

---

# THESE

Présenté à

L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

par

**Mohamed Fadi BASMAJI**

en vue de l'obtention du

**DOCTORAT**

de Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénierie

Filière : Microbiologie et Biocatalyse industrielle

Caractérisation de la protéine Knr4 et recherche de ses  
partenaires fonctionnels pour la compréhension de son rôle  
dans la synthèse pariétale chez la levure

*Saccharomyces cerevisiae.*

Soutenu novembre 2005 devant la commission d'examen :

Mr. H. VAN TILBEURGH	Professeur, Université Paris-sud, Orsay,	Rapporteur
Mr. M. CROUZET	Professeur, Université Bordeaux 2, Bordeaux	Rapporteur
Mr. T. FONTAINE	Chargé de recherche, Institut Pasteur, Paris	Rapporteur
Mr. D. COMBES	Professeur, INSA, Toulouse	Examineur
Mr. M. ROSSIGNOL	Ingénieurs de Recherche, CNRS, INRA, Toulouse	Examineur
Mme. H. MARTIN-YKEN	Chargée de recherche INRA, Toulouse	Examineur
Mr. J.M. FRANCOIS	Professeur, INSA, Toulouse	Directeur de thèse

Cette thèse a été préparée au Laboratoire de Biotechnologie-Bioprocédés UMR-CNRS 5504, UR-INRA 792 du Département de Génie Biochimique et Alimentaire de l'INSA de Toulouse

---



## Titre de la thèse en Anglais :

Characterization of Knr4 protein and research of its fonctionnals partners for the comprehension of its role in cell wall synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

---

### Abstract:

The cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* is a protectrice extracellular structure. Its synthesis is mainly under controlled by a MAP kinase signalisation pathway. Related to this pathway, the protein Knr4 implicated in the coordination of the cell wall synthesis with bud emergence. This protein, whose gene was originally isolated by complementation of a mutant resistant to the toxin killer K9, has been the subject of a functional study. First, we provided several experimental arguments suggesting that this protein displays an unfolded secondary and tertiary structure and takes part of a multiprotein complex. Secondly, by applying genetic (Synthetic lethal and Two-hybrid system) and biochemical techniques (Tandem affinity Purification) we established a map of an "*in vivo*" interaction network for this protein. The interaction identified show that Knr4p is associated to two major biological processes: the cell wall synthesis and the establishment of the cellular polarity/bud emergence. Furthermore, we showed that the phosphorylation of two serines residues (S200/S203) seems necessary to obtain an optimal interaction of this protein with its partners. Taken together, these results consolidates the notion that Knr4 is one of the proteic elements physically connecting the cell wall synthesis and the budding machinery during cell growth.

---

**Key-words:** Protein interaction, Cell wall, Cellular signalisation, TAPtag, Two hybrid system, Synthetique lethal, Yeast, Stress.

---



## *Je dédie cette thèse à*

### *Ma mère et mon père,*

*Je ne sais même pas par où commencer tellement ils ont fait pour moi, Il serait bien long de tout énumérer.*

*Merci de me guider dans les moments difficiles.*

*Merci d'être à mes côtés quand j'ai besoin de réconfort.*

*Merci de vous être effacés et de m'avoir laissé marcher seul, quand il le fallait.*

*Merci pour les encouragements et l'éducation que vous m'avez donné tout petit et le reste....ce reste ou ce tout comme on veut, si difficile pour moi à définir, ça doit s'appeler l'amour.*

*Alors simplement Merci*

### *Ma femme Nesrin et ma fille Mariam,*

*Nesrin, toi qui as toujours su m'entourer de ton amour,*

*Merci de ta patience et ta disponibilité dans les bons comme dans les mauvais moments*

*Je ne l'oublierai jamais*

*Mariam, tu es entrée dans nos vies comme une tornade.*

*Grâce à toi, notre vie est devenue merveilleuse.*

### *Mes Sœurs, Faghwa, Faghia et Ramia*

*Quand j'ai une bonne nouvelle à raconter, une blague, une aventure ou une joie, vous êtes les personnes à qui je ne peux attendre de le dire.*

*Merci pour votre soutien permanent, cette thèse vous est dédiée en l'expression de toute mon affection et ma reconnaissance.*

## *Remerciements :*

*Ma thèse se termine, c'est une page qui se tourne, j'aimerais ici trouver le ton juste pour remercier tous ceux qui m'ont formé, soutenu et qui ont croisé mon chemin.*

*L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire a été réalisé au laboratoire de Biotechnologie- Bioprocédés de l'INSA de Toulouse. Je remercie Mr. Nic LINDLEY, directeur du laboratoire de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.*

*Je voudrais remercier le ministère des études supérieur syrien et le CERUS de Toulouse pour leur appui et leur soutien tout au long de cette thèse.*

*J'exprime ma gratitude à Jean-Marie FRANCOIS, mon directeur de thèse, pour avoir suivi constamment la progression de mon travail de thèse. Je vous remercie pour les conseils judicieux que vous m'avez donnés.*

*Je remercie les différents membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail : Monsieur le professeur Didier COMBES, directeur du Département, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, Messieurs H. VAN TILBEURGH, M. CROUZET, J. FONTAINE et M. ROSSIGNOL.*

*J'exprime ma reconnaissance à Hélène Martin-Yken pour son encadrement. Les nombreuses discussions autour de la paroi de la levure m'ont été précieuses pour la thèse.*

*Adilia DAGHESAMANSKATA, soit vivement remerciée. Nos discussions ont toujours été constructives et vraies. Tes conseils et tes critiques ont énormément contribué à l'évolution de ma thèse.*

