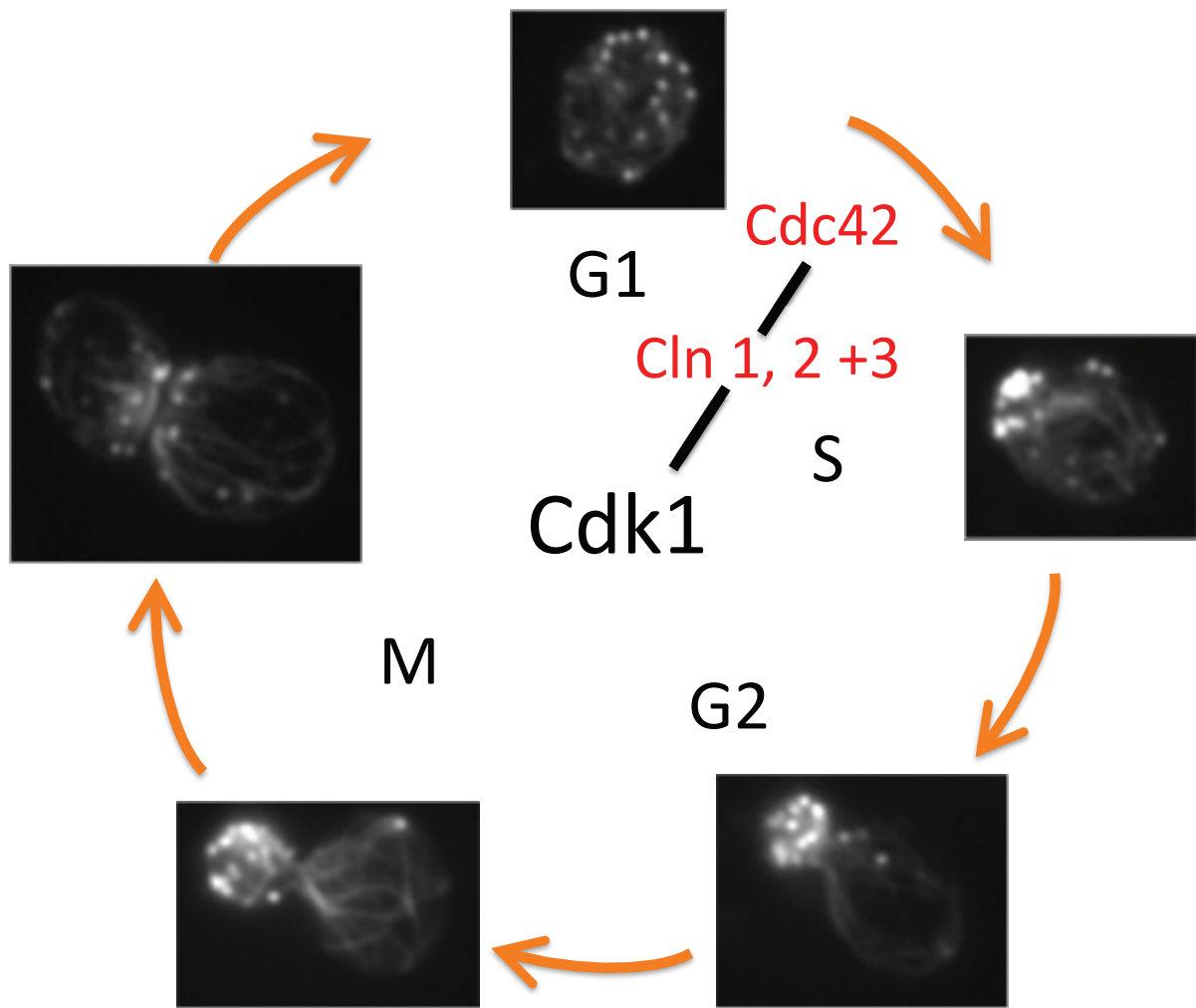


Figure 13. Dynamic architecture of actin cytoskeleton during *S. cerevisiae* cell cycle.

Images realised by Dr McCusker. Asynchronous culture in exponential phase was fixed and actin cytoskeleton is visualised by phalloidin staining.

During the cell cycle, actin cytoskeleton undergoes profound change in architecture. Establishment of cell polarity is dependent on Cdk1 activation by Clns. This activation controls Cdc42 GTPase.

Au cours du cycle cellulaire le cytosquelette d'actine présente une architecture dynamique (Figure 13). Celui-ci est impliqué dans différents processus fondamentaux tels que la polarisation cellulaire, l'endocytose ou encore la cytokinèse (Moseley and Goode 2006). L'actine existe sous forme monomérique appelée actine-G ou sous forme polymérisée appelé actine-F. Cette dernière est retrouvée dans les câbles d'actines et les patchs présents au niveau du cortex. Une autre structure présente de l'actine-F associé avec des fibres de myosines, l'anneau contractile nécessaire à la cytokinèse. La nucléation de filaments d'actine est réalisée par des protéines appelées formines, Bni1 et Bnr1 (Pruyne, Evangelista et al. 2002). Cdc42 active Bni1 ce qui permet la polymérisation des filaments d'actine depuis le site de polarisation (Gulli, Jaquenoud et al. 2000). Un autre effecteur de Cdc42, Gic1, a été identifié comme impliqué dans l'activation de Bni1 (Chen, Kuo et al. 2012). L'activation de Cdc42 permet de recruter les protéines Las17 et Vrp1, homologue de protéines WASP et WIP respectivement, au site de polarisation de la cellule de manière dépendante des formines (Lechler, Jonsdottir et al. 2001). Ces protéines agissent dans la voie du complexe Arp2/3, complexe impliqué dans la mise en place de l'actine branchée qui permet la structuration d'actine en patchs, nécessaires à l'endocytose (Moreau, Galan et al. 1997). La polarisation du cytosquelette participe au transport des vésicules d'exocytose. Cdc42 activée interagit avec Sec3 (Zhang, Orlando et al. 2008) et Exo70 (Wu and Brennwald 2010; Wu, Turner et al. 2010), deux sous-unités de l'exocyste, un complexe multiprotéique impliqué dans le trafic vésiculaire, l'arrimage et le ciblage de vésicules post-Golgiennes. L'exocytose permet d'acheminer du matériel nécessaire à la création de la future cellule fille. Ce processus présente une localisation polarisée après l'activation de Cdk1 (McCusker, Denison et al. 2007; McCusker, Royou et al. 2012). Tous les effecteurs de Cdc42 décrits précédemment sont impliqués dans la mise en place de la polarité nécessaire à la croissance du bourgeon.

8) Comment Cdc42 peut-elle être active en un point précis de la membrane plasmique seulement, pour pouvoir établir la polarité ?

Pour établir la polarité, Cdc42 doit être active en un point précis de la membrane plasmique. Dans une cellule haploïde, avant l'expression des cyclines G1, Cdc24 est séquestrée dans le noyau via une interaction avec la protéine Far1 (Nern and Arkowitz 2000). Suite à l'expression des cyclines, Far1 est fortement phosphorylée pour être prise en charge par le complexe SCF puis dégradée (Henchoz, Chi et al. 1997). Cette dégradation permet l'export de Cdc24 dans le cytoplasme. L'activation de Cdc42 est supposée être établie en deux étapes. Dans un premier temps une GTPase Ras-related appelée Bud1 sert de marqueur au niveau de la membrane pour établir le futur pôle. Dans une cellule haploïde Bud1 marque le dernier site de cytokinèse et permettra à terme de polariser la cellule vers ce site. Bud1, lorsqu'elle est activée par sa GEF Bud5, permet le recrutement initial de Cdc24 (Park, Bi et al. 1997; Shimada, Wiget et al. 2004). Cela permet l'activation locale de Cdc42. À ce moment, Cdc42 peut interagir avec une protéine d'échafaudage appelée Bem1 (Zheng, Bender et al. 1995). Bem1 est connue pour interagir avec plusieurs protéines, dont Cdc42, Cla4, Ste20, Boi1, Boi2 ou encore Cdc24 (Peterson, Zheng et al. 1994; Leeuw, Fourest-Lieuvain et al. 1995; Zheng, Bender et al. 1995; Bender, Lo et al. 1996; Matsui, Matsui et al. 1996; Bose, Irazoqui et al. 2001; Winters and Pryciak 2005).

a. Les protéines Cdc24 et Bem1

Les protéines Cdc24 et Bem1 sont les produits des gènes éponymes dans la levure *S. cerevisiae*. Cdc24 est la seule protéine RhoGEF pour Cdc42 dans la levure. Cdc24 est composée de quatre domaines. De la partie amino-terminale à la partie carboxy-terminale, ces domaines sont dans l'ordre : un domaine Calponin Homology (CH), un domaine Dbl-Homology (DH), un domaine Pleckstrin Homology (PH) et un domaine Phox and Bem1 (PB1). Ces différents domaines présentent des fonctions distinctes qui permettent à Cdc24 d'être régulée et de réguler elle-même Cdc42. Le domaine Calponin Homology a été mis en évidence comme pouvant interagir avec les filaments d'actine pour d'autres protéines mais cela n'a jamais été démontré pour Cdc24. En revanche il a été suggéré que ce domaine présente la particularité de pouvoir réguler les interactions intramoléculaires de Cdc24, notamment l'exposition du domaine PB1 pour favoriser l'interaction avec la protéine Bem1 (Fujimura-Kamada, Hirai et al. 2012). Le domaine Dbl-Homology doit quant à lui son nom à la similarité de

séquence avec l'oncogène *dbl* découvert dans des lymphomes diffus de cellules de type B (Cerione and Zheng 1996). Cet oncogène présente aussi la particularité de catalyser l'échange du GDP par du GTP dans la protéine Cdc42 humaine. Ce domaine est le domaine catalytique de Cdc24 : il confère à la protéine son activité GEF. Ce domaine DH est couplé en tandem avec un domaine PH. Chez de nombreuses protéines, ce domaine PH est utile à la localisation au niveau de différentes membranes, grâce à son interaction avec des phospholipides. Cependant, chez Cdc24, il ne semble pas jouer de rôle dans la localisation de la protéine. En effet lorsqu'il est exprimé seul dans la levure, le domaine PH de Cdc24 ne se localise pas au niveau de la membrane plasmique mais reste cytosolique bien qu'il interagisse avec un grand nombre de phosphoinositides (Yu, Mendrola et al. 2004). Chez Cdc24, c'est le domaine PB1, via lequel la protéine interagit avec la protéine d'échafaudage Bem1, qui est responsable du maintien de la localisation de Cdc24 à la membrane plasmique (Butty, Perrinjaquet et al. 2002).

La protéine Bem1 joue aussi un rôle important dans la polarité cellulaire. Elle présente la particularité d'interagir avec un grand nombre de protéines ce qui lui permet de jouer un rôle dans la création de complexes multiprotéiques. Cette protéine possède quatre domaines qui sont, de la partie amino-terminale à la partie carboxy-terminale : deux domaines SRC Homology 3 (SH3), un domaine phox (PX) et un domaine Phox and Bem1 (PB1). La phosphorylation du premier domaine SH3 par Cdk1/Cln3 est impliquée dans la fusion vacuolaire dépendante de Cdc42 (Han, Bogomolnaya et al. 2005). Le deuxième domaine SH3 permet l'interaction avec différentes protéines tels que Cla4, Ste20, Boi1 ou Boi2 (Leeuw, Fourest-Lieuvain et al. 1995; Bender, Lo et al. 1996; Matsui, Matsui et al. 1996; Bose, Irazoqui et al. 2001; Winters and Pryciak 2005). La séquence en aval de ce domaine SH3 est appelée CI et permet l'interaction de Bem1 avec la GTPase Cdc42 (Yamaguchi, Ota et al. 2007). Le domaine PX permet quant à lui l'interaction de la protéine avec les phosphoinositoles 4-phosphate (Stahelin, Karathanassis et al. 2007). Le dernier domaine, le domaine PB1, interagit avec son homologue PB1 dans la protéine Cdc24.

Cette interaction est médiée par la formation, sous l'influence d'interactions ioniques et d'interactions hydrophobes, d'un hétérodimère entre

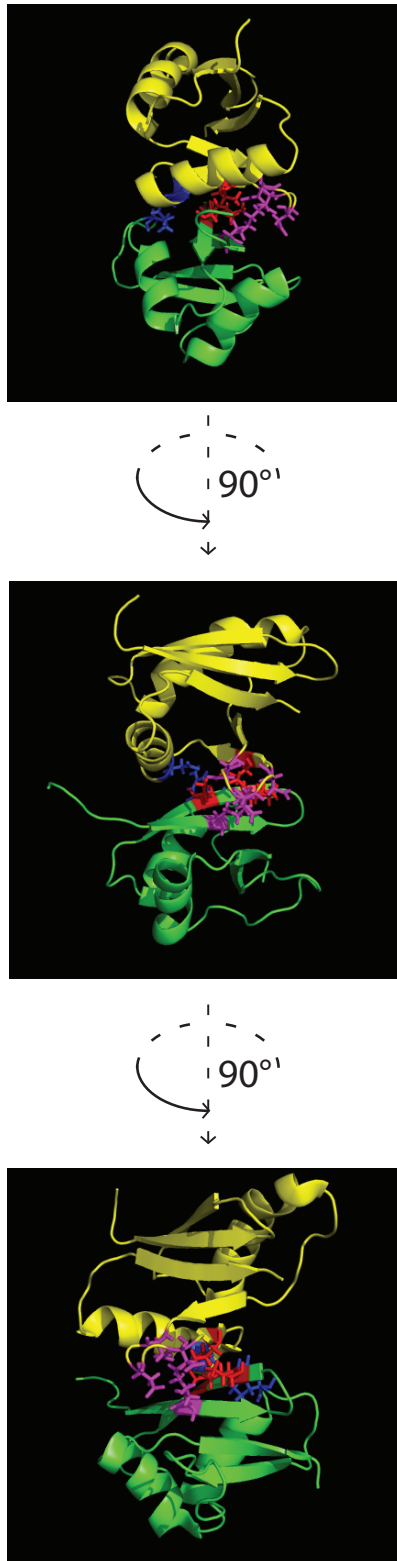


Figure 14. NMR structures of Cdc24 and Bem1 PB1 domains with critical residues highlighted

The NMR structure of Cdc24 and Bem1 PB1 heterodimer complex from Ogura *et al.*, 2009, *J Biochem*.

Cdc24 is colored in yellow and Bem1 in green. Critical residues involved in the interaction are colored by pair. Cdc24 aspartic acids 820,822 and 824 and Bem1 lysine 483 are colored in purple. Cdc24 aspartic acid 832 and Bem1 arginine 510 are colored in blue. Cdc24 valine 826 and Bem1 isoleucine 489 and alanine 491 are colored in red

les domaines PB1 de chaque protéine. Les interactions ioniques sont des appariements des acides aspartiques 820, 822 et 824 de Cdc24 avec la lysine 483 de Bem1, de l'acide glutamique 832 de Cdc24 avec l'arginine 510 de Bem1. La poche hydrophobe générée par l'interaction de Cdc24 et Bem1 implique les acides aminés valine 826 de Cdc24 et isoleucine 489 et alanine 491 de Bem1 (Ogura, Tandai et al. 2009). L'interaction entre ces deux protéines est déjà bien caractérisée dans la littérature (Figure 14).

b. Modèle de l'autoamplification du signal d'activation de Cdc42

Le monomère d'actine est présent à plus de 400000 exemplaires par cellule (Lu, Vogel et al. 2007). Les abondances des protéines Rho2, Rho3 et Rho5 sont de l'ordre de quelques milliers (3870, 5910 et 2180) (Ghaemmaghami, Huh et al. 2003). Par analogie Cdc42 serait donc présente en très faible concentration comparée à l'actine qu'elle régule. Il est donc nécessaire que la cellule amplifie le signal d'activation de Cdc42 pour organiser l'actine. Pour cela, il est requis que Cdc42 soit activée en un point de la cellule et que ce signal d'activation s'amplifie pour former un pôle robuste de Cdc42 activée. L'interaction entre Cdc24 et Bem1 pourrait avoir un rôle à jouer en permettant de générer une boucle d'autoamplification du signal d'activation de Cdc42. Il a été postulé qu'une petite quantité de Cdc42 activée pourrait recruter Bem1, qui recruterait Cdc24, qui activerait à son tour une plus grande quantité de Cdc42 (Figure15) (Gulli, Jaquenoud et al. 2000; Butty, Perrinjaquet et al. 2002). Il a été démontré que la localisation polarisée initiale de Cdc24 est indépendante de Bem1, qui en revanche est essentielle au maintien de la localisation polarisée de la GEF (Gulli, Jaquenoud et al. 2000; Butty, Perrinjaquet et al. 2002). Ainsi une délétion de *BEM1* conduit à des phénotypes sévères. En effet les délétants présentent une croissance très ralentie, une difficulté à mettre en place un bourgeon et peuvent être multi-nucléées (Bender and Pringle 1991). Certains travaux concernant l'interaction entre Cdc24 et Bem1 via leurs domaines PB1 respectifs suggèrent que Bem1 est aussi impliquée dans l'activation de Cdc24. Le modèle que l'on peut extraire de ces travaux est que Cdc24 existerait sous une forme inhibée, tout au moins pas totalement active. L'interaction avec Bem1 pourrait engendrer un changement structural de Cdc24 permettant son activation complète

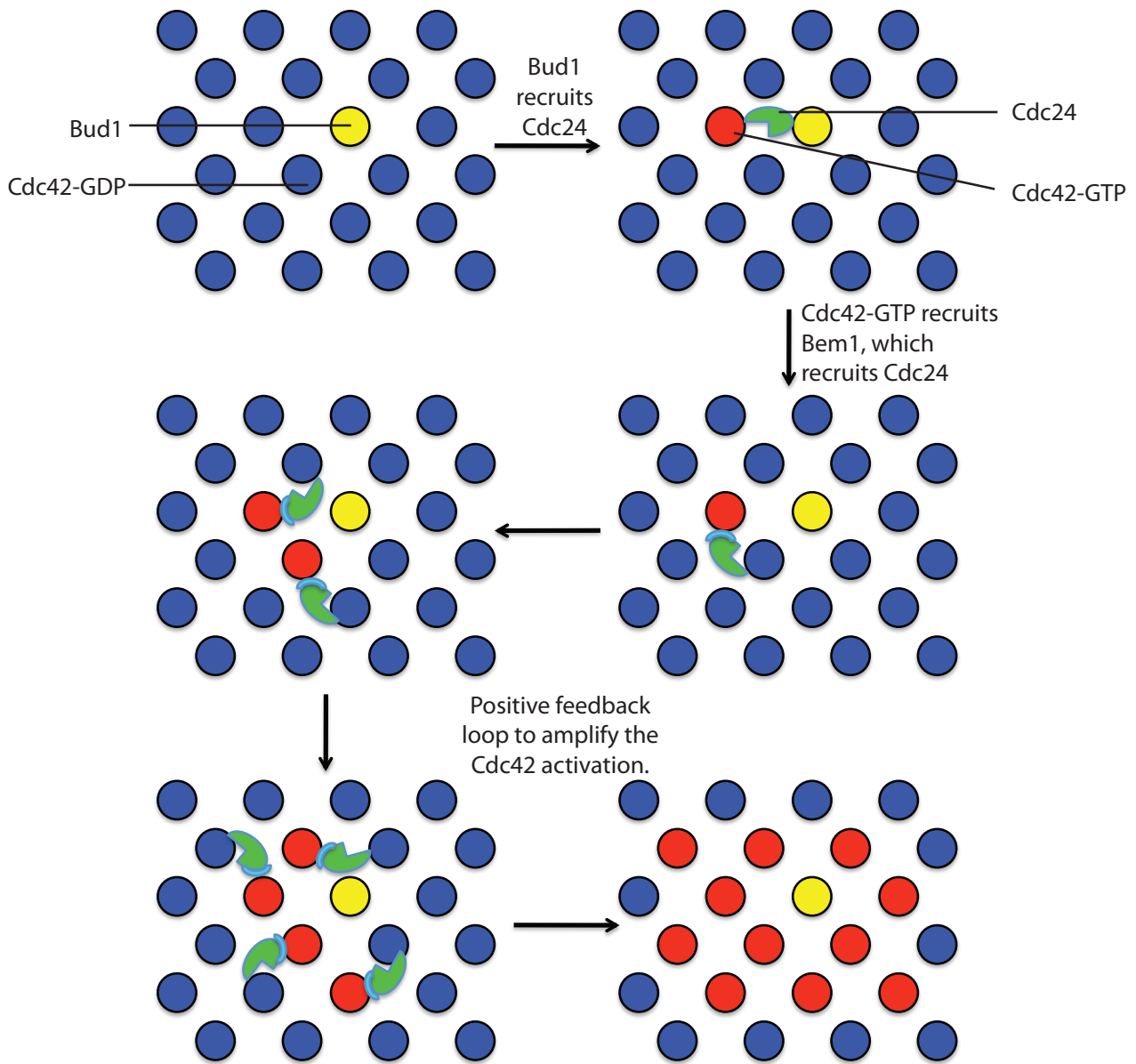


Figure 15. Cdc42, Bem1 and Cdc24 positive feedback loop model.

Amplification of Cdc42 activation signal can be mediated by interactions between Cdc42 GTP and Bem1 and Cdc24 after an initial recruitment of Cdc24 by Bud1 Ras-related GTPase. Based on Gulli et al., 2000; Butty et al., 2002; Kozubowski et al., 2008.

(Shimada, Wiget et al. 2004; Smith, Rubinstein et al. 2013). Il est intéressant de constater que dans certaines souches la délétion du gène *BUD1* aggrave le phénotype d'un délétant *BEM1*. Cette létalité a pu être compensée par une construction chimérique permettant d'accoler Cdc24 à l'une de ses kinases Cla4, ce qui tendrait à indiquer que le rôle de Bem1 serait de rapprocher Cdc24 de sa kinase (Kozubowski, Saito et al. 2008). Cependant le mécanisme sous jacent n'est pas clair et certaines questions restent en suspens. Sans Bem1 ni Bud1, comment Cdc24 peut-elle être localisée de manière polarisée? Dans le cas de cette étude cela pourrait être réalisé par le domaine CRIB de Cla4 qui interagit avec du Cdc42 activé. De même les résultats décrits ne vont pas à l'encontre de l'hypothèse d'un état inhibé de Cdc24. En effet le domaine PB1, supposé inhibiteur, est tronqué dans les constructions décrites. Par ailleurs la mise en place du cytosquelette d'actine permet aussi la création d'un pôle robuste de Cdc42 activé. En effet Cdc42 peut être acheminée par exocytose au niveau du site de polarisation de la cellule (Wedlich-Soldner, Altschuler et al. 2003; Wedlich-Soldner, Wai et al. 2004). Une cellule ne présentant pas de cytosquelette d'actine (traitement à la latrunculine) ou ne contenant pas la protéine Bem1 peut se polariser. En revanche une souche $\Delta bem1$ traitée à la latrunculine-A pour détruire les structures d'actine-F est incapable de se polariser (Gulli, Jaquenoud et al. 2000). Ce résultat suggère que la mise en place d'un pôle robuste de Cdc42 implique deux voies en parallèles, la boucle d'autoamplification du complexe Cdc42/Bem1/Cdc24 et le trafic membranaire permettant l'acheminement de Cdc42. La protéine Cdc24 est phosphorylée par les kinases Cla4 et Cln2/Cdk1 (Figure 16). Cet état multiphosphorylé a déjà été mis en évidence, mais aucune fonction n'a réellement été déterminée (Gulli, Jaquenoud et al. 2000; Wai, Gerber et al. 2009). De plus, le niveau de phosphorylation maximal de Cdc24 est atteint au moment de la mise en place de la polarité cellulaire. La phosphorylation de Cdc24 par Cla4 *in vivo* dépend de l'interaction des deux protéines avec Bem1. Différents travaux ont présentés des conclusions antagonistes. En effet Gulli *et al.* ont montré une diminution de l'interaction Cdc24/Bem1 lorsque la protéine GEF était fortement phosphorylée par la PAK kinase (Gulli, Jaquenoud et al. 2000). De son côté Bose *et al.* n'ont pas montré de différence dans l'interaction entre les deux protéines dans des conditions similaires (Bose, Irazoqui et al. 2001). Ainsi

la fonction et le mécanisme de la phosphorylation multiple de Cdc24 ne sont pas compris. Cependant la fonction de la phosphorylation de la protéine GEF Cdc24 par Cla4 a été étudiée et comprise dans un autre organisme, *Ustilago maydis* (Frieser, Hlubek et al. 2011). En effet la phosphorylation de Cdc24 dans cet organisme est impliquée dans une boucle négative d'auto-régulation. En effet lorsque la GTPase Rac1 active Cla4, la kinase phosphoryle Cdc24, engendrant la dégradation de la protéine GEF. Ce mode de régulation ne semble cependant pas conservé dans la levure *S. cerevisiae*. En effet les auteurs ont comparé la séquence impliquée dans la dégradation de Cdc24 chez *U. maydis* et *S. cerevisiae*. Cette comparaison a permis aux auteurs de constater que les sites de phosphorylation impliqués dans la dégradation de Cdc24 chez *U. maydis* ne sont pas conservés chez *S. cerevisiae*. Par ailleurs les travaux de Wai *et al.* ont montré que la mutation des sites de phosphorylation de Cdc24 chez *S. cerevisiae* n'affectait pas la stabilité de la protéine dans des populations cellulaires asynchrones. Ces observations amènent donc à penser que la protéine Cdc24 pourrait être régulée par la phosphorylation d'une manière différente dans ces organismes (Wai, Gerber et al. 2009).

Par ailleurs la protéine Cdc24 est présente dans un complexe multiprotéique comprenant Bem1, Boi1 et Boi2 qui sont deux protéines impliquées dans l'établissement de la polarité, mais aussi la protéine GAP de Cdc42, Rga2. Ce complexe a été purifié à partir de cellules synchronisées au moment où ces cellules polarisaient. Il est intéressant de constater que ces protéines (Bem1 exceptée) sont toutes phosphorylées au moment de la mise en place de la polarité cellulaire par la kinase Cln2/Cdk1 (McCusker, Denison et al. 2007). Cependant l'intérêt de la présence de ce complexe n'est pas compris.

L'utilisation de systèmes minimalistes pour reconstituer des systèmes biologiques présente de nombreux avantages. Par exemple cela permet d'affiner la connaissance des processus moléculaires impliqués dans les phénomènes étudiés sans interférence avec d'autres processus présents *in vivo*. Cela peut aussi permettre de découvrir des comportements inédits qui ne sont pas visibles à l'échelle macroscopique que représente la cellule. L'utilisation de systèmes minimalistes peut aider à comprendre comment fonctionnent certains

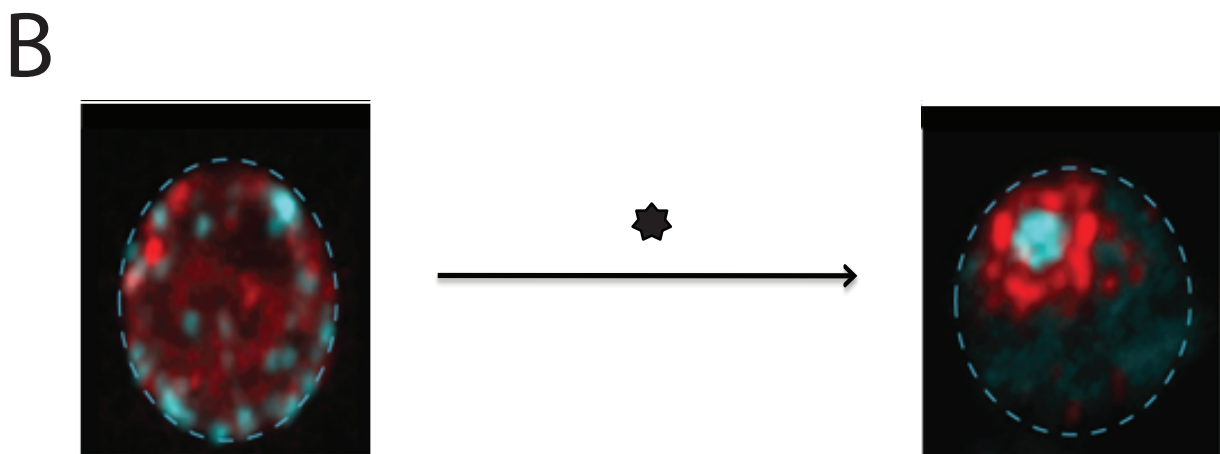
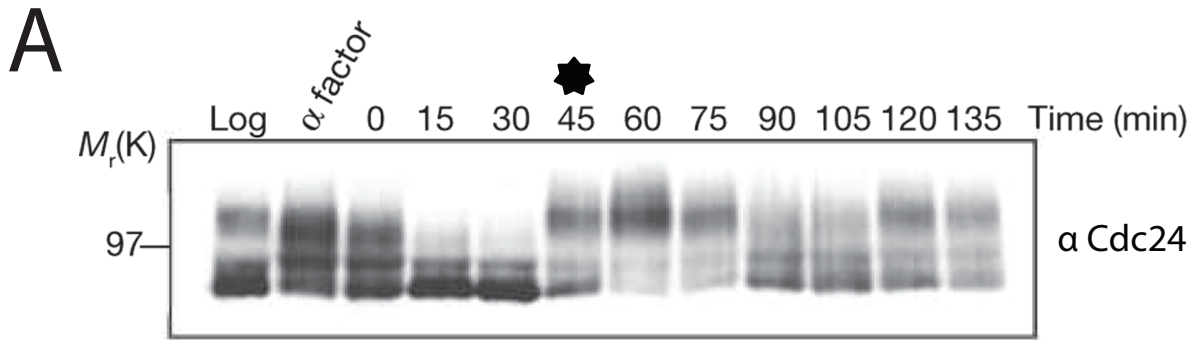


Figure 16. Cdc24 undergoes dynamic phosphorylation state during the cell cycle with a maximal level at polarity establishment.

(A) Cdc24 is dynamically phosphorylated during the cell cycle. Phosphorylation is visualised as an electrophoretic mobility shift. For this experiment, cells were synchronised using α factor. The cells were released and the were samples taken at indicated time after release. Western blot from McCusker *et al.*, ncb, 2007. Black star represents the establishment of cell polarity in the cell cycle time course western blot.

(B) Polarity establishment induces organisation changes in membrane trafficking domains. GFP-Sec4 and mCherry Abp1 enable the visualisation of exocytosis and endocytosis domains.

mécanismes. Par exemple l'utilisation de microbilles recouvertes d'ADN mises en présence d'extrait cellulaire de *Xenopus* a permis de découvrir que les centrosomes et les kinétochores n'étaient pas essentiels à la formation du fuseau mitotique *in vitro* (Heald, Tournebise et al. 1996). Un autre exemple de reconstitution de système *in vitro* fut la mise en place d'une expérience démontrant que les filaments d'actine étaient déplacés le long de myosines fixées sur une surface de verre en présence d'ATP (Kron and Spudich 1986). Ces exemples illustrent comment un processus biologique peut être compris par une approche minimaliste.

Objectifs de ces travaux de thèse.

Les travaux présentés ici ont visé à explorer les mécanismes régulant la phosphorylation de Cdc24. Pour cela, nous avons reconstitué *in vitro* le complexe reposant sur Bem1, et étudié l'effet de chacun de ses composants sur la phosphorylation de Cdc24 afin de comprendre comment la phosphorylation multiple de Cdc24 est régulée.

Nous avons dans un premier temps produit les différentes protéines nécessaires à cette étude, puis nous avons caractérisé les fonctions connues de celles-ci pour confirmer que les protéines produites au laboratoire présentaient les mêmes caractéristiques que celles connues *in vivo*. La purification de protéines recombinantes nous a permis aussi de débiter des études structurales pour caractériser la fonction du complexe Cdc24/Bem1. Suite à cela nous avons réalisé une reconstitution de ce système *in vitro* afin de disséquer le processus contrôlant la phosphorylation de Cdc24. Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence un effet de la protéine Bem1 sur la vitesse de phosphorylation de Cdc24 par Cla4. Par ailleurs nous avons pu identifier un mécanisme régulé par la phosphorylation de Cdc24. Nous avons aussi pu mettre en évidence un effet inattendu d'un membre du module GTPase sur la phosphorylation de Cdc24 par Cla4, la protéine GAP Rga2. Cdc24 n'est pas la seule protéine régulant Cdc42, nous avons donc observé la dynamique de localisation globale des protéines GAP *in vivo*. Cette approche permet de visualiser la globalité des zones pouvant potentiellement réguler Cdc42. Nous avons par ailleurs essayé de comprendre la fonction de la phosphorylation par Cln2/Cdk1 de la protéine Rga2. Cette phosphorylation est dynamique au cours du cycle cellulaire, nous avons donc utilisé les données sur la phosphorylation de Rga2 acquises par le Dr. McCusker pour générer des mutants et tenter d'en observer l'effet.

De plus, les protéines Cdc24 et Rga2 ont été mises en évidence dans un complexe contenant la protéine d'échafaudage Bem1. Nous avons débuté une caractérisation structurale de cette protéine qui semble importante dans le processus de polarisation cellulaire.

Matériels et méthodes

Souche	Genotype	Origin
DMY349	<i>MATa, his3-11, leu2-3,112, trp1-1, ura3-52, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1</i>	Dr Kellogg
DMY42	<i>MATa, his3-11, leu2-3,112, trp1-1, ura3-52, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1, CDC24-3HA:KI-URA3</i>	Dr McCusker
DMY74	<i>MATa, his3-11, leu2-3,112, trp1-1, ura3-52, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1, cdc24-74-3HA:KI-URA3</i>	Dr McCusker
DMY280	<i>MATa, his3-11, leu2-3,112, trp1-1, ura3-52, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1, RGA2 GFP::TRP1</i>	Dr McCusker
DMY1756	<i>MATa, his3-11, leu2-3,112, trp1-1, ura3-52, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1, RGA2::rga2ps2</i>	This work
DMY1758	<i>MATa, his3-11, leu2-3,112, trp1-1, ura3-52, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1, RGA2::rga2ps1</i>	This work
DMY1759	<i>MATa, his3-11, leu2-3,112, trp1-1, ura3-52, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1, RGA2::rga2wt</i>	This work
DMY1822	<i>MATa, his3-11, leu2-3,112, trp1-1, ura3-52, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1, BEM2 GFP::kanMX</i>	This work
DMY1823	<i>MATa, his3-11, leu2-3,112, trp1-1, ura3-52, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1, BEM3 GFP::hph1</i>	This work
DMY1842	<i>MATa, his3-11, leu2-3,112, trp1-1, ura3-52, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1, RGA1-GFP::HIS3</i>	This work
DMY1843	<i>MATa, leu2-3,112, ura3-52, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1, RGA2 GFP::TRP1, BEM2 GFP::kanMX BEM3 GFP::hph1 RGA1-GFP::HIS3</i>	This work
DMY1863	<i>MATa, leu2-3,112, ura3-52, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1, RGA2 GFP::TRP1, BEM2 GFP::kanMX BEM3 GFP::hph1 RGA1-GFP::HIS3 CHERRY-TUB4::URA3</i>	This work
DMY1886	<i>MATa, leu2-3,112, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1, RGA2 GFP::TRP1, BEM2 GFP::kanMX BEM3 GFP::hph1 RGA1-GFP::HIS3, ABP1:tdimer:URA3</i>	This work
DMY1888	<i>MATa, leu2-3,112, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1, RGA2 GFP::TRP1, BEM2 GFP::kanMX BEM3 GFP::hph1 RGA1::HIS3 BEM1:tdimer:URA3</i>	This work
DMY2019	<i>MATa, his3-11, leu2-3,112, trp1-1, ura3-52, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1, pGAL-CLN2-TAP</i>	This work
DMY2021	<i>MATa, his3-11, leu2-3,112, trp1-1, ura3-52, ade2-1, can1-100, GAL+, bar1, pGAL-CLA4-TAP</i>	This work

Table I. Strain used in this work

1) Matériels biologiques utilisés lors de ces études

a. Souches de levures utilisées au laboratoire

La levure *Saccharomyces cerevisiae*, aussi couramment appelée « levure du boulanger », est un organisme unicellulaire appartenant au règne des *Fungi*, aussi appelés mycètes, et faisant partie de la division des ascomycètes du fait de sa capacité de former des spores protégées par des asques lorsque les conditions de vie ne sont pas favorables à une reproduction asexuée. Ces levures peuvent vivre sous deux formes, haploïde et diploïde. La forme haploïde implique l'utilisation d'un signe sexuel: *MATa* ou *MATα*; pour leur permettre de reconnaître les levures « complémentaires » pour passer sous formes diploïdes.

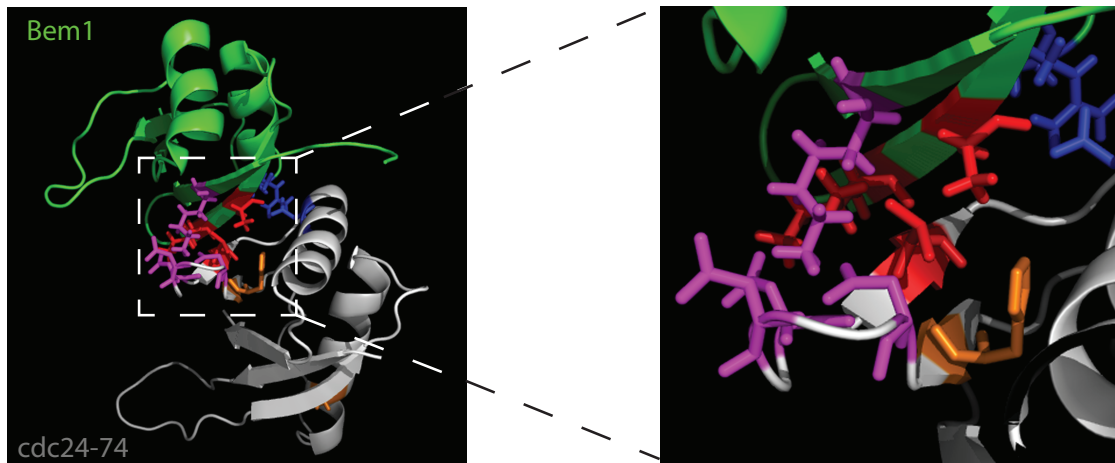
Il existe différents fonds génétiques étudiés en laboratoire comme le fond BY4742 (Euroscarf) ou le fond W303. Nos études réalisées au laboratoire utilisent ce dernier.

Les souches utilisées lors de ces travaux sont présentées dans la Table I.

La souche DMY42 a été générée par l'intégration du fragment 3xHA::*KIURA3* en partie 3' du gène *CDC24*. Un 5' oligonucléotide appariant le domaine PB1 et un 3' oligonucléotide appariant la région 3'UTR de *CDC24* ont été utilisés pour générer des produits de PCR en utilisant la Taq polymérase. Le taux d'erreur de cette polymérase est d'une erreur par kilobase amplifié. Ces produits de PCR ont ensuite été transformés dans la souche DMY349 et les transformants ont été sélectionnés après croissance à 25°C sur un milieu SC-URA+ Dextrose. Les transformants ont ensuite été répliqués sur du milieu frais et mis en croissance à 37°C. Les clones ne présentant pas de croissance à cette température ont été sélectionnés pour de plus amples analyses. Dans un premier temps un test de complémentation utilisant *CDC24* a été réalisé pour identifier les mutants récessifs. Par la suite un crible de suppresseur a été réalisé à l'aide d'une banque d'ADN de levure intégrée dans des plasmides 2μ. Les plasmides suppresseurs ont ensuite été récupérés puis séquencés pour identifier les suppresseurs *BEM1* et *CDC42* (Figure M-1).

Les souches permettant l'étiquetage des quatre protéines GAPs de Cdc42 ont été obtenues grâce à l'amplification des étiquettes et marqueurs associés

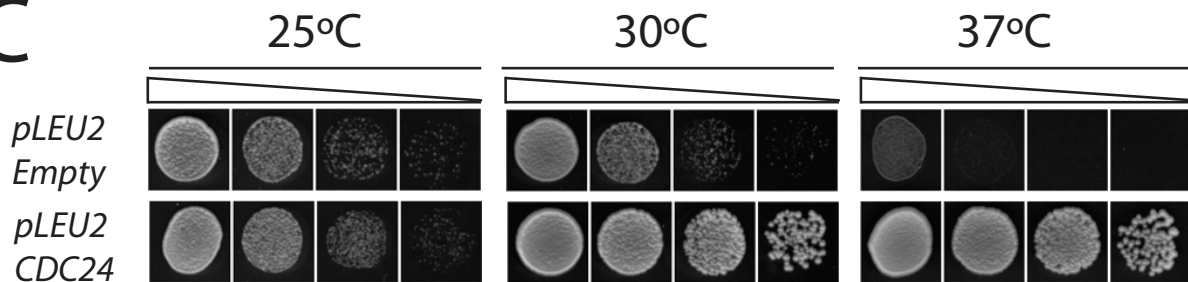
A



B

Sc Cdc24	K	I	S	N	T	H	N	N	N	I	S	P	I	T	K	I	K	Y	Q	D	E	D	G	D	F	V	V	L	G	S	D	E	D
cdc24-74	N	I	S	N	T	H	N	N	N	I	S	P	I	T	K	I	K	H	Q	D	E	D	G	D	F	V	V	L	G	S	D	E	D
Sp Scd1	K	L	C	G	I	L	K	Q	A	V	P	F	R	V	R	L	K	Y	V	D	E	D	G	D	F	I	T	I	T	S	D	E	D
Ca Cdc24	I	I	T	S	N	L	V	A	D	D	V	N	I	S	R	L	R	Y	K	D	D	E	G	D	F	V	N	L	N	S	D	D	D
K1 Cdc24	L	A	I	K	R	K	L	A	H	L	G	V	I	T	K	V	K	Y	Q	D	E	D	G	D	F	V	M	L	E	S	D	D	D
Um Cdc24	K	I	R	L	C	S	G	K	N	L	E	H	T	L	R	M	R	Y	I	D	E	D	G	D	A	V	L	I	S	D	D	D	D

C



D

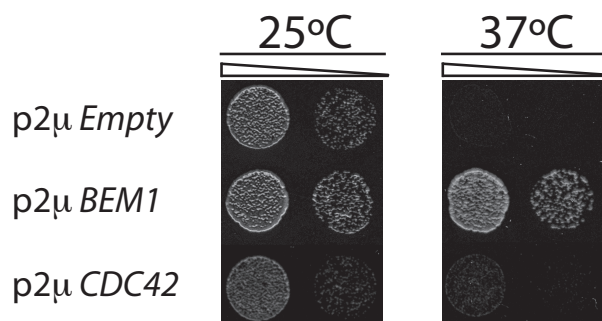


Figure M-1. Isolation and characterization of the *cdc24-74* mutant

(A) Model of the *cdc24-74*-Bem1 PB1 domain interaction based on the NMR structure in Ogura *et al.*. Bem1 and Cdc24 PB1 domains are represented in green and white respectively. Cdc24 aspartic acids 820,822 and 824 and Bem1 lysine 483 are colored in purple. Cdc24 aspartic acid 832 and Bem1 arginin 510 are colored in blue. Cdc24 valine 826 and Bem1 Isoleucin 489 and alanin 491 are colored in red. Orange residues refer to K801N and Y818H substitutions in *cdc24-74* protein.

(B) Protein alignment showing part of the PB1 domain in which the K801N and Y818H mutations reside in the *cdc24-74* mutant.

(C) Temperature sensitive growth of the *cdc24-74* mutant and rescue of the phenotype by expression of wild type Cdc24.

(D) Multicopy suppression of the *cdc24-74* mutant by 2 μ plasmids expressing *BEM1* and partial suppression by *CDC42* expression.

présents dans des vecteurs générés à cet effet (Longtine, McKenzie et al. 1998; Janke, Magiera et al. 2004). L'étiquetage des gènes *BEM2*, *BEM3*, *RGA1* et *RGA2*, a été réalisé suite à la transformation de produit de PCR utilisant comme matrice PYM27, PYM25, pFA6a-GFP(S65T)-HIS3MX6 et pFA6a-GFP(S65T)-TRP1 respectivement. Les transformants ont été étalés sur des milieux permettant leur sélection. Les clones présentant une croissance ont par la suite été testés par amplification d'ADN génomique de la région d'intérêt et par western blot en utilisant un anticorps reconnaissant la GFP (Figure M-2).

Les souches contenant des versions mutées pour la phosphorylation de *RGA2* ont été générées suite à la délétion de *RGA2* par une cassette *caURA3* dans la souche DMY349. Les produits de PCR correspondant à *rga2-wt*, *rga2-ps1* ou *rga2-ps2* ont ensuite été transformés et les clones résistant au 5-FOA ont été sélectionnés pour un contrôle de l'insertion du fragment au locus (Figure M-3).

b. Souches de bactéries utilisées au laboratoire

Les souches bactériennes utilisées au laboratoire pour le clonage ou l'expression de protéines sont des souches appartenant à l'espèce *Escherichia coli* et sont préparées à l'utilisation au sein du laboratoire.

i. La souche utilisée pour le clonage est la souche DH5 α : F- Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK⁻, mK⁺) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*. Cette souche offre des avantages pour le clonage du fait de certaines modifications comme la mutation *endA1* qui inactive une endonucléase intracellulaire permettant ainsi l'extraction d'ADN plasmidique.

ii. L'une des souches les plus utilisées au sein du laboratoire pour exprimer des protéines recombinantes est la souche BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Cette souche possède le génotype suivant: B F⁻ *ompT hsdS*(r_b⁻ m_b⁻) *dcm*⁺ Tet^r gal λ (DE3) *endA Hte* [*argU ileY leuW Cam*^r]. Le plasmide RIL de génotype [*argU ileY leuW Cam*^r] porte des copies supplémentaires des gènes encodants des ARNs de transfert (ARNt) peu abondants dans la bactérie et pouvant interférer avec la traduction de protéines eucaryotes dans ces systèmes recombinants. Ainsi les ARNt reconnaissant les codons AGA et AGG pour

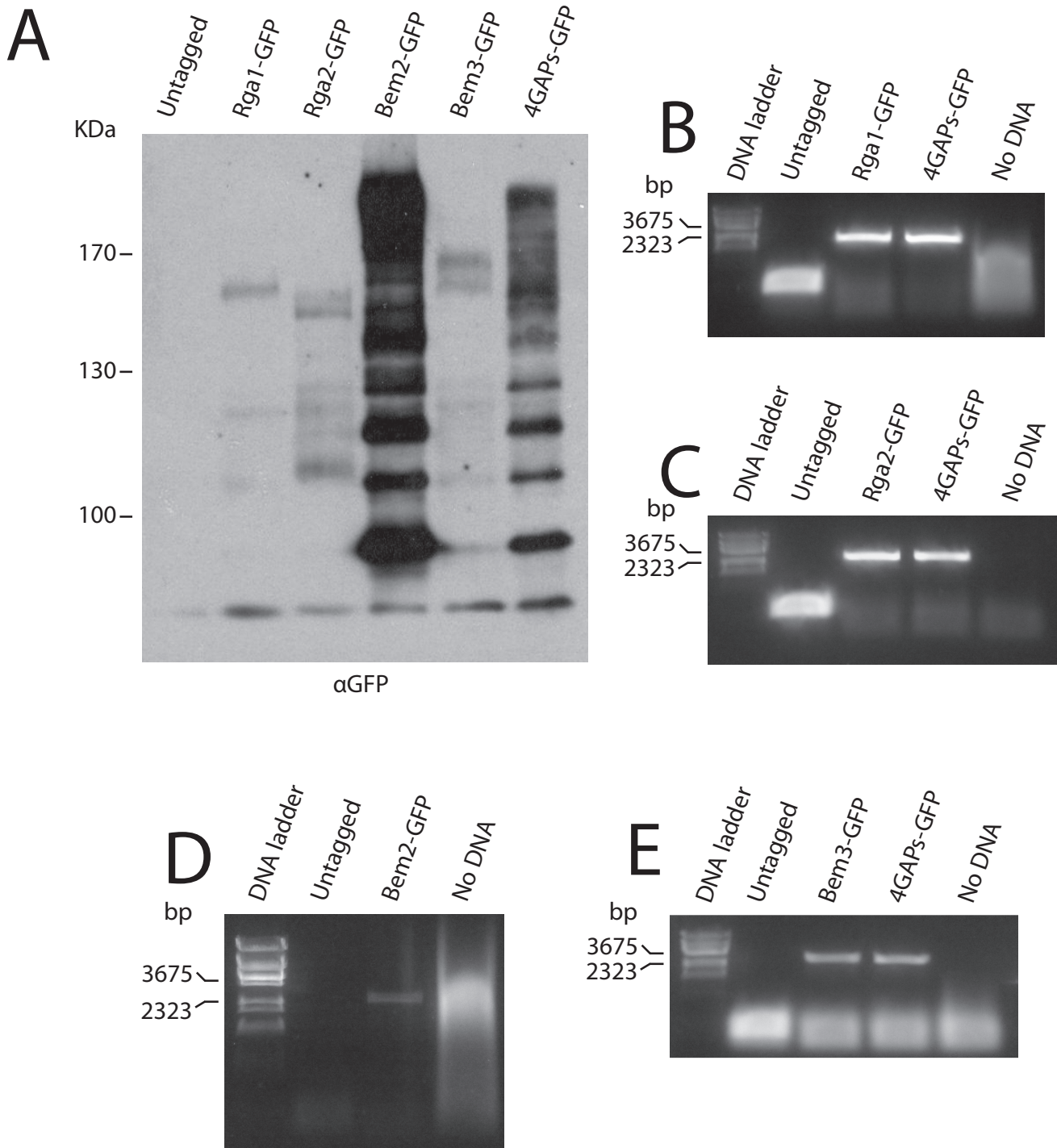


Figure M-2. Generation of a Cdc42 GAPs-GFP

(A) Western blot using a anti-GFP antibody allowing to visualize GAP-GFP tagged proteins. Untagged control is DMY349, single GAP-GFP are DMY1842, DMY280, DMY1822, DMY1823 and DMY1843. 1.5 OD of cell were minibeat in 60 μ L of sample buffer before boiling for 5 minutes. 8% SDS-PAGE gel and transferred on nitrocellulose membrane. Primary anti-GFP antibody from rabbit (2 μ g/mL) and secondary anti-rabbit antibody coupled with HRP from goat (1/5000) were incubated for 1h30 at room temperature

(B-E) Genomic DNA amplification showing proper integration of the TAG and selection marker at GAPs locus.

l'arginine, AUA pour l'isoleucine et CUA pour la leucine sont enrichis à l'aide de ce plasmide portant la résistance au chloramphenicol. La mutation ompT réduit la dégradation de protéines car ce gène code normalement pour une protéase de la membrane externe. La mutation hsdS abolit quand à elle le système de contrôle de l'ADN non endogène via la méthylation facilitant ainsi la propagation de l'ADN.

2) Milieux utilisés en microbiologie

a. Milieux bactériologiques

Au sein du laboratoire nous utilisons deux types de milieu, un essentiellement pour la culture lors de clonage et l'autre lors de l'expression des protéines.

i. Milieu 2xTY

Nous utilisons du milieu 2xTY suite à la transformation de bactérie par de l'ADN plasmidique suite à un clonage, lors de la mise en culture de bactéries pour réaliser des préparations d'ADN plasmidique, lorsque nous faisons des tests d'expression de protéines recombinantes ou lorsque nous faisons des précultures de bactéries pour produire des protéines recombinantes.

La composition de ce milieu est la suivante:

-15 g/L de tryptone.

-10 g/L de yeast extract.

-5 g/L de NaCl.

Lors de l'utilisation de ce milieu, des antibiotiques peuvent être ajoutés après autoclavage.

ii. Milieu Terrific Broth

Le milieu Terrific Broth est un milieu enrichi en tryptone, en extrait de levure et en glycérol comme source de carbone. Cet enrichissement en nutriment permet ainsi de réaliser des cultures où les DO seront plus élevées qu'en 2xTY. Ainsi à titre de comparaison lors de l'induction de l'expression de protéines la

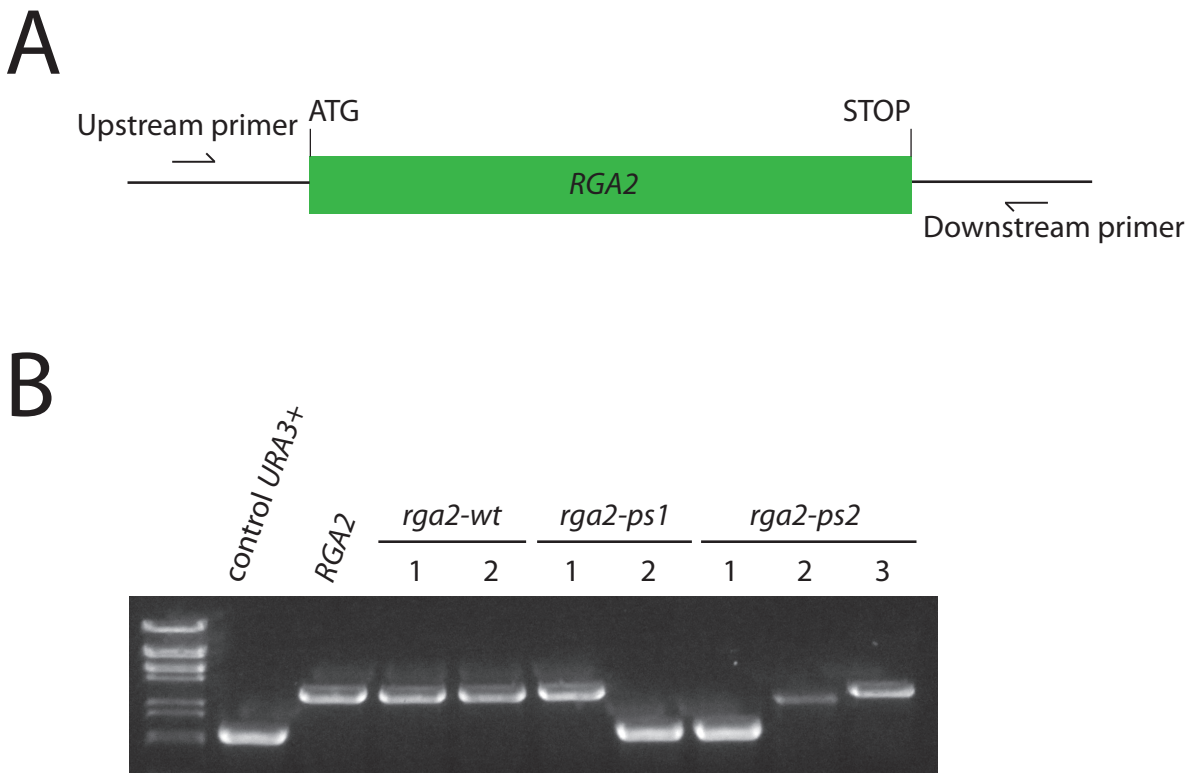


Figure M-3. Genomic DNA control for *rga2* reinsertion.

(A) Primers to controls the proper insertion of *rga2* ORF were designed to template around 300 bp upstream and downstream of Start codon and STOP codon respectively. Difference in genomic PCR products size enable to know which clones were positive for *rga2* insertion.

(B) 5FOA positive colonies were controlled for genomic DNA reinsertion of *rga2* mutants at endogenous locus. Clone 1 for *rga2-wt*, clone 1 for *rga2-ps1* and clone 3 for *rga2-ps2* were used for analysis.

