

ALEXANDRA LAMBERT

**ÉTUDE D'*ARF3* ET DE *GEA2* DANS
L'ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE
D'ACTINE CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Biologie
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2006

Résumé

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le cytosquelette d'actine est formé de câbles d'actine et de granules corticaux. La surexpression d'*ARF3* dans trois souches présentant un défaut soit dans la formation des câbles soit dans l'organisation des granules corticaux a entraîné une correction de leurs phénotypes. Ces résultats suggèrent un rôle pour Arf3p dans la formation et/ou l'organisation de ces deux structures. La mutagenèse dirigée a permis de démontrer que la myristoylation d'Arf3p est nécessaire à son activité. La localisation spécifique d'Arf3p est dépendante des protéines Bni1p, Drs2p, Gea1p et Gea2p qui ont un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine. De plus, *ARF3* démontre une interaction génétique avec *GEA2* et la surexpression de *GEA2* et de la région fonctionnelle de *BNI1* corrigent le bourgeonnement aléatoire d'*arf3Δ*. Ces résultats indiquent un rôle important pour Arf3p dans l'organisation du cytosquelette d'actine ainsi qu'un lien entre cette protéine et plusieurs autres impliquées dans cette structure.

Avant-Propos

En premier lieu, je tiens à remercier le Dr. Dominick Pallotta pour m'avoir laissé faire mes preuves dans le domaine de la recherche. C'est aussi grâce à ces judicieux conseils, sa disponibilité et son soutien financier que mon projet a pu aussi bien avancer. Ces deux années ont vraiment été pour moi très enrichissantes.

Je remercie également le CREFSIP pour son soutien financier pendant ma première année de maîtrise.

Je désire aussi remercier mes anciennes collègues de travail, Ewa Zakrzewska et Marjorie Perron pour avoir su répondre à mes nombreuses questions ou tout simplement pour ces petits moments passés à discuter de tout et de rien. Je souhaite remercier plus particulièrement Marjorie Perron pour l'ensemble des travaux déjà réalisés sur Arf3p à mon arrivée, tel que le clonage d'*ARF3* et d'*ARF3-GFP* dans les plasmides pBluescripts, pRS426 et pRS316 ainsi que le début de la mutagenèse dirigée (Perron, 2004). Je tiens aussi à remercier Manon Valcourt pour sa participation à l'étude de la surexpression de *GEA2*. Toutes les autres expériences décrites ont été effectuées par moi-même. Néanmoins, par convention, l'utilisation du pronom personnel « nous » sera préférée dans l'ensemble de ce manuscrit même s'il s'agit de mes propres résultats ou suppositions. J'ai aussi eu la chance de travailler avec Élyse Lavoie, qui au fil du temps, est devenue plus qu'une collègue mais aussi une très bonne amie et partageant avec moi la « passion » de ramasser tout et n'importe quoi lors des démonstrations des compagnies ainsi qu'à la participation à de nombreux tirages pour gagner régulièrement des cadeaux fort intéressants. Merci aussi, Élyse pour avoir pris le temps de m'écouter et de m'avoir conseillée lors de mes préparations pour mes présentations orales ainsi que ton aide pour la rédaction de ce manuscrit.

Je ne peux passer sous silence l'aide précieuse de ma famille malgré la distance qui nous sépare. Je remercie mes parents d'avoir cru en moi et de m'avoir laissé partir en ce jour du 18 août 2003 vers une destination inconnue, le Québec.

Pour finir, je tiens également à remercier la personne qui occupe une très grande place dans ma vie depuis maintenant plus de 7 ans, Fabien Panou. Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir supportée, encouragée et soutenue depuis ces nombreuses années.

En vérité, le chemin importe peu, la volonté d'arriver suffit à tout.
Albert Camus 1913-1960

Table des matières

Résumé	ii
Avant-Propos.....	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste de abréviations	xii
Chapitre 1 INTRODUCTION	1
1.1 Introduction générale	2
1.2 Le cytosquelette d'actine chez <i>S. cerevisiae</i>	2
1.2.1 Le cytosquelette d'actine.....	2
1.2.2 L'organisation du cytosquelette d'actine au cours du cycle cellulaire chez <i>S. cerevisiae</i>	4
1.2.3 Le cycle de l'actine lors du processus de conjugaison.....	4
1.2.4 La formation de deux structures : les granules corticaux et les câbles d'actine par deux systèmes de formation des filaments d'actine	6
1.2.4.1 La formation des granules corticaux et le complexe Arp2/3.....	6
1.2.4.2 La formation des câbles d'actine et les formines	9
1.2.5 Les protéines de liaison à l'actine	11
1.2.5.1 La profiline	11
1.2.6 La cofiline et ses partenaires	13
1.2.7 Les protéines de coiffe.....	15
1.2.8 La twinfiline.....	16
1.3 Les protéines de pontage des filaments d'actine.....	16
1.3.1.1 La fimbrine/Sac6p et Scp1p	16
1.3.1.2 Les tropomyosines	17
1.4 La régulation du cytosquelette d'actine	17
1.4.1 La régulation des GTPases.....	17
1.4.2 La sélection du site de bourgeonnement.....	18
1.4.3 L'organisation de la machinerie pour la formation du bourgeon	19
1.4.4 La croissance polarisée.....	20
1.4.4.1 La famille des Rho-GTPases	21
1.5 L'actine et l'endocytose.....	26
1.6 Étude des protéines associées à la régulation du cytosquelette d'actine.....	29
1.6.1 Les GEF Gea1p et Gea2p.....	30
1.6.2 Les protéines Arf	31
1.6.2.1 Les protéines Arf1p et Arf2p.....	32
1.6.2.2 La protéine Arf3p.....	32
1.6.2.3 Mécanisme d'activation et d'inactivation des Arf.....	35
1.7 Origine et objectifs du projet.....	36
Chapitre 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	38
2.1 Souches bactériennes et conditions de croissance.....	39
2.1.1 Souches bactériennes.....	39
2.1.2 Conditions de croissance	39
2.2 Souches de levure et conditions de croissance.....	40
2.2.1 Souches de levure	40

2.2.2 Conditions de croissance	42
2.3 Constructions plasmidiques	43
2.4 Manipulation de l'ADN.....	44
2.4.1 Réaction PCR.....	44
2.4.2 Électrophorèse sur gel d'agarose.....	45
2.4.3 Isolement d'ADN sur gel d'agarose.....	45
2.4.4 Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction	46
2.4.5 Ligature.....	46
2.4.6 Purification de produits de PCR.....	47
2.5 Transformation	47
2.5.1 Transformation bactérienne.....	47
2.5.1.1 Transformation bactérienne par électroporation.....	47
2.5.1.2 Transformation bactérienne par choc thermique	48
2.5.2 Transformation de <i>S. cerevisiae</i>	49
2.6 Extraction d'ADN plasmidique.....	50
2.6.1 Pour les bactéries	50
2.6.1.1 Méthode CTAB	50
2.6.1.2 Méthode par colonne QIAGEN.....	50
2.6.2 Pour la levure.....	51
2.7 Création du double mutant <i>arf3Δ gea2Δ</i>	51
2.7.1 Création du double mutant diploïde.....	51
2.7.2 Sporulation du mutant diploïde	52
2.7.3 Dissection des tétrades.....	52
2.7.3.1 Digestion de la paroi cellulaire de l'asque	52
2.7.3.2 Microdissection des ascospores.....	53
2.7.3.3 Sélection du double mutant	53
2.7.4 Test de conjugaison.....	54
2.7.5 Test du génotype.....	54
2.7.6 Vérification des délétions par PCR	55
2.8 Mutagenèse	55
2.8.1 Mutagenèse dirigée	55
2.8.1.1 Oligonucléotides	56
2.8.1.2 Réaction de mutagenèse dirigée.....	56
2.8.1.3 Clonage dans un plasmide de levure.....	57
2.8.2 Mutagenèse aléatoire	57
2.8.2.1 Oligonucléotides	57
2.8.2.2 Réaction	58
2.8.3 « Gap Repair »	58
2.9 Colorations et observations microscopiques.....	62
2.9.1 Observation en contraste interférentiel (Nomarski).....	62
2.9.2 Coloration des filaments d'actine	62
2.9.3 Coloration des cicatrices de bourgeonnement	62
2.9.4 Observation de la GFP « Green Fluorescent Protein »	63
2.10 Test de croissance.....	63
Chapitre 3 RÉSULTATS	65
3.1 La surexpression d' <i>ARF3</i> et de <i>GEA2</i>	66
3.1.1 La surexpression d' <i>ARF3</i> corrige le phénotype associé à la délétion de profiline (<i>phj1Δ</i>).....	66

3.1.2 L'importance des formines Bni1p et Bnr1p pour la formation des câbles par la surexpression d' <i>ARF3</i> et de <i>GEA2</i>	70
3.1.3 La surexpression d' <i>ARF3</i> et de <i>GEA2</i> affecte le phénotype de plusieurs souches mutantes	71
3.1.3.1 Effet de la surexpression d' <i>ARF3</i> et de <i>GEA2</i> sur le phénotype de la souche <i>drs2Δ</i>	72
3.1.3.2 Effet de la surexpression d' <i>ARF3</i> et de <i>GEA2</i> sur le phénotype de la souche <i>spa2Δ</i>	72
3.1.3.3 Formation et repolarisation des granules corticaux dans la souche <i>las17Δ</i> par la surexpression d' <i>ARF3</i>	73
3.1.3.4 Repolarisation des granules corticaux dans la souche <i>vp1Δ</i> par la surexpression d' <i>ARF3</i>	76
3.2 Localisation cellulaire d'Arf3p-GFP	77
3.2.1 Localisation spécifique d'Arf3p-GFP dans la souche sauvage.....	77
3.2.2 Délocalisation d'Arf3p-GFP dans les souches <i>bni1Δ</i> , <i>drs2Δ</i> , <i>gea1Δ</i> et <i>gea2Δ</i>	78
3.3 Étude du bourgeonnement de la souche <i>arf3Δ</i>	81
3.3.1 Le bourgeonnement aléatoire de la souche <i>arf3Δ</i>	81
3.3.2 Correction partielle du bourgeonnement aléatoire de la souche <i>arf3Δ</i> par la surexpression de <i>BNI1</i> , <i>FH1FH2</i> , <i>GEA2</i> , <i>RHO2</i> , <i>SYP1</i>	81
3.4 Interaction génétique entre <i>ARF3</i> et <i>GEA2</i>	85
3.4.1 Phénotypes des souches <i>arf3Δ</i> et <i>gea2Δ</i>	85
3.4.1.1 Phénotype de la souche <i>arf3Δ</i>	86
3.4.1.2 Phénotype de la souche <i>gea2Δ</i>	87
3.4.2 Phénotype de la souche <i>arf3Δ gea2Δ</i>	87
3.5 Mutagenèse dirigée et aléatoire d' <i>ARF3</i>	89
3.5.1 Étude de l'influence de mutants d' <i>ARF3</i> , clonés dans un plasmide multicopie, sur le cytosquelette d'actine des souches <i>pfy1Δ</i> et <i>pfy1-111 arf3Δ</i>	90
3.5.1.1 Mise en évidence par mutagenèse dirigée de l'importance de sites précis d'Arf3p pour son activité	90
3.5.1.2 Mise en évidence par mutagenèse aléatoire de l'importance d'un grand nombre de sites pour l'activité d'Arf3p	95
3.5.2 Étude de l'influence de mutants d' <i>ARF3</i> , clonés dans un plasmide centromérique, sur le cytosquelette d'actine des souches <i>pfy1Δ</i> et <i>pfy1-111 arf3Δ</i>	96
3.5.2.1 La production d'une seule copie d'Arf3p, mutée dans son site de liaison au GTP ou de « fast cycling » ne permet pas de corriger le cytosquelette d'actine des souches <i>pfy1Δ</i> et <i>pfy1-111 arf3Δ</i>	96
3.5.2.2 Mille mutants d' <i>ARF3</i> obtenus par mutagenèse aléatoire clonés dans un plasmide centromérique mais aucun ne corrige le cytosquelette d'actine des souches <i>pfy1Δ</i> et <i>pfy1-111 arf3Δ</i>	97
3.6 Étude du cytosquelette d'actine de la souche haploïde <i>bud6Δ</i> et du bourgeonnement de la souche diploïde <i>bud6Δ bud6Δ</i> suite à la surexpression des suppresseurs de la délétion de profiline	100
3.6.1 Le cytosquelette d'actine de la souche haploïde <i>bud6Δ</i> n'est pas modifié par la surexpression des suppresseurs de la délétion de profiline.....	100
3.6.2 Le bourgeonnement de la souche diploïde <i>bud6Δ bud6Δ</i> n'est pas corrigé par la surexpression des suppresseurs de la délétion de profiline.....	101

Chapitre 4 DISCUSSION	103
4.1 L'étude de la surexpression d' <i>ARF3</i> et de <i>GEA2</i>	104
4.1.1 Arf3p et Gea2p dans la formation des câbles d'actine.....	104
4.1.1.1 La formation des câbles dans la souche <i>pfy1Δ</i>	104
4.1.1.2 La formation des câbles d'actine par la surexpression d' <i>ARF3</i> et de <i>GEA2</i> dans <i>pfy1Δ</i> est dépendante des formines.....	106
4.1.1.3 L'importance de Spa2p pour Gea2p.....	107
4.1.2 L'implication d'Arf3p et de Gea2p dans la formation des granules corticaux et l'endocytose.....	108
4.2 L'étude de la localisation d'Arf3p et de sa fonction cellulaire.....	110
4.3 L'implication de <i>BNI1</i> mini, <i>GEA2</i> , <i>RHO2</i> et <i>SYP1</i> dans le maintien de la polarité cellulaire et la sélection du site de bourgeonnement.....	112
4.4 L'interaction génétique entre <i>ARF3</i> et <i>GEA2</i>	113
4.5 L'importance des domaines fonctionnels d'Arf3p pour son activité.....	114
4.6 La formation des câbles d'actine par les suppresseurs de la délétion de profiline dans <i>pfy1Δ</i> est dépendante de Bud6p	116
4.7 Modèle.....	117
Chapitre 5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	119
5.1 Conclusion	120
5.2 Perspectives	124
Références	125

Liste des tableaux

Tableau 1 Souches bactériennes utilisées	39
Tableau 2 Souches de levure utilisées	40
Tableau 3 Composition du mélange d'acides aminés essentiels et de bases azotés utilisé pour les milieux sélectifs	43
Tableau 4 Les différents plasmides utilisés dans l'étude actuelle.....	43
Tableau 5 Oligonucléotides utilisés pour la vérification du double mutant.....	55
Tableau 6 Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée.....	60
Tableau 7 Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse aléatoire et le « Gap Repair »	61
Tableau 8 Résumé des effets obtenues sur le phénotype des souches <i>pfy1</i> Δ et <i>pfy1-111 arf3</i> Δ par la surexpression des mutations d' <i>ARF3</i>	99

Liste des figures

Figure 1 Dynamique de la polymérisation des filaments d'actine	3
Figure 2 Organisation du cytosquelette d'actine durant le cycle cellulaire de <i>S. cerevisiae</i>	5
Figure 3 Le mécanisme de nucléation par le complexe Arp2/3 sur un filament d'actine	7
Figure 4 Le mécanisme de nucléation de l'actine par les formines	11
Figure 5 Le profiline et son rôle dans la polymérisation des filaments d'actine.....	12
Figure 6 Modèle de la régulation de la polymérisation et de la dépolymérisation des filaments d'actine	15
Figure 7 Modèle représentant le bourgeonnement des cellules haploïdes et diploïdes.....	19
Figure 8 Schéma mettant en jeu des protéines impliquées dans la sélection du site de bourgeonnement et dans l'établissement de la polarité cellulaire.....	20
Figure 9 Modèle représentant l'organisation des protéines de type Rho au site de bourgeonnement.....	24
Figure 10 Modèle illustrant les deux sentiers de signalisation empruntés par Cdc42p pour contrôler la polarisation du cytosquelette d'actine.....	25
Figure 11 Représentation schématique du processus d'endocytose chez <i>S. cerevisiae</i>	28
Figure 12 Modèle de voie de signalisation proposé pour l'organisation du cytosquelette d'actine par les différents suppresseurs identifiés. Inspiré de Marcoux <i>et al.</i> (2000) et Zakrzewska <i>et</i> <i>al.</i> (2003).....	30
Figure 13 Représentation schématique illustrant les interactions de Lsb5p avec d'autres protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine et dans l'endocytose. 35	
Figure 14 Schéma représentant le mécanisme d'activation et d'inactivation des protéines de type Arf	36
Figure 15 Surexpression d' <i>ARF1</i> , d' <i>ARF2</i> et d' <i>ARF3</i> clonés dans le plasmide YEp24 dans la souche <i>pfy1Δ</i>	68
Figure 16 Cytosquelette d'actine de la souche <i>pfy1Δ</i> lors de l'expression d' <i>ARF3</i>	68
Figure 17 Croissance de la souche <i>pfy1Δ</i> lors l'expression d' <i>ARF3</i>	69
Figure 18 Nouvelle surexpression d' <i>ARF3</i> cloné dans le plasmide YEp24 dans la souche <i>pfy1Δ</i>	69
Figure 19 Surexpression d' <i>ARF3</i> et de <i>GEA2</i> dans la souche <i>bni1#FH2-1 bnr1Δ</i>	71
Figure 20 Cytosquelette d'actine et morphologie des cellules <i>drs2Δ</i> surexprimant ou non <i>ARF3</i> et <i>GEA2</i>	74
Figure 21 Cytosquelette d'actine et morphologie des cellules <i>spa2Δ</i> surexprimant ou non <i>ARF3</i> et <i>GEA2</i>	75
Figure 22 Cytosquelette d'actine et morphologie des cellules <i>las17Δ</i> surexprimant ou non <i>ARF3</i> et <i>GEA2</i>	76
Figure 23 Cytosquelette d'actine et morphologie des cellules <i>vrp1Δ</i> seules et suite à la surexpression d' <i>ARF3</i> et de <i>GEA2</i>	77
Figure 24 Localisation cellulaire de la protéine Arf3p-GFP.....	80
Figure 25 Bourgeonnement aléatoire de la souche <i>arf3Δ</i> et correction partielle de ce bourgeonnement suite à la surexpression de <i>GEA2</i>	83
Figure 26 Graphique représentant l'effet de la surexpression des gènes <i>BNI1</i> mini, <i>GEA2</i> , <i>MID2</i> , <i>RHO2</i> , <i>ROM2</i> , <i>SYP1</i> et <i>WSC1</i> sur le bourgeonnement aléatoire de la souche <i>arf3Δ</i> à 30°C et à 37°C.	84

Figure 27 Analyse sur gel d'agarose du résultat d'une amplification par PCR permettant la vérification de la délétion du gène <i>ARF3</i> dans le double mutant <i>arf3Δ gea2Δ</i>	86
Figure 28 Phénotype de la souche <i>arf3Δ gea2Δ</i>	88
Figure 29 Représentation des mutations effectuées sur la protéine Arf3p	91
Figure 30 Surexpression du mutant <i>ARF3 HindIII</i> dans la souche <i>pfy1Δ</i>	91
Figure 31 Surexpression des mutants <i>ARF3G2A</i> et <i>ARF3N3A</i> dans la souche <i>pfy1-111 arf3Δ</i>	94
Figure 32 Représentation de la séquence en acides aminés de la protéine Arf3p sauvage ainsi que celle illustrant toutes les mutations obtenues par mutagenèse aléatoire inactivant la protéine	98
Figure 33 Cytosquelette d'actine de la souche <i>bud6Δ</i> haploïde.....	101
Figure 34 Bourgeonnement de la souche <i>bud6Δ bud6Δ</i>	102
Figure 35 Modèle proposé d'après l'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude actuelle impliquant Arf3p et Gea2p.....	118

Liste de abréviations

ABP :	Actin binding protein (protéine de liaison à l'actine)
Actine-F :	Actine filamenteuse
Actine-G :	Actine globulaire
ARF :	ADP-ribosylation factor (Facteur de ribosylation de l'ADP)
BSA :	Bovine Serum Albumine (Sérum albumine bovine)
CTAB :	Bromure d'héxadécyltriméthyl ammonium
D.O. :	Densité optique
DTT :	1,4-Dithiothréitol
EDTA :	Acide éthylène diamine tétraacétique
GAP :	GTPase activating protein (Protéine activant la GTPase)
GEF :	Guanine nucleotide exchange factor (Facteur d'échange guanosidique)
GFP :	Green fluorescent protein (Protéine verte fluorescente)
Golgi :	Appareil de Golgi
His :	Histidine
IP ₃ :	Inositol-1,4,5-triphosphate
IPTG :	Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside
Kan :	Kanamycine
Kb :	Kilobase
kDa :	kiloDalton
KOAc :	Acétate de potassium
KV :	Kilovolt
Leu :	Leucine
Lys :	Lysine
Met :	Méthionine
min :	minute
ml :	Millilitre
MOPS :	Acide 3-(N-Morpholino) propane sulfonique
pb :	Paire de base
pBS :	pBluescript
PI(4,5)P ₂ :	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PCR :	Polymerase chain reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)

PEG :	Polyéthylène glycol
PIPES :	Acide 1,4-Piperazinediethanesulfonique
PKC :	Protéine kinase-C
rpm :	Rotation par minute
SD :	Milieu Sabouraud dextrose
SDS :	Sodium dodécyl sulfate
Sec :	Seconde
TE :	Tris EDTA
Trp :	Tryptophane
U :	Unité
Ura :	Uracile
UV :	Ultraviolet
WT :	Wild-type (Type sauvage)
X-gal :	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosidase
YPD :	Milieu de culture complexe pour les levures

Chapitre 1 INTRODUCTION

1.1 Introduction générale

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée comme modèle pour étudier le cytosquelette d'actine. Ce microorganisme peut être haploïde ou diploïde. De plus son génome est peu complexe et entièrement séquencé. Les souches mutantes dans chacun des gènes sont aussi disponibles facilitant ainsi les études génétiques et cellulaires. Chez la levure, le cytosquelette est impliqué dans une multitude de processus cellulaires incluant la division cellulaire, la ségrégation chromosomique, le mouvement ainsi que le positionnement des organites, la formation du bourgeon, la croissance polarisée, la sécrétion et l'endocytose (Schmidt & Hall, 1998; Winsor & Schiebel, 1997). Le cytosquelette de la levure est composé de microtubules et de microfilaments. Les microtubules sont composés de polymères de tubuline α et β de 24 μm de diamètre. Ils sont impliqués dans la séparation des chromosomes, dans le transport cellulaire et dans le positionnement et la migration du noyau dans le bourgeon lors de la mitose. Les microfilaments sont composés de monomères d'actine polymérisé ensemble menant à la formation de filaments hélicoïdaux d'une taille de 7 à 9 μm de diamètre (Winsor & Schiebel, 1997). Contrairement aux cellules de mammifères, *S. cerevisiae* n'est pas une cellule motile conférant alors à l'actine un rôle uniquement structural. Conséquemment, l'actine intervient dans le maintien de l'intégrité du cytosquelette, dans la division cellulaire, dans l'endocytose, dans la sélection du site de bourgeonnement et dans la sécrétion (Ng & Abelson, 1980; Schmidt & Hall, 1998; Theriot & Mitchison, 1993).

1.2 Le cytosquelette d'actine chez *S. cerevisiae*

1.2.1 Le cytosquelette d'actine

L'actine est une protéine très abondante pouvant atteindre plus de 5% des protéines totales de la cellule et elle est très conservée dans l'ensemble des cellules eucaryotes. Chez *S.cerevisiae*, elle est codée par un gène unique, *ACT1*, indispensable à sa survie. L'actine est une protéine globulaire de 375 acides aminés possédant une activité ATPase (Gallwitz & Sures, 1980; Ng & Abelson, 1980). Elle est présente sous deux formes, l'actine monomérique globulaire (actine-G) et l'actine filamenteuse (actine-F) qui résulte de la polymérisation de l'actine-G en longs filaments hélicoïdaux. L'actine-G est liée soit à l'ATP ou à l'ADP et possède une activité ATPasique importante pour la dépolymérisation des filaments d'actine (Korn *et al.*, 1987;

Schmidt & Hall, 1998). L'actine-F présente une extrémité barbue (positive) et une extrémité pointue (négative) lui conférant une structure polarisée (Figure 1A). Cette polarité influence la polymérisation de l'actine qui s'effectue alors selon un modèle de tapis roulant «treadmilling», c'est-à-dire que la polymérisation se fait plus rapidement et de préférence à l'extrémité barbue tandis que la dépolymérisation se fait préférentiellement à l'extrémité pointue. L'actine-G-ATP est rapidement polymérisé à l'extrémité barbue du filament en formation pour ensuite subir promptement une hydrolyse de l'ATP pour de l'ADP par l'activité ATPasique du monomère. La polymérisation de l'actine est indépendante de l'énergie puisqu'elle peut avoir lieu aussi bien avec l'actine-G-ADP que l'actine-G-ATP. Cependant, la polymérisation est plus rapide avec la forme liée à l'ATP. Le monomère d'actine associé à l'ADP provoque une lente dépolymérisation du filament d'actine. (Figure 1B) (Adams & Pringle, 1984; Carlier, 1991; Schmidt & Hall, 1998).

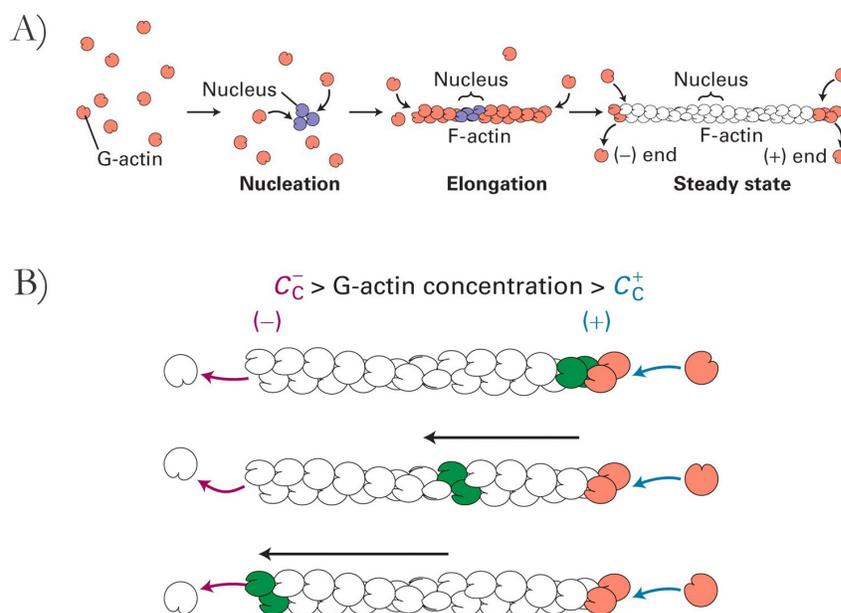


Figure 1 Dynamique de la polymérisation des filaments d'actine

A) L'actine-G-ATP polymérisent spontanément pour former des filaments d'actine. Les filaments d'actine possèdent une polarité avec une extrémité barbue (positive) et une extrémité pointue (négative). B) Cette polarité engendre un mécanisme de polymérisation de l'actine sous la forme d'un tapis roulant ou « treadmilling », c'est-à-dire que la polymérisation de l'actine-G-ATP (en rose) s'effectue plus rapidement à l'extrémité barbue du filament en formation qu'à l'extrémité pointue. Les monomères d'actine-G-ATP sont rapidement hydrolysés en actine-G-ADP (en vert) qui cheminent le long du filament pour ensuite être relargué à l'extrémité pointue. Inspirée de Lodish *et al.* (2003).

1.2.2 L'organisation du cytosquelette d'actine au cours du cycle cellulaire chez *S. cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, l'actine-F se présente sous deux formes : les granules corticaux et les câbles d'actine (Adams & Pringle, 1984). Les câbles d'actine sont constitués de microfilaments assemblés parallèlement alors que les granules corticaux sont formés par un réseau de microfilaments et un ensemble de protéines régulatrices. L'organisation de ces deux structures varie selon le stade du cycle cellulaire (Figure 2). Très tôt en phase G1, les câbles d'actine et les granules corticaux sont répartis aléatoirement mais uniformément dans la cellule. À ce stade, la cellule croît de façon isotropique, c'est à dire dans toutes les directions. Lorsque la cellule initie un nouveau cycle cellulaire, les granules corticaux se concentrent au site de bourgeonnement, préalablement sélectionné et marqué, et les câbles d'actine s'orientent en direction de ces derniers. À partir de ce moment, l'émergence du bourgeon peut débuter (Figure 2a). Au cours de la maturation du bourgeon, les granules corticaux se retrouvent exclusivement dans le bourgeon et les câbles d'actine s'orientent en direction des granules corticaux. Pendant cette phase, la croissance du bourgeon est polarisée (Figure 2b et Figure 2c). Plus tard, au cours de la phase M, la croissance du bourgeon devient isotropique et les granules corticaux se distribuent sur l'ensemble de la surface cellulaire du bourgeon (Figure 2d). Lorsque la cellule fille atteint une taille critique, les câbles d'actine et les granules corticaux se repartissent uniformément dans la cellule fille et la cellule mère (Figure 2e). Avant la cytokinèse, les granules corticaux se concentrent au septum et les câbles rayonnent vers les granules corticaux (Figure 2f). Puis s'ensuit la séparation entre la cellule mère et la cellule fille (Pruyne & Bretscher, 2000; Pruyne & Bretscher, 2000; Schmidt & Hall, 1998; Schott *et al.*, 2002).

1.2.3 Le cycle de l'actine lors du processus de conjugaison

Deux types sexuels sont observés chez *S. cerevisiae* : *MATa* et *MAT α* . Lorsque deux cellules haploïdes de type sexuel opposé (**a** et **α**) entrent en contact, une série d'interactions cellule-cellule donne lieu au processus de conjugaison. L'interaction entre les cellules se fait par l'intermédiaire de phéromones émises par chacun des deux types sexuels. Les cellules *MATa* secrètent le facteur **a** qui se fixe au récepteur des cellules *MAT α* alors que les cellules *MAT α* produisent le facteur **α** qui lui se fixe au récepteur des cellules *MATa*. Suite à l'exposition des cellules aux phéromones, le cycle cellulaire est arrêté en G1 et le cytosquelette d'actine est

transitoirement désorganisé. La liaison du facteur sexuel à son récepteur entraîne aussi la formation d'un shmoo, une excroissance permettant aux cellules haploïdes de fusionner et de former ainsi une cellule diploïde *MATa/α*. La formation du «shmoo» est aussi à la base de la réorganisation du cytosquelette d'actine. Les granules corticaux se localisent alors à l'extrémité du shmoo et les câbles d'actine prennent la même orientation (Figure 2g) (Chenevert, 1994; Jackson & Hartwell, 1990; Tkacz & MacKay, 1979).

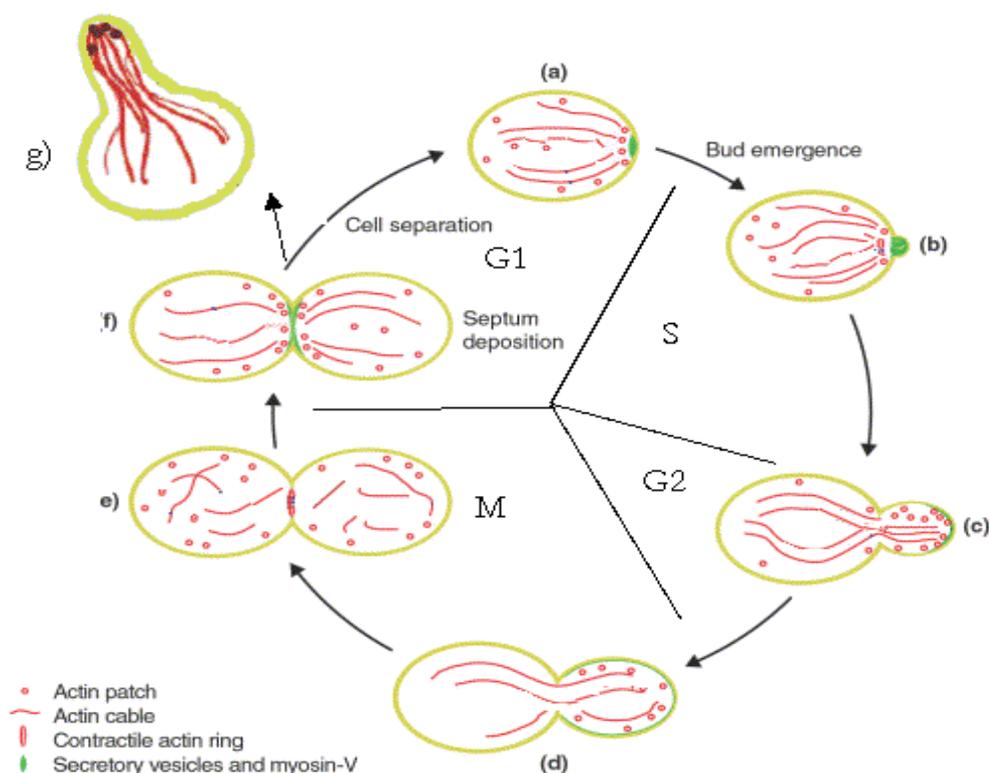


Figure 2 Organisation du cytosquelette d'actine durant le cycle cellulaire de *S. cerevisiae*

Les points rouges représentent les granules corticaux et les lignes rouges, les câbles d'actine. a) Le cycle cellulaire commence en G1 avec l'établissement du site de bourgeonnement et la polarisation du cytosquelette d'actine à ce site. b) et c) La croissance du bourgeon est apicale. Les granules corticaux sont localisés dans le bourgeon et les câbles, présents dans la cellule mère, s'orientent vers les granules corticaux. d) Suite à la polarisation du cytosquelette d'actine, la croissance du bourgeon va devenir isotropique. e) La croissance du bourgeon terminée, les câbles d'actine et les granules corticaux se répartissent aléatoirement dans la cellule mère et dans la cellule fille. f) Lors de la division cellulaire, les granules corticaux se rassemblent au septum et les câbles d'actine s'orientent en leur direction. f) Il va y avoir séparation de la cellule mère et de la cellule fille et la nouvelle cellule va pouvoir connaître une croissance isotropique. h) Une cellule haploïde peut arrêter en phase G1, sécréter des phéromones et générer un shmoo où seront localisés les granules corticaux et les câbles d'actine orientés en leur direction. Inspirée de Pruyne & Bretscher (2000a) et de Schott *et al.* (2002).

1.2.4 La formation de deux structures : les granules corticaux et les câbles d'actine par deux systèmes de formation des filaments d'actine

Chez *S. cerevisiae*, la formation et l'organisation des granules corticaux et des câbles d'actine est le fruit de l'activation de deux sentiers différents. En effet, la formation des granules corticaux se fait par l'intermédiaire d'un processus très conservé au cours de l'évolution impliquant le complexe Arp2/3 alors que celle des câbles d'actine se fait dépendamment des formines Bni1p et Bnr1p mais indépendamment du complexe Arp2/3 (Evangelista *et al.*, 2002; Winter *et al.*, 1999).

1.2.4.1 La formation des granules corticaux et le complexe Arp2/3

Le complexe Arp2/3 « actin related proteins 2/3 » a été identifié pour la première fois chez *Acanthamoeba castellanii* et se trouve très bien conservé chez l'ensemble des eucaryotes. Le complexe est composé de deux protéines de type Arp, Arp2p et Arp3p, ainsi que de cinq autres protéines, Arc40p, Arc35p, Arc18p, Arc19p et Arc15p, (Goode & Rodal, 2001; Machesky & Gould, 1999; Winter *et al.*, 1999). Une mutation de perte de fonction dans le gène d'une de ces protéines entraîne un défaut dans l'organisation et dans la motilité des granules corticaux ainsi que des problèmes dans diverses fonctions biologiques dépendantes de l'actine telle que l'endocytose et la polarité lors du cycle cellulaire (Moreau *et al.*, 1996; Winter *et al.*, 1997). Le complexe Arp2/3 apparaît comme un nucléateur des nouveaux filaments d'actine en plus d'être responsable de la formation de branchements sur des filaments déjà existants. En se fixant sur un filament d'actine déjà existant, ce dernier permet le branchement d'un nouveau filament d'actine avec un angle de 70° afin de créer une structure d'actine en réseau. La formation d'un branchement s'effectue à partir de l'extrémité pointue du nouveau filament et il semble que ce soit les protéines Arp2 et Arp3 qui constituent les deux premières sous-unités de ce nouveau filament d'actine. Enfin, les protéines Arp2p et Arp3p vont agir comme premiers monomères favorisant ensuite l'élongation du filament d'actine par son extrémité barbue. Le complexe reste attaché à l'extrémité pointue et donc coiffe le filament ce qui va le protéger d'une éventuelle dégradation de l'actine (Figure 3) (Egile *et al.*, 2005; Goode *et al.*, 2001; Millard *et al.*, 2004; Mullins & Pollard, 1999; Pollard & Beltzner, 2002; Volkman *et al.*, 2001). Pour être en mesure d'effectuer efficacement la nucléation de l'actine, le complexe Arp2/3 doit être activé. L'activateur le plus important et le premier à avoir été identifié chez *S. cerevisiae* est la protéine Las17p (connue aussi sous le nom de Bee1p), un homologue des

protéines WASP humaine « Wiskott-Aldrich syndrome protein » (Li, 1997). Deux autres activateurs ont aussi été identifiés, Abp1p et Pan1p (Duncan *et al.*, 2001; Goode *et al.*, 2001). Des données génétiques suggèrent que les myosines de type-I (Myo3p et Myo5p) puissent également activer le complexe Arp2/3 par leur liaison avec Vrp1p et Las17p (Evangelista *et al.*, 2000).

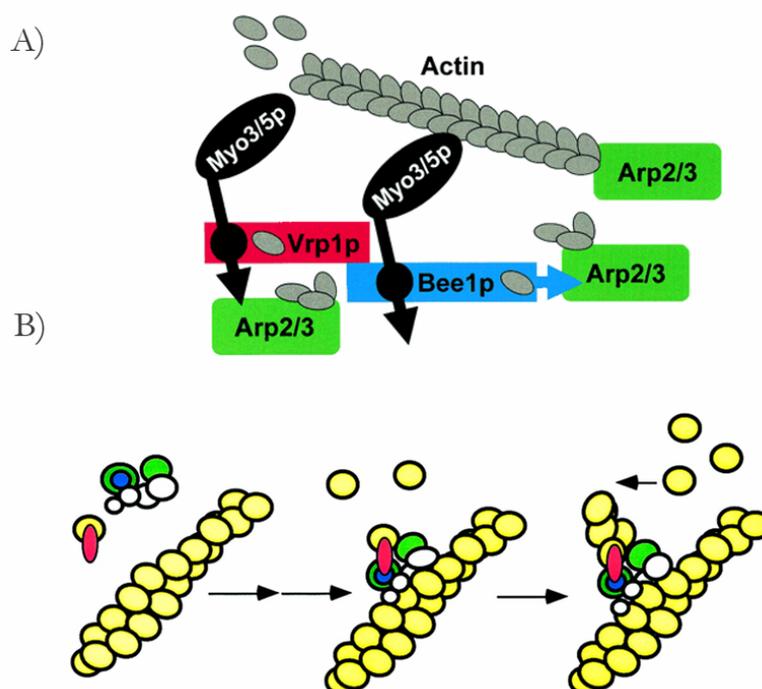


Figure 3 Le mécanisme de nucléation par le complexe Arp2/3 sur un filament d'actine

A) L'activation du complexe Arp2/3 (rectangle vert) favorise la nucléation et l'élongation d'un nouveau filament d'actine (en gris). L'activation de ce complexe nécessite notamment la protéine Las17p/Bee1p (rectangle rouge), qui interagit avec la protéine Vrp1p (rectangle bleu). Les myosines de type-I (Myo3/5) (rond noir) se lient par leur domaine SH3 (rond noir) à Las17p/Bee1p et Vrp1p. Le complexe Arp2/3 est activé par le domaine acide (A) en C-terminale de Las17p/Bee1p, permettant la nucléation d'un nouveau filament. Les monomères d'actine (ovale gris) se fixent sur Las17p/Bee1p et Vrp1p pour les amener au complexe Arp2/3 et permettre l'élongation du filament. B) Le complexe Arp2/3 (en rouge) contribue aussi à la formation d'un réseau de filament d'actine. Le complexe se lie à un filament d'actine préexistant et sert de point de départ pour la nucléation d'un nouveau filament. Le branchement d'un nouveau filament se fait toujours avec un angle de 70°C par rapport au filament existant. Inspirée de Evangelista *et al.* (2000) et de Higgs & Pollard (1999).

1.2.4.1.1 L'activation du complexe Arp2/3 par Las17p et les protéines associées

La protéine Las17p est un composant majeur des granules corticaux et indispensable à l'organisation des filaments d'actine et à la motilité des granules corticaux (Utsugi *et al.*, 2002).

La délétion du gène codant pour cette protéine est l'une des seules mutations connues entraînant une diminution très nette des granules corticaux dans le bourgeon et aussi dans la cellule mère. Toutefois, les câbles d'actine sont présents avec une orientation quelque peu aléatoire (Li, 1997). La protéine possède dans son extrémité C-terminale un domaine acide (A) et un domaine WH2 de liaison à l'actine. Le domaine acide de Las17p se fixe sur le complexe Arp2/3 afin de l'activer alors que le domaine WH2 « WASP homology 2 » sert à présenter un monomère d'actine au complexe pour favoriser l'élongation du filament en formation (Goode & Rodal, 2001; Madania *et al.*, 1999). La verpoline (Vrp1p) est une protéine importante pour le bon fonctionnement de Las17p ainsi que pour la polarisation des granules corticaux et pour l'endocytose (Donnelly *et al.*, 1993; Soulard *et al.*, 2005; Soulard *et al.*, 2002). Vrp1p est homologue à WIP humain « WASP-interacting protein ». Cette protéine se lie au domaine WH1 se situant à l'extrémité N-terminale de Las17p. De plus, ces deux protéines, Las17p et Vrp1p, interagissent avec le domaine SH3 des myosines de type-I, Myo3p et Myo5p. Ces deux myosines possèdent aussi un domaine acide comparable à celui retrouvé dans la partie C-terminale de Las17p, ce qui leur permet d'interagir avec le complexe Arp2/3. Le complexe formé par Las17p, Vrp1p et les myosines de type-I peut alors activer le complexe Arp2/3 et entraîner la nucléation d'un nouveau filament d'actine (Evangelista *et al.*, 2000; Goode & Rodal, 2001; Soulard *et al.*, 2005). D'autres protéines sont connues pour se lier à Las17p et pour l'activer par leur domaine SH3. Il y notamment deux protéines Sla1p et Lsb5p, des protéines de liaison à Las17p « LSB-Las17p-binding proteins ». Lsb5p interagit également avec Sla1p. Ces deux protéines sont indirectement impliquées dans la formation des granules corticaux par leur lien avec Las17p et elles jouent aussi un rôle dans l'endocytose (Costa *et al.*, 2005; Goode & Rodal, 2001).

1.2.4.1.2 L'activation du complexe Arp2/3 par Abp1p et les protéines associées

La protéine Abp1p « actin binding protein » permet elle aussi d'activer le complexe Arp2/3. Cette protéine possède différents domaines dont SH3 ainsi que des domaines acides servant à l'activation du complexe Arp2/3. Elle est localisée dans les granules corticaux et joue aussi un rôle dans l'endocytose. Par son domaine SH3, Abp1p recrute d'autres protéines telles que les ARK « actin-regulating kinases », Ark1p et Prk1p, ainsi que Srv2p formant un complexe activant le complexe Arp2/3. La protéine Rvs167p s'associe au module déjà en place en se liant à la région riche en proline d'Abp1 (Goode & Rodal, 2001; Goode *et al.*, 2001).

1.2.4.1.3 L'activation du complexe Arp2/3 et Pan1p

La protéine Pan1p peut se lier au complexe Arp2/3 ainsi qu'à d'autres protéines jouant plutôt un rôle dans l'endocytose comme End3p et Sla1p. Ceci suggère que Pan1p, Sla1p et End3p peuvent former un complexe. Pan1p possède elle aussi un domaine acide lui permettant de se lier et d'activer le complexe Arp2/3. Ce complexe peut interagir avec les complexes faisant intervenir Las17p et Abp1p énoncés précédemment. Pan1p joue également un rôle dans l'endocytose (Goode & Rodal, 2001).

1.2.4.2 La formation des câbles d'actine et les formines

La nucléation des filaments d'actine se fait le plus souvent par l'activation du complexe Arp2/3. Cependant, des données génétiques ont démontré que ce complexe n'était pas à l'origine de l'ensemble des nucléations des filaments d'actine. En effet, dans les cellules de levures en bourgeon, l'absence du complexe Arp2/3 empêche la formation des granules corticaux mais n'affecte pas la formation des câbles d'actine ni celle de l'anneau contractile. La nucléation d'une partie des filaments d'actine est donc indépendante du complexe nucléateur Arp2/3 (Evangelista *et al.*, 2002). Les formines appartiennent à une famille de protéines très bien conservées chez tous les eucaryotes. Elles sont généralement requises pour la croissance polarisée et la division cellulaire. Chez *S. cerevisiae*, on en dénombre deux, Bni1p et Bnr1p. Des souches ayant une délétion de l'un ou l'autre de ces gènes sont viables alors que la délétion des deux est létale. Ces données suggèrent que les fonctions de ces deux protéines sont partiellement redondantes (Evangelista *et al.*, 2003; Imamura *et al.*, 1997; Sagot *et al.*, 2002). Des travaux récents ont mis en évidence des différences entre ces deux formines. Tout d'abord les formines ne se trouvent pas localisées à la même place et elles ont aussi des fonctions différentes dans la cellule. Bni1p est localisée à l'extrémité du bourgeon et permet l'assemblage des câbles dans celui-ci. Quant à Bnr1p, elle est localisée à la base du bourgeon et permet la nucléation des filaments d'actine de la cellule mère (Moseley & Goode, 2005; Pruyne *et al.*, 2004). L'une des premières évidences de l'implication des formines dans la formation des câbles d'actine est la disparition des câbles d'actine visibles lors de la création d'un double mutant thermosensible (*bni1-FH2#1 bnr1Δ*) (Sagot *et al.*, 2002). Les formines possèdent deux domaines riches en proline dans leur portion C-terminale, FH1 et FH2 « formin homology domain », qui sont hautement conservés. La surexpression de cette portion de Bni1p, dans le double mutant thermosensible, restaure la formation des câbles d'actine tandis que dans la

souche sauvage ceci provoque la formation de câbles d'actine surnuméraires. Ces résultats viennent appuyer l'importance des formines et plus particulièrement de la portion C-terminale pour la formation des câbles d'actine. La surexpression du domaine FH1 ou bien FH2, seul est sans effet phénotypique (Evangelista *et al.*, 1997; Evangelista *et al.*, 2002; Sagot *et al.*, 2002). Les deux domaines ont donc chacun leur importance dans le fonctionnement des protéines. De plus, ils possèdent chacun des régions qui leur sont propres. Le domaine FH1 contient une région riche en proline favorisant la liaison des protéines avec des domaines SH3 et WW retrouvés notamment sur la profiline, une protéine qui se lie aux monomères d'actine et les active en échangeant l'ADP pour de l'ATP (Figure 4). Le laboratoire de Moseley a démontré qu'en plus de se lier à la profiline, la partie C-terminale (FH1) de Bni1p permet la fixation de Bud6p. Cette liaison de Bud6p n'a toutefois pas été observée avec Bnr1p. Bud6p échange l'ADP pour de l'ATP sur les monomères d'actine tout comme la profiline. Selon l'équipe de Moseley, Bud6p et Pfy1p coopèrent afin de stimuler la formation du filament d'actine (Moseley & Goode, 2005; Moseley *et al.*, 2004). FH2, le domaine le plus conservé, permet la nucléation de l'actine à partir de monomères d'actine G séquestrés préalablement au domaine FH1 et il reste lié à l'extrémité barbue d'un filament en formation pour favoriser son élongation (Figure 4). Cette dernière propriété différencie la nucléation faite par Bni1p de celle faite par Arp2/3 puisque lorsqu'Arp2/3 sert de nucléateur elle va se trouver à l'extrémité pointue du filament en formation alors que Bni1p se trouve à l'extrémité barbue (Evangelista *et al.*, 2003; Moseley *et al.*, 2004; Pruyne *et al.*, 2002).