*Je tiens à remercier Jean-Luc PARROU, pour son efficacité et ses remarques pertinentes.*

*Laurent BENBADIS, Marie-Ange TESTE et Gustavo M. de Billerbeck, soyez vivement remerciés, votre sympathie et votre disponibilité m'ont particulièrement marqué.*

*Un grand merci à Hélène CORDIER, merci pour m'avoir aidé, soutenu et surtout merci pour ton honnêteté.*

*J'aimerais pouvoir dire un grand merci à tous ceux qui ont rendu l'ambiance si agréable au sein de notre équipe, Fabien et Marlène, je vous souhaite le meilleur pour la suite. Merci également aux anciens thésards, Arnaud, Olivier et Mathieu, je vous remercie pour les excellents moments passés ensemble. Mes remerciements vont aussi à Véronique, Delphine, Lidvine, Sergui, Emmanuelle, Céline et Khaled. Je ne vous oublierai jamais.*

*Fadhel, je te remercie pour ta gentillesse et ton amitié ;les repas de midi, les pauses café et surtout les cartes téléphoniques.*

*Une mention très spéciale pour Shadi, tu m'as toujours encouragé, je te remercie pour ta présence, ta sincérité et ton écoute tout au long ces années en France.*

*Fadi BASMAJI  
à Toulouse, le 19-02-2006*

## ***Avant-propos***

Les levures sont des eucaryotes appartenant au règne des fungi ou champignons qui s'est différencié au cours de l'évolution à peu près en même temps que les plantes et les animaux. L'homme a, sans le savoir, domestiqué les levures depuis des temps très anciens à travers de nombreuses fermentations traditionnelles. La fabrication du pain est avérée à Sumer et en Egypte, 5000 ans avant notre ère, celle de la bière, du cidre, du vin et de diverses boissons fermentées est attesté autour de -2000 au Moyen et Extrême Orient. Vers 1860, Pasteur a identifié les levures comme agents des fermentations. En 1881, Emile Hansen, a décrit l'isolement des premières souches pures de *Saccharomyces* à partir de moûts. Certaines espèces comme *S. cerevisiae* ou *S. pombe* ont été identifiées dès la fin du XIX<sup>e</sup> siècle. Par contre beaucoup, d'autres espèces de levures n'ont été identifiées que plus récemment (entre 1950 et 1970).

La levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* représente aujourd'hui le micro-organisme le plus utilisé en terme industriel, notamment pour la fabrication du pain, et des boissons alcoolisées. Elle est, après *E.coli*, le microorganisme le plus étudiée et le plus utilisé dans les laboratoires. Un système de transformation génétique très efficace a été mis au point dès 1978, et en a fait un modèle universel pour l'étude d'aspects très variés de la biologie des cellules eucaryotes. Par ailleurs, l'existence d'asques englobant les produits d'une méiose et la facilité de culture de ces organismes ont permis de développer un arsenal d'outils génétiques qui simplifient la recombinaison et l'analyse de caractères génétiques complexes. Le séquençage complet du génome de la levure a été rendu public en 1996 (Goffeau, 1996). De nombreuses techniques développées chez la levure sont devenues d'usage courant en biologie, comme la technique du double hybride, de la purification de protéines par affinité en tandem [TAP]), la technologie des puces à ADN pour l'expression génique.

Pour mieux comprendre la fonction cellulaire d'une protéine, elle doit être étudiée à la fois d'une façon isolée et dans un contexte impliquant la recherche de ses partenaires protéiques. Pour une protéine donnée, plusieurs niveaux d'information devront être obtenues : 1- la séquence primaire de la protéine qui permet son attribution à une famille de protéines, 2- la recherche de domaine fonctionnel sur sa séquence, 3- la localisation intracellulaire de la protéine et son association avec d'autres organelles, 4- les différentes formes de régulations post-transcriptionnelles (phosphorylation, ubiquitination , etc) et enfin la recherche de ses partenaires . Par conséquent, l'étude des interactions protéines-protéines est une étape cruciale permettant une compréhension approfondie de la fonction cellulaire d'une protéine et de son

implication dans les mécanismes moléculaires de la cellule. Un nouveau concept appelé l'interactome a donc été inventé car il apparaît de plus en plus clair que les fonctions cellulaires requièrent des interactions entre les protéines, et il concerne l'étude des complexes protéiques à grande échelle, et qui représente un aspect de la protéomique (Gavin A. C. *et coll.*, 2002; Michaud G. A. et Snyder M., 2002; Zhu H. et Snyder M., 2001).

L'un des axes de recherche de l'équipe de « Physiologie Moléculaire des Eucaryotes inférieurs » concerne l'étude fonctionnelle de la protéine Knr4 impliquée dans la synthèse de  $\beta$ -(1,3) glucanes. La paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* est une structure extracellulaire de 100-200 nm d'épaisseur qui représente 15-25% de la masse sèche de la cellule. Elle est constituée principalement de polysaccharides avec une proportion mineure de chitine et des glycoprotéines fortement mannosylées (appelées mannoprotéines). Les travaux présentés dans ce mémoire ont été menés dans l'objectif d'étudier la protéine Knr4 et d'apporter des nouveaux éléments concernant son rôle dans la synthèse de la paroi chez la levure *S.cerevisiae*.

Ce mémoire est composé de trois parties, la première partie (Etude bibliographique) rend compte de l'état des connaissances sur la paroi de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Elle présente les voies de biosynthèse des différents constituants de la paroi et aux voies de signalisation impliquées dans la régulation de la paroi. Elle apporte des éléments de compréhension concernant la morphogenèse et polarisation chez la levure *S.cerevisiae*.