DO pour du 2xTY sera de 0,6 alors que l'induction en Terrific Broth pourra être réalisée entre 2 et 3 de DO. De même lors de la fin de l'induction les DO seront plus élevées permettant ainsi d'augmenter les rendements de production des protéines.

La composition de ce milieu est la suivante:

- 12 grammes de tryptone pour 900mL.
- 24 grammes de yeast extract pour 900mL.
- 4 mL de glycérol pour 900mL.

Aux 900 mL seront ajoutés 100mL d'un tampon phosphate contenant:

- 23,1 g/L de KH_2PO_4
- 125,4 g/L de K_2HPO_4

Lors de l'utilisation de ce milieu, des antibiotiques peuvent être ajoutés après autoclavage.

iii. Concentration des antibiotiques utilisés en culture

Les antibiotiques utilisés sont de l'ampicilline et du chloramphénicol et les concentrations finales furent 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivement.

b. Milieux pour les levures

Lors de la mise en culture de levures nous utilisons différents types de milieu au sein du laboratoire. Certains de ces milieux sont des milieux "riches" en nutriments et dans lesquels les sources de carbones peuvent varier, et d'autres milieux sont des milieux synthétiques permettant d'exploiter les auxotrophies et prototrophie de certains mutants afin de les sélectionner.

i. Milieu YPD

Le milieu YPD (pour Yeast extract, Peptone, Dextrose) est un milieu complet pour la culture des levures. L'extrait de levure contient tous les acides aminés nécessaires à la croissance, le peptone sera quant à lui une source de nutriment alors que le dextrose sera la source de carbone. La composition de ce milieu est.:

- 10 g/L de yeast extract

- 20 g/L de peptone
- 20 g/L de dextrose

Afin d'être certains que ce milieu contiendra de l'adénine après autoclavage nous en ajoutons pour atteindre 40 mg/L final.

Des marqueurs de sélection peuvent être ajoutés avant l'utilisation.

ii. Milieu YPG

Le milieu YPG présente la même composition que le YPD à la seule différence que la source de carbone présente est du galactose (à 20 g/L final), celui-ci permettant d'exprimer des gènes sous la dépendance des promoteurs GAL1 ou GALs.

iii. Milieu YEP

Le milieu YEP est lui aussi composé des mêmes sources d'acides aminés et de nutriments. Nous utilisons essentiellement ce milieu pour carencer les cultures de levures en sources de carbone afin d'optimiser la production de protéines lorsque leur expression est sous la dépendance de la présence de galactose. Pour cela, la seule source de carbone que nous ajoutons est un mélange de glycérol et d'éthanol à 2% chacun en concentrations finales

iv. Milieu SC

Le Milieu SC est ainsi appelé pour Synthetic Media. Ce milieu est un milieu minimum dans lequel nous rajoutons nous-même les acides aminés et acides nucléiques pour lesquels les levures utilisées sont auxotrophes. Ces milieux nous permettent ainsi de sélectionner des levures transformées et devenant ainsi prototrophes pour certains marqueurs. Afin d'avoir à ajouter un minimum d'acide aminés et acides nucléiques par la suite un premier mélange d'acides aminés est réalisé comme il est décrit ici:

- 14 grammes de valine
- 5 grammes de phénylalanine
- 5 grammes d'isoleucine
- 5 grammes d'arginine
- 8 grammes d'aspartate

-2 grammes de méthionine

-10 grammes de thréonine

-5 grammes de tyrosine

sont mélangés afin de rendre la poudre générée homogène. Une fois réalisé, le mélange est aliquoté par 2,16 grammes qui seront ainsi utilisés pour faire 3,6 L de milieu (les 400 mL manquants pour faire 4L étant les sources de carbone et des auxotrophie à supplémenter). Ainsi pour réaliser les 3,6 L il faudra ajouter 28 grammes de yeast nitrogen base aux 2,16 grammes du mélange d'acide aminé.

Le milieu, une fois homogène, est mis en bouteille et autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

Les sources de carbones et les acides aminés voulus seront ajoutés par la suite. Ainsi des solutions concentrées sont préparées telles quelles:

- L-Leucine à 6g/L dans de l'eau distillée (100X)
- L-Lysine à 1g/L dans de l'eau distillée (100X)
- L-Histidine à 1g/L dans de l'eau distillée (100X)
- L-Tryptophane à 1,6g/L dans de l'eau distillée (100X)
- Adénine à 4g/L dans de l'eau distillée (100X)
- Uracile à 2g/L dans de l'eau distillée (100X)
- Dextrose à 20g/L dans de l'eau distillée (10X)
- Galactose à 20g/L dans de l'eau distillée (10X)

Toutes ces solutions sont au préalable stérilisées par filtration.

v. Milieu 5-FOA

Ce milieu est utilisé lorsque l'on veut détecter des levures ayant perdu leur prototrophie à l'uracile par un moyen de sélection positive. L'acide 5-Fluorouracile (5-FOA) est un composé qui sera métabolisé par des cellules porteuses de la forme sauvage du gène *URA3*, qui code pour une orotidine 5-phosphate decarboxylase, la métabolisation de ce composé conduira à terme à la création d'un métabolite toxique: le 5-fluorouracile qui bloquera l'activité de la thymidylate synthase. Ce milieu est fait en deux étapes. Celui-ci étant utilisé sous forme solide il faut dans un premier temps mélanger 8 grammes d'agar dans 200

mL d'eau qui seront autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Il faut par la suite réaliser une solution de 200 mL contenant:

- 50 mM KH₂PO₄
- 1 g/L de 5-FOA
- 20 g/L de Dextrose
- 2,8 g/L de yeast nitrogen base
- 20 mg/L d'uracile
- 60 mg/L de leucine
- 20 mg/L de tryptophane
- 20 mg/L d'adénine
- 20 mg/L d'histidine
- 20 mg/L de lysine.

Lorsque l'agar autoclave puis refroidi jusqu'à une température d'environ 55°C la deuxième solution est filtrée et mélangée afin de couler les boîtes.

3) Manipulation des acides nucléiques

a. Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

Les conditions suivantes ont été utilisées pour réaliser les PCR (Saiki, Scharf et al. 1985):

- 0,8 µM oligonucléotides
- 200 µM dNTP
- dilution au 1X du tampon de réaction qui est fourni à 5X
- 1/20 v/v DMSO
- 1/100 v/v polymérase phusion
- H₂O pour compléter le volume réactionnel.

Les réactions d'élongation sont ensuite réalisées à l'aide d'un thermocycleur qui nous permet de réaliser des cycles comme suit:

- un premier cycle de 30 secondes durant lequel l'échantillon est chauffé à 98°C afin de dénaturer l'ADN matrice.

- Suivi de trente cycles comprenant trois phases:

- Une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 7 secondes.

- Une étape d'hybridation de l'oligonucléotide sur l'ADN matrice complémentaire, cette étape dure 20 secondes et la température d'hybridation varie selon les oligonucléotides du fait de leur composition, les températures d'hybridations furent ainsi calculées via un site internet (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>). La température d'hybridation choisie sera celle calculée en conditions salines ajustées.

- La dernière étape de ces cycles sera une élongation de l'ADN grâce à la polymérase phusion. Celle-ci est active à la température de 72°C et la durée de cette étape varie en fonction de la longueur de l'ADN à amplifier (15 à 30 secondes pour 1 kb).

-La dernière étape de cette réaction sera une élongation afin de compléter les brins synthétisés qui ne sont pas complets. L'échantillon est ainsi mis à la température de 72°C pendant 10 minutes.

b. Mutagénèse dirigée

Certaines des expériences réalisées au cours de ces travaux ont nécessité l'usage de mutants ponctuels. Afin de générer ceux-ci des mutagénèses dirigées ont été réalisées. Dans un premier temps le choix des codons utilisés pour muter les séquences originales a été fait en essayant de respecter au maximum les proportions des ARNt présents *in vivo* afin de ne pas varier les cinétiques de traduction et être similaires à celle de la protéine sauvage. Pour se faire les codons choisis le furent au regard des données présentes sur le site internet SGD (http://downloads.yeastgenome.org/unpublished_data/codon/ysc.orf.cod). Des oligonucléotides s'appariant à la séquence d'intérêt et présentant les acides nucléiques permettant de modifier la séquence furent ainsi générés. Les réactions de mutagénèse dirigée continrent les mêmes proportions que les réactions d'amplification par PCR avec des concentrations d'ADN matrice de 50, 100 et 200 ng/μL en incluant un contrôle sans oligonucléotides. Les températures d'hybridation furent calculées au regard des températures calculées par le site oligocalc en utilisant les séquences des oligonucléotides auxquelles furent enlevé les mésappariements ainsi qu'un nucléotide de part et

d'autre de ceux-ci. Le programme du thermocycleur fut le même que lors d'une amplification par PCR à l'exception que le temps d'élongation fut de 5 minutes dû à la taille du plasmide. Après avoir mis 10% des échantillons en électrophorèse afin d'observer le résultat de la réaction, les échantillons furent digérés par l'endonucléase DpnI qui coupe les brins d'ADN porteurs des séquences GATC méthylées sur le résidu A. Cette méthylation est réalisée dans des bactéries Dam⁺ leur permettant de reconnaître le brin d'ADN original suite à sa réplication. Ce système permet aux cellules de réparer les mauvais événements de réplication de l'ADN. Dans le cas d'une mutagenèse cela permet de digérer les copies de plasmides porteuses de la séquence non mutée puisque provenant du plasmide original. Une fois la réaction de coupure par DpnI réalisée les échantillons furent transformés dans des bactéries compétentes.

c. Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose

Afin de séparer les brins d'ADN en fonction de leur taille, ceux-ci ont été chargés dans des gels d'agarose et mis en présence d'un champ électrique. L'ADN étant chargé négativement, il va migrer du pôle négatif au pôle positif du générateur. Les gels d'agarose contiennent différentes concentrations d'agarose en fonction de la taille attendue du fragment d'ADN. Ainsi dans le but de séparer des fragments de 1 à 10 kb et des fragments de 0,3 à 1 kb, des gels à 0,8% et 1,2% d'agarose ont été utilisés respectivement. Pour faire un gel d'agarose aux différentes concentrations l'agarose a été pesé et dissout dans 50mL de tampon TBE après chauffage du mélange au micro-onde. Après dissolution nous avons ajouté un composé appelé SYBR Safe® (Invitrogen) dilué au 1/25000, celui-ci se fixe à l'ADN dans le gel et est visible sous illumination du système SAFE imager™ (Invitrogen). La composition du tampon TBE est:

-89 mM Tris

-89 mM Acide Borique

-2 mM EDTA

-Ajustement du pH à 8.0 avec de l'acide chloridrique

Ce tampon TBE est aussi le tampon mis dans la cuve d'électrophorèse. L'électrophorèse est réalisée à 50 V constants pendant 30 minutes.

d. Purification d'ADN après électrophorèse en gel d'agarose

Après électrophorèse en gel d'agarose il peut être utile de purifier les fragments d'ADN qui ont été séparés. Pour cela le kit de purification QIAquick® Gel Extraction Kit a été utilisé et le protocole a été scrupuleusement suivi.

e. Purification d'ADN plasmidique

Afin de purifier l'ADN plasmidique présent dans les bactéries après clonage le kit de purification QIAprep® Spin Miniprep Kit a été utilisé en suivant le protocole fourni.

f. Mesure de la concentration en ADN présent dans les échantillons

Les mesures de concentration en ADN ont été réalisées sur le Nanophotometer® de marque Implen présent à la plateforme de soutien aux équipes de l'IECB. Les mesures réalisées étaient faites à 260 nm de longueur d'onde et étaient d'une précision de l'ordre de 2,5 ng/μL ce qui était suffisant pour la biologie moléculaire réalisée au laboratoire.

g. Digestion des échantillons d'ADN par des endonucléases de restriction

Les digestions des échantillons ont été réalisées avec les enzymes de restriction de marque New England Biolabs. Les digestions réalisées ont été faites en suivant les conseils d'utilisation de tampons. Lorsque deux enzymes n'avaient pas de tampon d'activité compatibles la première digestion était suivie d'une électrophorèse en gel d'agarose puis d'une purification d'ADN en gel d'agarose afin de pouvoir digérer l'échantillon dans le tampon compatible à la seconde enzyme.

h. Ligation des échantillons d'ADN

Afin de générer les plasmides nécessaires aux études réalisées au cours de mes travaux les inserts d'ADN furent ligués dans les plasmides à l'aide de deux ligases différentes: la T4 ligase puis la Quick ligase (toutes deux de marque New England Biolabs). Les réactions de ligation avec la T4 ligase étaient réalisées à 15°C pendant la nuit, alors que celles réalisées avec la Quick ligase étaient réalisées à température ambiante pendant 5 minutes. Nous n'avons pas observé d'effet notable quant aux efficacités de ligation. Afin de calculer les proportions adéquates d'ADN à utiliser lors de ces réactions une seule et même règle a été

suivie au cours de ces travaux: utiliser 60 ng de plasmide par ligation et y incorporer trois fois plus en molarité de l'insert à liguer (5 fois plus lorsque la différence de taille entre le plasmide et l'insert était supérieure à 10).

i. Transformation d'ADN dans les bactéries compétentes

Afin de transformer les réactions de ligation ou les vecteurs d'expression dans les bactéries préparées à cet effet une seule technique est utilisée au laboratoire : la transformation par choc thermique. Pour ce faire, les bactéries compétentes sont mises en présence de l'ADN à transformer dans de la glace pendant 10 minutes minimum. Une fois cette première incubation réalisée, une incubation de 5 minutes à 37°C est réalisée puis l'échantillon est remis dans la glace pour 2 minutes. Une fois ces deux minutes passées l'échantillon est resuspendu dans du 2xTY et est incubé pendant 40 à 60 minutes à 37°C afin que les cellules transformées puissent exprimer les facteurs de résistance présents sur le plasmide transformé. Une fois cette étape d'incubation réalisée les cellules sont étalées sur un milieu contenant le facteur de sélection requis.

j. Préparation de cellules compétentes à la transformation.

Dans le but de générer des bactéries compétentes à la transformation le protocole suivant a été suivi pour les cultures et le traitement des cellules. Dans un premier temps les cellules ont été cultivées dans un volume de 12 mL dans du 2xTY (avec l'ajout de chloramphénicol pour les bactéries utiles à l'expression de protéines). Le lendemain les 12 mL étaient inoculés à 1 litre de milieu dont la composition est la suivante:

-2% bactotryptone

-0,5% yeast extract

-10 mM NaCl

-2,5 mM KCl

-10 mM MgCl₂

-10 mM MgSO₄

-le pH est ajusté à 7.0 avec du NaOH

La culture est réalisée à 18°C pendant la nuit. Le troisième jour, lorsque la DO à 600nm était entre 0,5 et 0,7, les erlenmeyers contenant les cultures étaient mis sur la glace pendant 10 minutes puis leur contenant centrifugé pendant 5

minutes à 2500g à 4°C. Une fois culotées les cellules étaient lavées avec 320 mL de Transformation Broth (TB):

-10 mM Pipes

-15 mM CaCl₂

-250 mM KCl

-ajustement du pH à 6,7 avec du NaOH puis ajout de MnCl₂ à 55 mM.

Une fois resuspendues les cellules sont laissées sur la glace pendant 5 minutes puis centrifugées à nouveau pendant 5 minutes à 2500 g à 4°C. Le culot cellulaire est finalement resuspendu dans 40 mL de TB et 3 mL de DMSO sont ajoutés. Les cellules sont alors aliquotées et congelées dans de l'azote liquide puis stockées à -80°C. Afin de tester leur efficacité de transformation des dilutions d'ADN plasmidique ont été transformées (0,1 ng et 0,001 ng) par 100 µL de cellules. Seules les préparations présentant des efficacités supérieures à $2 \cdot 3 \cdot 10^{-7}$ étaient utilisées pour du clonage par ligation.

k. PCR sur colonie

Après les ligations et transformations des constructions lors des clonages une étape de PCR sur colonies a été réalisée afin de minimiser le nombre de purifications d'ADN plasmidique à réaliser. Pour ce faire des mélanges réactionnels de PCR, contenant un oligonucléotide spécifique du plasmide et un oligonucléotide spécifique de l'insert, ont été aliquotés par 25 µL. Les colonies résultant de la transformation étaient piquées à l'aide d'un cure dents et resuspendues dans le mélange réactionnel. Ainsi après la réaction de PCR, seules les colonies dont les réactions montraient une amplification à la taille attendue étaient mises en culture pour extraire l'ADN plasmidique.

l. Purification d'ADN génomique de levure

Afin de préparer de l'ADN génomique de levure dans le but d'amplifier les fragments d'intérêt le protocole suivant a été utilisé. L'équivalent de 10 µL de culot sec de cellules de levure était culotté et mis en présence de 200 µL de billes de verre (environ 0,5 mm de diamètre), de 200 µL de tampon de lyse (2% v/v triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH8, 1 mM EDTA) et 200 µL de phénol/chloroforme (50% chacun). Ce mélange était alors vortexé pendant 1 minute afin de casser les cellules. Par la suite 400 µL de tampon TE (Tris, EDTA)

étaient ajoutés puis vortexés afin de rendre le mélange homogène. Par la suite une centrifugation de 5 minutes à vitesse maximale fut réalisée. Le surnageant contenant l'ADN (phase aqueuse) était alors mélangé avec un volume égal de chloroforme afin d'éliminer toute trace de phénol résultant de la première étape. Après une nouvelle étape de centrifugation de 5 minutes la phase aqueuse était ajoutée à 2 volumes d'éthanol puis centrifugée pendant 5 minutes. L'éthanol fut ensuite enlevé et le tube séché en utilisant un évaporateur rotatif pendant 2 minutes à 60°C. Le culot fut ensuite resuspendu dans 50µL d'eau distillée et utilisé lors de PCR.

m. Précipitation de l'ADN par phénol/Chloroforme

Afin de concentrer et purifier l'ADN résultant de réactions par PCR pour transformer des levures la méthode de précipitation par phénol/chloroforme a été utilisée. Pour ce faire les réactions de PCR étaient regroupées dans un seul microtube et un volume équivalent de phénol/chloroforme était ajouté. Après une étape où l'échantillon était vortexé pendant 1 minute, l'échantillon était centrifugé pendant 5 minutes. Par la suite la phase aqueuse était mise en présence d'un volume équivalent de chloroforme dans le but d'éliminer le phénol encore présent dans la phase aqueuse. Après une étape d'homogénéisation du mélange par vortex celui-ci était à nouveau centrifugé pendant 5 minutes à vitesse maximale. La phase aqueuse était par la suite resuspendue dans un volume équivalent d'éthanol dans le but de précipiter l'ADN en solution. Une fois l'ADN culotté par centrifugation le culot fut séché par évaporateur rotatif puis resuspendu dans 50µL d'eau distillée.

n. Transformation de levure

Le protocole utilisé dans le but de transformer des levures est le suivant. Les cellules sont cultivées jusqu'à une DO de 0,5 à 0,7 à 600nm. Une fois culottées par centrifugation, les cellules furent lavées à l'aide d'un tampon contenant:

-100 mM LiOAc

-10 mM Tris HCl pH7.5

-1 mM EDTA

Une fois culottées à nouveau, les cellules furent remises en suspension dans le même tampon et aliquotées en fonction du nombre de transformations à

réaliser puis à nouveau culottées. Une fois le culot obtenu 15µL d'ADN de sperme de saumon à 5mg/mL furent ajoutés, accompagnés de l'ADN à transformer. Puis furent ajoutés 700µL du tampon suivant:

- 40% PEG
- 100mM LiOAc
- 10mM Tris HCl pH7.5
- 1mM EDTA

Lorsque le mélange fut homogène, les différentes transformations furent incubées à 30°C pendant 1h puis 20 minutes à 42°C. Après une dernière centrifugation les cellules furent resuspendues dans du milieu SC ne contenant aucun acide aminé et nucléique ajouté, puis étalées sur un milieu adéquat pour sélectionner leur nouvelle prototrophie.

4) Manipulation des protéines

- a. Préparation des culots bactériens pour effectuer les purifications de protéines recombinantes

Les expressions de protéines recombinantes ont été réalisées à 15°C durant la nuit. Les bactéries furent centrifugées à 6000 g pendant 15 minutes à 4°C. Lorsque les cellules furent culottées et les culots séchés, ceux-ci furent congelés directement dans de l'azote liquide. Une fois congelés ils furent cassés dans un mixeur à café au préalable refroidi par de la neige carbonique. Afin de le faire le mixage été réalisé par cinq à six séries de 5 secondes jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette étape conduit à l'obtention d'une poudre homogène de cellule. Celle-ci fut ensuite placée dans un bécher refroidi à l'azote liquide et le tout fut laissé à température ambiante jusqu'à ce que les bords de la poudre entrent en fusion. A cette étape trois volumes de tampon de lyse contenant du PMSF à 1 mM furent ajoutés et mis en chambre froide sous agitation magnétique pendant 10 minutes. Une fois homogène les lysats furent soniqués pendant 1 minute et 30 secondes à 30 watts après ajout de PMSF. Par la suite les lysats furent centrifugés à 50000 g pendant 45 minutes et le surnageant fut chargé sur les colonnes appropriées.

- b. Chromatographie d'affinité par le nickel (IMAC)

La purification de protéines recombinantes auxquelles ont été ajoutées des étiquettes de six histidines en amino- ou carboxy-terminal est réalisée à l'aide de résine d'agarose sur laquelle des ions métalliques ont été immobilisés. Il peut s'agir de nickel ou de cobalt, la première solution est celle utilisée au laboratoire.

Nous utilisons des billes NiNTA que nous équilibrons de telle manière:

- 2 volumes de colonne H₂O
- 2 volumes de colonne 0.5 M EDTA
- 2 volumes de colonne H₂O
- 2 volumes de colonne v/v 10% acetic acid
- 2 volumes de colonne H₂O
- 2 volumes de colonne 50% EtOH
- 2 volumes de colonne H₂O
- 2 volumes de colonne 1 M NaOH
- 2 volumes de colonne H₂O
- 4 volumes de colonne 100mM NiSO₄
- 2 volumes de colonne H₂O
- 4 volumes de colonne de tampon d'élution
- 4 volumes de colonne de tampon de lyse

Les trois tampons usuels que nous utilisons au laboratoire contiennent les mêmes composants avec comme unique variante les concentrations d'imidazole qui sert de compétiteur de l'histidine pour le nickel. Ainsi les trois tampons servent à lyser les cellules et charger les extraits totaux sur les colonnes, laver les colonnes puis éluer celles-ci.

Les compositions sont donc:

- 5% glycérol
- 500 mM NaCl
- 50 mM Tris pH 7.5
- 5 mM imidazole pour le tampon de lyse

-25 mM imidazole pour le tampon de lavage

-250 mM imidazole pour le tampon d'élution

Ces tampons ont par la suite été adaptés aux cours des purifications réalisées durant mes travaux de thèse.

c. Chromatographie d'affinité par glutathion sepharose

Les protéines exprimées lorsqu'elles sont étiquetées avec la glutathione S-transférase sont purifiées à l'aide de résine d'agarose à laquelle est couplée du glutathion. La glutathione S-transférase est une protéine de 26 kDa naturellement exprimée dans les cellules eucaryotes, cependant elle n'est pas exprimée chez les procaryotes ce qui en fait une étiquette utile à la purification de protéines recombinantes. L'étiquette GST se fixe avec une forte affinité au glutathion mais cette interaction est réversible.

La résine utilisée au sein du laboratoire est une résine vendue par sigma-aldrich. Cette résine permet de fixer entre 5 et 10 milligrammes de protéines par millilitre de résine. Les tampons utilisés afin de purifier les protéines furent:

-Tampon de lyse:

-PBS

-0,5% Tween-20

-1 M NaCl

-ajout de DTT à 10 mM une fois le lysat centrifugé

-Tampon de lavage:

-PBS

-0,05% Tween-20

-0,25 M KCl

-0,5 mM DTT

-Tampon d'élution:

-50 mM Tris HCl pH8.1

-0,25 mM KCl

-5mM Gluthation réduit

Le DTT est utilisé dans les tampons de lyse et de lavage afin d'inhiber le relargage de la glutathione S-transférase du glutathion. Le glutathion réduit

présent dans le tampon d'éluion joue un rôle de compétiteur du glutathion fixé sur les billes.

d. Concentration des protéines

Dans le but de pouvoir travailler avec des échantillons protéiques suffisamment concentrés il a fallu concentrer ceux-ci. Ainsi des concentrateurs Amicon Ultra de marque Millipore furent utilisés. Pour ce faire ceux-ci furent dans un premier temps équilibrés avec le même tampon que celui contenant les protéines, pour cela ils furent mis en centrifugation pendant 10 minutes à 4°C à 6000 g. Par la suite l'excédent de tampon fut remplacé par les échantillons protéiques au sein des unités de concentration. Les échantillons furent ainsi centrifugés à 4°C à 6000 g le temps que le volume soit suffisamment réduit.

e. Chromatographie d'exclusion de taille

Afin de séparer les protéines recombinantes purifiées de contaminants présents dans l'éluat nous avons utilisé la technique de chromatographie d'exclusion de taille. Cette technique est permise par l'utilisation de colonnes dans lesquelles est coulée une résine poreuse qui permettra la rétention des protéines en fonction de leur encombrement stérique. Ainsi les protéines les plus volumineuses traverseront la résine plus rapidement que celles moins volumineuses rendant ainsi possible la séparation des protéines par leur taille. La colonne utilisée au cours de ces travaux fut une colonne superdex200 HR 10/30. Cette colonne permet une séparation des protéines de taille variant entre 10 et 600 kDa. Pour réaliser les chromatographies d'exclusion la colonne fut montée sur une machine Akta purifier fabriquée par GE Healthcare puis équilibrée dans le tampon de course. Les chromatographies furent réalisées à une vitesse de 0,5 mL par minute, avec un fractionnement de 0,5 mL.

f. Purifications des protéines Cdc24-6his et GST-Bem1

i. Purification de Cdc24

Les bactéries pour exprimer la protéine Cdc24-6his sont mises en pré-cultures à 37°C dans 100 mL de milieu 2xTY contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol. Le lendemain 20 mL de pré-culture sont resuspendus dans 1

litre de milieu TB contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol et mises à 37°C jusqu'à ce qu'elles atteignent 2 de DO. Les cultures sont alors mises à 15°C pendant une heure le temps qu'elles refroidissent. Alors l'IPTG est ajouté à une concentration finale de 0,8 mM et les cultures sont laissées en induction pendant la nuit. Le lendemain, les cultures sont centrifugées à 6000g pendant 15 minutes à 4°C puis sont congelées à sec dans de l'azote liquide. Les culots sont par la suite mixés dans un moulin à café pré-refroidi avec de la neige carbonique afin que la poudre résultante reste congelée pour éviter la protéolyse. La poudre est alors mise dans un bécher refroidi à l'azote liquide. Lorsque la surface de contact entre la poudre bactérienne et le bécher montre des signes de réchauffement (la poudre devient une pâte visqueuse à la périphérie du bécher) 4 volumes de tampon de lyse (20 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl et 5 mM d'imidazole) sont ajoutés avec du PMSF à 1mM. La solution est mélangée dans un premier temps avec une spatule puis mise à 4°C en agitation pendant 10 minutes. Le volume de la solution est d'environ 150mL, le volume des culots atteint 30 mL. Une fois homogène la solution est soumise à une sonication à 20 watts pendant 1 minute 30 secondes. Le lysat est ensuite centrifugé à 50000 g pendant 45 minutes. Le surnageant de la centrifugation est mis en incubation avec des billes Ni-NTA pendant deux heures en batch. Par la suite les billes et le lysat sont versés dans une colonne de chromatographie. Lorsque les billes sont culottées par la gravité et le lysat complètement passé au travers les billes, du tampon de lavage (20 mM Tris pH 7.5, 1 M KCl, 30 mM imidazole) est ajouté et lave la colonne par gravité (environ 30 volumes de colonne soit 300 mL pour 10 mL de billes). Une fois les billes lavées, l'éluat est réalisée par 20 mM Tris pH 7.5, 300 mM NaCl et 500 mM Imidazole. Alors l'éluat contenant la protéine Cdc24 est mis en dialyse dans du tampon contenant 20 mM Tris pH 7.5 et 150 mM NaCl. Une très forte précipitation protéique apparaît rapidement, celle-ci correspond au produit de dégradation d'environ 60 kDa. Après deux jours d'incubation dans ce tampon à 4°C la solution est concentrée jusqu'à atteindre un volume de 500 µL. Ces 500 µL sont alors injectés dans une colonne Superdex200 HR 10/30. La chromatographie d'exclusion et le fractionnement sont réalisés dans un tampon de même composition que la dialyse. Les fractions sont par la suite aliquotées et congelées dans de l'azote liquide afin de procéder à des expériences ultérieures.

ii. Purification de Bem1

Les étapes de production par les bactéries sont les mêmes que celles décrites pour Cdc24 hormis que l'induction est réalisée à 0,3 mM d'IPTG. Une fois éluée, la protéine est clivée par la protéase preScission (au 1/75^{ème}) après un changement de tampon par dialyse (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl puis ajout après dialyse de DTT et EDTA à 1 mM final). La protéolyse est réalisée pendant la nuit à 4°C. La solution est chargée sur une colonne de glutathion agarose et la fraction non retenue est récupérée. Elle est ensuite concentrée, après ajustement de la salinité à 300 mM NaCl pour éviter que Bem1 se colle à la membrane du concentrateur, jusqu'à un volume de 500 µL. La chromatographie d'exclusion est réalisée dans les mêmes conditions que pour Cdc24-6his et les fractions d'intérêt sont aliquotées puis congelées à l'azote liquide. (Un exemple de résultat de ces purifications est montré sur le panel A de la Figure I-5).

g. Mesure de la concentration des protéines

Dans le but de mesurer la concentration des protéines deux méthodes ont été utilisées. Lorsque les mesures ne nécessitaient pas une grande précision (par exemple les mesures de concentration afin de cliver les protéines recombinantes de leur étiquette), la méthode de mesure par réactif de Bradford a été utilisée. Cette technique est une procédure d'analyse spectroscopique dont les mesures sont réalisées à 595nm de longueur d'onde. Le réactif de Bradford était préparé au sein du laboratoire de la façon suivante:

- Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie G dans 50 mL d'éthanol a 96% en agitant pendant une heure.
- Une fois dissous, mélanger la solution avec 100 mL d'acide phosphorique puis ajouter de l'eau distillée pour atteindre un volume final de 1 litre.

Le réactif de Bradford se colore en présence de protéine de manière proportionnelle à la présence de celle-ci. Pour se faire, un volume compris entre 1 et 10 µL de la solution protéique était dilué dans un volume de 1 mL de réactif. Afin de mesurer la concentration de protéine présente dans les échantillons une gamme d'étalonnage avec de la BSA a été réalisée. La gamme comprenait des concentrations allant de 1 mg/mL à 10 mg/mL donnant une courbe d'étalonnage

linéaire. Une fois la courbe réalisée, dont les abscisses correspondent à la concentration protéique et les ordonnées à l'absorbance mesurée, les absorbances des échantillons furent testées et reportées sur la gamme d'étalonnage afin d'en déduire la concentration.

La deuxième technique de mesure de concentration protéique est une mesure plus précise prenant en compte les caractéristiques intrinsèques des protéines comme leur poids moléculaire ou leur coefficient d'extinction molaire. Cette technique dont la mesure est réalisée à 280nm relie ainsi directement ces propriétés à l'absorbance mesurée en suivant la loi de Beer-Lambert ($A = \Sigma c l$, où A correspond à l'absorbance, Σ au coefficient d'extinction molaire, c à la concentration molaire et l à la longueur du trajet optique). Ces mesures ont été réalisées à l'aide d'un nanodrop.

h. Électrophorèse en SDS-PAGE

Dans le but de séparer les protéines et d'observer le résultat des expériences réalisées, des électrophorèses SDS-PAGE ont été utilisées. Le principe de ces gels est de générer un maillage constitué de polymères d'acrylamide et de bis-acrylamide qui permettront de séparer les protéines en fonction de leur taille en conditions dénaturantes grâce à l'ajout de SDS, qui conférera par ailleurs une charge négative globale à la protéine. Pour ce faire des mélanges d'acrylamide et de bis-acrylamide ont été réalisés dans le but de générer différentes tailles de tamis (Anderson, Baum et al. 1973). Les proportions de bis-acrylamide utilisées varient dans le but de séparer les protéines en fonction de leur état de phosphorylation, les protéines les plus phosphorylées étant plus retardées.

Pourcentage de gel	8%	9%	10%	12,5%	20%
30% w/v Acrylamide	2,67	3	3,34	4,2	6,7
1% w/v Bis-acrylamide	1,62	1,44	1,3	1,04	0,66
1,5M Tris pH 8.8	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Eau (QSP 10mL)	3,5	3,1	2,8	2,24	0,12

Afin de catalyser la polymérisation de ces gels deux composants furent ajoutés, 50 µL de persulfate d'ammonium à 10% et 5µL de TEMED pour 10mL de mélange. Les gels ont par la suite été coulés dans les cassettes utilisées à cet effet et la surface supérieure fut aplanie par ajout d'eau distillée. Ce gel aura pour but de séparer les protéines en fonction de leur taille, les protéines les plus petites migrant plus rapidement que les grosses, il est appelé gel de séparation. Une fois le gel polymérisé, un deuxième type de gel a été coulé dans la partie supérieure. Ce gel aura pour but de focaliser les protéines pour leur rentrée dans le gel de séparation. Ce gel contient une faible quantité d'acrylamide (5% final) et un pH plus faible que le gel de séparation permettant ainsi une bonne focalisation des protéines à la frontière séparant les deux types de gel. La composition de ce gel est la suivante:

- 5% acrylamide
- 0,13% bis-acrylamide
- 125mM Tris pH 6.8

Pour permettre la polymérisation de celui-ci 50µL de persulfate d'ammonium à 10% et 5µL de TEMED sont ajoutés à 5mL de mélange.

Le tampon de course est le suivant:

- 383 mM Glycine
- 50 mM Tris
- 0,1% SDS

Les gels sont alors mis sous tension avec un ampérage constant de 20mA, les protéines migreront de la cathode à l'anode. Les gels seront migrés le temps nécessaire à chaque expérience en fonction de la migration d'un marqueur de taille visible (PageRuler Prestained Protein Ladder®). Une fois les gels correctement migrés, ceux-ci furent démoulés et différents types de traitement réalisés par la suite.

i. Coloration des gels

Dans le but d'observer le résultat des électrophorèses en SDS-PAGE, différents types de coloration ont été réalisés. Par exemple pour observer le résultat d'une purification de protéines exprimées dans la bactérie une

coloration au bleu de coomassie a été réalisée, alors que le résultat d'une purification de protéines depuis la levure nécessitait une méthode plus sensible, du fait de rendement plus faible, et a donc nécessité une coloration au nitrate d'argent.

La méthode de coloration au bleu de Coomassie implique une fixation de ce composant (Brilliant blue R) aux protéines sur les résidus aromatiques ou basiques. Pour ce faire, le gel est plongé dans la solution contenant le colorant pendant 10 à 20 minutes puis il est décoloré afin de pouvoir révéler la coloration des protéines. La composition de la solution de coloration est la suivante:

- 5 g de brilliant blue R (0,5% w/v final)
- 450 mL d'éthanol à 96% (45% v/v final)
- 100 mL d'acide acétique (10% v/v final)
- Le volume est ensuite ajusté à 1L en utilisant de l'eau distillée.

Une fois la coloration réalisée le gel sera uniformément coloré, il faut donc décolorer celui-ci dans le but d'observer les protéines. Pour ce faire des bains successifs dans du décolorant sont réalisés jusqu'à ce que le résultat du gel soit observable. La composition du décolorant est la suivante:

- 250mL d'éthanol à 96% (25% v/v final)
- 70mL d'acide acétique (7% v/v final)
- le volume est finalement ajusté à 1L avec de l'eau distillée.

La deuxième méthode de coloration est la coloration au nitrate d'argent. Le principe de cette méthode est basé sur l'attache des ions argent aux chaînes latérales contenant des groupements carboxyles ou sulfhydyles. Lorsque les ions argent sont réduits, ils se colorent permettant alors la visualisation des protéines au sein du gel. Pour ce faire le gel sera plongé dans différents bains successifs afin de procéder à la coloration.

Le premier bain permet de diminuer le bruit de fond, il est donc nécessaire de se débarrasser de composants tels que le SDS ou le tris. Pour ce faire le gel est plongé pendant 30 minutes dans un bain contenant:

- 25% d'éthanol (v/v)
- 7% d'acide acétique (v/v)

Le second bain a pour but d'ajouter un composant permettant d'augmenter la sensibilité de la révélation. Le thiosulfate de sodium se complexe fortement avec les ions Argent, et le glutaraldéhyde favorise cela. La composition de ce second bain est la suivante:

-30% d'éthanol (v/v)

-0,5 M d'acétate de sodium

-0,2% de thiosulfate de sodium (w/v)

-0,125% de glutaraldéhyde (v/v)

Une fois ce second bain réalisé trois lavages successifs de 10 minutes sont réalisés dans de l'eau distillée.

Le troisième bain permet d'incorporer le nitrate d'argent et du formaldéhyde qui aidera lui aussi à la réduction des ions Argent. La coloration ne se réalise pas car la réaction d'oxydo-réduction se produit à pH basique. Cette solution présente la composition suivante:

-0,1% de nitrate d'argent (w/v)

-0,01% de formaldéhyde

Le dernier bain permet de basifier le gel via l'ajout de carbonate de sodium permettant ainsi la réduction des ions Argent et donc la coloration des protéines présentes dans le gel. La composition est donc la suivante:

-2,5% de carbonate de sodium (w/v)

-0,01% de formaldéhyde

Une fois la coloration suffisante la réaction doit être stoppée le plus rapidement possible en acidifiant la réaction, par ajout d'une solution à 1% de glycine.

j. Immunodétection des protéines (western blot)

Lorsque cela fut nécessaire une autre technique de détection des protéines après gel SDS-PAGE fut utilisée: le western blot. Après une étape de transfert des protéines du gel vers une membrane appropriée, celle-ci est incubée avec une série d'anticorps permettant au final de détecter les protéines d'intérêt.

Pour procéder à cette manipulation le gel est dans un premier temps démoulé puis déposé dans une cassette de transfert et sera mise en sandwich entre une feuille de papier Whatman et la membrane en question. Le transfert est réalisé sous l'effet d'un champ électrique qui permettra aux protéines chargées négativement par le SDS de se transférer sur la membrane qui sera du côté de l'anode. Si la membrane utilisée est en PVDF (polyfluorure de vinylidène) elle doit être dans un premier temps activée dans du méthanol. Le tampon de transfert utilisé au laboratoire est le suivant:

- 20% de méthanol (v/v)
- 20mM de Tris base
- 150mM de glycine

Les transferts sont réalisés à 0,5A durant 2 heures.

Une fois le transfert réalisé les membranes sont saturées à l'aide d'une solution contenant 1X PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,76mM KH₂PO₄, le pH est ajusté à 7,2 avec du NaOH), 250mM NaCl, 0,1% de tween-20 et 5% de lait en poudre. Une saturation de 5 minutes par membrane est suffisante.

Une fois cette saturation réalisée, un anticorps à la concentration désirée (varie d'un anticorps à l'autre durant cette étude) est ajouté à la solution qui a permis de saturer les membranes. Une incubation d'une heure par membrane est nécessaire. Une fois ce premier anticorps incubé, les membranes sont lavées afin d'éviter tout signal aspécifique. Pour ce faire les membranes sont incubées 4 fois 5 minutes dans un tampon contenant 1X PBS, 250mM NaCl et 0,1% de Tween-20. Suite à ces lavages le deuxième anticorps est ajouté dans le tampon de saturation pendant 30 minutes par membrane. Une fois le second anticorps incubé les membranes sont lavées comme précédemment et sont par la suite prêtes à révéler le résultat de l'expérience.

Pour révéler les westerns blot nous utilisons deux techniques différentes en fonction de notre volonté de quantifier ou non les résultats de ceux-ci. Lorsque cela n'est pas nécessaire nous utilisons de la membrane de nitrocellulose et les anticorps secondaires sont couplés à l'enzyme HRP. Cette enzyme lorsqu'elle est mise en présence de luminol l'oxydera en 3-aminophthalate, cette réaction est accompagnée d'émission de lumière. Celle-ci pourra être détectée par l'incubation d'un film autoradiographique. Ce film une

The system is illuminated in a total reflection condition. When the Beam is reflected, the difference in refraction properties between the prism and the matrix generates an evanescent wave. Plasmon waves enter in resonance with evanescent waves allowing the absorption of a specific angle

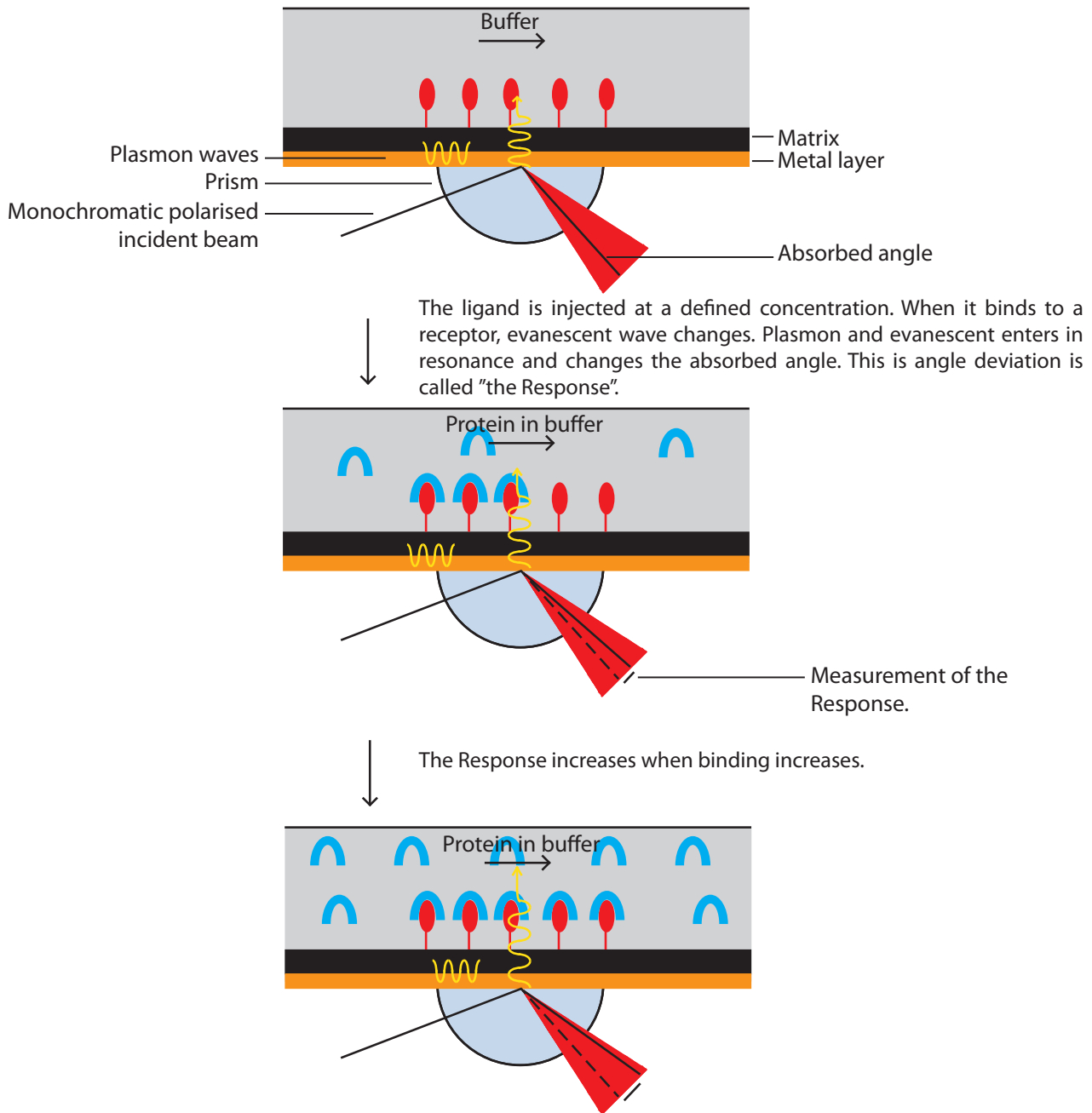


Figure M-4. Schematic representation of Surface Plasmon Resonance.

Receptors are covalently bound to a matrix. Plasmon waves propagate at the interface between the matrix and the metal layer. A prism under the metal layer is highlighted with a monochromatic polarised beam in a total reflection condition. This beam is refracted at the interface between the prism and the matrix and an evanescent wave is emitted in the media (matrix side). This wave enters in resonance with plasmon, exciting gold atoms which absorb the refracted light at a specific angle measured with a detector. When a receptor binds a ligand, the evanescent wave is affected and the resonance changes the angle of the absorbed wavelength.

fois plongé dans une solution de révélation présentera les signaux correspondant à la position de la protéine sur la membrane.

La seconde technique utilisée au laboratoire permet de quantifier les signaux et donc de suivre les réactions qui ont été séparées par le SDS-PAGE. Pour ce faire nous utilisons de la membrane PVDF, qui donnera moins de bruit de fond lors de la révélation, et un anticorps secondaire couplé à un fluorophore (α -mouse-alexa532, α -rabbit-alexa488). Ces fluorophores peuvent être excités à des longueurs d'onde spécifiques et émettre les signaux proportionnellement à leur concentration. Afin de scanner les membranes, l'appareil Typhoon Trio + (GE HealthCare) présent à l'IECB (équipe de Jean-Louis Mergny) a été utilisé. Le traitement des données générées (quantification) a été réalisé avec le logiciel ImageQuantTL qui est fourni avec le scanner.

k. Résonance plasmonique de surface

Cette technique permet de mesurer l'affinité entre un ligand et son récepteur. Elle est basée sur la mesure indirecte des propriétés d'ondes de surface. Les outils de mesures sont des puces qui sont constituées d'un prisme qui surplombe une fine couche métallique avec une matrice de l'autre côté. Les ondes de surface, appelées plasmons, se propagent à la frontière entre la couche métallique et la matrice et sont sensibles à des changements de l'environnement de cette dernière. En particulier, quand des récepteurs sont couplés à la matrice, les propriétés des plasmons varient lorsque le récepteur est lié à son ligand. Pour mesurer ces changements de propriétés, on illumine le prisme avec de la lumière polarisée en condition de réflexion interne totale. La lumière est réfléchiée par la surface métallique, et est réfractée. Cependant la réflexion totale est accompagnée d'une onde évanescente qui va se propager dans le milieu contenant les protéines. La résonance entre cette onde évanescente et le plasmon excite les ions de la couche d'or ce qui résulte dans l'absorption de l'onde réfracté à un certain angle, que l'on appelé angle de résonance. L'onde de surface est sensible à des changements à la suite d'une interaction ligand/récepteur. En conséquence, l'angle de résonance varie lui aussi, et la mesure de cet angle grâce à un détecteur permet donc de visualiser les changements d'état (lié ou non) du récepteur (Figure M-4).

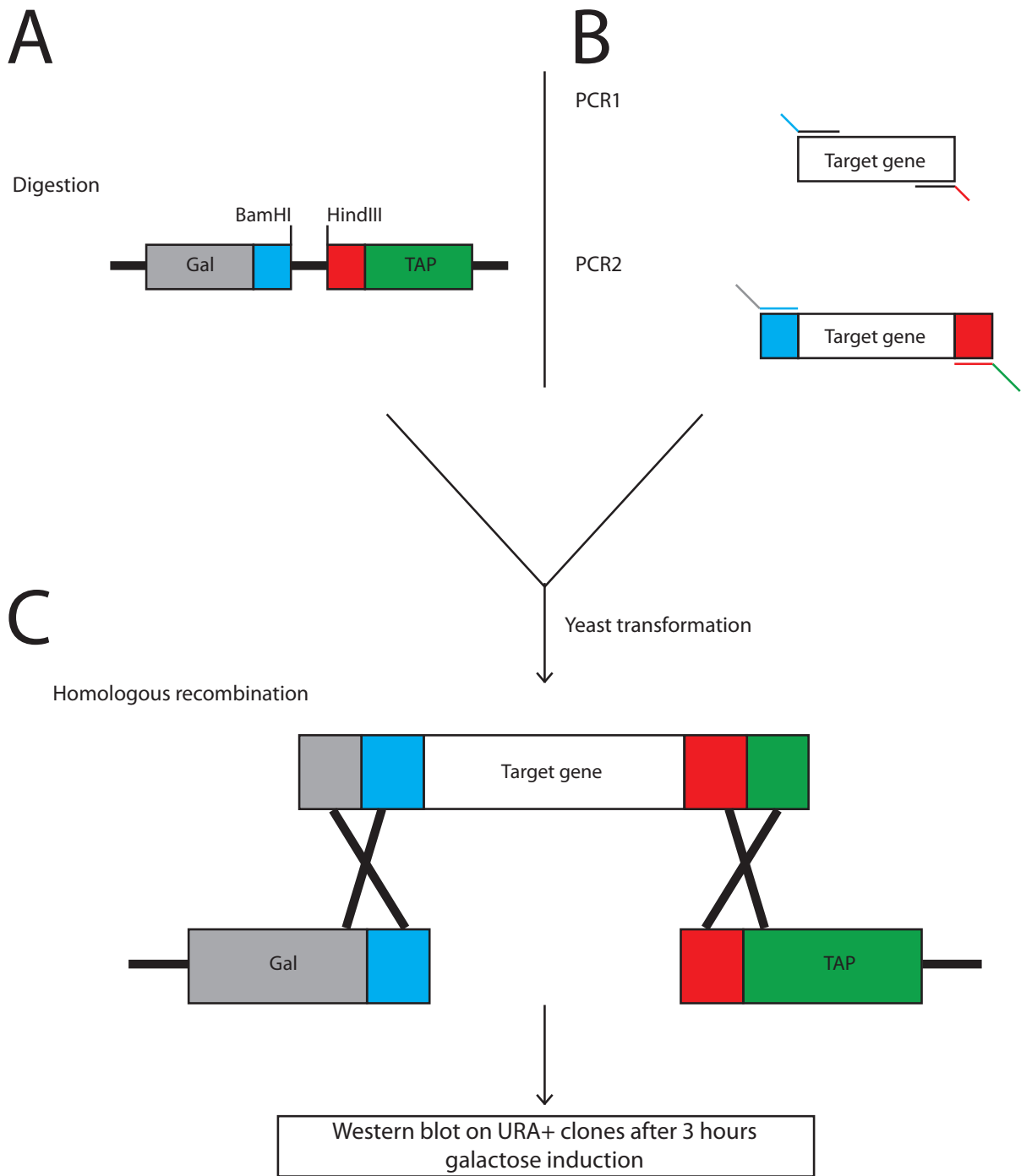


Figure M-5. TAP tagging strategy

(A) Digestion of a plasmid between the Gal promoter and the TAP sequence.

(B) Two step amplification by PCR of the gene of interest with oligos containing homology to the Gal promoter and TAP sequence.

(C) After co-transformation of the digested plasmid and PCR products, uracil prototroph yeast are grown in the presence of galactose for 3 hours and protein extracts are prepared for western blot.

Nos analyses ont été réalisées sur la machine Biacore3000 à l'institut IECB. Nous avons utilisé une puce CM5 (GE Healthcare) qui présente une matrice carboxyméthylée. Afin d'activer cette matrice, pour fixer le récepteur (Bem1), nous l'avons traitée avec du 1-éthyl-3-(3-diméthylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) et du N-hydroxysuccinimide (NHS) dans le but de rendre les résidus carboxyl réactifs. Une fois la matrice activée, toute substance contenant des amines pourra être fixée aux groupements carboxyl par des liaisons covalentes. Nous avons alors injecté la protéine Bem1 à un flux de 5 $\mu\text{L}/\text{minute}$ pendant 30 secondes à une concentration de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans un tampon à 20 mM d'acétate de sodium au pH 6.5. Ce tampon est utilisé car il présente un pH inférieur au point isoélectrique théorique de la protéine. Cela permet la protonation des résidus favorisant le couplage de la protéine aux résidus carboxyl activés de la matrice. Par ailleurs le tampon utilisé lors du couplage ne doit pas contenir d'amine pour éviter toute saturation de la matrice par le tampon. Le couplage de la protéine à la matrice a été directement observé par un changement de l'angle de réflexion (appelé Response Unit: RU). Une fois la protéine Bem1 couplée, nous avons saturé les résidus carboxyl encore réactifs en injectant une solution à 1 M d'éthanolamine. Les mesures d'interaction entre Cdc24 et Bem1 ont été réalisées avec un tampon de course composé de 20 mM Tris pH 7.5 et 150 mM NaCl.

1. purification par TAP tagging

Les séquences codantes des deux kinases ont été intégrées dans un plasmide 2 μ dérivé du pRS306 (Figure M-5). Après avoir digéré le plasmide entre les séquences du promoteur Gal et de l'étiquette TAP, nous l'avons co-transformé dans la levure avec un produit de PCR contenant le cadre de lecture du gène d'intérêt encadré de séquences homologues au promoteur et à l'étiquette. La levure utilisera la recombinaison homologue pour combler ainsi le "trou" existant dans le plasmide digéré par les produits de PCR (processus de gap repair). Le plasmide portant le gène URA3, les levures transformantes ayant réussi l'étape de recombinaison seront donc prototrophes pour l'uracile et seront sélectionnées sur du milieu sans uracile. Les clones ayant pu croître sur ce milieu sont par la suite testés pour l'expression des protéines. Pour cela, les cellules sont mises en cultures dans du milieu SC-URA+Dextrose pendant 2 jours

à 30°C. Après deux jours les cellules sont centrifugées à température ambiante puis rincées dans du milieu SC-URA+glycérol/éthanol avant d'être à nouveau centrifugées dans le but d'enlever toute forme de Dextrose extracellulaire. Elles sont à nouveau resuspendues dans du SC-URA+glycérol/éthanol puis mises en culture dans le même milieu avec une DO de départ de 0,05. Les cultures sont mises à 30°C pendant la nuit. Le lendemain lorsque la DO atteint 0,5-0,7, du galactose est ajouté jusqu'à atteindre une concentration de 2%, puis les cultures sont remises à 30°C pendant 3 heures. Une fois les trois heures passées 1 unité de DO est culottée pour chaque culture et congelée dans de l'azote liquide en présence de billes de verre dans des tubes. Puis 60 µL de tampon de charge contenant 1 mM de PMSF sont ajoutés dans chaque tube avant de les casser en utilisant un mini broyeur à bille. Les échantillons sont bouillis à 100°C pendant 5 minutes avant d'être chargés dans des gels SDS-PAGE à 10% d'acrylamide à raison de 10 µL par échantillon. Une fois les électrophorèses réalisées les gels sont transférés sur des membranes de nitrocellulose pendant 2 heures à 500 mA à 4°C. Un western blot est réalisé en utilisant uniquement un anticorps primaire IgG conjugué à la peroxydase qui reconnaît la protéine A présente dans l'étiquette TAP fusionnée à nos kinases. Nous avons ainsi pu cribler les différentes constructions exprimant Cla4-TAP et Cln2-TAP.