En plus de FH1 et FH2, les formines possèdent d'autres domaines impliqués dans la régulation de son activité : un domaine de liaison pour les GTPases de type Rho, GDB « GTPase-binding domain » ainsi qu'un domaine DAD « Dia-autoregulatory domain ». Ces deux domaines peuvent interagir ensemble et s'auto-inhiber. Dans la portion N-terminale de certaines formines, un domaine RBD « Rho-GTPase-binding domain » est retrouvé et est responsable d'une activation Rho-dépendante des formines. Certaines formines possèdent un domaine FH3 servant à leur localisation cellulaire (Figure 4) (Evangelista *et al.*, 2002; Evangelista *et al.*, 2003).

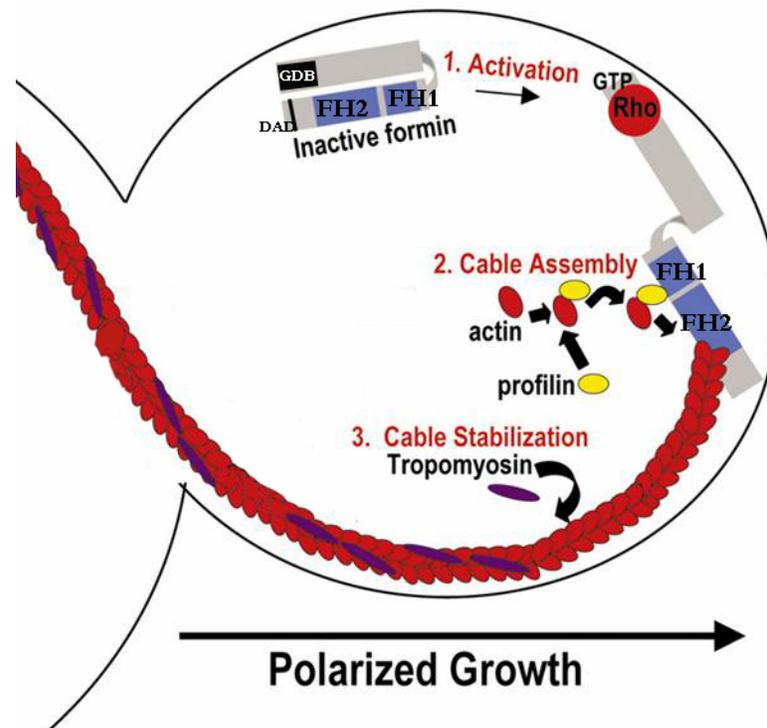


Figure 4 Le mécanisme de nucléation de l'actine par les formines

La formine Bni1p peut se retrouver sous une forme repliée inactive lorsque les domaines DAD en C-terminale et GDB en N-terminale interagissent. 1) Elle va être activée par la liaison d'une protéine de type Rho liée au GTP ce qui libère les domaines FH1 et FH2 pour la nucléation. 2) La profiline séquestre un monomère d'actine-G lié à l'ATP pour l'acheminer jusqu'à la région riche en proline du domaine FH1 afin de permettre au monomère d'actine de se lier au domaine FH2. Le domaine FH2 utilise l'actine pour réaliser la nucléation du filament d'actine. L'élongation se poursuit par l'extrémité barbue toujours par l'apport par la profiline des monomères d'actine-G-ATP. Inspirée de Evangelista *et al.* (2003).

1.2.5 Les protéines de liaison à l'actine

1.2.5.1 La profiline

La profiline est une petite protéine cytoplasmique et ubiquitaire de 12 à 15 kD nécessaire au bon déroulement de la croissance des cellules. Il s'agit de la première protéine de liaison à l'actine ABP « Actin-binding proteins » à avoir été caractérisée. Chez *S. cerevisiae*, elle est codée par un seul gène, *PFY1*, situé sur le chromosome XV. La délétion n'affecte pas la viabilité de la cellule mais l'organisation du cytosquelette d'actine est modifiée de façon importante. Sa présence est donc essentielle pour le maintien de l'intégrité du cytosquelette d'actine. Elle se lie aux monomères d'actine-G-ADP dans un complexe 1:1 ce qui a pour conséquence de

diminuer la concentration de ces monomères libres dans la cellule et permet à ces monomères d'échanger plus rapidement de l'ADP pour de l'ATP. Le complexe profiline-actine-ATP (profilactine) s'associe alors à l'extrémité barbue du filament en formation favorisant ainsi son élongation (Figure 5). La profiline séquestre également les monomères d'actine-G-ATP formant ainsi une réserve de monomères disponibles pour la polymérisation des filaments d'actine (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1992; Machesky & Poland, 1993; Witke, 2004). Il existe une autre protéine, Bud6p, permettant au même titre que la profiline d'échanger sur des monomères d'actine de l'ADP pour de l'ATP. Les deux protéines semblent vraiment essentielles à la cellule puisque la création du double mutant thermosensible *pfy1-4 bud6Δ* est létale. (Amberg *et al.*, 1997; Jin & Amberg, 2000).

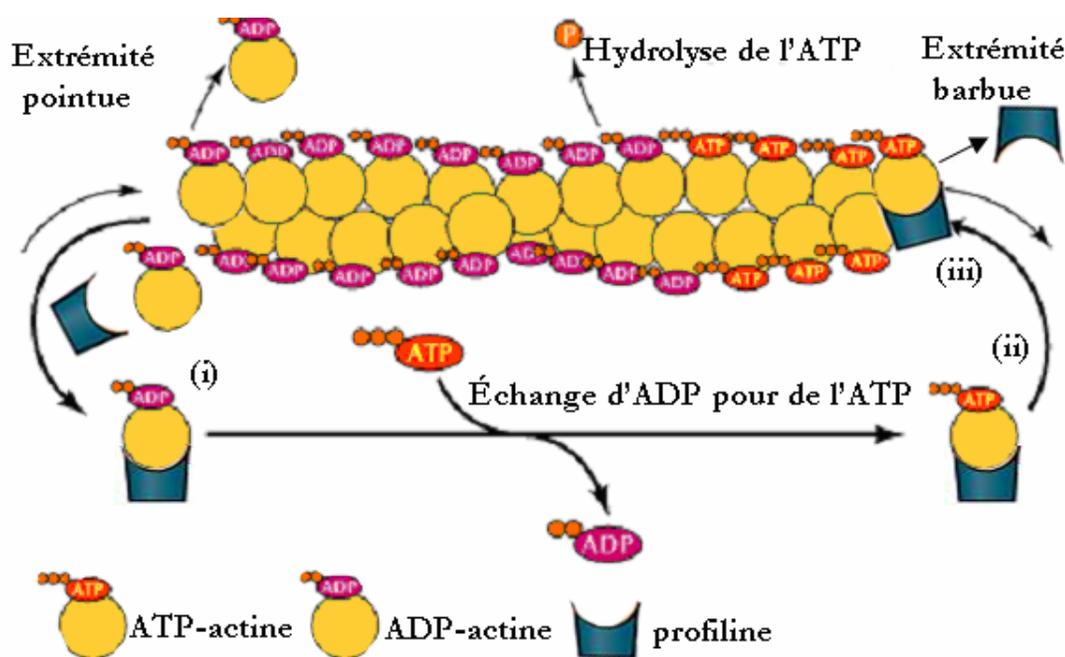


Figure 5 Le profiline et son rôle dans la polymérisation des filaments d'actine

In vitro, trois fonctions majeures ont été identifiées pour la profiline dans la régulation de la polymérisation de l'actine. i) La profiline (en bleu) séquestre les monomères d'actine-G-ADP ce qui a pour conséquence de diminuer la concentration de monomères libres dans la cellule. ii) Elle permet ensuite d'échanger de l'ADP pour de l'ATP sur les monomères d'actine-G, rendant ainsi ces monomères disponibles pour la polymérisation. iii) Le complexe profiline-actine-G-ATP peut interagir avec l'extrémité barbue du filament d'actine en formation favorisant l'élongation. Tout au long de la formation du filament, l'ATP est hydrolysé par l'activité ATPase des monomères d'actine-G donnant des monomères d'actine-G-ADP pouvant être relargués lentement à l'extrémité pointue lors de la dépolymérisation du filament d'actine. Inspirée de Cooper & Hausman (2003) et de Witke (2004).

La profiline peut aussi se lier aux lipides membranaires tel que le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂). Cette liaison au PIP₂ permet de contrôler l'accessibilité de la profiline pour l'actine puisqu'une molécule de profiline se lie soit à une molécule d'actine soit au PIP₂ mais pas aux deux. Ceci est dû au fait que le site de liaison pour ces deux molécules se chevauche. De plus, la liaison de la profiline au PIP₂ empêche son hydrolyse par la phospholipase C γ (PLC γ). La production des seconds messagers IP₃ et DAG résultant de la dégradation de PIP₂ n'est pas possible, inhibant ainsi les sentiers de signalisation les faisant intervenir. (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1990; Haarer *et al.*, 1993; Machesky & Poland, 1993). La profiline complexée à l'actine peut se lier aux domaines riches en proline du domaine FH1 de la formine Bni1p favorisant la nucléation et l'élongation des filaments d'actine (Evangelista *et al.*, 2003).

1.2.5.1.1 La phénotype associé à la délétion de profiline

Les mutants ayant une délétion du gène de la profiline (*pfy1* Δ) sont viables mais la morphologie cellulaire est altérée. Elles sont grosses et rondes et leur cytosquelette d'actine est totalement désorganisé. En effet, les câbles d'actine ne sont pas détectables et les granules corticaux sont retrouvés dans la cellule mère et dans le bourgeon à tous les stades du cycle cellulaire (Haarer & Brown, 1990; Haarer *et al.*, 1993; Marcoux *et al.*, 1998). La polarité des cellules est perdue et le bourgeonnement normalement axial des cellules haploïdes devient aléatoire. De plus, la sécrétion polarisée est compromise, les cellules accumulent les structures vésiculaires dans le cytoplasme et montrent un retard dans la sécrétion du facteur α . Les cellules *pfy1* Δ croissent très lentement à 30°C et pas du tout à 37°C et elles montrent aussi une sensibilité à la caféine et au NaCl (Marcoux *et al.*, 1998; Marcoux *et al.*, 2000; Zakrzewska *et al.*, 2003). La caféine est un inhibiteur de la phosphodiesterase qui convertie l'AMPc en AMP, entraînant une accumulation d'AMPc dans la cellule (Parsons *et al.*, 1988). Cette accumulation d'AMPc inhibe le sentier de signalisation de la protéinase kinase C (PKC), enzyme essentielle pour le maintien de l'intégrité de la cellule (Heinisch *et al.*, 1999; Parsons *et al.*, 1988).

1.2.6 La cofiline et ses partenaires

La cofiline/ADF « actin depolymerising factor », petite protéine de 15 à 20 kD, se lie à la fois aux monomères d'actine et aux filaments d'actine. La cofiline/ADF joue un rôle central dans la

dynamique du cytosquelette d'actine puisqu'elle stimule la dépolymérisation des filaments d'actine libérant ainsi de nombreux monomères d'actine. Indirectement par cette augmentation de la dépolymérisation, la polymérisation par le mécanisme de tapis roulant va elle aussi, être augmentée puisqu'il va y avoir une disponibilité accrue de monomères d'actine (Lappalainen *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 1993). La cofiline/ADF s'associe préférentiellement à l'actine-F-ADP plutôt qu'à l'actine-F-ATP. La cofiline peut aussi briser les filaments d'actine non coiffés créant ainsi des extrémités barbues libres pour la polymérisation (Carlier *et al.*, 1997; Moon & Drubin, 1995). Chez *S. cerevisiae*, la cofiline est codée par un seul gène, *COF1*, dont la délétion est létale. Des mutants thermosensibles de la cofiline montrent d'importants défauts dans la localisation des granules corticaux dans la cellule suggérant un rôle important dans la régulation de l'assemblage du cytosquelette d'actine. Chez la levure, la cofiline s'associe uniquement aux granules corticaux et non aux câbles d'actine. (Lappalainen & Drubin, 1997; Lappalainen *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 1993).

La cofiline interagit physiquement avec les protéines Aip1 « actin-interacting protein 1 » et Srv2/CAP « supressor of *ras*^{val14}/cyclase associated protein ». La protéine Aip1 se lie aux filaments d'actine et cause la dépolymérisation et la fragmentation de ces derniers seulement en présence de cofiline. Elle peut aussi coiffer les extrémités barbues des filaments d'actine pour prévenir la réassociation des filaments d'actine fragmentés. La protéine Aip1p est localisée dans les granules corticaux par l'intermédiaire de la cofiline (Rodal *et al.*, 1999). La protéine Srv2p est présente dans un complexe multimérique de masse moléculaire élevé. Elle se lie aux monomères d'actine par son domaine C-terminale. Ce complexe permet d'accélérer le recyclage de la cofiline liée aux monomères d'actine-G-ADP et de stimuler alors l'échange nucléotidique par la profiline sur ces monomères. Des analyses génétiques laissent entrevoir qu'en plus du complexe Srv2, un ensemble de protéines (Aip1p, la cofiline, les protéines de coiffe Cap1p et Cap2p et la profiline) serait nécessaire pour le bon fonctionnement du mécanisme polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine (Figure 6) (Balcer *et al.*, 2003; Paavilainen *et al.*, 2004).

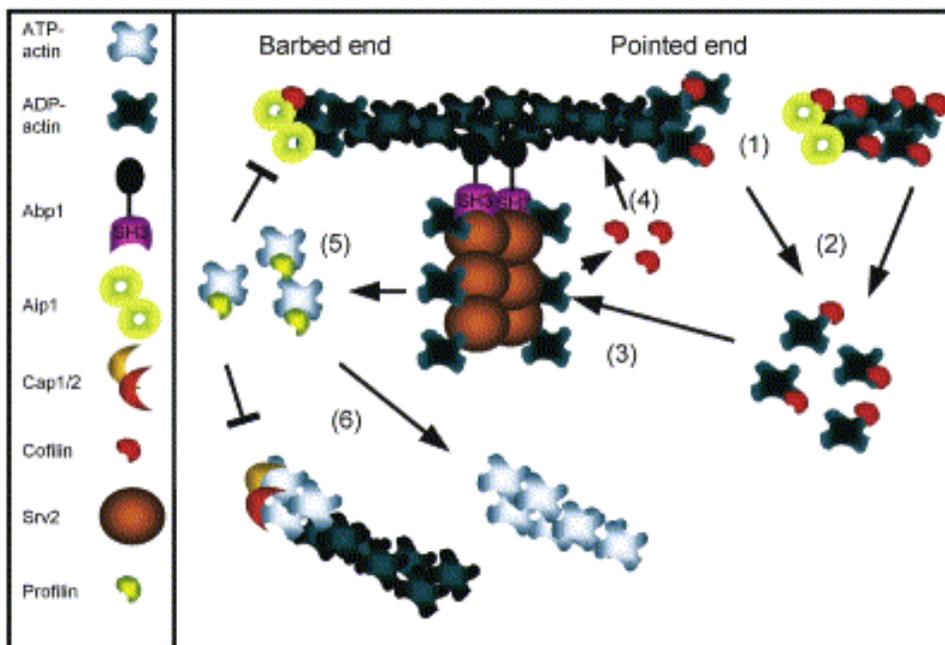


Figure 6 Modèle de la régulation de la polymérisation et de la dépolymérisation des filaments d'actine

Le mécanisme de la polymérisation et de la dépolymérisation des filaments d'actine est contrôlé par de nombreuses protéines pouvant être intégrées dans un modèle proposé par Balcer *et al.* (2003). 1) La cofiline et Aip1p favorisent la fragmentation des filaments d'actine en s'associant à leur extrémité barbue des filaments d'actine. Aip1p sert de protéines de coiffe pour prévenir le réassemblage des fragments de filaments alors que la cofiline ce qui entraîne 2) l'accumulation de monomères d'actine-G-ADP-cofiline. 3) Ceux-ci sont fixés par Srv2p ce qui stimule 4) le recyclage de la cofiline et 5) favorise l'échange d'ADP pour de l'ATP sur ces monomères d'actine par la profiline. 6) Les monomères d'actine-G-ATP sont alors disponibles pour être ajoutés à l'extrémité barbue d'un filament d'actine en formation. Les protéines de coiffe bloquent l'ajout de nouveaux monomères d'actine terminant ainsi l'élongation.

1.2.7 Les protéines de coiffe

Chez *S. cerevisiae*, deux protéines de coiffe forment un hétérodimère codées par les gènes *CAP1* et *CAP2*. La délétion de ces deux gènes n'est pas létale mais affecte la stabilité des filaments d'actine et la localisation des granules corticaux suggérant ainsi l'importance de ces deux protéines pour la localisation de ces derniers. Les protéines de coiffe se fixent à l'extrémité barbue des filaments d'actine pour contrôler la polymérisation et la dépolymérisation. L'association des protéines de coiffe à cette extrémité inhibe l'élongation des filaments d'actine. L'importance des protéines de coiffe chez la levure se situe essentiellement dans la

stabilisation des filaments d'actine en prévenant la dépolymérisation (Karpova *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2004).

1.2.8 La twinfiline

La twinfiline appartient à la classe des ABP ayant été identifiée originellement chez *S. cerevisiae*. Cette protéine est codée par un seul gène *TWF1*. La délétion de ce gène entraîne un défaut de localisation des granules corticaux et affecte le patron de bourgeonnement des cellules diploïdes devenant aléatoire au lieu de bipolaire (Goode *et al.*, 1998). La twinfiline interagit principalement avec les monomères d'actine-G-ADP cytoplasmique dans un ratio 1:1 et les séquestrer. Elle interagit aussi avec les protéines de coiffe, Cap1p et Cap2p par son extrémité C-terminale (Falck *et al.*, 2004). Cette interaction avec les protéines de coiffe est indispensable pour la localisation et la fonction cellulaire de la twinfiline et permet aussi de localiser les monomères d'actine-G-ADP près de l'extrémité barbue des filaments en formation. En aucun cas cette liaison avec les protéines de coiffe n'affecte l'activité de coiffage de ces dernières sur les filaments d'actine. La liaison des monomères d'actine-G-ADP à Twf1p empêche l'échange nucléotidique de ce faire en plus de prévenir l'assemblage non spécifique de ces monomères dans la cellule. Une fois que le complexe Twf1p-actine-G-ADP est bien localisé, le monomère d'actine-G-ADP est relargué et pris en charge par la profiline l'échange nucléotidique et polymérisé à l'extrémité positive du filament en formation. La twinfiline peut aussi se lier au PIP₂, ce qui inhibe sa liaison avec les monomères d'actine les rendant ainsi disponible pour la polymérisation (Falck *et al.*, 2004; Palmgren *et al.*, 2002).

1.3 Les protéines de pontage des filaments d'actine

1.3.1.1 La fimbrine/Sac6p et Scp1p

Chez *S. cerevisiae*, deux protéines de pontage existent pour stabiliser et organiser le cytosquelette d'actine, la fimbrine/Sac6p et Scp1p. La fimbrine/Sac6p est conservée chez tous les eucaryotes et est codée par un seul gène chez la levure, *SAC6*. La délétion de ce gène n'est pas létale mais les cellules *sac6Δ* sont plus grosses que celles de la souche sauvage et possèdent en plus un cytosquelette d'actine désorganisé. La protéine Sac6p possède deux paires de domaines de liaison à l'actine organisées en tandem, chaque paire comprenant deux domaines CH « calponin homology ». Par ces domaines, cette protéine va relier les filaments d'actine entre eux

permettant ainsi la formation des câbles d'actine et des granules corticaux (Adams *et al.*, 1991; Goodman *et al.*, 2003). Pour ce qui est de la protéine Scp1p, elle semble avoir des fonctions comparables à celles de Sac6p. La délétion de *SCP1* aggrave le phénotype de la souche *sac6Δ* ce qui appuie l'idée que Scp1p permet l'assemblage des filaments d'actine et qu'elle agit de paire avec Sac6p pour stabiliser le cytosquelette d'actine de la levure (Goodman *et al.*, 2003; Winder *et al.*, 2003).

1.3.1.2 Les tropomyosines

Il existe des protéines, les tropomyosines, se liant uniquement aux filaments d'actine et permettant de stabiliser les câbles d'actine et de prévenir leur possible fragmentation par d'autres protéines comme celles mentionnées ci-dessus. Chez *S. cerevisiae*, il en existe deux, codées par deux gènes différents *TPM1* et *TPM2*. La protéine Tpm1p est la plus abondante et la plus importante. En effet, la délétion du gène *TPM1* entraîne un défaut majeur dans l'organisation des câbles d'actine qui ne sont presque plus détectables. Quant à la délétion de *TPM2*, elle n'affecte en rien l'organisation des câbles d'actine (Liu & Bretscher, 1989).

1.4 La régulation du cytosquelette d'actine

L'établissement de la polarité cellulaire est une étape très importante lors de la division cellulaire nécessitant une régulation assez fine. La polarisation intervient lors de la formation du bourgeon précédant la cytokinèse ainsi qu'au moment de la formation du shmoo lors du processus de conjugaison. Dans ces deux cas trois étapes sont distinguables pour l'établissement de la polarité cellulaire ; la détermination du site de croissance, l'organisation et l'assemblage de toute la machinerie nécessaire à la croissance polarisée et la croissance en tant que telle. Toutes ces étapes sont contrôlées par des petites GTPases de la superfamille Ras ainsi que par de nombreux régulateurs de ces protéines.

1.4.1 La régulation des GTPases

Les petites GTPases ont la particularité d'alterner entre la forme active liée au GTP et la forme inactive liée au GDP. De nombreuses protéines interviennent pour régler le cycle activation/inactivation de ces GTPases dont les facteurs d'échange guanosidique (GEF « guanine nucleotide exchange factor »), les protéines activant les GTPases (GAP « GTPase-

activating proteins ») et les inhibiteurs de la dissociation du GDP (GDI « GDP dissociation inhibitors »). Les GEF permettent l'activation des GTPases par l'échange du GDP pour du GTP alors que les GAP vont activer l'activité GTPasique intrinsèque des protéines G ce qui stimule l'hydrolyse du GTP en GDP et inactive la GTPase. Pour ce qui est des protéines GDI, elles sont responsables de la dissociation de la GTPase inactive de la membrane et de sa séquestration dans le cytoplasme ce qui empêche d'échanger du GDP pour du GTP pour qu'elle demeure sous sa forme inactive (Cabib *et al.*, 1998; Schmidt & Hall, 1998).

1.4.2 La sélection du site de bourgeonnement

S. cerevisiae présente deux patrons de bourgeonnement différents. Chez les cellules haploïdes le patron de bourgeonnement est axial, c'est-à-dire que la division s'effectue toujours à côté du site précédent (Figure 7). Les cellules diploïdes présentent plutôt un patron de bourgeonnement bipolaire. Dans ce cas, la cellule mère bourgeonne soit à côté du site précédent (pôle proximale) soit à l'opposé du site précédent (pôle distale) (Figure 7) (Chang & Peter, 2003). La sélection du site de bourgeonnement ne se fait pas aléatoirement mais de façon précise ce qui nécessite la présence de protéines à la membrane servant de points de repères. Les protéines requises pour le bourgeonnement axial des cellules haploïdes sont Bud3p, Bud4p et Axl2p/Bud10p. La localisation de ces protéines à la zone d'émergence du bourgeon nécessite la présence de l'anneau formé par les septines, des protéines impliquées dans la division cellulaire. Cette structure marque le futur site de bourgeonnement durant la phase G1 ainsi qu'au cours du cycle cellulaire. Seulement à la fin du cycle cellulaire les protéines servant de points de repères s'associent aux septines et peuvent s'assembler directement au prochain site de bourgeonnement. Chez les cellules diploïdes, deux autres protéines, Bud8p et Bud9p, sont également exigées pour le bourgeonnement bipolaire. Bud8p marque l'extrémité distale du bourgeon (pôle opposé à son pôle d'émergence sur la cellule mère) alors que Bud9p marque plutôt l'extrémité proximale du bourgeon (pôle d'émergence du bourgeon sur une cellule mère). Une autre protéine, Rax2p, est requise chez les cellules diploïdes pour maintenir un bourgeonnement bipolaire après le premier cycle cellulaire (Figure 8) (Casamayor & Snyder, 2002; Chang & Peter, 2003).

1.4.3 L'organisation de la machinerie pour la formation du bourgeon

Une fois le site de bourgeonnement marqué à la surface de la cellule, l'étape suivante consiste à établir la polarité cellulaire en direction de ce site par une cascade de signalisation faisant intervenir des petites GTPases de la superfamille Ras. Les protéines impliquées dans cette cascade sont essentielles pour établir la polarité cellulaire puisque des mutants de celles-ci ne présentent plus de polarité et la croissance isotropique est perdue.

La GTPase Bud1p/Rsr1p est la première protéine à être recrutée après à la délimitation du site de bourgeonnement à la fois pour le bourgeonnement axial et bipolaire. L'activité de cette protéine est réglée par Bud5p, un facteur d'échange nucléotidique (GEF) et Bud2p, une protéine activant l'activité GTPasique (GAP). Ces protéines, ainsi que celle de type Bud, sont requises pour la sélection du site de bourgeonnement mais pas pour la croissance polarisée. La forme active de Bud1p est liée au GTP et régle l'activité de la GTPase Cdc42p par l'intermédiaire de la GEF Cdc24p qui elle-même est réglée par sa liaison à Bud1p-GTP. En plus de Bud1p, d'autres protéines peuvent activer ou inactiver Cdc42p (Figure 8). Il y a par exemple Bem1p, protéine adaptatrice indispensable pour maintenir l'activité de Cdc24p au site de polarisation. Toutefois, le recrutement de Bem1p exige aussi la présence de Cdc42p-GTP et de Bud1p-GDP (Chang & Peter, 2003; Kang *et al.*, 2001).

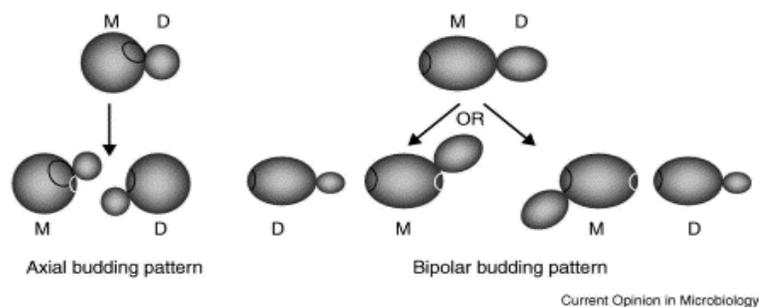


Figure 7 Modèle représentant le bourgeonnement des cellules haploïdes et diploïdes

Les cellules haploïdes présentent un bourgeonnement axial, c'est-à-dire que le site de bourgeonnement se trouve à côté du précédent (proximale) que ce soit sur la cellule mère ou bien sur la cellule fille. Pour les cellules diploïdes, le bourgeonnement est dit bipolaire. Les cellules mères bourgeonnent soit à côté du site précédent (proximale) soit à l'opposé du site précédent (distale). La cellule fille va bourgeonner à l'opposé du lieu où se trouve sa cicatrice de naissance. La première cicatrice de bourgeonnement est représentée par les lignes noires et les cicatrices subséquentes par les lignes blanches. M, cellule mère et D, cellule fille. Tirée de Casamayor & Snyder (2002).

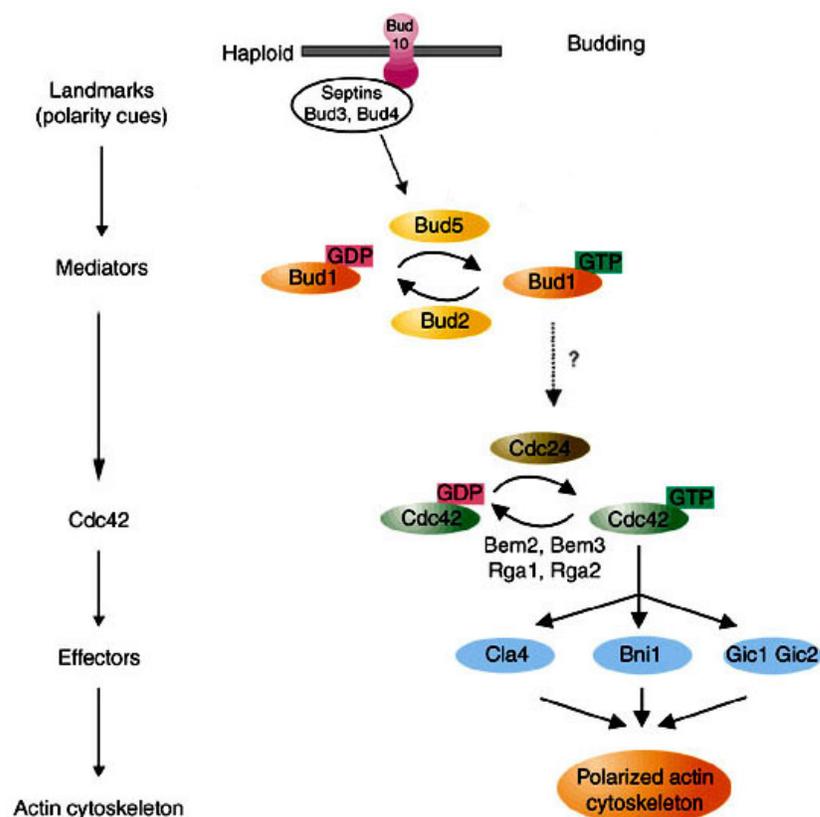


Figure 8 Schéma mettant en jeu des protéines impliquées dans la sélection du site de bourgeonnement et dans l'établissement de la polarité cellulaire

Les protéines se situant à la membrane et servant de points de repères « landmark proteins » identifient le site de bourgeonnement puis mènent à l'activation de Cdc42p via le recrutement du GEF Cdc24p par Bud1p-GTP. Cdc42p est le régulateur central de la polarité cellulaire. Le recrutement d'effecteurs tels que Cla4p et les formines permettent l'organisation du cytosquelette d'actine au futur site de bourgeonnement et d'initier la croissance polarisée. Inspirée de Chang & Peter (2003).

1.4.4 La croissance polarisée

La croissance polarisée est sous le contrôle de plusieurs petites protéines Rho appartenant toutes à la superfamille Ras. Les protéines de type Rho sont des régulateurs clés pour l'assemblage et l'organisation du cytosquelette d'actine à la suite de stimuli intracellulaires ou des signaux de croissance extracellulaires ainsi que pour la croissance du bourgeon. Chez *S. cerevisiae*, six GTPases de type Rho ont été identifiées : Cdc42p, Rho1p, Rho2p, Rho3p, Rho4p et Rho5p. Ces protéines possèdent 50% à 60% d'identité entre elles et seulement 30% d'identité avec Ras. (Schmidt & Hall, 1998).

1.4.4.1 La famille des Rho-GTPases

1.4.4.1.1 *Cdc42p* – Régulateur central de la polarité cellulaire

La protéine *Cdc42p* joue un rôle central dans l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire. Le gène *CDC42* est essentielle à la survie cellulaire (Johnson, 1999). Comme toutes les GTPases de type Rho, *Cdc42p* alterne entre une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP. Cette régulation se fait par le GEF *Cdc24p* et par les GAP *Bem3p*, *Rga1p* et *Rga2p* (Figure 9) (Caviston *et al.*, 2003; Gladfelter *et al.*, 2004). L'activation locale de *Cdc42p* au site de bourgeonnement constitue la première étape importante de la croissance polarisée. Pour ce faire, le recrutement de *Cdc24p* est indispensable. Au début de la phase G1, *Cdc24p* est séquestrée dans le noyau dans un complexe protéique composé de *Far1p*. Plus tard dans la phase G1, l'activation du complexe kinase cycline dépendante *Cdc28-Cln2* dégrade *Far1p* permettant l'exportation de *Cdc24p* dans le cytoplasme et son recrutement ensuite par *Bud1p* au site de polarisation (Figure 9). La protéine *Cdc42p* est aussi recrutée par *Bud1p* au futur site de bourgeonnement et pour y être ensuite activée par son GEF (Etienne-Manneville, 2004). Une seconde protéine, *Bem1p*, est recrutée uniquement après l'activation de *Cdc42p* pour maintenir *Cdc24p* au site de la croissance polarisée. L'activation de *Cdc42p* promeut l'organisation des septines et conduit à la formation de l'anneau séparant la cellule mère de la cellule fille. Elle recrute plusieurs protéines effectrices au site de bourgeonnement, ce qui active la croissance polarisée. Une protéine effectrice de *Cdc42p*, *Iqg1p*, est recrutée, facilitant l'accumulation des septines et permettant la localisation de *Bud4p*, une protéine importante pour le marquage du futur site de bourgeonnement. Parmi les autres effecteurs de *Cdc42p*, il est retrouvé les kinases *Cla4p* et *Ste20p*, toutes les deux des membres de la famille PAK « p21-activated kinase » et la formine *Bni1p* (Figure 9). L'interaction avec *Cla4p*, est requise pour la stabilisation de l'anneau formé par les septines alors que *Ste20p* contrôle plutôt la phosphorylation de *Bni1p* et par le fait même contribue à son activation (Etienne-Manneville, 2004; Gladfelter *et al.*, 2004; Kadota *et al.*, 2004). *Ste20p* est également essentielle à la formation du shmoo lors de la conjugaison (Oehlen & Cross, 1998). Des études génétiques suggèrent que le contrôle de la croissance polarisée par *Cdc42p*-GTP se fait par deux sentiers parallèles (Figure 10). Le premier serait propre *S. cerevisiae* faisant intervenir *Gic1p* et *Gic2p* et le second est conservé à travers l'évolution mettant en jeu *Bni1p* (Tcheperegine *et al.*, 2005). Les protéines de types *Gic* ont d'abord été identifiées comme étant impliquées dans la polarisation du cytosquelette d'actine puis par la suite dans la stabilisation du complexe *Cdc42p*-effecteurs

au futur site de bourgeonnement (Brown *et al.*, 1997; Kawasaki *et al.*, 2003). La liaison de Cdc42p à Bni1p permet son activation et donc la formation de câbles d'actine (Figure 9 et Figure 10). Bni1p fait partie d'un complexe protéique nommé polarisome comprenant Spa2p, Bni1p, Bud6p et Pea2p et affectant la croissance polarisée par un mécanisme qui n'est pas trop compris. Spa2p et Bud6p sont importantes pour la localisation et le bon fonctionnement de Bni1p (Irazoqui & Lew, 2004). Spa2p interagit avec plusieurs protéines comme Bni1p ou Msb3p et Msb4p qui stimulent l'activité GTPases de protéines Rab (Figure 10). L'interaction avec les protéines Msb3p et Msb4p se fait de préférence avec Cdc42-GDP. De plus des études récentes ont montré que Cdc42p, liée au GTP ou bien au GDP, permet la localisation de Spa2p au site de bourgeonnement. L'interaction de Spa2p avec Bni1p est requise pour la localisation de cette dernière à l'extrémité du bourgeon (Figure 10) (Fujiwara *et al.*, 1998; Rida & Surana, 2005; Tcheperegine *et al.*, 2005). Plus récemment, de nouvelles études ont mis en évidence que Spa2p interagit avec des nouvelles protéines impliquées à la fois dans le maintien de la polarité cellulaire et dans la régulation de l'activité de l'actine, Myo1p, Myo2p et Pan1p (Shih *et al.*, 2005). La protéine Pan1p fait elle-même partie d'un complexe avec End3p et Sla1p requis pour la formation granules corticaux, pour l'endocytose en se positionnant à la membrane et pour la synthèse de la paroi cellulaire (Zeng *et al.*, 2001). Pour ce qui est de Pea2p aucune fonction biologique ne lui est connue à ce jour mis à part qu'elle montre des fonctions et une localisation similaires à celles de Spa2p (Fujiwara *et al.*, 1998). Enfin, Cdc42p interagit directement avec Las17p permettant de recruter le complexe formé de Las17p/Vrp1/Myo3p-Myo5p nécessaire à l'activation du nucléateur Arp2/3 important pour la formation des granules corticaux (Lechler *et al.*, 2001). Le recrutement du complexe Arp2/3 et des formines est directement responsable de la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine au site de la croissance polarisée (Chang & Peter, 2003; Etienne-Manneville, 2004; Oehlen & Cross, 1998).

1.4.4.1.2 Les protéines Rho1p et Rho2p

La petite GTPase Rho1p, codée par le gène *RHO1*, est essentielle à la survie cellulaire puisque la délétion de ce gène est létale (Madaule *et al.*, 1987). Les mutants thermosensibles de cette protéine montrent un arrêt de croissance avec un tout petit bourgeon et une cellule présentant un phénotype comparable à une cellule en phase de lyse cellulaire. Malgré cela, le cytosquelette d'actine de ces cellules est polarisé en conditions permissives (Madden & Snyder, 1998;

Schmidt & Hall, 1998). Rho1p est impliquée dans le contrôle de la polarisation et de la croissance du bourgeon, dans l'organisation du cytosquelette d'actine ainsi que dans la synthèse de la paroi cellulaire. La localisation de Rho1p dans les granules corticaux proches du bourgeon naissant et dans l'extrémité du bourgeon lors de son émergence appuie l'hypothèse de son rôle dans la formation et la croissance du bourgeon (Madden & Snyder, 1998; Schmidt & Hall, 1998). Comme toutes les autres protéines G, Rho1p alterne entre la forme active liée au GTP et la forme inactive liée au GDP. Ce cycle est réglé par deux GEF, Rom1p et Rom2p, dont la délétion des deux gènes est létale ainsi que par quatre GAP, Bem2p, Sac7p, Bag7p et Lrg1p (Ozaki *et al.*, 1996). La protéine Rho1p contrôle l'activité de cinq protéines : Pkc1p, la β -1,3-glucan synthase, les formines Bni1p et Bnr1p et Sec3p un composant de l'exocytose (Fujiwara *et al.*, 1998). La protéine Pkc1p (protéine kinase C de levure) est associée et activée par Rho1p. Cette interaction confère à cette protéine kinase la capacité d'activer la voie des MAP kinases et donc la transcription de gènes codant pour des protéines contrôlant l'intégrité de la paroi cellulaire (Schmitz *et al.*, 2002). La protéine Rho1p règle aussi l'activité enzymatique de la glucane synthase (GS) contrôlant par le fait même la production du composant majeure de la paroi cellulaire, le β -1,3-glycane. Le complexe enzymatique β -1,3-glucane synthase est composé de deux sous unités catalytiques indispensables, Fks1p et Fks2p, qui interagissent avec Rho1p (Sekiya-Kawasaki *et al.*, 2002). La régulation du cytosquelette d'actine par Rho1p se fait par l'activation des formines Bni1p et Bnr1p, responsables de la nucléation et de la formation des câbles d'actine. L'interaction entre Rho1p et Bni1p est importante pour la localisation et le fonctionnement de Bni1p. L'interaction de Bni1p avec Rho1p mais aussi avec Spa2p, comme mentionné précédemment, permet la localisation de Bni1p aux sites de croissance où Rho1p va en plus régler la formation des câbles d'actine par l'entremise de Bni1p (Figure 9) (Fujiwara *et al.*, 1998; Levin, 2005).

Pour ce qui est de la GTPase Rho2p, la délétion de son gène *RHO2* n'entraîne aucune modification phénotypique sauf une augmentation de la sensibilité au benomyl qui est une drogue responsable de la dépolymérisation des microtubules, ce qui suggère que cette protéine joue un rôle dans l'organisation des microtubules (Levin, 2005; Madden & Snyder, 1998; Manning *et al.*, 1997). Les gènes *RHO1* et *RHO2* partagent 53% d'identité entre eux et la surexpression de *RHO2* permet de corriger le mutant *rho1* suggérant une fonction redondante de ces deux gènes (Madaule *et al.*, 1987; Schmidt & Hall, 1998) Des analyses génétiques ont

permis de mettre en évidence que Bem2p et Rom2p agissent respectivement comme GAP et GEF pour Rho2p. Toutefois, les effecteurs de Rho2p n'ont toujours pas été identifiés (Madden & Snyder, 1998).

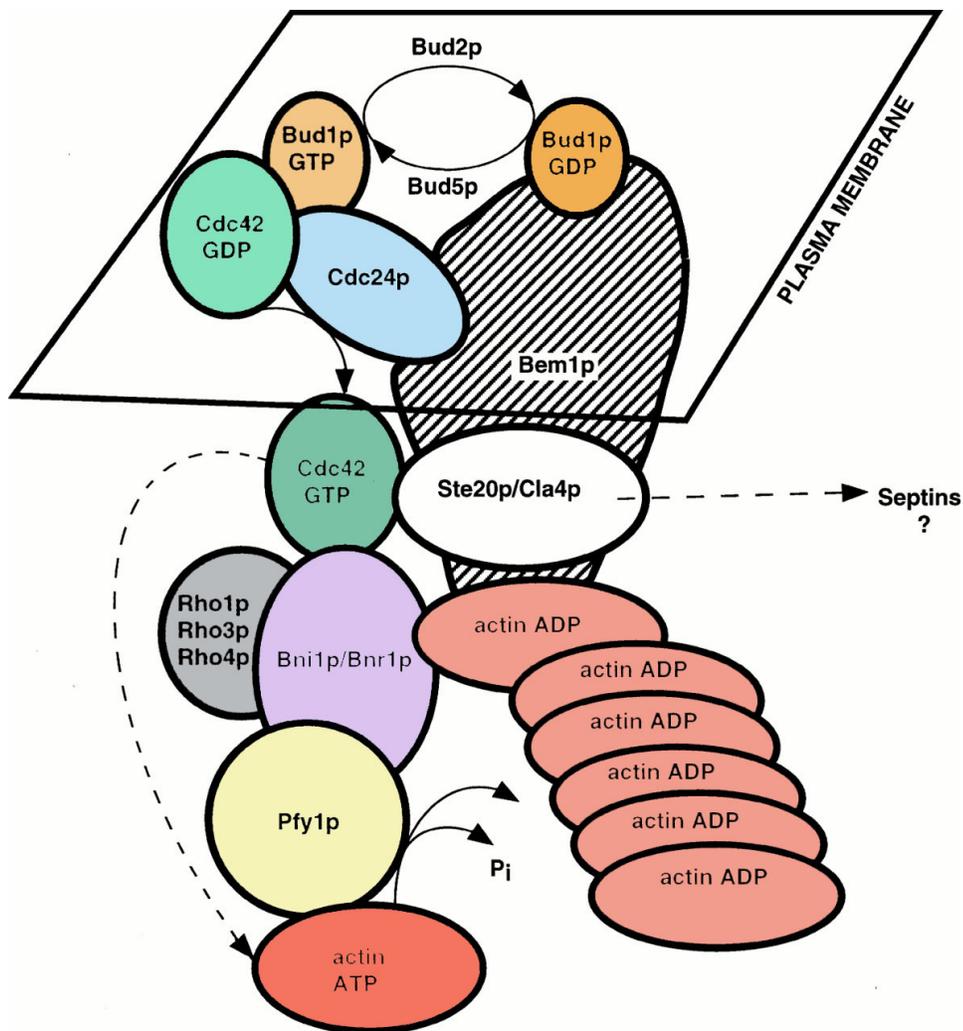


Figure 9 Modèle représentant l'organisation des protéines de type Rho au site de bourgeonnement

L'établissement de la polarité cellulaire dépend du recrutement du GEF Bud5p et de la GAP Bud2p pour respectivement l'activation et l'inactivation de la GTPase Bud1p (connue aussi sous le nom de Rsr1p). Sous sa forme liée au GDP, Bud1p se lie à Bem1p qui à son tour se fixe à Cdc24p. L'activation de Cdc24p par Bud1p-GTP permet d'échanger du GDP pour du GTP sur Cdc42p. Cdc42p recrute alors Bni1p ce qui entraîne la polymérisation de l'actine par sa liaison avec l'actine et la profiline. Bni1p interagit aussi avec Rho1p et possiblement avec Rho3p et Rho4p. Inspirée de Cabib *et al.* (1998).

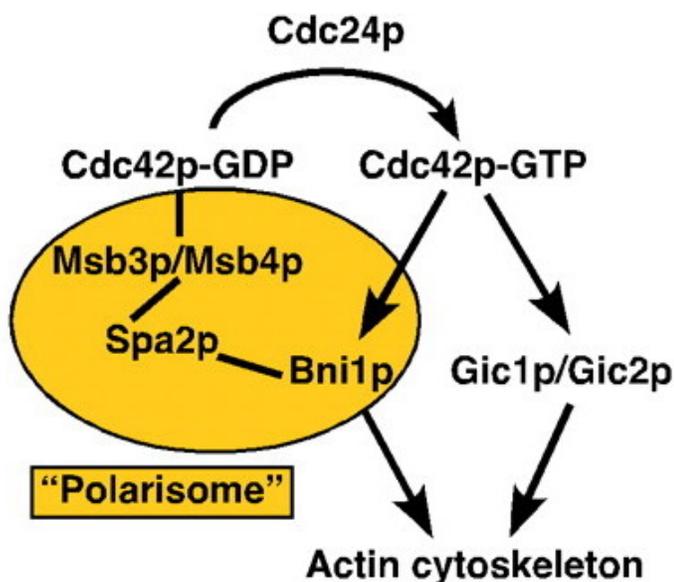


Figure 10 Modèle illustrant les deux sentiers de signalisation empruntés par Cdc42p pour contrôler la polarisation du cytosquelette d'actine.

Le contrôle de la polarisation du cytosquelette d'actine par Cdc42p se fait par deux sentiers de signalisation parallèle. L'un est spécifique aux levures et passe par Gic1p/Gic2p. L'autre, conservé à travers l'évolution, est nommé polarisome et est composé entre autre de Spa2p, Bni1p et Msb3p/Msb4p. La protéine Cdc42p-GDP interagit avec les protéines Msb3p/Msb4p qui se lie ensuite à Spa2p. En se fixant à Bni1p, Spa2p se trouve localisée à l'extrémité du bourgeon. L'activation de Cdc42p-GTP via le GEF Cdc24p entraîne l'activation d'une protéine du polarisome, Bni1p, permettant la formation des câbles d'actine. Cdc42p-GTP se fixe aussi aux protéines Gic1p et Gic2p ce qui engendre la polarisation du cytosquelette d'actine. Inspirée de Tcheperegine *et al.* (2005).