La deuxième partie décrit l'ensemble du matériel biologique et des techniques utilisées lors des expériences. En particulier elle présente la méthodologie précise des différentes approches permettant l'identification des interactions protéine-protéine.

Les résultats sont présentés dans la troisième partie de ce mémoire sous formes de trois chapitres accompagnés d'une discussion spécifique.

La quatrième partie comporte une conclusion générale qui reprend les principaux apports scientifiques de ce travail et apporte des éléments de réponse aux interrogations majeurs soulevés par ces résultats. Pour finir, les perspectives des travaux à poursuivre à la suite de ce travail de thèse sont décrites.

\*\*\*\*\*

# TABLE DES MATIERES

<b>1</b>	<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.</b>	<b>9</b>
1.1	Valeur biotechnologique de la paroi de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	9
1.2	La paroi cellulaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	11
1.2.1	Composition biochimique de la paroi.	11
1.2.2	Organisation moléculaire de la paroi cellulaire.	13
1.2.3	Propriétés de molécules antifongiques et chimiques pour identifier les mécanismes génétiques de la synthèse de la paroi et l'architecture de celle-ci chez la levure <i>S. cerevisiae</i> .	14
1.2.3.1	Les antifongiques.	14
1.2.3.2	Les toxines Killer.	16
1.2.3.3	Autres drogues affectant la synthèse de la paroi.	17
1.3	Voies de biosynthèse des composants de la paroi.	19
1.3.1	Biosynthèse des $\beta$ (1,3) glucanes.	19
1.3.1.1	Caractéristiques enzymatiques de la synthèse des $\beta$ (1,3) glucanes.	20
1.3.1.2	Gènes impliqués dans la synthèse et la régulation des $\beta$ (1,3)glucanes.	20
1.3.2	Biosynthèse des $\beta$ (1,6) glucanes.	23
1.3.2.1	Gènes impliqués dans la synthèse des $\beta$ (1,6) glucanes.	24
1.3.2.2	Lien avec la voie de la Pkc1	25
1.3.3	Synthèse des mannoprotéines.	26
1.3.4	Biosynthèse de la chitine.	28
1.3.4.1	Gènes impliqués dans la synthèse de la chitine.	29
1.3.4.2	Synthèse de la chitine au cours du cycle cellulaire.	30
1.3.4.3	Synthèse de chitine lors de la conjugaison.	30
1.3.4.4	Synthèse de chitine lors de la sporulation.	30
1.4	Polarité cellulaire et morphogénèse chez la levure.	31
1.4.1	Bourgeonnement.	33
1.4.1.1	Sélection du site de polarisation durant le bourgeonnement.	34
1.4.1.2	Le rôle du cytosquelette	37
1.4.1.3	Rôle des septines,	37
1.4.1.4	Rôle de l'actine,	38
1.4.2	Emergence du bourgeon.	40

1.4.2.1	Evènements moléculaire au départ du point START.....	40
1.4.2.2	Rôle de RHO, CDC42 et des autres gènes dans l'émergence du bourgeon.....	42
1.4.2.3	La synthèse de la paroi.....	45
1.4.2.4	Croissance du bourgeon.....	46
1.4.3	Mécanismes de contrôle du cycle cellulaire.....	47
1.4.3.1	La CDK Cdc28 est le cœur de la machinerie de la régulation du cycle cellulaire :.....	47
1.4.3.2	Point de contrôle du bourgeonnement :.....	47
1.4.3.3	Point de contrôle de l'intégrité cellulaire chez la levure <i>S.cerevisiae</i> .....	48
1.4.4	Méiose et sporulation.....	49
<b>1.5</b>	<b>Voie de signalisation de l'intégrité cellulaire.....</b>	<b>50</b>
1.5.1	Les cascades de signalisation MAP kinase chez <i>S. cerevisiae</i> .....	50
1.5.2	Voie de signalisation MAPK dépendante de la protéine kinase (Pkc1) et Mpk1/Slf2.....	52
1.5.2.1	L'intégrité de la paroi cellulaire est majoritairement sous le contrôle de la voie Pkc1.....	52
1.5.2.2	Régulation de l'activité de la voie de signalisation MAPK dépendante de Pkc1 .....	53
1.5.2.3	La MAP kinase de l'intégrité cellulaire, Slf2 et ses cibles finales.....	55
1.5.2.4	La coordination entre la voie de l'intégrité cellulaire et la prolifération cellulaire.....	56
1.5.2.5	Autres voies connectées à la protéine kinase Pkc1 mais indépendantes de la cascade MAPK.....	56
1.5.3	Voie de signalisation MAPK dépendante de la kinase Hog1 (High Osmolarity Glycerol response).....	57
1.5.3.1	Activation de la voie HOG.....	57
1.5.4	La voie de signalisation TOR.....	59
<b>1.6</b>	<b>Knr4, une protéine de levure impliquée dans la régulation de la synthèse de la paroi cellulaire.....</b>	<b>60</b>
1.6.1	La protéine Knr4 se trouve probablement au cœur d'un réseau d'interactions protéine-protéine.....	62
1.6.2	<i>KNR4</i> impliqué dans la régulation de la synthèse pariétale et la prolifération cellulaire ?.....	63