Pour cela des pré-cultures ont été lancées dans 100 mL de SC-URA+Dextrose pendant 3 jours. Après trois jours les cellules furent traitées comme décrit précédemment en utilisant des volumes de lavage de 50 mL de milieu. 10 mL prélevés sur les 50mL de la dernière suspension cellulaire ont servi à ensemercer 1L de culture à 30°C de SC-URA+glycérol/éthanol. Pour chaque purification un total de 4L de culture à 30°C a été utilisé. Après une journée de croissance environ la DO de la culture a atteint 0,6. Dès lors, 20g de galactose ont été ajoutés pendant 3 heures. Les cellules ont alors été centrifugées à 5000g pendant 10 minutes avant d'être congelées à sec dans de l'azote liquide. Les culots ont par la suite été moulus dans un moulin à café pré-refroidi à la neige carbonique. Afin de casser les cellules nous avons utilisé un broyeur planétaire (Retsch). Cette machine utilise la force centrifuge pour mettre en mouvement des billes d'acier, refroidies à l'azote liquide, introduites avec la poudre de cellules dans une jarre en rotation. La poudre de cellules est alors

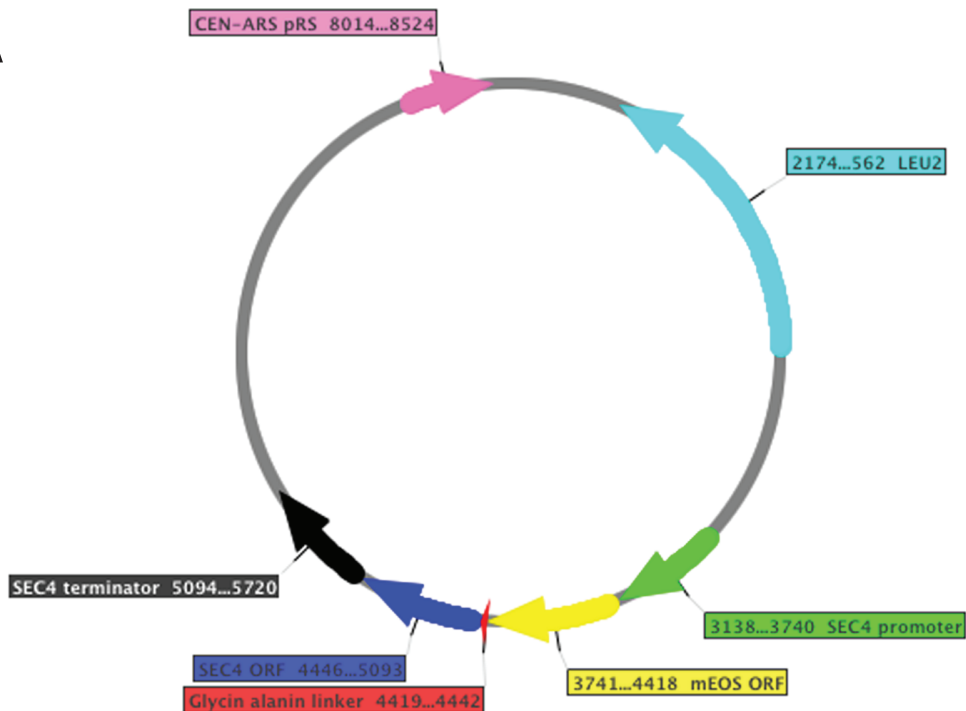
broyée entre les billes et le bord de la jarre. Des cycles de rotation de 4 minutes à 400 rpm ont été utilisés avec un changement de sens de rotation une minute avant la fin du cycle. Après 4 à 5 cycles le résultat du broyage fut constaté en resuspendant l'équivalent de 2 à 3 μL de poudre dans 100 μL de KCl à 1 M et en observant la casse des cellules au microscope. Par la suite la poudre de cellules cassées fut placée dans un bécher pré refroidi à l'azote liquide puis laissée à température ambiante le temps que la surface de contact entre le bécher et la poudre entre en fusion. Alors 40 mL de tampon de lyse (10 mM Tris pH8.0, 1 M NaCl, 0,1% Igepal, 50 mM NaF, 2 mM Na orthovanadate, 100 mM β -glycerophosphate, 1 mg/L leupeptine, 1mg/L pepstatin, 1mg/L chymostatin et 1 mM PMSF) furent ajoutés et mélangés vigoureusement à l'aide d'une spatule puis mis en agitation pendant 10 minutes à 4°C. De l'acétate de potassium (concentration finale 200mM) fut ajouté et le mélange fut laissé à incuber pendant 10 minutes dans la glace. Puis les lysats furent centrifugés en deux étapes, une première centrifugation de 30 minutes à 20500 rpm et une centrifugation de 1h30 à 35000 rpm (40000 et 110000 g environ). Le lysat clarifié fut mis en présence de 300 μL de billes IgG Sepharose pendant 2 heures. Après cette incubation les billes furent coulées dans une colonne de chromatographie afin d'être lavées trois fois avec 10 mL de tampon de lyse suivi de 10 mL de tampon de clivage par la TEV (10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,1% Igepal, 0,5 mM EDTA et 1 mM DTT). Une fois ce lavage effectué, la colonne fut bloquée et 2 mL du même tampon furent ajoutés. 10 μL de TEV furent alors ajoutés dans les colonnes mises en agitation à 4°C pendant la nuit. Le lendemain le liquide contenant les protéines d'intérêt clivées par la TEV fut récupéré par écoulement de la colonne. 300 μL de tampon furent ajoutés à la surface des billes dans le but de récupérer le volume mort. Puis l'échantillon fut dilué par 3 fois par du tampon de fixation sur les billes de calmoduline (10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,1 % Igepal, 1 mM MgAc, 1 mM Imidazol, 2mM CaCl₂ et 10 mM β -mercaptoéthanol), et du 1M de CaCl₂ fut ajouté dans un volume correspondant au 1/333 du volume récupéré précédemment afin de titrer l'EDTA présent dans le TEV clivage buffer. La solution protéique fut versée dans une colonne contenant 300 μL de billes de Calmodulin-Sepharose préalablement équilibrée. Les protéines furent laissées en incubation pendant 2 heures. Par la suite la

colonne fut lavée par du tampon de fixation 3 fois 10 mL. Pour finir les protéines furent éluées dans du tampon d'activité kinase supplémenté avec l'EGTA nécessaire à la chélation du calcium (50 mM Hepes, 2 mM MgCl₂, 0,05% Tween-20, 1 mM DTT, 10% glycerol et 2 mM EGTA). L'élution fut réalisée en 6 fractions de 300 µL successives. Les kinases furent ensuite dialysées afin d'enlever l'EGTA présent, celui-ci inhibant les réactions de phosphorylation.

5) Constructions réalisées au cours de ces travaux

Nom du plasmide	Sites de restriction utilisés (5' et 3')	Mutations générées	Commentaires
pET21a- <i>CDC24</i>	NdeI, NotI		Expression de Cdc24-6his dans <i>E.coli</i>
pET21a- <i>cdc24-ps</i>	XbaI, NotI	Tous les sites de phosphorylation par Cln2/Cdk1 ont été enlevés.	Expression de cdc24-ps-6his dans <i>E.coli</i>
pGEX6p2- <i>BEM1</i>	NdeI, XhoI	Mutation du site BamHI en site NdeI dans le plasmide	Expression de GST-Bem1 dans <i>E.coli</i>
pRS315- <i>RGA2</i>	Sall, NotI	Mutation du site NdeI dans la séquence terminateur. Addition du site NdeI au niveau du codon Start. Mutation du site SmaI dans le promoteur.	
pRS315- <i>rga2-ps1</i>	NheI, SmaI	Tous les sites de phosphorylation par	Dérivé de pRS315- <i>RGA2</i>

A



B

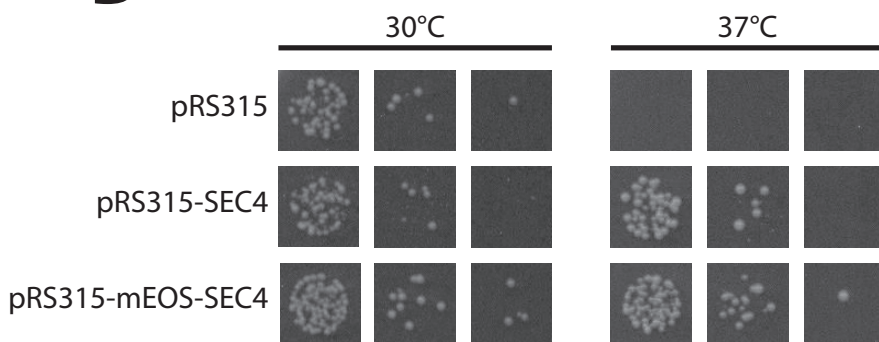


Figure M-6. *mEOS-SEC4* construct is functional

(A) pRS315-*mEOS-SEC4* plasmids map.

(B) DMY1563 (*sec4-8* strain) has been transformed with an empty plasmid (pRS315), a plasmid containing Sec4 with its promoter and terminator (pRS315-SEC4) and a plasmid derived from the previous one expressing mEOS at the amino terminal part of Sec4 (pRS315-mEOS-SEC4). The *sec4-8* mutant is not able to grow at 37°C so the plasmid were tested for their capacity to rescue the *sec4-8* mutation.

The temperature sensitivity of the strain is rescued in the presence of the pRS315-SEC4 and pRS315-mEOS-SEC4 but not the pRS315. This data argues that the plasmid expresses a Sec4 protein or chimeric protein with mEOS which is functional because it rescues the mutant defect.

		Cln2/Cdk1 présentant la séquence consensus minimale (S/TP)	
pRS315- <i>rga2-ps2</i>	HpaI, PstI	Ajout des sites HpaI et PstI par mutation silencieuse. Tous les sites de phosphorylation par Cln2/Cdk1	Dérivé de pRS315- <i>rga2-ps1</i>
pRS305-cter- <i>BEM1-TDIMER</i>	SacI/BamHI		La digestion avec l'enzyme HpaI permet l'étiquetage au locus avec tDimer
pRS305-cter- <i>ABP1-TDIMER</i>	SacI/BamHI		La digestion avec l'enzyme XbaI permet l'étiquetage au locus avec tDimer

Par ailleurs un autre vecteur a été généré au cours de cette thèse. Celui-ci permet l'expression de la protéine Sec4 couplée en amino-terminal à une étiquette photoactivable (mEOS) sous la dépendance de son propre promoteur. Cette construction a été utilisée par le Dr Jose (chercheuse au laboratoire) pour visualiser et traquer des vésicules d'exocytose singulières (Figure M-6).

Chapitre I: Préparation et
caractérisation des différentes protéines
nécessaires à l'étude de la
phosphorylation *in vitro* de Cdc24.

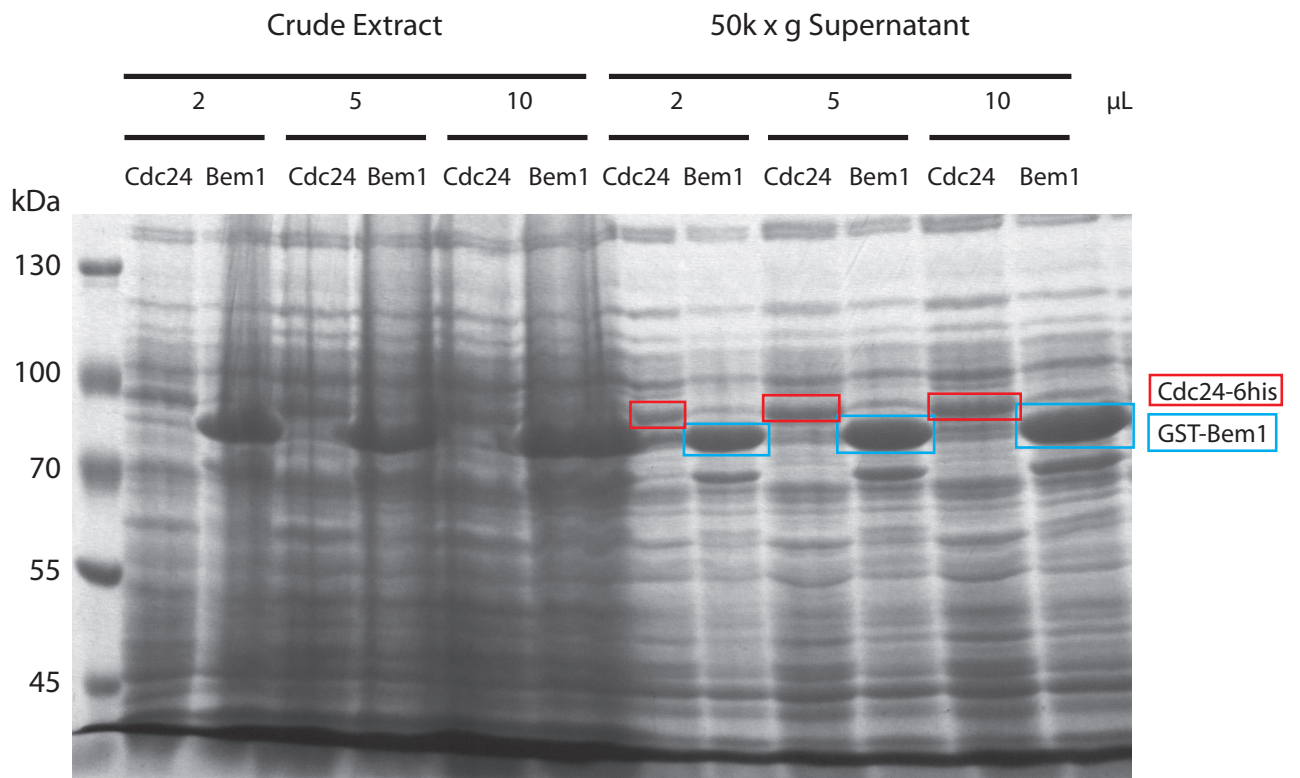


Figure I-1. Expression and solubility of Cdc24-6his and GST-Bem1 in E.coli.

Coomassie staining of a 10% SDS-PAGE showing the expression of full length Cdc24-6his and full length GST-Bem1 (the GST tag is removed in a later step of the purification).

A) Production des protéines recombinantes Cdc24-6his et GST-Bem1

Afin d'utiliser les protéines Cdc24 et Bem1 tant pour des études structurales que biochimiques nous avons du trouver un moyen de les produire en grande quantité. Pour cela nous avons choisi une approche de purification de protéines recombinantes exprimées dans une souche bactérienne *E.coli*. Les cadre de lecture de Cdc24 et Bem1 ont été clonés dans des vecteurs pET21a et pGEX6p2 respectivement. La protéine Cdc24 a été étiquetée avec une étiquette hexahistidine du coté carboxy-terminal, et la protéine Bem1 avec la GST suivi d'un site de coupure par une protéase du coté amino-terminal.

- a. Nos constructions permettent-elles d'exprimer ces protéines dans *E.coli* ?

Suite à l'expression des protéines Cdc24-6his et GST-Bem1 dans la souche *E.coli* BL21 codon+, un gel SDS-PAGE a été réalisé afin d'observer si nos protéines d'intérêt étaient exprimées et présentes dans le surnageant suite à la centrifugation des lysats à 50000 g pendant 1 heure. Le résultat obtenu est présenté sur la Figure I-1. Nous constatons que la protéine GST-Bem1 est fortement exprimée, et présente en grande quantité dans le surnageant (carrés cyan). En revanche la protéine Cdc24-6his présente un niveau d'expression plus faible bien qu'elle soit tout de même visible (carrés rouge).

- b. Pouvons-nous purifier les protéines recombinantes Cdc24-6his et GST-Bem1?

- i. Purification de la protéine Cdc24-6his

Après avoir constaté que la protéine Cdc24-6his était présente dans le surnageant après centrifugation, nous avons pu tester sa purification sur colonne d'agarose couplée au nickel (Ni-NTA), grâce à l'étiquette hexahistidine. Après expression et lyse des cellules comme décrit précédemment, nous avons chargé le surnageant de centrifugation sur une colonne Ni-NTA (10 mL de résine soit 2,5 mL de résine par litre de culture) pendant 2 heures à 4°C. La colonne a été lavée par 40 volumes de colonne de tampon contenant 5% glycérol, 20 mM Hepes pH 7.6, 1 M NaCl et 20 mM d'imidazole. Puis les protéines ont été éluées en utilisant le même tampon enrichi en imidazole (250 mM). Le résultat de la purification est présenté dans le panel A de la Figure I-2. Nous avons constaté la présence de

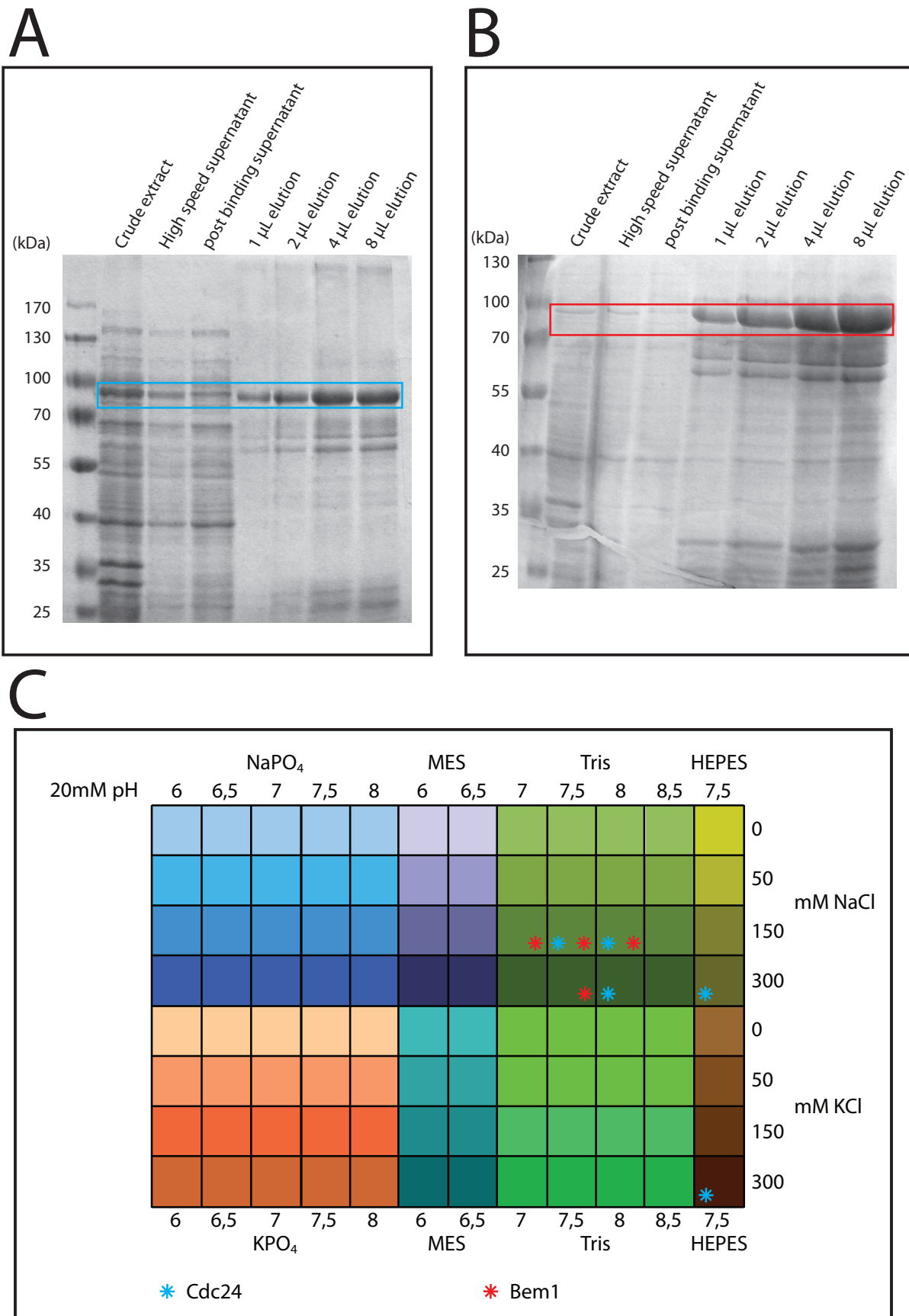


Figure I-2. Purification of Cdc24-6his and GST-Bem1 from *E.coli*.

(A) Coomassie staining after 10% SDS-PAGE showing Cdc24-6his purified using NiNTA resin.
 (B) Coomassie staining after 10% SDS-PAGE showing GST-Bem1 purified using glutathion agarose resin.
 (C) Cartoon template showing the rational design of buffers used to identify optimal conditions that maximize the stability and solubility of the purified proteins. Blue and red stars represents the best conditions found for Cdc24 and Bem1 respectively.

produits de dégradation, dont la taille avoisinait les 60 kDa. Nous avons ainsi pu purifier environ 10 mg de protéine pour 4 litres de culture avec ce premier essai.

ii. Purification de la protéine GST-Bem1

La protéine GST-Bem1 étant elle aussi présente dans la phase surnageante après centrifugation, nous avons pu poursuivre nos essais de purification en utilisant une colonne d'agarose couplée au glutathion. Le tampon de lyse utilisé fut 1X PBS, 0,05% Tween-20 et 1M NaCl. Après centrifugation, du DTT fut ajouté afin d'atteindre une concentration de 10 mM. Le lysat fut incubé sur la résine (5 mL de résine pour 4 L de culture) pendant 2h à 4°C. La colonne fut ensuite lavée par 40 volumes de colonne par un tampon contenant 1X PBS, 0,25 M KCl, 0,05% Tween-20 et 0,05 mM DTT. Une fois lavée la colonne fut éluée avec un tampon contenant 50 mM Tris HCl pH8.1, 0,25 mM KCl et 5 mM de glutathion réduit. Le résultat de la purification est présenté dans le panel B de la Figure I-2. Nous avons pu constater que la protéine Bem1 était purifiée en grande concentration avec cependant la présence de produits de dégradation. Cette purification nous a permis de purifier environ 25 mg de protéine GST-Bem1 pour 4 litres de culture.

c. Dans quelle solution de stockage les protéines Cdc24-6his et Bem1 sont elles les plus stables?

Dans le but de déterminer les conditions de stockage optimales pour la stabilité des protéines ainsi produites, nous avons passé au crible un grand nombre de conditions de conservation. Pour ce faire, 96 solutions de stockage différentes ont été préparées et réparties en 96 puits dans lesquels nous avons ajouté les protéines (voir schéma Figure I-2 panel C). Nous avons ainsi testé un total de 8 compositions salines (concentrations allant de 0 à 300 mM en NaCl ou KCl) et 17 tampons différents (pH variant entre 6 et 8.5). Le principe du crible est simple : 100 µL de chaque solution de stockage est mis dans un puits d'une plaque 96 puits, puis 5 µL de l'éluat de protéines est ajouté. La plaque est laissée à 4°C puis observée le lendemain à l'aide d'une loupe binoculaire. Nous attendions deux types de résultats : un précipité résultant d'une condition de solubilisation de la protéine inadéquate ; une absence de précipité révélant une condition de solubilisation de la protéine plus optimale. Dans les faits, certains puits ont montré une grande quantité de précipité et d'autres beaucoup moins.

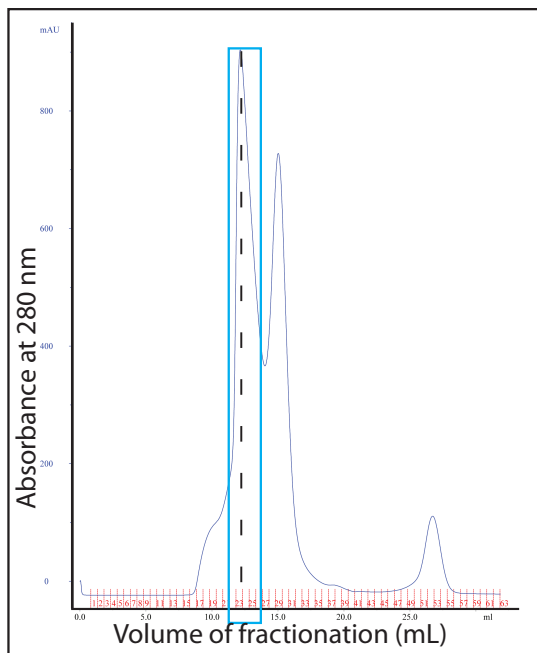
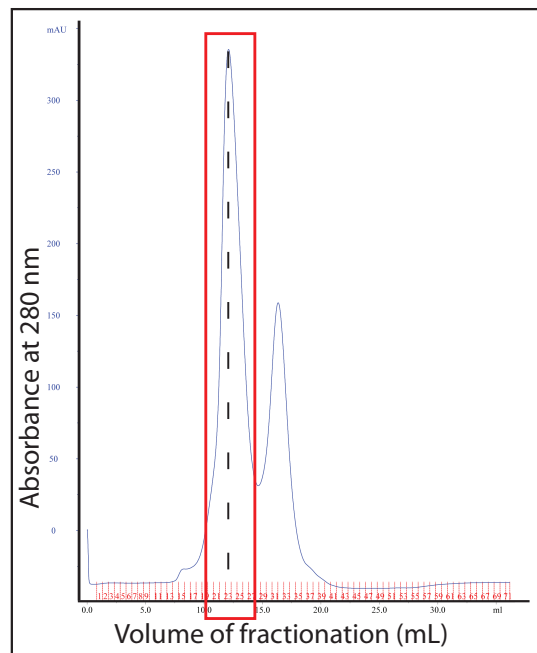
A**B**

Figure I-3. Gel filtration profiles of Bem1 and Cdc24.

(A) Gel filtration profile of Bem1 after the removal of the GST-tag. The blue rectangle shows the fractions containing full length Bem1. Those fractions were directly aliquoted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

(B) Gel filtration profile of Cdc24 after precipitation of the Cdc24 degradation product. The red rectangle shows the fractions containing full length proteins. Those fractions were directly aliquoted, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Les tampons présentant les meilleures conditions ont été annotés par des étoiles bleu et rouge pour Cdc24 et Bem1 respectivement. Nous avons donc sélectionné ces derniers afin d'optimiser leur composition et de les tester en présence de plus fortes concentrations protéiques.

Avant l'optimisation des tampons nous avons choisi d'enlever l'étiquette GST- de la protéine GST-Bem1, celle-ci pouvant avoir un effet lors d'étude biochimique et structurale. Pour cela la solution protéique a été dialysée en présence du tampon contenant 20 mM Tris pH 7.5 et 150 mM NaCl. Puis du DTT et de l'EDTA ont été ajoutés afin d'atteindre des concentrations de 1mM pour chacun. Enfin la protéase HRV 3C que nous avons purifié nous-mêmes a été ajoutée au 1/75^{ème}. Cette enzyme reconnaît le site préscession présent entre la GST et la protéine Bem1. La réaction de protéolyse a été incubée pendant la nuit à 4°C. Une fois clivé, l'échantillon fut rechargé sur la colonne glutathion agarose, après que la concentration en DTT eût été ajustée à 10 mM. Cette étape est réalisée dans le but de séparer l'étiquette GST- et les protéines non coupées qui seront retenues sur la colonne alors que les protéines Bem1 seront récupérées dans la fraction non retenue.

Les protéines Cdc24 et Bem1 ont par la suite été soumises à des chromatographies d'exclusion de taille dans le but de séparer les protéines des contaminants. La solution qui ne semblait pas affecter leur stabilité a été utilisée: 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl. Au préalable, les protéines ont été concentrées pour atteindre le volume maximal d'injection (500 µL), la Figure I-3 montre des exemples de chromatogramme pour Bem1 et Cdc24-6his.

Par la suite les protéines ont été concentrées afin de pouvoir tester leur stabilité à plus grande concentration (3 mg/mL dans 100 µL de concentration finale) dans différents tampons. Les solutions de stockage testée ont été utilisées afin de pouvoir comparer différentes concentrations salines, de 50 et 150 mM NaCl (les différentes conditions sont présentées dans le panel A de la Figure I-4). Après deux semaines d'incubation à 4°C, les échantillons ont été centrifugés et bouillis dans du tampon de charge. Ils furent chargés sur des gels SDS-PAGE à 9 et 11% pour Cdc24 et Bem1 respectivement. Le résultat de ce test est présenté dans la Figure I-4 (Gels des panels B et C pour Bem1 et Cdc24 respectivement).

Nous avons observé que les protéines étaient stables sur les durées testées. Nous avons par la suite choisi de manipuler les protéines après purification dans du tampon 20mM Tris pH 7.5 + 150 mM NaCl, solution qui permettait la meilleure conservation des protéines. L'absence de précipité dans cette solution nous a permis de conclure que les faibles quantités de précipité observées pendant le premier crible résultaient de la précipitation d'un produit de dégradation qui ne supportait pas ces conditions de stockage.

Suite à l'observation que le tampon contenant 20mM Tris pH 7.5 + 150 mM NaCl semblait adéquat à la stabilité des protéines nous avons testé leur stabilité en les soumettant à une centrifugation à 100000 g pendant 1 heure à 4°C. Le résultat de ce test est présenté dans le panel D de la Figure I-4.

L'optimisation de la solution de stockage et de manipulation des protéines nous a permis d'améliorer les protocoles de purification eux-mêmes. Le résultat de ces purifications est montré sur le panel E de la Figure I-4. La coloration au bleu de Coomassie du gel présenté montre une très faible abondance de contaminants (environ 5% de produit de dégradation pour Cdc24).

d. Cdc24 et Bem1 sont-elles dénaturées sous l'effet d'une augmentation de température?

L'activité des protéines est dépendante de leur repliement tridimensionnel. Ce repliement est fonction en grande partie de la séquence d'acides aminés qui composent la protéine et qui sont responsables de la formation de structures secondaires. Certains acides aminés présentent des caractéristiques hydrophiles et d'autres hydrophobes, certains sont chargés électriquement. Ces différentes propriétés font que certains acides aminés sont positionnés au centre des protéines (poches hydrophobes) alors que d'autres se trouveront en surface, exposés aux molécules d'eau du milieu environnant. Des interactions électrostatiques entre deux acides aminés chargés de manière opposée contribuent aussi au repliement des protéines. Une protéine peut être dénaturée, c'est-à-dire voir certains de ses domaines dépliés, sous l'effet d'agents dénaturants ou d'une augmentation de température. Afin de tester la robustesse de nos protéines vis-à-vis de l'augmentation de la température, nous avons testé d'éventuels changements de conformation à différentes températures par

dichroïsme circulaire par radiation de synchrotron (SRCD). Cette technique permet d'analyser la composition en structures secondaires (hélices alpha et feuillets bêta) en mesurant l'absorption optique propre à ces structures de certains rayonnements bien précis (Wallace and Janes 2001). En effet, les acides aminés sont des composés chiraux (sans symétrie miroir intrinsèque), et cette chiralité fait qu'ils sont optiquement actifs : ils absorbent la lumière différemment selon la polarisation de l'onde lumineuse qui les traverse. Il en va alors de même pour les structures secondaires : par exemple les hélices alpha absorbent les ondes de longueur d'onde 192 nm, et polarisées elliptiques gauches, et les ondes de 208 nm de longueur d'onde polarisées elliptiques droites spécifiquement. Les feuillets bêta absorbent quant à eux des ondes elliptiques droites de 198 nm. Pour produire ces ondes très particulières, le rayonnement incident, généré par un synchrotron, est dans un premier temps filtré à l'aide de miroirs afin de ne laisser passer uniquement les composantes de longueur d'onde comprise entre 170 et 260 nm. Puis les ondes transmises sont polarisées elliptiquement à l'aide d'un quartz piézoélectrique de façon à générer des ondes elliptiques gauche et droite. Enfin, les spectres d'absorption des ondes gauche et droite par la solution de protéines testée seront comparés dans le but de calculer, sur cette gamme de longueurs d'onde, l'absorption différentielle des ondes gauche et droite $\Delta A = A_{\text{gauche}} - A_{\text{droite}}$. L'analyse de ce spectre différentiel, et en particulier au voisinage des longueurs d'ondes particulières 192, 198 et 208nm, permet de remonter à la composition de l'échantillon de protéines en hélices alpha et feuillets bêta (Wallace and Janes 2001). Lorsqu'une protéine est dénaturée, ses structures secondaires disparaissent, et elle perd donc toute propriété d'absorbance des ondes polarisées aux longueurs d'onde précédemment spécifiées. En revanche, elle acquiert une forte absorbance à 220 nm (quelle que soit la polarisation), caractéristique des régions non structurées.

Les expériences SRCD ont été réalisées en collaboration avec le Dr Frank Wien (Chercheur sur la ligne de lumière DISCO du Synchrotron SOLEIL). Nous avons contrôlé et modifié la température en utilisant un thermostat à effet Peltier couplé à l'appareil de mesure de dichroïsme circulaire, ce qui a permis de chauffer les échantillons petit à petit afin d'obtenir une visualisation progressive de la dénaturation des protéines. Plus précisément, nous avons réalisé trois

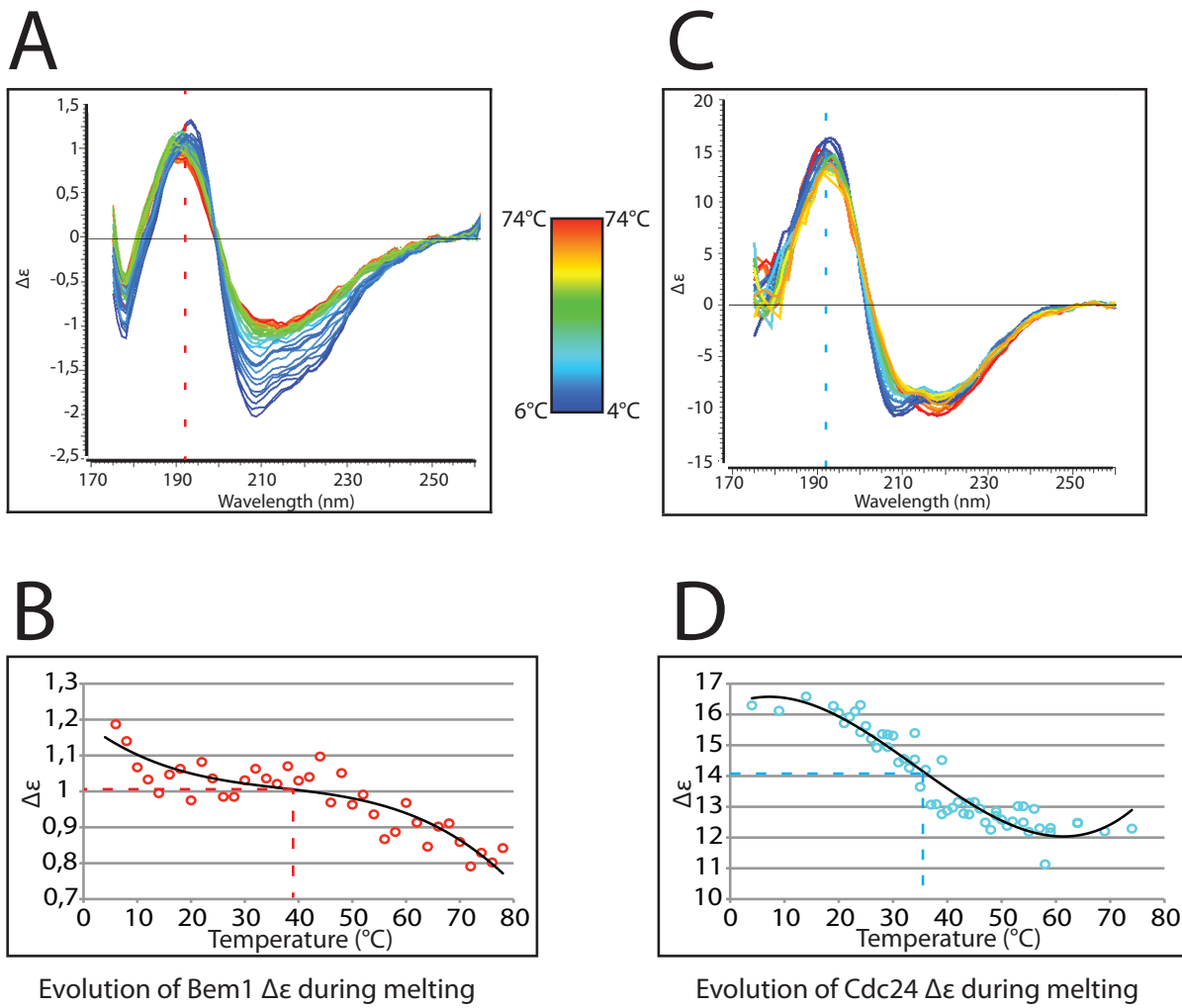


Figure I-5. The Cdc24 and Bem1 proteins are denatured upon temperature increase.

(A) and (C) Synchrotron Radiation Circular Dichroism measurements of full length Bem1 and Cdc24. Measurements were done from 175 to 260 nm in triplicate.

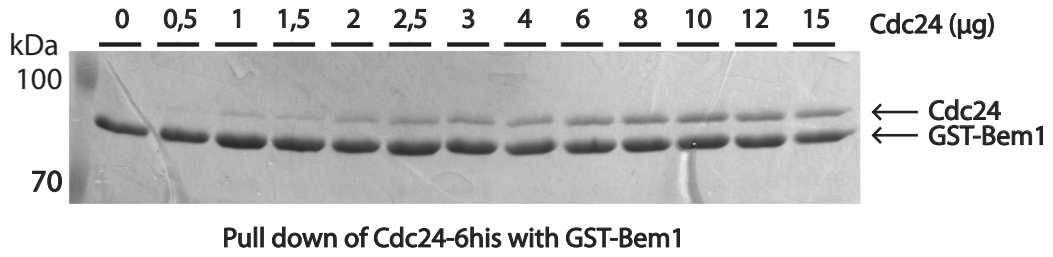
(B) and (D) The $\Delta\epsilon$ measured at 192 nm were plotted as a function of temperature for each protein. On each plot, the dashed line indicates the melting temperature for Bem1 and Cdc24, respectively.

mesures successives à chaque température, afin de limiter les incertitudes sur le résultat en réalisant une moyenne de ces mesures. Pour Cdc24, la température a été incrémentée par paliers de 5°C de 4 à 19°C, puis par paliers d'1°C jusqu'à 59°C pour finir par trois paliers de 5°C pour atteindre 74°C. Pour Bem1 la température a été incrémentée par paliers de 2°C de 6°C à 74°C. Les données ont par la suite été traitées en utilisant le logiciel CDtool (Lees, Smith et al. 2004). Les spectres moyens obtenus sont présentés dans la Figure I-5 pour Bem1 et Cdc24 (Panel A et panel C) respectivement. Ils sont représentés du bleu foncé au rouge en fonction de l'augmentation de température. A mesure que la température augmente, nous pouvons constater une diminution de l'absorbance aux longueurs d'onde 192 nm et 208 nm (caractéristique des hélices alpha) pour chacune de ces protéines, ainsi qu'une augmentation de l'absorbance à 220 nm qui est un signe de dénaturation. L'analyse de la décroissance des signaux à 192 nm en fonction de la température a révélé des courbes de dénaturation de forme sigmoïde, caractéristique d'une dénaturation « normale » (Figures I-5B et I-5D). En dessous d'une température critique dite « température de fusion », T_m , l'absorption ne varie pratiquement pas en fonction de la température : la protéine est stable. Autour de cette température, elle diminue brutalement avant de se stabiliser au-delà de T_m , où la protéine est complètement dénaturée. Nos mesures nous ont permis d'extraire T_m pour Bem1 (38°C) et Cdc24 (35°C).

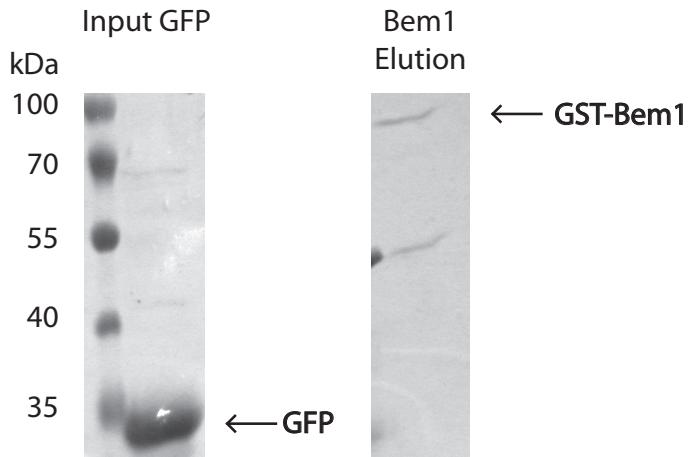
La différence notable dans les spectres SRCD de Bem1 et Cdc24 à basse et haute température indique qu'en dessous de leurs températures de fusion respectives, les deux protéines recombinantes sont repliées comme en atteste la présence de structures secondaires observables par leur absorbance à 192 et 208 nm. Cependant, ces expériences ne permettent pas de savoir si le repliement est exactement conforme à celui rencontré *in vivo*, et en particulier si les protéines obtenues sont fonctionnelles et peuvent interagir physiquement. Nous avons alors procédé à des tests d'interaction afin de savoir si les protéines produites pouvaient se lier.

- e. Les protéines recombinantes Cdc24 et Bem1 peuvent-elles interagir ensemble?

A



B



C

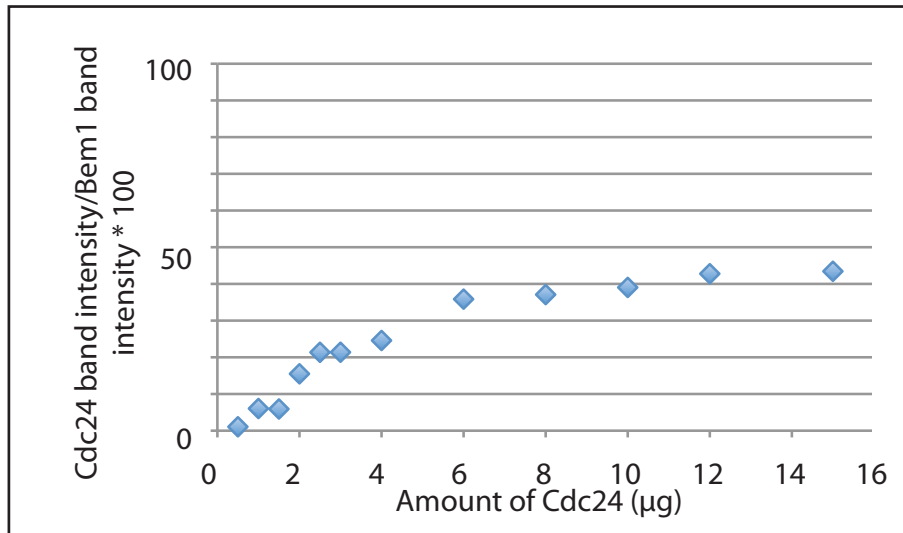


Figure I-6. Recombinant Bem1 and Cdc24 interact.

(A) Cdc24 is pulled down with GST-Bem1. The protein was resolved by 9% SDS-PAGE and stained with Coomassie.

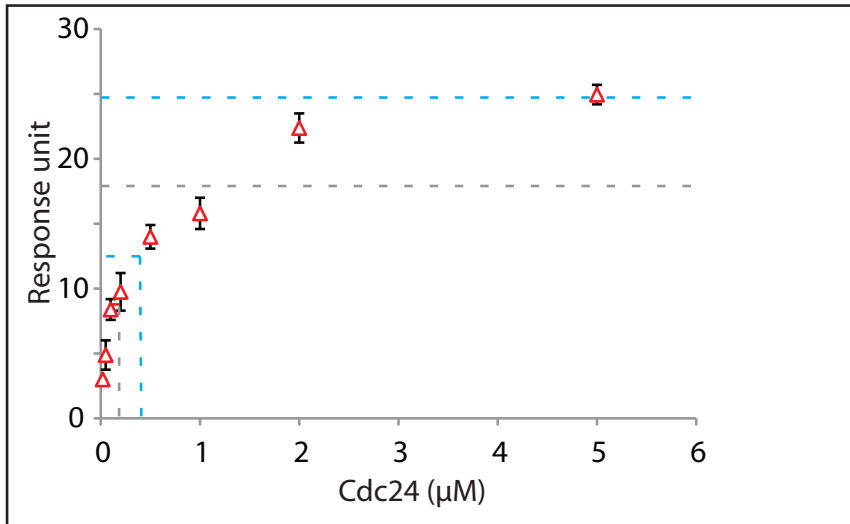
(B) Coomassie staining after a 11% acrylamide SDS-PAGE showing GFP control for pull-down.

(C) Quantification of the pull down shown in A.

Les protéines Cdc24 et Bem1 sont connues pour interagir ensemble notamment lors du maintien de la polarité cellulaire (Matsui, Matsui et al. 1996; Gulli, Jaquenoud et al. 2000; Bose, Irazoqui et al. 2001; Ito, Matsui et al. 2001; Butty, Perrinjaquet et al. 2002; Ogura, Tandai et al. 2009; Fujimura-Kamada, Hirai et al. 2012). Cette interaction est médiée par la formation, sous l'influence d'interactions ioniques et d'interactions hydrophobes, d'un hétérodimère entre les domaines PB1 de chaque protéine. Nous avons donc voulu déterminer si nos protéines recombinantes présentaient cette propriété. Pour cela nous avons dans un premier temps réalisé des expériences de pull down. Pour ce faire, nous avons injecté Cdc24 dans des colonnes contenant des billes d'agarose recouvertes de glutathion, préalablement incubées avec la protéine GST-Bem1. L'interaction forte entre le glutathion et l'étiquette GST permet à Bem1 d'être retenue sur les billes, et en cas d'interaction avec Cdc24 l'analyse de la fraction retenue par la colonne doit révéler une quantité significative de cette protéine (panel A de la Figure I-6). Nous avons contrôlé l'interaction de la GFP avec Bem1 et de Cdc24 sur les billes non chargées par Bem1 (panel B de la Figure I-6). Ces deux contrôles ont validé le résultat observé sur le panel A. En effet la GFP n'interagissait pas avec Bem1 et Cdc24 n'interagissait pas avec les billes sans Bem1. La quantification de l'interaction de Cdc24 retenue par Bem1 a été réalisée avec le logiciel ImageJ (panel C de la Figure I-6). Nous pouvons constater que l'intensité de Cdc24 augmente avec la quantité ajoutée aux billes jusqu'à tendre vers un plateau pour les quantités les plus élevées. Ce plateau montre un pourcentage d'environ 50% de signal de Cdc24 en fonction de Bem1. Nous n'avons cependant pas pu déterminer pourquoi ce plateau n'était pas plus élevé. Cela pourrait être expliqué, par exemple, par un trop grand nombre de lavage ou par une trop forte concentration en NaCl dans le tampon de lavage. En effet, l'interaction de l'hétérodimère des domaines PB1 est notamment dépendant d'interaction ionique, et donc affecté par la salinité des tampons. Cependant l'interaction entre les deux protéines semble dépendante de la quantité de Cdc24 en présence.

Afin de confirmer les résultats de ce pull down nous avons réalisé des mesures de l'interaction de ce complexe en utilisant la résonance plasmonique de surface. Les mesures réalisées après couplage de Bem1 sur les puces, ont été

A



B

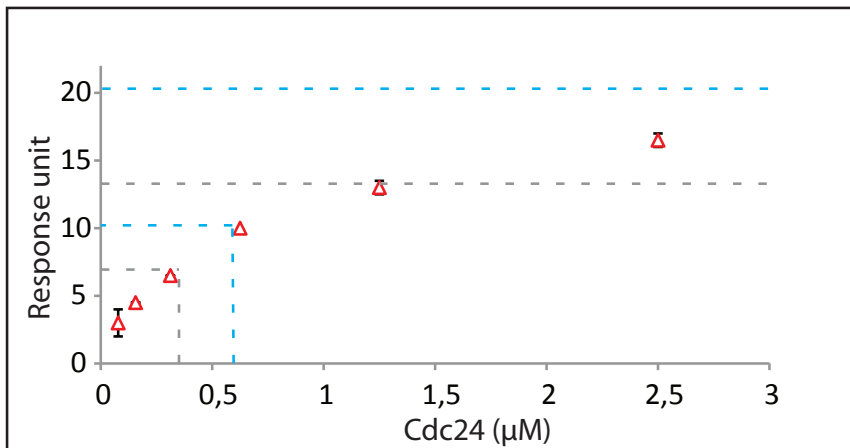


Figure I-7. The K_D of the Cdc24/Bem1 complex is sub micromolar.

The experiments were carried out on Biacore3000 using a CM5 sensor chip.

Bem1 was covalently bound to the sensor chip and an increasing concentration of Cdc24 was injected to test the interaction. The different concentrations were tested three times. Graphs A and B show the response units over Cdc24 concentration injected at equilibrium. For the experiment shown in A, the injected concentration of Cdc24 was 5µM, 2µM, 1µM, 0,5µM, 0,2µM, 0,1µM, 50nM and 20nM. For the experiment shown in B the concentration was 2,5µM, 1,25µM, 0,625µM, 312nM, 156nM and 78nM.

Each curve can be fitted with two different models:

$$y = B_{max} \cdot [Cdc24] / (K_D + [Cdc24]),$$

where B_{max} is the maximal binding of Cdc24 and K_D is the equilibrium dissociation constant, and

$$y' = B_{max} \cdot [Cdc24] / (K_D + [Cdc24]) + NS \cdot [Cdc24].$$

This last model incorporates non specific binding of Cdc24 to the sensor chip (NS), which was apparent at high Cdc24 concentrations.

For the graph shown in A, where the fitting was done using the first equation (cyan), the B_{max} is 24,717 Ru and the K_D is 0,306µM. With the second equation (grey) the B_{max} is 17,689, the K_D is 0,142µM and the NS is 1,68.

For the graph shown in B, where the fitting was done using the first equation (cyan), the B_{max} is 20,015 Ru and the K_D is 0,605µM. With the second equation (grey) the B_{max} is 13,426, the K_D is 0,349µM and the NS is 1,90.

faites avec la protéine Cdc24 diluée dans un tampon 20 mM Tris pH7.5 et 150 mM NaCl. Nous avons dans un premier temps constaté que la mesure des taux de formation et de dissociation du complexe Bem1/Cdc24 était hors de portée de nos expériences. En effet, la liaison et dissociation des protéines est trop rapide pour être détectée par le dispositif. Nous avons alors décidé de mesurer la constante de dissociation à l'équilibre. Pour ce faire, nous avons injecté Cdc24 à différentes concentrations et mesuré les changements de réponse unit (RU). En l'absence de Cdc24, la réponse du système doit être nulle, et doit plafonner en présence d'un très large excès de Cdc24 par rapport à Bem1. Afin de contrôler ce système la protéine Cdc24 a été injectée sur deux pistes en parallèle, une seule d'entre elles présentait la protéine Bem1. Les réponses mesurées sont ensuite soustraites afin de mesurer la composante spécifique à l'interaction Bem1/Cdc24. La courbe représentant le RU en fonction de la concentration en Cdc24 permet en principe de remonter à la constante de dissociation du complexe à l'équilibre. Les données obtenues sont reportées graphiquement sur la Figure I-7. Les graphiques A et B représentent deux expériences indépendantes. En présence de la seule fixation spécifique de Cdc24 sur Bem1, le RU devrait vérifier $RU = RU_{max} * [Cdc24] / (K_D + [Cdc24])$, où K_D est la constante de dissociation à l'équilibre recherchée, et ainsi saturer vers un plateau aux fortes concentrations en Cdc24. En faisant correspondre nos données à cette formule, nous avons pu extraire $K_D = 306$ nM et 605 nM respectivement pour les expériences présentées en A et B, avec un $RU_{max} = 24,717$ RU et $20,015$ RU. Cependant nous avons constaté que, bien que montrant une pente réduite aux fortes concentrations, les réponses mesurées ne saturaient toutefois pas. L'augmentation de la réponse semble linéaire pour les concentrations les plus élevées suggérant la contribution d'une fixation aspécifique de Cdc24, indépendante de Bem1. En tenant compte de cette contribution aspécifique et en faisant ainsi correspondre nos données à $RU = RU_{max} * [Cdc24] / (K_D + [Cdc24]) + NS * [Cdc24]$, les K_D mesurées furent 142 nM et 349 nM avec un RU_{max} à $17,689$ RU et $13,426$ RU pour A et B respectivement. Nous avons donc pu quantifier les K_D à l'équilibre du complexe Cdc24/Bem1 formé des protéines recombinantes purifiées au laboratoire (Figure I-7). Ces K_D sont plus faibles que les concentrations intracellulaires des protéines Bem1 et

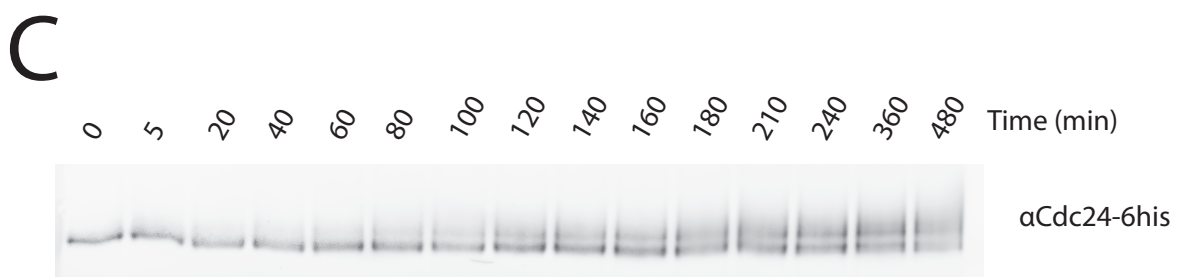
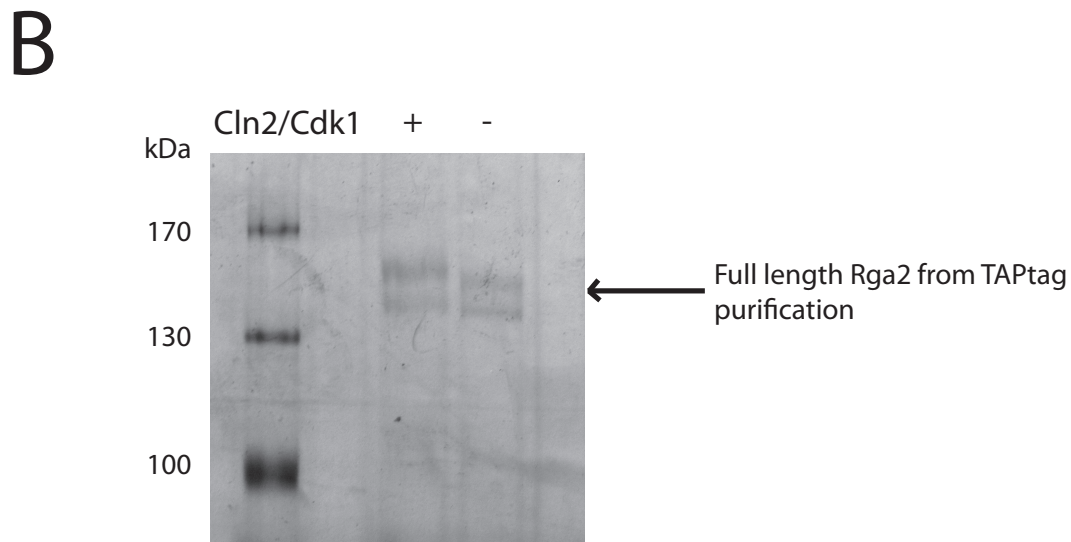
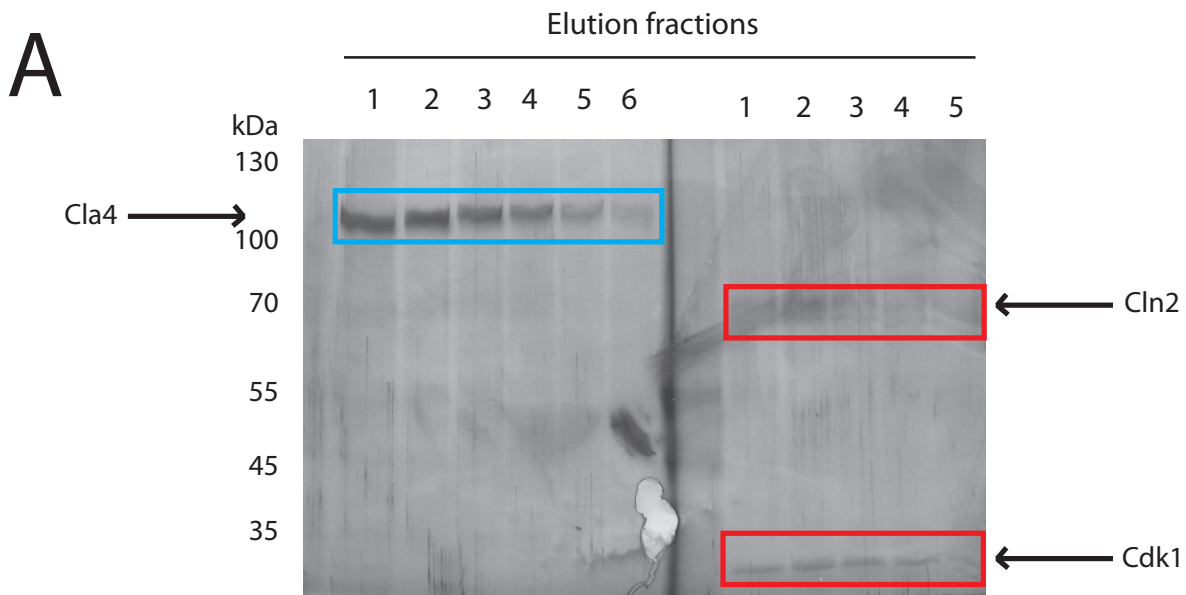


Figure I-8 Purification of active Cla4 and Cln2/Cdk1 kinases using TAPtag.