1.4.4.1.3 Les protéines Rho3p et Rho4p

Le maintien de la croissance polarisée après l'initiation de la formation du bourgeon est aussi contrôlé par deux autres GTPases, Rho3p et Rho4p. Ces protéines possèdent respectivement 46% et 41% d'identité de séquence avec la protéine Rho1p et sont identiques à 35% entre elles. La délétion de *RHO3* cause un défaut important de la croissance, phénotype qui n'est pas observé lors de la délétion de *RHO4*. La surexpression de *RHO4* dans la souche *rho3Δ* corrige la croissance indiquant alors que leurs fonctions sont assez proche l'une de l'autre (Matsui & Toh, 1992). La délétion de *RHO3* peut être aussi corrigée par la surexpression du gène *SEC4* et par celle du gène *TPM1* et de plus, Rho3p interagit directement avec Sec4p et Tpm1p. Le gène *SEC4* code pour Sec4p, une GTPase de type Rab essentielle pour l'exocytose qui permet la fusion des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique (Imai *et al.*, 1996). Quand au gène

TPM1, il code pour la tropomyosine un composant majeur impliqué dans la formation des câbles d'actine. Rho3p-GTP s'associe directement à deux autres protéines impliquées dans le trafic vésiculaire, Myo2p, une myosine transportant les vésicules le long des câbles d'actine et Exo70p, une protéine retrouvée dans l'exocytose. Ceci suggère que Rho3p joue un rôle important dans le trafic vésiculaire le long des câbles d'actine (Pruyne & Bretscher, 2000; Schott *et al.*, 2002). Les gènes *VRP1* et *LAS17* possèdent eux aussi la capacité de restaurer le cytosquelette d'actine de la souche *rho3Δ* et plus particulièrement la repolarisation des granules corticaux. Les protéines codées par ces deux gènes interagissent avec l'actine et les myosines assurant la croissance polarisée. La seule protéine régulatrice connue pour les protéines Rho3p et Rho4p est la protéine d'activation des GTPases (GAP), Rgd1p. Cette GAP fonctionne conjointement avec le duo Vrp1p-Las17p chez la levure. Ceci suggère que Vrp1p-Las17p et Rho3p agissent en parallèle ou de concert pour assurer la distribution des granules corticaux dans la cellule au cours de la croissance polarisée (Roumanie *et al.*, 2002). Pour ce qui est des effecteurs de ces deux protéines de type Rho, la formine Bni1p est considérée comme la candidate la plus probable (Figure 9) (Madden & Snyder, 1998).

1.4.4.1.4 La protéine Rho5p

La protéine Rho5p est une petite GTPase non essentielle à la survie cellulaire. Tout comme la protéine Rho1p, cette dernière semble interagir avec la protéine Pkc1p et jouer un rôle dans la voie de signalisation de l'intégrité membranaire. Cependant, ce rôle semble être opposé à celui de Rho1p, à savoir que Rho5p agirait négativement sur la voie de signalisation de la PKC. En effet, la délétion de *RHO5* rend les cellules résistantes à de fortes concentrations en caféine (20 mM), composé pour lesquels les mutants de la voie PKC sont très sensibles. Cette résistance est due au fait que Rho5p n'est plus présent pour inhiber le sentier responsable de l'intégrité de la paroi cellulaire (Schmitz *et al.*, 2002).

1.5 L'actine et l'endocytose

L'endocytose est un processus permettant aux cellules de puiser dans le milieu extérieur les molécules dont elles ont besoin pour survivre et de recycler les protéines de surface. Une portion de la membrane plasmique s'invagine, entraînant avec elle les molécules du milieu extracellulaire et les protéines membranaires dans un compartiment endocytique. La

membrane plasmique se referme ensuite sur elle-même et se détache du reste de la membrane pour former la vésicule endocytaire qui sera dirigée vers un compartiment de dégradation, la vacuole (Geli & Riezman, 1998; Riezman, 1985). Ce phénomène très complexe requiert l'implication des nombreuses protéines dont l'actine. Le lien entre le cytosquelette d'actine et l'endocytose est connu depuis une douzaine d'années. Effectivement, de nombreux mutants de l'endocytose, les mutants *end* (pour *endocytose*), possèdent un défaut dans l'organisation du cytosquelette d'actine ou bien encore un phénotype semblable aux souches portant une mutation dans un gène associé à l'actine. Il s'agit de gènes codant pour des protéines importantes pour la formation et la régulation du cytosquelette d'actine et plus particulièrement impliquées dans la formation des granules corticaux chez *S. cerevisiae*, tels que *END4(SLA2)*, *END5(VRP1)*, *END6(RVS161)*, *END7(ACT1)*, *END9(ARC35)* et *END14(SRV2)* (Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003; Munn, 2001). Cependant, les détails sur le mécanisme cellulaire restaient assez flous (Kubler & Riezman, 1993). Ce n'est que dix ans plus tard que la preuve de l'implication de l'actine dans l'endocytose a été faite. Suite à des observations en microscopie en temps réel, une accumulation d'actine aux sites d'endocytose était visible. Cette découverte laissait croire que la polymérisation de l'actine pouvait soit diriger l'invagination de la membrane, soit orienter le mouvement des vésicules nouvellement formées dans le cytoplasme ou bien les deux à la fois (Kaksonen *et al.*, 2003). En étudiant six protéines impliquées dans la formation des granules corticaux (Abp1p, Arc15p, Las17p, Pan1p, Sla1p et Sla2p), l'équipe de Drubin a mis en évidence que l'assemblage/désassemblage de ces protéines ainsi que l'implication de l'actine sont variables selon l'étape du processus d'endocytose. Ce même groupe a aussi confirmé l'implication de la clathrine dans l'endocytose chez la levure (Kaksonen *et al.*, 2003; Kaksonen *et al.*, 2005). La dynamique de l'endocytose fait intervenir de nombreuses protéines regroupées en quatre modules dirigeant chacun une étape précise de l'endocytose. Le premier module protéique est composé de clathrine, End3p, Pan1p, Sla1p et Sla2p. Ces protéines s'associent très tôt à la membrane plasmique et permettent l'invagination de cette dernière. La formation de ce complexe de revêtement est indépendante de l'actine mais son déplacement et son désassemblage requiert la polymérisation de cette dernière (Figure 11). Le second module implique des protéines qui vont servir à la formation du réseau d'actine. Il est composé d'actine, Cap1/2p, Sac6p, Abp1p et du complexe Arp2/3. Ce complexe protéique est responsable de la formation du réseau d'actine autour de la vésicule ce qui lui permet d'être larguée de la membrane plasmique et de se déplacer rapidement dans le

cytoplasme. La localisation de toutes les protéines de ce module est dépendante de l'actine (Figure 11). Le troisième module nommé WASP/Myop est composé de Las17p, un homologue de WASP, de Myo5p, une myosine de type I et de Bbc1p. Ce module est maintenu immobile à la membrane plasmique, à l'endroit même où la polymérisation de l'actine se fait, puis il est démantelé après le mouvement du revêtement et de l'arrêt de la polymérisation de l'actine (Figure 11). Le quatrième et dernier module, nommé module amphiphysine, est composé de Rvs161p et Rvs167p. Ces protéines se localisent brièvement aux sites d'endocytose après l'initiation de la polymérisation de l'actine facilitant ainsi la séparation de la vésicule endocytique avec la membrane plasmique (Figure 11) (Ayscough, 2005; Kaksonen *et al.*, 2005). Ainsi, un schéma détaillé illustrant les différentes étapes du mécanisme de l'endocytose avec ses nombreuses protéines régulatrices a pu être mis en place (Figure 11).

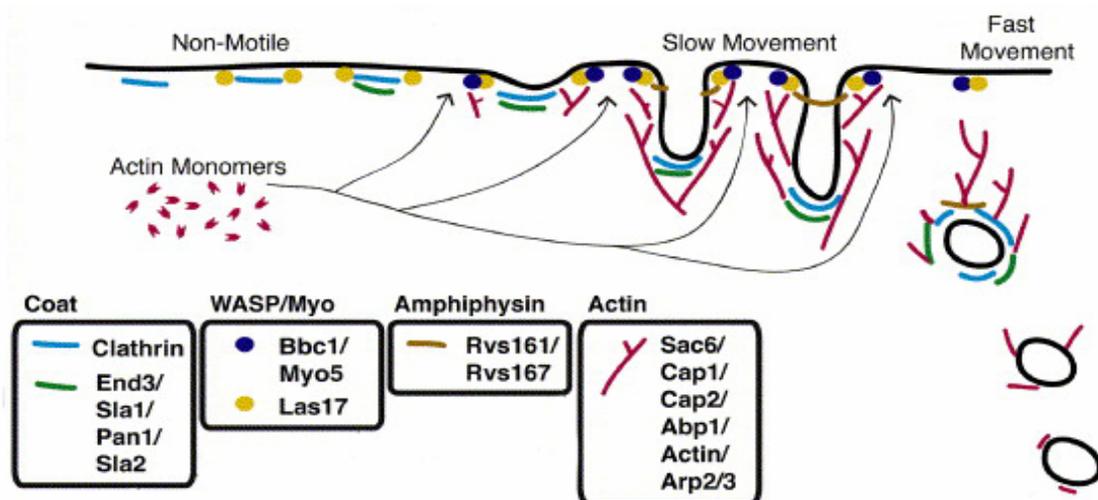


Figure 11 Représentation schématique du processus d'endocytose chez *S. cerevisiae*

La première étape de l'endocytose est le positionnement à la membrane plasmique au site endocytique du module de revêtement composé de la clathrine (lignes bleues), End3p, Pan1p, Sla1p et Sla2p (lignes vertes). Ensuite vient le recrutement de l'activateur du complexe Arp2/3, Las17p (ovales jaunes) et de Myo5p et Bbc1p (ovales bleus) afin de faciliter la polymérisation de l'actine (lignes fushias). Les protéines Rvs161p et Rvs167p (lignes brunes) sont responsables de la séparation de la vésicule endocytique avec la membrane plasmique. La polymérisation de l'actine dirige la vésicule vers le cytoplasme. Pour finir, le démantèlement du module de revêtement et des protéines associées a lieu. Inspirée de Kaksonen *et al.* (2005).

1.6 Étude des protéines associées à la régulation du cytosquelette d'actine.

La régulation du cytosquelette d'actine est un processus très complexe faisant intervenir de nombreuses protéines. L'équipe du Dr Pallotta s'intéresse à la régulation du cytosquelette d'actine chez la levure *S. cerevisiae* et a mis en évidence, par des études génétiques l'existence des supresseurs de la délétion du gène de la profiline (*pfy1Δ*). La sensibilité au NaCl et à la caféine de cette souche ont été utilisées pour l'identification des supresseurs. Un premier criblage génétique a permis d'identifier sept supresseurs multicopies associés à la délétion de la profiline : *MID2*, *ROM1*, *ROM2*, *SMY1*, *SYP1* et *WSC1*. La surexpression de ces gènes engendre une correction partielle du cytosquelette d'actine de la souche *pfy1Δ*. Cette correction se caractérise par une repolarisation des granules corticaux dans le bourgeon sans toutefois permettre la formation des câbles d'actine visibles. Ces supresseurs corrigent aussi la sensibilité à la caféine et au NaCl en plus de diminuer de façon assez importante la taille des cellules (Marcoux *et al.*, 1998; Marcoux *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent un modèle selon lequel l'organisation du cytosquelette d'actine se fait par le passage par les voies de signalisation de Rho1p et Rho2p. Ces dernières sont activées par les facteurs d'échange guanosidique Rom1p et Rom2p pour Rho1p et seulement Rom2p pour Rho2p. Ces GEF sont sous la dépendance de deux protéines membranaires Mid2p et Wisc1p (Figure 12) (Marcoux *et al.*, 1998; Marcoux *et al.*, 2000).

Un second criblage génétique a été réalisée en utilisant cette fois-ci la souche *pfy1-111 rho2Δ* possédant une mutation thermosensible dans le gène de la profiline et la délétion du gène *RHO2*. En utilisant cette souche, le laboratoire du Dr Pallotta aspirait à identifier de nouveaux supresseurs contrôlant l'organisation du cytosquelette d'actine en l'absence de la protéine Rho2p. Deux autres supresseurs de la souche *pfy1-111 rho2Δ* ont ainsi été identifiés : *GEA1* et *GEA2*. Ces deux supresseurs permettent de restaurer la formation des câbles d'actine visibles ainsi que de repolariser les granules corticaux dans la souche *pfy1-111 rho2Δ* mais aussi dans la souche *pfy1Δ*. La formation des câbles d'actine visibles par Gea1p et Gea2p est donc indépendante de la profiline et du sentier de signalisation passant par Rho2p (Figure 12) (Zakrzewska *et al.*, 2003).

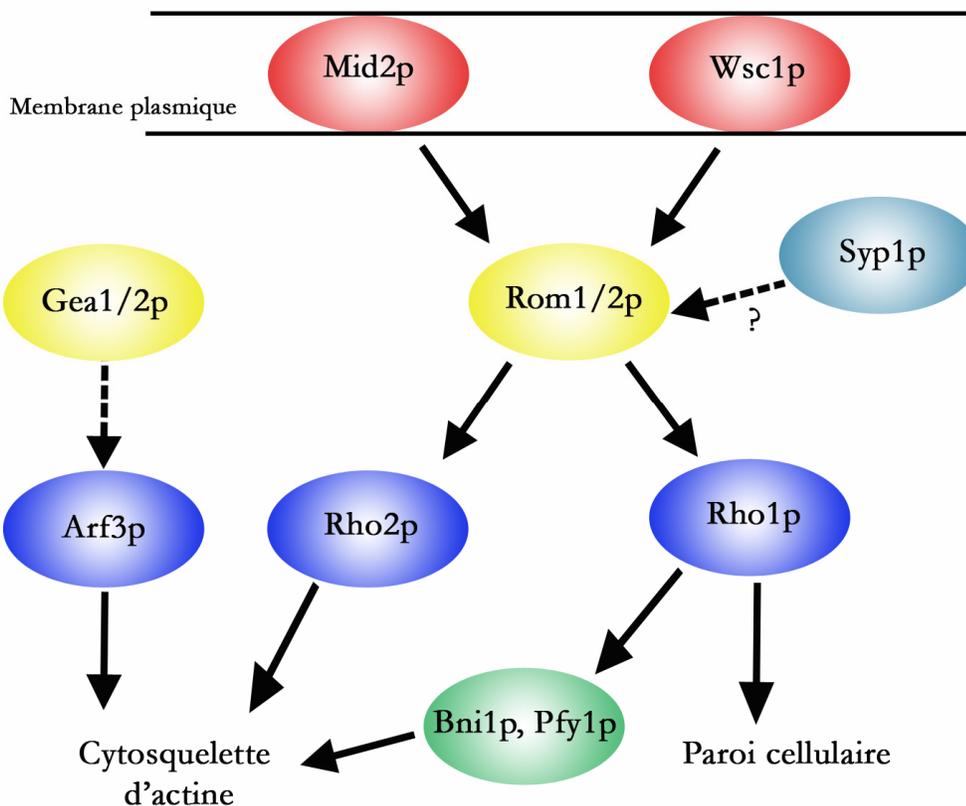


Figure 12 Modèle de voie de signalisation proposé pour l'organisation du cytosquelette d'actine par les différents suppresseurs identifiés. Inspiré de Marcoux *et al.* (2000) et Zakrzewska *et al.* (2003).

1.6.1 Les GEF Gea1p et Gea2p

Les protéines Gea1p et Gea2p font parties du groupe des facteurs d'échange guanosidique pour les GTPases de type Arf, au même titre que Sec7p et Syt1p (Chantalat *et al.*, 2003). Ces protéines possèdent une région centrale commune d'environ 200 acides aminés nommée Sec7. Cette région est nommée ainsi en référence à sa similitude de séquence avec le domaine catalytique retrouvé dans la protéine Sec7p responsable de l'échange du GDP pour du GTP. Les séquences se trouvant de part et d'autre de ce domaine servent probablement à la détermination des substrats par le GEF (Jackson & Casanova, 2000). Ces protéines sont sensibles à la brefeldine A (BFA), une drogue qui inhibe l'échange nucléosidique sur les Arf et provoque un arrêt de croissance et un blocage de la sécrétion (Peyroche *et al.*, 1999). Les protéines Gea1p et Gea2p possèdent 50% d'identité entre elles et leurs fonctions sont quelque peu redondantes. En effet, la délétion de l'un ou l'autre de leurs gènes n'entraîne aucun effet perceptible sur la croissance ou la sécrétion alors que la délétion des deux gènes est létale

(Peyroche *et al.*, 1996). Le rôle premier de ces GEF réside dans le transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et le Golgi puisque le double mutant thermosensible *gea1-ts gea2Δ* présente un défaut dans ce type de transport (Jackson & Casanova, 2000; Peyroche *et al.*, 2001; Peyroche *et al.*, 1996).

La mise en évidence de la formation des câbles d'actine et la repolarisation des granules corticaux dans le bourgeon par la surexpression des gènes *GEA1* et *GEA2* dans les souches *pfy1-111 rho2Δ* et *pfy1Δ* associent pour la première fois un rôle pour Gea1p et Gea2p dans l'organisation du cytosquelette d'actine en plus de leur rôle déjà connu dans le transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et le Golgi (Zakrzewska *et al.*, 2003).

Dans le réseau trans-Golgi se trouve la protéine Drs2p formant un canal membranaire et possédant à la fois une activité ATPase (P-type ATPase) et une activité « translocase » (ou flippase) pour les aminophospholipides. Elle est requise pour la formation d'une classe de vésicules sécrétoires nécessitant la clathrine pour leur biogenèse (Chen *et al.*, 1999; Gall *et al.*, 2002). En 2004, l'équipe de Chantalat a mise en évidence une délocalisation de Gea2p dans la souche *drs2Δ*, tout en précisant que la présence de Drs2p n'est pas seule responsable de la localisation cellulaire de Gea2p. Par la suite, la création du double mutant *drs2Δ gea2Δ* thermosensible a permis de faire la démonstration de l'existence d'une interaction génétique entre les gènes *DRS2* et *GEA2*. En effet, ce double mutant présente une croissance ralentie à température permissive ainsi qu'un défaut lors de la sécrétion des vésicules ce qui ne s'avère pas être le cas lors de la de *DRS2* ou de *GEA2*. De plus, le domaine Sec7 de Gea2p interagit avec 20 acides aminés situés en C-terminale de la queue cytoplasmique de Drs2p. Comme Drs2p est transmembranaire, il est possible qu'elle agisse comme un récepteur membranaire pour Gea2p. Cette dernière, par son interaction avec Drs2p, interviendrait dans la fenestration de la membrane et la tubulation, phénomènes menant à la formation de vésicules sécrétoires (Chantalat *et al.*, 2004).

1.6.2 Les protéines Arf

Les facteurs de ribosylation de l'ADP, Arf (ADP-ribosylation factor), sont de petites GTPases d'environ 21 kDa, très bien conservées dans les cellules eucaryotes. Elles ont été identifiées initialement en tant que cofacteurs nécessaires à l'ADP ribosylation de la sous-unité α des

protéines G par la toxine du choléra (Kahn & Gilman, 1984; Schleifer *et al.*, 1982). Les protéines Arf possèdent comme caractéristique commune essentielle à leur activité *in vivo* l'ajout d'un groupement myristate en N-terminale permettant leur attachement à la membrane (Kahn *et al.*, 1995). De plus, les GTPases Arf doivent être liées au GTP pour être actives. Cette activation est réalisée par des GEF qui échangent du GDP pour du GTP sur les GTPases (Huang *et al.*, 2003). Chez *S. cerevisiae*, trois protéines de type Arf sont retrouvées : Arf1p, Arf2p et Arf3p ainsi que deux autres protéines semblables à ces dernières, les « Arf-like » (ARL) Arl1p et Arl3p (Huang *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1994).

1.6.2.1 Les protéines Arf1p et Arf2p

Les protéines Arf1p et Arf2p sont identiques à 96% entre elles et sont fonctionnellement interchangeables puisque la délétion du gène de l'une peut être compensée par la présence de l'autre. La délétion des gènes des deux protéines est létale indiquant le caractère essentiel de celles-ci pour la viabilité cellulaire. Cependant, Arf1p est celle des deux qui est la plus synthétisée et sa délétion entraîne un défaut de croissance et de sécrétion. La délétion d'*ARF1* n'est pas létale mais entraîne un nombre important d'anomalies cellulaires affectant entre autres le fonctionnement de la clathrine (Chen & Graham, 1998).

Les mammifères possèdent six protéines Arf regroupées en trois classes : la classe I (Arf1p, Arf2p et Arf3p), la classe II (Arf4p et Arf5p) et la classe III (Arf6p). La surexpression des gènes *ARF1h* (humain) de la classe I et celle de *ARF4h* de la classe II de mammifère permet de restaurer la viabilité des cellules du double mutant *arf1Δ arf2Δ* de levure (Lee *et al.*, 1992). Les protéines Arf1p et Arf2p sont impliquées dans la formation des vésicules et dans le transport de celles-ci entre le réticulum endoplasmique et le Golgi (Moss & Vaughan, 1998; Roth, 1999). L'activité de ces deux protéines est régulée par les quatre GEF mentionnées précédemment : Gea1p, Gea2p, Sec7p et Syt1p. La délétion d'*ARF1* et de *GEA2* est létale ce qui n'est pas le cas lors de la délétion d'*ARF1* et de *GEA1* (Chantalat *et al.*, 2004; Spang *et al.*, 2001).

1.6.2.2 La protéine Arf3p

La protéine Arf3p est la troisième et dernière membre de la famille des protéines de type Arf chez *S. cerevisiae*. Le gène codant pour cette protéine ne partage que 54% d'identité de séquence avec les gènes *ARF1* et *ARF2* (Lee *et al.*, 1994). *ARF3* n'est pas un gène essentiel puisque les

doubles délétions *ARF1* et *ARF3* et *ARF2* et *ARF3* sont viables. De plus, la surexpression d'*ARF3* ne permet pas de restaurer la viabilité de double mutant *arf1* Δ *arf2* Δ . La protéine Arf3p ne semble donc pas intervenir dans le transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et le Golgi comme les deux autres. Il reste donc à identifier le rôle spécifique de cette protéine. Le gène *ARF3* présente une plus forte identité, de l'ordre de 60%, avec celle du seul gène présent dans la classe III des mammifères, ARF6h. (Lee *et al.*, 1994). Les différents rôles de la protéine humaine Arf6p sont bien identifiés. Elle intervient notamment dans l'organisation du cytosquelette d'actine, dans la cytokinèse mais aussi dans la régulation du trafic membranaire entre la membrane plasmique et l'endosome. Étant donné leur pourcentage d'identité, les deux protéines pourraient peut-être partager des fonctions similaires (Brown *et al.*, 2001; Donaldson, 2003; Huang *et al.*, 2003). Par l'étude de la localisation d'Arf3p, l'équipe de Huang a montré que la protéine est localisée surtout à la membrane plasmique, à la zone d'émergence du bourgeon ainsi que dans le bourgeon en croissance (Huang *et al.*, 2003). La localisation d'Arf3p aux différents stades du bourgeonnement sous-entend que la protéine serait impliquée dans le processus de bourgeonnement. Cette idée est renforcée suite à l'étude du patron des cicatrices de bourgeonnement de la délétion d'*ARF3* par la coloration au Calcofluor White. mettant en évidence un bourgeonnement aléatoire dans la souche haploïde et diploïde (Huang *et al.*, 2003; Perron, 2004).

Les travaux réalisés sur Arf3p semblent indiquer qu'elle présente des fonctions au sein de la cellule plus proches de celles d'Arf6p humaine que celles d'Arf1p et d'Arf2p. L'équipe du Dr Pallotta a donc tenté de mettre en évidence si effectivement des fonctions différentes des deux autres Arf sont attribuables à Arf3p. Pour ce faire, la surexpression des trois Arf de levure, *ARF1*, *ARF2* et *ARF3*, a tout d'abord été entreprise dans les souches *pfy1* Δ et *pfy1-111 rho2* Δ . Seule la surexpression d'*ARF3* a permis de diminuer la taille des cellules et de repolariser les granules corticaux dans le bourgeon dans la souche *pfy1* Δ . Pour ce qui est de la souche *pfy1-111 rho2* Δ , la surexpression d'*ARF3* entraîne seulement la repolarisation des granules corticaux dans le bourgeon et la formation de longs bourgeons (Zakrzewska *et al.*, 2003). C'était la première fois qu'un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine a pu être attribué à une protéine de type Arf chez la levure. Ceci semble renforcer l'idée qu'Arf3p joue un rôle bien à part des deux autres Arf retrouvées chez *S. cerevisiae* et que ce rôle se rapproche plus de celui de son homologue humain Arf6p. De plus, le phénotype du double mutant *pfy1-111 arf3* Δ s'avère

être modifié par rapport à celui de chacun des deux mutants. Il y aurait donc une interaction génétique entre ces deux gènes sans toutefois passer directement dans le même sentier de signalisation. Les modifications phénotypiques engendrées par la création de ce double mutant ne sont pas corrigées par la surexpression de *GEA1* ou *GEA2*. Ceci semble confirmer le modèle proposé à la Figure 12, c'est-à-dire qu'Arf3p pourrait être réglée entre autres par les GEF, Gea1p et Gea2p (Zakrzewska *et al.*, 2003).

De récentes données ont été publiées sur Arf3p par l'équipe de Costa suggérant l'implication d'Arf3p dans le processus d'endocytose par son interaction avec la protéine Lsb5p. Présentement, les fonctions de cette protéine ne sont pas clairement identifiées cependant, cette protéine possède des domaines permettant une caractérisation possible. Elle possède en N-terminale un domaine VHS (Vps27p/Hrs/STAM), un domaine ENTH (epsin N-terminal homology), au centre un domaine GAT (GGA [Golgi-Localizing, g-adaptin ear homology domain, Arf (ADP-ribosylationfactor)-binding] and TOM1) et en C-terminale un motif NPF (Asparigine-Proline-Phényalanine) qui interagit avec les protéines possédant un domaine EH (EPS15 homology) (Costa & Ayscough, 2005). Les domaines ENTH et NPF sont généralement retrouvés dans des protéines jouant un rôle dans l'endocytose (Kay *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 2001). De plus Lsb5p est localisée à la membrane plasmique ainsi que dans des endosomes provenant du processus d'endocytose. La localisation cellulaire de Lsb5p n'est pas dépendante de l'actine et est similaire à celle observée pour End3p qui est impliquée dans l'endocytose. Lors d'études précédentes sur de possibles protéines impliquant Lsb5p, deux protéines ont été identifiées, Las17p et Sla1p (Dewar *et al.*, 2002; Madania *et al.*, 1999). Suite à l'identification des différents domaines présents sur Lsb5p, il a été mis en évidence que cette dernière, par son domaine en N-terminale, comprenant le domaine VHS et ENTH, se lie à la région riche en proline de Las17p. Pour ce qui est de Sla1p, elle se lie au domaine NPF de Lsb5p présent en C-terminale. Finalement, la découverte la plus intéressante de cette étude est l'observation de l'interaction d'Arf3p avec le domaine GAT de Lsb5p ainsi que le besoin de la présence d'Arf3p pour la localisation de Lsb5p dans le cortex de la cellule. Ces travaux viennent contredire les affirmations faites par l'équipe de Huang qui affirmait qu'Arf3p ne jouait aucunement un rôle dans l'endocytose (Huang *et al.*, 2003). De plus, l'équipe de Costa a aussi montré qu'Arf3p se trouve localisée autour des vacuoles. Ces résultats viennent appuyer l'idée qu'Arf3p joue un rôle potentiel dans l'endocytose. L'ensemble de ces résultats a permis la

mise en place d'un schéma mettant évidence les différentes protéines susceptibles d'interagir avec Lsb5p (Figure 13) (Costa & Ayscough, 2005; Costa *et al.*, 2005).

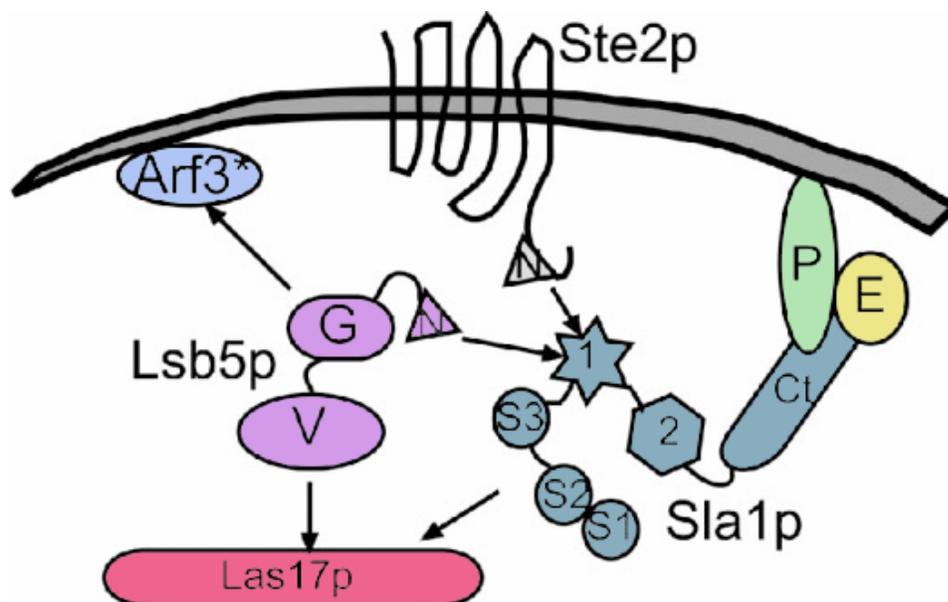


Figure 13 Représentation schématique illustrant les interactions de Lsb5p avec d'autres protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine et dans l'endocytose.

La présence d'un domaine NPF (N) sur Lsb5p permet de recruter Sla1p. Le domaine VHS (V) de Lsb5p est celui interagissant vraisemblablement avec Las17p. Le domaine GAT (G) de Lsb5p permet de lier Arf3p active, ancrée à la membrane par son domaine myristate en N-terminale. P, Pan1p, E, End3p. Tirée de Costa *et al.* (2005).

1.6.2.3 Mécanisme d'activation et d'inactivation des Arf

Comme toutes les GTPases, les protéines de type Arf alternent entre une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP. Cet échange régle l'association de protéines Arf avec la membrane puisque Arf-GDP est soluble et se retrouve dans le cytoplasme avec une faible affinité pour la membrane alors que Arf-GTP peut se lier très fermement à la membrane (Figure 14) (Franco *et al.*, 1995). L'activation de ces protéines se fait par l'intermédiaire des GEF qui sont Gea1p et Gea2p pour Arf1p et Arf2p (Peyroche *et al.*, 1996) et hypothétiquement pour Arf3p (Zakrzewska *et al.*, 2003). La forme Arf-GDP s'obtient suite à l'hydrolyse du GTP par l'activité GTPasique intrinsèque des protéines Arf. Toutefois cette activité GTPasique est très faible. Son efficacité peut être stimulée par l'action des protéines GAP. Gcs1p et Glo3p ont été identifiées comme les GAP pour Arf1p et Arf2p alors que pour

Arf3p aucune GAP n'a pu encore être identifiée, malgré le fait que cette protéine ait été retrouvée en double hybride avec la GAP Bud2p (Poon *et al.*, 1999).

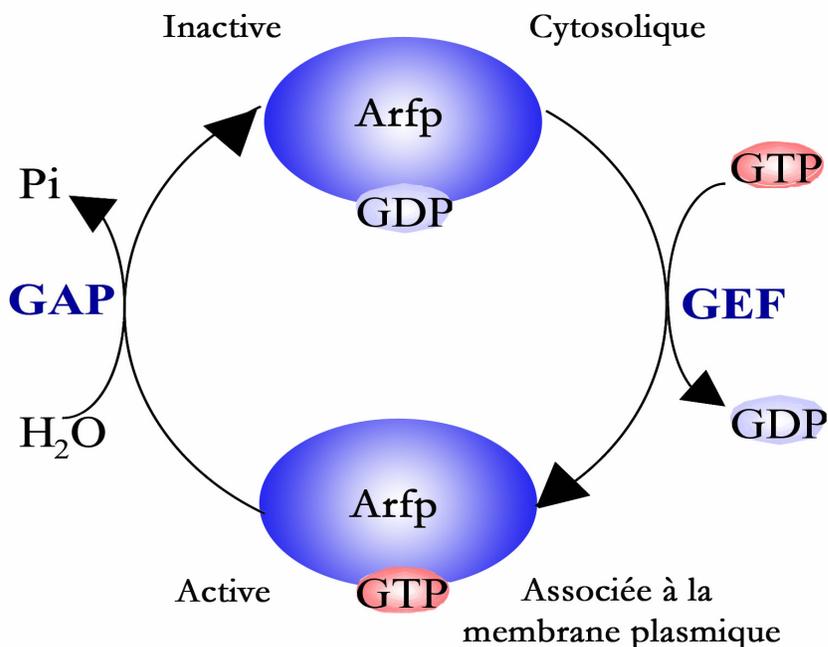


Figure 14 Schéma représentant le mécanisme d'activation et d'inactivation des protéines de type Arf

1.7 Origine et objectifs du projet

L'identification récente d'*ARF3* et de *GEA2* comme des suppresseurs multicopies de la délétion de profiline est à l'origine de ce projet (Zakrzewska *et al.*, 2003). La correction du phénotype des cellules déficientes en profiline, une protéine nécessaire à la régulation du cytosquelette d'actine, permet de croire qu'Arf3p et Gea2p sont importantes pour la régulation du cytosquelette d'actine. Cependant, à ce jour aucun des travaux réalisés sur ces deux protéines n'a permis de déterminer par quel mécanisme d'action Arf3p et Gea2p pourraient être impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine chez *S. cerevisiae* (Perron, 2004; Zakrzewska *et al.*, 2003). Les fonctions biologiques de ces deux protéines sont quant à elles connues. En effet, Gea2p est un facteur d'échange guanosidique pour les GTPases de type Arf qui sont des facteurs de ribosylation de l'ADP dont Arf3p fait partie. Il se pourrait donc que Gea2p soit un GEF pour Arf3p mais aussi pour d'autres protéines importantes pour l'organisation du cytosquelette d'actine. De là, l'hypothèse à la base de l'étude actuelle a pu être

émise stipulant que l'implication d'Arf3p dans l'organisation du cytosquelette d'actine chez la levure *S. cerevisiae* fait intervenir plusieurs protéines dont peut être Gea2p.

L'objectif principal fixé pour répondre à cette hypothèse consistait à identifier la ou les protéines importantes pour qu'Arf3p ainsi que Gea2p puissent jouer leur rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Pour ce faire, dans la première étude la surexpression d'*ARF3* et de *GEA2* a été faite dans plusieurs souches mutantes afin d'identifier des corrections ou des détériorations du cytosquelette d'actine. Cette étude devait nous permettre de mettre en place un sentier de signalisation potentiel ou de compléter celui déjà mis en place (Figure 12). La localisation cellulaire très précise d'Arf3p suggère l'implication de protéines importantes pour l'assurer. Nous avons donc procédé à la localisation cellulaire de la protéine Arf3p dans différentes souches afin de rechercher une délocalisation cellulaire de cette dernière et d'identifier de potentiels partenaires protéiques pour Arf3p. Toujours dans l'optique de rechercher d'éventuels partenaires protéiques, l'étude de la surexpression de différents gènes dans la souche *arf3Δ* a été réalisée afin de mettre en évidence une éventuelle correction de son bourgeonnement aléatoire. Un double mutant *arf3Δ gea2Δ* a été construit pour vérifier la présence d'une interaction génétique entre les gènes *ARF3* et *GEA2* et de mettre à l'épreuve une partie de notre hypothèse de départ. Bien que des acides aminés aient déjà été identifiés comme importants pour l'activité d'Arf3p, il reste à déterminer si ces derniers se situent bien dans les domaines supposés fonctionnels d'Arf3p et s'il n'en existerait pas d'autres (Perron, 2004). Pour ce faire, un essai de mutagenèse aléatoire a été réalisée afin d'identifier des acides aminés répartis sur l'ensemble de la séquence protéique ne sont pas essentiels à la fonction d'Arf3p. De plus, la mutagenèse dirigée a été de nouveau entreprise pour changer des acides aminés déjà identifiés comme faisant partis des sites potentiellement importants pour l'expression d'Arf3p. Cette démarche a été entreprise afin de déterminer si les résultats obtenus lors des précédents travaux sont spécifiques aux mutations réalisées. Elle a aussi été faite autour de ces mêmes acides aminés dans le but d'identifier l'étendu du domaine. Finalement, des supprimeurs de la délétion de profiline, dont notamment *ARF3* et *GEA2*, ont été surexprimés dans la souche *bud6Δ* afin déterminer si la correction du cytosquelette d'actine chez *S. cerevisiae* par ces gènes est indépendante de la profiline mais dépendante de Bud6p.

Chapitre 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Souches bactériennes et conditions de croissance

2.1.1 Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées au cours des manipulations sont *Escherichia coli* DH5 α et XL1-blue dont les génotypes sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 Souches bactériennes utilisées

Souches	Génotype
DH5 α	F ⁺ / <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> , (Nal ^r), <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , (Φ 80 <i>dlac</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15)
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F ⁺ , <i>proAB</i> , <i>lac^FZ</i> Δ M15, Tn10 (Tet ^r)]

2.1.2 Conditions de croissance

Les souches d'*E. coli* utilisées poussent sur un milieu Luria-Bertani (LB) composé de tryptone à 1%, d'extrait de levure à 0,5% et de NaCl à 1%. Le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH à 1N. Pour l'obtention d'un milieu gélosé, 1,5% (m/v) d'agar est ajouté. La croissance bactérienne en milieu liquide se fait à 37°C pendant 16 à 18 heures sous agitation à 250 rpm.

La croissance et la sélection des bactéries contenant un plasmide se font sur un milieu LB contenant de l'ampicilline à 100 μ g/ml. L'antibiotique est ajouté au milieu LB stérilisé et refroidi à partir d'une solution mère à 100 mg/ml.

2.2 Souches de levure et conditions de croissance

2.2.1 Souches de levure

Les génotypes et la référence concernant l'origine de toutes les souches de levure utilisées au cours de l'étude actuelle sont répertoriés dans le Tableau 2.

Tableau 2 Souches de levure utilisées

Souches	Génotypes	Référence
APY022	<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his3Δ200 lys2-801 ade2-101 gea1-6 gea2Δ::HIS3</i>	(1)
<i>arf3Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 arf3Δ::kan</i>	(2)
<i>arf3Δ gea2Δ</i>	<i>MATα leu2Δ lys2Δ ura3Δ arf3Δ::kan gea2::HIS3</i>	(3)
BY4741	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3</i>	(4)
BY4742	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3</i>	(4)
<i>bem2Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bem2Δ::kan</i>	(4)
BHY46	<i>MATα ura3 his3 leu2 ade2 ade3 pfy1-111::LEU2</i>	(5)
<i>bni1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bni1Δ::kan</i>	(4)
<i>bnr1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bnr1Δ::kan</i>	(4)
<i>bud2Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bud2Δ::kan</i>	(2)
<i>bud3Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bud3Δ::kan</i>	(4)
<i>bud4Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bud4Δ::kan</i>	(4)
<i>bud6Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bud6Δ::kan</i>	(4)
<i>bud6Δ bud6Δ</i>	<i>MATa/MATα his3/his3 leu2/leu2 lys2/LYS2 MET15/met15 ura3/ura3 bud6Δ::kan bud6Δ::kan</i>	(2)
<i>bud8Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bud8Δ::kan</i>	(4)
<i>cdc10Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 cdc10Δ::kan</i>	(4)
<i>cdc12-6</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 cdc12-6::kan</i>	(6)
<i>cbs1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 cbs1Δ::kan</i>	(4)

Souches	Génotypes	Références
<i>chs3Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 chs3Δ::kan</i>	(4)
<i>chs4Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 chs4Δ::kan</i>	(4)
<i>chs5Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 chs5Δ::kan</i>	(4)
<i>chs6Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 chs6Δ::kan</i>	(4)
<i>chs7Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 chs7Δ::kan</i>	(4)
CJY049-11-4	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 his3Δ200 lys2-801 ade2-101 GEA1 gea2Δ::HIS3</i>	(1)
CJY062-10-3	<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his3Δ200 lys2-801 ade2-101 gea1-4 gea2Δ::HIS3</i>	(1)
<i>cla4Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 cla4Δ::kan</i>	(4)
DJP102	<i>MATα lys2-80 ura3-52 his3-Δ200 trp1-1 leu2-3, 112 pfy1Δ::LEU2</i>	(7)
<i>drs2Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 drs2Δ::kan</i>	(4)
<i>ede1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 ede1Δ::kan</i>	(4)
EHZ100	<i>MATα his3 ura3 leu2 arf3Δ::kan</i>	(8)
EHZ200	<i>MATa ura3 his3 leu2 ade2 ade3 pfy1-111::LEU2 arf3Δ::kan</i>	(8)
<i>end3Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 end3Δ::kan</i>	(4)
EZY27	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 syp1Δ::URA3</i>	(12)
<i>gea1Δ</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2 lys 2 ura3 gea1Δ::HIS3</i>	(4)
<i>his1Δ</i>	<i>MATα his1Δ::kan</i>	(4)
<i>las17Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 las17Δ::kan</i>	(4)
<i>mid2Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 mid2Δ::kan</i>	(4)
PY3517	<i>MATα his3-Δ1 leu2-Δ0 ura3-Δ0 met15-Δ0 bni1-FH2#1::HIS3 bnr1::kanR</i>	(9)
<i>rho4Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 rho4Δ::kan</i>	(4)
<i>sac6Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 sac6Δ::kan</i>	(4)
<i>sla1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 sla1Δ::kan</i>	(4)
<i>sla2Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 sla2Δ ::kan</i>	(4)

Souches	Génotypes	Référence
<i>smv1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 smv1Δ::kan</i>	(4)
<i>spa2Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 spa2Δ::kan</i>	(4)
<i>srv2Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 srv2Δ::kan</i>	(4)
<i>tpm1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 tpm1Δ::kan</i>	(4)
<i>vrp1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 vrp1Δ::kan</i>	(4)
Y1242	<i>MATα his3Δ200 trp1-Δ1 ade2-101 lys2-801 ura3-52 rom2Δ::HIS3</i>	(10)
Y1392	<i>MATα can1-100 ura3-1 leu2-3,-112 his33-11,-15 trp1-1 ade2-1 myo3Δ::HIS3 myo5Δ::TRP1</i>	(11)
Y1695	<i>MATα ura 3-52 lys 2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-D200 rho2D::TRP1</i>	(10)

Références : (1) Peyroche *et al.* (2001), (2) Souche provenant de la compagnie Invitrogen, (3) l'étude actuelle, (4) Souche provenant de la compagnie Open Biosystems, (5) Haarer *et al.* (1993), (6) Lee *et al.* (2002), (7) Marcoux *et al.* (1998), (8) Zakrzewska *et al.* (2003), (9) Gracieuseté de David Pellman, (10) Manning *et al.* (1997), (11) Gracieuseté de Mr Charlie Boone, (12) Zakrzewska (2005).

2.2.2 Conditions de croissance

Les souches de *S. cerevisiae* sans plasmide poussent sur un milieu YPD riche et non sélectif. Il est composé d'extrait de levure à 1%, de tryptone à 2% et de glucose à 2%. La croissance des souches auxotrophes nécessite un milieu minimal composé de milieu azoté sans acide aminé « Yeast nitrogen base without amino acids » à 0,67%, de glucose à 2% et d'un mélange d'acides aminés essentiels à 0,072% exempt de l'acide aminé utilisé pour la sélection et quelques fois complémenté avec les bases azotés adénine et uracile. La composition du mélange en acides aminés essentiels utilisés pour les milieux sélectifs est présentée dans le Tableau 3. Un milieu solide est obtenu par l'ajout d'agar à 2% dans le milieu. L'incubation des cultures de *S. cerevisiae* se fait à la température optimale de 30°C à moins d'indication contraire, et sous agitation à 225 rpm pour les cultures en milieu liquide. Lors de tests de croissance, de la caféine à 1,25 mg/ml est ajoutée au milieu approprié.

Tableau 3 Composition du mélange d'acides aminés essentiels et de bases azotés utilisé pour les milieux sélectifs

Adénine	800 mg	Phénylalanine	2000 mg
Arginine	800 mg	Thréonine	8000 mg
Histidine	800 mg	Tryptophane	800 mg
Leucine	2400 mg	Tyrosine	1200 mg
Lysine	1200 mg	Uracile	800 mg
Méthionine	800 mg		

2.3 Constructions plasmidiques

Les différents plasmides utilisés lors de l'étude actuelle ainsi que leur provenance sont répertoriés dans le Tableau 4. Les plasmides pAAL100, pAAL101, pAAL200, pAAL201, pAAL202 et pAAL203 sont le résultat du clonage du gène *ARF3*, muté à différents sites et préalablement extrait du plasmide pBluescript avec les enzymes de restriction *SacI* et *KpnI*, dans les plasmides pRS426 ou pRS316 digérés eux aussi par ces mêmes enzymes. Les plasmides pAAL1, pAAL2 et pRMP100, pRMP101, pRMP102, pRMP103 et pRMP200 ont été construits par Marjorie Perron sur le même principe.

Tableau 4 Les différents plasmides utilisés dans l'étude actuelle

Plasmide	Description	Référence
pBS- <i>ARF3</i>	Plasmide pBluescript avec le gène <i>ARF3</i> et son promoteur	(1)
pRMP100	Plasmide pRS426 avec le gène <i>ARF3</i> et son promoteur	(1)
pAAL1	Plasmide pRS426 avec le gène <i>ARF3</i> portant la mutation <i>G2A</i> et son promoteur	(1)
pRMP101	Plasmide pRS426 avec le gène <i>ARF3</i> portant la mutation <i>D26G</i> et son promoteur	(1)
pRMP102	Plasmide pRS426 avec le gène <i>ARF3</i> portant la mutation <i>T31N</i> et son promoteur	(1)
pRMP103	Plasmide pRS426 avec le gène <i>ARF3</i> portant la mutation <i>Q71L</i> et son promoteur	(1)

Plasmide	Description	Référence
pAAL2	Plasmide pRS426 avec le gène <i>ARF3</i> portant la mutation <i>L162G</i> et son promoteur	(1)
pAAL100	Plasmide pRS426 avec le gène <i>ARF3</i> portant la mutation <i>N3A</i> et son promoteur	(2)
pAAL101	Plasmide pRS426 avec le gène <i>ARF3</i> et son promoteur muté en -10 avant l'ATG pour créer un site <i>HindIII</i>	(2)
pRMP200	Plasmide pRS316 avec le gène <i>ARF3</i> et son promoteur	(1)
pAAL200	Plasmide pRS316 avec le gène <i>ARF3</i> portant la mutation <i>Q71A</i> et son promoteur	(2)
pAAL201	Plasmide pRS316 avec le gène <i>ARF3</i> portant la mutation <i>Q72A</i> et son promoteur	(2)
pAAL202	Plasmide pRS316 avec le gène <i>ARF3</i> portant la mutation <i>L162A</i> et son promoteur	(2)
pAAL203	Plasmide pRS316 avec le gène <i>ARF3</i> portant la mutation <i>L163A</i> et son promoteur	(2)
pRMP301	Plasmide pRS426 avec le gène <i>ARF3</i> et son promoteur et la séquence de la GFP fusionnée en C-terminale du gène	(1)
YEp24- <i>MID2</i>	Plasmide YEp24 avec le gène <i>MID2</i> et son promoteur	(3)
pRS426- <i>RHO2</i>	Plasmide pRS426 avec le gène <i>RHO2</i> et son promoteur	(3)
pRS426- <i>ROM1</i>	Plasmide pRS426 avec le gène <i>ROM1</i> et son promoteur	(3)
pRS426- <i>ROM2</i>	Plasmide pRS426 avec le gène <i>ROM2</i> et son promoteur	(3)
YEp24- <i>SMY1</i>	Plasmide YEp24 avec le gène <i>SMY1</i> et son promoteur	(3)
pRS426- <i>WSC1</i>	Plasmide pRS426 avec le gène <i>WSC1</i> et son promoteur	(3)
p4753	Plasmide pRS426 avec les portions FH1 et FH2 du gène <i>BNI1</i>	(6)
pGM53	Plasmide multicopie avec le gène <i>GEA2</i>	(5)
pEML02	Plasmide pRS426 avec le gène <i>SYP1</i> et son promoteur	(4)

Référence : (1) Perron (2004), (2) L'étude actuelle, (3) Marcoux *et al.* (2000), (4) Lavoie (2006), (5) Peyroche *et al.* (2001), (6) Pruyne *et al.* (2002).