1.6.2.1	L'interaction entre Knr4 et le MAP kinase Slt2 est requise pour la signalisation cellulaire à travers la voie de l'intégrité cellulaire Pkc1.....	63
1.6.2.2	Knr4 interagit avec la voie BCK2 pour le contrôle de la phase G1 en compagnie du complexe Cln3-Cdc28.....	63
<b>2</b>	<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>65</b>
<b>2.1</b>	<b>Souches, plasmides et oligonucleotides.....</b>	<b>65</b>
2.1.1	Souches de levure et bactéries.....	65
2.1.2	Plasmides.....	66
2.1.3	Oligonucléotides.....	68
<b>2.2</b>	<b>Milieux de culture.....</b>	<b>70</b>
2.2.1	Milieux de culture de levure.....	70
2.2.2	Milieux de culture de bactéries.....	70
<b>2.3</b>	<b>.Tests phénotypiques sur boîtes de pétri .....</b>	<b>70</b>
<b>2.4</b>	<b>Techniques de génie génétique.....</b>	<b>71</b>
2.4.1	Préparation de bactéries thermocompétentes.....	71
2.4.2	Préparation de bactéries électrocompétentes.....	71
2.4.3	Transformation de bactéries thermocompétentes.....	72
2.4.4	Transformation de bactéries électrocompétentes.....	72
2.4.5	Mini préparation d'ADN plasmidique de bactéries.....	72
2.4.6	Transformation de levure.....	73
2.4.7	Technique de construction de plasmides in vivo par recombinaison homologue chez la levure <i>S. cerevisiae</i> .....	74
2.4.8	Extraction d'ADN plasmidique de levure.....	74
2.4.9	Extraction d'ADN génomique de levure.....	74
2.4.10	Extraction des ARN totaux de levure.....	75
2.4.10.1	Culture et broyage cellulaire.....	75
2.4.10.2	Extraction des ARN totaux.....	75
2.4.11	Techniques de clonage et d'analyses de séquences.....	76
2.4.11.1	Analyse informatique des séquences.....	76
2.4.12	Enzymes.....	76
2.4.13	Purification de fragment d'ADN.....	76
<b>2.5</b>	<b>Techniques de PCR.....</b>	<b>76</b>
2.5.1	Conditions de PCR.....	76

2.5.2	Mutagenèse par PCR.....	78
2.5.2.1	PCR Recombinante.....	78
2.5.2.2	Principe de la mutagenèse dirigée par PCR recombinante.....	78
2.5.2.3	Construction des plasmides pFB1, pFB3, pHM64, pHM66.....	79
2.5.3	RT-PCR quantitative en temps réel.....	80
<b>2.6</b>	<b>Dosage biochimique.....</b>	<b>81</b>
2.6.1	Dosage de l'activité $\beta$ -galactosidase.....	81
2.6.2	Dosage des protéines.....	82
<b>2.7</b>	<b>Détection spécifique des protéines: technique de " Western Blotting ".....</b>	<b>82</b>
2.7.1	Expression et purification de la protéine de fusion GST-Tys1.....	82
2.7.2	Extraction des protéines totales de levure.....	83
2.7.3	Gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes.....	84
2.7.4	Migration et Coloration.....	85
2.7.5	Transfert sur membrane en milieu liquide.....	86
2.7.6	Détection immunologique:.....	86
<b>2.8</b>	<b>Méthodes de séparation des protéines.....</b>	<b>87</b>
2.8.1	Gel filtration (ou chromatographie d'exclusion ou tamisage moléculaire).....	87
2.8.2	Gradient de saccharose.....	88
<b>2.9</b>	<b>Méthodes utilisées pour identifier les interactions protéiques.....</b>	<b>88</b>
2.9.1	Système de double hybride.....	88
2.9.1.1	Principe.....	88
2.9.1.2	Criblage de double-hybride.....	89
2.9.2	Tandem Affinity purification.....	90
2.9.2.1	Introduction.....	90
2.9.2.2	Protocole.....	91
<b>3</b>	<b>OBJECTIF DE LA THESE.....</b>	<b>96</b>
<b>4</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>97</b>
<b>4.1</b>	<b>Analyse moléculaire de la protéine Knr4.....</b>	<b>97</b>
4.1.1	Relation protéine/transcrit de <i>KNR4</i> au cours de la croissance.....	97
4.1.2	Quantification du niveau de l'expression de <i>KNR4</i> par une analyse utilisant l'approche de RT-PCR quantitative en temps réel (RT-Q-PCR).....	101
4.1.3	Estimation de la masse moléculaire de la protéine Knr4 par l'approche de Chromatographie par filtration sur gel.....	102