(A) Cla4 and Cln2/Cdk1 elutions after TAPtag purification were visualized by silver stain after 9% SDS-PAGE. Cla4 kinase and Cln2/Cdk1 were purified using IgG sepharose beads and calmodulin sepharose.

(B) Silver staining of a 9% SDS-PAGE of full length Rga2-TAP protein phosphorylated by Cln2/Cdk1 after incubation for 2 hours at 30°C.

(C) Western blot of a time course phosphorylation of full length Cdc24-6his by Cla4 kinase.

Cdc24 (environ 200 et 33 nM respectivement). Cependant ces protéines présentent une localisation polarisée donc confinée dans des espaces plus restreints que la totalité du volume cellulaire. Ces K_D sont donc tout à fait réalistes et pourraient même être un moyen pour la cellule de voir ces deux protéines interagir uniquement lorsqu'elles ont des localisations polarisées et éviter ainsi tout signal d'activation aspécifique. Cependant ces expériences ne nous ont pas permis de déterminer la stœchiométrie du complexe Cdc24/Bem1. Pour cela, il serait donc judicieux que des expériences de chromatographie d'exclusion stérique soient réalisées afin de déterminer s'il s'agit de complexes uniquement dimériques.

B) Production des kinases Cla4 et Cln2/Cdk1 en vue des tests enzymologiques?

Dans l'optique d'étudier l'effet de la phosphorylation de Cdc24 par les kinases Cla4 et Cln2/Cdk1 sur son rôle dans la polarité, nous avons dû produire ces kinases en les surexprimant dans la levure afin de les purifier.

Les purifications ont été réalisées comme décrit dans la section Matériel et Méthode. Le produit des purifications des kinases Cla4 et Cln2 est présenté sur le panel A de la Figure I-8. Plusieurs constatations nous permettent de penser que la protéine copurifiée avec Cln2-TAP est la kinase Cdk1. Cette bande n'est présente que dans la purification de Cln2 donc il s'agit d'une protéine qui interagit avec la cycline. La taille de cette protéine est d'environ 34 kDa comme Cdk1. Nous avons par la suite réalisé différents essais de phosphorylation pour tester l'activité kinase des éluions de ces purifications. Le panel B de la Figure I-8 montre par exemple un gel coloré au nitrate d'argent où un échantillon de protéine Rga2, purifiée par TAP tag, a été chargé. Nous pouvons constater que la fraction de Rga2 mise en présence de Cln2/Cdk1 (panel A de la figure I-8) présente un retard dans la migration, témoin d'une phosphorylation de la protéine. Le panel C de la Figure I-8 montre quant à lui un western blot présentant une phosphorylation au cours du temps de la protéine Cdc24-6his par la kinase Cla4. Ainsi les purifications de ces deux kinases se sont révélées concluantes, celles-ci pouvant phosphoryler certains de leur substrats connus, Rga2 et Cdc24 (panel B et C de la Figure I-8).

Nous avons donc été en mesure de produire de grandes quantités de protéines Bem1 et Cdc24. Ces protéines ont été caractérisées comme solubles et stables après avoir optimisé les conditions de purification et de stockage. Nous avons aussi pu mettre en évidence que ces protéines présentaient des caractéristiques spécifiques de protéines structurées comme en atteste les expériences de SRCD mais aussi les expériences d'interaction réalisées sur ces protéines recombinantes. Du point de vu interactionnel les valeurs obtenues sont de l'ordre de 150 à 300nM pour la constante de dissociation à l'équilibre. Cela semble en accord avec les résultats obtenus par d'autres équipes (Ogura, Tandai et al. 2009). Nous avons aussi pu produire les kinases Cla4 et Cln2/Cdk1 sous formes actives nous permettant de tester la régulation de la phosphorylation de Cdc24.

Chapitre 2: Etude *in vitro* de l'effet du module GTPase sur la phosphorylation de Cdc24 et ses conséquences.

La protéine Cdc24 est une protéine multiphosphorylée directement par les kinases Cla4 et Cln2/Cdk1. Le niveau de phosphorylation de Cdc24 est dynamique au cours du cycle cellulaire et présente son niveau maximal en phase G1/S (Gulli, Jaquenoud et al. 2000; Bose, Irazoqui et al. 2001; Moffat and Andrews 2004; McCusker, Denison et al. 2007; Wai, Gerber et al. 2009). Cet état maximal correspond au moment où la cellule se polarise et maintient cet axe de polarité afin de générer le bourgeon, la future cellule fille. La mise en place et le maintien de la polarisation cellulaire requièrent notamment le substrat de Cdc24, la GTPase Cdc42. Bien que certains sites de phosphorylation de Cdc24 soient connus, leur(s) rôle(s) dans l'établissement de la polarité est mal compris actuellement. Certains travaux n'ont pu mettre en évidence aucun phénotype chez des levures dont les sites phosphorylables de Cdc24 sont mutés (Wai, Gerber et al. 2009), alors que d'autres suggèrent que la phosphorylation de Cdc24 est nécessaire à l'arrêt de la croissance polarisée (Gulli, Jaquenoud et al. 2000). En effet, des mutants pour la kinase Cla4 et la GTPase Cdc42 ont présenté des phénotypes de bourgeons hyper allongés indiquant une mauvaise signalisation de l'arrêt de la croissance apicale. Dans cette étude, le rôle de Cdc24 dans l'arrêt de la croissance polarisée est attribué à une forte diminution, lorsqu'elle est phosphorylée, de son interaction avec la protéine Bem1. La dissociation des complexes Bem1 Cdc24 mettrait alors un terme au signal d'autoactivation de Cdc42. Cependant les résultats de ces expériences d'immunoprécipitation sont contradictoires avec les travaux de Bose *et al.*, qui ne montrent pas de différence d'affinité avec Bem1 en fonction du niveau de phosphorylation (Bose, Irazoqui et al. 2001). De plus en l'absence de la protéine Bem1, Cdc24 ne présente qu'une très faible phosphorylation *in vivo*. Nous avons donc décidé de clarifier les mécanismes contrôlant la phosphorylation de Cdc24. Par exemple, quel est le rôle de la protéine Bem1 dans la phosphorylation de Cdc24 par Cla4 ? Comment Cdc42 affecte-elle cette réaction ? Quel est l'effet de la phosphorylation de Cdc24 sur son interaction avec Bem1 ? Nous avons tenté de répondre à ces différentes questions en utilisant une approche minimaliste *in vitro*. Pour ce faire nous avons utilisé les protéines recombinantes générées lors de mes travaux.

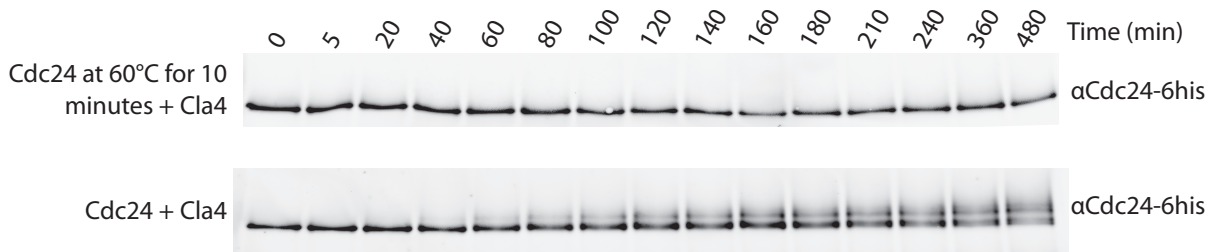


Figure II-1. Phosphorylation of Cdc24 by Cla4 is eliminated when Cdc24 is pre-incubated at 60°C, suggesting that phosphorylation requires Cdc24 tertiary structure.

Western blot against Cdc24 showing its phosphorylation state.

In the top panel, Cdc24 (100 nM) was incubated at 60°C for 10 minutes and incubated with Cla4 kinase (500 pM estimated). In the bottom panel, Cdc24 (100 nM) was not heated to 60°C. The samples were removed at the indicated times after initiating the kinase assay. Phosphorylation was visualised as an electrophoretic mobility shift.

A) La phosphorylation de Cdc24 par Cla4 requiert elle un repliement correct de Cdc24?

La phosphorylation des protéines est un évènement réversible. Cette modification post-traductionnelle vise à ajouter un groupement phosphate (PO_4^{3-}) sur des résidus spécifiques (Sérine/Thréonine ou Tyrosine). L'ajout de ce groupement peut avoir des effets différents sur les substrats comme par exemple des changements d'activité, de localisation, d'interaction ou encore de signalisation (Cohen 2000). Afin de catalyser l'insertion du groupement phosphate uniquement sur certains résidus de certaines protéines, les kinases sont capables de reconnaître des motifs spécifiques d'acides aminés. Ces motifs, du fait de leur séquence primaire et des propriétés des acides aminés, adoptent des conformations spécifiques qui seront reconnues par la kinase (Ubersax and Ferrell 2007).

Nous avons dans un premier temps voulu tester si la protéine Cdc24 produite au laboratoire présentait les structures secondaires spécifiques permettant sa phosphorylation par Cla4. Nous avons voulu savoir si la dénaturation de Cdc24 engendrait un blocage de la phosphorylation par Cla4. Ce résultat suggèrerait la présence de domaines structurés dans la protéine produite à partir de bactérie. Cela nous amènerait à cette conclusion car les sites de phosphorylation sont répartis sur la protéine (McCusker, Denison et al. 2007; Wai, Gerber et al. 2009). Cela suggèrerait aussi que Cla4 requiert la reconnaissance de séquences structurées sur Cdc24 pour sa signalisation. Dans cette optique, nous avons comparé la phosphorylation par Cla4 de deux échantillons de Cdc24. Le premier échantillon a été porté au préalable à 60°C afin de dénaturer Cdc24. La perte des structures secondaires à cette température a été confirmée par les expériences de SRCD (Figure I-6). Le second échantillon n'a pas été dénaturé. Pour réaliser les expériences de phosphorylation *in vitro*, la protéine a été diluée à une concentration de 10 nmol/L dans un mélange réactionnel (50 mM Hepes, 2 mM MgCl_2 , 0,05% Tween-20, 1 mM DTT, 10% glycerol et 1mM ATP) contenant la kinase Cla4. Nous avons constaté que la réaction de phosphorylation avait lieu uniquement sur la protéine non dénaturée (Figure II-1). Ce résultat suggère que les motifs de phosphorylation par Cla4 sont correctement structurés dans la protéine recombinante que nous avons

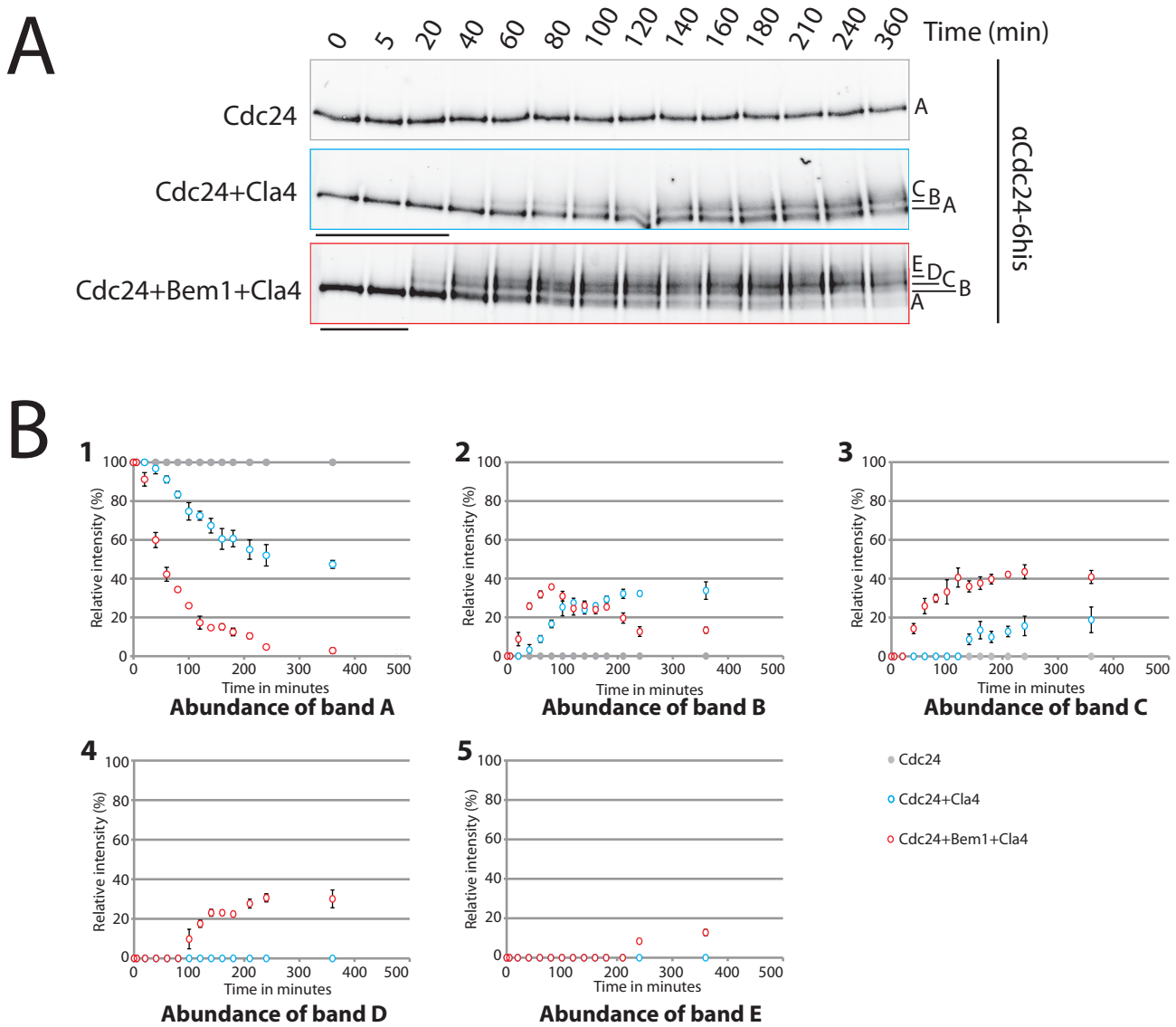


Figure II-2. Cdc24 phosphorylation by Cla4 is increased in a scaffold-dependent manner.

(A) Western blot against Cdc24 showing its phosphorylation state. Western blot with an anti-6*his antibody from mouse targeting Cdc24-6his. The secondary used is a anti-mouse coupled with alexa532. The blots were scanned using a Typhoon Trio+ scanner. The samples were removed at the indicated times after initiating the kinase assay. Cdc24 (100 nM) phosphorylation by Cla4 (500 pM estimated) in presence or not of Bem1 (100 nM), was visualised as an electrophoretic mobility shift.

(B) Quantification of different Cdc24 phospho-forms observed from the experiment shown in panel A. The fluorescence signals were quantified and the percentage of form A, B, C, D and E are shown in graphs 1, 2, 3, 4 and 5, respectively. Error bars indicate the standard error observed among 3 different experiments.

produite, et semblent confirmer que la phosphorylation de Cdc24 par Cla4 est dépendante d'un repliement correct des motifs de phosphorylation. Par ailleurs, différents travaux ont montré des sites de phosphorylation situés dans différentes parties de la protéine (McCusker, Denison et al. 2007; Wai, Gerber et al. 2009). Pour conclure, les résultats que nous avons obtenus en SRCD, les données interactionnelles et le résultat de cette expérience nous permettent de penser que la protéine Cdc24 recombinante contient des domaines structurés requis pour des interactions et la régulation de Cdc24.

B) La protéine Bem1 a-t-elle un effet sur la phosphorylation de Cdc24 par Cla4?

La phosphorylation de Cdc24 *in vivo* repose sur la présence de Bem1, Cla4 et Cdc42 (Gulli, Jaquenoud et al. 2000). Cependant, l'expérience réalisée précédemment a montré que la kinase Cla4 seule est capable de phosphoryler Cdc24 *in vitro*. Il est connu que Bem1 est nécessaire au maintien de Cdc24 à l'extrémité du bourgeon, et donc à sa colocalisation avec la kinase et la GTPase (Butty, Perrinjaquet et al. 2002; Wedlich-Soldner, Wai et al. 2004). Par ailleurs, la protéine Bem1 interagit avec la kinase Cla4, et cette fonction semble être primordiale dans la mise en place de la polarité cellulaire (Kozubowski, Saito et al. 2008). Comment Bem1 contribue t'elle à la phosphorylation de Cdc24 par Cla4? Bem1 est elle utile uniquement pour permettre la colocalisation de l'enzyme et son substrat ou joue t'elle un rôle central dans cette phosphorylation? Pour tester cela nous avons donc reproduit la réaction de phosphorylation de Cdc24 par Cla4 en présence de Bem1, avec pour objectif de comparer les vitesses de phosphorylation dans les deux situations.

Pour cela, la protéine Bem1 a été ajoutée au mélange réactionnel dans la même concentration que Cdc24 (100 nM). Nous avons donc réalisé une réaction de phosphorylation par Cla4 (500 pM) durant laquelle nous avons arrêté la réaction à différents temps. Après avoir réalisé des électrophorèses SDS-PAGE suivi de western-blot pour suivre la vitesse de phosphorylation de Cdc24, les signaux des différentes formes phosphorylées ont été quantifiés. Afin d'avoir une certaine robustesse dans les quantifications des réactions réalisées, l'expérience a été faite en triplicat. Nous avons observé que, d'une part, en présence de Bem1

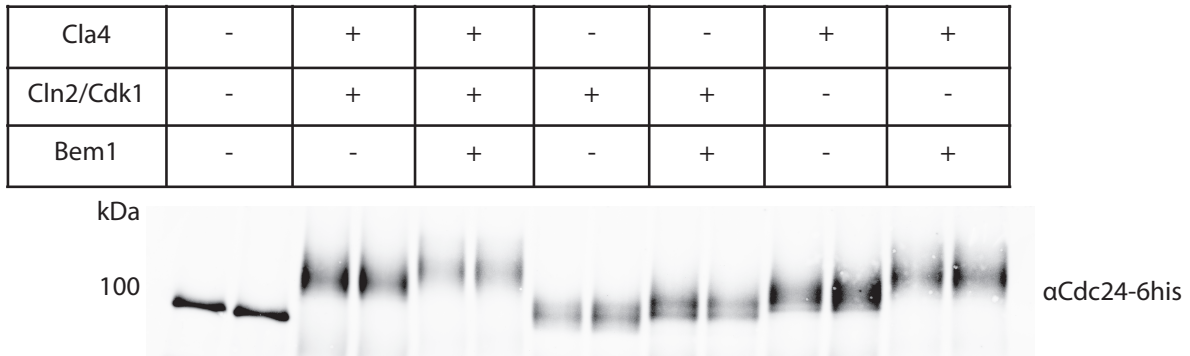


Figure II-3. Maximum Cdc24 phosphorylation level are higher when reactions are done in the presence of Bem1.

Cdc24 was phosphorylated by Clb4 and/or Cln2/Cdk1 in presence or absence of Bem1. Western blot with a anti-6*his antibody from mouse targetting Cdc24-6his. The secondary used is a anti-mouse coupled with alexa532. The blots were scanned using a Typhoon Trio+ scanner. Phosphorylation is visualised as an electrophoretic mobility shift.

la réaction de phosphorylation était fortement accélérée (Figure II-2). D'autre part, en l'absence de Bem1 seulement deux bandes correspondant à des formes phosphorylées de Cdc24 ont pu être observées (bandes B et C montrées sur le western blot α Cdc24-6his) contre quatre en présence de la protéine d'échafaudage (bandes B, C, D et E sur le western blot α Cdc24-6his). À titre de comparaison, les bandes B et C furent observables après 20 minutes de réaction en présence de Bem1 alors qu'elles furent observables après 40 et 140 minutes respectivement en son absence.

Nous avons aussi constaté que l'apparition des formes phosphorylées (disparition de la forme non phosphorylée A) n'était pas immédiate et semblait nécessiter un temps d'activation, que ce soit en présence ou en l'absence de Bem1 (les temps montrant ce délai sont soulignés dans la Figure). Ce genre de délai semble peu commun, en effet ce type de procédure expérimentale a déjà été utilisé dans la littérature et les réactions ne montraient pas ce temps de latence (Bouchoux and Uhlmann 2011; Harvey, Enciso et al. 2011). Cette expérience a donc montré que Bem1 augmente la vitesse de phosphorylation de Cdc24 par Cla4, mais le mécanisme sous-jacent n'est pas encore clair. Bem1 accélère t'elle les vitesses de phosphorylation de Cdc24 par Cla4 ou permet t'elle d'atteindre des niveaux supérieurs de phosphorylation ? Bem1 pourrait tout simplement augmenter les concentrations locales de la kinase pour son substrat en interagissant avec les deux. Bem1 pourrait aussi augmenter l'activité catalytique de Cla4 lors de leur interaction, mais pourrait aussi favoriser l'accessibilité de Cdc24 en induisant des changements conformationnels sur celle-ci. Cette expérience ne permet pas de distinguer ces deux possibilités.

C) Les réactions contenant Bem1 atteignent-elles des états de phosphorylation supérieurs ?

La levée d'une autoinhibition par le biais d'un changement conformationnel semble être un mécanisme couramment utilisé par lequel la transduction de signaux est relayée au cytosquelette. De nombreux exemples de protéines GEFs ou de kinases PAK ont été décrits comme existant sous différentes conformations structurales (Aghazadeh, Lowry et al. 2000; Kim, Kakalis et al. 2000; Lei, Lu et al. 2000; Parrini, Lei et al. 2002; Lei, Robinson et al. 2005; Yu,

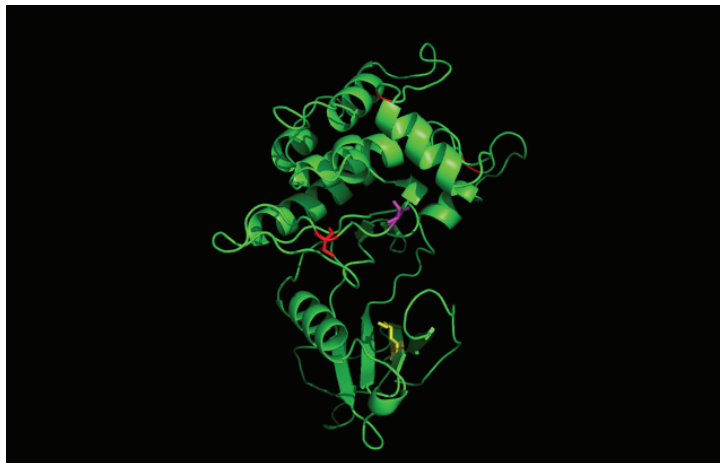
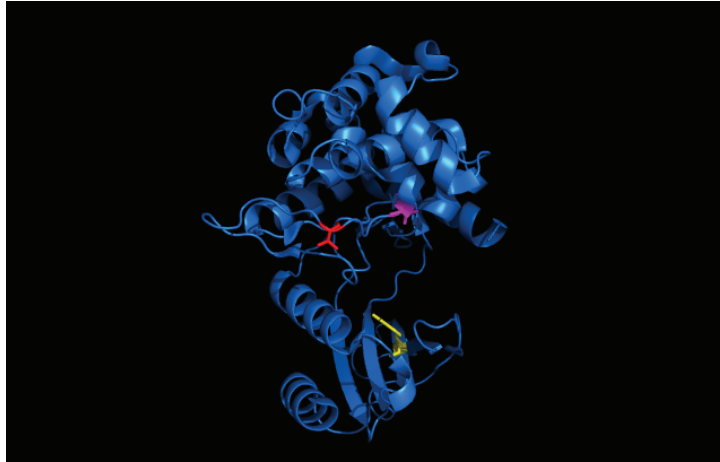


Figure II-4. Model of Cla4 structure shows conservation with Pak1 structure.

(A) Pak1 kinase domain structure has been solved by Lei *et al.*, Structure.

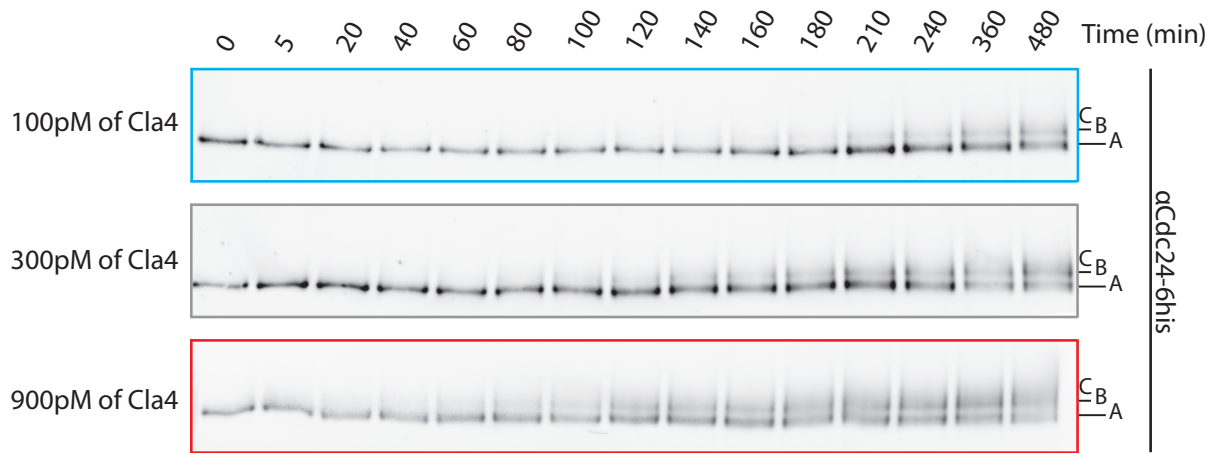
(B) Cla4 kinase domain modelisation shows conservation of the Pak1 autophosphorylation site (Red), catalytic residue (yellow), and a Cdk minimal consensus site (purple).

Martins et al. 2010). Il a été postulé que Cdc24 peut exister sous différentes conformations, une ouverte lorsqu'elle interagit avec Bem1 et une fermée (Shimada, Wiget et al. 2004). Lors de l'expérience précédente, nous avons observé qu'en présence de Bem1 les niveaux de phosphorylation de Cdc24 semblaient plus nombreux. Cela suggère ainsi une accessibilité de certains résidus phosphorylables par Cla4, uniquement lorsque Cdc24 interagit avec Bem1. Pour valider cette hypothèse, il faudrait pouvoir comparer les niveaux de phosphorylation maximaux obtenus en présence et en l'absence de Bem1. Ceci demande de pouvoir observer le résultat d'une réaction totale (plus aucun Cdc24 non phosphorylé). Ce n'est pas le cas lors de l'expérience présentée sur la Figure II-1. Ainsi des réactions de phosphorylation ont été réalisées afin d'aboutir à une phosphorylation totale de Cdc24 en présence ou non de Bem1.

Nous avons donc procédé à la phosphorylation complète de Cdc24 en utilisant un excès de Cla4. Nous avons arrêté les réactions après deux heures par ajout de tampon de charge et par ébullition des échantillons. Nous avons alors réalisé des gels SDS-PAGE à 9% suivis de western blot. Le résultat de ces expériences est présenté sur la Figure II-3. Contrairement aux expériences précédentes, nous pouvons observer que la forme non phosphorylée a complètement disparu, suggérant une réaction complète. Cette réaction est donc adaptée à la comparaison des niveaux maximum de phosphorylation accessibles en présence ou non de Bem1. Nous avons aussi voulu connaître l'effet de Cln2/Cdk1 sur ces niveaux de phosphorylation. En effet, *in vivo* les deux kinases phosphorylent Cdc24. Par ailleurs, de nombreux exemples de phosphorylation par le complexe Cycline/Cdk ont été mis en évidence comme des transitions abruptes dans le cycle. Nous avons donc incubé Cdc24 dans différentes conditions contenant les kinases séparées ou mélangées avec ou sans Bem1. Dans les trois conditions, nous avons observé une différence de retard dans la migration entre les échantillons contenant ou non Bem1, ce qui démontre que le niveau de phosphorylation de Cdc24 augmente en présence de Bem1, quelle que soit la kinase en présence.

Cette observation suggère que l'interaction entre Cdc24 et Bem1 induit des changements conformationnels sur la GEF permettant l'exposition de sites de

A



B

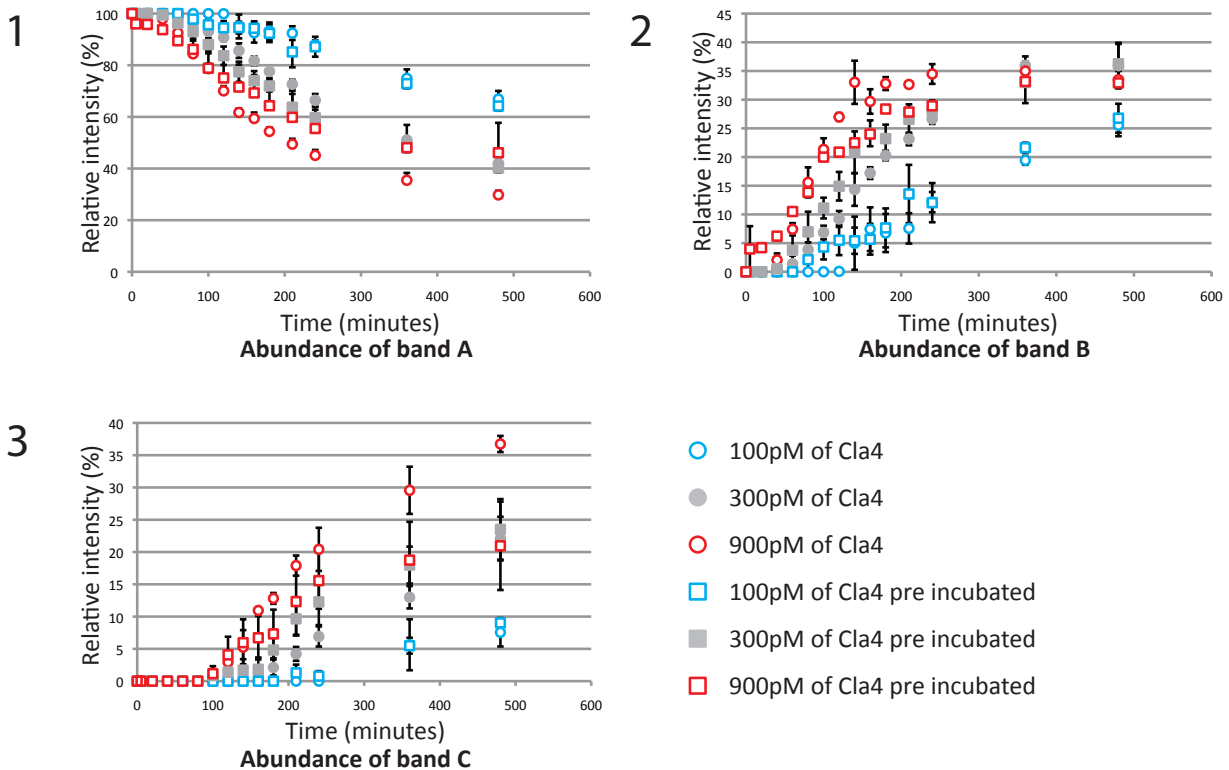


Figure II-5. Cdc24 phosphorylation kinetic depends on Cla4 concentration but Cla4 preincubation with ATP does not affect the kinetics.

(A) Western blot against Cdc24 showing its phosphorylation state. Western blot with a anti-6*his antibody from mouse targeting Cdc24-6his. The secondary used is a anti-mouse coupled with alexa532. The blot were scanned using a Typhoon Trio+ scanner. The samples were removed at the indicated times after initiating the kinase assay. Phosphorylation is visualised as an electrophoretic mobility shift. Cdc24 (100 nM) was phosphorylated by Cla4 kinase, which was added at different concentration (concentrations are estimated) to understand their effect on Cdc24 phosphorylation. Half of the kinase was incubated with ATP for 1 hour before the beginning of the reactions.

(B) Quantification of the different phosphorylated forms of Cdc24 observed in the experiment A. After scanning the total signals were quantified and the percentage of each Cdc24 form was calculated and plotted over time. Graph 1 shows the abundance of unphosphorylated Cdc24 in the different reactions overtime (form A). Graphs 2 and 3 show the abundance of phosphorylated forms B and C, respectively. Error bars indicate the standard error observed among 3 different experiments.

phosphorylation normalement inaccessibles aux enzymes Cla4 et Cln2/Cdk1. En présence de Bem1, Cdc24 atteint donc des états de phosphorylation supérieurs.

D) L'autoactivation de Cla4 est elle nécessaire à la phosphorylation de Cdc24?

Nous avons ensuite tenté de comprendre pourquoi l'apparition des formes phosphorylées (disparition de la forme non phosphorylée A) n'était pas immédiate, avec un taux de phosphorylation pratiquement nul aux temps courts. L'expérience présentée sur la Figure II-2 montre en effet un délai en début de réaction. Les premiers états phosphorylés apparaissent seulement après 20 minutes de réaction en présence de Bem1 et 40 minutes en son absence. L'hypothèse d'un manque de sensibilité lors de la quantification est à exclure car nous avons pu détecter des signaux très faibles (moins de 5% par exemple pour la première bande de phosphorylation en l'absence de Bem1). Un tel retard dans l'effet de la kinase Cla4 pourrait être le fait de la présence d'un mécanisme d'auto-activation chez Cla4. En effet, la kinase PAK1 (homologue de Cla4 chez les mammifères) possède un site d'autophosphorylation dans la boucle d'activation dans son domaine catalytique permettant l'activation complète de la kinase (Lei, Lu et al. 2000; Parrini, Lei et al. 2002). Après avoir réalisé une modélisation du domaine kinase de Cla4, nous avons constaté que ce site de phosphorylation pouvait présenter les mêmes caractéristiques spatiales que chez PAK1 (Lei, Robinson et al. 2005). Nous avons donc incubé la kinase seule en présence d'ATP avant de l'incorporer dans les réactions de phosphorylation de Cdc24. En effet il était possible que ce site activateur puisse être déphosphorylé par une phosphatase lors de l'expression ou la purification depuis la levure. La préincubation de la kinase avec de l'ATP avant de réaliser nos expérience de phosphorylation de Cdc24 aurait pu permettre à la kinase de s'autoactiver et donc de décroître ce temps de latence. Que ce soit en présence de Bem1 ou non (Figures II-5 et II-6), et pour différentes concentrations de kinase, nous n'avons pas constaté de différence notable dans le temps d'apparition des formes phosphorylées entre des conditions où Cla4 était incubée sur elle-même ou non (carré et rond dans les Figures). De même, ces temps de latence se sont avérés dépendre de la concentration en Cla4 dans le milieu réactionnel. Ces deux

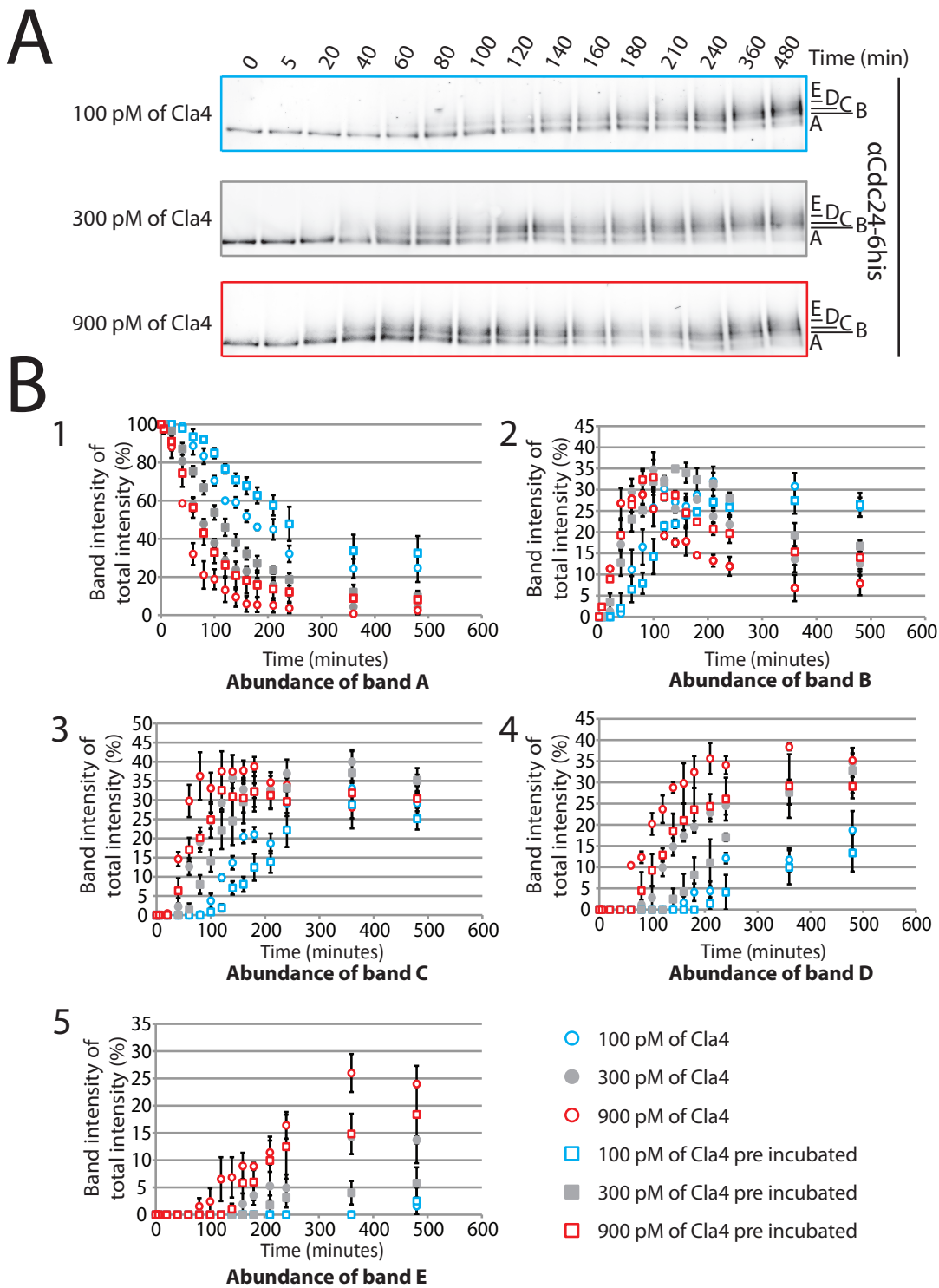


Figure II-6. Cdc24 phosphorylation kinetic by Cla4 is faster in presence of Bem1 and Cla4 preincubation with ATP does not affect the kinetics.

(A) Western blot against Cdc24 showing its phosphorylation state. Western blot with a anti-6*his antibody from mouse targeting Cdc24-6his. The secondary used is a anti-mouse coupled with alexa532. The blot were scanned using Typhoon Trio+ scanner. The samples were removed at the indicated times after initiating the kinase assay. Phosphorylation is visualised as an electrophoretic mobility shift. Cdc24 (100 nM) was phosphorylated by Cla4 kinase, which was added at different concentration (estimated) to understand its effect on Cdc24 phosphorylation in presence of Bem1 (100nM).

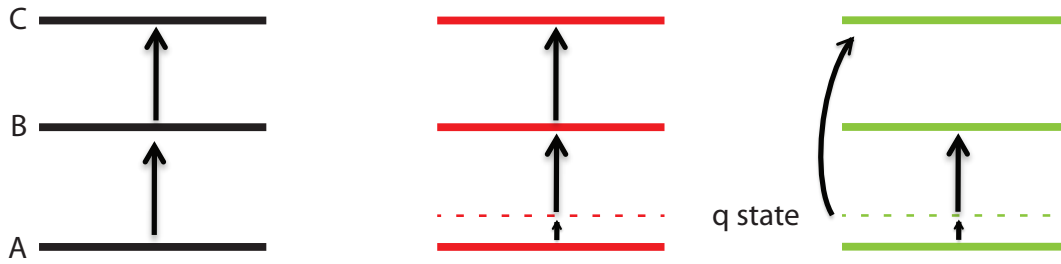
(B) Quantification of the different phosphorylated forms of Cdc24 observed in the experiment A. After scanning the total signals were quantified and the percentage of each Cdc24 phosphorylated forms were calculated and plotted over time. Graph 1 shows the abundance of unphosphorylated Cdc24 in the different reactions over time (form A). Graphs 2,3,4 and 5 show the abundance of the phosphorylated forms B, C, D and E, respectively. Error bars indicate the standard error observed among 3 different experiments.

observations suggèrent que le mécanisme par lequel Cla4 catalyse la phosphorylation de Cdc24 s'autoamplifie au cours de la réaction. En effet, en l'absence d'inhibition initiale de la phosphorylation la vitesse de disparition de la bande non phosphorylée doit être maximale aux temps courts. Afin d'expliquer la raison de la faiblesse du taux de phosphorylation en début d'expérience, le Dr. Tollis, chercheur au laboratoire, a comparé les prédictions de différents modèles de phosphorylation *in silico* à la quantification de nos expériences (fraction des différentes bandes phosphorylées en fonction du temps).

E) Modélisation mathématique des processus régulant la phosphorylation de Cdc24 par Cla4.

Les résultats obtenus pour les vitesses de phosphorylation de Cdc24 par Cla4 en présence ou non de Bem1 ont été confrontés à des modèles mathématiques pour comprendre les différentes caractéristiques de ces réactions. Dans un premier nous avons constaté qu'en l'absence de Bem1, la phosphorylation de Cdc24 présentait une très faible vitesse aux temps courts. Dans des réactions catalysées par des enzymes de type Michaeliennes, la vitesse de réaction est la plus rapide aux temps courts. En effet, les vitesses de réactions pour ses enzymes sont décroissantes au cours du temps du fait de la disparition du substrat. De même dans le cas de réactions ultrasensitives, il n'y a pas de délai en début de réaction (Bouchoux and Uhlmann 2011; Harvey, Enciso et al. 2011). Le docteur Tollis a donc tenté de trouver des conditions mathématiques qui correspondraient aux vitesses que nous observons dans nos réactions ne contenant pas Bem1. Le panel A de la Figure II-7 présente différents modèles que celui-ci a testé. Le modèle qui présentait les plus fortes similarités avec nos résultats fut un modèle où la transition entre la bande non phosphorylée et la première bande phosphorylée était catalysée par un produit intermédiaire, cela représente un mécanisme d'autoamplification de la réaction. Ainsi, la vitesse de réaction augmente avec la disparition de la bande non phosphorylée, vers une (ou plusieurs) forme(s) partiellement phosphorylée(s) que nous avons nommée(s) "q-state". En optimisant ses paramètres afin de rendre compte au plus proche des résultats expérimentaux, nous avons observé que ce modèle prédisait une très faible fraction de substrat dans ce "q-state" (autour de 5%

A



B

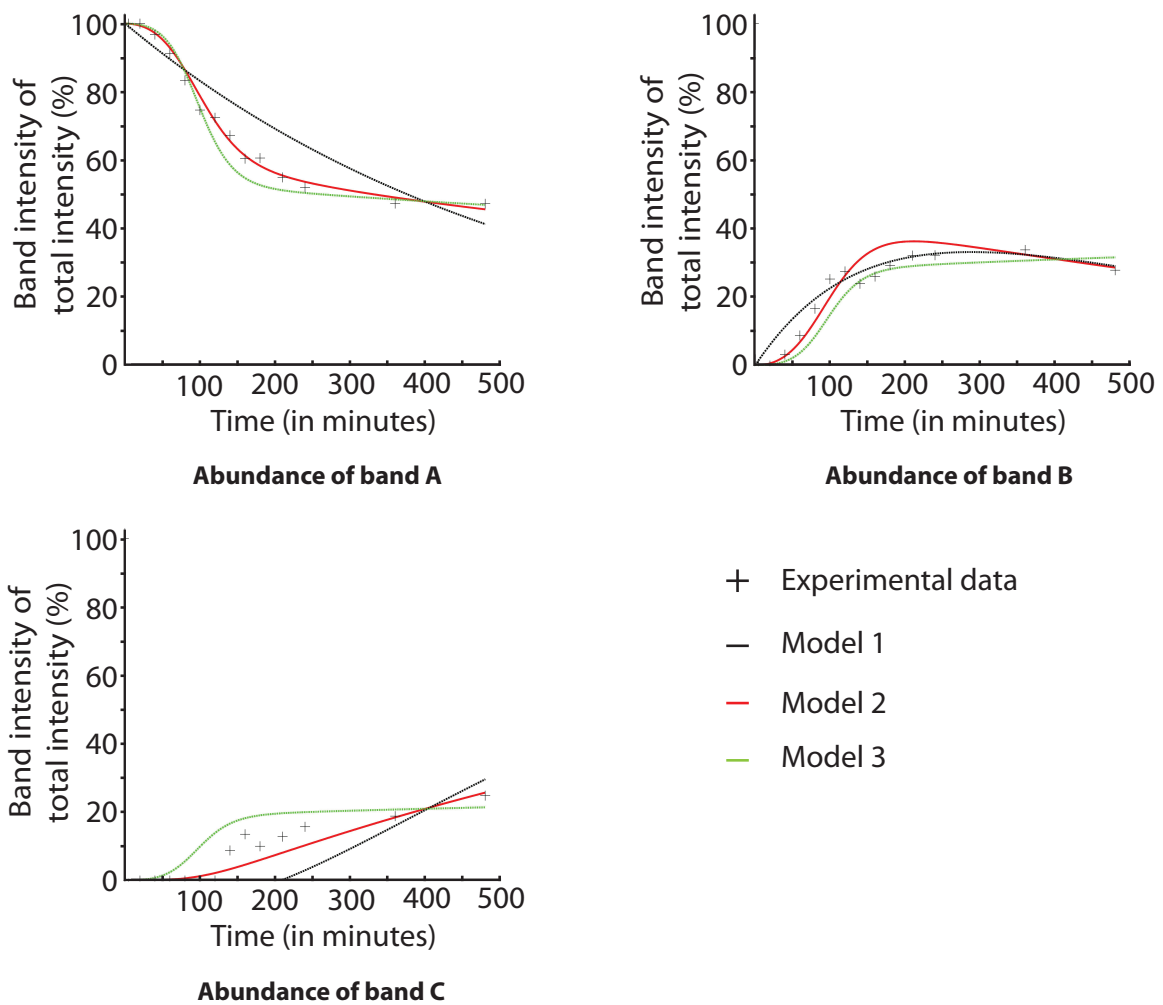


Figure II-7. Mathematical analysis of Cdc24 Cla4 dependent phosphorylation kinetics predicts an activation product.

(A) Examples of mechanistic model tested by Dr Tollis. Model 1 represents constant transition rates from bands A to B and B to C. Model 2 and 3 postulate the existence of a activation state (called q state) which accelerates transition from A to B. In model 2, appearance of form C depends on form B directly. In model 3, forms B and C are simultaneously produced from the q state.

(B) Optimal fitting of experimental phosphorylation kinetics for the 3 models. The curves colors are the same than in A.

typiquement), ce qui pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas observé de bande caractéristique de cette ou ces forme(s).

Nous avons cherché à expliquer cette étape d'autoamplification de la vitesse de réaction plutôt par une modification du substrat par la kinase. En effet, le retard aux temps courts dans la disparition de la forme non phosphorylée diminue avec l'augmentation de la concentration en kinase, ce qui indique que cette dernière est impliquée dans le mécanisme de ce retard. Cependant, la préincubation de Cla4 en présence d'ATP mais en l'absence de substrat est sans effet sur ce retard (Figure II-5), ce qui montre que le substrat joue un rôle dans ce mécanisme. Il pourrait par exemple s'agir de la phosphorylation d'un résidu sur Cdc24 par Cla4 qui serait fortement limitante cinétiquement mais qui permettrait par la suite de favoriser la phosphorylation d'autres résidus. Il semblerait que cette étape d'activation de certaines molécules de Cdc24 accélère la phosphorylation d'autres molécules en trans. En effet, si l'étape d'activation d'une molécule favorisait uniquement sa phosphorylation, les vitesses observées tendraient à être linéaires. Il a été démontré que Cdc24 est capable d'oligomériser (Mionnet, Bogliolo et al. 2008). Imaginons alors un système dans lequel Cla4 phosphoryle une première protéine Cdc24 de manière fortement lente, et que cette phosphorylation permette l'interaction de la kinase avec son substrat initial. Suite à la mise en place de l'interaction, cette première molécule de Cdc24 pourrait favoriser l'interaction de Cla4 avec d'autres molécules de Cdc24 favorisant ainsi les réactions de phosphorylation subséquentes.

Pour aboutir à cette prédiction, le docteur Tollis a modélisé mathématiquement les vitesses d'apparition et de disparition des formes A, B, et C en émettant différentes hypothèses sur les taux de transition entre les différentes formes. Ces différents modèles ont été évalués en calculant l'erreur entre les prédictions des modèles et les observations effectuées sur la variation des trois bandes au cours du temps. Le modèle intuitif dans lequel la forme A se phosphoryle à un taux constant pour donner B, qui elle-même se phosphoryle à un taux constant pour donner C a conduit à de fortes disparités entre vitesses prédites et observées (panel B de la Figure II-7, courbe en noir). L'introduction de la forme "q-state" transitoire dans le modèle a amélioré la qualité des prédictions.

Deux mécanismes ont été comparés, selon que la génération de la forme C nécessite la forme B ou soit possible directement depuis le q-state (panel A de la Figure II-7). La confrontation des prédictions de ces deux modèles avec les mesures a montré que le mécanisme où l'apparition de la forme C reposait sur la forme B était plus vraisemblable (panel B de la Figure II-7). Les modèles 1 et 3 donnent une erreur de 0,0033 et 0,0014 alors que le modèle 2 donne une erreur de $7,08 \times 10^{-4}$. Nous avons donc pu constater que le modèle reflétant le mieux les valeurs expérimentales est celui dans lequel le passage de la forme A à la forme B nécessite l'apparition d'une forme activée (q state) catalysant la réaction. Le passage à la forme C semble nécessiter un passage par la forme B. Le taux de transition entre la forme A et l'état q varie au cours du temps entre 0,0002 minute^{-1} à $t=0$ et 0,0049 minute^{-1} lorsque la fraction de substrat dans le q-state est maximale. Par la suite, les taux de passage à la forme B et C sont de 0,1034 et 0,002 minute^{-1} . Au vu de ces données la transition de l'état A à B est limité par le taux de transition de A à "q-state" en comparaison du taux de transition de "q-state" à B (0,0049 pour 0,1034 minute^{-1}). Les données citées proviennent de la modélisation des données présentées dans la Figure II-2. Nous avons aussi calculé ces valeurs pour les expériences présentées en II-5.