2.4 Manipulation de l'ADN

2.4.1 Réaction PCR

Le mélange des réactions de PCR « polymerase chain reaction » se compose de 2 µl de chacun des oligonucléotides à une concentration de 75 ng/µl, 50 ng d'ADN génomique de *S. cerevisiae*,

5 μl du tampon PCR contenant du MgCl_2 à 50 mM, 2 μl de dNTP à 10mM, 1 μl de Taq polymérase et finalement la quantité d'eau distillée nécessaire pour compléter le volume à 50 μl . Le mélange est ensuite placé dans un thermocycleur (Techgene) programmé pour effectuer une dénaturation pendant 10 minutes à 95°C puis 30 cycles selon les paramètres suivants : (1) étape de dénaturation : 1 min à 95°C, (2) étape d'hybridation : 1 min à la température de fusion des amorces moins 5°C (lorsque les températures de fusion des amorces sont différentes, la plus faible des valeurs est utilisée), (3) étape d'élongation : 1 min à 72°C, avec pour finir une élongation pendant 10 min à 72°C.

2.4.2 Électrophorèse sur gel d'agarose

Les électrophorèses sont réalisées sur des gels d'agarose à 0,8% pour une simple visualisation ou bien à 0,6% pour des extractions sur gel. L'agarose est dissoute en la portant à ébullition dans du tampon TBE à 1X (Tris basique à 90 mM, acide borique à 90 mM, EDTA à 2 mM). Ensuite du bromure d'éthidium à 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ est adjoint avant que le gel ne se solidifie afin de pouvoir visualiser l'ADN sous une lampe UV. Du tampon de chargement à 6X (bleu de bromophénol à 0,1%, glycérol à 50%, SDS à 1%, EDTA à 100 mM pH 8,0) est ajouté dans les échantillons de sorte que la concentration finale dans l'échantillon soit de 1X. La migration se fait dans une cuve à électrophorèse remplie de TBE à 1X, sous une tension de 100 volts. Des marqueurs de longueur moléculaire sont inclus dans chaque gel. Les marqueurs utilisés sont l'ADN du bactériophage ΦX174 digéré par *HaeIII* et l'ADN du bactériophage λ digéré par *HindIII*.

2.4.3 Isolement d'ADN sur gel d'agarose

L'ADN à isoler est déposé sur un gel d'agarose à 0,6% et la migration se fait sous une tension de 100 volts jusqu'à ce que les bandes soient bien séparées les unes des autres. Ensuite, sous une lampe UV, la région du gel donnant la bande d'intérêt est découpée à l'aide d'un scalpel et déposée dans un microtube. Le fragment de gel extrait est traité suivant le protocole du QIAquick[®] Gel Extraction Kit de QIAGEN.

2.4.4 Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

Afin de vérifier les constructions plasmidiques, d'extraire un fragment d'intérêt ou bien de déterminer la taille de l'insert ou d'un plasmide, des digestions avec généralement deux enzymes différentes sont réalisées. Pour de telles digestions, le mélange réactionnel est composé d'une quantité d'ADN comprise entre 0,1 et 4 μg , $1/_{10}$ de volume de tampon à 10X choisi suivant les enzymes utilisées et les recommandations de la compagnie (New England Biolabs), $1/_{10}$ de volume de BSA à 10X si nécessaire, 1 unité d'enzyme de restriction par μg d'ADN digéré puis le volume est complété avec de l'eau filtrée stérile. Suivant la quantité d'ADN digéré et l'utilisation faite par la suite, le volume final de la digestion peut varier. Dans le cas d'une vérification de construction plasmidique, d'une estimation de la taille d'un plasmide ou d'un insert, où 100 à 600 ηg d'ADN sont utilisés, la digestion se fait généralement dans 20 μL . Lorsqu'il s'agit d'une extraction d'un fragment d'intérêt demandant une plus grande quantité d'ADN, de l'ordre de 1 à 4 μg , le volume de la digestion sera alors de 100 μL . Dans le cas des digestions doubles, il arrive parfois que les tampons requis par les deux enzymes soient incompatibles empêchant la réalisation d'une digestion double. On procède alors à une digestion séquentielle où les deux digestions sont séparées par une précipitation d'ADN ou une extraction sur gel.

2.4.5 Ligature

L'ADN plasmidique est tout d'abord rendu linéaire par la digestion avec deux enzymes de restriction dont les sites sont situés dans le site multiple de clonage afin d'éviter une recircularisation du plasmide. Le fragment à sous cloner est digéré par les mêmes enzymes, ce qui crée des extrémités cohésives rendant la ligature plus facile. La ligature nécessite une quantité équimolaire du fragment d'ADN à insérer et du plasmide linéaire (de 50 à 100 ηg). À ce mélange, 2 μL de tampon de ligature à 10X sont ajoutés au mélange plasmide et fragment d'ADN ainsi qu'une unité de ligase extraite du bactériophage T4 puis le volume est complété à 20 μL avec de l'eau. La réaction peut se faire à 16°C pendant 4 heures ou bien toute la nuit à 4°C.

2.4.6 Purification de produits de PCR

La purification de produit de PCR se fait en utilisant la trousse d'extraction d'ADN plasmidique QIAGEN provenant du QIAprep® Spin Miniprep Kit. Cette trousse est utilisée suivant les recommandations du fabricant.

2.5 Transformation

2.5.1 Transformation bactérienne

2.5.1.1 Transformation bactérienne par électroporation

2.5.1.1.1 Préparation des cellules compétentes

Les cellules compétentes sont préparées selon le protocole de (Dower *et al.*, 1988). Tout d'abord, un litre de milieu LB est inoculé avec 10 ml d'une culture de nuit de la souche *E.coli* DH5 α et ensuite incubé à 37°C jusqu'à l'obtention d'une D.O.₅₉₅ de 0,5 à 1. A partir de cette étape, toutes les solutions et le matériel doivent être conservés sur de la glace. Les cellules sont réparties dans des bouteilles de 250 ml puis centrifugées pendant 15 minutes à 4°C à 5000 rpm (Sorvall RC-5B Plus avec le rotor GSA). Les bouteilles utilisées sont traitées préalablement à l'acide chlorhydrique pendant 4 heures à 37°C et stérilisées. Le surnageant est éliminé et le culot est repris avec 1 litre d'eau stérile. Ensuite, les cellules sont centrifugées à nouveau selon les conditions précédentes puis le culot est repris dans 500 ml d'eau stérile et centrifugé à nouveau. Le culot est alors cette fois-ci repris dans 20 ml d'une solution de glycérol à 10% puis centrifugé et repris dans 2 à 3ml de glycérol à 10%. La concentration finale de cellules obtenue est alors de 3×10^{10} cellules/ml. Cette suspension peut être divisée en plusieurs fractions puis conservée à -80°C. Dans ces conditions les bactéries pourront être conservées au moins 6 mois.

2.5.1.1.2 Électro-transformation

En ce qui concerne l'électro-transformation, les manipulations doivent être réalisées rapidement et le matériel maintenu en tout temps sur la glace. Dans un tube de 1,5 ml, 1 à 2 μ l d'ADN sont adjoints à 40 μ l de cellules compétentes préparées selon le protocole ci-dessus. Suite à une incubation d'une minute sur la glace, la suspension de cellules est transférée dans une cuvette à électroporation de 0,2 cm. Lors de ce transfert, il est très important de vérifier

que le mélange se trouve bien au fond de la cuvette. La cuvette est ensuite introduite dans le support à électroporation, préalablement refroidi à -20°C , et poussée dans la chambre jusqu'à ce qu'elle soit positionnée entre les deux électrodes. Une pulsation électrique doit être appliquée selon des paramètres spécifiques ($25\ \mu\text{F}$, $2,5\ \text{KV}$ et $200\ \Omega$) jusqu'à l'audition du signal. À ce moment, la cuvette est retirée du support et 1ml de milieu SOC (tryptone à 2%, extrait de levure à 0,5%, MgCl_2 à 10 mM, MgSO_4 à 10 mM et glucose à 20 mM) est ajouté. Les cellules sont reprises avec une pipette pasteur et transférées dans un tube de 13 ml pour une incubation d'une heure à 37°C . Elles sont ensuite lavées pour éliminer le milieu SOC puis étalées sur un milieu sélectif.

2.5.1.2 Transformation bactérienne par choc thermique

2.5.1.2.1 Préparation des cellules compétentes

La souche *E.coli* DH5 α utilisée pour la plupart des clonages a été traitée au chlorure de rubidium et congelée à -80°C (Utermohlen, 1994). Tout d'abord, 250 ml de milieu LB sont inoculés avec 2,5 ml d'une culture de nuit. La culture est incubée à 37°C sous agitation rapide jusqu'à l'obtention d'une D.O._{600nm} comprise entre 0,4 et 0,6. La culture est ensuite centrifugée dans des bouteilles de 250 ml à 4°C pendant 5 minutes à 5000 rpm (Sorvall RC-5B Plus avec le rotor GSA). L'ensemble du matériel doit être préalablement refroidi sur la glace. Les cellules sont remises en suspension dans 80 ml de TFB1 (KOAc à 30 mM, RbCl à 100 mM, CaCl_2 à 10 mM, MnCl_2 à 50 mM, glycérol à 15%, ajusté à un pH 5,8 avec de l'acide acétique) puis incubées sur la glace pendant 5 minutes. Les cellules sont à nouveau centrifugées pendant 5 minutes à 5000 rpm (Sorvall RC-5B Plus avec le rotor GSA), remises en suspension dans 8 ml de TFB2 (MOPS ou PIPES à 10 mM, CaCl_2 à 75 mM, RbCl 10 mM, glycérol à 15%, ajusté à un pH de 6,5 avec du KOH) et incubées pendant 15 à 60 minutes sur glace. À des fins de conservation, la solution de cellules compétentes obtenue est divisée en fractions de 200 μl dans des tubes de 1,5ml et congelées immédiatement à -80°C . Dans ces conditions, les cellules peuvent être conservées pour une durée d'au moins un an.

La souche *E. coli* XL1-Blue a été traitée au chlorure de calcium. Pour ce faire, 50 ml de milieu LB sont inoculés avec 2 ml d'une culture en phase stationnaire. La culture est incubée à 37°C sous agitation rapide jusqu'à l'obtention d'une D.O._{600nm} d'environ 0,5. Les cellules sont déposées sur la glace et 40 ml sont prélevés pour être centrifugés. Après une centrifugation

pendant 5 minutes à 3000 rpm à 4°C (Sorvall RC-5B Plus avec le rotor GSA), le culot est remis en suspension dans 5 ml d'une solution stérile de CaCl₂ à 50 mM stérile et préalablement refroidie. Les cellules sont traitées ainsi pendant 20 minutes puis centrifugées pendant 5 min à 3000 rpm à 4°C. Finalement, le culot est remis en suspension dans 1 ml de la solution de CaCl₂ à 50 mM. La conservation de ces cellules est de moins d'une semaine à 4°C.

2.5.1.2.2 Transformation par choc thermique

Lors de la transformation 50 à 200 ng d'ADN sont mis en présence de 100 µl de cellules compétentes pour une durée d'une heure. Un choc thermique pendant 5 minutes à 37°C ou pendant une minute à 42°C est ensuite effectué. Les cellules sont déposées sur la glace pendant environ 3 minutes avant d'ajouter 0,5 ml de milieu LB. On laisse incuber les cellules à 37°C sans agitation avant de les étaler sur un milieu LB solide contenant de l'ampicilline à une concentration de 100 µg/ml. Si le plasmide utilisé pour la transformation est pBlueScript il est possible de sélectionner les colonies blanches des transformants en étalant sur les boîtes 50 µl d'IPTG à 100 mM et 50 µl de X-Gal à 2%. Les boîtes sont incubées pendant 16 à 18 heures à 37°C.

2.5.2 Transformation de *S. cerevisiae*

Les différentes souches de levure sont transformées par la méthode utilisant l'acétate de lithium (Kaiser *et al.*, 1994). Un volume de 1,5 ml d'une culture de nuit est transféré dans un microtube puis centrifugé pendant 1 minute à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse. Le surnageant est enlevé et le culot repris dans 50 µl à 100 µl de liquide résiduel. On ajoute 2 µl de carrier DNA (sperme de hareng à 10 mg/ml, préalablement bouilli pendant 20 minutes) et environ 1 µg de plasmide puis on mélange à l'aide d'un vortex quelques secondes. Ensuite, 500 µl de « PLATE mixture » (PEG 4000 à 40%, acétate de lithium à 100 mM, Tris HCl à 10 mM, EDTA à 1 mM) et 20 µl de DTT à 1M sont ajoutés. Il est très important de vortexer entre chaque adjonction. Les cellules sont laissées à température ambiante pendant 6 à 8 heures. Cette incubation est suivie d'un choc thermique à 42°C pendant 10 minutes. Pour finir, les cellules sont récupérées par centrifugation puis repris dans 100 µl d'eau stérile afin d'être étalées sur un milieu sélectif approprié. Les boîtes sont incubées à 30°C jusqu'à l'obtention de colonies.

2.6 Extraction d'ADN plasmidique

2.6.1 Pour les bactéries

2.6.1.1 Méthode CTAB

L'ADN plasmidique de chaque transformant sélectionné est isolé grâce à la méthode d'extraction d'ADN plasmidique employant le CTAB (bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium). Un clone bactérien transformé est mis en culture dans du LB avec de l'ampicilline (100 µg/ml) sous agitation toute la nuit à 37°C. Ensuite, 1,5 ml de la culture sont transférés dans un microtube de 1,5 ml et centrifugés pendant 1 minute à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse. Après élimination du surnageant, le culot est repris dans 200 µl de tampon STET (sucrose à 8%(p/v), Tris·HCl à 50 mM, pH 8,0, EDTA à 50 mM, Triton à 0,1% (v/v)). Les cellules sont traitées avec 5 µl de lysosyme à 50 mg/ml pendant 5 minutes à température ambiante puis le tube est mis pendant 45 secondes dans de l'eau bouillante. Les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse et sans éliminer le surnageant, le culot visqueux est récupéré à l'aide d'un cure-dent. Le surnageant est traité avec 10 µl de CTAB à 5% (CTAB à 5% (p/v) dans NaCl à 0,5 M). Le tout est mélangé par inversion et centrifugé pendant 10 minutes à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse. Le surnageant est éliminé et la culot est solubilisé rapidement avec 300 µl de NaCl à 1,2 M. La précipitation de l'ADN se fait par l'addition de 750 µl d'alcool éthylique à 95%, suivie d'une incubation sur la glace pendant 10 à 15 minutes et d'une centrifugation pendant 15 minutes à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse. Le surnageant est retiré et il est possible de laver le culot avec 250 µl d'alcool éthylique à 70% avant de le dissoudre dans 50 µl de TE (Tris HCl à 10 mM pH 8,0, EDTA à 1 mM pH 8,0) ou 50 µl d'eau filtrée stérile.

2.6.1.2 Méthode par colonne QIAGEN

Cette trousse d'extraction d'ADN plasmidique QIAprep® Spin Miniprep Kit de la compagnie QIAGEN est utilisée seulement lorsque l'ADN a besoin d'être très propre comme pour le séquençage ou le clonage. Elle est utilisée suivant les recommandations du manufacturier.

2.6.2 Pour la levure

L'extraction d'ADN de levure est faite dans le but de récupérer l'ADN génomique de levure ainsi que les plasmides ayant été introduit dans celle-ci. Elle est réalisée suivant le protocole énoncé de (Hoffman & Winston, 1987). Une culture de nuit de 3ml est d'abord centrifugée pendant 1 minute à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse. Le culot est ensuite resuspendu dans 200 µl de tampon de lyse SSTET (TritonX-100 à 2% (v/v), SDS à 1% (v/v), NaCl à 100 mM, Tris HCl à 10 mM pH8,0, EDTA à 1 mM). Les cellules sont traitées avec 200 µl d'un mélange phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) et 300 mg de billes de verre (425-600 µm de diamètre) sont ajoutés et le tout est agité à l'aide d'un vortex pendant 4 minutes à vitesse maximale. Le mélange est centrifugé pendant 5 minutes à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse. La phase aqueuse est récupérée et mise dans un microtube propre. A ce volume récupéré, 200 µl d'un mélange phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) sont ajoutés puis le tout est centrifugé pendant 5 minutes à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse. Cette étape est répétée jusqu'à ce que l'interphase ne soit plus visible. Suite à la dernière extraction phénol-chloroforme, 10 µl de RNase à 10 mg/ml est ajouté à la phase aqueuse suivie d'une incubation à 37°C pendant 30 minutes. Ce traitement à la RNase sert à éliminer l'ARN présent dans la solution. Une extraction phénol-chloroforme est réalisée et est suivie d'une précipitation de l'ADN à l'éthanol. Pour ce faire, le volume de la phase aqueuse est mesuré puis $\frac{1}{10}$ de ce volume en acétate de sodium ainsi que 2 volumes d'alcool éthylique 95% sont adjoints. Le tout est laissé sur glace pendant 15 minutes puis centrifugé pendant 15 minutes à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse. Le surnageant est éliminé et le culot est séché à l'air. Ce dernier est repris dans 50 µl de tampon TE (Tris HCl à 10 mM pH 8,0, EDTA à 1 mM pH 8,0) ou 50 µl d'eau filtrée stérile.

2.7 Création du double mutant *arf3Δ* *gea2Δ*

2.7.1 Création du double mutant diploïde

Tout d'abord, les deux souches à croiser, *arf3Δ::Kan^R MATa* et *gea2Δ::HIS3 MATα* (CJY049-11-4) de type sexuel opposé, sont inoculées dans un même tube contenant 5 ml de YPD et incubées sous agitation toute la nuit à 30°C. Les marqueurs de sélection utilisés pour construire les souches mutantes haploïdes sont les gènes *HIS3* et *Kan^R*. Le gène *HIS3* permet à la souche de pousser sur un milieu minimal dépourvu d'histidine alors que le gène *Kan^R* confère à la

souche qui possède ce gène une résistance à la généticine (G418). Le lendemain, la sélection du diploïde se fait sur un milieu SD dépourvu d'histidine et contenant de la généticine G418 à 250 µg/ml. Les colonies obtenues sur ce milieu seront des souches diploïdes hétérozygotes qui posséderont les deux gènes marqueurs indispensables à la croissance sur ce milieu sélectif. Les cellules diploïdes hétérozygotes obtenues sont par la suite mises dans des conditions favorisant la sporulation de façon à obtenir un double mutant haploïde homozygote.

2.7.2 Sporulation du mutant diploïde

Pour que la sporulation se produise, une petite quantité de la souche diploïde est inoculée dans 5 à 8 ml de milieu minimal puis incubée toute la nuit sous agitation à 30°C. La culture de nuit est diluée dans 10 ml de milieu YPD de façon à avoir une D.O._{600nm} de 0,6. La culture diluée est de nouveau incubée à 30°C pendant 3 heures afin d'obtenir une D.O._{600nm} d'environ 1,2. Cette culture est alors centrifugée pendant 5 minutes à 3000 rpm (Sorvall RC-5B Plus avec le rotor SA-600). Le surnageant est décanté délicatement et le culot est lavé avec 20 ml d'eau stérile filtrée puis centrifugé pendant 5 min à 3000 rpm (Sorvall RC-5B Plus avec le rotor SA-600). Le culot obtenu est repris dans 10 ml de milieu YEPA (acétate de potassium à 2%, Bacto-Peptone à 2%, Bacto-Yeast Extract à 1%) puis les cellules sont incubées toute la nuit à 30°C sous agitation. La culture de nuit est alors centrifugée pendant 5 min à 3000 rpm (Sorvall RC-5B Plus avec le rotor SA-600) puis le culot est repris dans 20 ml d'eau distillé. Les cellules sont lavées deux fois avec 10 ml d'eau stérile filtrée puis reprises dans 25 ml de milieu SPM (acétate de potassium à 0,3%, raffinose à 0,02%, Drop out à 0,053%). Le tout est déposé dans un erlenmeyer de 250 ml pour une aération maximale. L'incubation se fait à 30°C pendant 2 à 3 jours sous agitation ou bien jusqu'à l'apparition de tétrades.

2.7.3 Dissection des tétrades

Une fois les tétrades obtenues suite à la sporulation de la souche diploïde, l'étape suivante consiste à la dissection de celles-ci afin d'obtenir un double mutant haploïde.

2.7.3.1 Digestion de la paroi cellulaire de l'asque

Une souche diploïde ayant sporulée peut être disséquée seulement après avoir digéré la paroi de l'asque renfermant les quatre spores. L'enzyme utilisée pour réaliser cette digestion est la

Zymolyase[®] 20T. Cette enzyme a pour fonction d'hydrolyser les polymères de glucoses liés par un lien β -1,3 par son activité β -1,3-glycanlaminaripentaohydrolase. Pour ce faire, 150 μ l de cellules ayant sporulées sont centrifugées pendant 20 sec à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse. Les cellules sont alors reprises dans 100 μ l de Zymolyase[®] 20T (200 μ g/ml dans de l'eau) et laissées à température ambiante pendant environ 30 minutes (le temps peut varier selon les souches utilisées). L'étape de digestion est une étape critique du protocole puisqu'une trop longue digestion entraînera la séparation des spores tandis qu'une digestion trop courte rendra la dissection difficile car les spores resteront ensemble. Les cellules sont centrifugées pendant 20 sec à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse puis reprises dans 50 à 100 μ l de sorbitol à 1 M (selon la concentration cellulaire). Les cellules sont finalement étalées en ligne droite à l'aide d'un fil à boucle sur un milieu sélectif parfaitement au niveau.

2.7.3.2 Microdissection des ascospores

Le mélange de cellules étalées sur la boîte de Pétri n'est pas composé uniquement d'asques de 4 spores mais aussi de cellules n'ayant pas sporulé ou bien seulement avec 2 ou 3 spores. Pour la dissection, il est important d'identifier les asques avec 4 spores sphériques disposées en losange. La microdissection est réalisée à l'aide d'un micromanipulateur relié à un microscope optique. Le réglage de la microaiguille est réalisé de façon à ce que celle-ci touche légèrement la surface du Pétri. Une tétrade est prélevée grâce à la microaiguille et les quatre spores sont déposées à environ 1 cm les unes des autres. Le Pétri est incubé à 30°C jusqu'à ce que les colonies correspondant à chaque spore apparaissent.

2.7.3.3 Sélection du double mutant

La sélection du double mutant obtenu parmi les quatre spores ayant formé des colonies est faite par réplique de la boîte sur un milieu minimal SD-HIS-G418 à 250 μ g/ml. Seul le double mutant pourra croître sur un tel milieu puisqu'il possédera le gène codant pour l'histidine venant de *gea2* Δ et le gène de résistance à la généticine G418 provenant d'*arf3* Δ . Il est important par la suite d'identifier les génotypes des cellules par des tests de conjugaison et de croissance sur différents milieux sélectifs.

2.7.4 Test de conjugaison

L'identification du type sexuel de la souche d'intérêt se fait par un test de conjugaison. Pour ce faire, il faut croiser la souche dont on cherche à déterminer le type sexuel avec une souche de type sexuel connu présentant une auxotrophie qui ne risque pas d'être retrouvée dans la souche à tester. Dans l'étude actuelle, les souches utilisées présentent une seule auxotrophie pour l'histidine dû à la délétion du gène *HIS1*. Les souches utilisées dans le laboratoire sont auxotrophes pour l'histidine mais suite à la délétion du gène *HIS3*. De ce fait, s'il y a conjugaison entre la souche d'intérêt et la souche déficiente pour le gène *HIS1*, le diploïde formé ne présentera plus aucune auxotrophie et sera en mesure de croître sur un milieu dépourvu d'acide aminé. Dans un premier temps, les souches *his1 MATa* et *his1 MATα* sont mises en culture dans 3 ml de milieu YPD et incubées toute la nuit à 30°C sous agitation. Le lendemain, 300 µl de cette culture de nuit sont prélevés et étalés sur un milieu solide YPD dans le but de produire un tapis cellulaire recouvrant entièrement la boîte après une incubation à 30°C pendant 2 à 3 jours. En parallèle, sur deux autres Pétris YDP, des dépôts de 3 à 4 µl sont faits avec les souches BY4741 *MATa*, BY4742 *MATα* et le double mutant à tester est incubé toute la nuit à 30°C. Les souches disposées sur cette dernière gélose ont été croisées par réplique avec un tapis cellulaire de cellules *his1Δ MATa* et *his1Δ MATα* se trouvant sur un milieu YPD. Après 24 heures d'incubation, ces deux derniers Pétris sont répliqués sur un milieu minimal SD sans acides aminés (glucose à 2%, milieu azoté sans acide aminé « YNB – Yeast Nitrogen Base without amino acids » à 0,67%), où ne pousseront que les cellules diploïdes issues d'un croisement entre deux souches de type sexuel opposé. Par exemple, si des cellules diploïdes avaient poussé sur la gélose SD provenant d'un croisement avec la souche *his1Δ MATa*, on aurait pu conclure que le type sexuel de la souche d'intérêt était *MATα* et vice versa. Pour confirmer les résultats obtenus pour la souche à tester, ceux-ci seront comparés aux résultats obtenus avec les souches contrôles BY4741 et BY4742 dont les types sexuels sont connus.

2.7.5 Test du génotype

Afin de déterminer le ou les auxotrophies du double mutant créé, un test de génotypage est réalisé par la mise en culture de ce dernier sur différents milieux sélectifs. Les différents milieux sélectifs utilisés sont choisis suivant les auxotrophies présentes dans les souches parentales

utilisées pour la création du double mutant. On utilise un milieu minimal SD ne contenant pas l'acide aminé ou la base azoté pour lequel on veut tester l'auxotrophie. Ce test est fait en parallèle avec les souches sauvages BY4741 et BY4742 dont les génotypes sont connus, ce qui sert de contrôle. Les gélouses sont incubées à 30°C pendant 2 à 3 jours. Si la souche croît sur l'un des milieux utilisés cela signifie qu'elle possède l'allèle sauvage en question sinon c'est qu'elle est auxotrophe pour ce facteur de croissance.

2.7.6 Vérification des délétions par PCR

Pour vérifier que le double mutant *arf3Δ gea2Δ* possède effectivement la délétion des deux gènes, des réactions de PCR sont réalisées sur ce dernier afin d'amplifier le marqueur *Kan^R* en ce qui concerne *arf3Δ* et la marqueur *HIS3* pour *gea2Δ*. Les réactions de PCR se font comme décrites précédemment (voir section 2.4.1) avec les différentes amorces répertoriées dans le Tableau 5.

Tableau 5 Oligonucléotides utilisés pour la vérification du double mutant

Oligonucléotides	Séquences	Tm°	Position relative
<i>ARF3 BamHI 5'</i>	CGGGATCCGGTCTC ATAACCCCTTCTTG	62°C	Amorce située à 500pb en amont de l'ATG du gène <i>ARF3</i> .
<i>KAN 3'</i>	CTGCAGCGAGGAG CCCTAAT	64°C	Amorce située dans la cassette <i>kan^r</i> servant à confirmer les délétions

2.8 Mutagenèse

2.8.1 Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a pour objet de créer des mutations ponctuelles dans le gène *ARF3*.

Une première mutagenèse dirigée a été réalisée sur le nucléotide se trouvant 10 paires de base avant le codon de départ pour la protéine Arf3p dans le but de créer un site pour l'enzyme de restriction *HindIII*. La création de ce site permet d'extraire le gène *ARF3* dépourvu de son promoteur et de le cloner dans un autre plasmide. De cette façon, la mutagenèse aléatoire

d'*ARF3* va pouvoir être faite en s'affranchissant de l'effet que pourrait avoir d'éventuelles mutations dans le promoteur sur l'expression de la protéine.

Une seconde mutagenèse dirigée a été effectuée sur la protéine Arf3p ayant pour objet de muter la séquence d'ADN du gène *ARF3* à des sites précis susceptibles d'aider à identifier les domaines fonctionnels de cette protéine. Le gène *ARF3* et son promoteur se trouvent clonés dans le plasmide pBluescript puisque la mutagenèse dirigée par PCR nécessite un plasmide ayant une taille relativement petite. La mutagenèse dirigée est faite suivant le protocole QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit vendu chez Stratagene®.

2.8.1.1 Oligonucléotides

La mutagenèse nécessite des oligonucléotides choisis judicieusement (Tableau 6). La paire d'oligonucléotides doit comporter bien sûr la mutation désirée mais avoir la même température d'hybridation. Les oligonucléotides utilisés font en général entre 25 et 45 nucléotides avec la mutation désirée au milieu. Il est très important qu'il y ait de 10 à 15 nucléotides de part et d'autre de la mutation qui s'apparient correctement. De plus, le pourcentage en GC de ces oligonucléotides doit être aux alentours de 40% et se terminer par un G ou un C.

2.8.1.2 Réaction de mutagenèse dirigée

Les mutations sur *ARF3* sont réalisées comme décrit dans le protocole de QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit vendu chez Stratagene®. Le mélange réactionnel est composé de 2 µl de chacun des oligonucléotides (62,5 ng/µl), 50 ng de plasmide pBS-*ARF3*, 5 µl de tampon pour la polymérase à 10X, 2 µl de dNTP à 10 mM et de l'eau distillée pour compléter le volume final à 50 µl. Par la suite, 1 µl de l'ADN polymérase *PfuTurbo* (2,5 U/µl) est ajouté. Le mélange est ensuite placé dans un thermocycleur (Techgene) programmé pour effectuer tout d'abord une dénaturation pendant 30 secondes à 95°C puis 12 cycles selon les paramètres suivants : (1) étape de dénaturation : 30 sec à 95°C, (2) étape d'hybridation : 1 min à 55°C, (3) étape d'élongation : 2 min/kb de plasmide à 68°C, dans le cas présent ce sera pendant 8 minutes. La réaction est gardée à 37°C jusqu'à l'ajout de 1 µl de *DpnI* (10 U/µl) suivie d'une incubation pendant une heure à 37°C. Finalement, 1 µl d'ADN traité avec l'enzyme *DpnI* est utilisé pour la transformation par choc thermique avec XL1-Blue. L'ADN plasmidique des colonies obtenues est ensuite isolé par la méthode utilisant le CTAB (voir section 2.6.1.1). Sur

L'ensemble des plasmides obtenus, deux sont sélectionnés, purifiés par chromatographie et séquencés afin de vérifier si la mutation désirée est belle et bien présente.

2.8.1.3 Clonage dans un plasmide de levure

Le plasmide pBS-*ARF3* muté est digéré avec les enzymes de restriction *SacI* et *KpnI*. Le fragment contenant *ARF3* muté est isolé sur gel suivant le protocole de QIAquick® Gel Extraction Kit de QIAGEN. Le fragment obtenu est ensuite réintroduit dans un plasmide de levure centromérique (pRS316) ou multicopie (pRS426), digéré par les deux mêmes enzymes. Une fois le plasmide obtenu, celui-ci est séquencé pour vérifier la présence de la mutation.

2.8.2 Mutagenèse aléatoire

La mutagenèse aléatoire a pour objet de créer des mutations aléatoirement dans l'ADN utilisé. De cette façon là, une banque de plasmides est ainsi créée comportant chacun le gène *ARF3* avec une mutation différente. La mutagenèse aléatoire a été réalisée sur le gène *ARF3* cloné dans le plasmide multicopie pRS426 dans le but de créer des mutations d'*ARF3* inactivant son expression mais aussi pour mettre en place le protocole de mutagenèse aléatoire. Pour cette mutagenèse, il est important de déterminer la quantité d'ADN à mettre au départ dans la réaction de PCR afin de s'assurer que le taux de mutagenèse soit raisonnable, à savoir pas plus de deux mutations dans le gène d'intérêt. Puis, la mutagenèse aléatoire, a été réalisée sur le plasmide pRS316-*ARF3* afin de produire des clones d'*ARF3* qui, exprimés en une seule copie, permettront de corriger le phénotype de la souche *pfy1Δ*.

2.8.2.1 Oligonucléotides

La mutagenèse aléatoire fait intervenir des oligonucléotides encadrant l'ADN à muter puisqu'elle fait appel à une réaction de PCR de base (Tableau 7). Les oligonucléotides sont préparés afin de faire ensuite la réaction de « Gap Repair », qui est en quelque sorte de la recombinaison homologue (voir section 2.8.3). Pour ce faire, ceux-ci possèdent 70 nucléotides dont 20 sont identiques à l'insert *ARF3*, et 50 identiques à la séquence des plasmides pRS316 ou pRS426. L'homologie de séquence doit se situer au-delà des sites de restriction *EcoRI* et *BamHI* puisque ceux-ci sont utilisés pour créer un plasmide linéaire en vue du « Gap Repair » avec le gène *ARF3* muté.

2.8.2.2 Réaction

La réaction de mutagenèse aléatoire sert à créer des mutations aléatoirement dans une séquence d'ADN. Le protocole de la réaction est effectué selon le GeneMorph® Random Mutagenesis Kit vendu chez Stratagene®. Le mélange réactionnel est composé de 5 µl de tampon pour la Mutazyme® 10X, 1 µl de dNTP à 40 mM (200 µM finale pour chaque), 0,5 µl de mélange des deux oligonucléotides (250 ng/µl de chaque oligonucléotide), 1 µl d'ADN polymérase Mutazyme® (2,5 U/µl), 10 ng de plasmide et de l'eau distillée pour compléter le volume final à 50 µl. La quantité de plasmide et donc d'ADN à fournir à la réaction est dépendante de nombre de mutations par kilobase que l'on désire. Dans notre cas, le nombre de mutations voulues était de une à deux du maximum dans le gène *ARF3* faisant 1000 kb. Pour ce faire, 10 ng d'ADN ont été mis dans la réaction de PCR puisque la compagnie indiquait qu'avec cette quantité là d'ADN on pouvait s'attendre à avoir un taux approprié de mutations. Le mélange est ensuite placé dans un thermocycleur (Techgene) programmé pour effectuer tout d'abord une dénaturation de 1 min à 95°C puis 40 cycles selon les paramètres suivant : (1) étape de dénaturation : 1 min 30 sec à 95°C, (2) étape d'hybridation : 1 min 30 sec à 60°C, (3) étape d'élongation : 1 min 30 sec à 72°C, (4) étape finale : 10 min à 72°C. Par la suite, le produit résultant de la PCR est purifié (voir section 2.4.6). Le choix de la température d'hybridation n'a pas été fonction de la température de fusion des amorces mais à plutôt été choisi suivant une température d'hybridation standard utilisé pour les réactions de PCR puisque le grand nombre de paires de bases donnait une température de fusion très élevée inconcevable pour une réaction de PCR.

2.8.3 « Gap Repair »

Le « Gap Repair » sert à faire de la recombinaison homologue entre un plasmide et un produit PCR directement dans les levures. Pour ce faire, les plasmides pRS426-*ARF3* et pRS316-*ARF3* ont été digérés préalablement par les enzymes de restriction *EcoRI* et *BamHI* (New England Biolabs), pour éliminer le gène *ARF3* et son promoteur et les rendre ainsi linéaires. Pour la réaction de « Gap Repair » proprement dite, les transformations des levures se font comme habituellement mise à part que le mélange réactionnel est composé du plasmide digéré et du produit PCR du gène *ARF3* obtenu après la mutagenèse aléatoire. Différentes quantités de plasmide digéré et de produit de PCR ont été transformés afin d'obtenir le meilleur taux de transformants possible. De plus, des contrôles ont été réalisés afin de s'assurer de l'efficacité de

la transformation et aussi vérifier que seul le plasmide digéré ne permet pas d'obtenir de transformants. Les quantités utilisées sont les suivantes :

- 200 η g de plasmide digéré + 250 η g de produit de PCR
- 500 η g de plasmide digéré + 250 η g de produit de PCR
- 200 η g de plasmide digéré (contrôle négatif)
- 500 η g de plasmide digéré (contrôle négatif)
- 200 η g de plasmide non digéré (contrôle positif de transformation)

Les clones obtenus sont alors mis en culture dans du milieu sélectif dans le but de faire ensuite une extraction d'ADN génomique et plasmidique de levure (voir section 2.6.2). Cette extraction est suivie d'une transformation par électroporation (voir section 2.5.1.1.2) dans le but d'isoler le plasmide contenant le gène *ARF3*. L'ADN plasmidique des colonies est ensuite isolé sur colonne et envoyé au séquençage pour déterminer le site de mutation.

Tableau 6 Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée

Oligonucléotides	Séquences	T° d'hybridation	Position relative
<i>ARF3</i> 5' HindIII	GGAAAAGACAAGCT T ATTGTAGA GATGGGC	55°C	En aval de ATG
<i>ARF3</i> 3' HindIII	GCCCATCTCTACA A TAAGCTTGTC TTTTC	55°C	En aval de ATG
<i>ARF3</i> 5' N3A	GCTAATTGTAGAGATGGGC GCTT CAATTTCGAAGGTTCTG	55°C	Région près du codon 3
<i>ARF3</i> 3' N3A	CAGAACCTTCGAAATTGAA GCGC CCATCTCTACAATTAGC	55°C	Région près du codon 3
<i>ARF3</i> 5' Q71A	GGGATGTAGGAGGA GC ACAAAG ATTGAGACC	55°C	Région près du codon 71
<i>ARF3</i> 3' Q71A	GGTCTCAATCTTTGT GCT CCTCCT ACATCCC	55°C	Région près du codon 71
<i>ARF3</i> 5' Q72A	GATGTAGGAGGACAA GCA AAGAT TGAGACCTC	55°C	Région près du codon 72
<i>ARF3</i> 3' Q72A	GAGGTCTCAATCTT GCT TGTCCTC CTACATC	55°C	Région près du codon 72
<i>ARF3</i> 5' L162A	CGGTAGTAACGCC GC ATCCGGAC AGGGTC	55°C	Région près du codon 162
<i>ARF3</i> 3' L162A	GACCCTGTCCGGAT GCGG CGTTA CTACCG	55°C	Région près du codon 162
<i>ARF3</i> 5' L163A	CGGTAGTAACGCCTTA GCC GGAC AGGGTC	55°C	Région près du codon 163
<i>ARF3</i> 3' L163A	GACCCTGTCCGG CTA AGGCGTTA CTACCG	55°C	Région près du codon 163

Nota : Les bases en rouges correspondent aux bases modifiées lors de la mutagenèse dirigée.

Tableau 7 Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse aléatoire et le « Gap Repair »

Oligonucléotides	Séquences	T° d'hybridation	Position relative
<i>ARF3</i> 5' pRS426	AGGGAACAAAAGCTGGA GCTCCACCGCGGTGGCGG CCGCTCTAGAACTAGT GG ATCCGGTCTCATAACCC	60°C	L'amorce est composée de la séquence de pRS426 en amont du site <i>Bam</i> HI (en rouge) et de la séquence de la région 5' d' <i>ARF3</i> en aval de ce site
<i>ARF3</i> 5' pRS316	CTATAGGGCGAATTGGAG CTCCACCGCGGTGGCGGC CGCTCTAGAACTAGT GGA TCCGGTCTCATAACCC	60°C	L'amorce est composée de la séquence de pRS316 en amont du site <i>Bam</i> HI (en rouge) et de la séquence de la région 5' d' <i>ARF3</i> en aval de ce site
<i>ARF3</i> 3' pRS426 et pRS316	GGGTACCGGGCCCCCCC TCGAGGTCGACGGTATCG ATAAGCTTGATATC GAAT TCGGCGTATGCAGATT	60°C	L'amorce est composée de la séquence de pRS426 ou de pRS316 (puisque'il s'agit de la même) en amont du site <i>Eco</i> RI (en rouge) et de la séquence de la région 3' d' <i>ARF3</i> en aval de ce site

2.9 Colorations et observations microscopiques

2.9.1 Observation en contraste interférentiel (Nomarski)

L'observation en contraste interférentiel se fait sur des cellules vivantes. Elle permet de visualiser la morphologie cellulaire des souches à l'étude. Des cellules en phase exponentielle de croissance sont montées sur une lame et observées directement. L'observation se fait à 1000X à l'aide d'un microscope Leitz possédant l'équipement pour ce type d'observation.

2.9.2 Coloration des filaments d'actine

La coloration du cytosquelette d'actine fait intervenir la phalloïdine, une toxine fongique provenant d'*Amanita phalloides*, qui a la propriété de se lier spécifiquement à l'actine filamenteuse. Pour permettre sa visualisation, cette dernière est couplée à un fluorochrome, l'AlexaFluor488. Le protocole utilisé pour la coloration des filaments d'actine est celui de (Zakrzewska *et al.*, 2003) légèrement modifié. Les cellules sont incubées à 30°C ou à 37°C jusqu'à l'obtention d'une culture en phase exponentielle de croissance. Elles sont ensuite fixées pendant 30 minutes à température ambiante par l'ajout de formaldéhyde à une concentration finale de 3,7%. Par la suite, les cellules sont lavées une fois avec du PBS 1X pH 7,4 (NaCl à 0,8%, KCl à 0,02%, Na₂HPO₄ à 0,092%, KH₂PO₄ à 0,02%) puis reprises dans 1 ml de cette même solution. À ce volume, il est adjoint 0,3 µM de phalloïdine couplée à l'AlexaFluor488 (Molecular Probes, Eugene, OR). La coloration se fait à température ambiante et à l'obscurité pendant une heure. Ensuite 5 µl sont déposés sur une lame pour une observation à 1000X au microscope Leitz à fluorescence équipé du filtre appropriée. La longueur d'onde d'excitation de l'AlexaFluor488 étant de 495 nm et celle d'émission de 519 nm, le filtre utilisé est le I3 permettant une excitation comprise entre 450 nm et 490 nm et une émission à 515 nm.

2.9.3 Coloration des cicatrices de bourgeonnement

Les cicatrices de bourgeonnement sont rendues visibles par la coloration des dépôts de chitine grâce au Calcofluor White. La coloration de la chitine au Calcofluor White est faite selon le protocole de (Pringle, 1991). A partir d'une culture de nuit, on prélève 900 µl de cellules auxquelles on ajoute de la formaldéhyde à 3,7%. Ceci est suivi d'une incubation à température ambiante pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite centrifugées et reprises dans 1 ml de la

solution A (K_2HPO_4 à 6,25 mM, KH_2PO_4 à 13,75 mM, $MgCl_2$ 0,5 à mM) contenant de la formaldéhyde à 37%. Après une incubation pendant une heure à température ambiante, les cellules sont lavées trois fois avec la solution A puis reprises dans 1 ml de cette même solution. La coloration est effectuée en additionnant $1/10$ du volume en Calcofluor White à 10 mg/ml (SIGMA) suivie d'une incubation pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS 1X pH 7,4 puis reprises dans 50 à 100 μ l de milieu de montage (glycérol à 90%, PBS 1X à 10%). De ce volume, quelques microlitres sont déposés sur une lame pour l'observation microscopique à 1000X avec le microscope Leitz. La longueur d'onde d'excitation du Calcofluor White étant de 395 η m et celle d'émission de 440 η m, le filtre D permettant une excitation à une longueur d'onde comprise entre 355 η m et 425 η m et une émission à 470 η m a été utilisé.

2.9.4 Observation de la GFP « Green Fluorescent Protein »

L'observation de la localisation cellulaire à l'aide de la GFP se fait à 1000X sur une culture en phase exponentielle de croissance à l'aide d'un microscope à fluorescence Leitz. La GFP utilisée possède deux mutations, S65G où une sérine est remplacée par une glycine à la position 65 et S72A où un sérine est remplacée par une adénine à la position 72 (Cormack *et al.*, 1997). Ces mutations sont nécessaires pour décaler de la GFP chez la levure. Elles permettent de décaler le pic d'excitation à 490 η m et d'augmenter la fluorescence émise. La longueur d'onde d'excitation de la GFP-S65G-S72A se situe à 490 η m et celle d'émission à 509 η m. Le filtre I3 a été utilisé.

2.10 Test de croissance

Les cellules présentant un défaut dans la paroi sont sensibles à la caféine. La caféine inhibe la phosphodiesterase, ce qui provoque l'augmentation d'AMPc dans la cellule. Cette accumulation d'AMPc inhibe la voie PKC, impliquée dans le maintien de l'intégrité de la paroi cellulaire, ce qui donne lieu à une sensibilité à la caféine. La sensibilité des cellules à cet agent est testée à 30°C sur un milieu adéquat auquel est ajouté de la caféine à 1,25 mg/ml. La croissance des cellules est aussi testée par incubation à 30°C et 37°C. Tout d'abord un décompte cellulaire doit être fait sur une culture en phase exponentielle de croissance afin d'avoir un premier dépôt de cellules à 1×10^5 suivi de trois autres dépôts provenant d'une

série de dilution en cascade au 1:10 (1:10, 1:100, 1:1000). Les boîtes sont incubées à 30°C et 37°C pendant 48 heures.

Chapitre 3 **RÉSULTATS**

3.1 La surexpression d'*ARF3* et de *GEA2*

3.1.1 La surexpression d'*ARF3* corrige le phénotype associé à la délétion de profiline (*pfy1Δ*)

La délétion du gène codant pour la profiline (*PFY1*) n'est pas létale pour la cellule mais entraîne d'importantes modifications phénotypiques. Les cellules sont grosses et rondes et leur cytosquelette d'actine est entièrement dépolarisé. Ces cellules ne présentent plus de câbles d'actine visibles et les granules corticaux sont répartis aléatoirement dans la cellule mère et dans le bourgeon (Figure 15 et Figure 16B). Un défaut dans la maturation et la sécrétion du facteur α , dans le bourgeonnement qui devient aléatoire, ainsi qu'une sensibilité à la caféine sont aussi observés. De plus, ces cellules poussent très difficilement à la température permissive de 30°C et ne poussent pas du tout à 37°C et sur un milieu contenant de la caféine (Haarer & Brown, 1990; Marcoux *et al.*, 1998; Zakrzewska *et al.*, 2003). Un criblage génétique fait par l'entremise de la souche *pfy1Δ*, a permis d'identifier les gènes *GEA1* et *GEA2* comme suppresseurs multicopies de la délétion de profiline. En effet, en plus de restaurer la croissance à 37°C et sur un milieu contenant de la caféine, la surexpression de ces deux gènes permet la repolarisation des granules corticaux dans le bourgeon ainsi que l'apparition de câbles d'actine visibles pour la première fois en l'absence de profiline (Zakrzewska *et al.*, 2003). Les protéines de type Gea sont des GEF pour les GTPase de type Arf. Afin de déterminer si la correction du cytosquelette d'actine par *GEA1* et *GEA2* dans les cellules déficientes en profiline fait intervenir les protéines Arf, les protéines Arf1p, Arf2p et Arf3p ont été surexprimés dans la souche *pfy1Δ*. Seule la surexpression d'*ARF3* a permis de diminuer la taille des cellules ainsi que de repolariser les granules corticaux mais sans permettre la formation de câbles d'actine visibles, ni la restauration de la croissance à 37°C et sur un milieu avec de la caféine (Figure 15) (Zakrzewska *et al.*, 2003).