4.1.4	Migration inhabituelle de la protéine Knr4 sur le gel SDS-PAGE. ....	103
4.1.5	Discussion. ....	106
<b>4.2</b>	<b>Recherche de partenaires fonctionnels de la protéine Knr4. ....</b>	<b>107</b>
4.2.1	Knr4 fait-elle partie d'un complexe protéique ? .....	107
4.2.2	Identification des partenaires de la protéine Knr4 par l'approche de double-hybride. ....	109
4.2.2.1	Knr4 interagit physiquement avec Tys1.....	110
4.2.2.2	Mise en évidence de l'interaction physique entre les protéines Knr4 et Tys1. 111	
4.2.2.3	La teneur en dityrosine dans les spores issues des diploïdes portant des mutations dans les gènes <i>TYS1</i> ou <i>KNR4</i> est fortement réduite. ....	112
4.2.2.4	Les protéines Knr4 et Tys1 sont-elles nécessaires pour une sporulation efficace ? .....	115
4.2.2.5	Discussion. ....	116
4.2.3	Recherche des gènes synthétiques létaux avec la délétion de <i>KNR4</i> . ....	117
4.2.3.1	Méthodologie. ....	117
4.2.3.2	Difficultés rencontrées. ....	118
4.2.4	Recherche des partenaires fonctionnels de la protéine Knr4 par l'approche du TAP-tag. 119	
4.2.4.1	Vérification de la construction KNR4-TAPtag.....	120
4.2.4.2	Purification de la protéine Knr4-TAP sur colonne de chromatographie d'affinité et analyse des bandes par spectrométrie de masse MALDI-TOF. ....	121
4.2.4.3	Purification de la protéine Knr4-TAP sur colonne de chromatographie d'affinité et analyse des bandes identifiées sur le gel de protéine par spectrométrie de masse LC-MS/MS.....	125
4.2.4.4	Validation des résultats obtenus précédemment en réalisant une troisième expérience de purification par affinité. ....	129
4.2.5	Les protéines co-purifiées avec Knr4 par l'approche de TAP-tag retenues comme des partenaires potentiels.....	134
4.2.6	Tests phénotypiques des mutants des gènes codant pour les protéines co-purifiées avec Knr4 par TAP-tag. ....	138
4.2.7	Discussion .....	141
4.2.7.1	Les différentes méthodes de recherche des partenaires protéiques : avantages, inconvénients et complémentarité. ....	141

<b>4.3</b>	<b>Etude préliminaire structure-fonction de la protéine Knr4.....</b>	<b>146</b>
4.3.1	Recherche des domaines de Knr4 impliqués dans son interaction avec certains de ses partenaires identifiés par le système double hybride.....	146
4.3.2	Les deux résidus sérines Ser200 et Ser203 identifiés comme phosphorylés <i>in-vivo</i> ont-ils un rôle physiologique sur la phosphorylation de Knr4 ?.....	148
4.3.2.1	L'interaction entre Knr4 mutée et les protéines Slt2, Bck2 et Tys1 est fortement réduite. ....	150
4.3.2.2	Les deux résidus sérines Ser200 et Ser203 affectent-elle l'activité de Knr4 ? 151	
4.3.2.3	La mutation des sites de phosphorylation Ser200 et Ser203 n'affecte pas la localisation de la protéine Knr4. ....	153
4.3.3	Discussion .....	156
<b>5</b>	<b>Conclusion générale et perspectives. ....</b>	<b>157</b>
5.1	La structure atypique et l'instabilité de la protéine Knr4 sont-elles des avantages fonctionnels ? .....	157
5.2	Réseau de l'interactome de Knr4, le lien entre synthèse de la paroi cellulaire et le bourgeonnement pendant la croissance cellulaire.....	158
<b>6</b>	<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>163</b>
<b>7</b>	<b>ANNEXES.....</b>	<b>200</b>
7.1	Liste des figures.....	200
7.2	Liste des tableaux. ....	205
7.3	Abréviations.....	207
7.4	Congrès, Communications et Publications. ....	211
7.4.1	Congrès et communication.....	211
7.4.2	Publications.....	211

# **1 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.**

## **1.1 Valeur biotechnologique de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*.**

La paroi de la levure *S. cerevisiae* est impliquée dans des nombreux procédés industriels et présente des caractéristiques intéressantes pour la santé humaine et animale. En effet, les extraits de levures, composés en grande partie des parois de levure, sont utilisés depuis plusieurs décennies pour des applications cosmétiques et pharmaceutiques. Le premier produit pharmaceutique à base de levure fut le "Zyмосan", un extrait brut de paroi de *S. cerevisiae* capable de stimuler le système immunitaire (Pillemer L. et Ecker E. E., 1941). Plus tard, des travaux ont montré que ce sont en fait les  $\beta$ -glucanes de la paroi qui sont responsables de la stimulation du système immunitaire (Coates N. J. et McColl S. R., 2001; Di Luzio N., 1983; Fitzpatrick F. et DiCarlo J., 1964; Lee J. N. *et coll.*, 2001), probablement via leurs effets sur l'activation des macrophages (Czop J. K. et Austen K. F., 1985; Ponton J. *et coll.*, 2001; Vassallo R. K. T. J. S. J. E. a. L. A. H. *et coll.*, 2001). Les  $\beta(1,3)$  glucanes, composants principaux de la paroi, ont aussi d'autres propriétés intéressantes et peuvent être utilisées en particulier comme adjuvants ajoutés à des agents anti-infectieux (Nicoletti A. *et coll.*, 1992), à des agents anti-cancéreux (Carrow D., 1996; Mansell P. *et coll.*, 1978), à des dérivés de la vitamine C et à des agents anti-cholestérolémiques (Donzis B., 1990). Les  $\beta(1,3)$  glucanes auraient également des effets bénéfiques lorsqu'ils sont administrés à des patients sous radiothérapie (Patchen M. L. *et coll.*, 1987). Ces mêmes composants sont aussi des composés actifs bien adaptés à des applications cosmétiques ou pharmacologiques, étant présents sous forme de dérivés carboxyméthylés dans la composition de crèmes cosmétiques et d'écrans solaires (Mibelle AG Biochemistry, 2002). Des travaux récents ont mis en évidence que des parois cellulaires de levure traitées à l'acide pouvaient aussi servir à enduire des comprimés ou des granules dans l'industrie pharmaceutique (Kasai T. *et coll.*, 2000; Yuasa H. *et coll.*, 2000; Yuasa H. *et coll.*, 2002). Les mannanes de la paroi seraient capables de stimuler le système immunitaire (Ponton J. *et coll.*, 2001), puisqu'ils peuvent induire la fièvre lorsqu'ils sont injectés chez le rat (Ataoglu H. *et coll.*, 2000; Dogan M. D. *et coll.*, 1999).