Réaction	Erreur	Taux de passage A à "q state" (minute^{-1})	Taux de passage B à C (minute^{-1})
100 pM	1.1722e-004	0,0013	0,0015
100 pM pré-incubé	1.0791e-004	0,001	0,0015
300 pM	4.0885e-005	0,0027	0,0020
300 pM pré-incubé	2.5984e-004	0,0023	0,0022
900 pM	3.6345e-004	0,0043	0,0028
900 pM pré-incubé	4.3651e-004	0,0034	0,0018

Paramètres issus du modèle mathématique 4 de la figure II-7

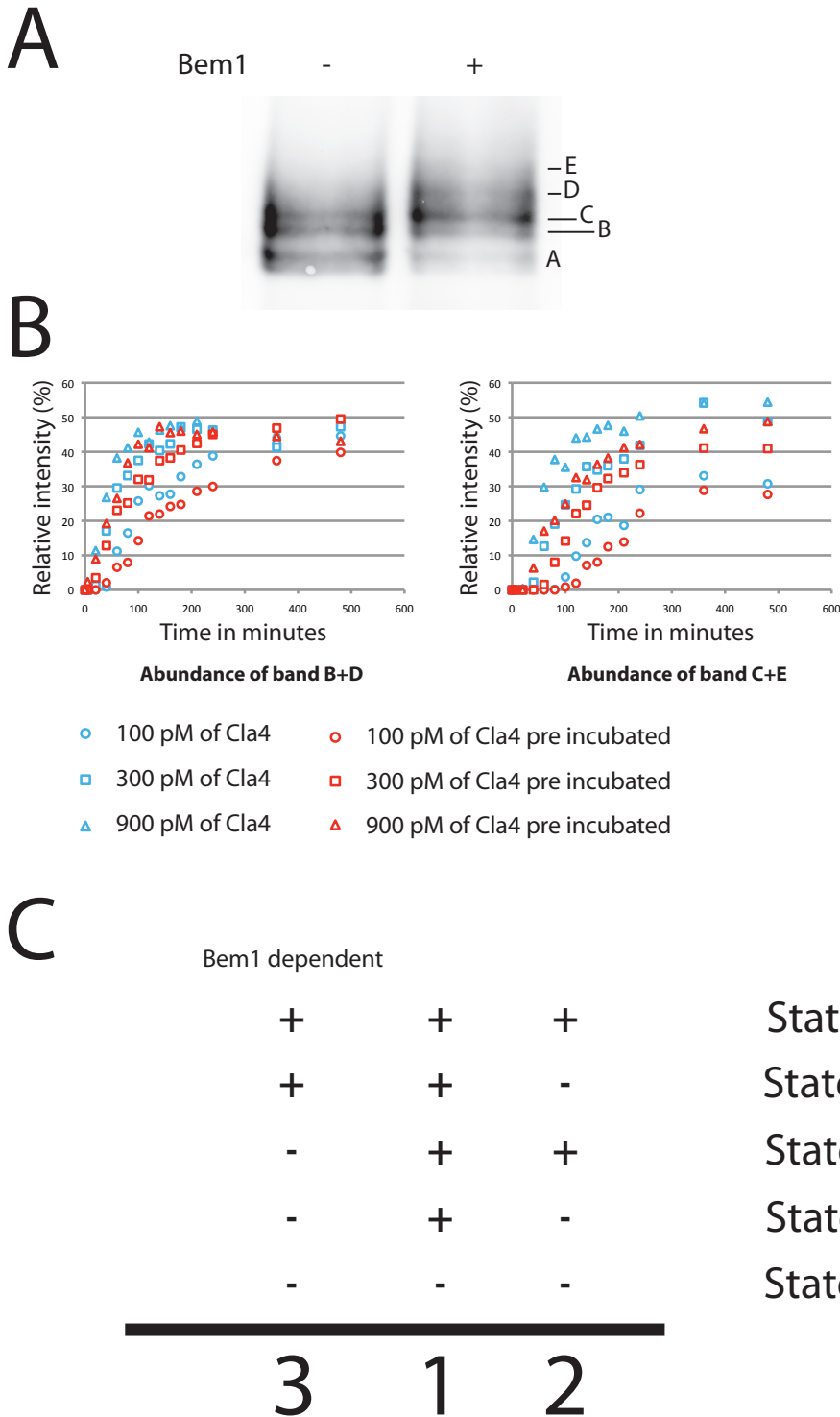


Figure II-8. Forms D and E may respectively result in phosphorylation of forms B and C in the Cdc24 phosphorylation reaction

(A) Western blot against Cdc24 showing representative samples containing each phosphorylated form of Cdc24 which is visualised as an electrophoretic mobility shift. Western blots with an anti-6^{*}his antibody from mouse targeting Cdc24-6his, which recognises Cdc24-6his. The secondary used is a anti-mouse coupled with alexa532. The blot was scanned using a Typhoon Trio+ scanner. Phosphorylation was visualised by electrophoretic mobility shift. The samples are showing the different phosphorylated forms obtained in Cdc24+Cla4 and Cdc24+Bem1+Cla4 reactions.

(B) Graphs show the evolution of cumulative abundance of forms B+D and C+D based on the experiment presented in figure II-6.

(C) Model for the appearance of each phosphorylated form in Cdc24 phosphorylation by Cla4 in presence of Bem1.

Ainsi les analyses des données expérimentales de la phosphorylation de Cdc24 par Cla4 en l'absence de Bem1 semblent indiquer un mécanisme d'autoamplification. Nous avons aussi voulu analyser les observations réalisées pour les réactions contenant Bem1.

Le mécanisme de phosphorylation de Cdc24 par Cla4 en présence de Bem1 semble plus complexe. Dans un premier temps nous avons constaté que les formes B et C dans les réactions contenant ou non Bem1 présentaient les mêmes retard de migration (panel A de la Figure II-8). Cela suggère que les sites phosphorylés en l'absence de Bem1 sont les premiers sites modifiés en présence de la protéine d'échafaudage. Pour confirmer cela nous avons observé l'évolution de l'abondance cumulée des formes B+D et C+E dans l'expérience de la Figure II-6 (panel B de la Figure II-8). Nous avons constaté que ces valeurs augmentaient jusqu'à l'atteinte d'un plateau avoisinant 50%. Ces données suggèrent que l'apparition des formes D et E dépendent directement des formes B et C respectivement. Le modèle de phosphorylation de Cdc24 que nous avons établi est présenté dans le panel C de la Figure II-8. Ce modèle résume comment les formes B et C permettent l'obtention des formes D et E tout en permettant la conservation des abondances observées dans le panel B de la Figure II-8.

Des exemples de modèles testés par le Dr Tollis sont présentés dans le panel A de la Figure II-9. Le premier modèle est dérivé de l'hypothèse que les quatre états de phosphorylation de Cdc24 sont la résultante de phosphorylations successives. Le modèle 2 est basé sur le même principe avec l'incorporation d'un "q-state" pour expliquer le temps de latence observé en début de réaction pour l'apparition des premières formes phosphorylées. Les modèles 3 et 4 sont basés sur l'observation que les proportions cumulées des formes B+D et C+E deviennent constantes. Le modèle 3 incorpore un seul "q-state" amenant à la production de la forme B qui permet la production de la forme C ou D. Le modèle D est basé sur la présence de deux "q-state", qui mènent soit à la production de B puis C ou uniquement de B. Ces différents modèles ont donc été confrontés aux résultats expérimentaux observés dans la Figure II-2 et le résultat de cette confrontation est présenté dans le panel B de la Figure II-9. Les erreurs calculées furent 0,027, 0,027, 0,023 et $6,6 \times 10^{-4}$ pour les modèles 1, 2, 3 et 4. Il semblerait

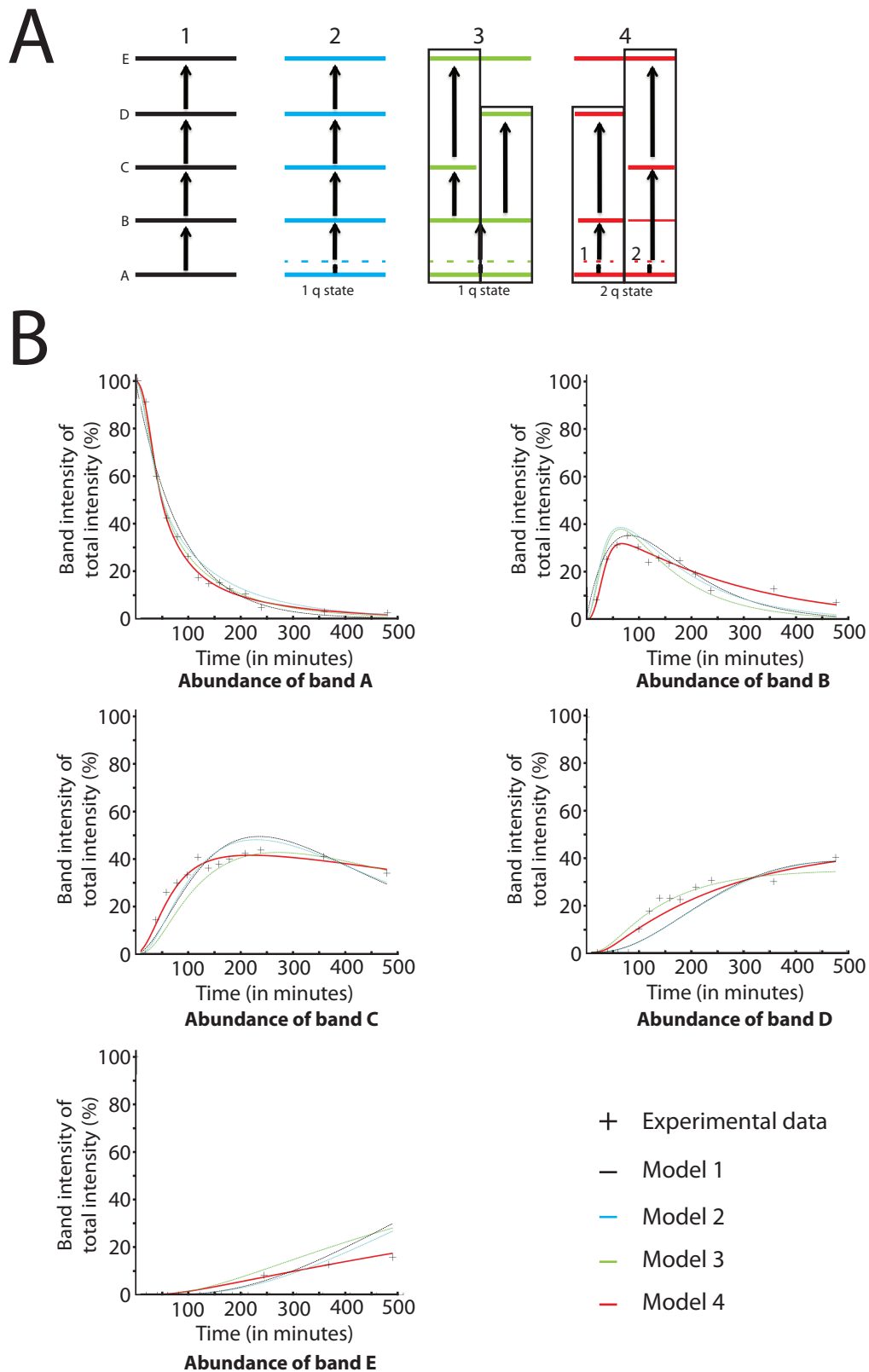


Figure II-9. Mathematical reconstitution of Cdc24 phosphorylation by Cla4 in presence of Bem1 predicts two pathways.

(A) Examples of mechanistic model tested by Dr Tollis. Model 1 represents constant transition rates from bands A to B, B to C., C to D and D to E. Model 2 postulates the existence of a activation state (called q state) which accelerates transition from A to B. Model 3 postulates the existence of a activation state (called q state) which accelerates transition from A to B leading to divergent pathways leading to appearance of forms D and E. Model 4 postulate the existence of two activation states (called q1 and q2 states) which accelerate transition from forms A to B or C. In this model form B leads to form D and form C leads to form E.

(B) Optimal fitting of experimental phosphorylation kinetics for the 4 models. The curves colors are the same than in A.

donc que le modèle 4 soit celui qui se rapproche le plus des résultats expérimentaux.

Ce modèle impliquant deux “q-state” pourrait refléter une hétérogénéité dans la population de protéines présentes dans la réaction. Le module encadré à gauche présente des taux de passages de l'état A à “q-state1” et de B à D de 0,016 et 0,0047 minute⁻¹ respectivement. Le passage de la forme “q-state1” est de 0,16 minute⁻¹, cette réaction semble donc limitée par l'apparition de la forme “q-state1”. Le deuxième module montre des taux de passage de l'état A à “q-state2” et de C à E de 0,011 et 0,0041 minute⁻¹ respectivement. Dans ce deuxième module le passage de la forme “q-state2” à la forme C (en passant par la forme B) est de 0,0389 minute⁻¹. La réaction limitante pour l'apparition de la forme C est donc le passage forme A à “q-state2”. Ces différences de vitesse dans le passage aux “q-state” peuvent être expliquées par le fait que la protéine Bem1 pourrait interagir avec Cdc24 uniquement dans le module de droite. Cette interaction permettrait une augmentation de l'affinité de Cdc24 pour Cla4 expliquant cette vitesse accrue. Cette interaction pourrait par ailleurs bloquer l'accessibilité des sites de phosphorylation nécessaires au passage à l'état C observable uniquement dans le module de gauche en l'absence d'interaction avec Bem1. Les différences de taux de passage en “q-state” avec les modèles ne contenant pas Bem1 pourraient refléter un autre effet de Bem1 au travers d'une activation de Cla4. Ce modèle mathématique est celui qui se rapproche le plus des observations expérimentales présentées dans la Figure II-2. Nous avons donc voulu confronter ce modèle aux autres expériences réalisées dans la Figure II-6. Les valeurs obtenues pour ce modèle sont récapitulées dans le tableau suivant.

Réaction	Erreur	Taux de passage en q-state1 (minute ⁻¹)	Taux de passage B à D (minute ⁻¹)	Taux de passage en q-state2 (minute ⁻¹)	Taux de passage C à E (minute ⁻¹)
100 pM	4.98.10 ⁻⁴	0,0042	0.0015	0,0042	0.0003
100 pM pré-incubé	1.79.10 ⁻⁴	0,0027	0.0013	0,0035	0.0005
300 pM	4.24.10 ⁻⁴	0,022	0.0037	0,033	0.0012
300 pM pré-incubé	3.58.10 ⁻⁴	0,007	0.0030	0,0096	0.0004
900 pM	0.0012	0,024	0.0074	0,016	0.0020
900 pM pré-incubé	8.24.10 ⁻⁴	0,013	0.0036	0,0089	0.0015

Paramètres issus du modèle mathématique 4 de la figure II-9

Ce quatrième modèle a présenté de faibles erreurs quels que soient les résultats expérimentaux auxquels il a été confronté.

L'utilisation combinée d'analyse expérimentale de vitesse de phosphorylation et d'approche mathématique nous a permis d'établir un modèle de phosphorylation de Cdc24 par Cla4 en présence ou non de Bem1. Nous ne pouvons pas affirmer que les mécanismes que nous avons décrits sont vrais mais ce sont les plus simples que nous ayons envisagé. Il serait par ailleurs intéressant de connaître l'effet de chacun des états de phosphorylation sur l'activité de Cdc24 envers Cdc42.

F) Quel est l'effet de la GTPase Cdc42 sur la phosphorylation de Cdc24 par Cla4?

La kinase Cla4 fait partie de la famille des p21-activated kinase. Ces kinases sont connues pour être des effecteurs de la GTPase Cdc42. Il a été démontré que la kinase PAK1 existe sous forme d'homodimère qui s'autoinhibe via la présence d'une boucle d'autoactivation (qui est phosphorylée pour être activée) dans le site catalytique (Lei, Lu et al. 2000; Parrini, Lei et al. 2002). L'interaction entre

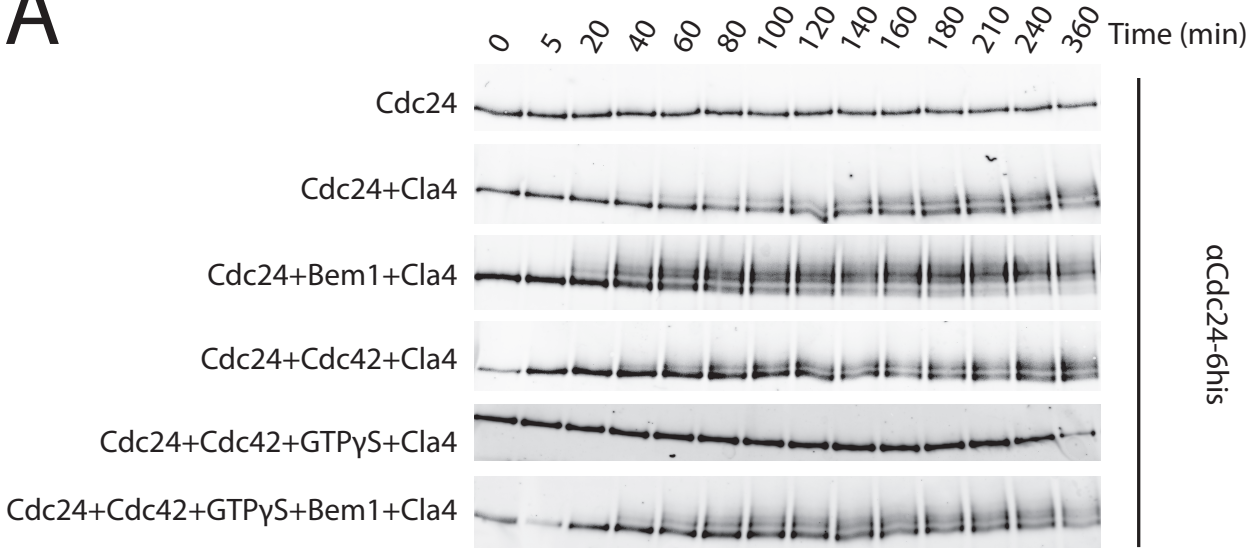
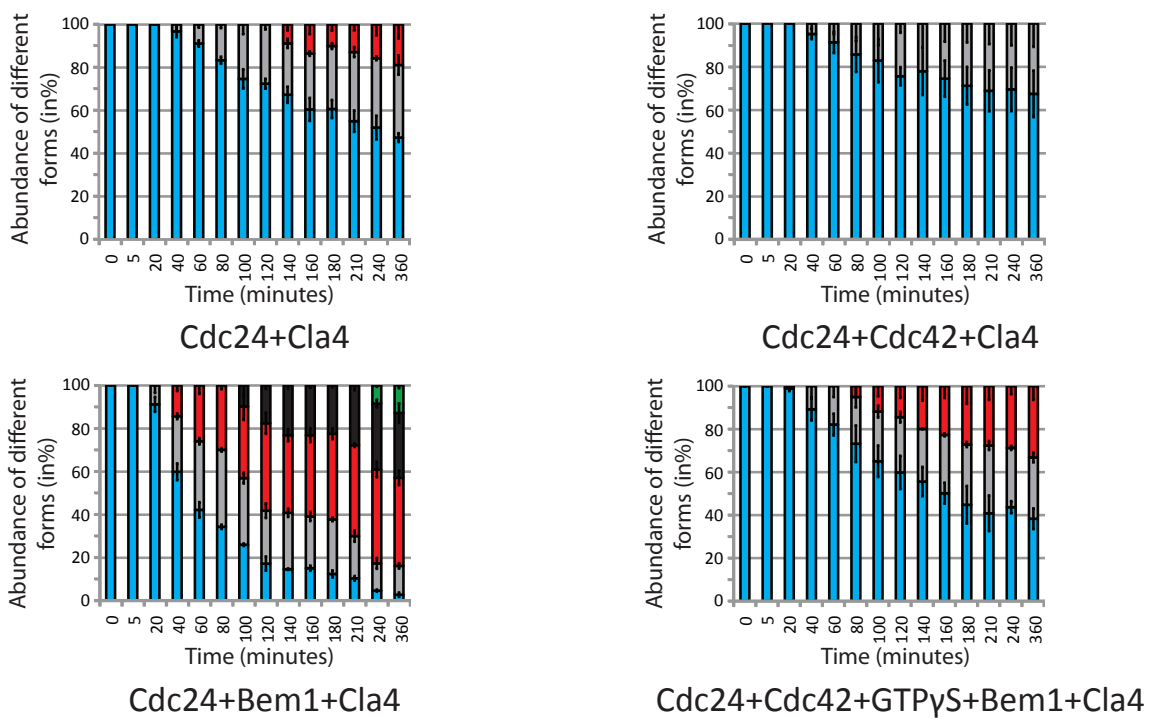
A**B**

Figure II-10. Activated Cdc42 decrease the phosphorylation of Cdc24 by Cla4

(A) Western blot against Cdc24 showing its phosphorylation state. Western blot with a anti-6*his antibody from mouse targeting Cdc24-6his. The secondary used is a anti-mouse coupled with alexa532. The blots were scanned using a Typhoon Trio+ scanner. The samples were removed at the indicated times after initiating the kinase assay. Phosphorylation is visualised as an electrophoretic mobility shift. Cdc24 was phosphorylated by Cla4 kinase (500 pM estimated), in the presence of other proteins: Cdc42 (80nM estimated), Bem1 (100 nM) or GTP γ S (1 μ M).

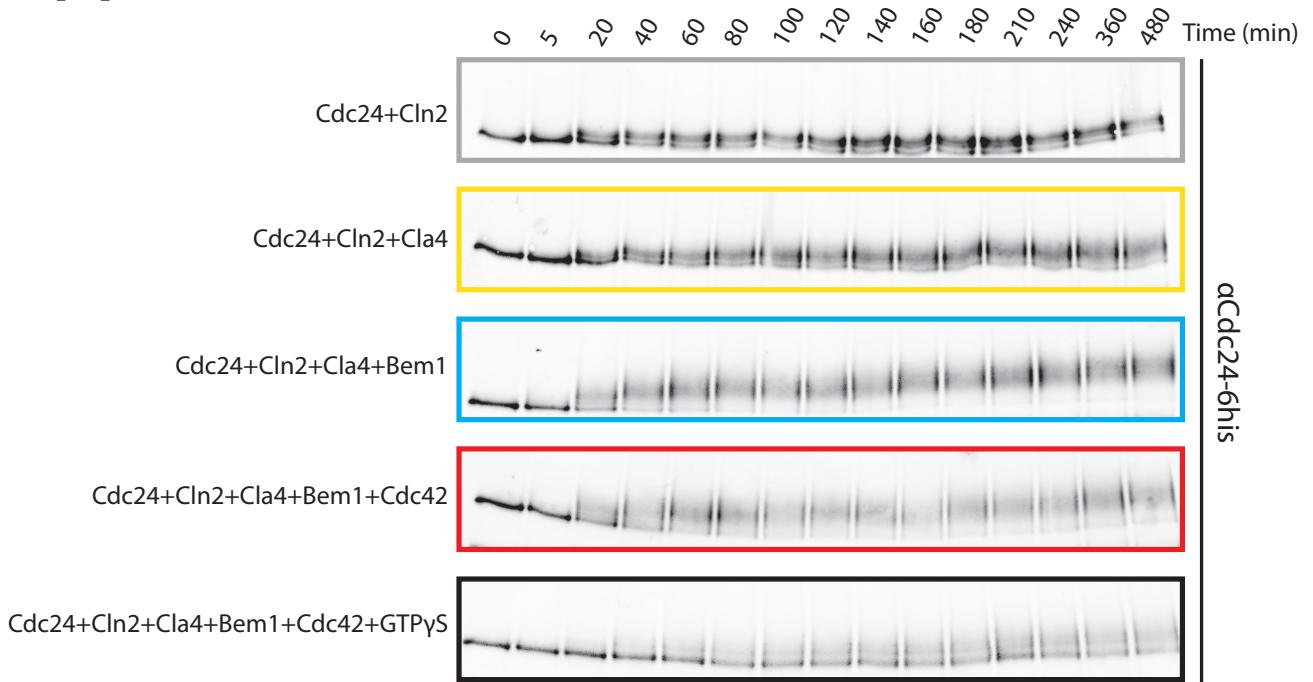
(B) Quantification of the different phosphorylated forms of Cdc24 observed in the experiment A. After scanning the total signals were quantified and the percentage of each Cdc24 form was calculated and plotted over time. The graphs show the abundance of unphosphorylated, first, second, third and fourth phosphorylated form of Cdc24 colored in cyan, grey, red, black and green, respectively, at the different time points. Error bars indicate the standard error observed among 3 different experiments.

cette boucle et le site catalytique est stabilisée par la présence d'une boucle inhibitrice présente au niveau d'un domaine d'inhibition. Ce domaine est aussi impliqué dans l'interaction avec Cdc42. Cette autoinhibition pourrait être levée lorsque la kinase interagit avec Cdc42 qui permettrait de déplacer la boucle autoinhibitrice et donc favoriser l'activation de PAK1. Dans la levure, des études ont montré que les domaines PH et CRIB sont nécessaires à la localisation polarisée de Cla4 (Wild, Yu et al. 2004). Par ailleurs, l'activité kinase de Cla4 augmente sur la MBP lorsque la kinase est purifiée depuis une souche où Cdc42 bloquée sous forme GTP (Benton, Tinkelenberg et al. 1997). Cependant dans leurs travaux, les auteurs ont aussi observé que lorsque le domaine d'interaction de Cla4 était supprimé, la kinase présentait une plus grande activité que la kinase non mutée. Nous avons donc voulu connaître l'effet de Cdc42 dans nos conditions minimalistes de phosphorylation de Cdc24 par Cla4.

Pour cela, nous avons réalisé les mêmes réactions que précédemment en incorporant Cdc42 au mélange réactionnel, seule ou en présence de GTP γ S (Figure II-10). La GTPase a été préalablement purifiée par le Dr McCusker après son expression dans la levure *S. cerevisiae*. Afin de purifier la GTPase, la séquence de l'étiquette 3-HA avait été ajoutée à la séquence génomique de la GTPase. La Figure II-10 montre que la phosphorylation de Cdc24 par Cla4 ne semble que très peu affectée par la présence de la GTPase (lignes 2 et 4). En revanche, lorsque du GTP γ S a été incorporé dans les réactions, nous avons constaté une inhibition de la réaction de phosphorylation (lignes 2 et 5). Ces résultats suggèrent que la forme active de la GTPase inhibe la phosphorylation de Cdc24. Lorsque Bem1 a été ajouté dans les mêmes conditions (ligne 6) nous avons pu observer un niveau et une vitesse de phosphorylation similaire à celle observée quand Cla4 est seule. La présence de Bem1 en parallèle de Cdc42 activée permet le retour d'un niveau basal de phosphorylation similaire à la ligne 2 où la réaction ne contient que Cdc24 et sa kinase.

Il est possible que Cdc42, Cdc24 et Bem1 soient toutes impliquées dans la boucle d'autoamplification. Cette autoamplification conduirait à la création d'un fort pôle de Cdc42-GTP. Le fait que Cdc42 et Bem1 puisse avoir une fonction antagoniste sur la phosphorylation de Cdc24 par Cla4 pourrait être un mécanisme de régulation interne de la phosphorylation de Cdc24. Si la

A



B

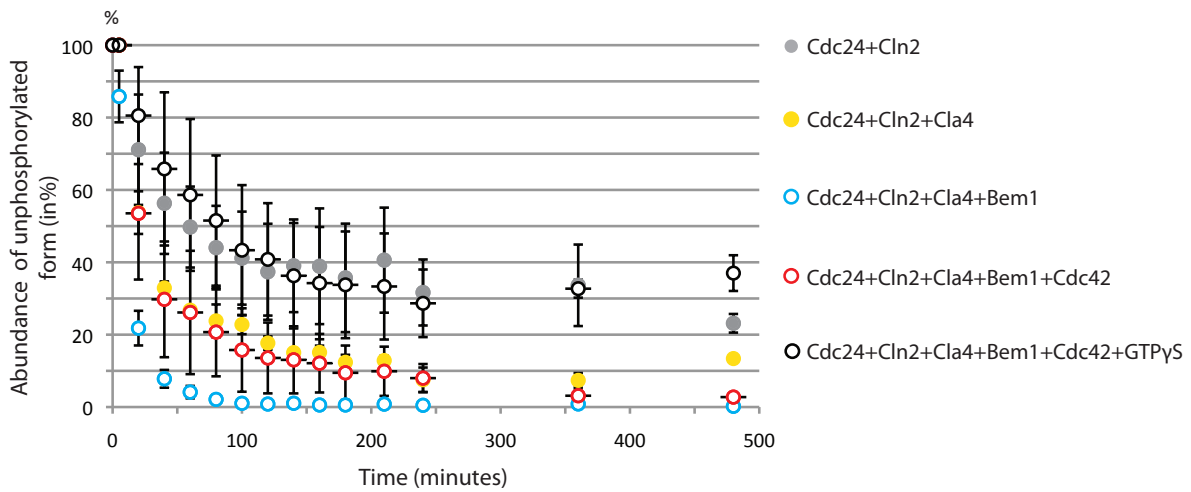


Figure II-11. Cdc24 phosphorylation by Cln2/Cdk1 and Cla4 are additive.

(A) Western blot against Cdc24 showing its phosphorylation state. Western blot with an anti-6*his antibody from mouse targeting Cdc24-6his. The secondary used is a anti-mouse coupled with alexa532. The blots were scanned using a Typhoon Trio+ scanner. The samples were removed at the indicated times after initiating the kinase assay. Phosphorylation is visualised as an electrophoretic mobility shift. Cdc24 was phosphorylated by Cla4 (500 pM estimated) and/or Cln2/Cdk1 (250 pM estimated) kinase, the reactions were performed in the presence or absence of Cdc42 (80 nM estimated), Bem1 (100 nM) or GTPyS (1 μ M).

(B) Quantification of the unphosphorylated form observed in experiment A. After scanning, the total signals were quantified and the percentage of unphosphorylated Cdc24 was calculated and plotted over time. Error bars indicate the standard error observed among 3 different experiments.

phosphorylation de Cdc24 a un rôle activateur pour son activité GEF (activité intrinsèque mais aussi interaction avec Bem1) un tel mécanisme permettrait d'éviter un emballement de l'activité kinase de Cla4 à mesure que la cellule se polarise. Si le pôle de Cdc42 est déjà suffisamment fort, quel est le but pour la cellule de renforcer l'activité GEF par la phosphorylation ? Au contraire, si la cellule a besoin de se polariser, la phosphorylation par Cla4 augmentée par Bem1 au début de la boucle d'autoactivation permettrait d'accélérer ce mécanisme d'autoamplification. Les résultats obtenus lors de cette expérience vont dans le sens de cette hypothèse.

G) Ces différents effets sont ils spécifiques à Cla4, ou concernent ils tous les sites phosphorylables sur Cdc24 ?

Le temps nécessaire aux réactions de phosphorylation de Cdc24 a montré un temps plus long que ceux observés *in vivo*. Cette vitesse diminuée pourrait être expliquée par l'absence d'un composant présent *in vivo*. Il est connu que Cln2/Cdk1 a un rôle direct dans l'émergence du bourgeon, notamment par la régulation du module GTPase. Le système de phosphorylation *in vitro* mis en place nous a permis de tester le rôle de Cln2/Cdk1 sur la phosphorylation de Cdc24 en parallèle des autres facteurs déjà testés sur la phosphorylation de Cdc24 (Figure II-11). Cependant lorsque les deux kinases sont couplées la phosphorylation de Cdc24 est plus diffuse et ne présente pas de bandes distinctes, rendant impossible une quantification des différents états de phosphorylation présents. Nous avons alors choisi de suivre uniquement la disparition de la forme non phosphorylée comme marqueur de la vitesse de réaction. Lorsque les deux kinases sont en présence de Cdc24 leur phosphorylation est additive. La réaction contenant les deux kinases est plus rapide, comme on peut le constater lors de la quantification des lignes 1 et 2. De plus, lorsque la protéine Bem1 est incorporée, la réaction de phosphorylation de Cdc24 atteint une vitesse de disparition de la forme non phosphorylée plus rapide (ligne 3). En revanche, l'addition de Cdc42 ralentit légèrement la vitesse de phosphorylation de Cdc24 (ligne 4). Ce ralentissement est accru en présence de GTP γ S (ligne 5). Nous avons donc pu constater que la présence de Cln2/Cdk1 accélère la vitesse de phosphorylation de Cdc24.

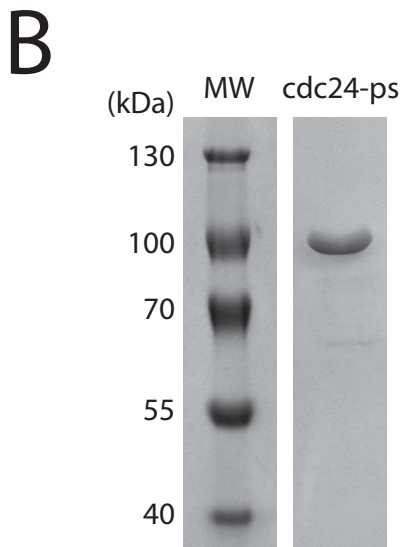
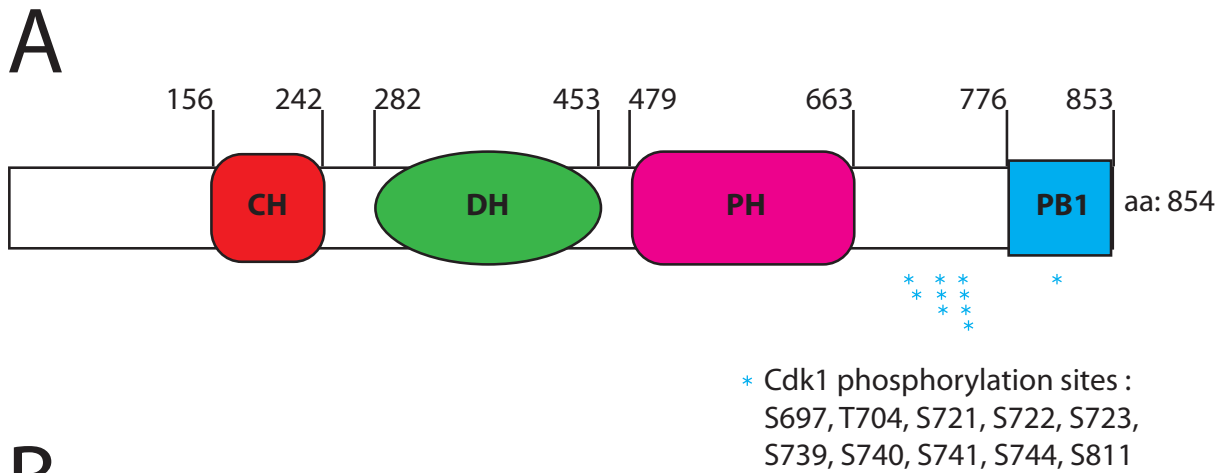


Figure II-12: Schematic representation of the domain organization withing Cdc24, including the mapped Cln2/Cdk1 phosphorylation sites.

(A) All Cln2/Cdk1 phosphorylation sites were mutated to alanine by directed mutagenesis in the *cdc24-ps* mutant. Mutated site are represented by cyan stars. This construct was cloned into pET21a and expressed as a 6-histidine tagged protein.

The mutated sites are: S697, T704, S721, S722, S723, S739, S740, S741, S744 and S811.

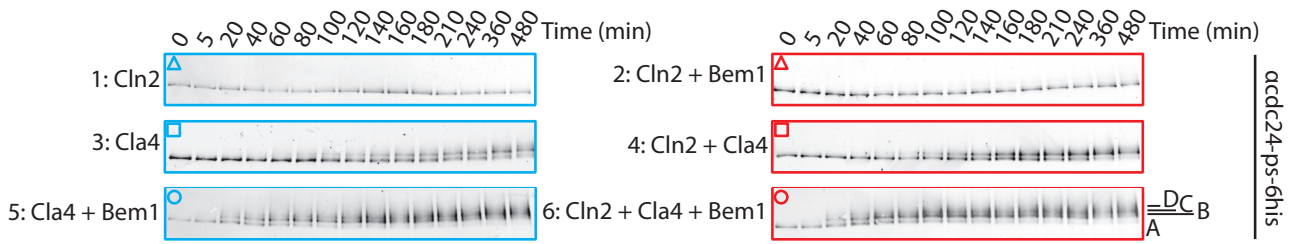
(B) Coomassie staining after 9% SDS-PAGE showing elution of *cdc24-ps-6his* purified using Ni-NTA resin.

H) La kinase Cln2/Cdk1 active-t-elle Cla4?

Cla4 n'est pas la seule kinase à avoir comme substrat Cdc24 : Cln2/Cdk1 est aussi une kinase de cette RhoGEF. *CLA4* a été identifié lors d'un crible génétique visant à identifier les gènes présentant une létalité synthétique avec des délétions des gènes codants les cyclines Cln1 et Cln2 (Cvrckova, De Virgilio et al. 1995). Les données génétiques décrites dans la littérature suggèrent en effet une activation de la kinase Cla4 par le complexe Cln2/Cdk1. Les résultats obtenus dans l'expérience précédente peuvent être expliqués de deux façons différentes. Soit Cln2/Cdk1 agit uniquement sur Cdc24 soit Cln2/Cdk1, en plus de phosphoryler Cdc24, active Cla4. Dans le but de tester cette hypothèse nous avons utilisé une approche nous permettant de rendre Cdc24 insensible à l'activité kinase de Cln2/Cdk1, de telle sorte qu'elle ne soit phosphorylée que par la kinase Cla4 (Figure II-12). Lors des travaux précédents du Dr McCusker, celui-ci a cartographié les sites de phosphorylations de Cdc24 par Cln2/Cdk1. Pour cela, après avoir purifié et traité la protéine GEF à la phosphatase, le Dr McCusker a incubé Cdc24 avec la kinase Cln2/Cdk1. Suite à cela les sites de phosphorylation ont été détectés par spectrométrie de masse. Nous avons donc utilisé ces données pour muter les sites de phosphorylation de Cdc24 par Cln2/Cdk1 (la Figure II-12 illustre les sites phosphorylés par Cln2/Cdk1 sur Cdc24 détectés par le Dr McCusker). Si le modèle expliquant les résultats précédents par une activation de Cla4 par Cln2/Cdk1 est correct, l'utilisation de cette construction dans nos expériences de phosphorylation pourrait nous permettre de l'observer directement. En effet, l'incubation de la kinase Cln2/Cdk1 avec ce mutant nous permettrait d'observer l'effet indirect de cette kinase sur Cdc24 par l'activation de la kinase Cla4.

Après purification de cette protéine recombinante (cdc24-ps-6his), nous avons réalisé des réactions de phosphorylation nous permettant de répondre à cette hypothèse (Figure II-13). Dans un premier temps nous avons contrôlé que ce mutant ne pouvait pas être phosphorylé par la kinase Cln2/Cdk1 seule ou en présence de Bem1 (Figure II-13 ligne 1 et 2). Une première information relativement marquante, fut la phosphorylation (même minime) de cette protéine normalement non phosphorylable par la kinase Cln2/Cdk1 en présence

A



B

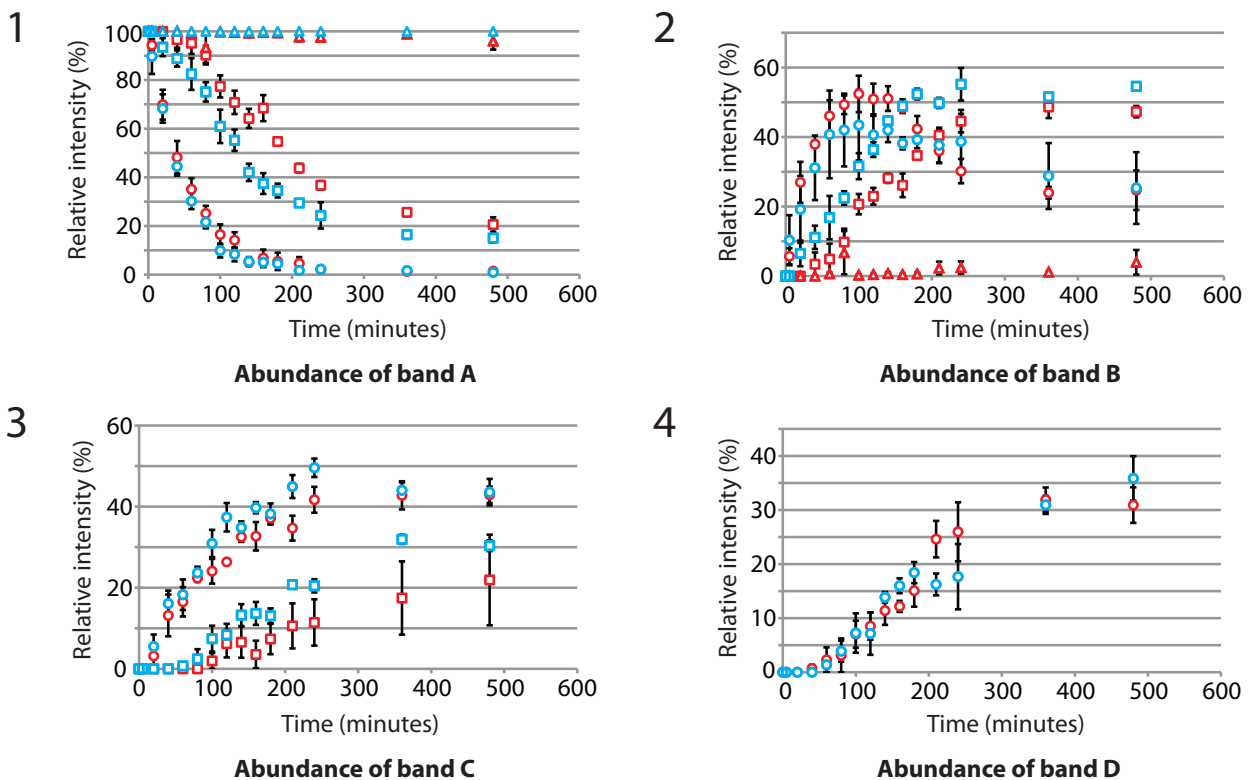


Figure II-13. Cln2 kinase does not increase the rate of Cla4 phosphorylation.

(A) Western blot against *cdc24-ps* showing its phosphorylation state. Western blot with a anti-6*his antibody from mouse targetting *Cdc24-6his*. The secondary used is a anti-mouse coupled with alexa532. The blots were scanned using a Typhoon Trio+ scanner. The samples were removed at the indicated times after initiating the kinase assay. Phosphorylation is visualised as an electrophoretic mobility shift. *cdc24-ps* protein (100 nM) was phosphorylated by Cla4 kinase (500 pM estimated), the reactions were performed in the presence of Cln2 (50 pM estimated), Bem1 (100 nM).

(B) Quantification of the different phospho-forms observed in experiment A. After scanning, the total signals were quantified and the percentage of each *cdc24-ps* form was calculated and plotted over time. Graph 1 shows the abundance of unphosphorylated *cdc24-ps* in the different reactions overtime (form A). Graphs 2,3 and 4 show the abundance of phosphorylated forms B, C and D, respectively. Error bars indicate the standard error observed among 3 different experiments.

de Bem1 (Figure II-13 ligne 2). Nous avons alors ajouté Cla4 seule ou en présence de Bem1 (Figure II-13 ligne 3 et 5) et nous avons comparé les vitesses de phosphorylation lorsque la kinase Cln2/Cdk1 était ajoutée. Les réactions contenant Cla4 avec ou sans Cln2/Cdk1 ne semblaient pas présenter de différence (Figure II-13 ligne 3 et 4). Cette observation est corroborée par les quantifications présentées dans le panel B (comparaison entre les carrés rouges et bleus). Nous avons aussi pu constater que ce mutant présente une augmentation du niveau de phosphorylation par Cla4 lorsque la protéine Bem1 est présente dans la réaction (Figure II-13 ligne 5). Il est à noter que les vitesses observées sont similaires à celles présentées sur la Figure I-2, suggérant un comportement similaire des protéines Cdc24 et cdc24-ps dans ces réactions de phosphorylation. Par ailleurs lorsque Bem1 et Cla4 sont en présence de Cln2/Cdk1, celle-ci ne semble pas affecter la vitesse de phosphorylation (Figure II-13 ligne 5 et 6). Ces résultats suggèrent que la kinase Cln2/Cdk1 ne présente pas d'effet direct sur la kinase Cla4 pour la phosphorylation de cdc24-ps. Il est possible que la létalité synthétique de mutant pour ces deux kinases soit dû à un effet portant sur une autre protéine que Cdc24.

I) La phosphorylation de Cdc24 affecte-t-elle sa capacité à interagir avec Bem1?

L'interaction entre la protéine Cdc24 et Bem1 est supposée être impliquée dans une boucle d'auto-activation de Cdc42. Les études, réalisées au préalable, sur l'effet de la phosphorylation de Cdc24 lors de la constitution du complexe Cdc24/Bem1, ont abouti à des conclusions différentes. En effet les travaux de Gulli *et al.* ont suggéré que la phosphorylation de Cdc24 permet de diminuer l'interaction alors que Bose *et al.* n'ont pas montré de différence notable dans l'interaction lorsque Cdc24 est hyperphosphorylée (Gulli, Jaquenoud et al. 2000; Bose, Irazoqui et al. 2001).

Devant ce manque de concordance dans les effets de la phosphorylation de Cdc24 sur l'interaction avec la protéine Bem1, nous avons décidé de réaliser des phosphorylations *in vitro* suivies d'expériences de pull down. Comme nous avons constaté que les kinases Cln2/Cdk1 et Cla4 sont additives pour la phosphorylation de Cdc24 et que la protéine Bem1 permet d'atteindre différents

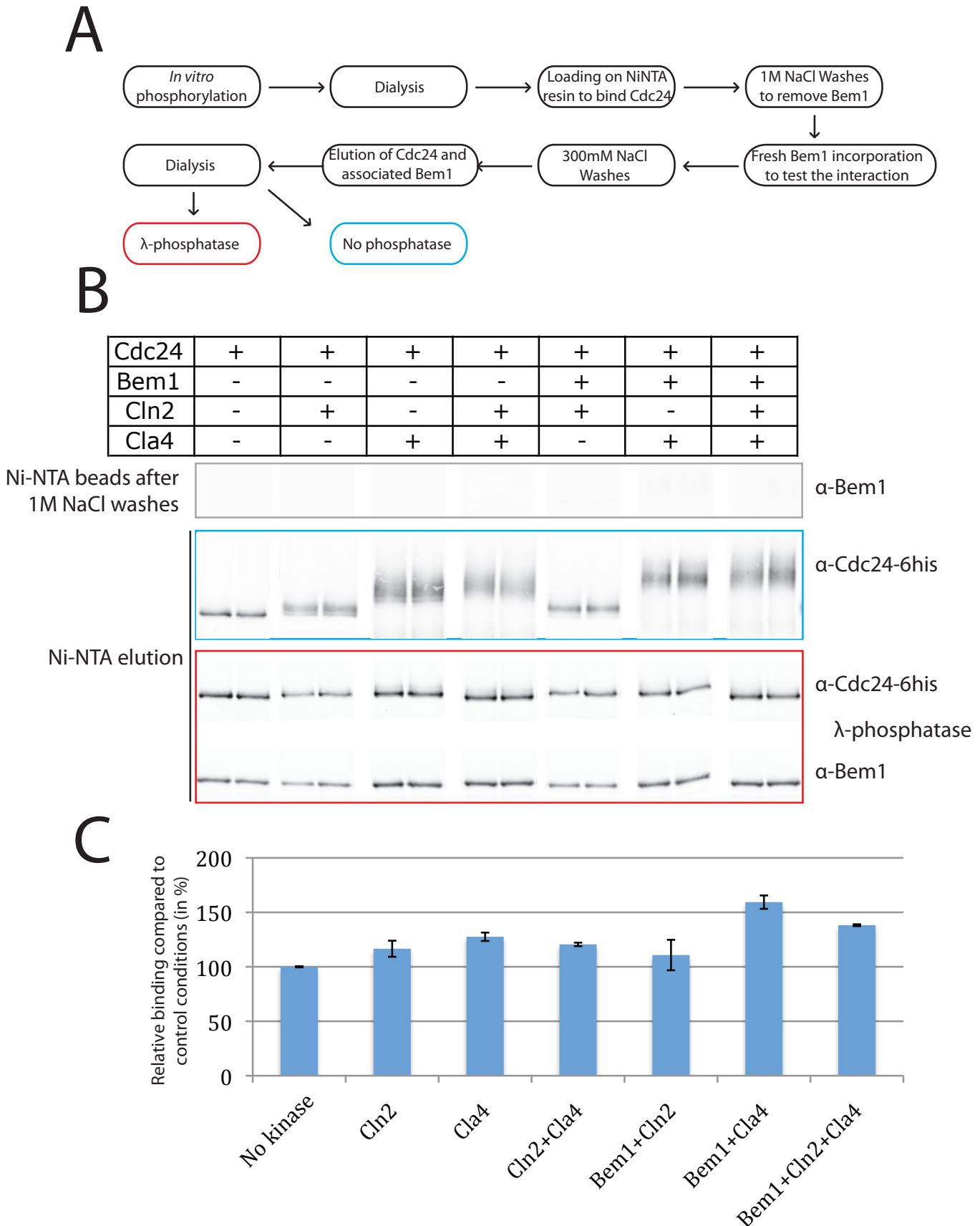


Figure II-14. Cdc24 phosphorylation by Cla4 increases the GEF/Bem1 binding.

(A) Principle of the experiment.

(B) Upper panel shows Bem1 removal after the five 1 M NaCl washes.

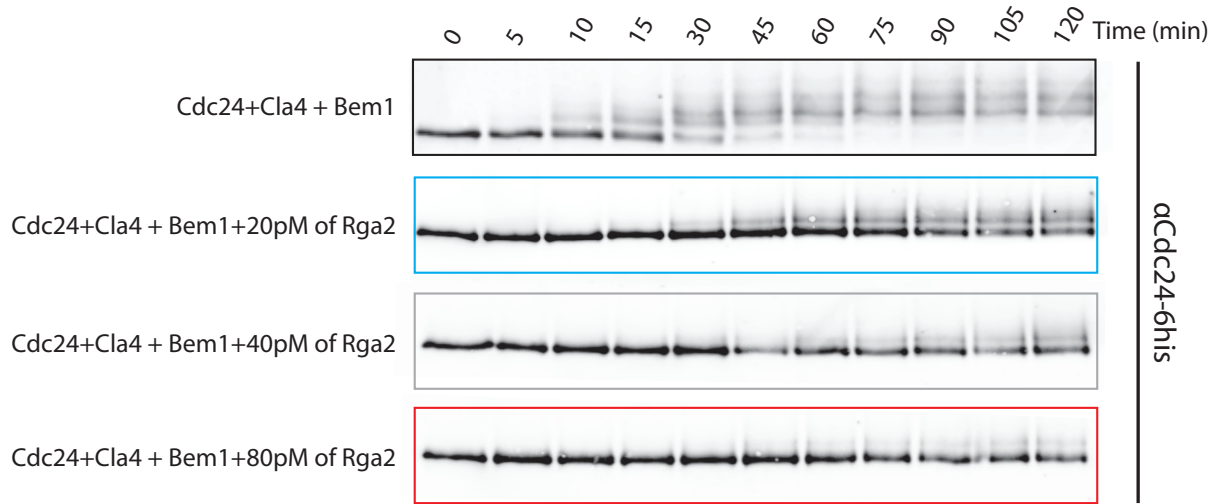
Middle panel shows the phosphorylated Cdc24 samples generated by incubation with the indicated proteins. After elution of Cdc24 from the Ni beads, half of the sample was treated with phosphatase. The bottom panel shows the Cdc24 after treatment with phosphatase and the associated Bem1. Samples from duplicate experiments have been loaded side-by-side.

(C) Quantification of the ratio of Bem1 over Cdc24 signal is shown in which samples with no kinase are normalized to 100%. Error bars indicate the standard error observed among 2 different experiments.

niveaux de phosphorylation nous avons décidé de tester toutes ces conditions dans les expériences de pull down.

Pour ce faire, les différentes formes de Cdc24 (non phosphorylée, phosphorylée au préalable par Cla4 et/ou Cln2/Cdk1 avec ou sans Bem1) ont été introduites dans différentes colonnes contenant de la résine Ni-NTA. L'interaction spécifique entre l'étiquette polyhistidine (6His) présente sur les protéines Cdc24 recombinantes et les ions Nickel recouvrant la surface de la résine permettent de fixer les formes de Cdc24. Nous avons ensuite incubé Bem1 dans chacune des colonnes, et après élution nous avons quantifié la fraction de Bem1 retenue par chaque forme de Cdc24 du fait de l'interaction physique avec ces dernières. La comparaison des fractions retenues par les différentes formes nous a permis de déterminer quelle forme possède la meilleure affinité pour Bem1. Pour ce faire, de grandes quantités de kinase ont été incubées avec 5µg de protéine Cdc24 en présence ou non de Bem1 (3,1µg pour avoir la même molarité que Cdc24) pendant 2 heures à 30°C. Puis les réactions ont été dialysées pendant la nuit à 4°C dans un tampon de fixation (20mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl et 0,05% de Tween-20). Une fois dialysées, les réactions ont été incubées avec 25µL de billes Ni-NTA pour fixer les protéines Cdc24-6his à 4°C pendant 1 heure. Dans le but d'éliminer les protéines Bem1 présentes dans certaines réactions, 5 lavages successifs de 5 minutes ont été réalisés (20mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl, 30 mM Imidazole et 0,05% de Tween-20) suivis d'un dernier lavage pour équilibrer les billes dans la solution d'interaction (20mM Tris pH 7.5, 300 mM NaCl, 30 mM Imidazole et 0,05% de Tween-20). 10% des billes ont alors été récupérés afin de déterminer si les lavages ont permis d'éliminer les protéines Bem1 présentes lors des réactions de phosphorylation (premier western blot du panel B de la figure II-14). Suite à ces lavages, 100µL contenant 3,1 µg de Bem1 ont été ajoutés aux billes ayant fixé Cdc24-6his. Les deux protéines ont été incubées pendant 1 heure à 4°C puis les billes ont été lavées 5 fois 5 minutes à l'aide du tampon d'interaction. Les protéines ont alors été éluées 2 fois 15 minutes par 50 µL d'un tampon ajusté à 500 mM d'imidazole. Les éluations ont par la suite été dialysées dans un tampon contenant 20mM Tris pH 7.5 et 300 mM NaCl, dans le but d'être déphosphorylés. Une fois dialysés les échantillons ont été séparés en deux et placés à 30°C, l'un étant en présence de phosphatase λ. Les réactions de

A



B

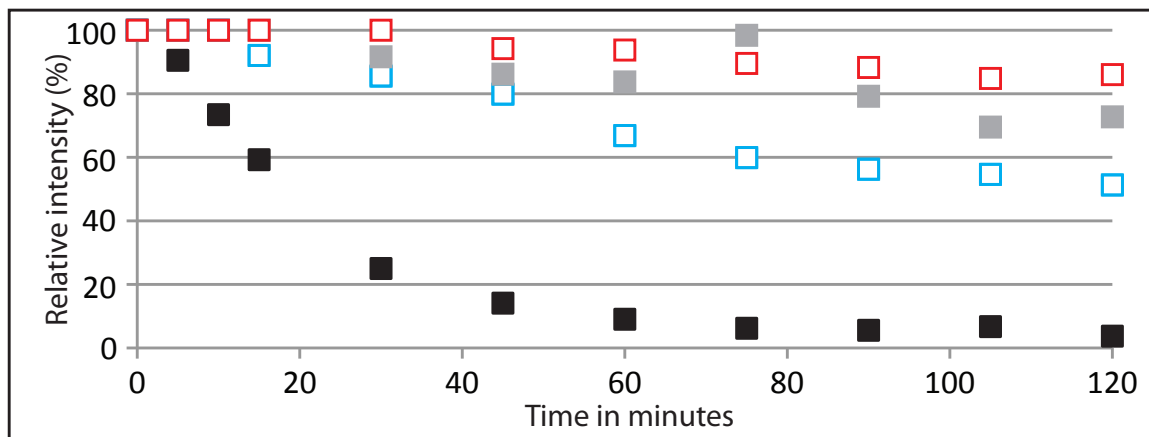


Figure II-15. Rga2-3xHA inhibits the phosphorylation of Cdc24 by Cla4

(A) Western blot against Cdc24 showing its phosphorylation state. Western blot with a anti-6*his antibody from mouse targeting Cdc24-6his. The secondary used is a anti-mouse coupled with alexa532. The blots were scanned using a Typhoon Trio+ scanner. The samples were removed at the indicated times after initiating the kinase assay. Phosphorylation is visualised as an electrophoretic mobility shift. Cdc24 (100 nM) was phosphorylated by Cla4 (500 pM estimated) kinase in the presence of Bem1 (100 nM) and different amounts of Rga2 (concentrations are estimated).

(B) Quantification of the unphosphorylated form of Cdc24 observed in experiment A. The total signals were quantified and the percentage of unphosphorylated Cdc24 was calculated and plotted over time.