Ces résultats de la surexpression d'*ARF3* furent obtenus suite à sa surexpression à l'aide du plasmide multicopie, YEp24. Tous les travaux réalisés dans la présente étude utilisent *ARF3* cloné dans le plasmide centromérique pRS316 (pRMP200) ainsi que dans le plasmide multicopie pRS426 (pRMP100), différent du plasmide YEp24. Donc, par souci de rigueur, il semblait important d'observer l'effet de la surexpression d'*ARF3* cloné dans le plasmide pRS426 sur le cytosquelette d'actine de la souche *pfy1Δ*. De manière inattendue, la

surexpression d'*ARF3* à l'aide de pRMP100 dans cette souche n'a pas donné les mêmes résultats que ceux obtenus suite au clonage dans YEp24. La surexpression d'*ARF3* à l'aide du plasmide pRMP100 permet maintenant la formation de câbles d'actine visibles en plus de repolariser les granules corticaux dans le bourgeon (Figure 16C). La croissance à 30°C, à 37°C et sur un milieu contenant de la caféine est aussi restaurée (Figure 17). Le phénotype observé maintenant est très proche de celui observé dans des cellules de la souche sauvage BY4741 (Figure 17). Afin de confirmer les résultats qui avaient été obtenus suite à la surexpression d'*ARF3* par le plasmide YEp24 dans la souche *pfj1Δ* (Zakrzewska *et al.*, 2003), le gène *ARF3* cloné dans le plasmide YEp24 a de nouveau été surexprimé dans cette même souche. Les résultats observés s'avèrent être les mêmes que dans la précédente étude à savoir une diminution de la taille des cellules ainsi qu'une repolarisation partielle des granules corticaux dans le bourgeon sans toutefois l'apparition de câbles visibles d'actine (Figure 15 et Figure 18). L'expression d'*ARF3* cloné dans le plasmide centromérique pRS316 (pRMP200), ne donnant qu'une seule copie du gène, a aussi été faite. Toutefois, l'expression du plasmide pRMP200 dans *pfj1Δ* ne permet pas de corriger son phénotype (Figure 16D et Figure 17). De cette façon, *ARF3* a pu être identifié comme un nouveau suppresseur multicopie de la souche *pfj1Δ* entraînant la restauration des câbles d'actine.

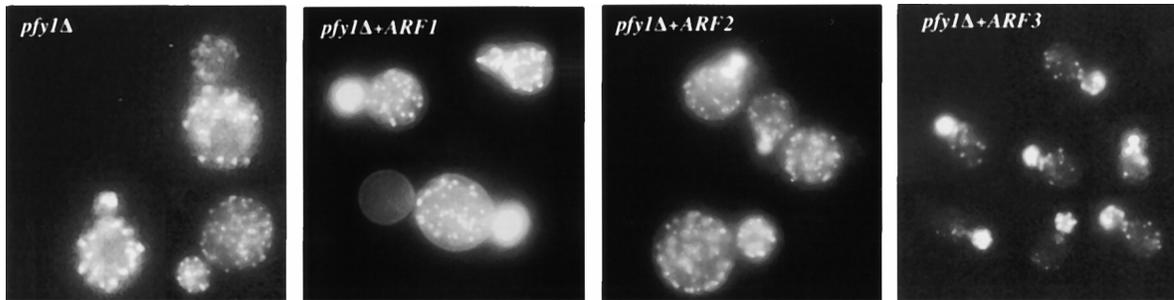


Figure 15 Surexpression d'*ARF1*, d'*ARF2* et d'*ARF3* clonés dans le plasmide YEp24 dans la souche *pfy1Δ*

Les cellules provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance sont fixées avec du formaldéhyde puis colorées avec la phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor488 pour la visualisation de l'actine filamenteuse. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec le filtre approprié. La surexpression d'*ARF1* et d'*ARF2*, clonés dans le plasmide YEp24, ne corrige pas le phénotype de la souche *pfy1Δ*. Cependant, la surexpression d'*ARF3*, dans ce même plasmide, diminue la taille des cellules et repolarise partiellement les granules corticaux dans le bourgeon des cellules déficientes en profiline sans faire réapparaitre de câbles d'actine visibles. Photo tirée de Zakrzewska *et al.* (2003).

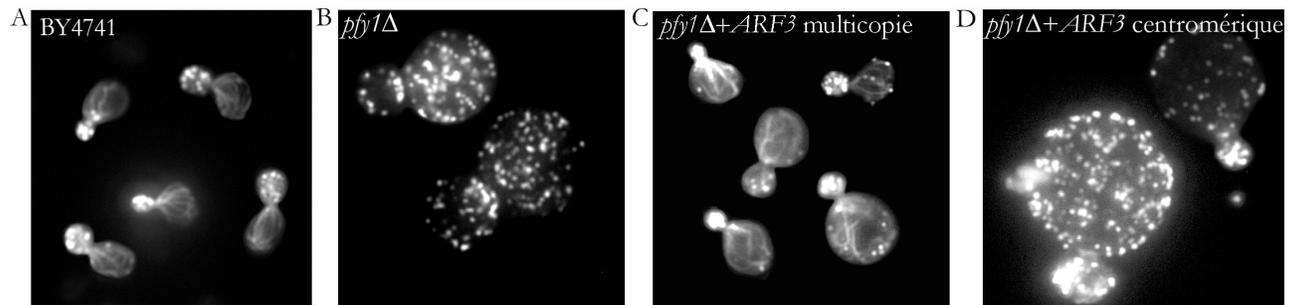


Figure 16 Cytosquelette d'actine de la souche *pfy1Δ* lors de l'expression d'*ARF3*

Les cellules provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance sont fixées avec du formaldéhyde puis colorées avec la phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor488 pour la visualisation de l'actine filamenteuse. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec le filtre approprié. A) Cellules de la souche sauvage avec un cytosquelette d'actine parfaitement organisé. B) Cellules de la souche *pfy1Δ* présentant un cytosquelette d'actine désorganisé. C) La surexpression d'*ARF3*, par le plasmide pRMP100 (plasmide multicopie), diminue la taille des cellules, repolarise les granules corticaux dans le bourgeon et mène à l'apparition de câbles d'actine visibles. D) L'expression d'*ARF3*, par le plasmide pRMP200 (plasmide centromérique), ne permet pas de repolariser les granules corticaux dans le bourgeon ni la formation de câbles d'actine visibles dans la souche *pfy1Δ*.

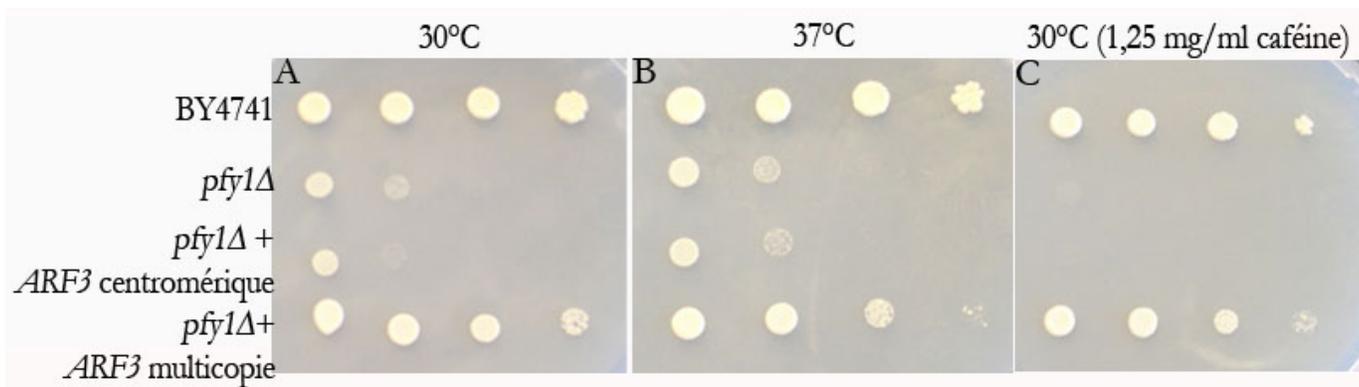


Figure 17 Croissance de la souche *pfy1Δ* lors l'expression d'*ARF3*

Un total de 10^5 cellules et une série de trois autres dilutions de 1:10 chacune ont été déposées sur un milieu minimal sans uracile en présence ou en l'absence de 1,25 mg/ml de caféine. Les cellules ont été incubées pendant 48 heures à 30°C et 37°C. La croissance de la souche *pfy1Δ* seule, exprimant ou surexprimant *ARF3*, est comparée avec celle de la souche sauvage BY4741. A) À 30°C, la croissance de la souche *pfy1Δ* pousse mal. L'expression d'*ARF3* par le plasmide pRMP200 ne permet pas d'améliorer la croissance seule la surexpression d'*ARF3* par le plasmide pRMP100 le permet. B) À 37°C, la surexpression d'*ARF3* par pRMP100 restaure parfaitement la croissance de la souche *pfy1Δ* par rapport à la souche sauvage BY4741 mais pas son expression par pRMP200. C) La souche déficiente en profiline est sensible à la caféine. Seule la surexpression d'*ARF3* par pRMP100 corrige cette sensibilité et restaure la croissance et non son expression par pRMP100.

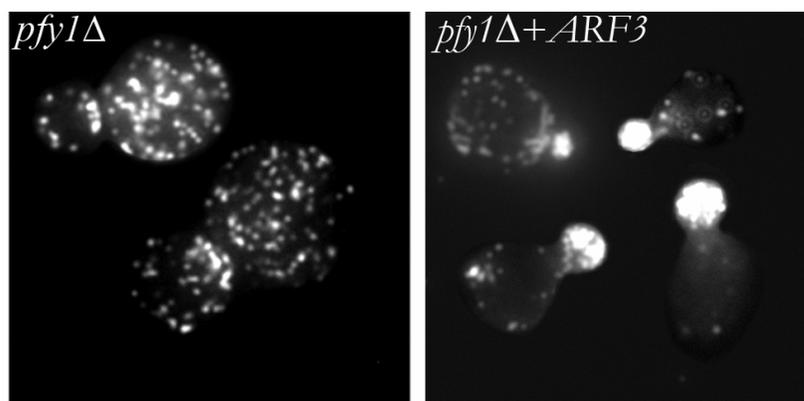


Figure 18 Nouvelle surexpression d'*ARF3* cloné dans le plasmide YEp24 dans la souche *pfy1Δ*

Les cellules provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance sont fixées avec du formaldéhyde puis colorées avec la phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor488 pour la visualisation de l'actine filamenteuse. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec le filtre approprié. La surexpression d'*ARF3* cloné dans le plasmide YEp24 dans la souche *pfy1Δ* permet une correction partielle du cytosquelette d'actine. La taille des cellules diminue, les granules corticaux sont partiellement repolarisés dans le bourgeon sans faire réapparaître les câbles d'actine. Ces résultats confirment les résultats précédemment obtenus dans cette même avec *ARF3* cloné dans le plasmide YEp24 par Zakrzewska *et al.* (2003).

3.1.2 L'importance des formines Bni1p et Bnr1p pour la formation des câbles par la surexpression d'*ARF3* et de *GEA2*

La formation des câbles d'actine chez *S. cerevisiae* fait intervenir deux systèmes, un avec la profiline et un autre avec les formines Bni1p et Bnr1p. La correction du cytosquelette d'actine par les protéines Arf3p et Gea2p est indépendante de la profiline, il restait donc à savoir si ces dernières ont besoin de l'autre système pour la formation des câbles d'actine. Pour ce faire, les deux gènes *ARF3* et *GEA2* ont été surexprimés dans la souche *bni1-FH2#1 bnr1Δ* (PY3517). Cette souche possède une mutation thermosensible sur le gène *BNI1* et une délétion complète du gène *BNR1*. Les cellules de cette souche ont un cytosquelette d'actine normal à 25°C alors qu'à 30°C, les câbles d'actine sont absents et les granules corticaux sont répartis dans la cellule mère et le bourgeon (Figure 19A). À 37°C, il n'y a pas de croissance possible (Evangelista *et al.*, 2003; Zakrzewska *et al.*, 2003). La surexpression de *GEA2* dans la souche *bni1#FH2-1 bnr1Δ*, à 30°C et 37°C, ne permet pas de restaurer la formation des câbles, ni la croissance (Figure 19C). Donc, *GEA2* a besoin de formines fonctionnelles pour former des câbles (Zakrzewska *et al.*, 2003). Afin de déterminer si la même conclusion pouvait s'appliquer à *ARF3*, ce gène a été surexprimé par le plasmide pRMP100 dans cette même souche mais aucune correction n'a été observée (Figure 19B). Donc, tout comme *GEA2*, *ARF3* requiert la présence des formines fonctionnelles pour la formation des câbles d'actine.

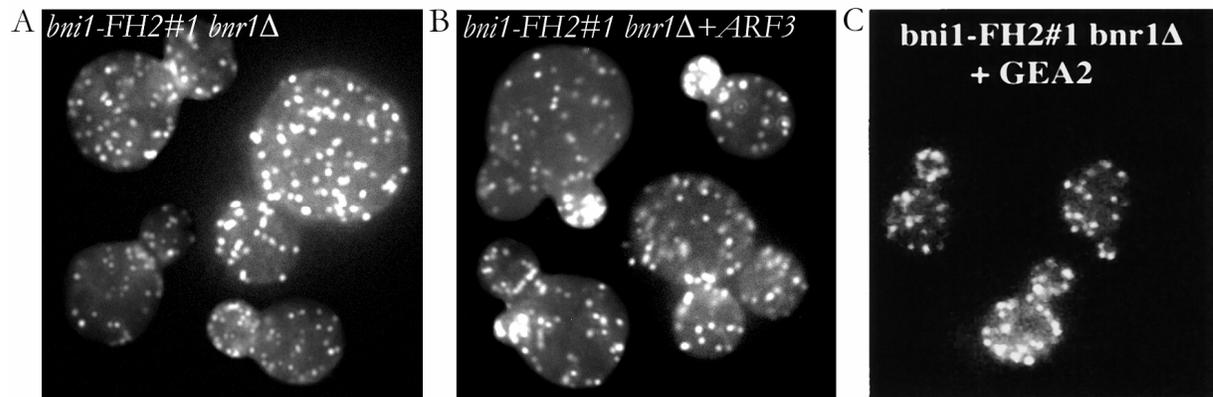


Figure 19 Surexpression d'*ARF3* et de *GEA2* dans la souche *bni1#FH2-1 bnr1Δ*

Les cellules provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance sont fixées avec du formaldéhyde puis mis en présence de phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor488 pour la visualisation de l'actine filamenteuse. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec le filtre approprié. A) La souche *bni1-FH2#1 bnr1Δ* ne possède pas de câbles d'actine visibles et les granules corticaux sont répartis aléatoirement dans la cellule mère et dans le bourgeon. B) La surexpression d'*ARF3* par le plasmide pRMP100 et de *GEA2* par le plasmide pGM53 dans cette souche, ne permet pas de corriger son cytosquelette d'actine. C) Les résultats pour *GEA2* sont tirée de Zakrzewska *et al.* 2003.

3.1.3 La surexpression d'*ARF3* et de *GEA2* affecte le phénotype de plusieurs souches mutantes

Les gènes *ARF3* et *GEA2* semblent jouer un rôle important dans l'organisation du cytosquelette d'actine puisque leur surexpression dans la souche *pfj1Δ* permet de rétablir l'organisation du cytosquelette d'actine. De plus, il est possible que la correction du phénotype de la souche *pfj1Δ* par la surexpression de *GEA2* se fasse par l'intermédiaire du gène *ARF3* puisque *GEA2* est un GEF pour les Arf. Mais l'implication de plusieurs autres protéines dans l'organisation du cytosquelette en lien avec *ARF3* et *GEA2* n'est pas à exclure. Pour mettre à l'épreuve cette possibilité, *ARF3* et *GEA2* ont été surexprimés par l'intermédiaire de leur plasmide respectif, pRMP100 et pGM53, dans différentes souches mutantes.

Les souches utilisées portent des délétions dans des gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette (*bem2Δ*, *rho4Δ*, *rom2Δ*, *spa2Δ*), dans l'endocytose (*ede1Δ*, *end3Δ*, *las17Δ*, *myo3Δ*, *myo5Δ*, *sac6Δ*, *sla1Δ*, *sla2Δ*, *vrp1Δ*), dans le bourgeonnement (*bud2Δ*, *bud3Δ*, *bud4Δ*, *bud6Δ*, *bud8Δ*), dans la division cellulaire (*cdc10Δ*, *cdc12-6*) et dans bien d'autres fonctions biologiques en rapport direct ou indirectement avec la régulation du cytosquelette de la cellule (*chs1Δ*,

chs3Δ, *chs4Δ*, *chs5Δ*, *chs6Δ*, *chs7Δ*, *bni1Δ*, *mid2Δ*, *tpm1Δ*, *srv1Δ*, *drs2Δ*, Y1392). Toutes les souches étudiées ont été observées seules à 30°C et à 37°C puis en présence d'*ARF3* et de *GEA2* à ces mêmes températures. La surexpression d'*ARF3* et de *GEA2* a engendré des modifications morphologiques ainsi que dans l'organisation du cytosquelette d'actine dans quatre des souches à l'étude : *drs2Δ*, *spa2Δ*, *las17Δ*, et *vrp1Δ*.

3.1.3.1 Effet de la surexpression d'*ARF3* et de *GEA2* sur le phénotype de la souche *drs2Δ*

Le phénotype de la souche *drs2Δ* ne présente pas de différences majeures par rapport à celui d'une cellule sauvage. À savoir, à 30°C comme à 37°C, les cellules sont de petite taille, de forme ellipsoïdale et leur cytosquelette d'actine est organisé avec les granules corticaux dans le bourgeon et les câbles d'actine orientés vers ces derniers (Figure 20A). Toutefois, la surexpression d'*ARF3* et de *GEA2* modifie le phénotype de cette souche dans des proportions différentes aux deux mêmes températures que précédemment. À 30°C, la surexpression d'*ARF3* provoque un léger allongement des cellules *drs2Δ*, mais l'organisation du cytosquelette d'actine reste inchangée. À 37°C, la surexpression d'*ARF3* dans les cellules *drs2Δ* entraîne l'allongement des cellules allant jusqu'à la formation de bâtonnets. De plus, une désorganisation du cytosquelette d'actine semble se produire (Figure 20B). À 30°C, suite à la surexpression de *GEA2* dans cette même souche, les cellules ont tendance à s'allonger et présente un cytosquelette d'actine organisé. À 37°C, la surexpression de *GEA2* dans la souche *drs2Δ* semble néfaste pour la cellule puisque aucune croissance n'est observée (Figure 20C).

3.1.3.2 Effet de la surexpression d'*ARF3* et de *GEA2* sur le phénotype de la souche *spa2Δ*

Le phénotype des cellules de la souche *spa2Δ* est très semblable à celui observé dans les cellules de la souche sauvage mise à part qu'elles sont légèrement plus rondes (Figure 21A). L'observation des cellules de la souche *spa2Δ* suite à la surexpression d'*ARF3* ne révèle pas de modifications dans la taille des cellules mais plutôt une légère modification dans la polarisation du cytosquelette d'actine (Figure 21B). La majorité des granules corticaux sont retrouvés dans le bourgeon mis à part quelques uns qui sont présents à la fois dans la cellule mère et dans le bourgeon. Pour ce qui est des câbles d'actine leur orientation ne semble pas être perturbée

(Figure 21B). La surexpression de *GEA2* dans cette souche engendre un phénotype plus sévère que celui des cellules de la souche *spa2Δ* ainsi que suite à la surexpression d'*ARF3*. Les cellules sont un peu plus grosses, s'arrondissent et leur cytosquelette d'actine se désorganise, à 30°C et à 37°C. Les granules corticaux sont peu nombreux et sont repartis dans la cellule mère et dans le bourgeon. Les câbles d'actine sont présents en grand nombre avec des orientations aléatoires (Figure 21C).

3.1.3.3 Formation et repolarisation des granules corticaux dans la souche *las17Δ* par la surexpression d'*ARF3*

Les cellules de la souche *las17Δ* présentent un phénotype sévère mais poussent tout de même à 30°C alors qu'aucune croissance n'est observée à 37°C. Ces cellules sont de taille supérieure à celle de la souche sauvage et présentent des câbles orientés généralement en direction du bourgeon sauf quelques-uns qui s'entremêlent. Les granules corticaux sont peu nombreux et sont retrouvés à la fois dans le bourgeon et dans la cellule mère (Figure 22A). Suite à la surexpression d'*ARF3* à 30°C, la quantité de granules corticaux est augmentée dans 50% des cellules et ils sont de plus tous localisés dans le bourgeon. La taille des cellules présentant une correction est diminuée sans toutefois atteindre celle des cellules de la souche sauvage. Les câbles d'actine, quant à eux, sont toujours visibles et orientés en direction des granules corticaux (Figure 22B). Pour les 50% des cellules restantes, aucune modification phénotypique n'a pu être observée par rapport au phénotype des cellules *las17Δ*. À 37°C, les cellules surexprimants *ARF3* ne croissent pas et donc par conséquent aucune coloration n'a pu être réalisée. À 30°C, la surexpression de *GEA2* dans la souche *las17Δ* n'entraîne aucune correction phénotypique et de plus aucune croissance n'est observée à 37°C (Figure 22C).

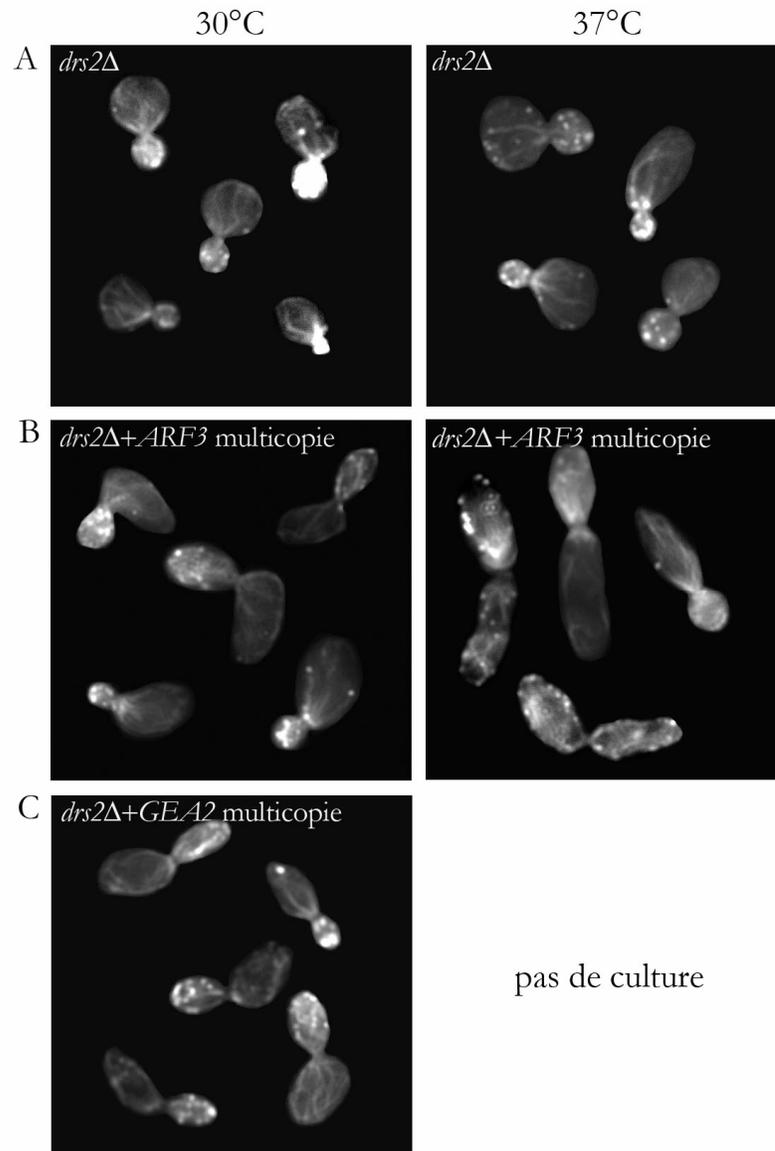


Figure 20 Cytosquelette d'actine et morphologie des cellules *drs2Δ* surexprimant ou non *ARF3* et *GEA2*

Les cellules provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance sont fixées avec du formaldéhyde puis mis en présence de phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor488 pour la visualisation de l'actine. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec le filtre approprié. A) Les cellules de la souche *drs2Δ* présente un phénotype comparable à celui des cellules sauvages. B) À 30°C, la surexpression d'*ARF3* par le plasmide pRMP100, entraîne un allongement des cellules, phénomène encore plus visible à 37°C où les cellules prennent la forme d'un bâtonnet. Seulement à cette dernière température, les granules corticaux sont dépolarisés et les câbles orientés aléatoirement. C) À 30°C, la surexpression de *GEA2* par le plasmide pGM53 dans cette même souche donne des cellules allongées mais avec un cytosquelette d'actine organisé. La surexpression de *GEA2* inhibe la croissance des cellules *drs2Δ* à 37°C.

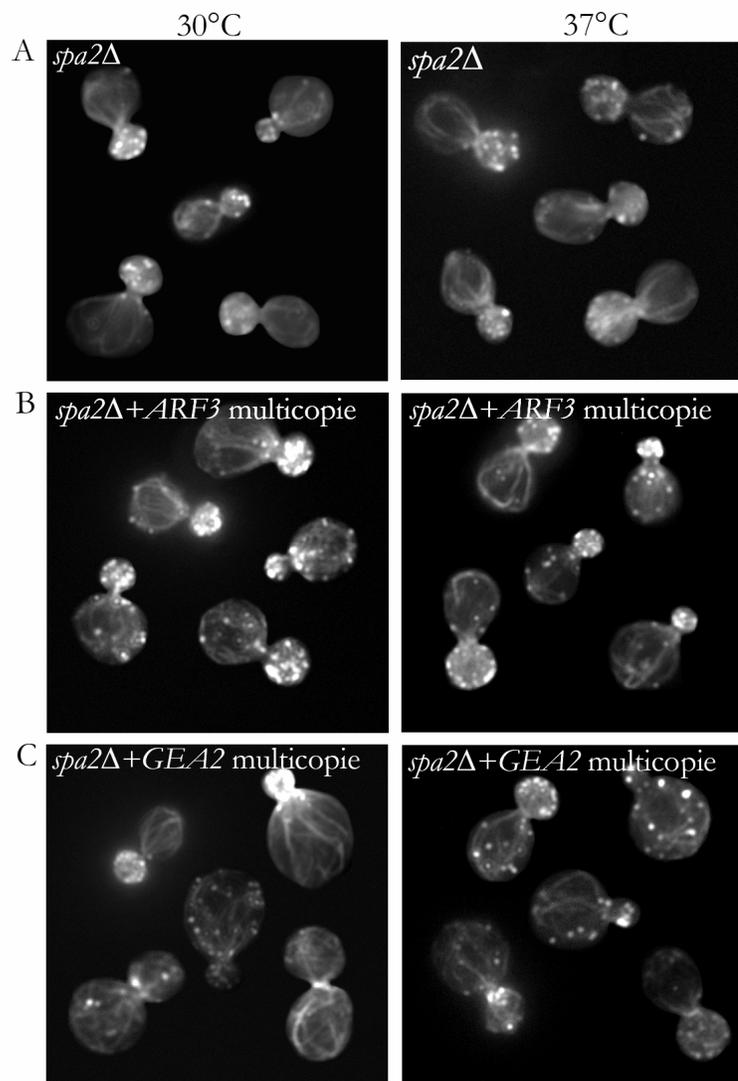


Figure 21 Cytosquelette d'actine et morphologie des cellules *spa2Δ* surexprimant ou non *ARF3* et *GEA2*

Les cellules provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance sont fixées avec du formaldéhyde puis mis en présence de phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor488 pour la visualisation de l'actine. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec le filtre approprié. B) À 30°C et à 37°C, lors de la surexpression d'*ARF3* par le plasmide pRMP100, la taille des cellules n'est pas modifiée par rapport à celle des cellules *spa2Δ* A), la majorité des granules corticaux sont retrouvés dans le bourgeon mise à part quelques uns qui sont présents à la fois dans la cellule mère et dans le bourgeon. L'orientation des câbles d'actine en direction du bourgeon n'est pas affectée. C) Les cellules *spa2Δ* surexprimant *GEA2* par le plasmide pGM53 sont plus grosses que les cellules *spa2Δ*. De plus, les granules corticaux se trouvent répartis dans la cellule mère et dans le bourgeon et dans certaines cellules ils semblent même absents. Quand aux câbles d'actine, leur orientation est aléatoire dans les cellules où les granules corticaux sont répartis aléatoirement mais vers le bourgeon lorsque les granules corticaux se trouvent dans ce dernier.

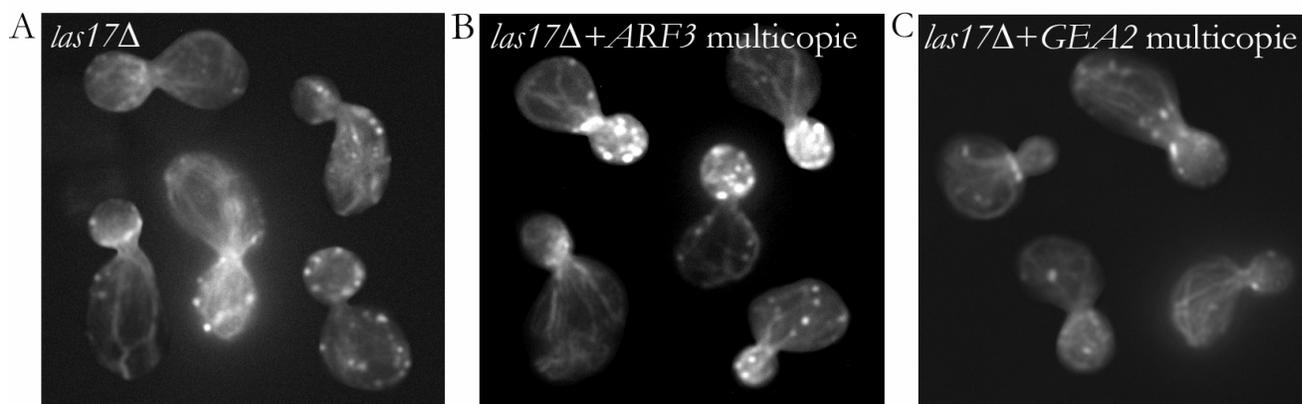


Figure 22 Cytosquelette d'actine et morphologie des cellules *las17Δ* surexprimant ou non *ARF3* et *GEA2*

Les cellules provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance sont fixées avec du formaldéhyde puis mis en présence de phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor488 pour la visualisation de l'actine. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec le filtre approprié. A) Les cellules *las17Δ* présentent un phénotype sévère à 30°C. Les cellules sont allongées, peu de granules corticaux sont présents et les câbles sont mal orientés. B) À 30°C, la surexpression d'*ARF3* par le plasmide pRMP100 dans la souche *las17Δ*, entraîne la formation et la polarisation des granules corticaux dans le bourgeon dans environ 50% des cellules. Quant aux câbles d'actine ils sont toujours présents et sont orientés vers les granules corticaux. La taille des cellules présentant une correction ne diminue que très légèrement. C) À 30°C et à 37°C, la surexpression de *GEA2* par le plasmide pGM53 n'entraîne aucune modification dans le phénotype des cellules qui reste comparable à celles de *las17Δ*. Seuls les résultats obtenus à 30°C sont présentés sur la figure puisqu'à 37°C aucune coloration du cytosquelette d'actine de *las17Δ* surexprimant ou non *ARF3* et *GEA2* n'a pu être réalisée.

3.1.3.4 Repolarisation des granules corticaux dans la souche *vrp1Δ* par la surexpression d'*ARF3*

Les cellules *vrp1Δ* sont grosses et rondes. Leur cytosquelette d'actine est désorganisé avec des câbles orientés aléatoirement et des granules corticaux localisés à la fois dans la cellule mère et dans le bourgeon et dans l'orientation des câbles qui est aléatoire (Figure 23A). Ces cellules poussent bien à 30°C mais éprouvent plus de difficulté à croître à 37°C. À ces deux températures, suite à la surexpression d'*ARF3* dans la souche *vrp1Δ*, la taille des cellules diminue très nettement et redevient semblable à celle des cellules de la souche sauvage. De plus, la surexpression de ce gène dans la souche *vrp1Δ* corrige l'organisation du cytosquelette d'actine. Les granules corticaux sont de nouveau polarisés dans le bourgeon et les câbles

d'actine orientés vers ces derniers (Figure 23B). Cependant, la surexpression de *GEA2* ne modifie en rien le phénotype des cellules de la souche *vrp1Δ* (Figure 23C).

Les résultats obtenus suite à la surexpression d'*ARF3* dans *pfy1Δ* démontrent qu'Arf3p est impliquée dans la formation des câbles d'actine alors que ceux obtenus suite à sa surexpression dans les souches *las17Δ* et *vrp1Δ* suggèrent l'implication d'Arf3p dans la formation des granules corticaux.

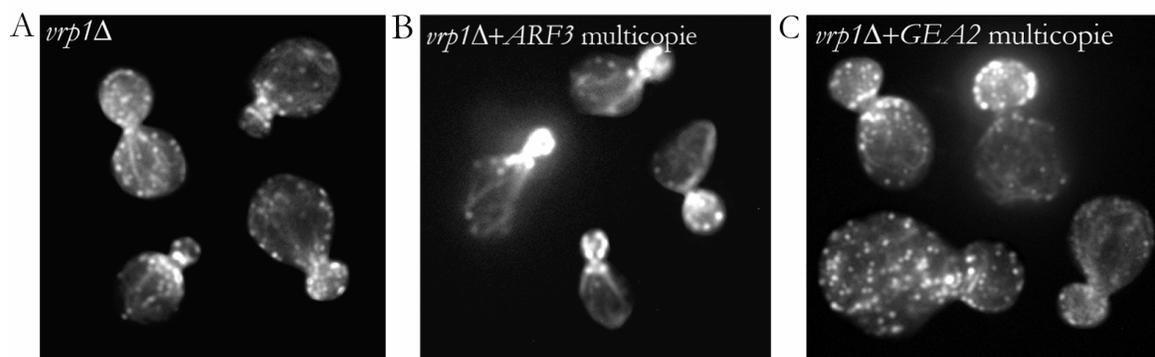


Figure 23 Cytosquelette d'actine et morphologie des cellules *vrp1Δ* seules et suite à la surexpression d'*ARF3* et de *GEA2*

Les cellules provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance sont fixées avec du formaldéhyde puis mis en présence de phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor488 pour la visualisation de l'actine. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec le filtre approprié. A) Les cellules *vrp1Δ* présentent un défaut dans la polarisation des granules corticaux et dans l'orientation des câbles d'actine. B) La surexpression d'*ARF3* dans cette souche par le plasmide pRMP100 diminue la taille des cellules qui devient comparable à celle observée pour des cellules de la souche sauvage. Les granules corticaux sont repolarisés dans le bourgeon et les câbles d'actine sont orientés en direction des granules corticaux. C) La surexpression de *GEA2* par le plasmide pGM53 dans cette même souche n'entraîne aucune correction phénotypique. Seuls les résultats obtenus à 30°C sont présentés sur la figure puisqu'à 37°C les mêmes résultats ont pu être observés.

3.2 Localisation cellulaire d'Arf3p-GFP

3.2.1 Localisation spécifique d'Arf3p-GFP dans la souche sauvage

Par la localisation d'une protéine, des fonctions possibles de celle-ci peuvent en être déduites permettant ainsi d'orienter les recherches. Jusqu'à maintenant, seule l'activité moléculaire d'Arf3p est bien établie puisqu'il s'agit d'une GTPase mais aucune autre information ne permet de déterminer précisément son rôle chez la levure *S. cerevisiae*. L'étude la localisation de la

protéine Arf3p à l'aide de la protéine de fusion GFP (green fluorescent protein) s'avère donc être une piste assez intéressante. La localisation cellulaire d'Arf3p avait déjà été commencée par Marjorie Perron (Perron, 2004). Pour ce faire, la protéine de fusion Arf3p-GFP avait été construite en clonant le gène *ARF3* dans le plasmide pBS-GFP de telle sorte que la séquence codant pour la GFP se situe en C-terminale d'*ARF3* et non en N-terminale car cette protéine possède à cette extrémité un site de myristoylation nécessaire à sa fonction. Par la suite, le fragment *ARF3-GFP* a été cloné dans le plasmide multicopie pRS426 (pRMP301) (Perron, 2004). L'observation de la localisation cellulaire d'Arf3p-GFP à l'aide de pRMP301 dans une souche donnée est faite sur une culture en phase exponentielle de croissance par microscopie à fluorescence. La surexpression d'Arf3p-GFP dans la souche sauvage permet de localiser Arf3p-GFP à la membrane plasmique, dans le bourgeon ainsi qu'autour des vacuoles. La localisation de la protéine dans le bourgeon varie suivant l'avancement du cycle cellulaire. Dès que le site de bourgeonnement est déterminé, Arf3p se retrouve concentrée à ce site tout en restant localisée à la membrane plasmique. Au fur et à mesure de la croissance du bourgeon, la protéine se trouve toujours localisée dans ce dernier mais de façon moins prononcée (Costa *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2003; Perron, 2004) (Figure 24A).

3.2.2 Délocalisation d'Arf3p-GFP dans les souches *bni1Δ*, *drs2Δ*, *gea1Δ* et *gea2Δ*

La localisation d'Arf3p-GFP a aussi été déterminée dans les souches *bni1Δ*, *bnr1Δ*, *bud6Δ*, *bud2Δ*, *cdc12-6*, *cla4Δ*, *drs2Δ*, *gea1Δ*, *gea2Δ*, *las17Δ*, *sla1Δ*, *sla2Δ*, *spa2Δ*, *syp1Δ* et *vrp1Δ*. La sélection des délétions géniques utilisées s'est faite selon l'hypothèse qu'Arf3p serait sous le contrôle de Gea2p et/ou de Gea1p, suivant les protéines comme Drs2p (Saccharomyces Genome Database) retrouvées en double hybride avec Arf3p et suivant l'hypothèse d'un rôle pour Arf3p dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Une délocalisation dans l'une de ces souches permettrait donc de mettre en évidence des partenaires protéiques potentiels importants pour la localisation d'Arf3p et donc par le fait même pour son activité. Dans les souches *bnr1Δ*, *bud6Δ*, *bud2Δ*, *cdc12-6*, *cla4Δ*, *las17Δ*, *sla1Δ*, *sla2Δ*, *spa2Δ*, *syp1Δ* et *vrp1Δ* la localisation d'Arf3p est similaire à celle observée dans la souche sauvage (résultats non présentés). L'étude de la localisation cellulaire d'Arf3p a permis d'identifier quatre partenaires protéiques potentiels pour cette protéine puisque quatre délocalisations d'Arf3p ont pu être

observées. En effet, dans les souches *bni1Δ*, *drs2Δ*, *gea1Δ* et *gea2Δ* la protéine présente un défaut de localisation à 30°C comme à 37°C, elle n'est plus localisée à la membrane plasmique, dans le bourgeon et autour des vacuoles. Dans la souche *gea2Δ*, la délocalisation d'Arf3p se caractérise par une absence d'émission de fluorescence par la GFP (Figure 24E) alors que dans les souches *bni1Δ*, *drs2Δ* et *gea1Δ*, elle s'illustre par une émission très diffuse de la fluorescence dans le cytoplasme (Figure 24A, 24B et 24C).

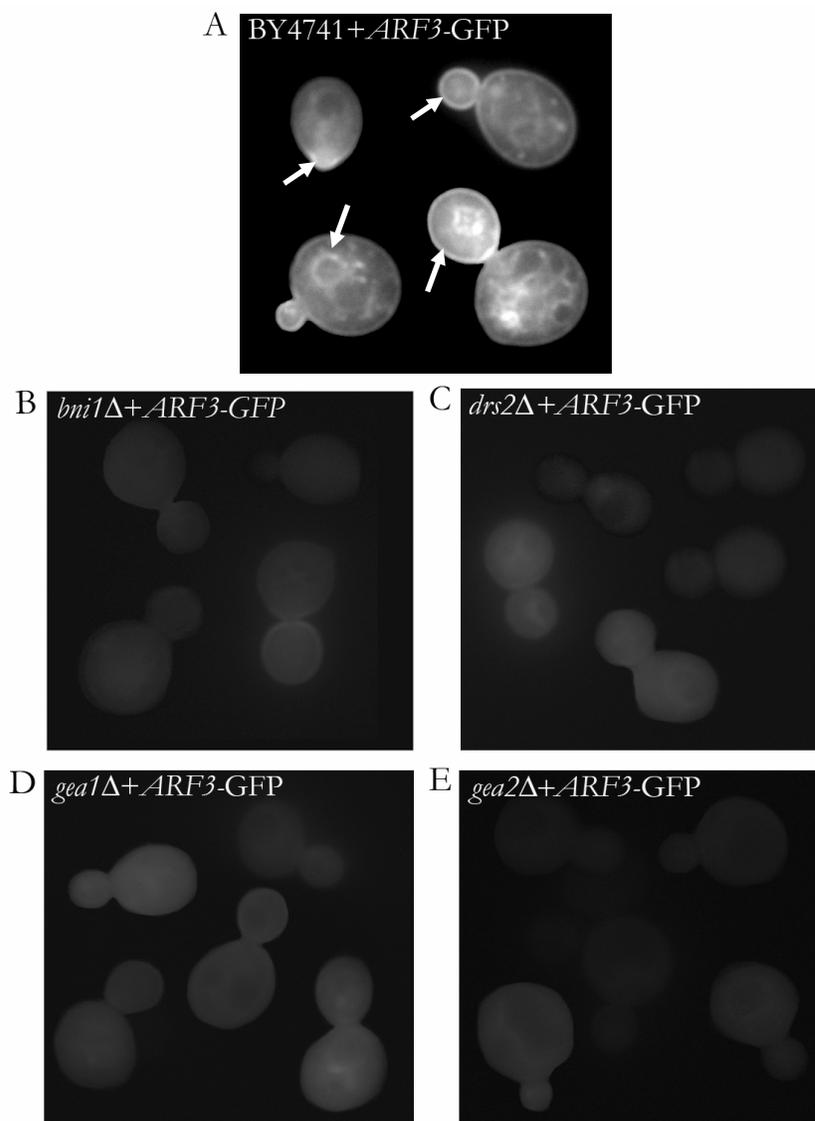


Figure 24 Localisation cellulaire de la protéine Arf3p-GFP

La protéine de fusion Arf3p-GFP a été surexprimée par le plasmide pRMP301 et observée à l'aide d'un microscope à fluorescence.

A) Localisation cellulaire de la protéine Arf3p-GFP dans les cellules de la souche sauvage BY4741 à 30°C. La protéine Arf3p-GFP se trouve localisée à la membrane plasmique, au bourgeon ainsi qu'autour des vacuoles. La localisation au bourgeon de la protéine est dépendante du cycle cellulaire. Seuls les résultats à 30°C sont présentés puisqu'à 37°C la même localisation est observée. B), C), D) et E) Délocalisation de la protéine Arf3p lors de la surexpression de la protéine de fusion Arf3p-GFP dans les souches *bni1Δ*, *drs2Δ*, *gea1Δ* et *gea2Δ*. La GFP semble absente de la souche *gea2Δ* (E) tandis que dans les souches *bni1Δ* (B), *drs2Δ* (C) et *gea1Δ* (D) de la fluorescence est émise mais de façon très diffuse dans le cytoplasme de la cellule. Seuls les résultats à 30°C sont présentés puisqu'à 37°C la même localisation est observée. Les flèches blanches précisent la localisation cellulaire d'Arf3p-GFP

3.3 Étude du bourgeonnement de la souche *arf3Δ*

3.3.1 Le bourgeonnement aléatoire de la souche *arf3Δ*

Les cellules haploïdes de levures possèdent un patron de bourgeonnement axial, c'est-à-dire que l'émergence d'un nouveau bourgeon se fait toujours à côté du précédent. La délétion du gène *ARF3* génère l'apparition d'un patron de bourgeonnement aléatoire, c'est dire que le bourgeonnement se fait anarchiquement sur l'ensemble de la surface cellulaire. Ainsi le nouveau bourgeon se forme n'importe où à la surface de la cellule et non à coté du bourgeon précédent et les cicatrices de bourgeonnement ne se touchent plus. Par simple observation des cellules *arf3Δ* à 30°C, le taux de cellules présentant un bourgeonnement aléatoire est difficilement déterminable. Pour ce faire un décompte cellulaire a donc été réalisé sur une centaine de cellules. Le taux de cellules *arf3Δ* présentant un patron de bourgeonnement aléatoire à cette température a pu être estimé à 40%. À 37°C, le nombre de cellules *arf3Δ* présentant un bourgeonnement aléatoire est très important, de l'ordre de 90%, ce qui est facilement quantifiable par simple observation au microscope sans décompte cellulaire (Figure 25A).

3.3.2 Correction partielle du bourgeonnement aléatoire de la souche *arf3Δ* par la surexpression de *BNI1 FH1FH2*, *GEA2*, *RHO2*, *SYP1*

Afin d'identifier si la surexpression de certains gènes restaurerait le défaut de bourgeonnement de la souche *arf3Δ*, les suppresseurs *GEA2*, *MID2*, *RHO2*, *ROM2*, *SYP1*, *WSC1* et le mini gène *BNI1 FH1FH2* ont été testés. Le mini gène *BNI1 FH1FH2*, communément appelé *BNI1 mini*, est un gène tronqué ne contenant que les séquences des deux domaines fonctionnels du gène *BNI1* à savoir les domaines FH1 et FH2 importants pour la formation des câbles surnuméraires dans la souche sauvage (Pruyne *et al.*, 2002). La surexpression de *MID2*, *ROM2* et *WSC1* ne permet pas de corriger le bourgeonnement aléatoire de la souche *arf3Δ* ni à 30°C ni à 37°C (Figure 26). Par contre, celle de *BNI1 mini*, *GEA2*, *RHO2* et *SYP1* permet un correction partielle de ce bourgeonnement à 30°C comme à 37°C (Figure 26). La correction la plus importante du bourgeonnement de la souche *arf3Δ* est observée lors de la surexpression de *GEA2* puisqu'à 30°C le taux de cellules ayant un bourgeonnement aléatoire passe de 40% à

5% et à 37°C ce taux passe de 90% à 50% (Figure 25B). Une très bonne correction du patron de bourgeonnement est aussi observée lors de la surexpression de *BNI1* mini et de *SYP1* puisque le bourgeonnement aléatoire passe de 40% à 10% à 30°C et de 90% à 50% à 37°C (Figure 26). Une correction plus faible est visible suite à la surexpression de *RHO2* avec un bourgeonnement aléatoire de 20% à 30°C et de 60% à 37°C (Figure 26). Pour apprécier correctement la proportion de cellules présentant un bourgeonnement aléatoire suite à la surexpression de ces gènes, un décompte cellulaire a été effectué sur une centaine de cellules comme pour la souche *arf3Δ*. De ce fait, seules les photos des résultats obtenus suite à la surexpression de *GEA2* sont montrées puisque pour les autres gènes surexprimés les résultats du décompte cellulaire présentés sous forme graphique permettent mieux d'apprécier le degré de correction du bourgeonnement de la souche *arf3Δ* (Figure 26).