Enfin, les mannoprotéines ont un pouvoir bio-émulsifiant important susceptible d'être intéressant dans de nombreuses applications médicales et pharmaceutiques (Cameron D. R. *et coll.*, 1988).

Des levures entières ou des extraits de levure sont régulièrement ajoutées à la nourriture des animaux d'élevage pour faciliter leur digestion, mais pour aussi les protéger des agents pathogènes. L'une des caractéristiques des parois des levures est qu'elles protègent les animaux des mycotoxines. Ces mycotoxines sont des produits secondaires du métabolisme des champignons retrouvés dans les fourrages ou céréales au cours du stockage. L'aflatoxine et la toxine fusarium sont des mycotoxines entre autres responsables de problèmes hépatiques, de diminution des performances reproductrices, de tumeurs et d'immunosuppression. Une des méthodes pour atténuer les effets des mycotoxines est basée sur l'utilisation de molécules capables d'absorber les mycotoxines dans la nourriture. Ainsi, les toxines absorbées passent à travers l'appareil digestif sans être retenues. Le réseau complexe de  $\beta$ -glucanes de la paroi possède cette capacité comme l'ont démontré des travaux chez le poulet (Devegowda G. *et coll.*, 1994; Devegowda G. *et coll.*, 1995). Certaines modifications des techniques d'obtention des parois de levures ont permis de commercialiser des parois capables de fixer un plus large spectre de mycotoxines (Devegowda G. *et coll.*, 1998). Les efforts dans ce domaine se concentrent à l'heure actuelle sur une meilleure compréhension biochimique de l'interaction entre les mycotoxines et les composants de la paroi, afin d'optimiser la capacité absorbante des parois vis-à-vis des mycotoxines (Dawson K. A. *et coll.*, 2001).

### **La paroi : une cible idéale pour des agents antifongiques ?**

La gamme des infections fongiques qui touchent les humains s'étend des dermatoses localisées d'incidence mineure à des infections invasives dispersées souvent fatales, en particulier chez des patients immunodéprimés (Georgopapadakou N. H. et Walsh T. J., 1994). Au cours des vingt-cinq dernières années, la fréquence des infections fongiques présentant des risques mortels a dramatiquement augmenté du fait de l'explosion du nombre de patients immunodéprimés : traitements par chimiothérapie, traitements antirejet, trithérapie... Deux types d'antifongiques sont disponibles à l'heure actuelle pour traiter les infections fongiques graves. Ce sont d'une part les substances fongostatiques comme les azoles qui inhibent la croissance des champignons, et d'autre part les substances fongicides telles que les polyènes qui détruisent totalement les cellules mais se révèlent également toxiques pour l'hôte. Un agent antifongique visant la paroi serait à la fois sélectif et fongicide, une caractéristique

intéressante pour une application clinique (Georgopapadakou N. H., 1998). Trois classes de molécules ciblant respectivement la synthèse de chitine (nikkomycines), les  $\beta(1,3)$  glucanes (échinocandines) et les mannoprotéines (pradamicines) sont entrées en développement clinique. Les nikkomycines sont un substrat analogue à l'UDP-*N*-acétylglucosamine qui interfèrent avec la synthèse de la chitine (Georgopapadakou N. H., 1997), les échinocandines sont des dérivés d'acides gras d'hexapeptides cycliques qui inhibent de façon non compétitive la synthèse des  $\beta(1,3)$  glucanes, et la famille des pradamicines atteint les mannoprotéines pariétales (Watanabe M. *et coll.*, 1996). Alors que le développement des nikkomycines et des pradamicines s'est arrêté pour cause d'une efficacité *in vivo* trop faible, les échinocandines se sont révélées efficaces et trois molécules (la caspofungine, la micafungine et l'anidulafungine) sont en fin de développement clinique (Georgopapadakou N. H., 2000). D'un intérêt particulier, la caspofungine est un inhibiteur de la synthèse des  $\beta(1,3)$  glucanes (un composant essentiel de la paroi de levure *S.cerevisiae*). En brisant l'intégrité structurale de la paroi cellulaire, la caspofungine entraîne un déséquilibre osmotique, suivi de la lyse de la cellule fongique. Bien que ces molécules soient prometteuses, des travaux continuent pour trouver d'autres cibles pariétales

## **1.2 La paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*.**

La paroi cellulaire de la levure constitue entre 20 à 25 % de la masse sèche de la cellule. Elle assure le maintien de la forme et de l'intégrité cellulaire. C'est une structure dynamique puisqu'elle est remodelée au cours des divisions cellulaires, ainsi qu'en réponse aux agressions environnementales. Elle est constituée de proportions variables de polysaccharides et de protéines glycosylées (Nguyen T. H. *et coll.*, 1998). La paroi protège la cellule contre les attaques physiques et elle a une fonction majeure dans la morphogénèse.