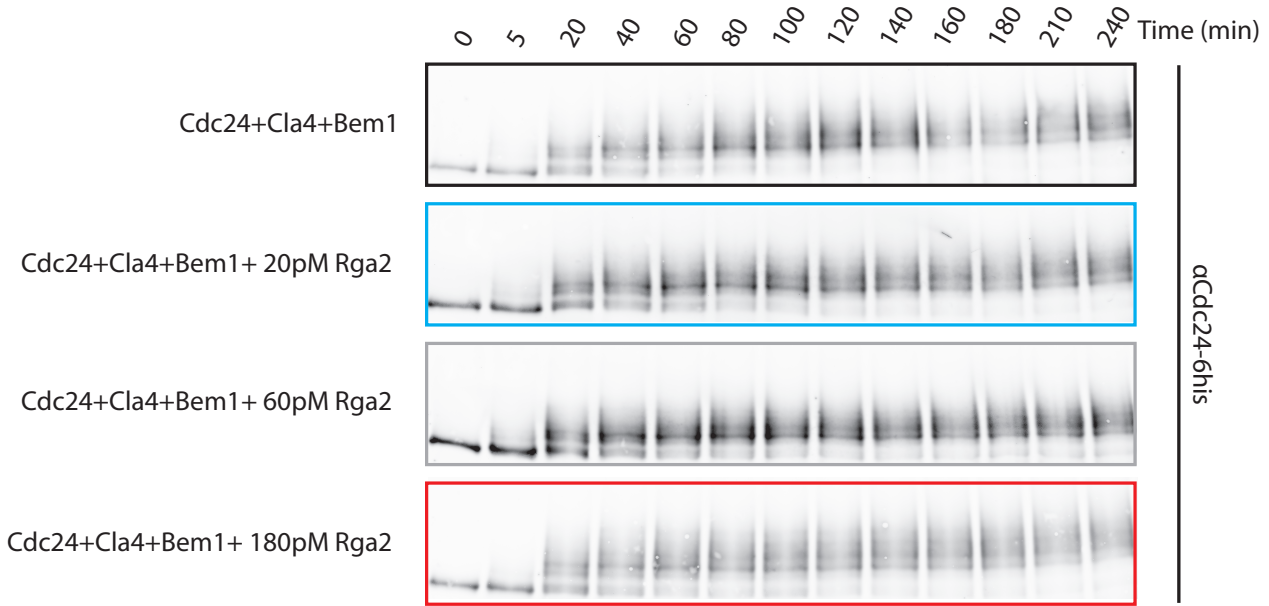
déphosphorylation ont duré 1h30 puis ont été inactivées par l'ajout de 16,6 μ L de tampon de charge (4X). Après électrophorèse SDS-PAGE à 9% et 11% d'acrylamide (pour les échantillons déphosphorylés), des Western blots ont été réalisés dans le but de visualiser le résultat de cette expérience (Figure II-14).

Nous avons ainsi constaté que dans nos conditions expérimentales la protéine Cdc24 phosphorylée interagit plus avec Bem1. De plus, cette augmentation de l'interaction est majorée lorsque les réactions de phosphorylation ont été réalisées en présence de Bem1. Il a été suggéré précédemment que sous l'influence de l'interaction avec la protéine d'échafaudage, la structure de la GEF adopterait une conformation ouverte, permettant une accessibilité accrue à la partie interne contenant les domaines DH et PH (dont dépendent l'activité GEF) (Shimada, Wiget et al. 2004; Smith, Rubinstein et al. 2013). Il est possible que lors de la phosphorylation par Cla4 en présence de Bem1, la structure ouverte soit stabilisée et facilite l'interaction entre les deux protéines. Cette hypothèse expliquerait cette augmentation de signal lorsque Cdc24 est phosphorylée en présence de Bem1. Par ailleurs cette stabilisation du complexe Bem1/Cdc24 suggère un renforcement de la boucle d'auto-amplification impliquant ces deux protéines lors de la mise en place et du maintien de la polarité car le niveau de phosphorylation de Cdc24 augmente au moment de l'émergence du bourgeon.

Après avoir constaté un effet de la phosphorylation de Cdc24 sur son interaction avec Bem1 nous avons voulu comprendre pourquoi l'effet de la GTPase activée n'était pas la même *in vivo* et *in vitro*. Nous avons postulé que nos conditions minimales ne réunissaient pas toutes les conditions nécessaires à une hyperphosphorylation de Cdc24 en présence de Cdc42 activée. Nous avons raisonné que cet effet observé *in vivo* peut être un effet indirect de l'activation de Cdc42. En effet lorsque Cdc42 est activée celle-ci peut interagir avec un grand nombre de protéines. Nous avons alors voulu observer l'effet d'une protéine interagissant spécifiquement avec la GTPase activée.

- J) La protéine Rga2 a-t-elle un effet sur la phosphorylation de Cdc24 par Cla4?

A



B

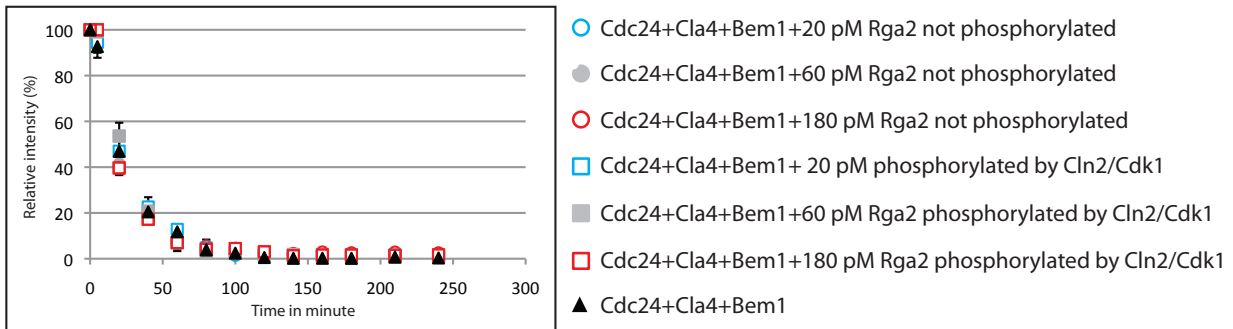


Figure II-16. Rga2 purified by TAPtagging does not inhibit the phosphorylation of Cdc24 by Cla4 in presence of Bem1.

(A) Western blot against Cdc24 showing its phosphorylation state. Western blot with a anti-6*his antibody from mouse targetting Cdc24-6his. The secondary used is a anti-mouse coupled with alexa532. The blots were scanned using a Typhoon Trio+ scanner. The samples were removed at the indicated times after initiating the kinase assay. Phosphorylation is visualised as an electrophoretic mobility shift. Cdc24 was phosphorylated by Cla4 kinase (500 pM estimated) in the presence of Bem1 and increasing amounts of Rga2-TAP (concentrations are estimated).

(B) Quantification of the unphosphorylated form observed in experiment A. The signals were quantified and the percentage of unphosphorylated Cdc24 was calculated and plotted over time. Error bars indicate the standard error observed among 3 different experiments.

La phosphorylation de Cdc24 est fortement augmentée en présence de Cdc42 activée *in vivo*. En revanche lorsque nous avons testé l'effet de Cdc42 couplé à l'incorporation de GTP γ S nous avons observé l'effet inverse. Ce résultat suggère que les conditions réactionnelles utilisées dans cette expérience ne remplissent pas les conditions qui permettent une phosphorylation maximale de Cdc24.

Au delà des effecteurs connus pour interagir avec la GTPase liée au GTP, d'autres protéines peuvent interagir avec elle pour permettre la catalyse de l'hydrolyse du GTP, les protéines GAP. La protéine Rga2 est une protéine GAP de Cdc42. Cette protéine a été mise en évidence comme étant présente dans un complexe contenant entre autres Cdc24 et Bem1. Le fait que Rga2 puisse interagir avec Cdc42 activée et qu'elle soit aussi présente dans ce complexe nous a amené à tester son effet sur la phosphorylation de Cdc24.

Pour ce faire nous avons ajouté des quantités croissantes de la protéine GAP étiquetées avec 3HA (purifiée précédemment par le Dr. McCusker) dans des réactions contenant Cdc24, Bem1 et Cla4 (Figure II-15 panel A). Il fut intéressant de constater que Rga2 présentait un effet contraire à notre hypothèse, celle-ci inhibant la phosphorylation de Cdc24 par Cla4 d'autant plus que sa concentration augmentait dans le mélange réactionnel (Figure II-15 panel B). Nous avons alors voulu tester l'effet de l'état de phosphorylation de Rga2, qui est un autre substrat de Cln2/Cdk1. Pour ce faire nous avons produit des constructions TAP-tag pour la protéine Rga2 afin d'en produire puis d'en purifier à nouveau. Une fois la protéine fixée sur les billes de protéine-A sépharose, celles-ci ont été lavées avec du tampon d'activité kinase puis soumises à une phosphorylation par Cln2/Cdk1 à 30°C. Le résultat de la purification est présenté dans la Figure I-8 du chapitre 1. Nous avons alors réalisé des expériences similaires à la Figure II-16 afin de savoir si la phosphorylation de Rga2 par Cln2/Cdk1 pouvait compromettre l'inhibition par cette dernière de la phosphorylation de Cdc24 par Cla4. Le résultat de cette expérience est malheureusement peu concluant (Figure II-16). En effet, hormis un léger ralentissement de la phosphorylation dans les échantillons ne contenant pas Bem1 visible essentiellement en début de réaction (Figure II-17 panels B et D), nous n'avons pas constaté d'effet inhibiteur de la protéine Rga2 quel que soit son

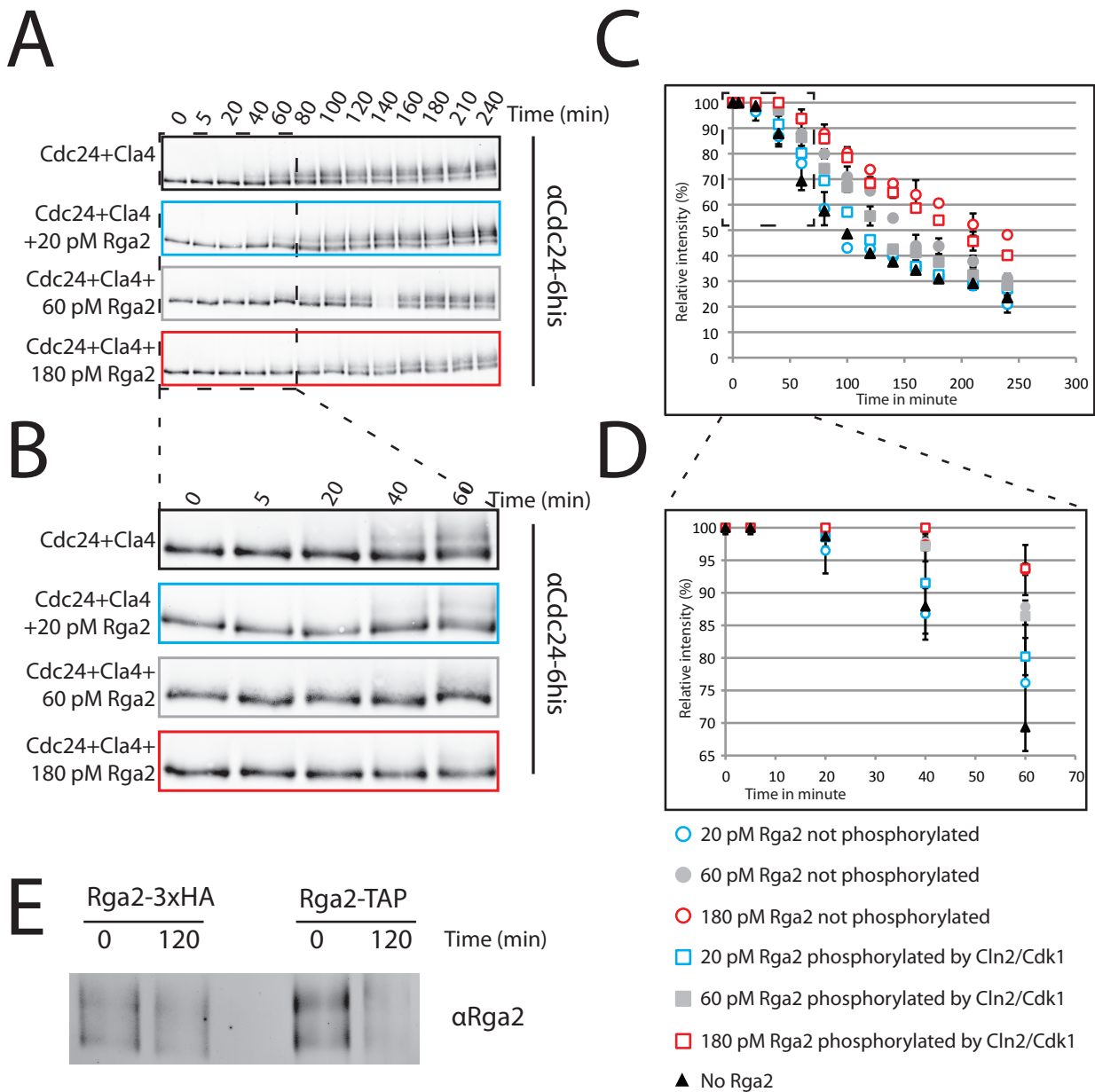


Figure II-17. Rga2-TAP inhibits the phosphorylation of Cdc24 by Cla4.

(A) Western blot against Cdc24 showing its phosphorylation state. Western blot with a anti-6*his antibody from mouse targeting Cdc24-6his. The secondary used is a anti-mouse coupled with alexa532. The blots were scanned using a Typhoon Trio+ scanner. The samples were removed at the indicated times after initiating the kinase assay. Phosphorylation is visualised as an electrophoretic mobility shift. Cdc24 (100 nM) was phosphorylated by Cla4 (500 pM estimated) kinase with increasing amounts of Rga2-TAP (concentrations are estimated).

(B) Magnification of the five first time points shown in (A).

(C) Quantification of the different forms observed in the experiment (A). After revelation the total signals were quantified and the percentage of unphosphorylated Cdc24 was calculated and plotted over time. Error bars indicate the standard error observed among 3 different experiments.

(D) Quantification of the different forms observed of the five first time points shown in (C). Error bars indicate the standard error observed among 3 different experiments.

(E) Western blot against Rga2. Samples from experiment II-15 and (A) at t=0 and t=120 were resolved by 9% SDS-PAGE (80 and 180 pM conditions respectively).

état de phosphorylation. Afin de comprendre l'échec de cette expérience, nous avons réalisé un western blot pour la protéine GAP. Nous avons ainsi pu observer en comparant avec les premières expériences réalisées que la protéine Rga2 étiquetée TAP était moins stable (panel E de la Figure II-17). Ce manque de stabilité, couplé à une hypersensibilité du système contenant Bem1 et Cla4, pourrait expliquer le fait que l'inhibition ne soit pas observable. Les réactions ne contenant pas Bem1 étant plus lentes, il a été possible d'observer un effet (minime) similaire à l'expérience présentée Figure II-15.

Lors de ces travaux nous avons mis en évidence que la protéine Cdc24 pouvait être phosphorylé par Cla4 uniquement lorsque la GEF présentait une structure non dénaturée. Ces résultats en complément des données précédemment récoltées en SRCD et en analyse interactionnelle de Cdc24 et Bem1 suggèrent que Cdc24 produite et purifiée depuis la bactérie présentait des domaines correctement structurés. Par ailleurs nous avons pu observer deux effets de la protéine Bem1 sur la phosphorylation de Cdc24. Premièrement, Bem1 permet d'augmenter la vitesse de phosphorylation de Cdc24 par Cla4. Deuxièmement, Bem1 permet d'atteindre des niveaux supérieurs de phosphorylation de Cdc24. Ce résultat a été observé pour Cla4 et Cln2/Cdk1 et semble être donc spécifique d'un effet sur la protéine GEF. De plus, nous avons observé que la vitesse de phosphorylation de Cdc24 par Cla4 était fortement diminuée en présence de Cdc42/GTP γ S. Nous avons aussi pu constater que la vitesse de phosphorylation de Cdc24 était maximale lorsque Cln2/Cdk1, Cla4 et Bem1 étaient présentes dans la réaction. Suite à l'utilisation d'un mutant pour la phosphorylation par Cln2/Cdk1, nous avons pu conclure que cette kinase n'avait pas d'effet direct sur Cla4. Lors d'essais sur la fonction de la phosphorylation de Cdc24 sur l'interaction avec Bem1, nous avons constaté que la phosphorylation jouait un rôle positif. Les interactions semblaient même accrues lorsque les phosphorylations de Cdc24 étaient réalisées en présence de la protéine d'échafaudage notamment pour Cla4. En revanche nous avons observé un effet inhibiteur de la protéine Rga2 sur la phosphorylation de Cdc24 par Cla4.

Chapitre 3: Dynamique et phosphorylation des GAPs régulant Cdc42 au cours du cycle cellulaire.

La capacité des GTPases monomériques à être activées et inactivées rapidement en fait des interrupteurs moléculaires efficaces (Bishop and Hall 2000). Leur activation via leur liaison au GTP leur permet d'interagir et d'activer leur effecteurs (Pai, Kabsch et al. 1989). L'hydrolyse du GTP en GDP modifie la conformation des GTPases, ce qui interrompt l'interaction avec leurs effecteurs, mettant ainsi fin au signal biochimique. Le grand nombre d'effecteurs de la Rho GTPase Cdc42 lui permet de réguler un grand nombre de processus comme la polarité cellulaire, le remodelage du cytosquelette d'actine, le trafic membranaire, la migration cellulaire, l'adhésion ou encore la prolifération cellulaire chez les mammifères (Melendez, Grogg et al. 2011). Il est primordial que ces processus fondamentaux soient parfaitement régulés pour que la cellule puisse fonctionner normalement. Il n'est donc pas surprenant qu'une dérégulation de Cdc42 (activation) ait été montrée comme affectant la transformation cellulaire (Qiu, Abo et al. 1997). Les cycles d'activation et d'inactivation sont catalysés par des protéines GEF et GAP, de l'anglais Guanine nucleotide Exchange Factor et GTPase Activating Protein respectivement (Hart, Eva et al. 1991; Ahmadian, Hoffmann et al. 1997). Ces protéines ont souvent un caractère oncogène et suppresseur de tumeur respectivement (Ron, Graziani et al. 1989; Katzav, Cleveland et al. 1991; Miki, Smith et al. 1993; Murgia, Anglani et al. 1998; Durkin, Yuan et al. 2007).

Chez la levure, les protéines GAP pour la GTPase Cdc42, qui sont au nombre de 4 (Rga1, Rga2, Bem2 et Bem3), sont elles aussi phosphorylées au cours du cycle cellulaire et montrent une phosphorylation maximale lorsque la cellule polarise (Knaus, Pelli-Gulli et al. 2007; McCusker, Denison et al. 2007; Sopko, Huang et al. 2007). Cependant ce pic de phosphorylation pourrait avoir un rôle dans l'établissement de la polarité, comme certaines études récentes semblent le confirmer. Par exemple la surexpression de la protéine Bem3 mutée pour 5 sites de phosphorylation présente une létalité synthétique en présence d'un mutant pour la GEF cdc24. En abrogeant l'activité de Bem3 en mutant l'arginine critique pour la fonction GAP, cette létalité synthétique est perdue. Cela suggère que cette létalité est due à une activation constitutive de la protéine Bem3. Similairement, la surexpression de Rga2 couplée à la délétion de certaines protéines impliquée

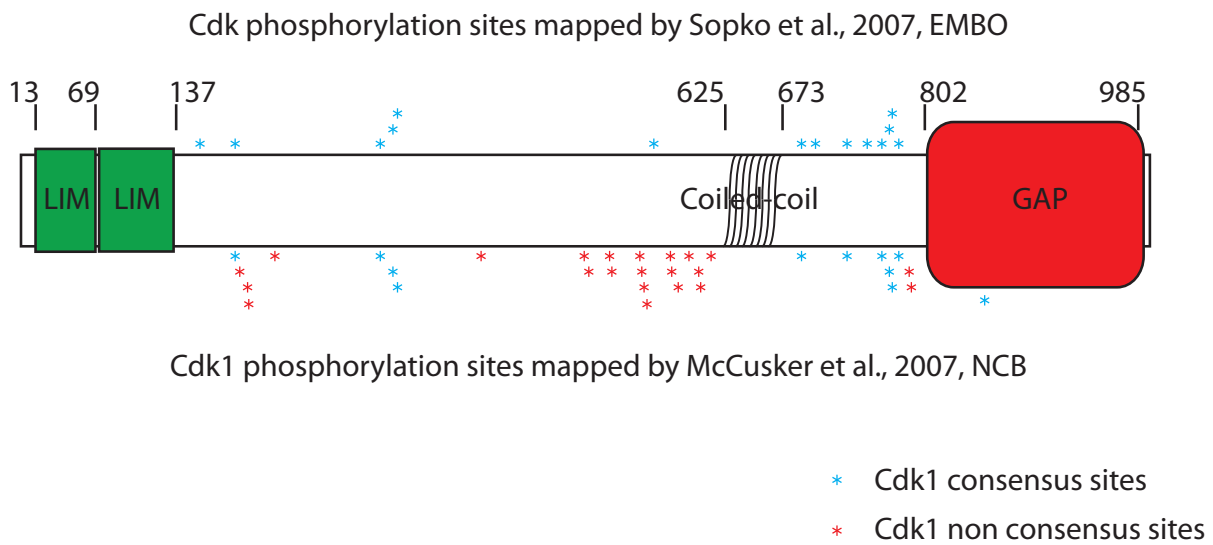


Figure III-1. Schematic representation of the domain organization within Rga2, including the mapped Cln2/Cdk1 phosphorylation sites.

Cyan stars are minimal Cdk consensus site (S/TP) and red stars are non consensus sites.

At the top of the protein are represented sites mapped by Sopko *et al.* and at the bottom are sites mapped by McCusker *et al.*

All Cln2/Cdk1 phosphorylation sites corresponding to minimal consensus for Cdk1 (cyan stars at the bottom of the protein) were mutated to alanine by directed mutagenesis in the *rga2-ps1* mutant. All known Cln2/Cdk1 phosphorylation sites were mutated to alanine by directed mutagenesis in the *rga2-ps2* mutant (red and cyan stars).

dans le cycle cellulaire (kinase Pho85, ou cyclines Cln1/Cln2 simultanément) mène à une absence de croissance polarisée. Après avoir identifié 13 sites de phosphorylation sur Rga2, Sopko et son équipe ont décidé de tester la surexpression de mutants pour la phosphorylation et ont constaté un effet toxique pour certains d'entre eux. Cette toxicité fut associée à une accumulation de cellules dépolarisées, mettant en évidence un rôle clé de la phosphorylation de Rga2 lors de la polarisation cellulaire.

McCusker *et al.* ont par ailleurs identifié 33 sites de phosphorylation par Cln2/Cdk1 sur Rga2, dont 9 en commun avec Sopko *et al.* (Figure III-1). Il est intéressant de constater que 19 parmi ces 33 sites ne correspondent pas au site minimal consensus de phosphorylation. Il existe plusieurs différences entre les approches de Sopko *et al.* et McCusker *et al.*. Premièrement les kinases utilisées par Sopko *et al.* étaient produites dans des cellules d'insecte alors que celles utilisées par McCusker *et al.* provenaient de purification à partir de levure. Il est possible que les kinases de Sopko *et al.* ne soient pas totalement fonctionnelles ou moins actives. Deuxièmement Sopko *et al.* ont utilisé des protéines tronquées pour leurs analyses, la phosphorylation de site non consensus dépendraient peut-être de la phosphorylation de sites consensus adjacents. Ces sites sont présents normalement dans la protéine entière pourraient être absents des fragments utilisés car ceux-ci étaient tronqués.

Les sites de phosphorylation sont répartis tout au long de la protéine, dans des régions non globulaires selon les prédictions des études structurales, à l'exception d'un site présent dans le domaine GAP (Figure III-1). De même les sites de phosphorylation semblent organisés en 4 groupes, situés immédiatement après le deuxième domaine LIM (sites essentiellement non consensus), puis un peu plus loin (sites consensus), les deux derniers groupes encadrant le domaine coiled-coil (sites consensus pour l'un, non consensus pour l'autre). Notre étude se place dans la continuité de ce travail. Dans le but de tester le rôle des sites de phosphorylation détectés par McCusker *et al.* lors de la polarisation cellulaire, deux constructions ont été réalisées. La première, appelée *rga2-ps1*, a été mutée uniquement pour les sites consensus de Cln2/Cdk1, alors que la seconde, *rga2-ps2*, a été mutée pour tous les sites détectés (Table II). Ces

<i>rga2-ps1</i>	<i>rga2-ps2</i>
T191, T320, S330, S334, S692, S733, S763, S770, S772, T779, S853	T191, S197, S203, S204, T226, T320, S330, S334, S408, T500, T504, S523, S524, S549, S550, S551, S552, S576, S577, S584, T593, S601, T602, S613, S692, S733, S763, S770, S772, T779, S788, S789, S853

Table II. Mutated residues in *rga2-ps1*, *rga2-ps2* and *Cdc24-ps* constructs

Previously mapped phosphorylation sites were mutated by directed mutagenesis

deux mutants ont été observés *in vivo*. Nous avons donc testé l'effet de ces mutations *in vivo* en testant la croissance des cellules et leur taille.

A) Quel est l'effet des mutations pour la phosphorylation de Rga2 par Cln2/Cdk1?

Dans un premier temps nous avons décidé de tester l'effet de ces mutations sur la croissance en présence de la protéine Rga2 non mutée. Pour ce faire nous avons généré des constructions plasmidiques contenant les différents allèles de *RGA2*. L'expression de ces allèles étant sous la dépendance du promoteur naturel de *RGA2*, le niveau d'expression attendu par cette technique est proche de la normale. Avec pour objectif d'étudier l'effet synthétique des mutations pour la phosphorylation de Rga2 avec la mutation de la GEF Cdc24, nous avons par la suite transformé différentes souches avec ces constructions. Ainsi une souche contrôle et une souche *cdc24-74* ont été utilisées. La protéine mutante *cdc24-74* présente deux substitutions dans son domaine PB1, la lysine 801 et la tyrosine 818 remplacées par une asparagine et une histidine respectivement. Basé sur la structure générée par Ogura *et al.*, l'asparagine est située sur la face externe du dimère des domaines PB1 de Bem1 et Cdc24, alors que l'histidine est positionnée à l'interface de ces deux domaines (Panel A de la Figure M-1) (Ogura, Tandai et al. 2009). Par ailleurs la tyrosine est fortement conservée chez les homologues de Cdc24 (Panel B de la Figure M-1). Ce mutant a été isolé lors d'un crible du Dr McCusker pour découvrir de nouveaux mutants *cdc24*. Cette souche a montré un défaut de croissance à 30°C, défaut menant à une absence de croissance à 37°C (panel C de la Figure M-1). Cette mutation est récessive puisqu'elle peut être complémentée par une copie surnuméraire du gène sauvage, suggérant fortement que le gène affecté était bien *CDC24*. Le Dr. McCusker a par ailleurs montré que ce mutant pouvait être supprimé totalement ou partiellement par l'expression surnuméraire de Bem1 et Cdc42 respectivement (Panel D de la Figure M-1). La protéine *cdc24-74* présente un défaut d'interaction avec la protéine Bem1 *in vivo* à température non permissive (37°C), et la souche présente des défauts de polarisation et parfois même plusieurs petits bourgeons.

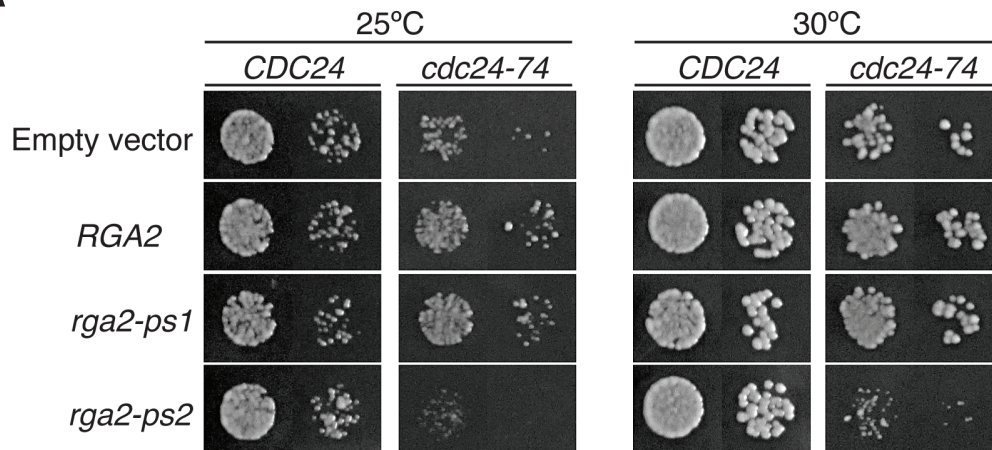
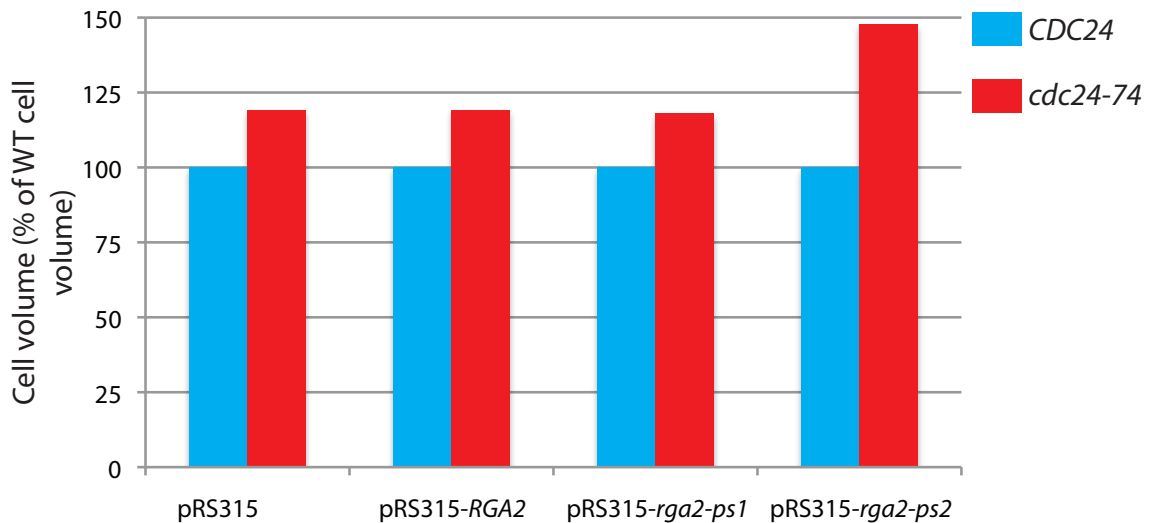
A**B**

Figure III-2. *rga2-ps2* phosphorylation mutation shows synthetic effect with *cdc24-74* mutation

(A) Growth assay of Rga2 constructs transformed in *cdc24-74* and control strains at different temperatures.

(B) Comparison of cell sizes between cells expressing Rga2 and mutants in *CDC24* and *cdc24* strains. Cells were grown asynchronously at 30°C to 0.6 OD and fixed with formaldehyde. Cell volumes were acquired using Coulter counter apparatus allowing measurement of 5000 to 10000 cells per run.

Nous avons alors réalisé des tests en goutte afin d'observer la croissance de colonies inséminées à différentes concentrations et à différentes températures (25 et 30°C). Après deux jours de pousse des différences de croissance furent observables (Figure III-2, panel A). Alors que le mutant *rga2-ps1* ne semble pas avoir d'effet sur la croissance, le mutant *rga2-ps2* présente une inhibition de la croissance à 25 et 30°C. Afin de compléter l'analyse de ces mutants nous avons mesuré la taille des cellules à l'aide d'un Coulter counter. Cette machine permet de mesurer la taille de particules mises en suspension dans un électrolyte (en l'occurrence la solution de stockage des cellules). Pour réaliser cette expérience les cellules en phase exponentielle de croissance (30°C) ont dans un premier temps été fixées avec 4% de formaldéhyde pendant 30 minutes avant d'être lavées (1X PBS, 0,05% tween et 0,02mM azide de sodium). Les cellules *cdc24-74* sont naturellement légèrement plus volumineuses que la souche de référence (Figure III-2, panel B) avec une augmentation du volume moyen de 119%. Cependant les cellules *cdc24-74* exprimant *rga2-ps2* ont montré une augmentation de volume d'environ 148% par rapport à la souche de référence. Cette augmentation globale de la taille des cellules peut être corrélée avec un excès de croissance isotrope résultant d'un retard dans la mise en place de la croissance polarisée, voire d'une absence de polarisation. Ce résultat est en accord avec le défaut de croissance de la colonie observé pour ce mutant.

Ces expériences montrent que la mutation de tous les sites de phosphorylation de Rga2 et pas seulement les sites consensus de Cdk1 résultent en un défaut de taille cellulaire lorsqu'elle est combinée à la mutation *cdc24-74*. Les défauts de croissance obtenus par addition de *rga2-ps2* (exprimé par le promoteur naturel *RGA2*) à la mutation *cdc24-74* pourraient suggérer une activité accrue du produit de *rga2-ps2*. Plus particulièrement, l'absence de phénotype pour le mutant *rga2-ps1* semble montrer que les sites non consensus phosphorylés par Cln2/Cdk1 revêtent une importance particulière. Cependant, les constructions *rga2-ps* étaient portées par des plasmides centromériques et par conséquent le nombre de copies de la protéine pouvait être légèrement supérieur à la situation naturelle (une copie par ploïdie). De même la copie

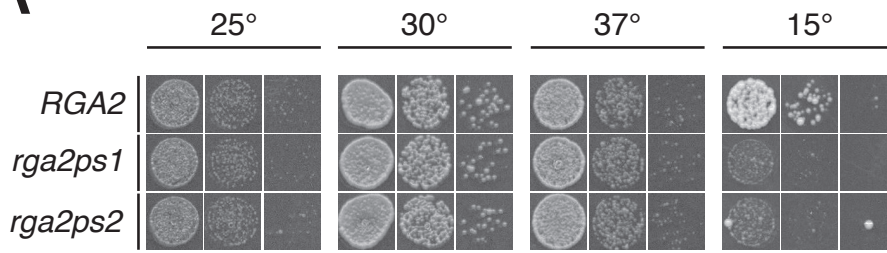
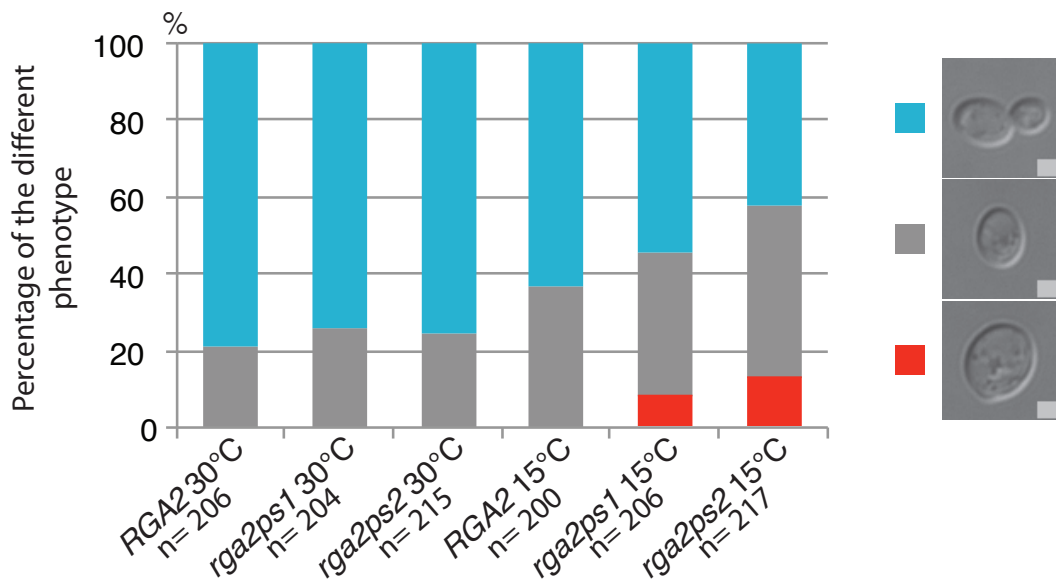
A**B**

Figure III-3. Locus replacement of *RGA2* by phosphorylation mutants shows defects at 15°C

(A) Growth assay showing of *RGA2* and phosphorylation mutants at different temperature.

(B) Quantification of unbudded cells at 30°C and 15°C for *RGA2* and phosphorylation mutants.

endogène de *RGA2* était toujours présente, cela pourrait expliquer l'absence de phénotype pour *rga2-ps1*.

B) Peut-on observer ce phénotype lorsque les formes mutantes sont intégrées au locus?

Afin de se rapprocher des conditions endogènes nous avons décidé d'intégrer ces constructions au locus *RGA2* dans une souche sauvage. Pour cela nous avons dans un premier temps supprimé le gène à l'aide de l'ORF *caURA3*. Puis nous avons intégré les différentes formes de *RGA2* au locus en utilisant un moyen de sélection positif, le 5-FOA.

Une fois les différentes souches obtenues nous avons réalisé de nouveaux tests en goutte sur ces souches. Cette fois-ci, nous avons exploré une gamme de températures plus étendue (Figure III-3, panel A). A 25, 30 et 37°C nous n'avons observé aucun phénotype. Cependant, la croissance des mutants pour la phosphorylation s'est avérée diminuée à 15°C. Cette température a été testée dans le but d'observer un effet si le métabolisme général de la cellule était ralenti. Nous avons alors choisi d'examiner les phénotypes de culture à 15°C et de les comparer aux phénotypes observés à 30°C.

La visualisation des cellules nous a permis de constater que certaines cellules présentaient un défaut de croissance polarisée à 15°C. En effet les souches mutantes présentaient des proportions non négligeables de cellule sans bourgeon et de taille accrue. Cela nous a conduit à les classer en trois catégories différentes: les cellules ayant bourgeonnées, les petites, et les grandes non bourgeonné dont la taille avoisinaient celle des cellules ayant bourgeonné. Dans un premier temps nous avons constaté pour la souche de référence que le nombre de cellules ne présentant pas de bourgeon était accru lors de culture à 15°C (37% contre 21% à 30°C). L'analyse des mutants pour la phosphorylation à 15°C a montré une proportion encore plus élevée de cellules n'ayant pas bourgeonné, la différence étant plus marquée pour *rga2-ps2* (57%) que pour *rga2-ps1*(46%) en comparaison de la souche de référence (37%) (panel B de la Figure III-3). Les cellules de grande taille n'ayant pas bourgeonné furent observées uniquement dans les mutants (8 et 13% pour *rga2-ps1* et *rga2-ps2*

respectivement). Dans la mesure où la croissance polarisée nécessite des cycles d'activation/inactivation de Cdc42, ces phénotypes suggèrent que la phosphorylation, absente chez les mutants, régule ces cycles via un contrôle de l'activité GAP dans les cellules sauvages. La mutation des sites non consensus additionnée aux mutations des sites consensus dans *rga2-ps2*, conduit à des phénotypes plus marqués. Malgré ces résultats encourageants nous n'avons malheureusement pas pu continuer d'étudier ces mutants. En effet, leur conservation s'est avérée difficile : utilisés immédiatement après leur production, ces mutants ont montré deux fois les mêmes phénotypes, cependant après un stockage à -80°C, les phénotypes à 15°C n'étaient plus observables suggérant une adaptation des cellules à ce manque de phosphorylation de Rga2.

En conclusion, les résultats obtenus suggèrent que les mutations générées affectent la mise en place d'une croissance polarisée. L'aggravation des défauts de croissance de *cdc24-74*, suggère que ces mutants sont affectés pour leur activité GAP qui pourrait être accrue.

C) Quelle est la localisation des GAP de Cdc42 durant le cycle cellulaire?

Il a déjà été reporté que les quatre protéines GAPs de Cdc42 sont phosphorylées par les kinases du cycle cellulaire *in vivo*. Le niveau de phosphorylation de ces protéines évolue en permanence au cours du cycle cellulaire. Parallèlement, la localisation de ces protéines GAPs semble également dépendre du cycle cellulaire. En effet, il a été présenté que Bem3, Rga1 et Rga2 sont présentes au niveau du futur site de bourgeonnement (Caviston, Longtine et al. 2003). Puis elles sont présentes sous forme d'un croissant au fond du bourgeon avant d'être relocalisées au cou peu avant la division cellulaire. La protéine Bem2 présente une localisation similaire (bourgeon et cou) (Knaus, Pelli-Gulli et al. 2007). En dépit de ces travaux, il n'existe aucune étude montrant la localisation des 4 GAPs de Cdc42 en même temps qui témoignerait des zones où la GTPase pourrait être inactivée.

À cet effet nous avons réalisé un étiquetage à la GFP de toutes les GAPs connues de Cdc42 au locus dans le but d'avoir une vision d'ensemble des "domaines" GAP. Afin de connaître l'avancement du cycle cellulaire, nous avons

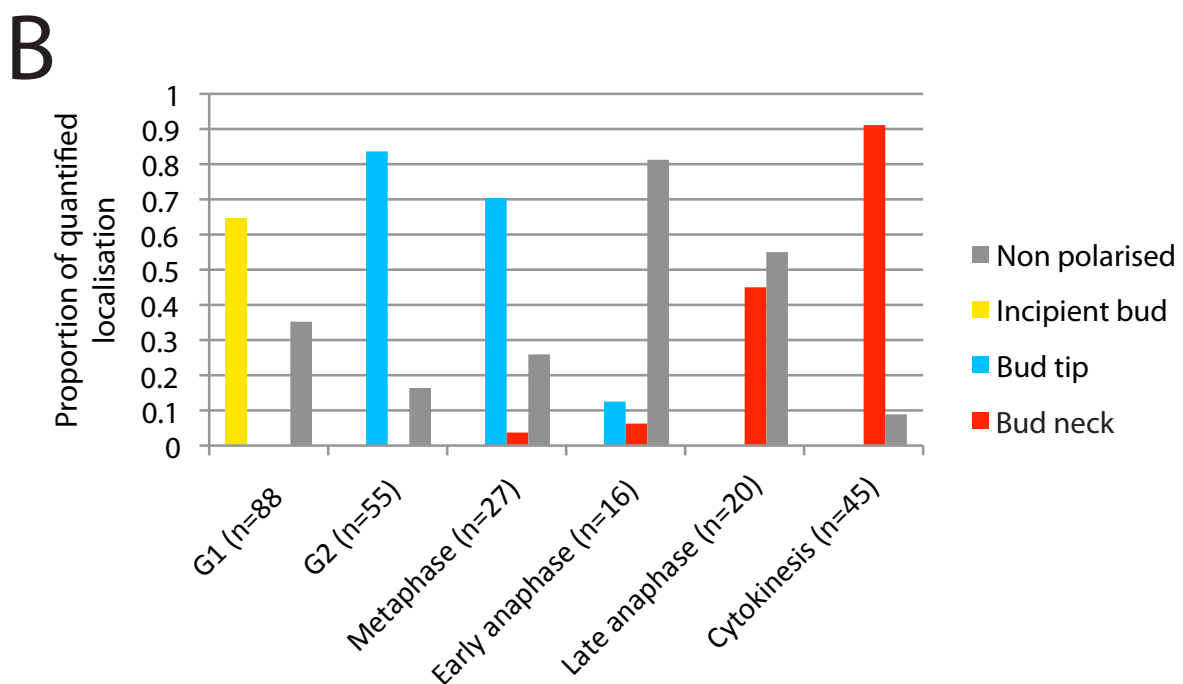
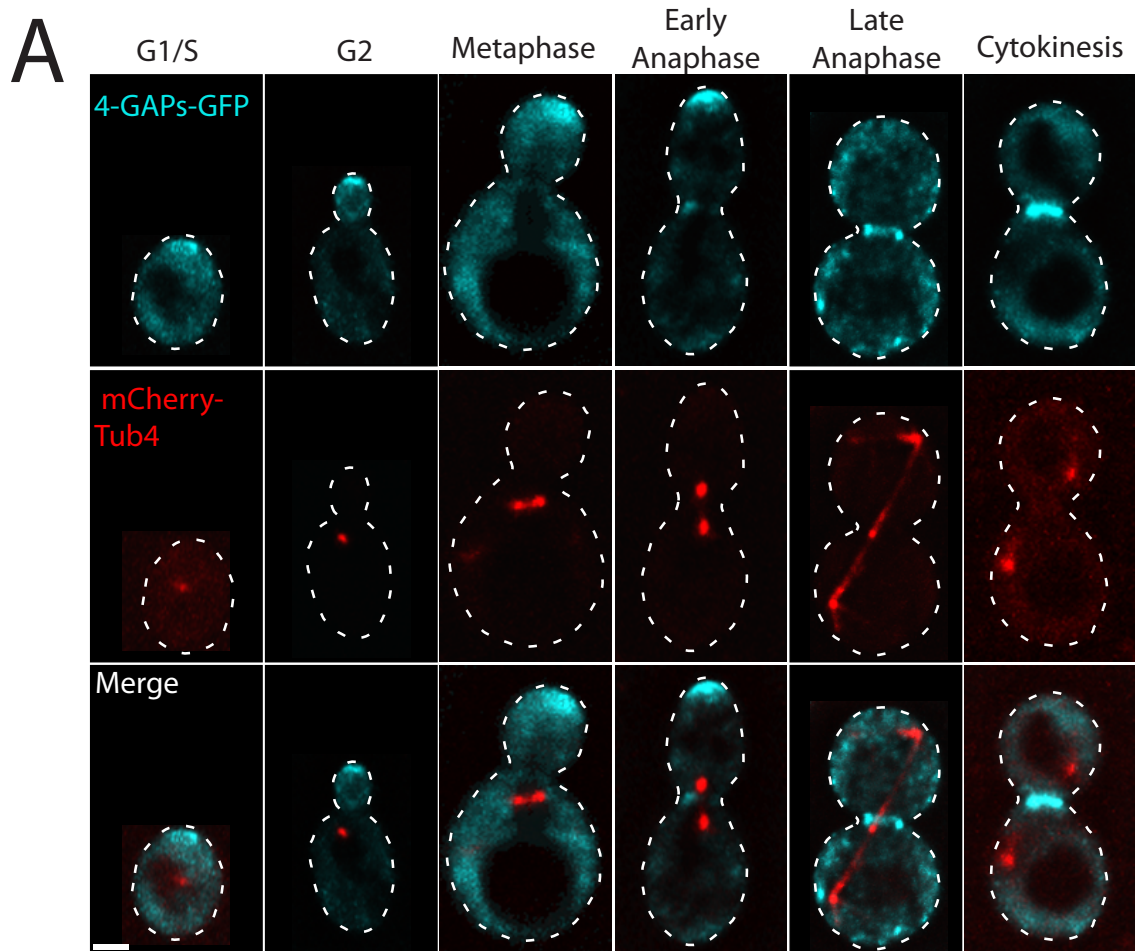


Figure III-4. Cell cycle-dependent localisation of Cdc42 GAPs.

(A) Simultaneous visualisation of Cdc42 GAPs and γ -Tubulin (Tub4). All Cdc42 GAPs and *TUB4* were tagged at their genomic loci with GFP or mCherry, respectively. This strain provides a global view of Cdc42 GAP localisation during the cell cycle. Scale bar is 2 μ m.

(B) Quantification of Cdc42 GAP localisation during the cell cycle. The number of cells at each phase are indicated in brackets.

visualisé la position et la forme des spindle pole bodies (SPB) en étiquetant la protéine Tub4 avec mCherry. Cette protéine est un γ -tubulin impliquée dans la nucléation des microtubules nécessaires à la migration des chromosomes. Elle est localisée au niveau des plaques internes et externes des SPB (Marschall, Jeng et al. 1996; Spang, Geissler et al. 1996). Ces derniers étant dupliqués à la fin de la phase G1 avant de se séparer pour migrer lors de la mitose, Tub4-mCherry est un marqueur du cycle cellulaire bien adapté à notre étude (Kahana, Schnapp et al. 1995; Jaspersen, Huneycutt et al. 2004).

L'acquisition simultanée des deux couleurs correspondant aux différents marqueurs (4GAPs-GFP et Tub4-mCherry) a été réalisée sur plusieurs plans z, séparés de 200nm. Chaque acquisition a ensuite été traitée par déconvolution et une projection des différents plans séparés de 200nm a été faite pour obtenir l'image finale. L'acquisition de la localisation des protéines GAPs de Cdc42 est montrée sur la Figure III-4 à différents instants du cycle cellulaire. Nous avons constaté une accumulation du signal GAP au site du futur bourgeon et dans le bourgeon lors de la croissance apicale. Puis le signal perd sa localisation polarisée au début de l'anaphase (élongation des SPB). Pour finir le signal est présent au niveau du cou en fin d'anaphase jusqu'à la cytokinèse (lorsque les SPB sont très allongés). Lors de ces derniers stades, les cellules sont polarisées au niveau du cou de la cellule. Lors de la fin de la mitose l'activité kinase de Cdk1 est absente. Cependant la localisation des protéines GAPs est polarisée au niveau du cou, ce qui suggère que cette localisation n'est pas dépendante de la phosphorylation par Cdk1 lors de la mitose.

La dynamique de la localisation des GAP au cours du cycle est très similaire à celle de la localisation des zones de polarisation (au niveau du bourgeon lors de la croissance apicale, puis le signal perd sa localisation polarisée lorsque la croissance est isotropique avant d'être à nouveau polarisé au niveau du cou en fin de cycle cellulaire).

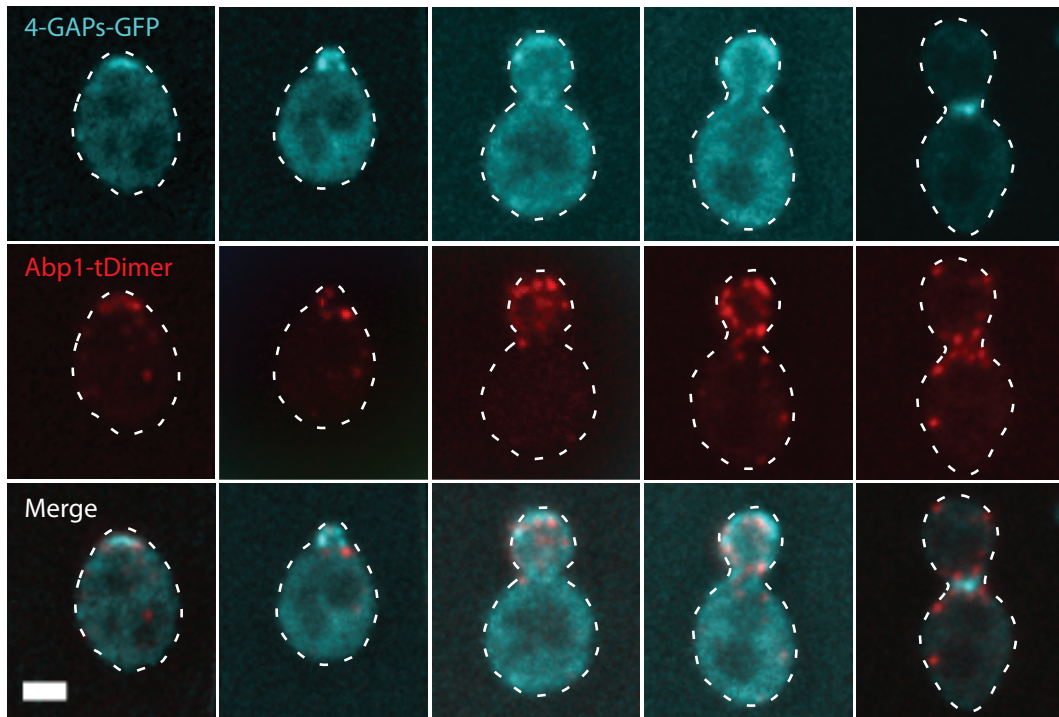
D) Les GAP colocalisent-elles avec les domaines endocytiques?

L'expérience précédente a montré que dans l'ensemble, les protéines GAP ont une localisation polarisée au cours du cycle cellulaire. Cette observation

semble contre intuitive avec le fait que Cdc42 doit être activée pour polariser la cellule. La formation d'un pôle robuste et dynamique de Cdc42 au niveau du site de polarisation est nécessaire pour établir un axe de polarité. Les résultats présentés précédemment diffèrent du modèle de régulation de Cdc42 proposé dans la levure *S. pombe*. L'étude de la protéine GAP de Cdc42, Rga4, a montré un rôle de celle-ci dans la conservation de la géométrie de la cellule durant le cycle cellulaire (Das, Wiley et al. 2007). Les auteurs ont montré que la délétion du gène codant cette protéine GAP conduisait à une augmentation de la largeur des cellules. Cette protéine, qui localise sur les cotés de la cellule, semble permettre l'inactivation de Cdc42 à ces niveaux. L'expression du domaine GAP de Rga4 permettait de diminuer significativement la largeur des cellules, prouvant que l'activité GAP est nécessaire au contrôle de cette géométrie. Par ailleurs la visualisation de mutants pour la régulation de Cdc42 a conduit Kelly *et al.* à la conclusion que ceux-ci régulaient Cdc42 en fonction de sa localisation dans la cellule. Les localisations exclusives d'une GEF (Scd1) et d'une GAP (Rga4), localisées aux extrémités ou sur le coté de la cellule, permet d'activer ou d'inactiver Cdc42 en fonction de sa position dans la cellule. Ces régulations dans des zones spécifiques de la cellule affectent directement la largeur de la cellule. Ainsi le découplage de zones d'activation et d'inactivation de la GTPase permet de générer un gradient de Cdc42 activé nécessaire à la croissance polarisée chez *S. pombe* (Kelly and Nurse 2011).