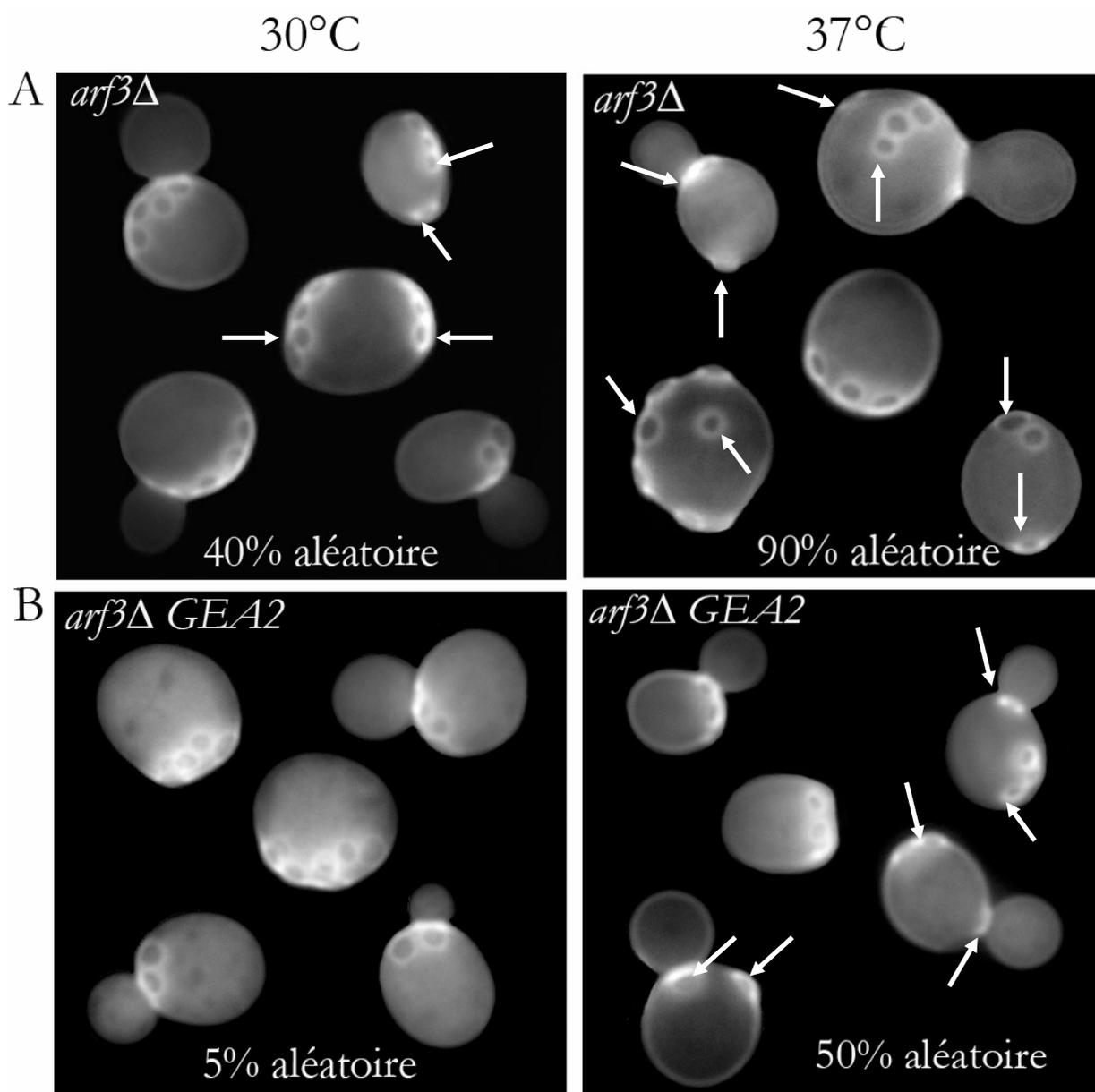
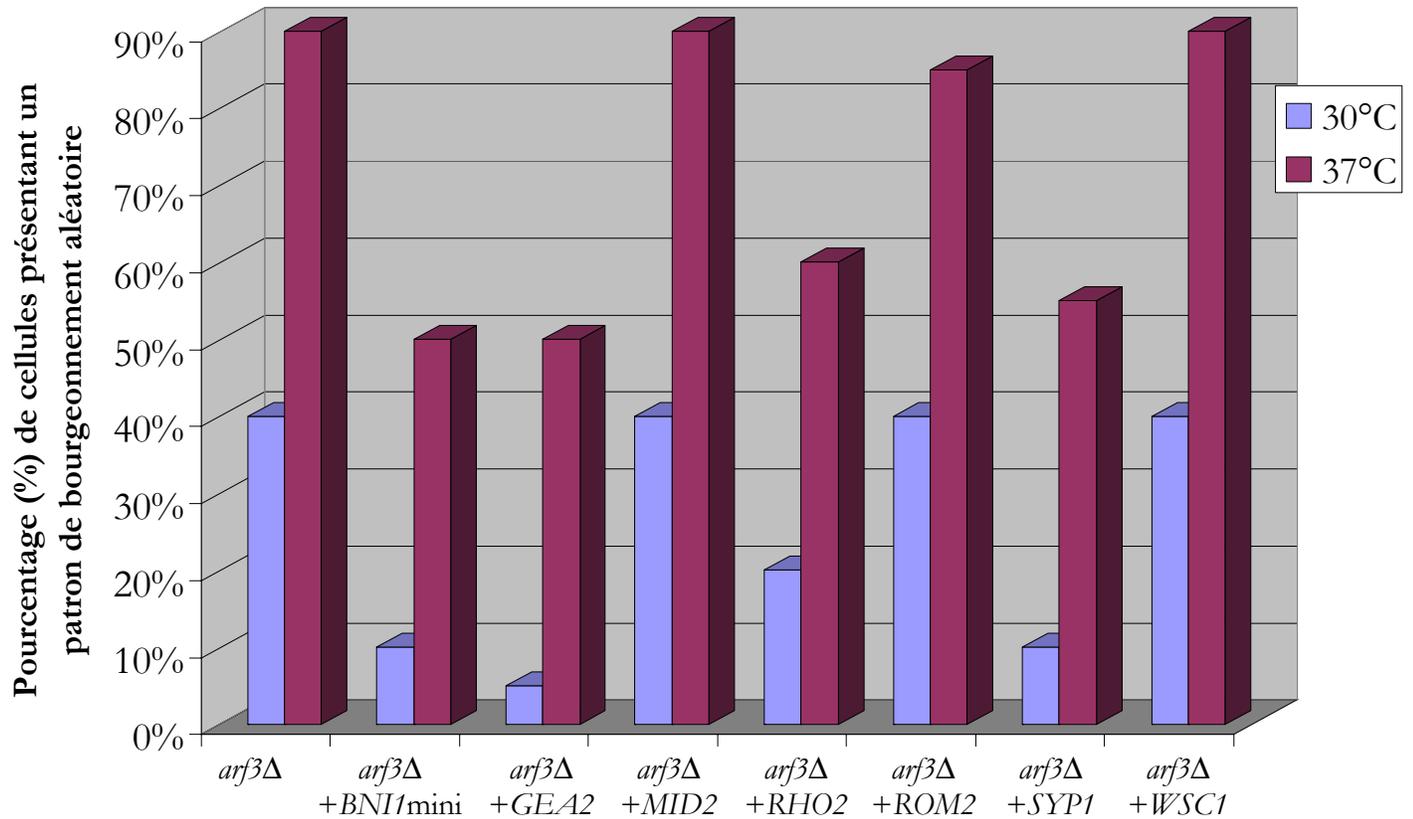


Figure 25 Bourgeonnement aléatoire de la souche *arf3Δ* et correction partielle de ce bourgeonnement suite à la surexpression de *GEA2*

Les cellules provenant d'une culture de nuit sont fixées avec du formaldéhyde puis les cicatrices de bourgeonnement présentant des dépôts de chitine sont colorées grâce au Calcofluor White. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec le filtre approprié. Les sites de bourgeonnement aléatoire sont indiqués par des flèches. A) La délétion du gène *ARF3* entraîne l'apparition d'un bourgeonnement aléatoire. La fraction de cellules ayant un bourgeonnement aléatoire à 30°C est de 40%, ce taux passe à 90% lorsque les cellules sont incubées à 37°C. B) La surexpression de *GEA2* dans la souche *arf3Δ* permet de corriger significativement le bourgeonnement aléatoire des cellules puisqu'à 30°C la fraction de cellules bourgeonnement aléatoire passe de 40% à 5% et à 37°C, cela passe de 90% à 50%.



Souches de levure testées avec ou sans la surexpression d'un gène

Figure 26 Graphique représentant l'effet de la surexpression des gènes *BNI1* mini, *GEA2*, *MID2*, *RHO2*, *ROM2*, *SYP1* et *WSC1* sur le bourgeonnement aléatoire de la souche *arf3Δ* à 30°C et à 37°C.

Le pourcentage de cellules *arf3Δ* présentant bourgeonnement aléatoire, avec ou sans la surexpression d'un gène, a été évalué par décompte cellulaire puis représenté graphiquement. Pour l'ensemble des souches testées, cent cellules avec deux bourgeons et plus ont été comptées à 30°C et à 37°C. Les colonnes de couleur mauve représentent les résultats obtenus à 30°C suite au décompte cellulaire alors que les colonnes de couleur prune représentent ceux obtenus à 37°C.

3.4 Interaction génétique entre *ARF3* et *GEA2*

Les résultats connus jusqu'à maintenant sur *ARF3* et *GEA2* laissent supposer que le GEF Gea2p serait responsable en partie de l'activation d'Arf3p. En effet, la correction du cytosquelette de *ppy1Δ* par la surexpression des gènes *ARF3* et *GEA2* codant pour les protéines Arf3p et Gea2p permet d'attribuer un rôle commun à ces deux protéines dans la formation des câbles d'actine. De plus, la délocalisation de la protéine Arf3p dans la souche *gea2Δ* suggère l'importance de la présence de Gea2p pour sa localisation normale. Enfin, lors de l'étude du bourgeonnement de la souche *arf3Δ*, il a pu être remarqué que la surexpression du gène *GEA2* permet aussi de corriger assez bien le bourgeonnement aléatoire de cette souche C. Donc d'après l'ensemble de ces résultats, la décision de créer un double mutant *arf3Δ gea2Δ* a été prise afin de montrer l'existence ou non d'une interaction génétique entre ces deux gènes. Un test de génotype a été fait sur des milieux SD dépourvus de l'acide aminé pour laquelle l'auxotrophie a voulu être testé afin de préciser le génotype du double mutant et le type sexuel de la souche a aussi été déterminé (voir section 2.2.1 Tableau 2). Les délétions géniques sont aussi vérifiées par PCR avec des amorces spécifiques pour chaque gène testé (voir section 2.7.6 Tableau 5; Figure 27). Toutefois, seuls les résultats PCR démontrant l'absence du gène *ARF3* sont montrés. Pour ce qui est de la délétion de *GEA2*, il s'agit d'une souche gracieusement fournie par le laboratoire du Dre Jackson dont la vérification de la délétion de *GEA2* avait été faite par le concepteur (Peyroche *et al.*, 2001).

3.4.1 Phénotypes des souches *arf3Δ* et *gea2Δ*

Avant d'entreprendre l'étude du phénotype du double mutant *arf3Δ gea2Δ* et d'en tirer des conclusions hâtives sur l'existence d'une interaction génétique entre les deux gènes, il est important de procéder à l'observation individuelle des deux souches *arf3Δ* et *gea2Δ* à 30°C et à 37°C.

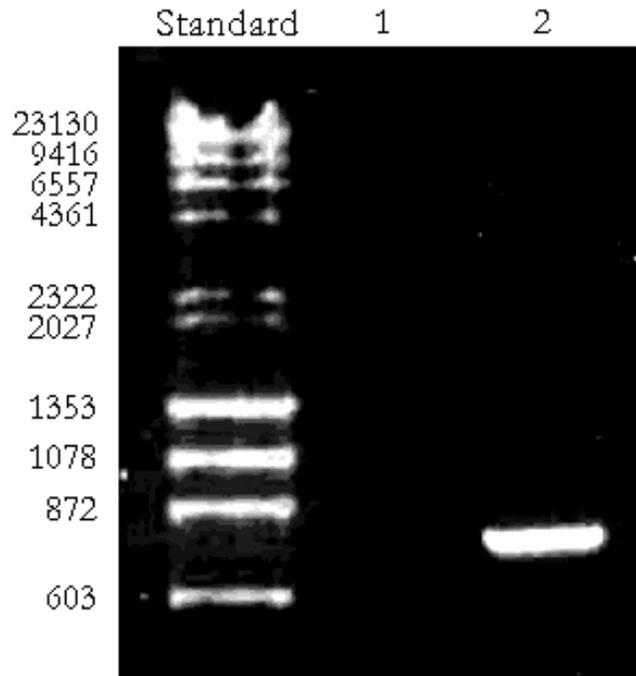


Figure 27 Analyse sur gel d'agarose du résultat d'une amplification par PCR permettant la vérification de la délétion du gène *ARF3* dans le double mutant *arf3Δ gea2Δ*

- 1) Les marqueurs de longueur utilisés sont de l'ADN du bactériophage Φ X174 digéré par *Hae*III et l'ADN du bactériophage λ digéré par *Hind*III.
- 2) Amplification d'*ARF3* dans la souche sauvage BY4741 avec les amorces *ARF3 Bam*HI 5' et *KAN* 3'. Il n'y a pas de bande puisqu'il ne peut pas y avoir d'amplification du gène *KAN* dans la souche sauvage vu que ce gène n'est pas présent.
- 3) Vérification de la délétion *arf3Δ::kan* dans le double mutant *arf3Δ gea2Δ* à l'aide des amorces *ARF3 Bam*HI 5' et *KAN* 3'. La bande présente correspond à l'amplification du gène de la kanamycine et non au gène *ARF3* et son promoteur (1000 paires de bases). La migration s'est faite à 100 V sur un gel d'agarose 0,8%.

3.4.1.1 Phénotype de la souche *arf3Δ*

Les cellules déficientes en *ARF3* possèdent un phénotype comparable à celui observé pour des cellules de la souche sauvage à 30°C à savoir elles sont de forme ellipsoïdal avec un cytosquelette d'actine polarisé. A 37°C, 30% des cellules présentent des doubles bourgeons avec une dépolarisation de leur cytosquelette d'actine (Figure 28A). La souche croît aussi très bien sur un milieu YDP contenant 1,25 mg/ml de caféine à 30°C et à 37°C (Zakrzewska *et al.*, 2003).

3.4.1.2 Phénotype de la souche *gea2Δ*

Pour ce qui est des cellules déficientes en *GEA2*, elles présentent un phénotype comparable à celui observé chez des cellules de la souche sauvage à 30°C comme à 37°C (Figure 28B). Elles poussent aussi très bien sur un milieu YPD contenant 1,25 mg/ml de caféine à 30°C et à 37°C (Zakrzewska *et al.*, 2003).

3.4.2 Phénotype de la souche *arf3Δ gea2Δ*

En ce qui a trait à la morphologie et à l'organisation du cytosquelette d'actine, la souche *arf3Δ gea2Δ* possède un phénotype différent de la souche *arf3Δ* et *gea2Δ*. À 30°C, la taille des cellules augmente légèrement, 50% des cellules présentent un cytosquelette d'actine dépolarisé, les granules corticaux sont répartis à la fois dans la cellule mère et dans le bourgeon et les câbles d'actine sont orientés aléatoirement (Figure 28C). À 37°C, les cellules sont très grosses, elles présentent un cytosquelette d'actine complètement désorganisé. Les granules corticaux sont retrouvés dans la cellule mère et dans le bourgeon. Les câbles d'actine sont toujours présents mais orientés aléatoirement. Toutefois, dans certaines cellules les câbles d'actine visibles semblent absents (Figure 28C). Pour ce qui est de la croissance, la souche *arf3Δ gea2Δ* pousse très bien sur un milieu YPD avec 1,25 mg/ml de caféine à 30°C ainsi qu'à 37°C.

Le bourgeonnement de cette nouvelle souche a aussi été observé. Comme mentionné ci-dessus lors de l'étude de la souche *arf3Δ* (voir section 3.3.1), la surexpression de *GEA2* permet de corriger le patron de bourgeonnement aléatoire de cette dernière. Par contre, la délétion des deux gènes *ARF3* et *GEA2* donne un patron de bourgeonnement comparable à celui observé pour la souche *arf3Δ*. À savoir, à 30°C, 37% des cellules présentent un patron de bourgeonnement aléatoire et à 37°C, 86% des cellules ont un bourgeonnement aléatoire (résultats non présentés). Les résultats obtenus avec le double mutant *arf3Δ gea2Δ* permettent d'affirmer qu'une interaction génétique existe entre les gènes *ARF3* et *GEA2*.

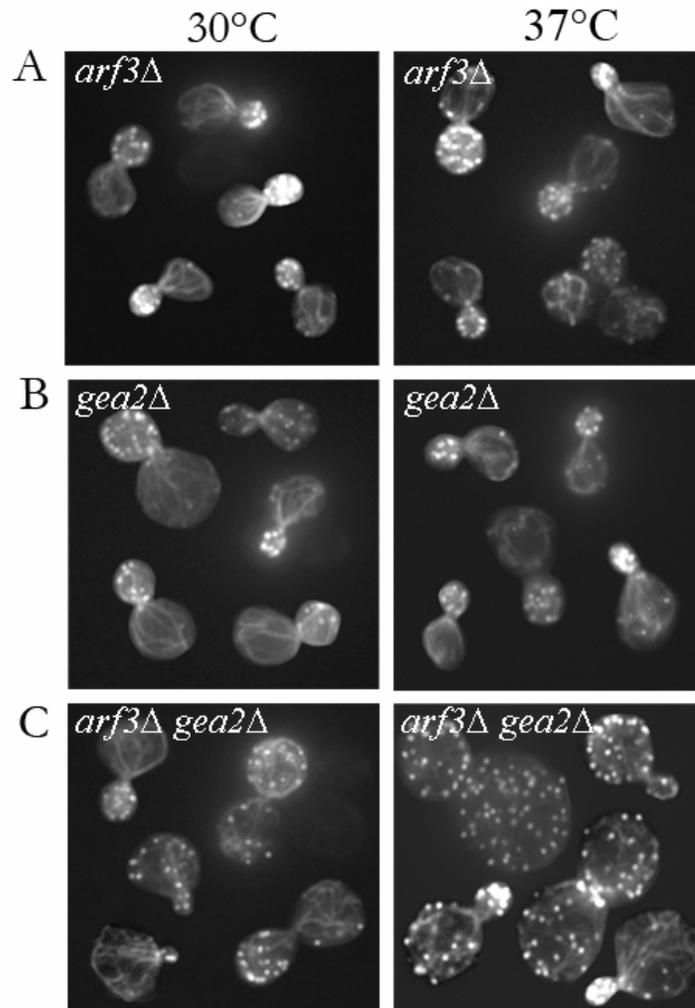


Figure 28 Phénotype de la souche *arf3Δ gea2Δ*

Les cellules provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance sont fixées avec du formaldéhyde puis mis en présence de phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor488 pour la visualisation de l'actine. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec le filtre approprié. A) À 30°C, la forme et le cytosquelette d'actine de la souche *arf3Δ* sont semblables à ceux observés dans les cellules de la souche sauvage. Cependant à 37°C, 30% des cellules présentent un double bourgeon avec dans celles-ci la présence d'un cytosquelette désorganisé. B) À 30°C et à 37°C, les cellules de la souche *gea2Δ* présentent une taille semblable aux cellules de la souche sauvage et un cytosquelette d'actine organisé. C) Pour ce qui est de la souche *arf3Δ gea2Δ*, à 30°C la moitié des cellules présente un cytosquelette d'actine désorganisé avec des granules corticaux répartis dans la cellule mère et dans le bourgeon. Quand aux câbles d'actine, ils semblent orientés aléatoirement. La taille de ces cellules est aussi légèrement augmentée. À 37°C, les cellules deviennent assez grosses avec un cytosquelette d'actine désorganisé. Dans certaines cellules, les câbles d'actine sont presque inexistantes.

3.5 Mutagenèse dirigée et aléatoire d'*ARF3*

La mutagenèse dirigée et aléatoire ont été effectuées afin de poursuivre l'étude des domaines fonctionnels d'Arf3p (Perron, 2004) et de déterminer si des mutations dans *ARF3* pourraient diminuer ou améliorer l'expression de la protéine qui en résulte. La mutagenèse dirigée a été faite sur et autour des sites ayant déjà fait l'objet d'une étude dans le cadre du projet de Marjorie Perron (Perron, 2004). Ces différentes mutations avaient été préalablement définies d'après l'étude réalisée sur le gène *ARF1* de levure (Kahn *et al.*, 1995). Il s'agissait des sites potentiels de myristoylation en N-terminale, de liaison au GDP et au GTP ainsi que le site « fast cycling » retrouvé chez *ARF6*, l'homologue humain d'*ARF3* permettant d'échanger rapidement du GDP pour du GTP et rendant la protéine active en tout temps. Dans la présente étude, la mutagenèse dirigée a été réalisée dans le site de N-myristoylation, le site de liaison au GTP et la région associée à l'activité GTPasique mais aussi sur des acides aminés très proche de ces sites. Toutes les mutations créées par la mutagenèse dirigée, soit celles obtenues dans l'étude actuelle ou bien celles obtenues par Marjorie Perron, sont présentées dans la Figure 29. Les mutations d'*ARF3* obtenues à la fois par la mutagenèse dirigée et aléatoire ont été mises dans le plasmide centromérique pRS316 et dans le plasmide multicopie pRS426. Le but d'utiliser le plasmide centromérique pRS316 était d'identifier des mutations d'*ARF3* qui exprimés en une seule copie permettrait la synthèse d'un faible taux de protéines constitutivement actives entraînant la correction du cytosquelette des souches *pfy1* Δ et/ou *pfy1-111 arf3* Δ . Le but d'utiliser le plasmide multicopie pRS426 était d'obtenir des mutations d'*ARF3* qui surexprimés dans ces deux mêmes souches ne permettraient plus la correction du cytosquelette d'actine de ces souches comme observé avec *ARF3* sauvage dans *pfy1* Δ . Ceci signifierait alors que l'acide aminé muté est essentiel à l'activité de la protéine. La souche *pfy1-111 arf3* Δ a été utilisée dans le but de s'affranchir de l'expression basale d'*ARF3* pouvant être présente dans la souche *pfy1* Δ ainsi que de celle de *PFY1*. Le phénotype des cellules de cette souche est semblable à celui de la souche sauvage à 30°C. Cependant, à 37°C, les cellules présentent un cytosquelette d'actine désorganisé. Les granules corticaux sont répartis à la fois dans le bourgeon et dans la cellule mère et les câbles d'actine sont présents dans presque toutes les cellules mais sont très fins ce qui les rend difficilement visibles (Figure 31A). Dans un premier temps, les résultats obtenus suite à la mutagenèse dirigée et aléatoire d'*ARF3* cloné

dans un plasmide multicopie seront présentés puis ceux obtenus sur *ARF3* cloné cette fois-ci dans un plasmide centromérique suivront.

3.5.1 Étude de l'influence de mutants d'*ARF3*, clonés dans un plasmide multicopie, sur le cytosquelette d'actine des souches *pfy1Δ* et *pfy1-111 arf3Δ*

La surexpression d'*ARF3* par le plasmide pRMP100 entraîne la correction du cytosquelette d'actine de la souche *pfy1Δ*. En introduisant des mutants d'*ARF3* dans le plasmide multicopie pRS426, nous voulions déterminer si les mutations apportées provoqueraient ou non l'inactivation de l'activité de la protéine.

3.5.1.1 Mise en évidence par mutagenèse dirigée de l'importance de sites précis d'Arf3p pour son activité

Avant de commencer la mutagenèse d'*ARF3*, une tentative du clonage d'*ARF3* dépourvu de son promoteur dans un plasmide a été entreprise afin de s'affranchir d'éventuelles mutations pouvant affecter ce dernier. Pour ce faire, un site de restriction pour l'enzyme *HindIII* a été créé dans le promoteur en substituant -10 paires de base avant l'ATG l'adénine présente par une thymine. Ainsi, il devenait possible d'extraire le gène *ARF3* dépourvu de son promoteur, de le cloner dans un autre plasmide et de réaliser la mutagenèse. Suite à l'obtention de cette mutation, celle-ci a été testée avant de poursuivre l'étude afin de s'assurer qu'elle n'affectait en rien l'expression de la protéine dans la souche *pfy1Δ*. Malheureusement, la mutation s'est avérée néfaste pour l'expression de la protéine puisque la surexpression d'*ARF3* portant cette mutation dans *pfy1Δ* ne corrige plus l'organisation du cytosquelette d'actine tel qu'observé lors de surexpression d'*ARF3* sauvage. Les cellules présentent le même phénotype que les cellules de la souche *pfy1Δ*, elles sont grosses et rondes avec des granules corticaux répartis à la fois dans la cellule mère et dans le bourgeon et une absence de câbles d'actine visibles (Figure 30). L'étude s'est donc poursuivie sur la séquence codante d'*ARF3* ainsi que sur son promoteur.

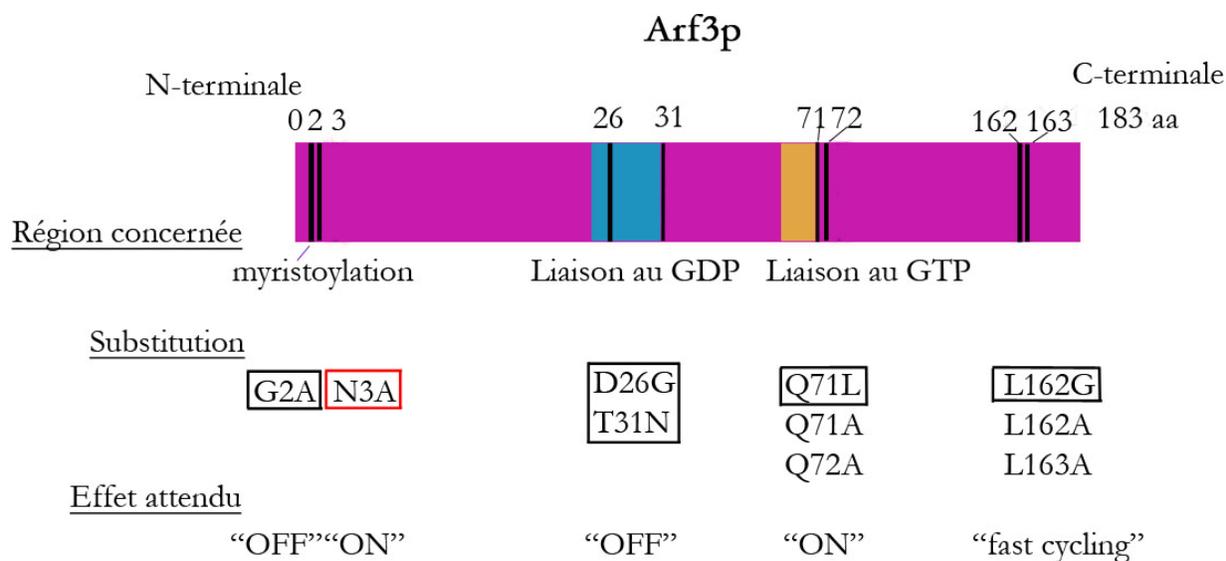


Figure 29 Représentation des mutations effectuées sur la protéine Arf3p

Les mutations à réaliser sur Arf3p ont été déterminées suite aux études déjà publiées sur Arf1p identifiant des domaines importants pour son activité. Les mutations encadrées en noir sont celles réalisées par Marjorie Perron et se trouvent dans un plasmide multicopie. La mutation encadrée en rouge a été obtenue dans l'étude actuelle et se trouve aussi dans un plasmide multicopie. Les mutations non encadrées ont été réalisées au cours de l'étude actuelle et clonées dans un plasmide centromérique.

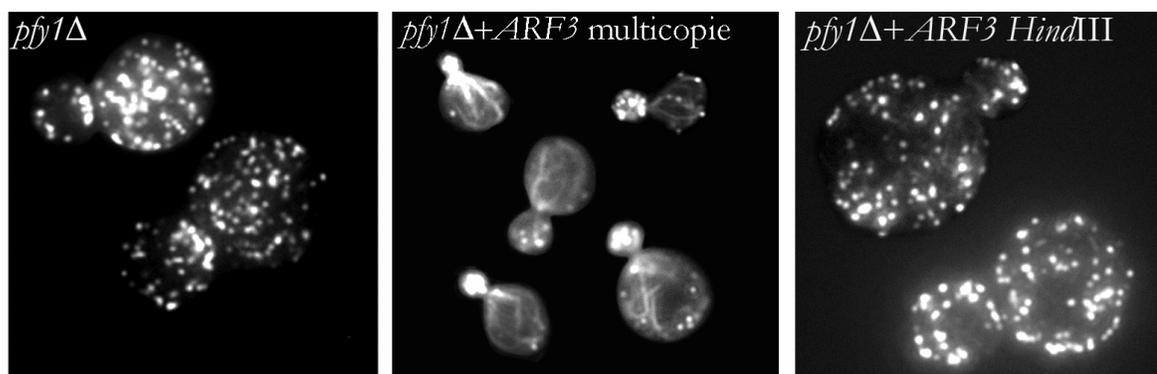


Figure 30 Surexpression du mutant *ARF3 HindIII* dans la souche *pfy1Δ*

Les cellules provenant d'une phase exponentielle de croissance sont fixées avec du formaldéhyde puis mis en présence de phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor488 pour la visualisation de l'actine. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec le filtre approprié. La surexpression par le plasmide pAAL101 du gène *ARF3* avec une mutation dans son promoteur -10 acides aminés avant l'ATG créant un site *HindIII* dans la souche *pfy1Δ* ne permet plus la correction du cytosquelette d'actine de cette souche comme observée lors de la surexpression d'*ARF3* et de son promoteur non muté.

Dans cette partie de l'étude, la mutagenèse dirigée a été utilisée uniquement pour modifier l'acide aminé à la position 3 d'Arf3p. Il s'agit de l'acide aminé attenant le site de myristoylation se trouvant à la position 2. Les résultats obtenus suite à cette mutation vont permettre d'affirmer ou d'infirmer l'importance de la présence de l'acide aminé à la position 2 pour la myristoylation et l'activité de la protéine. La construction a ensuite été transformée dans la souche *pfy1Δ* ainsi que dans la souche *pfy1-111 arf3Δ*. Les mutants d'*ARF3* créés par Marjorie Perron (Perron, 2004) ont aussi été transformés dans la souche *pfy1-111 arf3Δ* puisqu'ils avaient été transformés jusqu'à maintenant seulement dans les souches *pfy1Δ* et *pfy1-111*.

3.5.1.1.1 Étude des mutants d'ARF3 portant une mutation dans le site de myristoylation nécessaire pour l'ancrage à la membrane de la protéine

Une caractéristique importante des protéines de type Arf est leur ancrage à la membrane plasmique indispensable à l'activité de la protéine. Cet ancrage est possible suite la N-myristoylation qui correspond à l'ajout d'un groupement myristate dans la partie N-terminale de la protéine plus précisément sur la glycine à la position 2. La mutation de ce site, réalisée par Marjorie Perron, entraîne une inactivation de la protéine tel que mis en évidence par surexpression dans les souches *pfy1Δ* et *pfy1-111* (Perron, 2004). Cet acide aminé est donc important pour l'activité de la protéine Arf3p comme pour celle de la protéine Arf1p. Pour confirmer que le site de N-myristoylation se trouve bien à la position 2 une seconde mutation a été réalisée, cette fois-ci sur l'acide aminé à la position 3. De cette façon, il sera possible de déterminer si l'ajout d'un groupement myristate se fait spécifiquement sur l'acide aminé à la position 2 et non sur celui à la position 3. Pour ce faire, une substitution d'une asparagine par une alanine à la position 3 (*N3A*) a été effectuée. Le gène muté *ARF3N3A* a ensuite été introduit dans un plasmide multicopie pRS426 donnant le plasmide pAAL100. Ce plasmide a été transformé dans la souche *pfy1Δ* et *pfy1-111 arf3Δ*. Le plasmide pAAL1 exprimant le mutant *ARF3G2A* a aussi été transformé mais uniquement dans la souche *pfy1-111 arf3Δ*.

La surexpression d'*ARF3N3A* par le plasmide pAAL100 dans la souche *pfy1Δ* n'entraîne aucune correction du cytosquelette d'actine de cette souche qui reste totalement désorganisé comme dans les cellules de la souche de départ (Figure 30). Le même résultat avait été observé suite à la surexpression d'*ARF3G2A* par le plasmide pAAL1 dans cette même souche (Perron, 2004). De plus, la surexpression d'*ARF3G2A* par le plasmide pAAL1 dans la souche *pfy1-111*

arf3Δ ne permet pas de corriger le cytosquelette d'actine de cette souche (Figure 31B). Cependant, la surexpression d'*ARF3N3A* par le plasmide pAAL100 dans la souche *pfy1-111 arf3Δ* entraîne une correction du cytosquelette d'actine de cette souche à 37°C marqué par la repolarisation des granules corticaux dans le bourgeon et la formation de câbles d'actine visibles orientés vers ce dernier (Figure 31C). La correction du cytosquelette d'actine de la souche *pfy1-111 arf3Δ* suite à la surexpression du mutant *ARF3N3A* et non suite à celle d'*ARF3G2A* indiquent que la modification lipidique est bien réalisée sur l'acide aminé à la position 2 et qu'en plus cette modification est très importante pour l'activité de la protéine. Toutefois, l'absence de correction du cytosquelette d'actine de la souche *pfy1Δ* par le mutant *ARF3N3A* reste assez surprenante et inexplicable.

3.5.1.1.2 Les mutants d'*ARF3* présentant une mutation dans le site de liaison au GTP et dans le site de « fast cycling » ne corrigent pas le phénotype des souches *pfy1Δ* et *pfy1-111 arf3Δ*

Un mutant a déjà été créé dans le site de liaison au GTP par Marjorie Perron, il s'agit de la mutation *Q71L* où la glutamine a été substituée par une leucine à la position 71. Ce mutant d'*ARF3* a ensuite été cloné dans un plasmide multicopie pRS426 donnant le plasmide pRMP103. La surexpression d'*ARF3Q71L* dans les souches *pfy1Δ* et *pfy1-111* n'a pas permis de corriger les phénotypes associés à ces deux souches (Perron, 2004). Par l'intermédiaire de ce plasmide, *ARF3Q71L* a été surexprimé dans la souche *pfy1-111 arf3Δ* puisque ceci n'avait jamais été fait. Aucune correction du cytosquelette d'actine de cette souche à 37°C n'a pu être observée (Tableau 8). Étant donné qu'aucune correction n'est observée avec ce mutant d'*ARF3*, il est fort probable que la mutation affecte négativement le site de liaison au GTP. Elle doit probablement abolir l'activité GTPase de la protéine et empêcher ainsi l'échange du GDP pour du GTP.

Une substitution d'une leucine par une glycine à la position 162 (*L162G*) dans la partie C-terminale de la protéine a été créée par Marjorie Perron. Cette mutation a été faite dans le but de créer un mutant où l'échange du GDP pour du GTP se fait très rapidement « fast cycling » rendant la protéine toujours active. Ce type de mutation a été réalisé sur Arf6p, une protéine humaine partageant 60% d'identité avec Arf3p (Santy, 2002).

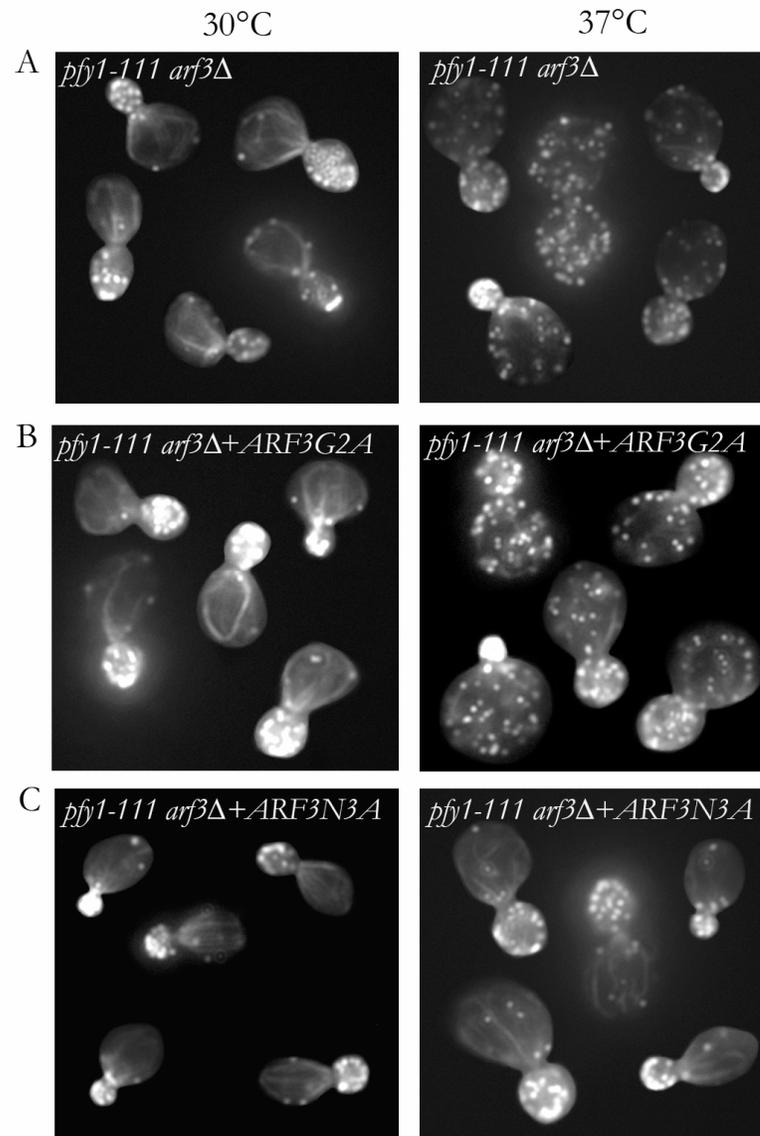


Figure 31 Surexpression des mutants *ARF3G2A* et *ARF3N3A* dans la souche *pfy1-111 arf3Δ*

Les cellules provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance sont fixées avec du formaldéhyde puis mis en présence de phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor488 pour la visualisation de l'actine. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec le filtre approprié. A) Les cellules de la souche *pfy1-111 arf3Δ* présentent un phénotype comparable à celui des cellules de la souche sauvage à 30°C. À 37°C, leur cytosquelette d'actine est désorganisé avec des granules corticaux dépolarisés et des câbles d'actine très peu visibles. B) La surexpression d'*ARF3G2A* par le plasmide pAAL1 ne permet pas de corriger le cytosquelette de la souche *pfy1-111 arf3Δ* à 37°C. C) La surexpression d'*ARF3N3A* par le plasmide pAAL100 permet de corriger le cytosquelette d'actine de la souche *pfy1-111 arf3Δ* à 37°C. La surexpression des mutants *ARF3Q71L* par le plasmide pRMP103 et *ARF3L62G* par le plasmide pAAL2 dans la souche *pfy1-111 arf3Δ* donnent le même résultat que celui obtenu suite à la surexpression d'*ARF3G2A* par le plasmide pAAL1.

Cette mutation d'*ARF3* a été cloné dans le plasmide pRS426 donnant le plasmide pAAL2 et surexprimé dans la souche *pfy1Δ* et *pfy1-111* donnant une correction du cytosquelette d'actine ainsi que restauration de la croissance uniquement dans la souche *pfy1-111* (Perron, 2004). Ce plasmide transformé dans la souche *pfy1-111 arf3Δ* n'a permis aucune correction du cytosquelette d'actine à 37°C (Tableau 8). Cet acide aminé semble donc aussi très important pour l'activité de la protéine. Ce qui est tout de même assez surprenant c'est qu'il est possible d'obtenir une correction avec cette mutation dans la souche *pfy1-111* (Perron, 2004) mais pas dans la souche *pfy1-111 arf3Δ*. Ceci est peut être du à l'expression basale d'*ARF3*.

3.5.1.2 Mise en évidence par mutagenèse aléatoire de l'importance d'un grand nombre de sites pour l'activité d'Arf3p

Étant donné que la surexpression d'*ARF3* restaure l'organisation du cytosquelette d'actine ainsi que le défaut de croissance de la souche *pfy1Δ*, la mutagenèse aléatoire du gène a été réalisée afin d'identifier des sites essentiels à sa fonction. Suite à cette mutagenèse, 11 clones de la souche *pfy1Δ* présentant un défaut de croissance à 37°C ainsi qu'un cytosquelette d'actine totalement désorganisé ont été sélectionnés (Figure 30). En les choisissant selon ces critères, il était fort probable que la mutation présente sur *ARF3* affecte l'activité de la protéine car dans le cas contraire le phénotype de la souche *pfy1Δ* serait corrigé comme observé dans les résultats précédents (Figure 16C). Les plasmides des 11 clones contenant le gène *ARF3* muté sont extraits de la souche *pfy1Δ*, puis le gène a été séquencé afin de déterminer l'emplacement de la mutation. Les mutations d'*ARF3* obtenues dans ces clones sont réparties sur l'ensemble de la séquence protéique (Figure 32) et dans le promoteur. De plus, le nombre de mutations obtenues sur ce gène varie de une à deux mutations réparties de la façon suivante. Sept des onze mutants sélectionnés possèdent une seule mutation, dont quatre se situent dans la séquence codante sur les acides aminés aux positions 80, 90, 117 et 174 (Figure 32) et les trois autres se retrouvent dans le promoteur. Deux de ces onze mutants contiennent deux mutations réparties pour une dans la séquence codante sur les acides aminés aux positions 30 et 103 (Figure 32) et l'autre dans le promoteur. Un mutant présente deux mutations dans la séquence codante sur les acides aminés aux positions 48 et 109 (Figure 32) et finalement le dernier des onze mutants présente une délétion dans la région promotrice. Les résultats obtenus avec les mutants présentant une ou deux mutations uniquement dans la séquence codante suggèrent

l'importance de plusieurs acides aminés pour l'activité et la stabilité d'Arf3p répartis sur l'ensemble de la séquence protéique et non uniquement dans les sites fonctionnels d'Arf3p. Pour ce qui est des mutants avec deux mutations dont une dans le promoteur il n'est pas possible de savoir laquelle est importante. Il se pourrait donc que les régions identifiées précédemment comme les domaines fonctionnels d'Arf3p ne soient pas les seuls domaines importants pour l'activité ou la stabilité de la protéine. Les mutations retrouvées dans la région promotrice d'*ARF3* s'étendent de -54 à -381 paires de bases avant l'ATG et sont repartis aléatoirement. Ces derniers résultats suggèrent que la région promotrice couvrirait une région allant au moins de -54 à -381 paires de bases avant l'ATG.

3.5.2 Étude de l'influence de mutants d'*ARF3*, clonés dans un plasmide centromérique, sur le cytosquelette d'actine des souches *pfy1Δ* et *pfy1-111 arf3Δ*

L'utilisation d'un plasmide centromérique avait pour but de mettre en évidence si la synthèse d'un faible niveau de protéines Arf3p mutées permettrait de corriger le phénotype de la souche *pfy1Δ* ainsi que celui de la souche *pfy1-111 arf3Δ*. La mutagenèse dirigée et la mutagenèse aléatoire ont été utilisées.

3.5.2.1 La production d'une seule copie d'Arf3p, mutée dans son site de liaison au GTP ou de « fast cycling » ne permet pas de corriger le cytosquelette d'actine des souches *pfy1Δ* et *pfy1-111 arf3Δ*

Par mutagenèse dirigée, quatre mutations ont été produites. Deux d'entre elles se trouvent à l'intérieur ou près du site supposé de liaison au GTP, il s'agit des mutations *Q71A* et *Q72A* où les glutamines à la position 71 et 72 ont été remplacés par des alanines (Figure 29). Pour les deux autres, les sites mutés se situent dans le site supposé de « fast cycling ». Il s'agit des mutations *L162A* et *L163A* où les leucines à la position 162 et 163 ont été remplacées par des alanines (Figure 29). Ces mutants d'Arf3p ont été introduits dans le plasmide centromérique pRS316 donnant les plasmides pAAL200 pour la mutation *Q71A*, pAAL201 pour *Q72A*, pAAL202 pour *L162A* et pAAL203 pour *L163A*. Tous ces plasmides ont été transformés dans les souches *pfy1Δ* et *pfy1-111 arf3Δ*. Aucun de ces mutants n'a permis de restaurer le cytosquelette d'actine de la souche *pfy1Δ*, ni celui de la souche *pfy1-111 arf3Δ* à 37°C (Tableau 8). Ces résultats laissent croire que ces sites sont très importants pour la protéine et que leurs

mutations empêchent son activité ou bien que la surexpression d'*ARF3* est indispensable pour des modifications phénotypiques soient visibles dans les deux souches utilisées.

3.5.2.2 Mille mutants d'*ARF3* obtenus par mutagenèse aléatoire clonés dans un plasmide centromérique mais aucun ne corrige le cytosquelette d'actine des souches *pfy1Δ* et *pfy1-111 arf3Δ*

La mutagenèse aléatoire avait pour but d'obtenir des mutants d'*ARF3*, clonés dans le plasmide pRS316, qui permettraient de corriger le phénotype de la souche *pfy1Δ*. Suite à cette mutagenèse, mille clones ont été testés. Le test consistait à mettre en culture des clones dans du milieu minimal sans uracile et de les faire croître à 37°C qui est une température non permissive pour la souche *pfy1Δ*. Si la croissance était possible pour un clone cela signifierait que le mutant d'*ARF3* se trouvant dans cette colonie possède une mutation permettant la synthèse de peu de protéines mais toujours actives. Aucun des mille clones testés n'a permis de restaurer la croissance de la souche à 37°C.

Seq1	MGNSISKVLGKLF	GSKEMKI	LMLGLDKAG	KT	TILYKLKLNKI	KTSTPT	VGFNVETV	TYKN
Seq2	MANSISKVLGKLF	GSKEMKI	LMLGLGKAG	KT	TILYKLKLNKI	KTSTPT	VGFNVETV	TYKN
	10	20	30	40	50	60		
Seq1	VKFNMMWDVGGQ	QRLRPLW	RHYF	PATTALIE	VIDSSARNR	MEEA	KEELYSTI	GEKEMENVV
Seq2	VKFNMMWDVGG	LQRLRPLW	-	HYPATTALII	VIDSSARNR	MEEET	KEELYSVI	GEKEMENVV
	70	80	90	100	110	120		
Seq1	LLVWANKQDLK	DAMK	PQEVSD	FELEKLN	LKNQPWC	VIGSNAL	SGQGLVE	GLSWISNNTNV
Seq2	LLVWANKQDLK	DAMK	PQEVSD	FELEKLN	LKNQPWC	VIGSNAG	SGQGLVE	GLSWESNNTNV
	130	140	150	160	170	180		
Seq1	PKK							
Seq2	PKK							

Figure 32 Représentation de la séquence en acides aminés de la protéine Arf3p sauvage ainsi que celle illustrant toutes les mutations obtenues par mutagenèse aléatoire inactivant la protéine

La séquence notée Seq1 correspond à la séquence en acides aminés de la protéine Arf3p sauvage alors que celle notée Seq2 correspond à la séquence de la même protéine mais avec l'ensemble des mutations observées suite à la mutagenèse aléatoire. Les acides aminés surlignés en rose sont ceux ayant été mutés lors de la mutagenèse aléatoire. Dans la séquence 2, le trait à la position 80 signifie que la mutation dans ce codon a engendré un codon STOP et donc un arrêt de la synthèse protéique. La séquence en gras allant de l'acide aminé 24 à l'acide aminé 31 correspond au site supposée de liaison au GDP qui se trouve à être une séquence homologue à Arf1p. L'autre séquence en gras allant de l'acide aminé 68 à 73, se trouvant elle aussi sur la séquence de la protéine Arf1p, serait le site de liaison au GTP.