### **1.2.1 Composition biochimique de la paroi.**

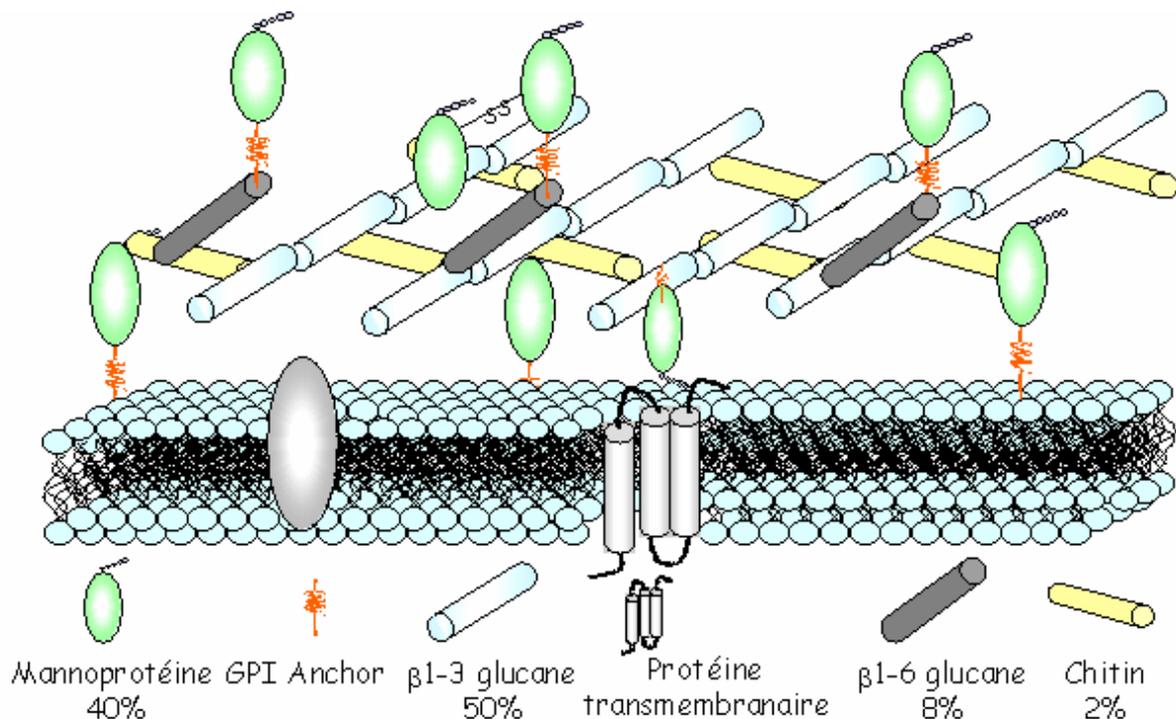
La paroi cellulaire est une structure ou "organite" de 100 à 200nm d'épaisseur chez la levure *S. cerevisiae*. Il est considéré que la composition et l'architecture de la paroi peuvent varier notamment avec l'âge de la cellule et en réponse à des modifications du milieu de culture (Aguilar-Uscanga B. et Francois J. M., 2003; Cid V. J. *et coll.*, 1995; Fleet G. H., 1991; Klis F. M., 1994).

Selon les différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* et les conditions de cultures, la composition pariétale s'établit autour des valeurs moyennes suivantes :

Composants de la paroi	% du poids de la paroi	Nature biochimique
Glucanes	50 à 60%	Unité glucose liées à 80% en $\beta(1,3)$ et à 20% en $\beta(1,6)$
Mannoprotéines	40 à 50%	Protéines glycosylées portant des chaînes de mannoses liées en $\alpha(1,2)$ , $\alpha(1,3)$ , $\alpha(1,6)$
Chitine	1 à 3%	Unités N- acétylglucosamine liées en $\beta(1,4)$

**Tableau 1 : Composition de la paroi de *S. cerevisiae* exprimé en pourcentage (d'après Fleet, 1991, Klis, 1994, Dallies et coll, 1998)**

Les analyses de la paroi cellulaire par microscopie électronique ont révélé qu'elle est constituée de plusieurs couches. On observe une couche interne transparente et amorphe, considérée comme une couche squelettique et une couche externe, dense, constituée des fibrilles perpendiculaires à la surface, constitué de protéines liées par des liaisons covalentes avec la couche interne (Osumi M., 1998) (Figure 1).



**Figure 1 : Représentation schématique de la structure moléculaire de la paroi cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae*.**

La paroi cellulaire de la *S.cerevisiae* présente quatre classes des macromolécules qui sont les suivantes dans l'ordre de leur emplacement, de l'extérieur vers l'intérieur : Les

mannoprotéines (CWP pour *C*ell *W*all *P*rotein) sont retrouvées dans la couche externe. Ce sont des glycoprotéines fortement glycosylées qui comportent 95% de carbohydrates. La couche interne, constituée de plusieurs sous-couches, est composée majoritairement de deux classes de  $\beta$ -glucanes, le  $\beta$ -(1,3) et le  $\beta$ -(1,6) glucanes avec une quantité mineure de chitine. Les glucanes assurent le maintien de la forme cellulaire et la résistance mécanique (figure 1). Une partie de la chitine se trouve dans la partie la plus intérieure de la couche interne, essentiellement complexée aux  $\beta$ -glucanes (Suarit R. *et coll.*, 1988). Cependant, la majeure partie (90%) de la chitine est localisée au niveau des cicatrices de bourgeonnement (Cabib E. et Bowers B., 1971). Il n'existe pas de séparation entre ces deux couches, au contraire, les mannoprotéines sont ancrées dans la couche de glucane en formant des liaisons covalentes avec les  $\beta$ (1,3) et  $\beta$ (1,6) glucanes. Ces mannoprotéines, qui sont responsables des propriétés de surface de la paroi, déterminent sa porosité et jouent un rôle de filtre sélectif de protection contre les attaques chimiques et enzymatiques de types glucanases (Zlotnik H. *et coll.*, 1984). Elles sont impliquées avec d'autres composants dans les interactions entre les cellules, telles que la conjugaison ou la floculation (Bony M. *et coll.*, 1997; Reynolds T. B. et Fink G. R., 2001).