Le maintien du pôle de Cdc42 est dépendant de deux mécanismes de recyclage pour contrecarrer la diffusion de la protéine sur les membranes, un rapide et un lent (Slaughter, Das et al. 2009). Le mécanisme rapide implique un recyclage rapide de Cdc42 sous forme inactive via la RhoGDI Rdi1 (Slaughter, Das et al. 2009; Das, Slaughter et al. 2012). Cette protéine permet d'extraire la GTPase de la membrane en masquant le groupement -prenyl (Ueda, Kikuchi et al. 1990; Hori, Kikuchi et al. 1991; Koch, Tanaka et al. 1997). Rdi1 est localisée au bourgeon puis au cou lors de la mitose (Richman, Toenjes et al. 2004). Le deuxième mécanisme implique un recyclage via l'endocytose et l'exocytose (Slaughter, Das et al. 2009). Cdc42 est endocytée à la membrane en dehors du pôle puis redirigée vers l'endosome avant d'être exocytée à nouveau grâce aux

A



B

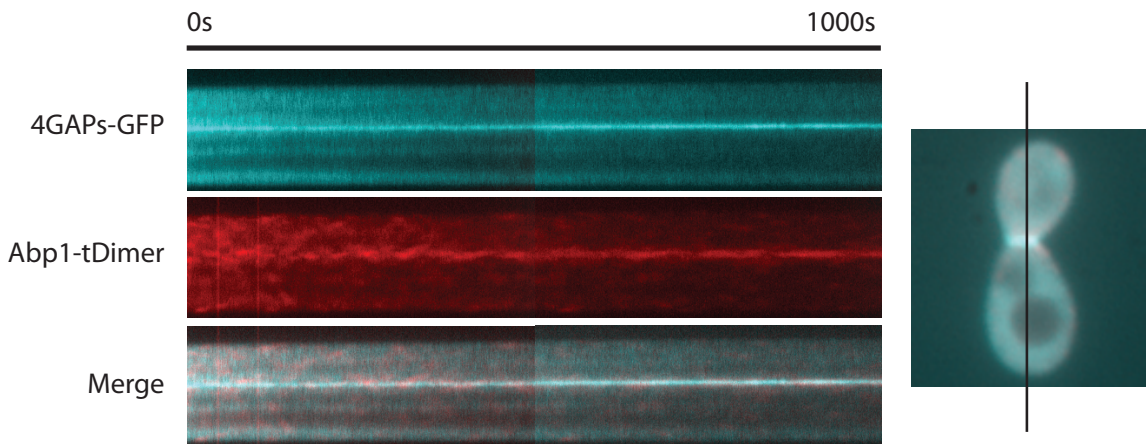


Figure III-5. Localisations of Cdc42's GAP and endocytosis

(A) Simultaneous visualisation of Cdc42 GAPs and Abp1. All Cdc42 GAPs and *ABP1* were tagged at their genomic loci with GFP or tDimer, respectively. This strain provides a global view of localisation of the proteins in different cell shapes. Scale bar is $2\mu\text{m}$

(B) Kymograph showing the relocalisation of the Cdc42 GAPs and Abp1 at the bud neck during the end of mitosis

câbles d'actine dirigés vers et par le pôle. De plus des cellules traitées avec de la latrunculine A ou B n'ont pas montré le même effet sur la polarisation de la localisation de Cdc42. En effet lorsque les cellules étaient traitées avec la première des deux toxines, Cdc42 présentait une localisation polarisée. En revanche l'utilisation de Latrunculine B a montré une perte de localisation polarisée de Cdc42 rapide (Irazoqui, Howell et al. 2005). La différence majeure entre ces deux toxines est que la Latrunculine B a moins d'effet sur les patches d'actine contrairement à Latrunculine A qui affecte toutes les structures d'actine. Cela suggère que l'endocytose est moins affectée lors de l'utilisation de Latrunculine B et donc que l'endocytose joue un rôle dispersif dans le processus de polarisation de la localisation de Cdc42 en l'absence d'exocytose. Les auteurs ont confirmé ce résultat en utilisant des mutants pour les tropomyosines, ces mutants perdaient la localisation polarisée de Cdc42 rapidement. Il a été démontré dans des travaux précédents que les domaines de trafic membranaire ont des localisations polarisées et que ces deux domaines coopéraient pour établir la polarité (Jose, Tollis et al. 2013). Même s'il paraît clair que l'inactivation de Cdc42 est requise pour être prise en charge par Rdi1, ce n'est *a priori* pas le cas pour être recyclée par l'endocytose. En effet, nous ne savons pas si Cdc42 peut être endocytée sous toutes ses formes ou si ce mécanisme est spécifique. Observer la localisation globale des GAPs nous permet de connaître les régions où celles-ci peuvent inactiver Cdc42. Nous avons donc voulu observer la localisation simultanée des GAPs et des domaines endocytiques et constater si ces localisations pouvaient se superposer.

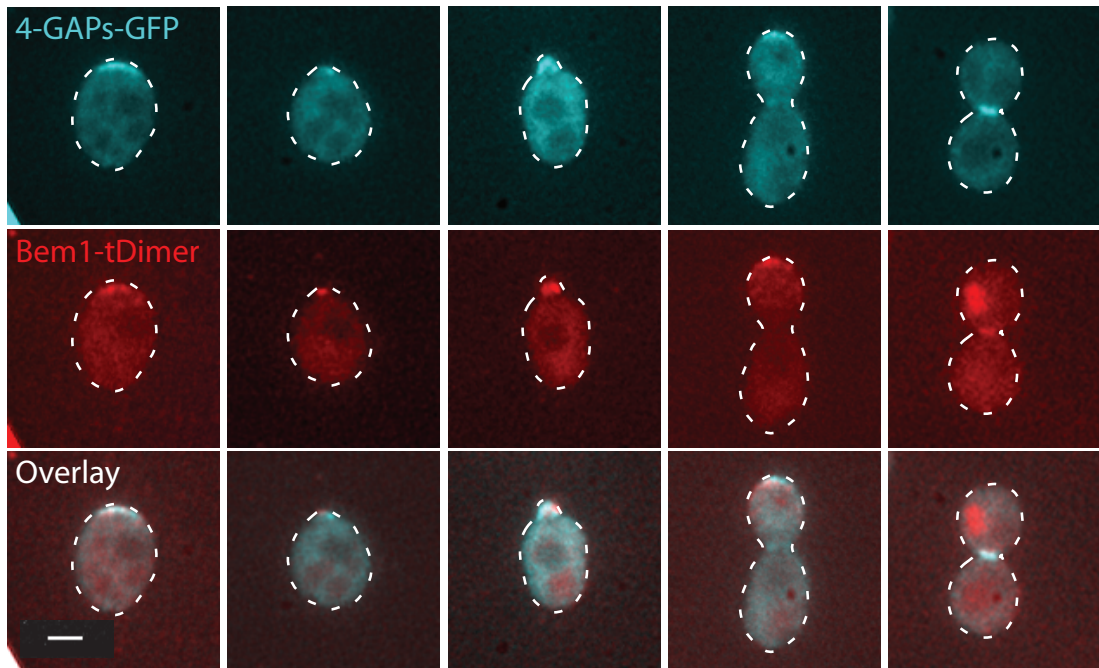
Pour ce faire nous avons, comme dans la série d'expérience précédente, étiqueté les GAP avec une GFP intégrée au locus. Pour marquer l'endocytose, nous avons utilisé un marqueur Abp1-mCherry. Abp1 est une protéine interagissant avec l'actine corticale et qui est requise pour l'endocytose (Kaksonen, Sun et al. 2003). Nous avons ensuite observé simultanément ces deux marqueurs dans des cellules à différents stades du cycle (Figure III-5, panel A). L'imagerie a été réalisée de la même manière que l'expérience précédente. Ainsi nous avons pu constater que les protéines GAPs ne se localisaient pas au niveau des domaines d'endocytose et semblaient même

être séquestrées à l'extrémité du bourgeon, alors que l'endocytose se concentre plutôt autour de cette extrémité dans le bourgeon. Nous avons aussi constaté que lorsque les GAPs se relocalisaient au niveau du cou, l'endocytose formait deux anneaux de part et d'autre de celui-ci. Ces deux types de marqueurs (les domaines GAP et endocytiques) semblaient s'exclure au niveau du cou. Nous avons alors voulu constater la chronologie des événements de relocalisation de ces deux marqueurs au niveau du cou lors de la mitose (Figure III-5, panel B).

Pour cela nous avons réalisé des acquisitions en temps réel sur des cellules supposées être prêtes à se diviser (avec un gros bourgeon). L'acquisition simultanée des signaux pour les GAPs-GFP et Abp1-tDimer a été réalisée avec un intervalle d'une seconde entre chaque vue. Ces vues ont été acquises sur un unique plan avoisinant le centre de la cellule (sur le plan z). Puis un kymographe représentant le signal pour les deux canaux le long d'un axe traversant la cellule dans le sens bourgeon/cellule mère (axe vertical) au cours du temps (axe horizontal) a été réalisé. Nous pouvons constater qu'au début de l'acquisition les GAPs sont déjà présentes au niveau du cou alors que les domaines d'endocytose semblent plus diffus dans la cellule : les protéines GAP semblent recrutées avant que les événements d'endocytose ne se concentrent au niveau du cou. Cependant ces acquisitions ont été réalisées sur un petit nombre de cellules, ce travail nécessite d'être approfondi pour confirmer ces résultats préliminaires.

En conclusion, bien qu'ayant à l'échelle de la cellule des localisations similaires au cours du cycle cellulaire, les GAP et l'endocytose occupent des domaines bien distincts au niveau de la membrane, que ce soit au moment de la croissance polarisée du bourgeon ou au moment de la division cellulaire. Y a-t-il un bénéfice fonctionnel pour la cellule à avoir ses domaines GAP et d'endocytose juxtaposés ? Si oui, quel est-il ? Ces expériences ne permettent pas de répondre à cette question, car ces résultats n'excluent ni la présence de Cdc42-GTP ni de Cdc42-GDP au niveau des domaines endocytiques. En effet l'activation de la GTPase permet le recrutement des protéines Las17 et Vrp1 qui contribuent à l'activation du complexe Arp2/3 et à la formation des patches d'actine (Lechler, Jonsdottir et al. 2001). De plus Cdc42 bloquée sous forme GTP ou GDP peut être recyclée, bien que plus lentement, en l'absence de Rdi1 (Slaughter, Das et al. 2009). Ce résultat

A



B

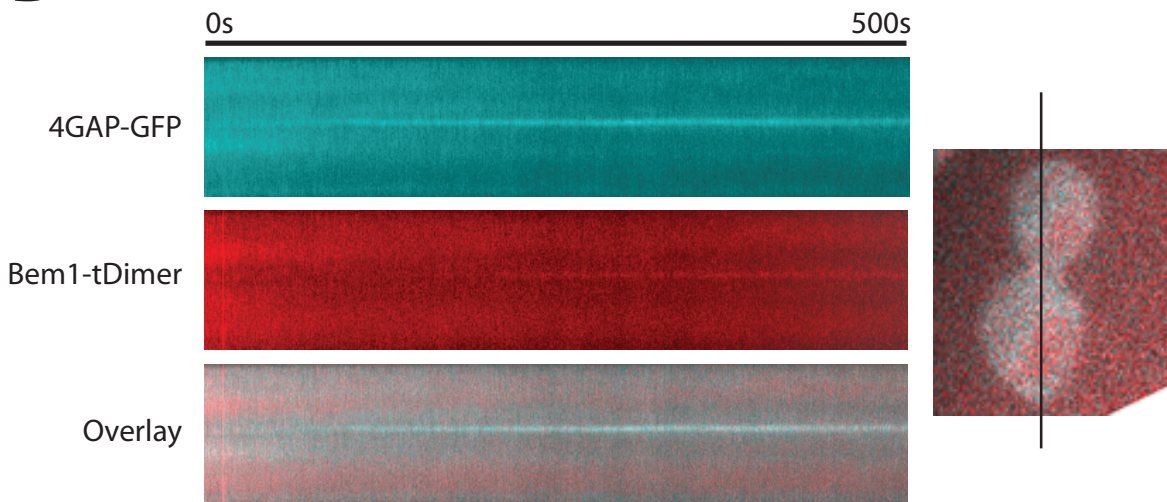


Figure III-6. Localisations of Cdc42 GAPs and activated Cdc42 seem to overlap.

(A) Simultaneous visualisation of Cdc42 GAPs and Bem1. All Cdc42 GAPs and Bem1 were tagged at their genomic loci with GFP or tDimer, respectively. This strain provides a global view of localisation of the proteins in different cell shapes. Scale bar is $2\mu\text{m}$

(B) Kymograph showing the relocalisation of the Cdc42 GAP's and Bem1 at the bud neck during the end of mitosis.

suggère qu'en l'absence de cycle d'activation-inactivation Cdc42 peut être endocytée, mais pas recyclée par Rdi1. Exclure les GAPs des domaines d'endocytose aurait alors pour rôle d'augmenter leur concentration à l'extrémité du bourgeon et au cou, là où le recyclage de Cdc42 par Rdi1 nécessite ces cycles d'activation-inactivation. Au vu des questions ouvertes par les résultats de l'étude précédente, nous avons décidé d'étudier la localisation simultanée des GAP et de la forme active de Cdc42.

E) Quelle est la localisation des GAP en fonction de Bem1?

L'activation de Cdc42 est nécessaire à son interaction avec ses effecteurs, et par conséquent à l'activation des voies qu'elle régule. Cependant la stabilité du pôle de Cdc42 au niveau du bourgeon requiert une rotation entre les formes GTP et GDP de la GTPase (Slaughter, Das et al. 2009). En effet, une forme mutante de Cdc42 constitutionnellement active ne peut pas être recyclée par la voie Rdi1, alors que ce mutant présentant une mutation additionnelle ne pouvant pas interagir avec ses effecteurs est recyclé plus rapidement. Cela suggère que l'interaction de Cdc42 avec ses effecteurs ralentit le recyclage via le trafic membranaire. Pour cela Cdc42 et ses régulateurs doivent colocaliser afin de réguler la GTPase. Il est déjà connu que les GAPs localisent aux sites de polarisation. Cependant la visualisation simultanée des quatre protéines GAPs et de Cdc42 activée n'a jamais été réalisée. Les constructions où Cdc42 étaient étiquetées avec mCherry étant peu fluorescentes et les constructions étiquetant les domaines CRIB de Cla4, Ste20 et Gic2 semblant toxiques (les cellules présentaient un défaut de croissance), nous avons choisi de visualiser une protéine connue pour colocaliser avec Cdc42, en étiquetant avec tDimer la protéine Bem1. Cette protéine semble être au centre du processus de formation du pôle de Cdc42 et qui à ce titre est supposée adopter la même dynamique spatio-temporelle que Cdc42 (Zheng, Bender et al. 1995; Bose, Irazoqui et al. 2001).

Nous avons ensuite observé la localisation dynamique de ces différents marqueurs au cours du cycle cellulaire (Figure III-6, panel A). L'acquisition a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Au début du cycle, le

marqueur Bem1-mCherry est localisé au niveau du futur bourgeon avec les protéines GAPs et les deux structures forment un large croissant. Puis ce croissant semble se concentrer au niveau du futur bourgeon. Lors de la croissance apicale du bourgeon les deux structures continuent d'être localisées à l'extrémité du bourgeon avant de diffuser et de se relocaliser au niveau du cou. Même si à l'approche de la mitose les deux marqueurs colocalisent au niveau du cou nous avons voulu déterminer lequel prenait position en premier.

Pour cela nous avons réalisé le même type d'acquisition en temps réel que dans la section précédente et nous avons observé l'ordre d'apparition des différents marqueurs au niveau du cou (Figure III-6, panel B). Les acquisitions ont été réalisées toutes les deux secondes sur un temps de 500 secondes. Contre toute attente, nous avons observé que les protéines GAPs sont localisées au niveau du cou avant la protéine Bem1, ce qui pourrait suggérer que l'activation de Cdc42 est chronologiquement postérieure à l'arrivée des GAPs. Cependant il est nécessaire de reproduire ce genre d'expérience afin de confirmer cette chronologie. Actuellement les données acquises souffrent d'un manque de robustesse du fait du peu d'acquisitions réalisées.

Les GAPs sont des régulateurs essentiels de Cdc42. Les résultats préliminaires concernant Rga2 suggèrent que la phosphorylation par Cln2/Cdk1 inhibe son activité. La localisation des GAPs au cours du cycle cellulaire a montré une localisation calquée sur celle de Cdc42 activée avec une possible exclusion des zones endocytiques. Ces résultats vont dans le sens d'un scénario dans lequel la GTPase a besoin de cycles d'activation-inactivation pour être physiologiquement active. Ce scénario est cependant différent des données connues chez *S. pombe* chez qui la ségrégation spatiale de GEF et de GAP de Cdc42 permet de générer un gradient d'activation de la GTPase qui contrôle directement la géométrie cellulaire.

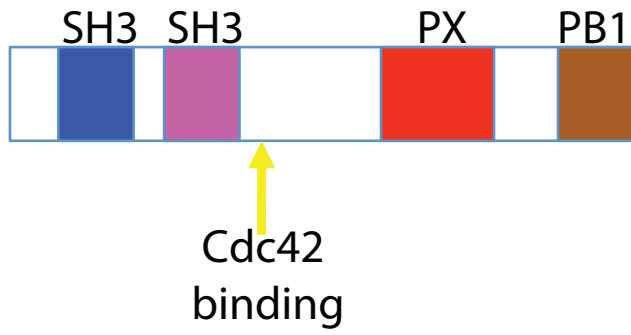
Chapitre 4: Etude préliminaire de la
structure de la protéine d'échafaudage,
Bem1.

La fonction d'une protéine dépend de sa structure. Celle-ci dirige la manière dont la protéine interagit avec d'autres protéines, ou bien son activité. La protéine Bem1 est un des éléments centraux de la polarité chez *S. cerevisiae*. En effet elle interagit avec de nombreuses protéines clés. Ces interactions ont précédemment été mises en évidence. Elle peut ainsi s'apparier avec Cdc42, Cdc24, Cla4, Ste20, Boi1 ou Boi2 (Leeuw, Fourest-Lieuvain et al. 1995; Bender, Lo et al. 1996; Matsui, Matsui et al. 1996; Bose, Irazoqui et al. 2001; Winters and Pryciak 2005). De même la protéine Bem1 peut interagir avec les membranes (Stahelin, Karathanassis et al. 2007). Il s'agit d'une protéine d'échafaudage car elle est à la base de la mise en place de complexes protéiques. Par exemple Bem1 permet la présence de Cdc24 et de sa kinase Cla4 dans un même complexe (Kozubowski, Saito et al. 2008). En l'absence de Bem1, la protéine Cdc24 n'est pas maintenue au niveau du bourgeon (Gulli, Jaquenoud et al. 2000; Butty, Perrinjaquet et al. 2002). L'interaction entre Bem1 et les protéines Cdc42 et Cdc24 est supposée impliquée dans une boucle d'auto-activation de Cdc42 (Gulli, Jaquenoud et al. 2000). En effet lors de la croissance apicale, Cdc42 recruterait Bem1 qui recruterait Cdc24. La GEF activerait alors les protéines Cdc42 alentour.

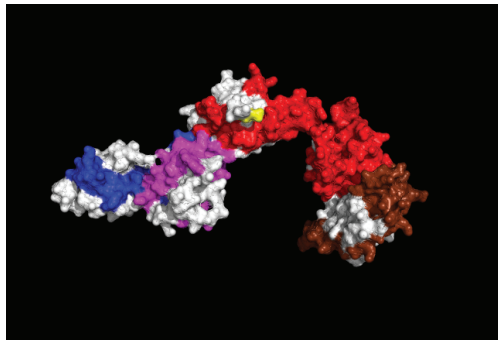
Le fait que Bem1 soit impliquée dans différents processus biologiques en fait une bonne candidate pour des études structurales. La compréhension et la résolution de sa structure permettraient de comprendre son mode de régulation. Pour cela nous avons entrepris différentes études. Ne disposant d'aucune donnée structurale globale de la protéine Bem1 nous avons donc voulu en savoir plus sur sa structure. Bem1 est une protéine composée de plusieurs domaines. Un domaine est une partie d'une protéine présentant une séquence et une fonction connue. Du côté amino-terminal au carboxy-terminal on trouve deux domaines SH3, un domaine PX et un domaine PB1, ce dernier étant impliqué dans l'interaction avec Cdc24. Le site d'appariement de Cdc42 sur Bem1 est aussi connu et situé en aval du deuxième domaine SH3. Par homologie avec des domaines de même nature sur d'autres protéines, il est possible de présumer de la structure de chacun de ces domaines indépendamment. Cependant l'organisation relative tridimensionnelle des différents domaines n'est pas connue et pourrait permettre de mieux comprendre comment la protéine

fonctionne. Dans le cadre de la boucle d'auto-activation de Cdc42 par exemple, les positions relatives de la GTPase et de sa GEF pourraient avoir une importance. Nous avons donc utilisé le serveur I-TASSER pour modéliser Bem1 *in silico*. Ce serveur est une plateforme automatisée de prédiction de structure et de fonction protéique (Zhang 2008; Roy, Kucukural et al. 2010). Pour cela le serveur réalise deux types de prédictions. Tout d'abord, il simule la structure de la chaîne carbonée qui sert de support aux différents domaines, et détecte ainsi les domaines probables. Ensuite, il simule la structure des différents domaines détectés séparément. Pour cette seconde simulation, le serveur agit en plusieurs étapes. Dans un premier temps le serveur cherche à identifier les séquences d'acides aminés des domaines à des séquences similaires sur des protéines de structure connue, en combinant plusieurs programmes informatiques de détection et en ne conservant que les résultats les plus probables, domaine par domaine. Par la suite, les fragments sont assemblés, en utilisant une méthode de simulation dite « par replica exchange Monte Carlo ». Cette méthode consiste à réaliser des assemblages « test », puis à calculer l'énergie correspondant à l'assemblage testé en se limitant à la modélisation des carbones alpha des acides aminés. En modifiant l'assemblage de manière itérative et en comparant les énergies des tests successifs, le simulateur génère un grand nombre de structures qui, en moyenne, représentent des configurations spatiales de la protéine qui sont probables dans les conditions thermodynamiques du laboratoire. Cette méthode permet de générer plusieurs structures moyennes probables. Lors de la simulation des différents arrangements « test », le simulateur prend en compte différentes données connues ou contraintes observées sur des séquences homologues (ponts hydrogène, hydrophobicité ou conformation des chaînes carbonées), ainsi que les contraintes spatiales dans l'alignement et les zones de contacts prédites. Enfin, les modèles obtenus sont affinés puis comparés à des bases de données de protéines de structures connues. Cette étape permet de présumer de la fonction d'un domaine par similarité de topologie.

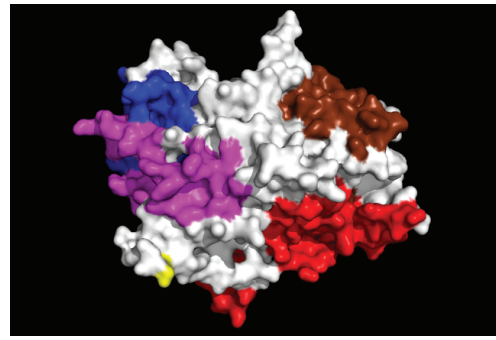
A



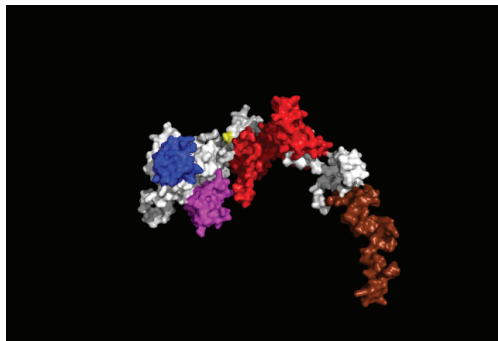
B



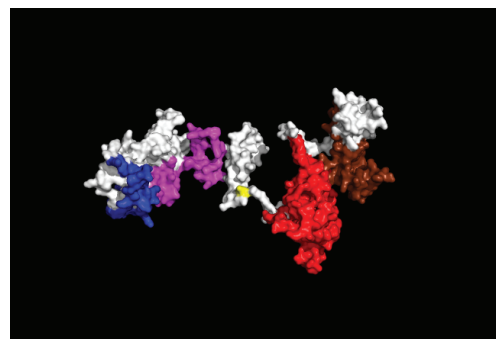
Model 1



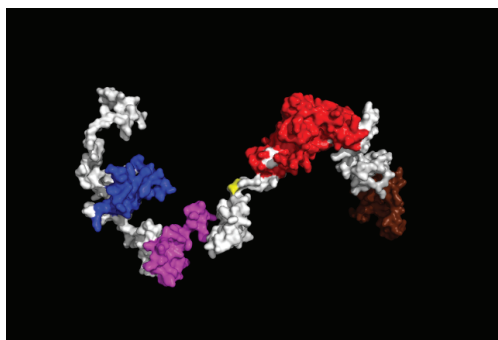
Model 2



Model 3



Model 4



Model 5

Figure IV-1. Bem1 *in silico* modelisation

(A) Bem1 domain organisation.

(B) Five Bem1 protein models generated *in silico* with I-TASSER server shows complete different structures. Domain color are conserved with (A) to allow better understanding

D'une part, des essais de cristallisation de la protéine Bem1 ont été réalisés en parallèle de ceux effectués avec la protéine Cdc24. D'autre part, nous avons procédé à des expériences de diffraction des rayons X à petits angles (Small Angle X-ray Scattering). Cette technique permet de travailler avec des échantillons en solution (non cristallisés), sans orientation spatiale particulière. Elle permet notamment de déterminer des conformations protéiques, des arrangements de complexes ou des changements de conformation. Son principe est basé sur la diffraction de la lumière. Du fait de la nature ondulatoire de la lumière, lorsqu'un rayon lumineux se propage et rencontre un objet partiellement transparent, l'onde est déformée par les détails de l'objet. L'onde résultante après la traversée de l'objet est une image d'interférence caractéristique de la structure de cet objet, un peu comme les vaguelettes qui se forment lorsqu'une vague contourne un poteau ou des rochers dépendent de la forme de ces derniers. L'image formée par ces interférences est appelée « figure de diffraction ». Plus l'objet est petit, plus l'angle auquel se manifeste le phénomène de diffraction est grand. Ainsi, un rayon incident au niveau d'une fente sera diffracté de manière inversement proportionnelle à la taille de la fente. En plaçant un écran loin de la fente on observe une « figure de diffraction » qui montre des pics et des trous d'intensité, la distance caractéristique entre deux pics d'intensité étant de l'ordre du rapport entre la longueur d'onde du faisceau incident et la taille de la fente. Similairement, les signaux mesurés lors d'expériences de SAXS proviennent de la diffraction des rayons X par les nuages électroniques des molécules de l'échantillon, et révèlent alors des détails caractéristiques de la structure de ces molécules dont la taille est de l'ordre de grandeur des domaines individuels des protéines. La figure de diffraction montre alors l'interférence entre les figures de diffraction produites par chaque molécule traversée. Le fait que l'échantillon soit en solution et donc orienté aléatoirement engendre une diffraction qui doit avoir avec une symétrie circulaire autour d'une tâche centrale alignée sur le faisceau incident. En pratique, on réalise une moyenne angulaire du profil de diffraction obtenu afin de n'analyser que la dépendance de l'intensité mesurée envers son éloignement à la tâche centrale. Plus précisément, ce profil d'intensité est représenté en fonction de la variable $Q=4\pi\sin\theta/\lambda$ où θ correspond à la moitié de l'angle de

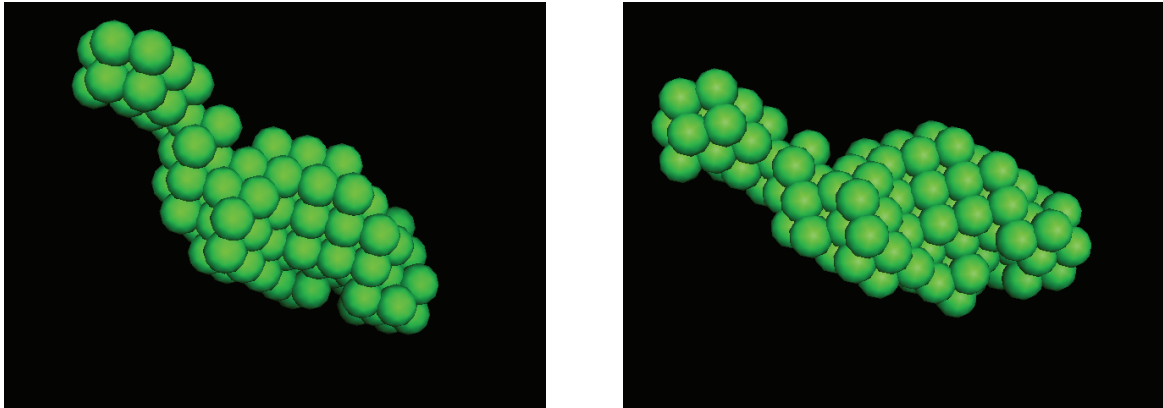


Figure IV-2. Model for Bem1 protein shape based on SAXS datas

The ab initio beads model has been generated based on SAXS acquisition done at SWING beamline of SOLEIL synchrotron.

diffraction et λ la longueur d'onde des rayons X. On représente alors le logarithme en base 10 de l'intensité de diffusion $I(Q)$ en fonction de Q . Cette courbe sera caractéristique pour chaque structure. Elle permet de déterminer des données structurales particulières de chaque protéine. Par exemple, il est possible d'assimiler $I(Q)$ à une gaussienne pour les petits angles. La fonction $\ln(I)=f(Q^2)$ est alors linéaire pour $Q_{\min}<Q<Q_{\max}$, et sa pente est égale au carré du rayon de gyration. Ce dernier renseigne sur la taille et la forme globale de la protéine. En réalisant une transformation des données mesurées il est aussi possible de représenter le nombre de couples d'électrons en fonction de la distance les séparant. Ainsi en connaissant ces différentes caractéristiques il est possible de connaître la forme globale de la protéine testée (Mertens and Svergun 2010). Les modèles générés à partir de données SAXS sont appelés modèles *Ab initio*. Il existe deux méthodes différentes pour la construction de ces modèles. La première utilise des parties de la structure de la protéine comme modèle. En connaissant ces sous-structures il est possible de générer *in silico* les spectres SAXS correspondant à différents arrangements tridimensionnels de ces structures. En comparant ces spectres avec ceux de la protéine testée il est possible de déterminer la forme la plus probable des domaines de la protéine. Une autre méthode de reconstruction est permise par la génération de modèles structuraux présumés *in silico*. Ces modèles sont générés via des algorithmes de calculs qui utilisent des similarités de séquences et de domaines connus dans la protéine à tester. Une protéine permet de générer différents modèles *in silico*. Ces différents modèles sont alors soumis à une simulation de leur spectre SAXS. Une fois obtenus ils sont comparés aux données mesurées. Cette méthode permet de générer un modèle *Ab initio* prenant en compte les différentes caractéristiques mesurées. Ces modèles sont représentés sous la forme de billes qui correspondent aux zones de fortes densités électroniques. Ce sont des modèles de faible résolution mais qui donnent une idée de la structure de la protéine.

Nous avons réalisé des acquisitions de données SAXS de la protéine Bem1. Pour cela les échantillons protéiques sont soumis à une chromatographie d'exclusion par HPLC (Agilent). La colonne de chromatographie utilisée est la même qui a

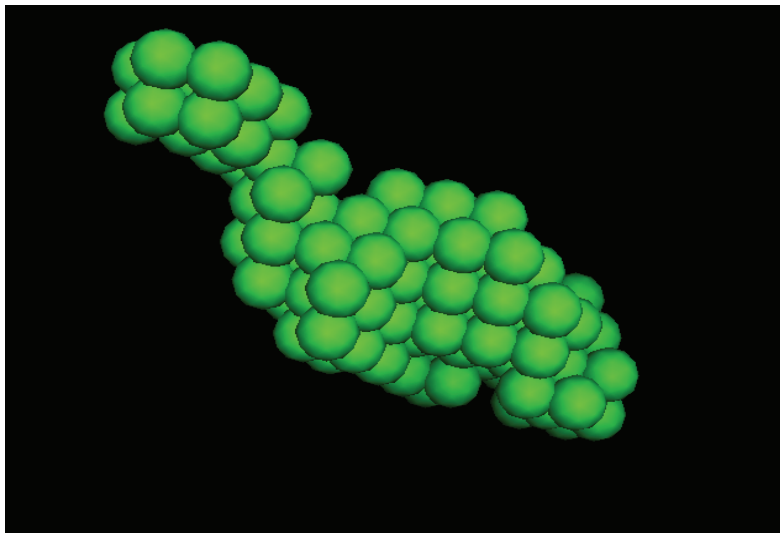
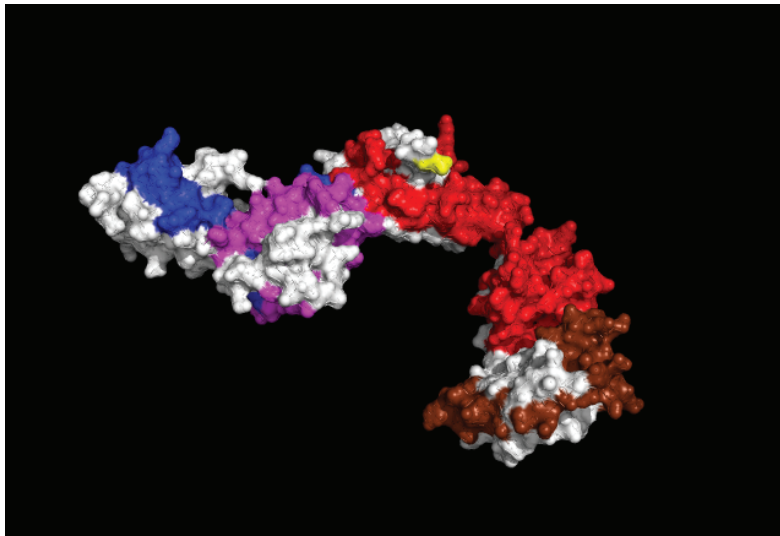


Figure IV-3. Comparison between model 1 and *ab initio* model

The two models show similarity of shape. The spatial domain repartition could be relevant with Bem1 biological function allowing the protein to bind multiple proteins at the same time.

servi lors des purifications des protéines (Superdex 200 HR 10/30). Ce couplage d'une HPLC à la ligne de mesure SAXS permet d'optimiser les mesures réalisées. En effet l'échantillon de protéines doit être le plus pur possible afin d'éviter tout signal aspécifique.

La répartition des domaines de Bem1 est représentée sur le panel A de la Figure IV-1. En utilisant le serveur I-TASSER nous avons donc pu générer différents modèles de la protéine Bem1 (Figure IV-1). Nous pouvons constater que les différents modèles générés sont très divergents structurellement. Cette disparité ne permet donc pas d'améliorer notre connaissance sur la structure de la protéine.

Une fois les expériences de SAXS réalisées ces modèles ont pu être confrontés et comparés au modèle *Ab initio* généré. Dans un premier temps l'analyse de la protéine Bem1 en SAXS nous a permis d'extraire le rayon de gyration qui est de 53,051 Å. Par ailleurs le $I(0)$ prédit fut $2.34573501 \cdot 10^{-5}$. Pour finir le $q_{max}R_g$ obtenu fut 1,5645. Après l'obtention de ces données nous avons pu générer *ab initio* une prédiction de la forme de la protéine (Figure IV-2). Ces données même si elles sont de faible résolution, nous informent sur la forme de Bem1. Il semblerait que ce soit une protéine allongée ce qui pourrait permettre l'interaction de plusieurs molécules en même temps, par exemple Cdc24, Cla4 et Cdc42. Cependant au regard de la forme de la protéine obtenue par SAXS et des modèles réalisés *in silico* il est intéressant de constater certaines similarité de forme entre le modèle *ab initio* et le modèle 1 (les deux modèles sont montrés dans la Figure IV-3). Ce modèle 1 pourrait refléter la capacité de Bem1 à interagir avec plusieurs protéines en même temps. Cependant aucune preuve ne nous permet de certifier que la structure de Bem1 correspond à ce modèle 1. Afin d'approfondir nos connaissances sur la structure de Bem1 et de Cdc24, des essais de cristallisation ont été mis en place pour nos protéines recombinantes en collaboration avec une équipe du Synchrotron Soleil. Ces essais ont été réalisés dans une plateforme automatisée de l'institut Pasteur et ont donné quelques débuts de cristallisation pour la protéine Bem1. L'utilisation combinée de plusieurs techniques de biologie structurale pourrait permettre à terme de mieux comprendre le mode de fonctionnement de ces protéines.

Discussion

1) Génération des produits nécessaires à l'étude de la phosphorylation de Cdc24.

a. Caractérisation des protéines recombinantes

i. Caractérisation structurelle

Après la mise en place des purifications de nos protéines, nous avons procédé à leur caractérisation. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence la présence de structures secondaires dans nos protéines. Pour ce faire, il nous fallait trouver une méthode sensible au repliement de ces structures secondaires afin de pouvoir comparer les propriétés des protéines dans les conditions normales et dans des conditions dénaturantes. Nous avons donc réalisé des expériences de dichroïsme circulaire par radiations de synchrotron (SRCD) à différentes températures. En effet, les spectres d'absorption obtenus par SRCD présentent des caractéristiques spécifiques aux structures secondaires, et le contrôle de la température permet de passer des conditions « normales » dans lesquelles la protéine est repliée à des conditions dénaturantes. Les spectres SRCD que nous avons obtenu furent sensibles à une augmentation de température, témoignant d'un repliement correct des protéines dans les conditions usuelles de croissance des levures. Plus précisément, nous avons déterminé des températures de fusion de 35°C et 38°C pour Cdc24-6his et Bem1 respectivement (Figure I-5). Ce résultat pourrait être pertinent biologiquement. En effet l'organisation du cytosquelette d'actine est sous la dépendance des Rho GTPases dont fait partie Cdc42 (Gulli, Jaquenoud et al. 2000; Takai, Sasaki et al. 2001). Il a déjà été démontré que le cytosquelette d'actine pouvait être dépolarisé suite à un passage à 37°C (Uesono, Ashe et al. 2004). Ces températures de fusion pourraient, par exemple, expliquer ce résultat par le fait que des protéines impliquées dans l'activation de Cdc42 ne seraient pas totalement fonctionnelles.

ii. Caractérisation des interactions

Suite à cette première caractérisation structurale, nous avons testé si nos protéines Bem1 et Cdc24 recombinantes présentaient l'interaction reportée dans la littérature (Matsui, Matsui et al. 1996; Gulli, Jaquenoud et al. 2000; Bose, Irazoqui et al. 2001; Ito, Matsui et al. 2001; Butty, Perrinjaquet et al. 2002; Ogura, Tandai et al. 2009; Fujimura-Kamada, Hirai et al. 2012). Pour cela nous avons utilisé deux méthodes, une qualitative et une quantitative.

Tout d'abord, l'interaction a été testée par pull down. La protéine GST-Bem1 a été fixée sur des billes de glutathion-agarose. Nous avons ensuite ajouté la protéine Cdc24-6his dans des quantités croissantes. Après de multiples lavages les protéines ont été éluées par ajout d'un compétiteur, le glutathion. Le résultat de l'expérience démontre que les protéines recombinantes étaient en mesure d'interagir, vraisemblablement via leur domaine PB1 similairement aux protéines des levures sauvages (Figure I-6).

Dans le but d'avoir aussi des résultats qualitatifs nous avons par la suite réalisé des mesures de l'affinité des protéines. Pour cela nous avons réalisé des expériences de résonance plasmonique de surface. La protéine Bem1 a été fixée sur une puce de mesure et la protéine Cdc24 injectée pour mesurer l'interaction ligand/récepteur entre les deux protéines. Nous avons observé que la fixation de Cdc24 sur Bem1 est très rapide dans les conditions de notre expérience, en deçà de la résolution temporelle de nos mesures. Par conséquent, nous n'avons pas pu avoir accès aux taux instantanés de formation et de dissociation du complexe Bem1/Cdc24, cependant nous avons pu mesurer la constante d'équilibre K_D de la réaction de formation du complexe. Nous avons répété l'expérience deux fois, et obtenu des valeurs de K_D , de l'ordre de plusieurs centaines de nM (Figure I-7).

Si l'on raisonne à l'échelle de la cellule et que l'on se réfère aux quantifications décrites ces résultats peuvent sembler surprenants. En effet le volume moyen d'une cellule de levure avoisine 50 femtolitres. Une cellule contient environ 6000 molécules de Bem1 et 1000 molécules de Cdc24 (Ghaemmaghami, Huh et al. 2003), ce qui correspond à environ 200 et 33

nmoles/L respectivement. Pour ces valeurs de K_D , si la concentration en protéines était homogène dans toute la cellule le complexe Bem1/Cdc24 se formerait avec une efficacité très réduite et la grande majorité des protéines ne seraient pas liées. Cependant, ces protéines ne sont pas ubiquitaires, elles sont localisées au niveau des sites de croissances, donc dans des volumes plus petits qu'une cellule entière. Par exemple, la simple présence de toutes les protéines Bem1 et Cdc24 dans un volume restreint au voisinage de la membrane plasmique (couche d'une centaine de nm d'épaisseur par exemple) conduirait à des concentrations locales supérieures à $1\mu\text{M}$, très au delà du K_D mesuré. Par conséquent, cette valeur « intermédiaire » du K_D pourrait permettre à la cellule de former efficacement le complexe Bem1/Cdc24, catalyseur de l'auto-amplification de l'activation de Cdc42, uniquement dans les régions cellulaires où les protéines sont déjà concentrées.

b. La structuration de Cdc24 permet sa phosphorylation par Cla4.

Nous avons finalement utilisé une autre approche pour caractériser notre protéine recombinante Cdc24. Celle-ci a été utilisée comme substrat pour Cla4 en montrant que le repliement de la protéine produite était nécessaire à la phosphorylation, et par conséquent que cette dernière était bien spécifique à la structure même de Cdc24. Pour ce faire, nous avons comparé les vitesses de phosphorylation entre un échantillon incubé à 60°C pendant 10 minutes (donc dénaturé) et un échantillon similaire laissé à température ambiante (Figure II-1). Nous avons clairement pu démontrer qu'une dénaturation de Cdc24 rendait impossible sa phosphorylation par Cla4. Les sites de phosphorylation déjà connus de Cla4 sont localisés dans la partie carboxy-terminale de Cdc24, dans le domaine PH et entre les domaines PH et PB1 (Wai, Gerber et al. 2009). Ce résultat indique fortement que les motifs de phosphorylation présents dans ces parties de la protéine sont correctement repliés.

2) Etude de la régulation de la phosphorylation de Cdc24.

La phosphorylation est un processus dynamique et réversible. Cette modification post-traductionnelle permet de réguler différents processus tels que l'activité protéique, l'affinité entre des interactants ou encore la localisation

dans la cellule. Chez l'homme, de nombreuses RhoGEFs sont phosphorylées et ces phosphorylations sont plus ou moins comprises. Par exemple la GEF β Pix interagit avec la protéine 14-3-3 β ce qui lui permet d'être phosphorylée par la kinase PKA. Cette interaction avec la protéine 14-3-3 β diminue en retour l'activité GEF envers Rac1 (Chahdi and Sorokin 2008). La protéine GEF Syx, lorsqu'elle est phosphorylée dans sa partie carboxy-terminale par la kinase PKD, interagit avec la protéine 14-3-3. Cette interaction inhibe l'activité GEF de Syx envers RhoA (Ngok, Geyer et al. 2013). De même une autre GEF de RhoA, GEF-H1, est phosphorylée par la kinase Par1b. Cette phosphorylation diminue son activité GEF (Yoshimura and Miki 2011). Ainsi la phosphorylation des RhoGEF peut avoir plusieurs effets comme des changements de capacités interactionnelles ou d'activités. Cdc24 est la seule protéine GEF de Cdc42 avérée chez la levure *S.cerevisiae*. Elle est phosphorylée par au moins deux kinases qui sont Cla4 et Cln2/Cdk1 (Bose, Irazoqui et al. 2001; Moffat and Andrews 2004; McCusker, Denison et al. 2007; Wai, Gerber et al. 2009). Cette phosphorylation est dynamique au cours du cycle cellulaire. Le plus haut niveau de phosphorylation est atteint au moment de la mise en place du futur bourgeon. Malgré de nombreuses études à ce sujet, aucun mécanisme dû à la phosphorylation n'a pu être mis en évidence. Pour comprendre l'effet de la phosphorylation de Cdc24 lors de la mise en place du bourgeon nous en avons disséqué les voies de régulation connues. Pour cela nous avons reconstitué un système minimaliste *in vitro*. L'avantage d'un tel modèle d'étude est de minimaliser le système au possible. Cela permet d'écarter toutes possibilités d'interprétation inhérente à la présence d'autres facteurs comme cela peut être le cas *in vivo*.

- a. La protéine Bem1 améliore la phosphorylation de Cdc24 par Cla4.
 - i. Bem1 augmente la vitesse de phosphorylation de Cdc24 par Cla4.

Nous avons tout d'abord cherché à comprendre les mécanismes de régulation de la phosphorylation par les autres composants connus de la mise en place de la polarité cellulaire. La protéine Bem1 est connue pour interagir avec

Cdc24 et Cla4 ; *in vivo* sa présence est requise pour que Cdc24 soit phosphorylée (Gulli, Jaquenoud et al. 2000; Bose, Irazoqui et al. 2001; Butty, Perrinjaquet et al. 2002). En effet, lorsque les domaines de Bem1 permettant l'interaction avec Cla4 ou Cdc24 sont mutés, aucune phosphorylation de Cdc24 n'est observée *in vivo* (Bose, Irazoqui et al. 2001; Kozubowski, Saito et al. 2008). Nous avons donc décidé d'ajouter la protéine Bem1 dans nos réactions de phosphorylation et d'en observer l'effet. Nous avons pu observer que le niveau de phosphorylation de Cdc24 augmentait en présence de Bem1 (Figure II-2). Cette augmentation peut être due à deux mécanismes. La protéine Bem1 pourrait activer la kinase Cla4 en interagissant. La deuxième hypothèse serait que l'interaction Bem1/Cdc24 induise un changement conformationnel de Cdc24 pour permettre l'accessibilité à des sites enfouis.

- ii. Bem1 augmente le niveau maximal de phosphorylation de Cdc24 par Cla4.

Les travaux de Shimada *et al.* ont conduit les auteurs à émettre l'hypothèse que l'interaction entre Cdc24 et Bem1 induirait un changement de repliement de la partie carboxy-terminale de Cdc24 engendrant une ouverture de structure (Shimada, Wiget et al. 2004). Afin de phosphoryler autant que possible Cdc24, nous avons incubé une grande quantité de kinase avec Cdc24, en présence ou non de Bem1. La kinase Cln2/Cdk1, qui n'est pas supposée être affectée par Bem1, a été utilisée comme contrôle. Quelle que soit la combinaison de kinases utilisée, Cdc24 s'est avérée présenter un plus fort retard de migration lorsque la protéine Bem1 était présente dans les réactions (Figure II-3). Ce résultat montre qu'en présence de Bem1, Cdc24 est plus fortement phosphorylée par Cln2/Cdk1 et Cla4. Cela pourrait suggérer que l'interaction avec Bem1 ouvre sur Cdc24 l'accès à un ou plusieurs sites de phosphorylation, qui sont inaccessibles en l'absence de Bem1. Il serait intéressant de pouvoir observer la conformation de Cdc24 lorsqu'elle interagit ou non avec Bem1. Pour cela une technique de biologie structurale telle que le SAXS serait appropriée. Cette technique permettrait de comparer la forme de la protéine Cdc24 lorsqu'elle est seule ou qu'elle interagit avec Bem1.

- iv. Cla4 n'est pas responsable de la faible vitesse de phosphorylation de Cdc24 en début de réaction.

Lors des expériences de phosphorylation de Cdc24 par Cla4, nous avons constaté un retard dans le début de la réaction. En effet, les premières formes phosphorylées n'ont pu être visibles qu'après une à plusieurs dizaines de minutes en fonction des conditions. La kinase Cla4 est homologue de Pak1, une p21-activated kinase qui se présente naturellement sous une forme auto-inhibée. L'inhibition de Pak1 est levée lorsque la protéine s'auto-phosphoryle sur un site particulier (Lei, Lu et al. 2000; Lei, Robinson et al. 2005). En réalisant une modélisation *in silico* du domaine kinase de Cla4 nous avons constaté une forte similitude de structure présumée avec Pak1, ainsi que la présence d'un site d'autophosphorylation à la même position (Figure II-4). La nécessité d'une autophosphorylation de Cla4 pour lever son inhibition expliquerait le retard observé dans les réactions de phosphorylation de Cdc24. Pour tester cette hypothèse nous avons incubé Cla4 en présence d'ATP pendant une heure avant d'incorporer la kinase dans des réactions de phosphorylation de Cdc24. Nous avons constaté que cette incubation n'avait aucun effet sur le délai initial de phosphorylation de Cdc24, infirmant notre hypothèse (Figure II-5 et II-6 du chapitre 2). Nous avons ensuite fait l'hypothèse que ce retard soit la conséquence d'un problème de température d'échantillon en début de réaction. En effet, les échantillons conservés à -20°C doivent atteindre une certaine température pour que la kinase soit active. Cependant, le retard dans la réaction diminue lorsqu'on augmente la concentration en kinase, ce qui ne serait pas le cas s'il résultait d'un problème de thermalisation. Cela suggère en outre que le délai initial n'est pas dû à la kinase en elle-même mais à son substrat, Cdc24. Une hypothèse serait que la première phosphorylation soit l'étape limitante de la réaction, une fois passée, la réaction est débloquée et se réalise normalement.

- v. Cdc24 pourrait permettre une auto-amplification de sa propre phosphorylation.

Pour tenter de comprendre le délai de la phosphorylation de Cdc24 par Cla4, le Dr. Tollis a confronté les résultats expérimentaux à différents modèles

mathématiques simulant la réaction de phosphorylation. De ces différents modèles, certains ont montré une certaine fiabilité. Ces modèles prenaient en compte une première étape limitante appelé « q-state ». En l'absence de Bem1, une seule voie de phosphorylation permettrait d'aboutir aux résultats que nous avons observés. Celle-ci implique une première étape fortement limitante qui conduit à la production d'un composé de Cdc24 qui auto-amplifie la réaction (le « q-state ») (Figure II-7). Au vu de la comparaison de réaction contenant ou non Bem1 et de la conservation des abondances des formes B+D et C+E (Figure II-8), il semblerait que la réaction de phosphorylation en présence de Bem1 soit composée de deux voies. Ces deux voies impliquant des taux de passage différent, permettraient d'aboutir aux résultats observés (Figure II-9). Ces modèles mathématiques ne reflètent pas forcément la réalité et doivent être testés. Par exemple, nous avons postulé que le « q-state » pourrait permettre l'autocatalyse par le biais d'une homodimérisation de Cdc24. Cela implique plusieurs mécanismes, la formation d'un complexe entre Cla4 et Cdc24, et d'une homodimérisation de Cdc24. Le second mécanisme peut être vraisemblable car déjà décrit (Mionnet, Bogliolo et al. 2008). Il serait alors intéressant d'observer l'effet de mutation affectant cette propriété au cours de la réaction de phosphorylation. En revanche une interaction avec la kinase n'est pas décrite. Les tests d'interactions décrits dans la littérature ont été réalisés en absence de forme phosphorylée de Cdc24 (Bose, Irazoqui et al. 2001). Il serait alors fortement informatif de réaliser des pull down de Cla4 par Cdc24 après une pré incubation en présence ou non d'ATP. Par ailleurs si l'une des phosphorylations est l'étape limitante pour la réaction, un mutant simple de ce site de phosphorylation devrait totalement inhiber la phosphorylation de Cdc24 par Cla4.

b. D'autres protéines régulent la phosphorylation de Cdc24.

Les p21-activated kinases sont des effecteurs de Cdc42 (Leberer, Dignard et al. 1992; Cvrckova, De Virgilio et al. 1995; Simon, De Virgilio et al. 1995; Martin, Mendoza et al. 1997). Ces kinases sont auto-inhibées intramoléculairement via une boucle d'activation occupant le site catalytique (Lei, Lu et al. 2000; Lei, Robinson et al. 2005). Cette boucle est maintenue en

position par une seconde boucle inhibitrice. Chez les mammifères, la GTPase pourrait contribuer à lever cette auto-inhibition de la kinase en permettant le déplacement de cette boucle inhibitrice comme elle le fait pour WASP (Kim, Kakalis et al. 2000; Parrini, Lei et al. 2002). En effet, lorsque la kinase interagit avec Cdc42 la structure de WASP s'ouvre permettant la levée de l'auto-inhibition. Ainsi, il a été démontré que chez la levure une souche exprimant Cdc42 sous forme bloquée GTP présentait une activité kinase augmentée pour Cla4 sur le substrat MBP (Benton, Tinkelenberg et al. 1997). Cependant la mutation du domaine d'interaction à Cdc42 sur Cla4 a aussi présenté une plus grande activité.

- i. L'activation de Cdc42 diminue la phosphorylation de Cdc24 par Cla4.

Nous avons alors voulu tester l'effet de Cdc42 sur la phosphorylation de Cdc24. Lorsque Cdc42 fut incorporée avec uniquement la kinase et son substrat, aucun changement significatif ne fut observé. En revanche lorsque du GTP γ S fut incorporé afin d'activer la GTPase, l'activité de Cla4 fut complètement inhibée en l'absence de Bem1 (Figure II-10). Ce résultat est surprenant, et en désaccord avec les résultats précédemment reportés sur le substrat MBP. La possibilité que le GTP γ S inhibe complètement Cla4 est à écarter car en présence de Bem1, Cla4 conserve une activité basale malgré la présence de GTP γ S. Il en va de même pour la kinase Cln2/Cdk1 qui présente une activité en présence de GTP γ S. Ce résultat permet d'invalider l'hypothèse que le GTP γ S ait un effet direct dans le tampon d'activité. Il est possible qu'*in vivo* d'autres facteurs associés à la kinase et la GTPase aient un rôle dans la régulation de l'activité kinase de Cla4 envers Cdc24. Par ailleurs l'ajout de Bem1 dans la réaction contenant Cla4, Cdc42 et du GTP γ S présente une phosphorylation de la GEF. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait qu'en présence de Cdc42 activée, Cla4 interagirait avec la GTPase, et Cdc24 ne serait pas présente dans le complexe par manque d'affinité due à l'activation de Cdc42. En présence de Bem1, Cdc24 pourrait être recrutée dans le complexe contenant Cdc42, Cla4 et Bem1 pouvant ainsi être phosphorylée. Dans le but de tester si Cdc42 activé inhibe Cla4 il serait intéressant de réaliser des expériences de phosphorylation de Cdc24 en présence d'un compétiteur de Cla4 pour Cdc42 activé, en incorporant par exemple un peptide contenant le domaine CRIB de Cla4. Cette expérience pourrait permettre d'expliquer la différence observée

dans nos réactions avec les données connues *in vivo* où l'expression d'une forme bloquée activée de Cdc42 active Cla4. En effet *in vivo*, Cdc42 bloquée sous forme active pourrait interagir avec d'autres effecteurs et ainsi la kinase Cla4 ne serait inhibée.

ii. Une autre protéine décroît l'activité de Cla4 pour Cdc24, Rga2.

Cdc24 et Bem1 sont présentes dans un complexe protéique lors de la mise en place du bourgeon. Les protéines Rga2, Boi1 et Boi2 font aussi partie de ce complexe (McCusker, Denison et al. 2007). Comme la GTPase Cdc42 sous forme active inhibe la phosphorylation de Cdc24, nous avons émis l'hypothèse que des protéines interagissant avec Cdc42 activée pourraient avoir un effet activateur sur la phosphorylation de la GEF. En tant que GAP (donc interagissant avec la forme active Cdc42) et membre du module Cdc24, la protéine Rga2 nous a semblé un bon candidat. Nous avons dans un premier temps utilisé une protéine Rga2-3HA purifiée par le Dr. McCusker. Cette protéine a fortement inhibé la phosphorylation de Cdc24 en présence de Bem1, d'autant plus que sa concentration dans le milieu réactionnel était importante (Figure II-15). Nous avons par la suite voulu savoir si le niveau de phosphorylation de Rga2, elle-même substrat de Cln2/Cdk1, pouvait affecter cette inhibition. Pour ce faire nous avons réalisé de nouvelles constructions pour purifier Rga2 par TAP-tagging. Malheureusement, cette protéine GAP, avec et sans traitement par Cln2/Cdk1, n'a pas montré d'effet sur la phosphorylation de Cdc24 par Cla4 en présence de Bem1 (Figure II-16). Celle-ci ne s'est montrée capable de diminuer l'activité de Cla4 pour Cdc24 qu'en absence de Bem1 (Figure II-17). Nous avons alors voulu comprendre pourquoi les résultats étaient si différents entre les deux expériences menées avec deux productions différentes de Rga2. Pour cela nous avons soumis nos échantillons à un western blot pour visualiser la protéine Rga2-TAP, et nous nous sommes aperçu que la quantité de Rga2-TAP présente diminuait au cours du temps. Cette instabilité de la protéine et sa disparition au fur et à mesure des essais de phosphorylation pourrait expliquer l'absence d'effet inhibiteur à long terme de la protéine que nous avons produite (Figure II-

17). Cependant, le ralentissement de la vitesse de phosphorylation observé en l'absence de Bem1 et en présence de Rga2-TAP suggère toutefois que Rga2 joue un rôle direct dans la régulation de l'activité kinase de Cla4 sur la GEF (Figure II-17).

iii. Cln2/Cdk1 augmente la vitesse de phosphorylation de Cdc24.