Tableau 8 Résumé des effets obtenues sur le phénotype des souches *pfy1Δ* et *pfy1-111 arf3Δ* par la surexpression des mutations d'*ARF3*

	Souche <i>pfy1Δ</i> Correction du cytosquelette d'actine	Souche <i>pfy1-111 arf3Δ</i> Correction du cytosquelette d'actine
<i>ARF3WT</i>	+	Ø
<i>ARF3G2A</i> * multicopie	-	-
<i>ARF3N3A</i> multicopie	-	+
<i>ARF3D26G</i> * multicopie	-	-
<i>ARF3T31N</i> multicopie	-	-
<i>ARF3Q71L</i> * multicopie	-	-
<i>ARF3Q71A</i> centromérique	-	-
<i>ARF3L62G</i> * multicopie	-	-
<i>ARF3L162A</i> centromérique	-	-
<i>ARF3L163A</i> centromérique	-	-

* Résultats pour la surexpression dans la souche *pfy1Δ* tirés de l'étude de Marjorie Perron (Perron, 2004)

Un + signifie qu'il y a eu une correction du cytosquelette d'actine dans la souche mentionnée et un - signifie au contraire qu'il n'y a pas eu de correction.

Ø signifie que la surexpression du gène *ARF3* sauvage n'a pas été faite dans la souche *pfy1-111 arf3Δ*

3.6 Étude du cytosquelette d'actine de la souche haploïde *bud6Δ* et du bourgeonnement de la souche diploïde *bud6Δ bud6Δ* suite à la surexpression des supresseurs de la délétion de profiline

La protéine Bud6p, au même titre que la profiline, permet d'échanger de l'ADP pour de l'ATP sur les monomères d'actine favorisant ainsi leur polymérisation. D'après les résultats précédents, *ARF3* et *GEA2* ont été identifiés comme des supresseurs multicopies de la délétion de profiline, ce qui signifie que les protéines issues de ces gènes n'ont pas besoin de la profiline pour former des câbles d'actine. Comme Bud6p joue un rôle voisin de celui de la profiline, il s'avérait judicieux de vérifier si les protéines Arf3p et Gea2p utilisent plutôt de Bud6p pour former des câbles d'actine. Pour ce faire, *ARF3* par le plasmide pRMP100 et *GEA2* par le plasmide pGM53 ont été surexprimés dans la souche *bud6Δ* haploïde. En plus de ces deux gènes, sept autres gènes ont été aussi surexprimés dans la souche *bud6Δ* haploïde. Il s'agit de *MID2*, *RHO2*, *ROM1*, *ROM2*, *SYP1*, *SMY1* et *WSC1*, tous identifiés précédemment comme des supresseurs multicopies de la délétion de profiline (Marcoux *et al.*, 1998; Marcoux *et al.*, 2000). La souche *bud6Δ* haploïde ne présentant qu'un faible défaut dans l'organisation de son cytosquelette d'actine, l'étude a aussi été faite sur la souche diploïde *bud6Δ bud6Δ* qui présente un bourgeonnement aléatoire au lieu de bipolaire. Une éventuelle correction par l'un de ces supresseurs du bourgeonnement de cette dernière souche serait sans doute plus facilement identifiable.

3.6.1 Le cytosquelette d'actine de la souche haploïde *bud6Δ* n'est pas modifié par la surexpression des supresseurs de la délétion de profiline

À 30°C comme à 37°C, environ 85% des cellules de la souche *bud6Δ* haploïde possède un phénotype comparable à celui observé dans les cellules de la souche sauvage. Les quelques 15% de cellules restantes présentent un cytosquelette d'actine désorganisé avec des granules corticaux présents à la fois dans la cellule mère et dans le bourgeon et de plus les câbles d'actine sont désorientés (Figure 33). Lors de la surexpression des différents supresseurs mentionnés ci-dessus, à 30°C et à 37°C, aucune correction ou aggravation du phénotype de la souche *bud6Δ* n'a pu être observée (Figure 33). Ces résultats signifient peut-être que les gènes *ARF3* et *GEA2* n'ont pas besoin de la profiline pour former des câbles mais auraient besoin de Bud6p. Il en serait de même pour les autres supresseurs étudiés.

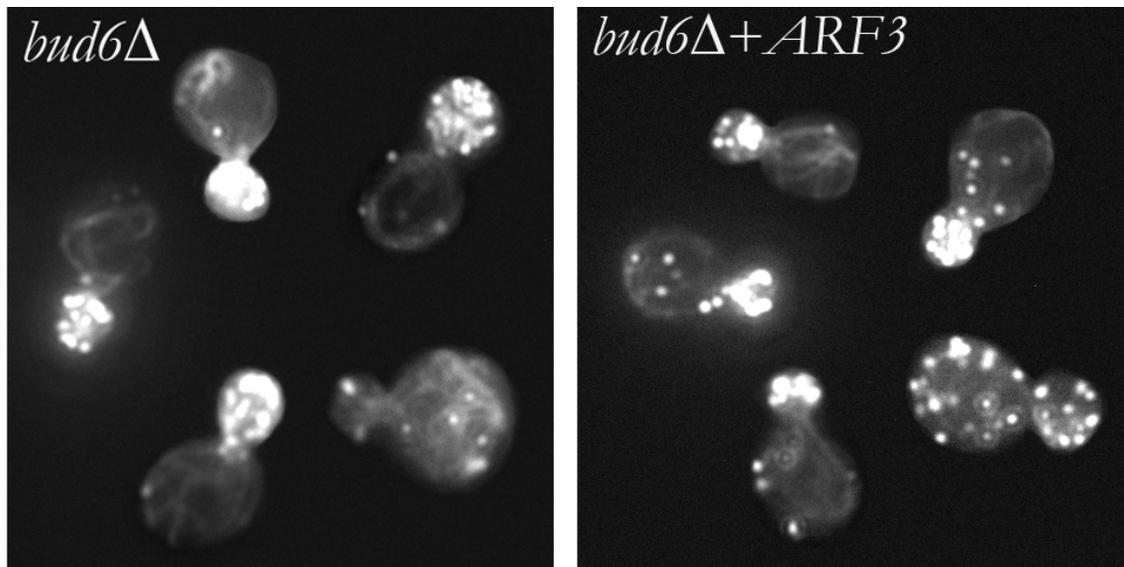


Figure 33 Cytosquelette d'actine de la souche *bud6Δ* haploïde

Les cellules provenant d'une phase exponentielle de croissance sont fixées avec du formaldéhyde puis mis en présence de phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor488 pour la visualisation de l'actine. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec le filtre approprié. À 30°C et à 37°C, les cellules déficientes en *BUD6* présentent un cytosquelette d'actine organisé mise à part dans 15% des cellules qui présentent un cytosquelette d'actine désorganisé. Les granules corticaux, dans cette petite proportion de cellules, sont répartis à la fois dans la cellule mère et dans le bourgeon et les câbles d'actine sont désorientés. Seuls les résultats obtenus à 30°C sont présentés sur la figure puisqu'à 37°C les mêmes résultats ont pu être observés. Suite à la surexpression d'*ARF3* dans *bud6Δ* aucune correction du cytosquelette d'actine de cette souche n'a pu être observée. Il en est de même lors de la surexpression de *GEA2*, *MID2*, *RHO2*, *ROM1*, *ROM2*, *SYP1*, *SMY1* et *WSC1*.

3.6.2 Le bourgeonnement de la souche diploïde *bud6Δ bud6Δ* n'est pas corrigé par la surexpression des suppresseurs de la délétion de profiline

Les cellules diploïdes de levures possèdent un bourgeonnement caractéristique dit bourgeonnement axial, c'est-à-dire que le bourgeonnement se fait alternativement aux extrémités de la cellule de façon à former des arcs de cercle au deux pôles. Dans la souche *bud6Δ* diploïde le bourgeonnement est aléatoire, c'est-à-dire que les cicatrices de bourgeonnement se retrouvent n'importe où à la surface de la cellule (Figure 34). La surexpression dans cette souche des mêmes gènes que dans la souche *bud6Δ* haploïde n'entraîne pas la restauration du bourgeonnement bipolaire (Figure 34). L'absence de correction du patron de bourgeonnement lors de la surexpression des suppresseurs de la délétion de profiline laisse croire que ces derniers ont besoin de Bud6p pour jouer leur rôle

dans l'organisation du cytosquelette d'actine. De plus, ils empruntent vraisemblablement le même sentier de signalisation que celui de *BUD6*.

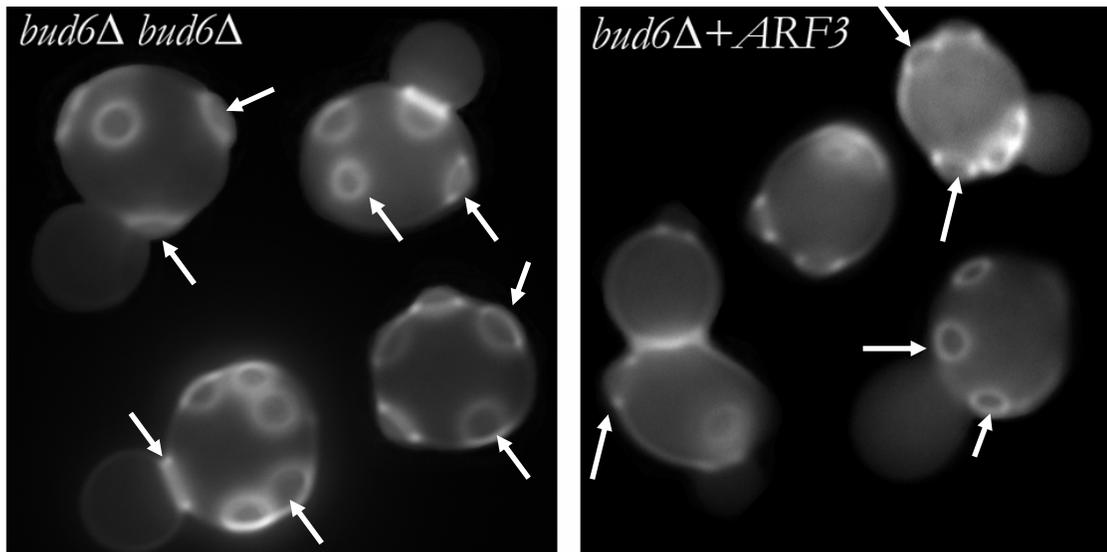


Figure 34 Bourgeonnement de la souche *bud6Δ bud6Δ*

Les cellules provenant d'une culture de nuit sont fixées avec du formaldéhyde puis les cicatrices de bourgeonnement présentant des dépôts de chitine sont colorées grâce au Calcofluor White. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec le filtre approprié. Les sites de bourgeonnement aléatoire sont indiqués par des flèches. Les cellules *bud6Δ bud6Δ* diploïde présentent un bourgeonnement aléatoire dans l'ensemble des cellules. Seuls les résultats obtenus à 30°C sont présentés sur la figure puisque à 37°C les mêmes résultats ont pu être observés. Suite à la surexpression d'*ARF3* dans *bud6Δ bud6Δ* le patron de bourgeonnement aléatoire de cette souche n'a pas été corrigé. Il en est de même lors de la surexpression de *GEA2*, *MID2*, *RHO2*, *ROM1*, *ROM2*, *SYP1*, *SMY1* et *WSC1*.

Chapitre 4 **DISCUSSION**

4.1 L'étude de la surexpression d'*ARF3* et de *GEA2*

L'étude de la surexpression d'*ARF3* et de *GEA2* a débuté dans deux souches présentant une délétion pour des gènes importants dans l'organisation du cytosquelette d'actine et plus particulièrement dans la formation des câbles d'actine. Il s'agit de la souche déficiente en profiline, *pfy1Δ* et de la souche mutante pour les formines Bni1p et Bnr1p, *bni1-FH2#1 bnr1Δ*.

L'étude de la surexpression d'*ARF3* et de *GEA2* s'est poursuivie dans différentes souches portant une mutation sur des gènes impliqués entre autre dans l'organisation du cytosquelette d'actine, l'endocytose, le bourgeonnement et la division cellulaire. L'observation du cytosquelette d'actine de toutes ces souches, suite à la surexpression de ces deux gènes, a permis de mettre en évidence des résultats intéressants notamment dans les souches *las17Δ*, *vrp1Δ*, *drs2Δ* et *spa2Δ*

4.1.1 Arf3p et Gea2p dans la formation des câbles d'actine

4.1.1.1 La formation des câbles dans la souche *pfy1Δ*

Lors de la recherche des supprimeurs multicopies des souches *pfy1Δ* et *pfy1-111 rho2Δ*, deux protéines ont été identifiées. Il s'agit des protéines Gea1p et Gea2p (Zakrzewska *et al.*, 2003). La surexpression des gènes codant pour ces protéines dans ces souches permet un repolarisation des granules corticaux dans le bourgeon, l'apparition de câbles d'actine visibles et la restauration de la croissance sur un milieu contenant de la caféine. La correction du cytosquelette d'actine de ces deux souches a permis de mettre en évidence que la formation des câbles d'actine par la surexpression de *GEA2* est indépendante de la profiline et ne dépend pas non plus de la voie de signalisation passant par Rho2p (Zakrzewska *et al.*, 2003). Par la suite, la recherche de cibles potentielles pour Gea1p et Gea2p a mené à l'étude des protéines de type Arf puis à l'identification d'Arf3p comme supprimeur multicopie de la souche *pfy1-111 rho2Δ*. En effet, la surexpression du gène *ARF3* dans cette souche provoque la diminution de la taille des cellules ainsi que la repolarisation des granules corticaux dans le bourgeon. Toutefois, quelques cellules présentent un bourgeon allongé. La surexpression de ce même gène dans la souche avec la délétion de profiline, *pfy1Δ*, permet une suppression partielle du phénotype associé à cette délétion. Effectivement, une diminution de la taille des cellules et une

repolarisation des granules corticaux dans le bourgeon sont observés (Figure 15). Ces résultats sont le fruit de la surexpression du gène *ARF3* cloné dans le plasmide YEp24 (Perron, 2004; Zakrzewska *et al.*, 2003). Dans le cadre de l'étude actuelle, la surexpression du gène *ARF3*, dans différentes souches mutantes, notamment dans la souche *pfy1Δ*, a été faite par l'intermédiaire du gène *ARF3* cloné dans le plasmide pRS426 (pRMP100). De manière inattendue, les résultats obtenus avec le plasmide pRMP100 dans la souche *pfy1Δ* ne concordent pas avec les résultats antérieurs obtenus lors de la surexpression d'*ARF3* cloné dans le plasmide YEp24. En effet, la surexpression d'*ARF3* par le plasmide pRMP100 dans la souche *pfy1Δ* entraîne comme précédemment une diminution de la taille des cellules, la repolarisation des granules, mais cette fois-ci, des câbles d'actine sont présents contrairement à ce qui avait été observé auparavant. De plus, la croissance devient possible à 37°C et sur un milieu contenant de la caféine (Figure 16 et Figure 17). L'expression d'*ARF3* par le plasmide pRMP200 (plasmide centromérique) ne permet pas de corriger le cytosquelette d'actine de la souche déficiente en profiline (Figure 16 et Figure 17). *ARF3* apparaît donc comme un suppresseur multicopie de la délétion de profiline. La formation des câbles par *ARF3* dans *pfy1Δ* ne dépend donc pas de la présence de la profiline, tout comme *GEA2*.

Ces résultats tout aussi intéressants que surprenants sont tout de même explicables. La différence pouvant expliquer cette divergence dans les résultats réside dans l'utilisation des deux plasmides différents pour surexprimer le même gène. Toutefois, les deux plasmides utilisés, YEp24 et pRS426, se ressemblent beaucoup. Tous les deux présentent la même origine de répllication de levure 2 μm avec les séquences REP3 et FRT nécessaire pour la multiplicité des copies (entre 10 et 40 copies par cellule) et le même taux de ségrégation. La seule différence pouvant être à l'origine de ce phénomène résiderait dans la stabilité du plasmide YEp24 qui serait affectée suite au clonage du gène *ARF3*. Il a été démontré que la taille et la séquence du fragment cloné peuvent influencer négativement la stabilité et le niveau d'expression du plasmide YEp24. Ces phénomènes ne sont pas observés lors de l'utilisation du plasmide pRS426 (Christianson *et al.*, 1992; Rose & Broach, 1991). Donc le clonage d'*ARF3* et de son promoteur, représentant un fragment de 1000 paires de bases, affecte vraisemblablement la stabilité de YEp24 mais pas celle du plasmide pRS426 qui semble être moins sensible au type de fragment inséré. Le nombre supérieur de copies du plasmide pRMP100 produit par cellule par rapport à celui obtenu avec le plasmide YEp24 pourrait aussi

expliquer les résultats différents obtenus avec pRMP100. Il s'avère donc que le changement de plasmide lors de l'étude de la surexpression d'*ARF3* soit à l'origine de l'apparition des câbles d'actine visibles dans la souche *pfy1Δ*.

4.1.1.2 La formation des câbles d'actine par la surexpression d'*ARF3* et de *GEA2* dans *pfy1Δ* est dépendante des formines

Chez *S. cerevisiae*, la formation des câbles et le maintien de la polarité cellulaire lors de la croissance dépendent de la présence des formines. Il en existe deux chez la levure ayant une fonction partiellement redondante, Bni1p et Bnr1p, pour lesquels la délétion des deux gènes est létale (Evangelista *et al.*, 2003; Imamura *et al.*, 1997). Des récents travaux ont mis en évidence l'existence d'une fonction distincte entre ces deux formines. Cette différence réside dans le fait que le recrutement de Bud6p, permettant au même titre que la profiline l'échange nucléotidique sur les monomères d'actine, se fait uniquement sur Bni1p (Moseley & Goode, 2005).

Les cellules issues de la délétion de profiline ainsi que celles du double mutant thermosensible *bni1-FH2#1 bnr1Δ* (PY3517) présentent un même défaut dans l'organisation de leur cytosquelette d'actine à savoir des granules corticaux repartis à la fois dans la cellule mère et dans le bourgeon et l'absence de câbles d'actine visibles. Étant donné que la surexpression d'*ARF3* et de *GEA2* dans la souche *pfy1Δ* permet l'apparition de câbles d'actine visibles, il a été vérifié si la formation des câbles d'actine était aussi dépendante des formines. Pour ce faire, les surexpressions d'*ARF3* et celle de *GEA2* ont été faites dans le double mutant *bni1-FH2#1 bnr1Δ* (PY3517), mais aucune correction n'a pu être observée (Figure 19). La surexpression des deux gènes à l'étude entraîne donc la correction du cytosquelette de la souche *pfy1Δ* mais ne parvient pas à surpasser l'absence de ces deux formines Bni1p et Bnr1p. Ces résultats permettent d'affirmer que la formation des câbles d'actine par les protéines Arf3p et Gea2p est dépendante des formines mais indépendante de la profiline. Dans la souche *pfy1Δ*, la présence de Bud6p n'est pas suffisante pour surmonter l'absence de profiline dans les cellules et permettre la formation de câbles d'actine visibles. D'après ces dernières interprétations, les résultats obtenus dans la délétion de profiline et les connaissances actuelles du sujet, il est possible de formuler une hypothèse stipulant que la formation des câbles d'actine suite à la surexpression d'*ARF3* ou de *GEA2* dans la souche *pfy1Δ* serait dû à la suractivation de la

protéine (Moseley *et al.*, 2004). L'importance de Bud6p pour Arf3p et Gea2p ainsi que pour d'autres supprimeurs de la profiline sera discutée un peu plus loin car ceci a fait l'objet d'une partie de mon étude.

4.1.1.3 L'importance de Spa2p pour Gea2p

La protéine Spa2p est une protéine non essentielle contrôlant la polarité cellulaire mais dont la fonction moléculaire précise n'est pas encore très bien définie. Son importance dans le maintien de la polarité cellulaire est appuyée par sa localisation dans la cellule au cours du cycle cellulaire. En effet, elle est retrouvée au futur site de bourgeonnement puis au site de croissance polarisée tout au long du cycle cellulaire. De plus, la délétion du gène *SPA2* affecte le patron de bourgeonnement de la cellule qui devient aléatoire ce qui confirme son importance dans la polarité cellulaire (Snyder, 1989). Cette protéine fait aussi partie du complexe protéique nommé polarisome composé des protéines Bni1p, Bud6p et de Pea2p, ce qui lui confère indirectement un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Irazoqui & Lew, 2004; Shih *et al.*, 2005). Il a été remarqué aussi que la délétion de *SPA2* affecte légèrement l'association entre Bni1p et l'actine filamenteuse (Tcheperegine *et al.*, 2005).

Lors de la surexpression de *GEA2* dans la souche *spa2Δ*, les cellules augmentent légèrement de taille et deviennent plus rondes ce qui les rend différentes des cellules *spa2Δ* dont le phénotype est comparable à celui de la souche sauvage (Figure 21). De plus, l'organisation du cytosquelette d'actine est altérée, les granules corticaux sont peu nombreux et répartis à la fois dans la cellule mère et dans le bourgeon. Quant aux câbles d'actine, ils sont présents en grand nombre et orientés aléatoirement dans la cellule (Figure 21). Pour ce qui est de la surexpression d'*ARF3* dans cette même souche, aucune modification phénotypique n'a pu être observée (Figure 21). La surexpression de *GEA2* perturbe l'organisation du cytosquelette d'actine et surtout l'orientation des câbles d'actine dans la souche *spa2Δ* alors que celle d'*ARF3* n'affecte en rien l'orientation des ces derniers. Cet effet sur le cytosquelette d'actine de la souche *spa2Δ* suite à la surexpression de *GEA2* est surprenant mais tout de même explicable. Sachant que la souche *spa2Δ* présente un défaut de polarité et que Gea2p est impliquée dans la formation des câbles d'actine dépendamment des formines, une tentative d'explication peut être formulée. Suite à la surexpression de *GEA2* dans cette souche, il se pourrait que l'importante quantité de protéines Gea2p produite stimule la production de câbles par l'entremise des formines dont

elle est dépendante. Cette hypothèse expliquerait la présence en grand nombre de câbles d'actine. Cependant, le fait que la souche *spa2Δ* présente un défaut de polarité ne permet pas à ces câbles d'actine ni aux granules corticaux de s'orienter correctement en direction bourgeon, ce qui expliquerait l'aspect désorganisé du cytosquelette d'actine. Pour ce qui est de la surexpression d'*ARF3*, elle ne semble pas affecter les cellules de la souche *spa2Δ* ou du moins pas autant que celle de *GEA2*. Pourtant, d'après nos résultats précédents, cette protéine aurait aussi besoin de Bni1p pour la formation des câbles d'actine. Il se peut qu'Arf3p soit prise en charge par des protéines autres que celles impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine, contrôlant ainsi l'excès de cette protéine et n'influençant pas alors ce dernier.

4.1.2 L'implication d'Arf3p et de Gea2p dans la formation des granules corticaux et l'endocytose

Suite à la surexpression d'*ARF3* et de *GEA2* dans les souches *las17Δ* et *vrp1Δ*, seule celle d'*ARF3* a permis d'observer une correction parfaite du cytosquelette d'actine de ces deux souches (Figure 22 Figure 23). Comme mentionné dans l'introduction (voir section 1.2.4.1), les protéines Las17p et Vrp1p sont des joueurs majeurs pour l'activation du complexe Arp2/3 servant à la formation des granules corticaux. Ces résultats suggèrent donc qu'Arf3p serait impliquée tout comme Las17p et Vrp1p dans la formation et dans la polarisation des granules corticaux. La correction du cytosquelette d'actine de ces deux souches sous-entend aussi que la présence des protéines Las17p et Vrp1p n'est pas nécessaire pour la formation et la polarisation des granules corticaux lorsqu'*ARF3* est surexprimé. L'implication d'Arf3p dans la formation des granules corticaux se ferait donc par un sentier de signalisation parallèle à celui emprunté par Las17p et Vrp1p menant vraisemblablement lui aussi à l'activation du complexe Arp2/3. Récemment, la démonstration d'une interaction directe entre Lsb5p, une protéine jouant un rôle dans l'endocytose, Arf3p, Las17p et Sla1p a été faite par (Costa *et al.*, 2005). L'implication d'Arf3p dans ce complexe et sa localisation cellulaire autour des vacuoles laissent croire qu'Arf3p interviendrait dans le processus d'endocytose. L'implication d'Arf3p dans la formation des granules corticaux et possiblement dans le processus d'endocytose est tout à fait envisageable puisque ces deux phénomènes sont reliés (voir section 1.5). De plus, les résultats de cette équipe permettent d'envisager que le rôle joué par Arf3p dans l'organisation des granules corticaux se ferait par le biais du complexe mettant en jeu Lsb5p et des protéines

associées à ce dernier jouant aussi un rôle dans la formation des granules corticaux comme Sla1p ou bien encore Rvs167p (Ayscough *et al.*, 1999; Pruyne & Bretscher, 2000). L'absence de correction du phénotype de ces souches suite à la surexpression de *GEA2* peut tout de même amener à deux interprétations possibles. La première serait que Gea2p ne soit tout simplement pas impliquée dans la formation des granules corticaux mais uniquement dans la formation des câbles d'actine. La deuxième au contraire serait que Gea2p intervienne dans la formation des granules corticaux en passant directement par Las17p et Vrp1p et non parallèlement comme Arf3p ce qui impliquerait que ces protéines soient présentes pour que Gea2p puisse jouer son rôle.

D'autres résultats ont été obtenus dans la souche *drs2Δ* suggérant l'importance de la protéine Drs2p pour l'activité d'Arf3p et de Gea2p. La protéine Drs2p est impliquée dans la formation de vésicules de sécrétion dépendantes de la clathrine. Cette protéine est aussi recrutée lors de la formation des vésicules sécrétoires tardives, dont la formation des vacuoles ainsi que dans le processus d'endocytose (Chen *et al.*, 1999; Hua *et al.*, 2002). La présence de Drs2p est aussi indispensable à la localisation de Gea2p dans la cellule (Gall *et al.*, 2002). Les cellules de la souche *drs2Δ* ne présentent pas de défaut de croissance ni de modification phénotypique aux températures utilisées. Suite à la surexpression de *GEA2* dans cette souche, les cellules changent morphologiquement, devenant allongées formant des bâtonnets mais leur cytosquelette d'actine reste assez bien organisé. Toutefois, la croissance est inhibée à 37°C (Figure 20). Il semble donc que l'excès de Gea2p dans les cellules mutantes *drs2Δ* soit néfaste pour le maintien de la morphologie cellulaire et la croissance à 37°C. Lors de la surexpression d'*ARF3* dans cette même souche, les cellules s'allongent à 30°C et à 37°C avec en plus à cette dernière température, une désorganisation de l'ensemble du cytosquelette d'actine ainsi qu'une disparition des granules corticaux (Figure 20). De plus, la surexpression d'*ARF3* semble elle aussi avoir un effet toxique pour les cellules mutantes *drs2Δ* mais dans une plus faible proportion que celle de *GEA2*. D'après ces résultats et les connaissances sur le sujet, une interprétation possible serait que la délocalisation de Gea2p dans la souche *drs2Δ* (Gall *et al.*, 2002) nuirait à l'activation d'Arf3p par le GEF Gea2p. Ainsi une quantité importante de la protéine Arf3p inactive se retrouverait dans la cellule devenant alors toxique pour celle-ci. Il en serait de même pour les résultats obtenus suite à la surexpression de *GEA2*. En effet, la protéine Gea2p présente déjà dans la cellule ne peut pas se localiser correctement. Si en plus

on augmente le niveau de Gea2p suite à la surexpression de *GEA2*, la cellule ne saura que faire de cette quantité de protéines devenant alors toxique pour celle-ci. Ces résultats suggèrent aussi que Gea2p serait probablement un GEF pour Arf3p comme il avait été suggéré dans l'hypothèse de départ. De plus, les protéines Arf3p, Drs2p et Gea2p seraient peut-être impliquées dans un même sentier de signalisation influençant la morphologie cellulaire et la formation des granules corticaux mais le mécanisme d'action ne peut être expliqué pour le moment.

4.2 L'étude de la localisation d'Arf3p et de sa fonction cellulaire

La protéine Arf3p s'avère être un suppresseur de la souche associée à la délétion de profiline. Cependant, sa fonction au sein de la cellule n'est pas encore bien définie. L'étude de la localisation cellulaire de cette protéine est un bon moyen pour en connaître davantage sur sa fonction cellulaire. Pour ce faire, l'observation de la protéine de fusion Arf3p-GFP fut d'abord faite dans la souche sauvage. La protéine Arf3p est localisée à la membrane plasmique, autour des vacuoles ainsi que dans le bourgeon. Cette dernière localisation est plus prononcée au début de la croissance du bourgeon mais reste toujours présente au fur et à mesure de sa croissance (Figure 24). Ces différentes localisations sont confirmées par les travaux de l'équipe de Huang ainsi que plus récemment par ceux de l'équipe de Costa (Costa *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2003). La localisation d'Arf3p au site de bourgeonnement et dans le bourgeon en croissance confirme son implication dans la polarisation et dans la formation des câbles d'actine. De plus, la localisation d'Arf3p autour des vacuoles laisse fortement présager son implication dans l'endocytose. Les travaux de l'équipe de Costa mettent en évidence l'existence d'une interaction entre Arf3p et Lsb5p, une protéine jouant un rôle dans l'endocytose (Costa & Ayscough, 2005; Costa *et al.*, 2005). Cette liaison sous-entend donc qu'Arf3p jouerait un rôle dans l'endocytose mais aussi dans la voie de formation des granules corticaux puisque ces derniers sont directement reliés à l'endocytose.

Une localisation aussi précise d'Arf3p doit nécessiter des interactions avec des protéines spécifiques. Dans le but de mettre en évidence les protéines impliquées dans ce phénomène et de préciser sa fonction au sein de la cellule, l'étude de la localisation de la protéine de fusion Arf3p-GFP a été faite dans plusieurs souches mutantes. La localisation cellulaire d'Arf3p a été observée dans 15 souches portant une délétion génique pour un gène codant soit pour une

protéine supposément importante pour l'activation d'Arf3p comme Gea2p, ou retrouvée en double hybride avec Arf3p comme Drs2p (Saccharomyces Genome Database) ou impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Dans 11 de ces souches la localisation cellulaire d'Arf3p est comparable à celle observée dans la cellule sauvage, à savoir dans le bourgeon, à la membrane plasmique ainsi qu'autour des vacuoles. Toutefois, une délocalisation d'Arf3p-GFP a été mise en évidence dans quatre souches testées : *bni1Δ*, *drs2Δ*, *gea1Δ* et *gea2Δ*. Cette délocalisation se caractérise par une absence d'émission de la fluorescence dans la souche *gea2Δ* et par une émission diffuse dans le cytoplasme des trois autres souches (Figure 24B). La première interprétation plausible, permettant d'expliquer cette absence de fluorescence dans la souche *gea2Δ*, serait qu'en l'absence de Gea2p la synthèse de la protéine Arf3p-GFP soit impossible. La deuxième interprétation résiderait dans le fait qu'en l'absence de Gea2p, la protéine Arf3p-GFP serait produite mais elle serait incapable d'acquérir sa structure tertiaire ce qui entraînerait inévitablement sa dégradation et donc une absence d'émission de fluorescence. Ce phénomène a d'ailleurs été observé par Kruse *et al.* (2002) lors de l'étude de la localisation de la protéine Myo4p dans les souches *she2Δ* et *she3Δ*. Pour vérifier si effectivement cette absence de fluorescence est due à la dégradation des protéines Arf3p-GFP produites, il serait intéressant de vérifier dans la souche *gea2Δ* le niveau d'expression d'ARNm d'Arf3p-GFP et de le comparer à la quantité finale de protéine Arf3p retrouvée dans la cellule. Cette même expérience devrait être faite aussi dans la souche sauvage.

La délocalisation d'Arf3p dans ces quatre souches suggère l'importance des protéines Bni1p, Drs2p, Gea1p et Gea2p pour sa localisation cellulaire. Mise à part la protéine Drs2p, l'ensemble de ces protéines joue un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine. La protéine Bni1p est impliquée dans la formation des câbles d'actine ainsi que dans le maintien de la polarité cellulaire au cours de la croissance du bourgeon (Dong *et al.*, 2003). La délocalisation d'Arf3p-GFP dans la souche *bni1Δ* confirme le rôle d'Arf3p dans l'organisation du cytosquelette d'actine et plus précisément dans la formation des câbles d'actine. La dépendance des formines pour la formation des câbles d'actine par Arf3p et la délocalisation de cette protéine dans la souche *bni1Δ* permet aussi de préciser qu'éventuellement, dans un sentier de signalisation, Arf3p agirait sur Bni1p. De plus, cette délocalisation confirme un rôle pour Arf3p dans le maintien de la polarité cellulaire, rôle déjà souligné par l'équipe de Huang

lors de l'étude du bourgeonnement de la souche *arf3Δ* (Huang *et al.*, 2003). Les protéines Gea1p et Gea2p sont des GEF pour les protéines de type Arf. Même si le rôle premier de ces deux protéines se situe dans le transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et le Golgi, ces protéines seraient aussi impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Zakrzewska *et al.*, 2003). Une délocalisation d'Arf3p dans ces deux souches *gea1Δ* et *gea2Δ* vient de nouveau souligner l'implication d'Arf3p dans l'organisation du cytosquelette d'actine. De plus, ces résultats laissent sous-entendre que l'activation d'Arf3p se ferait par les GEF Gea1p ou Gea2p. Enfin, la protéine transmembranaire du trans-Golgi, Drs2p, aussi importante pour la formation des vésicules à clathrine, est requise pour la localisation de Gea2p (Gall *et al.*, 2002) ainsi que pour celle d'Arf3p comme il a été mis en évidence lors de l'étude actuelle (Figure 24). Ces résultats suggèrent que la délocalisation de Gea2p dans la souche *drs2Δ* serait à l'origine de la délocalisation d'Arf3p lors de la surexpression d'*ARF3*-GFP. Cette interprétation est appuyée par le fait qu'Arf3p est aussi délocalisée dans la souche *gea2Δ*. La présence de Gea2p serait donc importante pour la localisation d'Arf3p et donc probablement pour son activation étant donné que Gea2p est un GEF pour les protéines de type Arf. De plus, des études d'interaction génétique ont mis en évidence la létalité du double mutant *drs2Δ bni1Δ* (Schuldiner *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2001). Ces données suggèrent un rôle pour Drs2p dans l'organisation du cytosquelette d'actine en empruntant des sentiers communs à Arf3p et Gea2p et un autre rôle dans la polarité cellulaire par l'interaction génétique de *DRS2* avec *BNI1*. Pour finir, il serait judicieux de vérifier s'il existe une interaction génétique entre *ARF3* et *DRS2*, entre *ARF3* et *GEA1* et entre *ARF3* et *BNI1* par la création de doubles mutants, ce qui permettra de compléter l'étude des sentiers de signalisation déjà mis en place. Le double mutant *arf3Δ gea2Δ* a été fait dans le cadre de l'étude actuelle et les résultats seront discutés par la suite.

4.3 L'implication de *BNI1* mini, *GEA2*, *RHO2* et *SYPI* dans le maintien de la polarité cellulaire et la sélection du site de bourgeonnement

La souche *arf3Δ* présente un bourgeonnement aléatoire dans environ 40% des cellules à 30°C et dans environ 90% des cellules à 37°C (Figure 25). Ce défaut de bourgeonnement suggère qu'Arf3p joue un rôle important dans la polarité cellulaire (Huang *et al.*, 2003). La

surexpression de plusieurs gènes, identifiés ou non comme des suppresseurs de *ppy1Δ*, a permis de surpasser ce défaut. Il s'agit de la surexpression de *BNI1* mini, *GEA2*, *RHO2* et *SYP1* (Figure 25 et Figure 26). C'est avec la surexpression de *GEA2* que la meilleure correction est obtenue puisqu'à 30°C seulement 5% des cellules présentent un bourgeonnement aléatoire tandis qu'à 37°C seule une correction partielle a pu être observée (Figure 25). Pour ce qui est des résultats avec les trois autres gènes, à 30°C le bourgeonnement aléatoire est retrouvé dans environ 10 à 20% des cellules alors qu'à 37°C la correction n'est toujours que partielle (Figure 26). Ces résultats suggèrent que ces protéines Bni1p, Gea2p, Rho2p et Syp1p sont reliées fonctionnellement avec Arf3p mais sans être impliquées directement dans le même sentier de signalisation que cette dernière. Seule la création des doubles mutants permettrait de montrer si une interaction génétique existe entre *ARF3* et chacun de ces gènes et ensuite de mettre en place de possibles sentiers de signalisation. Ces résultats confirment un rôle déjà connu pour Bni1p et Rho2p dans la sélection et le maintien de la polarité cellulaire et permet d'avancer que Gea2p et Syp1p seraient elles aussi impliquées dans ces deux fonctions déjà connues pour Arf3p (Huang *et al.*, 2003). De plus, la correction du bourgeonnement aléatoire d'*arf3Δ* par la surexpression de *BNI1* mini suggère que dans un sentier de signalisation impliquant Arf3p et Bni1p, Bni1p ne contrôlerait pas l'activité d'Arf3p dans la cellule mais sans doute celui de d'autres protéines agissant en aval de Bni1p.

4.4 L'interaction génétique entre *ARF3* et *GEA2*

Comme mentionné précédemment, Arf3p-GFP est délocalisée dans la souche *gea2Δ*. Ce résultat a donc mené à la création du double mutant *arf3Δ gea2Δ* afin de vérifier s'il existe une interaction génétique entre ces deux gènes et de plus si l'activation d'Arf3p est sous la dépendance du GEF Gea2p. L'identification d'éventuelles caractéristiques du double mutant s'est faite surtout par l'observation de l'organisation du cytosquelette d'actine et de la croissance sur un milieu contenant de la caféine. La souche *arf3Δ* ne présente pas de réelles caractéristiques phénotypiques anormaux, les cellules étant petites avec un cytosquelette d'actine organisé comme dans une cellule sauvage. Seule une petite proportion des cellules, environ 30%, présente à 37°C des doubles bourgeons avec un cytosquelette d'actine dépolarisé (Figure 28). Les cellules de la souche *gea2Δ* sont un peu plus grosses que les cellules sauvages avec un cytosquelette d'actine bien organisé (Figure 28). Ces deux souches poussent aussi très

bien en présence de caféine. L'observation du cytosquelette d'actine dans le double mutant *arf3Δ gea2Δ* a permis de détecter une détérioration dans son organisation et le phénotype de cette nouvelle souche ne correspond pas à celui associé à chacune des délétions utilisées pour la création du double mutant. À 30°C, la moitié des cellules présente un cytosquelette d'actine désorganisé avec des granules corticaux répartis à la fois dans la cellule mère et dans le bourgeon et des câbles d'actine orientés aléatoirement (Figure 28). À 37°C, le cytosquelette d'actine de l'ensemble des cellules est désorganisé et les cellules sont plus grosses (Figure 28). La croissance sur un milieu contenant de la caféine est comparable à celle de chacun des mutants seuls. Donc, la double délétion affecte le cytosquelette d'actine mais pas la croissance.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure qu'une interaction génétique existe entre *ARF3* et *GEA2*. Toutefois, comme le phénotype du double mutant est différent du phénotype observé dans la souche *arf3Δ* et dans la souche *gea2Δ*, ceci signifie que Gea2p est probablement responsable de l'activation d'Arf3p mais possiblement aussi de d'autres protéines de type Rho. La surexpression de *GEA2* dans la souche *arf3Δ* a permis de corriger le bourgeonnement aléatoire de cette dernière à 30°C et à 37°C. Cette correction du bourgeonnement confirme une fois de plus que Gea2p est impliquée dans plusieurs autres sentiers de signalisation distincts de celui faisant intervenir Arf3p. En effet, si Gea2p activait seulement Arf3p, il n'y aurait pas eu de modification du phénotype lors de la création du double mutant et de plus la surexpression de *GEA2* n'aurait pas permis de corriger le bourgeonnement de la *arf3Δ*. De plus, la création de ce double mutant vient renforcer l'idée qu'Arf3p est une protéine différentes des deux autres protéines de type Arf retrouvées chez la levure, et plus particulièrement Arf1p. En effet, le double mutant *arf1Δ gea2Δ* est létale alors que *arf3Δ gea2Δ* ne l'est pas (Spang *et al.*, 2001).

4.5 L'importance des domaines fonctionnels d'Arf3p pour son activité

L'étude des domaines fonctionnels d'Arf3p, déjà entreprise par Marjorie Perron, a permis de mettre en évidence l'importance du site de myristoylation en N-terminale pour l'activité de la protéine (Perron, 2004). D'autres mutations avaient été réalisées dans les sites supposés de liaison au GDP et au GTP, en s'appuyant sur les résultats obtenus pour Arf1p, entraînant à chaque fois une inactivation de la protéine (Perron, 2004). Ces résultats laissaient croire que les

sites mutés étaient vraiment importants pour l'activité de la protéine et faisaient possiblement partie des régions fonctionnelles potentielles d'Arf3p. Afin d'en apprendre un peu plus sur la localisation des domaines fonctionnels d'Arf3p, l'étude actuelle a été poursuivie en utilisant cette fois la mutagenèse dirigée et la mutagenèse aléatoire dans le plasmide multicopie pRS426 et le plasmide centromérique pRS316. L'utilisation de ces deux approches a permis de mettre en place deux stratégies d'études.

La première idée était de produire par mutagenèse dirigée et aléatoire des mutants d'*ARF3* qui, clonés dans un plasmide multicopie, mènerait à la synthèse de plusieurs copies d'une protéine non fonctionnelle ne permettant pas de corriger le cytosquelette d'actine de souches *pfy1Δ* et *pfy1-111 arf3Δ*. En effectuant ceci, l'objectif était de confirmer l'importance des domaines fonctionnels déjà mis en évidence pour l'activité d'Arf3p. Pour ce faire, six mutants ont été construits par mutagenèse dirigée avec une mutation affectant soit l'acide aminé du site de myristoylation (*ARF3G2A*) ou celui le juxtaposant (*ARF3N3A*), soit la prétendue zone de liaison au GTP (*ARF3Q71L*) ou au GDP (*ARF3D26G* et *ARF3T31N*) ou bien encore le site supposé de « fast cycling » (*ARF3L162G*), site où il pourrait y avoir un échange rapide entre le GDP et le GTP rendant la protéine toujours active. Toutes ces mutations ont entraîné une inactivation de la protéine Arf3p observable par l'absence de correction du cytosquelette d'actine des souches à l'étude. Seule la mutation se situant après le site de myristoylation a causé la correction du cytosquelette de la souche *pfy1-111 arf3Δ*. Ces résultats permettent de conclure que les régions mutées sont probablement des sites importants pour l'activité et la stabilité de la protéine Arf3p. De plus, la correction du phénotype de la souche *pfy1Δ* et *pfy1-111 arf3Δ* par le mutant *ARF3N3A* et non par le mutant *ARF3G2A* est en accord avec la conclusion voulant que l'ajout d'un groupement myristate, indispensable à l'activité de la protéine, s'effectue bien sur le deuxième acide aminé de la protéine et non sur le troisième. La mutagenèse aléatoire d'*ARF3* a quant à elle permis de mettre en évidence huit nouveaux sites importants pour l'activité de la protéine, répartis sur l'ensemble de la séquence d'Arf3p. L'emplacement de ces mutations ne correspond pas aux sites supposés importants pour le fonctionnement de la protéine. Cependant la majorité des mutations se situent dans le deuxième tiers de la séquence d'Arf3p (Figure 32). Ces résultats suggèrent que les acides aminés présents dans les domaines supposés fonctionnels d'Arf3p ne sont pas les seuls importants pour l'activité de la protéine. Des mutations se sont aussi retrouvées dans la

séquence avant l'ATG donnant des informations sur l'étendue de la séquence promotrice puisque des mutations de -54 à -381 paires de base avant le codon de départ entraînent une inactivation de l'expression de la protéine. De plus, une mutation en -10 avant l'ATG a aussi provoqué l'inactivation de la protéine puisque la surexpression de ce mutant dans la souche *pfy1Δ* ne provoque pas la correction de son cytosquelette d'actine. Le promoteur semble donc s'étendre sur un assez grand domaine avant l'ATG qui ne peut toutefois pas être défini précisément.

La deuxième idée était de produire, par mutagenèse dirigée et aléatoire des mutants d'*ARF3* qui, clonés dans un plasmide centromérique, conduiraient à la synthèse d'un faible niveau de protéines continûment actives qui corrigerait le cytosquelette d'actine des souches *pfy1Δ* et *pfy1-111 rho2Δ*. Pour ce faire, la mutagenèse dirigée a été faite dans les sites de liaison au GTP (*ARF3Q71A* et *ARF3Q72A*) et dans le site présumé de « fast cycling » (*ARF3L162A* et *ARF3L163A*) mais sans permettre aucune correction du cytosquelette d'actine de ces souches. Encore une fois, ces résultats suggèrent que ces sites sont probablement importants pour l'activité de la protéine. Les mutants d'*ARF3* obtenus par mutagenèse aléatoire dans un plasmide centromérique n'ont en aucun cas permis de restaurer le cytosquelette d'actine des souches étudiées. Ceci peut donc signifier que les sites mutés sont encore importants pour l'activité ou la stabilité de la protéine et que leurs mutations entraînent son inactivation. Une autre explication plausible serait que même si la mutation n'affecte pas l'activité ou la stabilité de la protéine le fait que celle-ci ne soit présente qu'en faible quantité ne permet pas de corriger le cytosquelette d'actine de ces souches. Dans ce cas, *ARF3* serait donc bien un suppresseur multicopie de la délétion de profiline. Toutes ces mutations réalisées couvrant l'ensemble de la séquence codante donnent lieu en général à une inactivation de la protéine ce qui laisse croire que plusieurs des acides aminés présents sont utiles et indispensables à la production d'une protéine fonctionnelle.

4.6 La formation des câbles d'actine par les suppresseurs de la délétion de profiline dans *pfy1Δ* est dépendante de Bud6p

D'après nos données précédentes, il est possible d'affirmer que la formation des câbles d'actine dans la souche *pfy1Δ* suite à la surexpression différents suppresseurs identifiés dont *ARF3* et *GEA2* est indépendante de la profiline. Au même titre que la profiline, Bud6p intervient dans

la polymérisation des câbles d'actine par son association avec la formine Bni1p et non Bnr1p (Moseley & Goode, 2005; Moseley *et al.*, 2004). Nous suggérons donc que Bud6p pourrait être suractivée directement ou indirectement lors de la surexpression d'*ARF3*, de *GEA2* et des autres supresseurs ce qui entraînerait la formation des câbles d'actine. Pour vérifier cette hypothèse, de nombreux supresseurs de la délétion de profiline, *MID2*, *RHO2*, *ROM1*, *ROM2*, *SYP1*, *SMY1* et *WSC1*, ainsi qu'*ARF3* et *GEA2* ont été surexprimés dans la souche haploïde *bud6Δ*. La majorité des cellules issues de cette souche présentent un cytosquelette d'actine organisé comme dans une cellule sauvage mise à part que dans environ 15% d'entre elles où leur cytosquelette d'actine est désorganisé. La surexpression de ces supresseurs dans la souche *bud6Δ* n'a pas entraîné la correction du cytosquelette d'actine des quelques 15% de cellules présentant un défaut dans l'organisation de leur cytosquelette d'actine. Ces résultats appuient l'idée que la surexpression d'*ARF3*, de *GEA2* et des autres supresseurs suractivent Bud6p pour conduire à la formation des câbles d'actine dans la souche *pfy1Δ*. Cette conclusion est appuyée par les résultats obtenus suite à l'étude du bourgeonnement de la souche *bud6Δ bud6Δ*. En effet, lors de la surexpression de ces mêmes supresseurs le patron de bourgeonnement des cellules de cette souche demeure toujours aléatoire. Donc que la surexpression de l'un de ces supresseurs dans la souche *pfy1Δ* pourrait permettre de suractiver Bud6p aboutissant à une augmentation de l'échange de l'ADP pour de l'ATP sur les monomères d'actine-G qui pourrait compenser celui de la profiline. Cette augmentation accrue de Bud6p serait à l'origine de la formation des câbles d'actine dans la souche *pfy1Δ*. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, il serait judicieux de vérifier s'il existe une interaction génétique entre *BUD6* et ces différents supresseurs par la création de doubles mutants.

4.7 Modèle

Les données du double hybride (Saccharomyces Genome Database), de la chromatographie d'affinité (Saccharomyces Genome Database) ainsi que les résultats obtenus suite à l'étude actuelle, me permettent de proposer un modèle impliquant Arf3p et Gea2p ainsi que d'autres protéines énumérées dans la discussion (Figure 35). Par ce modèle, il est possible d'identifier les protéines essentielles à l'action d'Arf3p dans la formation des câbles d'actine et des granules corticaux et d'établir un ordre séquentiel d'intervention. (Figure 35).

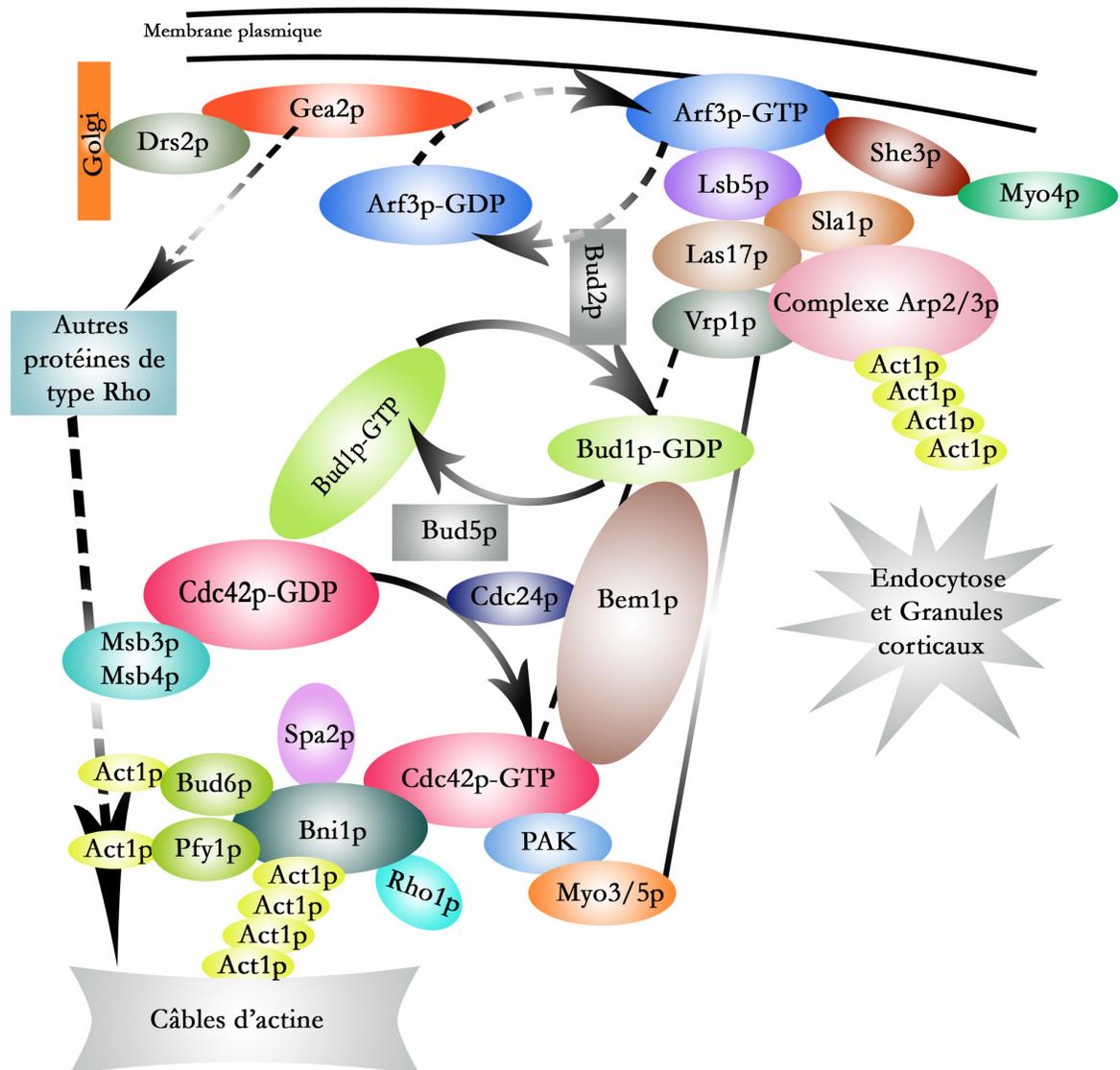


Figure 35 Modèle proposé d'après l'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude actuelle impliquant Arf3p et Gea2p.

Il est supposé que l'activation d'Arf3p, suite à sa liaison au GTP, est faite en partie par le GEF, Gea2p et que son inactivation serait le fruit de l'hydrolyse du GTP en GDP par la GAP, Bud2p, trouvée en double hybride avec Arf3p. Celle-ci est aussi la GAP de Bud1p, qui elle-même est activée par le GEF, Bud5p. Une fois que Bud1p est activée par sa liaison au GTP, elle va à son tour participer à l'activation de Cdc42p par le GEF, Cdc24p qui se trouve aussi lié à Bem1p. Cet ensemble d'interactions va servir à la formation des câbles d'actine. La protéine Arf3p-GTP, une fois activée se lie aussi à la protéine Lsb5p qui est aussi liée à la protéine Las17p. Cette dernière permet notamment l'activation du complexe Arp2/3p, complexe protéique servant à la formation des granules corticaux et par le fait même au processus d'endocytose. Les flèches en pointillées signifient que le sentier de signalisation n'est pas clairement identifié mais juste supposé.

Chapitre 5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

5.1 Conclusion

L'importance du cytosquelette d'actine dans la cellule exige une régulation très précise de celui-ci par de nombreuses protéines notamment la profiline. La délétion du gène *PFY1*, codant pour cette protéine, n'est pas létale mais occasionne un phénotype anormal dans les cellules. Les cellules deviennent grosses et rondes, croissent mal et leur cytosquelette d'actine est totalement désorganisé. Cette désorganisation est marquée par une absence de câbles d'actine visibles et par la présence de granules corticaux repartis à la fois dans la cellule mère et dans le bourgeon. Le laboratoire du Dr Pallotta a identifié différents suppresseurs de la délétion de profiline, *pfy1Δ*, dont les gènes *GEA1* et *GEA2*. Les protéines Gea1p et Gea2p, issues de l'expression des ces deux gènes, sont des facteurs d'échange nucléotidique pour les protéines de type Arf et sont connues pour être impliquées dans le transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et le Golgi. Par cette découverte, un nouveau rôle a pu être attribué à ces protéines dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Par la suite, la recherche de cibles pour ces protéines a mené à l'étude des protéines de type Arf, où seule la surexpression d'*ARF3* dans la souche *pfy1Δ* a occasionné une correction partielle du cytosquelette d'actine de cette souche (Zakrzewska *et al.*, 2003). Il est important de préciser que ces résultats sont le fruit de la surexpression d'*ARF3* cloné dans le plasmide multicopie YEp24. Dans le cadre de l'étude actuelle, l'utilisation du plasmide pRS426 a nécessité des études de caractérisation phénotypique dans la souche *pfy1Δ* afin de voir si les résultats seraient les mêmes que suite à l'utilisation de YEp24. Et là, de manière inattendue ce ne fut pas le cas. La surexpression d'*ARF3* cloné dans le plasmide pRS426 permet de restaurer la croissance sur un milieu contenant de la caféine et à 37°C, de diminuer la taille des cellules, de repolariser les granules corticaux dans le bourgeon et fait notable, de former des câbles d'actine. Cette dernière modification phénotypique, obtenue suite à l'utilisation de pRS426 en remplacement de YEp24 pour surexprimer *ARF3*, serait peut-être dû à un plus grande stabilité du plasmide ainsi qu'à la présence d'un nombre plus élevé de copies du plasmide pRMP100. De plus, la production d'un faible niveau de protéine suite à l'expression d'*ARF3* par le plasmide pRMP200 dans *pfy1Δ* ne permettant pas de corriger son phénotype, une conclusion peut être émise stipulant qu'*ARF3* est un suppresseur multicopie de la délétion *pfy1Δ* au même titre que *GEA2*.

Les résultats obtenus lors de l'étude de la surexpression d'*ARF3* et de *GEA2* permettent d'affirmer qu'Arf3p et Gea2p jouent bel et bien un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Tout comme pour Gea2p, la démonstration de l'indépendance de la profiline mais de la dépendance des formines pour la formation des câbles d'actine par Arf3p a été faite. De plus, la localisation de la protéine de fusion Arf3p-GFP au site de bourgeonnement et dans le bourgeon en croissance dans une cellule sauvage ainsi que sa délocalisation lors de sa surexpression en l'absence de *BNI1* confirment son implication dans le maintien de la polarité cellulaire et dans l'organisation du cytosquelette d'actine. La surexpression d'*ARF3* comme celle de *GEA2* dans la souche *bud6Δ* n'entraîne pas la correction du cytosquelette de cette souche ni la correction du bourgeonnement aléatoire de la souche diploïde *bud6Δ bud6Δ*. En effet, Bud6p joue un rôle similaire à celui de la profiline, à savoir elle permet d'échanger de l'ADP pour de l'ATP sur les monomères d'actine-G et facilite par la suite leur translocation sur le domaine FH2 de la formine Bni1p afin de former les filaments d'actine. D'après tous ces résultats, une hypothèse peut être émise suggérant que la formation des câbles d'actine lors de la surexpression d'*ARF3* et de *GEA2* dans la souche *pfy1Δ* se fait par l'entremise de Bni1p et Bud6p. L'étude actuelle a aussi permis de démontrer, que, en plus d'être impliquée dans la formation des câbles d'actine, Arf3p intervient aussi dans la formation des granules corticaux. En effet, la surexpression d'*ARF3* dans les souches *las17Δ* et *vrp1Δ* permet respectivement la réapparition et la repolarisation des granules corticaux. Les protéines issues de ces gènes participent à l'activation du complexe Arp2/3p responsable de la formation des granules corticaux. Il est donc justifié de penser que l'implication d'Arf3p dans un sentier de signalisation parallèle à celui emprunté par Las17p et Vrp1p pour activer le complexe Arp2/3 et permettre la formation de granules corticaux est plausible (Figure 35). Dernièrement, Costa *et al.* (2005) une équipe a montré qu'Arf3p était liée physiquement à une protéine impliquée dans l'endocytose, Lsb5p, liant aussi Las17p et Sla1p suggérant ainsi l'implication d'Arf3p dans ce processus. Un autre indice de l'implication d'Arf3p dans l'endocytose est sa localisation autour des vacuoles. La localisation d'Arf3p autour des vacuoles, sa liaison avec Lsb5p et son implication dans la formation des granules corticaux convergent vers l'idée qu'Arf3p serait impliquée de près ou de loin dans le processus d'endocytose. Toutefois, la souche *arf3Δ* ne présente pas de défaut d'endocytose (Huang *et al.*, 2003; Lavoie, 2006). D'après les résultats de l'étude actuelle et les connaissances actuelles sur le sujet, il est possible d'affirmer que la

protéine Arf3p est la seule qui, à ce jour, joue un rôle aussi bien dans la voie signalisation pour la formation des câbles d'actine que dans celle conduisant à la formation des granules corticaux.

La surexpression de *GEA2*, de *BNI1* mini et des suppresseurs de la profiline *RHO2* et *SYP1* dans la souche *arf3Δ* corrigent, au moins partiellement, le bourgeonnement aléatoire de cette souche. Les résultats obtenus dans la souche *arf3Δ* suite à la surexpression de *BNI1* mini, *GEA2*, *RHO2* et *SYP1* confirment le rôle connu pour les protéines Bni1p et Rho2p dans l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire (Madden & Snyder, 1998; Pruyne *et al.*, 2004) et font la preuve de l'implication de Gea2p et de Syp1p dans ces deux mêmes fonctions au même titre qu'Arf3p. Cette correction partielle du bourgeonnement d'*arf3Δ* suite à la surexpression de *BNI1* mini et *RHO2* suggère aussi l'existence seulement d'une interaction fonctionnelle puisque la mise en évidence d'une interaction génétique entre *ARF3* et ces gènes par la création de doubles mutants n'a pas encore été faite. *ARF3* et *SYP1* présentent seulement une interaction fonctionnelle. En effet la création du double mutant par Élyse Lavoie n'a pas permis de mettre en évidence une interaction génétique entre ces gènes (Lavoie, 2006). Pour ce qui est de *GEA2*, une interaction génétique entre *ARF3* et *GEA2* a été montrée lors de la création du double mutant.

Finalement, la localisation spécifique d'Arf3p est dépendante des protéines Bni1p, Drs2p, Gea1p et Gea2p qui ont un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Cette dépendance de Gea2p pour la localisation d'Arf3p confirme en évidence l'implication d'Arf3p dans le cytosquelette d'actine ainsi que le rôle potentiel de GEF de Gea2p pour Arf3p. La délocalisation de Gea2p (Gall *et al.*, 2002) ainsi que celle d'Arf3p dans la souche *drs2Δ* permettent de formuler deux hypothèses. La première serait que la présence de Drs2p est nécessaire à la localisation de Gea2p et d'Arf3p et la seconde que la délocalisation de Gea2p dans cette souche soit à l'origine de la délocalisation d'Arf3p. Cette dernière hypothèse est confirmée par la délocalisation d'Arf3p observée dans la souche *gea2Δ*. Ces résultats permettent une fois de plus de conclure sur l'importance de la présence de Gea2p pour la localisation d'Arf3p et donc possiblement pour son activation puisque Gea2p est une GEF pour les protéines de type Arf. Toutefois, la présence d'une interaction génétique entre *ARF3* et *GEA2* ainsi que la correction par *GEA2* du bourgeonnement d'*arf3Δ* suggèrent que Gea2p

agit sur d'autres protéines de type Rho, impliquées elles aussi dans la formation des câbles d'actine. Ces protéines restent toutefois à être identifiées. De plus, la délocalisation d'Arf3p-GFP dans *bni1Δ* et la dépendance des formines pour la formation des câbles d'actine par la surexpression d'*ARF3* suggère que la protéine Bni1p se situe en aval de la protéine Arf3p dans la voie de formation des câbles d'actine, ce qui expliquerait aussi la correction du bourgeonnement de la souche *arf3Δ*.

Enfin, la mutagenèse dirigée d'Arf3p a permis de confirmer que la myristoylation, qui est une modification lipidique, est propre à l'acide aminé à la position deux de la protéine et qu'elle est essentielle à l'activité de la protéine. Cependant, nous ne pouvons toujours pas affirmer avec exactitude l'emplacement du site de liaison du GTP, du GDP et ni celui de l'activité GTPasique puisque quelque soit le niveau d'expression de la protéine et les mutations entreprises dans ces sites aucune correction du cytosquelette d'actine des souches *pfy1Δ* et *pfy1-111 arf3Δ* n'a pu être mise en évidence. De plus, la mutagenèse aléatoire d'*ARF3* a permis de mettre en évidence que des sites répartis sur l'ensemble de la séquence protéique peuvent se révéler importants pour son activité ce qui rend d'autant plus difficile l'identification formelle des sites fonctionnels d'Arf3p. La mutagenèse aléatoire d'*ARF3* a permis d'apporter des informations quant à l'étendu du présumé promoteur d'Arf3p. Par nos résultats, nous pouvons penser que son promoteur s'étend au moins jusqu'à -381 paires de bases avant l'ATG.

Tous ces résultats mènent à la conclusion qu'Arf3p est impliquée à la fois dans la formation des câbles d'actine et dans la formation des granules corticaux. D'après les connaissances actuelles, il s'agit de la seule protéine jouant un rôle dans ces deux sentiers de signalisation. De plus, cette protéine est impliquée dans la polarité cellulaire et possiblement dans le processus d'endocytose.

5.2 Perspectives

Les connaissances acquises aux cours de l'étude actuelle permettent d'affirmer qu'Arf3p est l'une des seules protéines à jouer un rôle à la fois dans la formation des granules corticaux et des câbles d'actine. De plus, la mise en évidence d'une interaction génétique entre Arf3p et Gea2p suggère que Gea2p est aussi un GEF pour d'autres protéines de type Rho intervenant dans la formation des câbles d'actine. La protéine Arf3p s'est aussi vue attribuer un rôle potentiel dans l'endocytose par son implication dans la formation des granules corticaux, sa localisation cellulaire et sa liaison avec Lsb5p. Pour parfaire l'étude actuelle, il serait judicieux de la poursuivre en s'appuyant sur les points proposés lors de la discussion. Il faudrait notamment créer des doubles mutants *arf3Δ bni1Δ*, *arf3Δ bud6Δ*, *arf3Δ drs2Δ* et *arf3Δ gea1Δ*. Malgré la démonstration d'une interaction génétique entre Arf3p et Gea2p lors de la création du double mutant, une étude biochimique entre ces protéines permettrait de confirmer ou d'infirmer qu'un échange de GDP pour du GTP se fait. Il serait peut-être pertinent aussi de créer le double mutant *ppy1-111 bud6Δ*, puisque *ppy1Δ bud6Δ* est létale, et de surexprimer *ARF3* et *GEA2* dans cette nouvelle souche ainsi que l'ensemble des suppresseurs de *ppy1Δ* identifié. Toutefois ils ne devraient pas corriger le phénotype de cette souche s'ils ont effectivement besoin de *BUD6* pour corriger le cytosquelette d'actine. Il serait également possible de surexprimer *ARF3* dans un mutant thermosensible du complexe Arp2/3 puisque la délétion d'*ARP2* et d'*ARP3* est létale. Ceci serait fait dans le but de vérifier si Arf3p intervient dans la formation des granules corticaux en passant par ce complexe comme c'est le cas pour Las17p et Vrp1p. Finalement, l'implication d'Arf3p dans l'endocytose pourrait être confirmée par une étude d'endocytose (Wiederkehr *et al.*, 2001).

Références

- Adams, A. E., Botstein, D. & Drubin, D. G. (1991). Requirement of yeast fimbrin for actin organization and morphogenesis in vivo. *Nature*, **354**(6352), 404-8.
- Adams, A. E. & Pringle, J. R. (1984). Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **98**(3), 934-45.
- Amberg, D. C., Zahner, J. E., Mulholland, J. W., Pringle, J. R. & Botstein, D. (1997). Aip3p/Bud6p, a yeast actin-interacting protein that is involved in morphogenesis and the selection of bipolar budding sites. *Mol Biol Cell*, **8**(4), 729-53.
- Ayscough, K. R. (2005). Defining protein modules for endocytosis. *Cell*, **123**(2), 188-90.
- Ayscough, K. R., Eby, J. J., Lila, T., Dewar, H., Kozminski, K. G. & Drubin, D. G. (1999). Sla1p is a functionally modular component of the yeast cortical actin cytoskeleton required for correct localization of both Rho1p-GTPase and Sla2p, a protein with talin homology. *Mol Biol Cell*, **10**(4), 1061-75.
- Balcer, H. I., Goodman, A. L., Rodal, A. A., Smith, E., Kugler, J., Heuser, J. E. & Goode, B. L. (2003). Coordinated regulation of actin filament turnover by a high-molecular-weight Srv2/CAP complex, cofilin, profilin, and Aip1. *Curr Biol*, **13**(24), 2159-69.
- Brown, F. D., Rozelle, A. L., Yin, H. L., Balla, T. & Donaldson, J. G. (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol*, **154**(5), 1007-17.
- Brown, J. L., Jaquenoud, M., Gulli, M. P., Chant, J. & Peter, M. (1997). Novel Cdc42-binding proteins Gic1 and Gic2 control cell polarity in yeast. *Genes Dev*, **11**(22), 2972-82.
- Cabib, E., Drgonova, J. & Drgon, T. (1998). Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, **67**, 307-33.
- Carlier, M. F. (1991). Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem*, **266**(1), 1-4.
- Carlier, M. F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G. X., Hong, Y., Chua, N. H. & Pantaloni, D. (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol*, **136**(6), 1307-22.
- Casamayor, A. & Snyder, M. (2002). Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Curr Opin Microbiol*, **5**(2), 179-86.
- Caviston, J. P., Longtine, M., Pringle, J. R. & Bi, E. (2003). The role of Cdc42p GTPase-activating proteins in assembly of the septin ring in yeast. *Mol Biol Cell*, **14**(10), 4051-66.
- Chang, F. & Peter, M. (2003). Yeasts make their mark. *Nat Cell Biol*, **5**(4), 294-9.
- Chantalat, S., Courbeyrette, R., Senic-Matuglia, F., Jackson, C. L., Goud, B. & Peyroche, A. (2003). A novel Golgi membrane protein is a partner of the ARF exchange factors Gea1p and Gea2p. *Mol Biol Cell*, **14**(6), 2357-71.
- Chantalat, S., Park, S. K., Hua, Z., Liu, K., Gobin, R., Peyroche, A., Rambourg, A., Graham, T. R. & Jackson, C. L. (2004). The Arf activator Gea2p and the P-type ATPase Drs2p interact at the Golgi in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, **117**(Pt 5), 711-22.
- Chen, C. Y. & Graham, T. R. (1998). An *arf1Δ* synthetic lethal screen identifies a new clathrin heavy chain conditional allele that perturbs vacuolar protein transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **150**(2), 577-89.
- Chen, C. Y., Ingram, M. F., Rosal, P. H. & Graham, T. R. (1999). Role for Drs2p, a P-type ATPase and potential aminophospholipid translocase, in yeast late Golgi function. *J Cell Biol*, **147**(6), 1223-36.

- Chenevert, J. (1994). Cell polarization directed by extracellular cues in yeast. *Mol Biol Cell*, **5**(11), 1169-75.
- Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H. & Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, **110**(1), 119-22.
- Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A., Falkow, S. & Brown, A. J. (1997). Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology*, **143** (Pt 2), 303-11.
- Costa, R. & Ayscough, K. R. (2005). Interactions between Sla1p, Lsb5p and Arf3p in yeast endocytosis. *Biochem Soc Trans*, **33**(Pt 6), 1273-5.
- Costa, R., Warren, D. T. & Ayscough, K. R. (2005). Lsb5p interacts with actin regulators Sla1p and Las17p, ubiquitin and Arf3p to couple actin dynamics to membrane trafficking processes. *Biochem J*, **387**(Pt 3), 649-58.
- Dewar, H., Warren, D. T., Gardiner, F. C., Gourlay, C. G., Satish, N., Richardson, M. R., Andrews, P. D. & Ayscough, K. R. (2002). Novel proteins linking the actin cytoskeleton to the endocytic machinery in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **13**(10), 3646-61.
- Donaldson, J. G. (2003). Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem*, **278**(43), 41573-6.
- Dong, Y., Pruyne, D. & Bretscher, A. (2003). Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J Cell Biol*, **161**(6), 1081-92.
- Donnelly, S. F., Pocklington, M. J., Pallotta, D. & Orr, E. (1993). A proline-rich protein, verprolin, involved in cytoskeletal organization and cellular growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **10**(3), 585-96.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, **16**(13), 6127-45.
- Duncan, M. C., Cope, M. J., Goode, B. L., Wendland, B. & Drubin, D. G. (2001). Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol*, **3**(7), 687-90.
- Egile, C., Rouiller, I., Xu, X. P., Volkman, N., Li, R. & Hanein, D. (2005). Mechanism of filament nucleation and branch stability revealed by the structure of the Arp2/3 complex at actin branch junctions. *PLoS Biol*, **3**(11), e383.
- Engqvist-Goldstein, A. E. & Drubin, D. G. (2003). Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 287-332.
- Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci*, **117**(Pt 8), 1291-300.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M. S., Chow, C. J., Adames, N., Pringle, J. R., Peter, M. & Boone, C. (1997). Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science*, **276**(5309), 118-22.
- Evangelista, M., Klebl, B. M., Tong, A. H., Webb, B. A., Leeuw, T., Leberer, E., Whiteway, M., Thomas, D. Y. & Boone, C. (2000). A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, **148**(2), 353-62.
- Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D. C., Boone, C. & Bretscher, A. (2002). Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol*, **4**(1), 32-41.
- Evangelista, M., Zigmond, S. & Boone, C. (2003). Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci*, **116**(Pt 13), 2603-11.
- Falck, S., Paavilainen, V. O., Wear, M. A., Grossmann, J. G., Cooper, J. A. & Lappalainen, P. (2004). Biological role and structural mechanism of twinfilin-capping protein interaction. *EMBO J*, **23**(15), 3010-9.

- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. & Paris, S. (1995). Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg²⁺ levels. *J Biol Chem*, **270**(3), 1337-41.
- Fujiwara, T., Tanaka, K., Mino, A., Kikyo, M., Takahashi, K., Shimizu, K. & Takai, Y. (1998). Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **9**(5), 1221-33.
- Gall, W. E., Geething, N. C., Hua, Z., Ingram, M. F., Liu, K., Chen, S. I. & Graham, T. R. (2002). Drs2p-dependent formation of exocytic clathrin-coated vesicles in vivo. *Curr Biol*, **12**(18), 1623-7.
- Gallwitz, D. & Sures, I. (1980). Structure of a split yeast gene: complete nucleotide sequence of the actin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**(5), 2546-50.
- Geli, M. I. & Riezman, H. (1998). Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. *J Cell Sci*, **111**(Pt 8), 1031-7.
- Gladfelter, A. S., Zyla, T. R. & Lew, D. J. (2004). Genetic interactions among regulators of septin organization. *Eukaryot Cell*, **3**(4), 847-54.
- Goldschmidt-Clermont, P. J., Furman, M. I., Wachsstock, D., Safer, D., Nachmias, V. T. & Pollard, T. D. (1992). The control of actin nucleotide exchange by thymosin β 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol Biol Cell*, **3**(9), 1015-24.
- Goldschmidt-Clermont, P. J., Machesky, L. M., Baldassare, J. J. & Pollard, T. D. (1990). The actin-binding protein profilin binds to PIP₂ and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science*, **247**(4950), 1575-8.
- Goode, B. L., Drubin, D. G. & Lappalainen, P. (1998). Regulation of the cortical actin cytoskeleton in budding yeast by twinfilin, a ubiquitous actin monomer-sequestering protein. *J Cell Biol*, **142**(3), 723-33.
- Goode, B. L. & Rodal, A. A. (2001). Modular complexes that regulate actin assembly in budding yeast. *Curr Opin Microbiol*, **4**(6), 703-12.
- Goode, B. L., Rodal, A. A., Barnes, G. & Drubin, D. G. (2001). Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p. *J Cell Biol*, **153**(3), 627-34.
- Goodman, A., Goode, B. L., Matsudaira, P. & Fink, G. R. (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* calponin/transgelin homolog Scp1 functions with fimbrin to regulate stability and organization of the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, **14**(7), 2617-29.
- Haarer, B. K. & Brown, S. S. (1990). Structure and function of profilin. *Cell Motil Cytoskeleton*, **17**(2), 71-4.
- Haarer, B. K., Petzold, A. S. & Brown, S. S. (1993). Mutational analysis of yeast profilin. *Mol Cell Biol*, **13**(12), 7864-73.
- Heinisch, J. J., Lorberg, A., Schmitz, H. P. & Jacoby, J. J. (1999). The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **32**(4), 671-80.
- Hoffman, C. S. & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**(2-3), 267-72.
- Hua, Z., Fatheddin, P. & Graham, T. R. (2002). An essential subfamily of Drs2p-related P-type ATPases is required for protein trafficking between Golgi complex and endosomal/vacuolar system. *Mol Biol Cell*, **13**(9), 3162-77.

- Huang, C. F., Buu, L. M., Yu, W. L. & Lee, F. J. (1999). Characterization of a novel ADP-ribosylation factor-like protein (yARL3) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **274**(6), 3819-27.
- Huang, C. F., Liu, Y. W., Tung, L., Lin, C. H. & Lee, F. J. (2003). Role for Arf3p in development of polarity, but not endocytosis, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **14**(9), 3834-47.
- Imai, J., Toh-e, A. & Matsui, Y. (1996). Genetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* RHO3 gene, encoding a rho-type small GTPase, provides evidence for a role in bud formation. *Genetics*, **142**(2), 359-69.
- Imamura, H., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Kamei, T., Takahashi, K., Sasaki, T. & Takai, Y. (1997). Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, **16**(10), 2745-55.
- Irazaqui, J. E. & Lew, D. J. (2004). Polarity establishment in yeast. *J Cell Sci*, **117**(Pt 11), 2169-71.
- Jackson, C. L. & Casanova, J. E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol*, **10**(2), 60-7.
- Jackson, C. L. & Hartwell, L. H. (1990). Courtship in *S. cerevisiae*: both cell types choose mating partners by responding to the strongest pheromone signal. *Cell*, **63**(5), 1039-51.
- Jin, H. & Amberg, D. C. (2000). The secretory pathway mediates localization of the cell polarity regulator Aip3p/Bud6p. *Mol Biol Cell*, **11**(2), 647-61.
- Johnson, D. I. (1999). Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**(1), 54-105.
- Kadota, J., Yamamoto, T., Yoshiuchi, S., Bi, E. & Tanaka, K. (2004). Septin ring assembly requires concerted action of polarisome components, a PAK kinase Cla4p, and the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **15**(12), 5329-45.
- Kahn, R. A., Clark, J., Rulka, C., Stearns, T., Zhang, C. J., Randazzo, P. A., Terui, T. & Cavenagh, M. (1995). Mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* ARF1. *J Biol Chem*, **270**(1), 143-50.
- Kahn, R. A. & Gilman, A. G. (1984). Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin. *J Biol Chem*, **259**(10), 6228-34.
- Kaiser, C., Michaelis, S. & Mitchell, A. (1994). Lithium acetate yeast transformation. In *Methods in yeast genetics*, ed. C. S. H. L. Press. Cold Spring Harbor, NY, pp. 133-134.
- Kaksonen, M., Sun, Y. & Drubin, D. G. (2003). A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell*, **115**(4), 475-87.
- Kaksonen, M., Toret, C. P. & Drubin, D. G. (2005). A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell*, **123**(2), 305-20.
- Kang, P. J., Sanson, A., Lee, B. & Park, H. O. (2001). A GDP/GTP exchange factor involved in linking a spatial landmark to cell polarity. *Science*, **292**(5520), 1376-8.
- Karpova, T. S., Tatchell, K. & Cooper, J. A. (1995). Actin filaments in yeast are unstable in the absence of capping protein or fimbrin. *J Cell Biol*, **131**(6 Pt 1), 1483-93.
- Kawasaki, R., Fujimura-Kamada, K., Toi, H., Kato, H. & Tanaka, K. (2003). The upstream regulator, Rsr1p, and downstream effectors, Gic1p and Gic2p, of the Cdc42p small GTPase coordinately regulate initiation of budding in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells*, **8**(3), 235-50.

- Kay, B. K., Yamabhai, M., Wendland, B. & Emr, S. D. (1999). Identification of a novel domain shared by putative components of the endocytic and cytoskeletal machinery. *Protein Sci*, **8**(2), 435-8.
- Kim, K., Yamashita, A., Wear, M. A., Maeda, Y. & Cooper, J. A. (2004). Capping protein binding to actin in yeast: biochemical mechanism and physiological relevance. *J Cell Biol*, **164**(4), 567-80.
- Korn, E. D., Carlier, M. F. & Pantaloni, D. (1987). Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science*, **238**(4827), 638-44.
- Kubler, E. & Riezman, H. (1993). Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J*, **12**(7), 2855-62.
- Lappalainen, P. & Drubin, D. G. (1997). Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature*, **388**(6637), 78-82.
- Lappalainen, P., Fedorov, E. V., Fedorov, A. A., Almo, S. C. & Drubin, D. G. (1997). Essential functions and actin-binding surfaces of yeast cofilin revealed by systematic mutagenesis. *EMBO J*, **16**(18), 5520-30.
- Lavoie, E. (2006). Étude de *SYP1* dans l'organisation du cytosquelette d'actine chez *Saccharomyces cerevisiae*. In *Faculté des Sciences et de Génie*, Vol. Mémoire de Maîtrise, Université LAVAL. Québec, pp. 112.
- Lechler, T., Jonsdottir, G. A., Klee, S. K., Pellman, D. & Li, R. (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), 261-70.
- Lee, F. J., Moss, J. & Vaughan, M. (1992). Human and Giardia ADP-ribosylation factors (ARFs) complement ARF function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **267**(34), 24441-5.
- Lee, F. J., Patton, W. A., Lin, C. Y., Moss, J., Vaughan, M., Goldman, N. D. & Syin, C. (1997). Identification and characterization of an ADP-ribosylation factor in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, **87**(2), 217-23.
- Lee, F. J., Stevens, L. A., Kao, Y. L., Moss, J. & Vaughan, M. (1994). Characterization of a glucose-repressible ADP-ribosylation factor 3 (ARF3) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **269**(33), 20931-7.
- Lee, M. H., Min, M. K., Lee, Y. J., Jin, J. B., Shin, D. H., Kim, D. H., Lee, K. H. & Hwang, I. (2002). ADP-ribosylation factor 1 of Arabidopsis plays a critical role in intracellular trafficking and maintenance of endoplasmic reticulum morphology in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **129**(4), 1507-20.
- Levin, D. E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **69**(2), 262-91.
- Li, R. (1997). Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, **136**(3), 649-58.
- Liu, H. P. & Bretscher, A. (1989). Disruption of the single tropomyosin gene in yeast results in the disappearance of actin cables from the cytoskeleton. *Cell*, **57**(2), 233-42.
- Machesky, L. M. & Gould, K. L. (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol*, **11**(1), 117-21.
- Machesky, L. M. & Poland, T. D. (1993). Profilin as a potential mediator of membrane-cytoskeleton communication. *Trends Cell Biol*, **3**(11), 381-5.
- Madania, A., Dumoulin, P., Grava, S., Kitamoto, H., Scharer-Brodbeck, C., Soulard, A., Moreau, V. & Winsor, B. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of human Wiskott-Aldrich syndrome protein Las17p interacts with the Arp2/3 complex. *Mol Biol Cell*, **10**(10), 3521-38.

- Madaule, P., Axel, R. & Myers, A. M. (1987). Characterization of two members of the rho gene family from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**(3), 779-83.
- Madden, K. & Snyder, M. (1998). Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu Rev Microbiol*, **52**, 687-744.
- Manning, B. D., Padmanabha, R. & Snyder, M. (1997). The Rho-GEF Rom2p localizes to sites of polarized cell growth and participates in cytoskeletal functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **8**(10), 1829-44.
- Marcoux, N., Bourbonnais, Y., Charest, P. M. & Pallotta, D. (1998). Overexpression of MID2 suppresses the profilin-deficient phenotype of yeast cells. *Mol Microbiol*, **29**(2), 515-26.
- Marcoux, N., Cloutier, S., Zakrzewska, E., Charest, P. M., Bourbonnais, Y. & Pallotta, D. (2000). Suppression of the profilin-deficient phenotype by the *RHO2* signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **156**(2), 579-92.
- Matsui, Y. & Toh, E. A. (1992). Yeast *RHO3* and *RHO4* ras superfamily genes are necessary for bud growth, and their defect is suppressed by a high dose of bud formation genes *CDC42* and *BEM1*. *Mol Cell Biol*, **12**(12), 5690-9.
- Millard, T. H., Sharp, S. J. & Machesky, L. M. (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J*, **380**(Pt 1), 1-17.
- Moon, A. & Drubin, D. G. (1995). The ADF/cofilin Proteins: Stimulus-responsive Modulators of Actin dynamics. *Mol. Biol. Cell*, **6**(11), 1423-1431.
- Moon, A. L., Janmey, P. A., Louie, K. A. & Drubin, D. G. (1993). Cofilin is an essential component of the yeast cortical cytoskeleton. *J Cell Biol*, **120**(2), 421-35.
- Moreau, V., Madania, A., Martin, R. P. & Winson, B. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* actin-related protein Arp2 is involved in the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, **134**(1), 117-32.
- Moseley, J. B. & Goode, B. L. (2005). Differential Activities and Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Formin Proteins Bni1 and Bnr1 by Bud6. *J Biol Chem*, **280**(30), 28023-33.
- Moseley, J. B., Sagot, I., Manning, A. L., Xu, Y., Eck, M. J., Pellman, D. & Goode, B. L. (2004). A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol Biol Cell*, **15**(2), 896-907.
- Moss, J. & Vaughan, M. (1998). Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem*, **273**(34), 21431-4.
- Mullins, R. D. & Pollard, T. D. (1999). Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol*, **9**(2), 244-9.
- Munn, A. L. (2001). Molecular requirements for the internalisation step of endocytosis: insights from yeast. *Biochim Biophys Acta*, **1535**(3), 236-57.
- Ng, R. & Abelson, J. (1980). Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**(7), 3912-6.
- Oehlen, L. J. & Cross, F. R. (1998). The role of Cdc42 in signal transduction and mating of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**(15), 8556-9.
- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y. & Takai, Y. (1996). Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, **15**(9), 2196-207.
- Paavilainen, V. O., Bertling, E., Falck, S. & Lappalainen, P. (2004). Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol*, **14**(7), 386-94.
- Palmgren, S., Vartiainen, M. & Lappalainen, P. (2002). Twinfilin, a molecular mailman for actin monomers. *J Cell Sci*, **115**(Pt 5), 881-6.

- Parsons, W. J., Ramkumar, V. & Stiles, G. L. (1988). Isobutylmethylxanthine stimulates adenylate cyclase by blocking the inhibitory regulatory protein, Gi. *Mol Pharmacol*, **34**(1), 37-41.
- Perron, M. (2004). Rôle d'*ARF3* dans le cytosquelette d'actine chez *Saccharomyces cerevisiae*. In *Faculté des Sciences et de Génie*, Vol. Mémoire de Maîtrise, Université LAVAL. Québec, pp. 110.
- Peyroche, A., Antonny, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J. & Jackson, C. L. (1999). Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell*, **3**(3), 275-85.
- Peyroche, A., Courbeyrette, R., Rambourg, A. & Jackson, C. L. (2001). The ARF exchange factors Gea1p and Gea2p regulate Golgi structure and function in yeast. *J Cell Sci*, **114**(Pt 12), 2241-53.
- Peyroche, A., Paris, S. & Jackson, C. L. (1996). Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature*, **384**(6608), 479-81.
- Pollard, T. D. & Beltzner, C. C. (2002). Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol*, **12**(6), 768-74.
- Poon, P. P., Cassel, D., Spang, A., Rotman, M., Pick, E., Singer, R. A. & Johnston, G. C. (1999). Retrograde transport from the yeast Golgi is mediated by two ARF GAP proteins with overlapping function. *EMBO J*, **18**(3), 555-64.
- Pringle, J. R. (1991). Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor. *Methods Enzymol*, **194**, 732-5.
- Pruyne, D. & Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci*, **113**(Pt 3), 365-75.
- Pruyne, D. & Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. II The role of the cortical actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, **113**(Pt 4), 571-85.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A. & Boone, C. (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*, **297**(5581), 612-5.
- Pruyne, D., Gao, L., Bi, E. & Bretscher, A. (2004). Stable and dynamic axes of polarity use distinct formin isoforms in budding yeast. *Mol Biol Cell*, **15**(11), 4971-89.
- Rida, P. C. & Surana, U. (2005). Cdc42-dependent localization of polarisome component Spa2 to the incipient bud site is independent of the GDP/GTP exchange factor Cdc24. *Eur J Cell Biol*, **84**(12), 939-49.
- Riezman, H. (1985). Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis. *Cell*, **40**(4), 1001-9.
- Rodal, A. A., Tetreault, J. W., Lappalainen, P., Drubin, D. G. & Amberg, D. C. (1999). Aip1p interacts with cofilin to disassemble actin filaments. *J Cell Biol*, **145**(6), 1251-64.
- Rose, M. D. & Broach, J. R. (1991). Cloning genes by complementation in yeast. *Methods Enzymol*, **194**, 195-230.
- Roth, M. G. (1999). Snapshots of ARF1: implications for mechanisms of activation and inactivation. *Cell*, **97**(2), 149-52.
- Roumanie, O., Peypouquet, M. F., Thoraval, D., Doignon, F. & Crouzet, M. (2002). Functional interactions between the *VRP1-LAS17* and *RHO3-RHO4* genes involved in actin cytoskeleton organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **40**(5), 317-25.
- Sagot, I., Klee, S. K. & Pellman, D. (2002). Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat Cell Biol*, **4**(1), 42-50.

- Santy, L. C. (2002). Characterization of a fast cycling ADP-ribosylation factor 6 mutant. *J Biol Chem*, **277**(43), 40185-8.
- Schleifer, L. S., Kahn, R. A., Hanski, E., Northup, J. K., Sternweis, P. C. & Gilman, A. G. (1982). Requirements for cholera toxin-dependent ADP-ribosylation of the purified regulatory component of adenylate cyclase. *J Biol Chem*, **257**(1), 20-3.
- Schmidt, A. & Hall, M. N. (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 305-38.
- Schmitz, H. P., Huppert, S., Lorberg, A. & Heinisch, J. J. (2002). Rho5p downregulates the yeast cell integrity pathway. *J Cell Sci*, **115**(Pt 15), 3139-48.
- Schmitz, H. P., Lorberg, A. & Heinisch, J. J. (2002). Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal HR1 domain. *Mol Microbiol*, **44**(3), 829-40.
- Schott, D., Huffaker, T. & Bretscher, A. (2002). Microfilaments and microtubules: the news from yeast. *Curr Opin Microbiol*, **5**(6), 564-74.
- Schuldiner, M., Collins, S. R., Thompson, N. J., Denic, V., Bhamidipati, A., Punna, T., Ihmels, J., Andrews, B., Boone, C., Greenblatt, J. F., Weissman, J. S. & Krogan, N. J. (2005). Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell*, **123**(3), 507-19.
- Sekiya-Kawasaki, M., Abe, M., Saka, A., Watanabe, D., Kono, K., Minemura-Asakawa, M., Ishihara, S., Watanabe, T. & Ohya, Y. (2002). Dissection of upstream regulatory components of the Rho1p effector, 1,3- β -glucan synthase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **162**(2), 663-76.
- Shih, J. L., Reck-Peterson, S. L., Newitt, R., Mooseker, M. S., Abersold, R. & Herskowitz, I. (2005). Cell polarity protein Spa2p associates with proteins involved in actin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **16**(10), 4595-608.
- Snyder, M. (1989). The SPA2 protein of yeast localizes to sites of cell growth. *J Cell Biol*, **108**(4), 1419-29.
- Soulard, A., Friant, S., Fitterer, C., Orange, C., Kaneva, G., Mirey, G. & Winsor, B. (2005). The WASP/Las17p-interacting protein Bzz1p functions with Myo5p in an early stage of endocytosis. *Protoplasma*, **226**(1-2), 89-101.
- Soulard, A., Lechler, T., Spiridonov, V., Shevchenko, A., Li, R. & Winsor, B. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* Bzz1p is implicated with type I myosins in actin patch polarization and is able to recruit actin-polymerizing machinery in vitro. *Mol Cell Biol*, **22**(22), 7889-906.
- Spang, A., Herrmann, J. M., Hamamoto, S. & Schekman, R. (2001). The ADP ribosylation factor-nucleotide exchange factors Gea1p and Gea2p have overlapping, but not redundant functions in retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **12**(4), 1035-45.
- Tcheperegine, S. E., Gao, X. D. & Bi, E. (2005). Regulation of cell polarity by interactions of Msb3 and Msb4 with Cdc42 and polarisome components. *Mol Cell Biol*, **25**(19), 8567-80.
- Theriot, J. A. & Mitchison, T. J. (1993). The three faces of profilin. *Cell*, **75**(5), 835-8.
- Tkacz, J. S. & MacKay, V. L. (1979). Sexual conjugation in yeast. Cell surface changes in response to the action of mating hormones. *J Cell Biol*, **80**(2), 326-33.
- Tong, A. H., Evangelista, M., Parsons, A. B., Xu, H., Bader, G. D., Page, N., Robinson, M., Raghibizadeh, S., Hogue, C. W., Bussey, H., Andrews, B., Tyers, M. & Boone, C. (2001). Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science*, **294**(5550), 2364-8.

- Utermohlen, J. (1994). RbCl transformation Procedure for Improve Efficiency. *The NEB Transcript*, **6**, 7.
- Utsugi, T., Minemura, M., Hirata, A., Abe, M., Watanabe, D. & Ohya, Y. (2002). Movement of yeast 1,3-beta-glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. *Genes Cells*, **7**(1), 1-9.
- Volkman, N., Amann, K. J., Stoilova-McPhie, S., Egile, C., Winter, D. C., Hazelwood, L., Heuser, J. E., Li, R., Pollard, T. D. & Hanein, D. (2001). Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science*, **293**(5539), 2456-9.
- Watson, H. A., Cope, M. J., Groen, A. C., Drubin, D. G. & Wendland, B. (2001). In vivo role for actin-regulating kinases in endocytosis and yeast epsin phosphorylation. *Mol Biol Cell*, **12**(11), 3668-79.
- Wiederkehr, A., Meier, K. D. & Riezman, H. (2001). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in fluid-phase endocytosis. *Yeast*, **18**(8), 759-73.
- Winder, S. J., Jess, T. & Ayscough, K. R. (2003). SCP1 encodes an actin-bundling protein in yeast. *Biochem J*, **375**(Pt 2), 287-95.
- Winsor, B. & Schiebel, E. (1997). Review: an overview of the *Saccharomyces cerevisiae* microtubule and microfilament cytoskeleton. *Yeast*, **13**(5), 399-434.
- Winter, D., Podtelejnikov, A. V., Mann, M. & Li, R. (1997). The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr Biol*, **7**(7), 519-29.
- Winter, D. C., Choe, E. Y. & Li, R. (1999). Genetic dissection of the budding yeast Arp2/3 complex: a comparison of the in vivo and structural roles of individual subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(13), 7288-93.
- Witke, W. (2004). The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol*, **14**(8), 461-9.
- Zakrzewska, E. (2005). La signalisation et le cytosquelette d'actine. In *Faculté des Sciences et de Génie*, Vol. Thèse de Doctorat, Université LAVAL. Québec, pp. 211.
- Zakrzewska, E., Perron, M., Laroche, A. & Pallotta, D. (2003). A role for *GEA1* and *GEA2* in the organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **165**(3), 985-95.
- Zeng, G., Yu, X. & Cai, M. (2001). Regulation of yeast actin cytoskeleton-regulatory complex Pan1p/Sla1p/End3p by serine/threonine kinase Prk1p. *Mol Biol Cell*, **12**(12), 3759-72.