Cla4 n'est pas la seule kinase ayant pour substrat Cdc24. En effet Cln2/Cdk1 phosphoryle elle aussi la GEF. Après avoir étudié en détails la régulation par différents facteurs de la phosphorylation de Cdc24 par Cla4, nous avons souhaité étudier l'effet de la deuxième kinase sur les vitesses de phosphorylation de Cdc24. Cependant, en présence simultanée de Cln2/Cdk1 et Cla4, les signaux résultant de la migration sur gel SDS-PAGE n'ont pas montré de structure en bandes discrètes et quantifiables. Nous avons alors choisi de quantifier la disparition de la fraction de Cdc24 non phosphorylée en fonction du temps. Les résultats de la quantification suggèrent que les phosphorylations par les deux kinases sont additives et que Cln2/Cdk1 accélère la phosphorylation de Cdc24 (Figure II-11). Cela pourrait être dû à une activation de Cla4 par Cln2/Cdk1 ou à un cumul de deux réactions de phosphorylation en parallèle: Cln2/Cdk1 sur Cdc24 et Bem1/Cla4 sur Cdc24. Nous avons constaté que le blocage de la phosphorylation de Cdc24 en présence de Cdc42 et de GTP γ S n'avait plus lieu en présence de l'autre kinase, même si la vitesse de phosphorylation de Cdc24 était tout de même diminuée. Cela suggère que l'inhibition observée sur Cla4 par Cdc42 activée, pour la phosphorylation de Cdc24, est spécifique à la PAK et ne concerne pas la phosphorylation par Cln2/Cdk1. Cependant il est possible que sous l'effet de Cln2/Cdk1, Cla4 soit activée, comme cela a été suggéré par le passé. Afin de tester cette possibilité, nous avons généré une construction permettant d'exprimer une protéine recombinante de Cdc24 qui était non phosphorylable par Cln2/Cdk1 (Figure II-12). Une éventuelle accélération de la phosphorylation d'une telle protéine par Cla4 en présence de Cln2/Cdk1 ne pourrait alors pas être le fait d'une action directe de Cln2/Cdk1 sur Cdc24.

iv. Cla4 n'est pas activé par Cln2/Cdk1 pour phosphoryler Cdc24.

Afin de constater si Cln2/Cla4 avait un effet direct sur Cla4, nous avons utilisé une séquence mutante de Cdc24 développée par le passé par le Dr. McCusker (mutant *cdc24-ps*) (McCusker, Denison et al. 2007). Après production et purification de ce mutant, nous avons répété les expériences de phosphorylation de Cdc24 par Cla4, en présence ou non de Cln2/Cdk1 et Bem1. Que ce soit en présence ou non de Bem1, les vitesses de phosphorylation de *cdc24-ps* (conditionnées par l'activité kinase de Cla4 seulement) sont très similaires entre les échantillons contenant Cla4 seule et ceux contenant Cla4 et Cln2/Cdk1 (Figure II-13). Ce résultat suggère fortement que Cln2/Cdk1 est sans effet sur l'activité kinase de Cla4 envers Cdc24. Il reste néanmoins possible que Cla4, produite dans la levure et donc en présence de cyclines et des kinases associées, ait été déjà activée *in vivo* avant la purification. Afin d'exclure complètement cette possibilité, il serait nécessaire d'inclure dans le protocole de production de Cla4 une étape de traitement à la phosphatase λ .

- 3) La phosphorylation de Cdc24 par Cla4 augmente l'affinité de la GEF pour Bem1.

L'interaction entre Bem1 et Cdc24 est primordiale pour la mise en place d'un bourgeon. Par ailleurs, Cdc24 est phosphorylée massivement lors de la phase G1. Existe-t-il un lien entre cette phosphorylation et la formation du complexe Bem1/Cdc24 ? Différentes expériences testant l'interaction entre Cdc24 et Bem1 ont déjà été décrites dans la littérature, et ont conduit à des résultats non concordants (Gulli, Jaquenoud et al. 2000; Bose, Irazoqui et al. 2001). Dans certains cas la phosphorylation inhibait l'interaction entre les deux protéines, dans d'autres elle ne l'affectait pas. Cependant ces expériences ont été basées sur l'utilisation de mutants de Cdc42 *in vivo* pour générer une hyperphosphorylation de Cdc24, et les effets observés sur la polarité et la formation du complexe Bem1/GEF peuvent résulter de nombreux effets secondaires à ces mutants. Par exemple, *in vivo* Bem1 peut être présente dans différents complexes. Nous ne connaissons pas l'effet d'une surexpression de Cdc42 active ou Cla4 sur la formation de ces autres complexes. Nous avons décidé de réaliser les premiers tests de l'effet direct de la phosphorylation de

Cdc24 sur son interaction avec Bem1, en utilisant notre système minimaliste *in vitro*.

Pour ce faire nous avons phosphorylé Cdc24 par Cla4 et/ou Cln2/Cdk1 en présence ou non de Bem1. Cette expérience a montré une augmentation de l'affinité de Cdc24 phosphorylée pour Bem1 lorsque Cla4 participait à la phosphorylation de Cdc24 (Figure II-14). Cet effet est encore plus visible si Cdc24 a été phosphorylée en présence de Bem1. La comparaison des niveaux maximum de phosphorylation en présence et en l'absence de Bem1 nous avait permis de suggérer que l'interaction avec cette dernière ouvre l'accès à des sites de phosphorylation « cachés ». Ces données suggèrent que ces sites, une fois phosphorylés, pourraient contribuer au maintien d'une structure ouverte de Cdc24 facilitant son interaction avec Bem1. Ces résultats ne sont pas en accord avec les résultats obtenus par Gulli et Bose, et pourraient suggérer que l'hyperphosphorylation de Cdc24 et l'absence d'augmentation, voire la diminution, de l'interaction entre Bem1 et Cdc24 sont deux conséquences découplées de l'utilisation de formes mutantes de Cdc42 dans ces études.

4) Modèle de régulation de Cdc24 au cours de la mise en place de la polarité cellulaire.

La formation d'un pôle stable de Cdc42 activé est nécessaire à la mise en place de la polarité cellulaire sous l'effet de Cln2/Cdk1. Il a été suggéré qu'une boucle d'auto-amplification impliquant Cdc42, Bem1 et Cdc24 favorise la formation de ce pôle en parallèle d'un mécanisme basé sur le trafic cellulaire impliquant l'actine. Au début de la formation de ce pôle, peu de molécules Cdc42 sont actives. Cln2/Cdk1 et Cla4 pourrait alors favoriser cette boucle en phosphorylant Cdc24 via Bem1, et donc augmenter l'affinité des deux protéines. Par ailleurs, nous ne savons pas si la phosphorylation de Cdc24 présente un effet sur l'activité GEF de la protéine. Si tel est le cas, la phosphorylation de Cdc24 pourrait avoir un double effet en influant sur la capacité de Cdc24 à être complexé avec Bem1 mais aussi augmenter l'activité activatrice de Cdc24 pour Cdc42. Ainsi, chez *S. cerevisiae*, la formation d'un complexe protéique contenant

Cdc24, Bem1 et Cla4 conduirait à une phosphorylation rapide de Cdc24 et pourrait générer une réponse rapide de la cellule dans le but d'optimiser la mise en place de la polarité cellulaire. Par ailleurs, la présence de Rga2 dans le complexe contenant Cdc24 et Bem1 pourrait être un moyen de contrôler l'activité de Cla4 envers Cdc24, et par exemple diminuer la stabilité du dimère Cdc24/Bem1 si le complexe n'est pas localisé correctement dans la cellule.

Une fois la taille du pôle de Cdc42 activé suffisante, la GTPase pourrait diminuer l'activité de Cla4 diminuant ainsi la boucle d'auto-amplification. Le maintien du pôle de Cdc42 requiert un cycle entre ses formes actives et inactives (Slaughter, Das et al. 2009). Cela implique que des mécanismes équilibrent les activités GAP et GEF à des niveaux similaires. La diminution de la vitesse de phosphorylation médiée par Cdc42 et Rga2 en parallèle pourrait par exemple permettre d'éviter un emballement de l'activité GEF via un renforcement de l'interaction avec Bem1. Par ailleurs la phosphorylation pourrait aussi accroître l'activité GEF, ce qui impliquerait un contrôle par la machinerie de polarisation. De même, une régulation des activités GAP pourrait permettre de réguler l'ensemble du système.

- 5) Des mutants *rga2* pour la phosphorylation par Cln2/Cdk1 suggèrent un défaut de polarisation.

Les protéines GAP de Cdc42 sont phosphorylées dynamiquement au cours du cycle cellulaire. Le Dr. McCusker a identifié de nouveaux sites de phosphorylation de Rga2 par Cln2/Cdk1. Dans le but de comprendre l'effet de cette phosphorylation, des allèles mutés pour la phosphorylation de Rga2 ont été générés. Nous avons réalisé deux mutants, l'un sur lequel les sites consensus de Cln2/Cdk1 seulement sont mutés (*rga2-ps1*) et un sur lequel tous les résidus phosphorylables connus pour Cln2/Cdk1 sont mutés (*rga2-ps2*) (Figure III-1).

- a. *rga2-ps2* présente un effet additif avec un mutant *cdc24*

Ces gènes ont été introduits via des plasmides contenant le promoteur sauvage de RGA2 dans des souches sauvages ou présentant une perte de fonction

de Cdc24 (Figure M-1 et III-2). Nous avons constaté que seul le mutant *rga2-ps2* présentait un défaut de croissance dans un contexte de perte de fonction de Cdc24. Outre le fait que cet allèle de *RGA2* est dominant sur la copie sauvage (présente au locus), ce résultat pourrait suggérer une forme hyperactive de *rga2-ps2* avec un gain de fonction, qui vient s'ajouter à la perte de fonction de Cdc24. Dans cette hypothèse, la phosphorylation de Rga2 aurait donc pour rôle de réduire son activité. Par ailleurs, l'augmentation moyenne de la taille des cellules observées pourrait être corrélée à un défaut de mise en place de polarité cellulaire engendrant une croissance isotrope accrue.

- b. Des mutants *RGA2* pour la phosphorylation présentent un phénotype suggérant un défaut de polarisation.

Afin de nous rapprocher des conditions physiologiques, nous avons choisi d'intégrer ces différents allèles au locus *RGA2*. Nous avons constaté que les souches *rga2-ps1* et *rga2-ps2* présentaient une plus faible croissance à 15°C que la souche contrôle (Figure III-3). Les cultures *rga2-ps1* et *rga2-ps2*, à cette température, ont également montré une plus grande proportion de cellules n'ayant pas bourgeonné en comparaison de la culture de contrôle, avec en particulier une présence accrue de grosses cellules. Ces cellules présentaient un diamètre de taille similaire à une cellule en fin de phase G2. Ce phénotype suggère que les cellules ne parviennent pas à se polariser, et restent plus longtemps dans un régime de croissance isotrope, atteignant ainsi de grandes tailles sans bourgeon. Ce défaut de mise en place de polarité cellulaire pourrait être dû à une hyperactivité de la protéine GAP lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, activité qui rendrait difficile l'activation de Cdc42 nécessaire à la polarisation. Le fait qu'aucun phénotype n'aie pu être observé aux autres températures testées pourrait être expliqué par une adaptation rapide des cellules. Par exemple, dans l'hypothèse où la phosphorylation de Bem2, Bem3 ou Rga1 tendrait également à les inhiber, un défaut de phosphorylation sur Rga2 pourrait être compensé par une augmentation de la phosphorylation des autres GAP afin de maintenir un niveau global contrôlé d'activité GAP. Afin de tester cette possibilité, il serait judicieux de mesurer le niveau de phosphorylation des autres GAP de Cdc42 dans ces mutants.

6) La localisation générale des protéines GAP de Cdc42 semble similaire aux zones de polarisation.

Les 4 protéines GAPs de Cdc42 sont des substrats de la kinase Cdk1 (Ubersax, Woodbury et al. 2003; Knaus, Pelli-Gulli et al. 2007; McCusker, Denison et al. 2007; Sopko, Huang et al. 2007). Par ailleurs la localisation des GAPs a déjà été observée séparément (Caviston, Longtine et al. 2003; Knaus, Pelli-Gulli et al. 2007; McCusker, Denison et al. 2007; Sopko, Huang et al. 2007). Cependant la visualisation simultanée de ces quatre protéines pourrait permettre de mieux comprendre quand (au cours du cycle cellulaire) et où (localisation des GAPs) Cdc42 a la possibilité d'être régulée par les GAPs. Des études chez *S. pombe* ont montré que l'activation de Cdc42 était dépendante d'un gradient d'activation permis par des localisations asymétriques de protéines GAP et GEF (Kelly and Nurse 2011).

a. Les protéines GAPs de Cdc42 localisent dynamiquement aux sites de polarisation au cours du cycle cellulaire.

Pour cela, nous avons marqué les quatre protéines GAP avec une étiquette GFP, et visualisé ce marqueur simultanément avec un marqueur du cycle cellulaire (mCherry-Tub4) (Kahana, Schnapp et al. 1995; Marschall, Jeng et al. 1996; Spang, Geissler et al. 1996; Jaspersen, Huneycutt et al. 2004). Pendant la phase G1/S les GAPs sont localisées au niveau du cortex, puis polarisent leur localisation dans le bourgeon en G2 jusqu'en anaphase précoce. Là, les GAPs se perdent cette localisation polarisée pour se relocaliser au niveau du cou. Les différentes localisations que nous avons constatées ont déjà été décrites pour les GAPs individuellement (Figure III-4). Ces résultats montrent que les protéines GAPs sont présentes au niveau des sites de croissance, où il est possible que Cdc42 soit activée. Cependant nous ne savons pas si les GAPs sont toutes actives en même temps au cours du cycle cellulaire. Une étude complète de l'effet de la phosphorylation sur les 4 GAPs serait nécessaire pour comprendre à quel moment chacune d'entre elle joue un rôle particulier, si tel est le cas. En effet, il est possible qu'elles ne soient pas actives en même temps.

- b. Les protéines GAPs et les domaines d'endocytose semblent mutuellement exclusifs.

Le recyclage de Cdc42 est essentiel à la formation d'un pôle robuste (Slaughter, Das et al. 2009). Deux voies de recyclage ont été mises en évidence, une voie impliquant la RhoGDI Rdi1 et une autre impliquant le trafic membranaire (endo/exocytose). Rdi1, qui recycle Cdc42 sous forme inactive, se localise au site de croissance similairement aux GAPs (Richman, Toenjes et al. 2004). D'autres travaux ont suggéré que des formes bloquées de Cdc42, qui ne suivent donc pas les cycles d'activation-inactivation, n'étaient pas recyclées par cette voie. A l'inverse, la forme de Cdc42 recyclée par l'endocytose n'est pas connue mais cette voie ne semble pas nécessiter la rotation GDP-GTP de Cdc42. Nous avons donc voulu observer le positionnement relatif des domaines endocytiques et des domaines riches en GAPs, et ce à différents stades du cycle cellulaire. Nous avons constaté que ces domaines semblent majoritairement exclusifs (panel A de la Figure III-5). Par quel mécanisme ces domaines se retrouvent-ils apposés sans toutefois se mélanger ? Pour répondre à cette question, il serait intéressant d'étudier la localisation des GAPs dans des mutants pour le trafic membranaire. En effet, il a été démontré au laboratoire que les localisations des domaines de trafic membranaire étaient interdépendantes (Jose, Tollis et al. 2013). Des mutants ont été générés dans lesquels la localisation des domaines d'endocytose décrite plus haut était perturbée. Il serait alors instructif de connaître la localisation des GAPs dans ces mutants afin de constater si leur localisation est totalement indépendante ou non des zones de trafic. D'autre part, nos mesures en temps réel sur une cellule ont révélé qu'en fin de cycle cellulaire, les GAPs se localisaient au niveau du cou avant les domaines endocytiques (panel B de la Figure III-5). Il serait judicieux d'étendre cette étude à un plus grand nombre de cellules à différents stades du cycle, afin de pouvoir établir avec certitude la chronologie des événements de localisation des différents acteurs de la polarité. En effet, ces résultats ne couvrent pas un nombre suffisant de cellules pour être certifiés. Etablir cette chronologie pourrait être une étape primordiale dans la compréhension de la mise en place de la polarité.

c. Les GAPs semblent localiser avec la protéine Bem1.

La présence des GAPs à l'épicentre des sites de croissance polarisée peut s'expliquer par la nécessité d'inactiver Cdc42 afin qu'elle puisse être recyclée rapidement par la voie reposant sur Rdi1. Ce recyclage assure en partie la stabilité d'un pôle de Cdc42 active. Cette observation nous a amené à questionner la localisation des quatre GAP par rapport aux zones riches en Cdc42 activée. Nous n'avons cependant pas réussi à générer un marqueur non toxique pour Cdc42 activé. Nous avons alors utilisé la souche où toutes les GAPs étaient simultanément marquées par l'étiquette GFP, et utilisé la protéine Bem1 étiquetée par tDimer, Bem1 interagissant avec Cdc42 (Zheng, Bender et al. 1995; Bose, Irazoqui et al. 2001). Nous avons alors observé ces marqueurs dans des cellules à différents stades du cycle cellulaire. Nous avons pu constater que les protéines GAPs et la protéine Bem1 colocalisent aux différentes étapes du cycle cellulaire (panel A de la Figure III-6). Nous avons observé également la chronologie du recrutement de ces marqueurs en fin de cycle cellulaire, et avons constaté avec surprise que les protéines GAPs se localisent au cou du bourgeon avant la protéine Bem1, et donc possiblement avant la formation d'un solide pôle de Cdc42 active (panel B de la Figure III-6). Il serait cependant nécessaire de confirmer ce résultat en utilisant un autre marqueur de Cdc42 activée, par exemple un effecteur de Cdc42. En effet, il est possible que Bem1 soit recrutée après qu'une certaine quantité de Cdc42 soit activée. De même il serait instructif d'observer l'ordre d'arrivée des GAPs et de Bem1 au site présumé de bourgeonnement en début de cycle cellulaire. Dans l'hypothèse où les GAPs seraient les premiers effecteurs de Cdc42 à présenter une localisation polarisée, il serait intéressant de tester leur aptitude à polariser leur localisation indépendamment de l'auto-activation de Cdc42, par exemple en observant leur localisation lorsque Far1 est toujours présente pour maintenir Cdc24 dans la noyau (Nern and Arkowitz 2000). En effet, cette protéine séquestre Cdc24 au niveau du noyau avant d'être dégradée en réponse à la phosphorylation par Cln2/Cdk1 (Henchoz, Chi et al. 1997), et par conséquent la boucle d'auto-activation de Cdc42 devrait être inexistante en sa présence.

Ces différents travaux suggèrent que la localisation des protéines GAP régulant Cdc42 chez *S. cerevisiae* semble différente de ce qui est connu chez *S. pombe*. En effet, contrairement à *S. pombe* chez qui les zones de localisation des régulateurs de la GTPase sont séparées nous avons montrés ici que la localisation des protéines GAPs de Cdc42 chez *S. cerevisiae* correspond aux zones de polarisation de la cellule au cours du cycle cellulaire.

7) L'étude structurale de Bem1 est importante mais peu concluante pour le moment.

Dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires de la régulation de Cdc42 nous avons débuté des études structurales. Pour cela nous avons utilisé les protéines recombinantes purifiées au laboratoire. Nous avons réalisé des expériences de SAXS sur la protéine Bem1. Malheureusement, ces expériences ne nous ont pas apporté beaucoup d'informations sur la biologie de la protéine, ni sur sa conformation, notamment la position des différents domaines. En revanche, cette technique pourrait être utilisée pour comprendre physiquement l'interaction entre Cdc24 et Bem1, qui n'a jamais été caractérisée d'un point de vue global. En effet, nos données sur la phosphorylation de Cdc24 suggèrent une ouverture de sa structure lorsqu'elle se lie à Bem1, et un tel changement dans la structure de la GEF devrait avoir une signature claire dans des expériences SAXS.

Références

- Aghazadeh, B., W. E. Lowry, et al. (2000). "Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation." Cell 102(5): 625-633.
- Ahmadian, M. R., U. Hoffmann, et al. (1997). "Individual rate constants for the interaction of Ras proteins with GTPase-activating proteins determined by fluorescence spectroscopy." Biochemistry 36(15): 4535-4541.
- Amon, A., M. Tyers, et al. (1993). "Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins." Cell 74(6): 993-1007.
- Anderson, C. W., P. R. Baum, et al. (1973). "Processing of adenovirus 2-induced proteins." J Virol 12(2): 241-252.
- Annan, R. S., M. J. Huddleston, et al. (2001). "A multidimensional electrospray MS-based approach to phosphopeptide mapping." Anal Chem 73(3): 393-404.
- Bender, A. and J. R. Pringle (1989). "Multicopy suppression of the cdc24 budding defect in yeast by CDC42 and three newly identified genes including the ras-related gene RSR1." Proc Natl Acad Sci U S A 86(24): 9976-9980.
- Bender, A. and J. R. Pringle (1991). "Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol 11(3): 1295-1305.
- Bender, L., H. S. Lo, et al. (1996). "Associations among PH and SH3 domain-containing proteins and Rho-type GTPases in Yeast." J Cell Biol 133(4): 879-894.
- Benton, B. K., A. Tinkelenberg, et al. (1997). "Cla4p, a *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p-activated kinase involved in cytokinesis, is activated at mitosis." Mol Cell Biol 17(9): 5067-5076.
- Berger, C., R. Kannan, et al. (2010). "Cell cycle independent role of Cyclin E during neural cell fate specification in *Drosophila* is mediated by its regulation of Prospero function." Dev Biol 337(2): 415-424.

- Bishop, A. L. and A. Hall (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." Biochem J 348 Pt 2: 241-255.
- Bose, I., J. E. Irazoqui, et al. (2001). "Assembly of scaffold-mediated complexes containing Cdc42p, the exchange factor Cdc24p, and the effector Cla4p required for cell cycle-regulated phosphorylation of Cdc24p." J Biol Chem 276(10): 7176-7186.
- Bouchoux, C. and F. Uhlmann (2011). "A quantitative model for ordered Cdk substrate dephosphorylation during mitotic exit." Cell 147(4): 803-814.
- Bourne, H. R., D. A. Sanders, et al. (1991). "The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism." Nature 349(6305): 117-127.
- Brizuela, L., G. Draetta, et al. (1989). "Activation of human CDC2 protein as a histone H1 kinase is associated with complex formation with the p62 subunit." Proc Natl Acad Sci U S A 86(12): 4362-4366.
- Butty, A. C., N. Perrinjaquet, et al. (2002). "A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization." EMBO J 21(7): 1565-1576.
- Caviston, J. P., M. Longtine, et al. (2003). "The role of Cdc42p GTPase-activating proteins in assembly of the septin ring in yeast." Mol Biol Cell 14(10): 4051-4066.
- Cerione, R. A. and Y. Zheng (1996). "The Dbl family of oncogenes." Curr Opin Cell Biol 8(2): 216-222.
- Chahdi, A. and A. Sorokin (2008). "Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates beta1Pix guanine nucleotide exchange factor activity through 14-3-3beta binding." Mol Cell Biol 28(5): 1679-1687.
- Chen, H., C. C. Kuo, et al. (2012). "Cdc42p regulation of the yeast formin Bni1p mediated by the effector Gic2p." Mol Biol Cell 23(19): 3814-3826.

- Choksi, S. P., T. D. Southall, et al. (2006). "Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in Drosophila neural stem cells." Dev Cell 11(6): 775-789.
- Ciosk, R., W. Zachariae, et al. (1998). "An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast." Cell 93(6): 1067-1076.
- Cohen, P. (2000). "The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update." Trends Biochem Sci 25(12): 596-601.
- Costanzo, M., J. L. Nishikawa, et al. (2004). "CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast." Cell 117(7): 899-913.
- Cowan, C. R. and A. A. Hyman (2007). "Acto-myosin reorganization and PAR polarity in C. elegans." Development 134(6): 1035-1043.
- Cvrckova, F., C. De Virgilio, et al. (1995). "Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast." Genes Dev 9(15): 1817-1830.
- Das, A., B. D. Slaughter, et al. (2012). "Flippase-mediated phospholipid asymmetry promotes fast Cdc42 recycling in dynamic maintenance of cell polarity." Nat Cell Biol 14(3): 304-310.
- Das, M., D. J. Wiley, et al. (2007). "Regulation of cell diameter, For3p localization, and cell symmetry by fission yeast Rho-GAP Rga4p." Mol Biol Cell 18(6): 2090-2101.
- Deshaies, R. J. and J. E. Ferrell, Jr. (2001). "Multisite phosphorylation and the countdown to S phase." Cell 107(7): 819-822.
- Draetta, G. and D. Beach (1989). "The mammalian cdc2 protein kinase: mechanisms of regulation during the cell cycle." J Cell Sci Suppl 12: 21-27.
- Durkin, M. E., B. Z. Yuan, et al. (2007). "DLC-1: a Rho GTPase-activating protein and tumour suppressor." J Cell Mol Med 11(5): 1185-1207.

- Evans, T., E. T. Rosenthal, et al. (1983). "Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division." Cell 33(2): 389-396.
- Featherstone, C. and P. Russell (1991). "Fission yeast p107wee1 mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase." Nature 349(6312): 808-811.
- Feldman, R. M., C. C. Correll, et al. (1997). "A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p." Cell 91(2): 221-230.
- Frieser, S. H., A. Hlubek, et al. (2011). "Cla4 kinase triggers destruction of the Rac1-GEF Cdc24 during polarized growth in *Ustilago maydis*." Mol Biol Cell 22(17): 3253-3262.
- Fujimura-Kamada, K., T. Hirai, et al. (2012). "Essential role of the NH2-terminal region of Cdc24 guanine nucleotide exchange factor in its initial polarized localization in *Saccharomyces cerevisiae*." Eukaryot Cell 11(1): 2-15.
- Garrard, S. M., C. T. Capaldo, et al. (2003). "Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6." EMBO J 22(5): 1125-1133.
- Gautier, J., C. Norbury, et al. (1988). "Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*." Cell 54(3): 433-439.
- Gautier, J., M. J. Solomon, et al. (1991). "*cdc25* is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2." Cell 67(1): 197-211.
- Ghaemmaghami, S., W. K. Huh, et al. (2003). "Global analysis of protein expression in yeast." Nature 425(6959): 737-741.
- Ghiara, J. B., H. E. Richardson, et al. (1991). "A cyclin B homolog in *S. cerevisiae*: chronic activation of the Cdc28 protein kinase by cyclin prevents exit from mitosis." Cell 65(1): 163-174.
- Glotzer, M. (2005). "The molecular requirements for cytokinesis." Science 307(5716): 1735-1739.

- Gould, K. L. and P. Nurse (1989). "Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis." Nature 342(6245): 39-45.
- Gulli, M. P., M. Jaquenoud, et al. (2000). "Phosphorylation of the Cdc42 exchange factor Cdc24 by the PAK-like kinase Cla4 may regulate polarized growth in yeast." Mol Cell 6(5): 1155-1167.
- Hadwiger, J. A., C. Wittenberg, et al. (1989). "A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast." Proc Natl Acad Sci U S A 86(16): 6255-6259.
- Han, B. K., L. M. Bogomolnaya, et al. (2005). "Bem1p, a scaffold signaling protein, mediates cyclin-dependent control of vacuolar homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Dev 19(21): 2606-2618.
- Hanks, S. K. and T. Hunter (1995). "Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification." FASEB J 9(8): 576-596.
- Hao, Y., L. Boyd, et al. (2006). "Stabilization of cell polarity by the *C. elegans* RING protein PAR-2." Dev Cell 10(2): 199-208.
- Haraguchi, T., T. Koujin, et al. (2000). "Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes." J Cell Sci 113 (Pt 5): 779-794.
- Hardwick, K. G., R. Li, et al. (1999). "Lesions in many different spindle components activate the spindle checkpoint in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics 152(2): 509-518.
- Harper, J. W. (2002). "A phosphorylation-driven ubiquitination switch for cell-cycle control." Trends Cell Biol 12(3): 104-107.
- Hart, M. J., A. Eva, et al. (1991). "Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the *dbl* oncogene product." Nature 354(6351): 311-314.
- Hart, M. J., A. Eva, et al. (1994). "Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the *dbl* oncogene product." J Biol Chem 269(1): 62-65.

- Hartwell, L. H., J. Culotti, et al. (1974). "Genetic control of the cell division cycle in yeast." Science 183(4120): 46-51.
- Hartwell, L. H., J. Culotti, et al. (1970). "Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants." Proc Natl Acad Sci U S A 66(2): 352-359.
- Harvey, S. L., A. Charlet, et al. (2005). "Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1." Cell 122(3): 407-420.
- Harvey, S. L., G. Enciso, et al. (2011). "A phosphatase threshold sets the level of Cdk1 activity in early mitosis in budding yeast." Mol Biol Cell 22(19): 3595-3608.
- Harvey, S. L. and D. R. Kellogg (2003). "Conservation of mechanisms controlling entry into mitosis: budding yeast wee1 delays entry into mitosis and is required for cell size control." Curr Biol 13(4): 264-275.
- Heald, R., R. Tournebize, et al. (1996). "Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts." Nature 382(6590): 420-425.
- Henchoz, S., Y. Chi, et al. (1997). "Phosphorylation- and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Far1p in budding yeast." Genes Dev 11(22): 3046-3060.
- Holly, S. P. and K. J. Blumer (1999). "PAK-family kinases regulate cell and actin polarization throughout the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Biol 147(4): 845-856.
- Hori, Y., A. Kikuchi, et al. (1991). "Post-translational modifications of the C-terminal region of the rho protein are important for its interaction with membranes and the stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins." Oncogene 6(4): 515-522.
- Irazoqui, J. E., A. S. Howell, et al. (2005). "Opposing roles for actin in Cdc42p polarization." Mol Biol Cell 16(3): 1296-1304.
- Ito, T., Y. Matsui, et al. (2001). "Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions." EMBO J 20(15): 3938-3946.

- Janke, C., M. M. Magiera, et al. (2004). "A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes." Yeast 21(11): 947-962.
- Jaspersen, S. L., B. J. Huneycutt, et al. (2004). "Cdc28/Cdk1 regulates spindle pole body duplication through phosphorylation of Spc42 and Mps1." Dev Cell 7(2): 263-274.
- Jeffrey, P. D., A. A. Russo, et al. (1995). "Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex." Nature 376(6538): 313-320.
- Jose, M., S. Tollis, et al. (2013). "Robust polarity establishment occurs via an endocytosis-based cortical corralling mechanism." J Cell Biol 200(4): 407-418.
- Kahana, J. A., B. J. Schnapp, et al. (1995). "Kinetics of spindle pole body separation in budding yeast." Proc Natl Acad Sci U S A 92(21): 9707-9711.
- Kaksonen, M., Y. Sun, et al. (2003). "A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization." Cell 115(4): 475-487.
- Katzav, S., J. L. Cleveland, et al. (1991). "Loss of the amino-terminal helix-loop-helix domain of the vav proto-oncogene activates its transforming potential." Mol Cell Biol 11(4): 1912-1920.
- Kelly, F. D. and P. Nurse (2011). "Spatial control of Cdc42 activation determines cell width in fission yeast." Mol Biol Cell 22(20): 3801-3811.
- Kim, A. S., L. T. Kakalis, et al. (2000). "Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein." Nature 404(6774): 151-158.
- Klotzbucher, A., E. Stewart, et al. (1996). "The 'destruction box' of cyclin A allows B-type cyclins to be ubiquitinated, but not efficiently destroyed." EMBO J 15(12): 3053-3064.

- Knaus, M., M. P. Pelli-Gulli, et al. (2007). "Phosphorylation of Bem2p and Bem3p may contribute to local activation of Cdc42p at bud emergence." EMBO J 26(21): 4501-4513.
- Koch, G., K. Tanaka, et al. (1997). "Association of the Rho family small GTP-binding proteins with Rho GDP dissociation inhibitor (Rho GDI) in *Saccharomyces cerevisiae*." Oncogene 15(4): 417-422.
- Koivomagi, M., E. Valk, et al. (2011). "Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase." Nature 480(7375): 128-131.
- Kozubowski, L., K. Saito, et al. (2008). "Symmetry-breaking polarization driven by a Cdc42p GEF-PAK complex." Curr Biol 18(22): 1719-1726.
- Kron, S. J. and J. A. Spudich (1986). "Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface." Proc Natl Acad Sci U S A 83(17): 6272-6276.
- Labbe, J. C., A. Picard, et al. (1989). "Purification of MPF from starfish: identification as the H1 histone kinase p34cdc2 and a possible mechanism for its periodic activation." Cell 57(2): 253-263.
- Langan, T. A., J. Gautier, et al. (1989). "Mammalian growth-associated H1 histone kinase: a homolog of cdc2+/CDC28 protein kinases controlling mitotic entry in yeast and frog cells." Mol Cell Biol 9(9): 3860-3868.
- Leberer, E., D. Dignard, et al. (1992). "The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein beta gamma subunits to downstream signalling components." EMBO J 11(13): 4815-4824.
- Leberer, E., C. Wu, et al. (1997). "Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase." EMBO J 16(1): 83-97.
- Lechler, T., G. A. Jonsdottir, et al. (2001). "A two-tiered mechanism by which Cdc42 controls the localization and activation of an Arp2/3-activating motor complex in yeast." J Cell Biol 155(2): 261-270.

- Lee, M. G. and P. Nurse (1987). "Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*." Nature 327(6117): 31-35.
- Lees, J. G., B. R. Smith, et al. (2004). "CDtool-an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving." Anal Biochem 332(2): 285-289.
- Leeuw, T., A. Fourest-Lieuvin, et al. (1995). "Pheromone response in yeast: association of Bem1p with proteins of the MAP kinase cascade and actin." Science 270(5239): 1210-1213.
- Lei, M., W. Lu, et al. (2000). "Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch." Cell 102(3): 387-397.
- Lei, M., M. A. Robinson, et al. (2005). "The active conformation of the PAK1 kinase domain." Structure 13(5): 769-778.
- Lew, D. J., V. Dulic, et al. (1991). "Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (*Cln*) function in yeast." Cell 66(6): 1197-1206.
- Lew, D. J. and S. I. Reed (1993). "Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by *Cdc28* and cyclins." J Cell Biol 120(6): 1305-1320.
- Liu, J. and J. N. Onuchic (2006). "A driving and coupling "Pac-Man" mechanism for chromosome poleward translocation in anaphase A." Proc Natl Acad Sci U S A 103(49): 18432-18437.
- Longtine, M. S., A. McKenzie, 3rd, et al. (1998). "Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast 14(10): 953-961.
- Lu, P., C. Vogel, et al. (2007). "Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation." Nat Biotechnol 25(1): 117-124.
- Manning, G., G. D. Plowman, et al. (2002). "Evolution of protein kinase signaling from yeast to man." Trends Biochem Sci 27(10): 514-520.

- Marschall, L. G., R. L. Jeng, et al. (1996). "Analysis of Tub4p, a yeast gamma-tubulin-like protein: implications for microtubule-organizing center function." J Cell Biol 134(2): 443-454.
- Martin, H., A. Mendoza, et al. (1997). "Characterization of SKM1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a novel Ste20/PAK-like protein kinase." Mol Microbiol 23(3): 431-444.
- Matsui, Y., R. Matsui, et al. (1996). "Yeast src homology region 3 domain-binding proteins involved in bud formation." J Cell Biol 133(4): 865-878.
- McCusker, D., C. Denison, et al. (2007). "Cdk1 coordinates cell-surface growth with the cell cycle." Nat Cell Biol 9(5): 506-515.
- McCusker, D., A. Royou, et al. (2012). "Cdk1-dependent control of membrane-trafficking dynamics." Mol Biol Cell 23(17): 3336-3347.
- Meiri, D., M. A. Greeve, et al. (2009). "Modulation of Rho guanine exchange factor Lfc activity by protein kinase A-mediated phosphorylation." Mol Cell Biol 29(21): 5963-5973.
- Melendez, J., M. Grogg, et al. (2011). "Signaling role of Cdc42 in regulating mammalian physiology." J Biol Chem 286(4): 2375-2381.
- Meraldi, P. and E. A. Nigg (2002). "The centrosome cycle." FEBS Lett 521(1-3): 9-13.
- Mertens, H. D. and D. I. Svergun (2010). "Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering." J Struct Biol 172(1): 128-141.
- Miki, T., C. L. Smith, et al. (1993). "Oncogene *ect2* is related to regulators of small GTP-binding proteins." Nature 362(6419): 462-465.
- Milburn, M. V., L. Tong, et al. (1990). "Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins." Science 247(4945): 939-945.

- Minoshima, Y., T. Kawashima, et al. (2003). "Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis." Dev Cell 4(4): 549-560.
- Mionnet, C., S. Bogliolo, et al. (2008). "Oligomerization regulates the localization of Cdc24, the Cdc42 activator in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem 283(25): 17515-17530.
- Moffat, J. and B. Andrews (2004). "Late-G1 cyclin-CDK activity is essential for control of cell morphogenesis in budding yeast." Nat Cell Biol 6(1): 59-66.
- Moll, T., G. Tebb, et al. (1991). "The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5." Cell 66(4): 743-758.
- Moreau, V., J. M. Galan, et al. (1997). "The yeast actin-related protein Arp2p is required for the internalization step of endocytosis." Mol Biol Cell 8(7): 1361-1375.
- Moseley, J. B. and B. L. Goode (2006). "The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism." Microbiol Mol Biol Rev 70(3): 605-645.
- Motegi, F., S. Zonies, et al. (2011). "Microtubules induce self-organization of polarized PAR domains in *Caenorhabditis elegans* zygotes." Nat Cell Biol 13(11): 1361-1367.
- Murgia, A., F. Anglani, et al. (1998). "The guanine triphosphatase (GTPase) activating protein (GAP)-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene is not mutated in neural crest-derived sporadic tumours." Eur J Cancer 34(4): 577-579.
- Murray, A. W., M. J. Solomon, et al. (1989). "The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity." Nature 339(6222): 280-286.
- Nance, J. (2005). "PAR proteins and the establishment of cell polarity during *C. elegans* development." Bioessays 27(2): 126-135.

- Nash, P., X. Tang, et al. (2001). "Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication." Nature 414(6863): 514-521.
- Nern, A. and R. A. Arkowitz (2000). "Nucleocytoplasmic shuttling of the Cdc42p exchange factor Cdc24p." J Cell Biol 148(6): 1115-1122.
- Ngok, S. P., R. Geyer, et al. (2013). "Phosphorylation-mediated 14-3-3 protein binding regulates the function of the rho-specific guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF) Syx." J Biol Chem 288(9): 6640-6650.
- Nicklas, R. B. and S. C. Ward (1994). "Elements of error correction in mitosis: microtubule capture, release, and tension." J Cell Biol 126(5): 1241-1253.
- Niiya, F., T. Tatsumoto, et al. (2006). "Phosphorylation of the cytokinesis regulator ECT2 at G2/M phase stimulates association of the mitotic kinase Plk1 and accumulation of GTP-bound RhoA." Oncogene 25(6): 827-837.
- Nishi, Y., E. Rogers, et al. (2008). "Polo kinases regulate C. elegans embryonic polarity via binding to DYRK2-primed MEX-5 and MEX-6." Development 135(4): 687-697.
- Noatynska, A. and M. Gotta (2012). "Cell polarity and asymmetric cell division: the C. elegans early embryo." Essays Biochem 53: 1-14.
- Nurse, P. (1975). "Genetic control of cell size at cell division in yeast." Nature 256(5518): 547-551.
- Nurse, P., P. Thuriaux, et al. (1976). "Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe." Mol Gen Genet 146(2): 167-178.
- Ogura, K., T. Tandai, et al. (2009). "NMR structure of the heterodimer of Bem1 and Cdc24 PB1 domains from Saccharomyces cerevisiae." J Biochem 146(3): 317-325.
- Ohta, Y., J. H. Hartwig, et al. (2006). "FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling." Nat Cell Biol 8(8): 803-814.

- Omer, C. A. and J. B. Gibbs (1994). "Protein prenylation in eukaryotic microorganisms: genetics, biology and biochemistry." Mol Microbiol 11(2): 219-225.
- Pai, E. F., W. Kabsch, et al. (1989). "Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation." Nature 341(6239): 209-214.
- Pai, E. F., U. Krengel, et al. (1990). "Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis." EMBO J 9(8): 2351-2359.
- Pal, G., M. T. Paraz, et al. (2008). "Regulation of Mih1/Cdc25 by protein phosphatase 2A and casein kinase 1." J Cell Biol 180(5): 931-945.
- Park, H. O., E. Bi, et al. (1997). "Two active states of the Ras-related Bud1/Rsr1 protein bind to different effectors to determine yeast cell polarity." Proc Natl Acad Sci U S A 94(9): 4463-4468.
- Parrini, M. C., M. Lei, et al. (2002). "Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1." Mol Cell 9(1): 73-83.
- Peterson, J., Y. Zheng, et al. (1994). "Interactions between the bud emergence proteins Bem1p and Bem2p and Rho-type GTPases in yeast." J Cell Biol 127(5): 1395-1406.
- Pruyne, D., M. Evangelista, et al. (2002). "Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association." Science 297(5581): 612-615.
- Qiu, R. G., A. Abo, et al. (1997). "Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation." Mol Cell Biol 17(6): 3449-3458.
- Raleigh, J. M. and M. J. O'Connell (2000). "The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25." J Cell Sci 113 (Pt 10): 1727-1736.
- Reed, S. I., J. A. Hadwiger, et al. (1985). "Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC28." Proc Natl Acad Sci U S A 82(12): 4055-4059.

- Richman, T. J., K. A. Toenjes, et al. (2004). "Analysis of cell-cycle specific localization of the Rdi1p RhoGDI and the structural determinants required for Cdc42p membrane localization and clustering at sites of polarized growth." Curr Genet 45(6): 339-349.
- Rivers, D. M., S. Moreno, et al. (2008). "PAR proteins direct asymmetry of the cell cycle regulators Polo-like kinase and Cdc25." J Cell Biol 180(5): 877-885.
- Rogers, S., R. Wells, et al. (1986). "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis." Science 234(4774): 364-368.
- Ron, D., G. Graziani, et al. (1989). "The N-terminal region of proto-dbl down regulates its transforming activity." Oncogene 4(9): 1067-1072.
- Ron, D., M. Zannini, et al. (1991). "A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr." New Biol 3(4): 372-379.
- Roof, R. W., M. D. Haskell, et al. (1998). "Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation." Mol Cell Biol 18(12): 7052-7063.
- Rose, L. S. and K. J. Kemphues (1998). "Early patterning of the *C. elegans* embryo." Annu Rev Genet 32: 521-545.
- Roy, A., A. Kucukural, et al. (2010). "I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction." Nat Protoc 5(4): 725-738.
- Rudolph, M. G., A. Wittinghofer, et al. (1999). "Nucleotide binding to the G12V-mutant of Cdc42 investigated by X-ray diffraction and fluorescence spectroscopy: two different nucleotide states in one crystal." Protein Sci 8(4): 778-787.
- Saiki, R. K., S. Scharf, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science 230(4732): 1350-1354.

- Saraste, M., P. R. Sibbald, et al. (1990). "The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins." Trends Biochem Sci 15(11): 430-434.
- Schmidt, H., C. Rickert, et al. (1997). "The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm." Dev Biol 189(2): 186-204.
- Schneider, B. L., J. Zhang, et al. (2004). "Growth rate and cell size modulate the synthesis of, and requirement for, G1-phase cyclins at start." Mol Cell Biol 24(24): 10802-10813.
- Schwob, E. and K. Nasmyth (1993). "CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Dev 7(7A): 1160-1175.
- Shimada, Y., P. Wiget, et al. (2004). "The nucleotide exchange factor Cdc24p may be regulated by auto-inhibition." EMBO J 23(5): 1051-1062.
- Shinjo, K., J. G. Koland, et al. (1990). "Molecular cloning of the gene for the human placental GTP-binding protein Gp (G25K): identification of this GTP-binding protein as the human homolog of the yeast cell-division-cycle protein CDC42." Proc Natl Acad Sci U S A 87(24): 9853-9857.
- Simanis, V. and P. Nurse (1986). "The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation." Cell 45(2): 261-268.
- Simon, M. N., C. De Virgilio, et al. (1995). "Role for the Rho-family GTPase Cdc42 in yeast mating-pheromone signal pathway." Nature 376(6542): 702-705.
- Simpson-Lavy, K. J. and M. Brandeis (2010). "Clb2 and the APC/C(Cdh1) regulate Swe1 stability." Cell Cycle 9(15): 3046-3053.
- Skotheim, J. M., S. Di Talia, et al. (2008). "Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry." Nature 454(7202): 291-296.
- Slaughter, B. D., A. Das, et al. (2009). "Dual modes of *cdc42* recycling fine-tune polarized morphogenesis." Dev Cell 17(6): 823-835.

- Sloat, B. F., A. Adams, et al. (1981). "Roles of the CDC24 gene product in cellular morphogenesis during the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle." *J Cell Biol* 89(3): 395-405.
- Smith, S. E., B. Rubinstein, et al. (2013). "Independence of symmetry breaking on Bem1-mediated autocatalytic activation of Cdc42." *J Cell Biol*.
- Sopko, R., D. Huang, et al. (2007). "Activation of the Cdc42p GTPase by cyclin-dependent protein kinases in budding yeast." *EMBO J* 26(21): 4487-4500.
- Spang, A., S. Geissler, et al. (1996). "gamma-Tubulin-like Tub4p of *Saccharomyces cerevisiae* is associated with the spindle pole body substructures that organize microtubules and is required for mitotic spindle formation." *J Cell Biol* 134(2): 429-441.
- Stahelin, R. V., D. Karathanassis, et al. (2007). "Structural and membrane binding analysis of the Phox homology domain of Bem1p: basis of phosphatidylinositol 4-phosphate specificity." *J Biol Chem* 282(35): 25737-25747.
- Stenmark, H. and V. M. Olkkonen (2001). "The Rab GTPase family." *Genome Biol* 2(5): REVIEWS3007.
- Takai, Y., T. Sasaki, et al. (2001). "Small GTP-binding proteins." *Physiol Rev* 81(1): 153-208.
- Tcherkezian, J., E. I. Danek, et al. (2005). "Extracellular signal-regulated kinase 1 interacts with and phosphorylates CdGAP at an important regulatory site." *Mol Cell Biol* 25(15): 6314-6329.
- Tenlen, J. R., J. N. Molk, et al. (2008). "MEX-5 asymmetry in one-cell *C. elegans* embryos requires PAR-4- and PAR-1-dependent phosphorylation." *Development* 135(22): 3665-3675.
- Ubersax, J. A. and J. E. Ferrell, Jr. (2007). "Mechanisms of specificity in protein phosphorylation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 530-541.
- Ubersax, J. A., E. L. Woodbury, et al. (2003). "Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1." *Nature* 425(6960): 859-864.

- Ueda, T., A. Kikuchi, et al. (1990). "Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein." J Biol Chem 265(16): 9373-9380.
- Uesono, Y., M. P. Ashe, et al. (2004). "Simultaneous yet independent regulation of actin cytoskeletal organization and translation initiation by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell 15(4): 1544-1556.
- Wai, S. C., S. A. Gerber, et al. (2009). "Multisite phosphorylation of the guanine nucleotide exchange factor Cdc24 during yeast cell polarization." PLoS One 4(8): e6563.
- Wallace, B. A. and R. W. Janes (2001). "Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins: secondary structure, fold recognition and structural genomics." Curr Opin Chem Biol 5(5): 567-571.
- Ward, G. E. and M. W. Kirschner (1990). "Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C." Cell 61(4): 561-577.
- Wedlich-Soldner, R., S. Altschuler, et al. (2003). "Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42 GTPase." Science 299(5610): 1231-1235.
- Wedlich-Soldner, R., S. C. Wai, et al. (2004). "Robust cell polarity is a dynamic state established by coupling transport and GTPase signaling." J Cell Biol 166(6): 889-900.
- Wijnen, H., A. Landman, et al. (2002). "The G(1) cyclin Cln3 promotes cell cycle entry via the transcription factor Swi6." Mol Cell Biol 22(12): 4402-4418.
- Wild, A. C., J. W. Yu, et al. (2004). "The p21-activated protein kinase-related kinase Cla4 is a coincidence detector of signaling by Cdc42 and phosphatidylinositol 4-phosphate." J Biol Chem 279(17): 17101-17110.

- Winters, M. J. and P. M. Pryciak (2005). "Interaction with the SH3 domain protein Bem1 regulates signaling by the *Saccharomyces cerevisiae* p21-activated kinase Ste20." *Mol Cell Biol* 25(6): 2177-2190.
- Wittenberg, C. and S. I. Reed (1989). "Conservation of function and regulation within the Cdc28/cdc2 protein kinase family: characterization of the human Cdc2Hs protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 9(9): 4064-4068.
- Wolfe, B. A., T. Takaki, et al. (2009). "Polo-like kinase 1 directs assembly of the HsCdk-4 RhoGAP/Ect2 RhoGEF complex to initiate cleavage furrow formation." *PLoS Biol* 7(5): e1000110.
- Worthylake, D. K., K. L. Rossman, et al. (2000). "Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1." *Nature* 408(6813): 682-688.
- Wu, H. and P. Brennwald (2010). "The function of two Rho family GTPases is determined by distinct patterns of cell surface localization." *Mol Cell Biol* 30(21): 5207-5217.
- Wu, H., C. Turner, et al. (2010). "The Exo70 subunit of the exocyst is an effector for both Cdc42 and Rho3 function in polarized exocytosis." *Mol Biol Cell* 21(3): 430-442.
- Yamaguchi, Y., K. Ota, et al. (2007). "A novel Cdc42-interacting domain of the yeast polarity establishment protein Bem1. Implications for modulation of mating pheromone signaling." *J Biol Chem* 282(1): 29-38.
- Yamano, H., C. Tsurumi, et al. (1998). "The role of the destruction box and its neighbouring lysine residues in cyclin B for anaphase ubiquitin-dependent proteolysis in fission yeast: defining the D-box receptor." *EMBO J* 17(19): 5670-5678.
- Yamashita, Y. M., A. P. Mahowald, et al. (2007). "Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division." *Science* 315(5811): 518-521.
- Yang, Z., U. S. Tulu, et al. (2007). "Kinetochore dynein is required for chromosome motion and congression independent of the spindle checkpoint." *Curr Biol* 17(11): 973-980.

- Yoshimura, Y. and H. Miki (2011). "Dynamic regulation of GEF-H1 localization at microtubules by Par1b/MARK2." Biochem Biophys Res Commun 408(2): 322-328.
- Yu, B., I. R. Martins, et al. (2010). "Structural and energetic mechanisms of cooperative autoinhibition and activation of Vav1." Cell 140(2): 246-256.
- Yu, J. W., J. M. Mendrola, et al. (2004). "Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains." Mol Cell 13(5): 677-688.
- Yuan, H., C. Y. Chiang, et al. (2012). "Regulation of cyclin A localization downstream of Par-1 function is critical for the centrosome orientation checkpoint in *Drosophila* male germline stem cells." Dev Biol 361(1): 57-67.
- Zanin, E., A. Desai, et al. (2013). "A Conserved RhoGAP Limits M Phase Contractility and Coordinates with Microtubule Asters to Confine RhoA during Cytokinesis." Dev Cell 26(5): 496-510.
- Zetterberg, A., O. Larsson, et al. (1995). "What is the restriction point?" Curr Opin Cell Biol 7(6): 835-842.
- Zhang, X., K. Orlando, et al. (2008). "Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42." J Cell Biol 180(1): 145-158.
- Zhang, Y. (2008). "I-TASSER server for protein 3D structure prediction." BMC Bioinformatics 9: 40.
- Zheng, Y., A. Bender, et al. (1995). "Interactions among proteins involved in bud-site selection and bud-site assembly in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem 270(2): 626-630.

Le cycle cellulaire eucaryote est caractérisé par des changements abrupts et dynamiques de la polarité cellulaire lorsque les chromosomes sont dupliqués et ségrégués. Ces événements nécessitent une coordination entre la machinerie du cycle cellulaire et les régulateurs de la polarité. Les mécanismes qui contrôlent cette coordination ne sont pas totalement compris. Dans la levure *S. cerevisiae*, comme dans d'autres organismes eucaryotes, la GTPase Cdc42 joue un rôle important dans la régulation de la polarité cellulaire. En effet ses régulateurs constituent un module GTPase qui subit une phosphorylation dynamique, au cours du cycle cellulaire, par des kinases évolutivement conservées dont la Cycline-Dependent Kinase 1 (Cdk1) et la p21-Activated Kinase (PAK). Ces kinases et substrats pourraient relier la polarité et la progression dans le cycle cellulaire. En utilisant une approche *in vitro*, nous avons reconstitué la phosphorégulation du Guanine nucléotide Exchange Factor (GEF) de Cdc42, la protéine Cdc24. Nous avons identifié un possible mécanisme de régulation de la phosphorylation impliquant une protéine d'échafaudage qui augmente la phosphorylation de Cdc24 par la PAK et Cdk1. Cette phosphorylation accroît modérément l'affinité de Cdc24 pour cette même protéine d'échafaudage, Bem1. De plus, en testant les effets d'autres composants du module GTPase sur la phosphorylation de Cdc24, nous avons identifié un effet antagoniste pour une GTPase Activating Protein (GAP), Rga2. Cette protéine est présente dans le même complexe que Cdc24 et Bem1, les membres de ce complexe sont tous phosphorylés par Cdk1. Des mutants *rga2* suggèrent que la phosphorylation que subie Rga2 inhibe son activité GAP. Nous proposons un modèle provisoire pour expliquer la présence de Rga2 dans ce complexe et l'inhibition qu'elle oppose à la phosphorylation de Cdc24. La présence de la protéine GAP dans le complexe pourrait être un mécanisme de contrôle de la phosphorylation de Cdc24 dans le but de déstabiliser son interaction avec la protéine Bem1 en cas de mauvaise localisation du complexe. Par ailleurs, la PAK est activée par l'activité de Cdc42, nos résultats sont consistants avec un modèle dans lequel des signaux du cycle cellulaire engendreraient une auto-amplification de l'activation du module GTPase. Chez *S. pombe*, la croissance polarisée nécessite un gradient d'activation de Cdc42 dû à une ségrégation de GEF et de GAP. Dans ces travaux nous montrons que toutes les protéines GAPs de Cdc42 localisent aux sites de croissance au cours du cycle cellulaire. Ces localisations sont consistantes avec le besoin de cyclage de Cdc42 pour maintenir sa polarisation. Ces résultats suggèrent que la localisation des protéines GAP régulant Cdc42 chez *S. cerevisiae* semble différente de ce qui est connu chez *S. pombe*.