### **1.2.2 Organisation moléculaire de la paroi cellulaire.**

Au niveau moléculaire, l'architecture de la paroi semble constituée de blocs de construction flexibles regroupant tous les composants de la paroi reliés par des liaisons covalentes en une structure ordonnée. La couche externe est constituée principalement des mannoprotéines à ancre GPI (GPI-CWP), qui représente la classe majeure de CWPs (Hamada K. *et coll.*, 1999). Elles sont attachés par des liaisons covalentes aux  $\beta$ (1,6) glucanes via une ancre GPI modifiée. Le  $\beta$ (1,6) glucane est à son tour associé par des liaisons covalentes au  $\beta$ (1,3) glucane.

Quant aux mannoprotéines de type PIR (pour *P*rotein with *I*nternal *R*epeats; PIR-CWP) qui présente une classe mineure des CWPs, elles sont directement attachées aux  $\beta$ (1,3) glucanes par une liaison alcali-labile dont la nature n'a pas encore été élucidée parfaitement elles se trouvent dispersées dans la couche interne (Cabib E. *et coll.*, 2001; Kapteyn J. C. *et coll.*, 2001; Mrsa V. *et coll.*, 1997). Une liaison covalente caractérisée au niveau de la paroi est la liaison  $\beta$ (1,4) entre l'extrémité réductrice d'un résidu de *N*-acétylglucosamine d'une chaîne de chitine et l'extrémité non réductrice d'un glucose d'un polymère de  $\beta$ (1,3) glucanes (Kollar R. *et coll.*, 1997). Un modèle d'un bloc de construction proposé par l'équipe de F. Klis est présenté à figure 2.



### 1.2.3.1.2 Inhibiteurs de la synthèse des $\beta$ -glucanes.

Une famille d'antibiotiques regroupe des lipopeptides fongicides qui inhibent de façon non compétitive la synthèse des  $\beta(1,3)$  glucanes. Cette famille de lipopeptides comprend entre autre la papulacandine B (Baguley B. C. *et coll.*, 1979; Kopecka M., 1984), l'aculéacine (Font d. M. *et coll.*, 1991; Miyata M. *et coll.*, 1980), la cilofungine (Beaulieu D. *et coll.*, 1993; Beaulieu D. *et coll.*, 1994), l'échinocandine B, et la pneumocandine B<sub>0</sub>, ainsi que leurs dérivés synthétiques ou semi-synthétiques (Kurtz M. B. et Douglas C. M., 1997). Ils ont permis d'étudier les mécanismes associés à la synthèse des  $\beta(1,3)$  glucanes, et notamment de cloner le gène *FKSI*, codant pour la sous-unité catalytique principale de la  $\beta(1,3)$  glucane synthase, sous le nom de *ETG1* pour *E*chinocandin *T*arget *G*ene *1* (Douglas C. M. *et coll.*, 1994b; Douglas C. M. *et coll.*, 1994a). Ces composés ont de même permis l'identification du gène *PBR1* pour *P*apulacandin *B* *R*esistant *1* (Castro C. *et coll.*, 1995), ainsi que du gène *GNS1* qui serait impliqué dans la synthèse des  $\beta(1,3)$  glucanes (el Sherbeini M. et Clemas J. A., 1995a; el Sherbeini M. et Clemas J. A., 1995b). Le FK506 et la cyclosporine A sont des immunosuppresseurs qui possèdent une activité antifongique. Ils bloquent la voie de transmission du signal dépendante du calcium, et chez *S. cerevisiae*, inhibent la phosphatase 2B dépendante du calcium et de la calmoduline, également appelée calcineurine (Kunz J. et Hall M. N., 1993). Le FK506 a ainsi également permis le clonage de *FKSI* (pour *FK506 S*ensitive *1*), mais de façon plus détournée. En effet, en présence de ces composés, et de même que chez des mutants de la calcineurine, la transcription du gène *FKS2* codant pour la seconde sous-unité de la  $\beta(1,3)$  glucane synthase est réprimée. Dans ces conditions, le gène *FKSI* devient essentiel, et donc la combinaison d'un mutant de ce gène avec la drogue FK506 est létale pour la cellule. Enfin, la sensibilité et la résistance à la  $\beta(1,3)$  glucanase sont également des indications de l'effet d'une mutation sur le contenu en  $\beta(1,3)$  glucanes de la paroi (Lussier M. *et coll.*, 1997; Ram A. F. *et coll.*, 1994).

### 1.2.3.1.3 Inhibiteurs de la glycosylation des protéines.

La tunicamycine inhibe la *N*-acétylglucosylaminyl transférase, qui catalyse le transfert de *N*-acétylglucosamine sur le lipide transporteur du dolichol phosphate, ce qui bloque la *N*-glycosylation des protéines (voir section 1.2.4). Elle permet ainsi de s'affranchir des variations de poids moléculaire dues aux *N*-glycosylations des protéines et d'identifier des bandes protéiques définies sur les gels d'électrophorèse (Orlean P. *et coll.*, 1991). L'hygromycine B et la généticine G418 sont des antibiotiques de la famille des aminoglycosides, qui présentent une efficacité variable contre les champignons. Des levures

ayant des défauts marqués dans la *N*-glycosylation des protéines voient leur sensibilité aux aminoglycosides accrue (Ballou L. *et coll.*, 1991; Dean N., 1999; Dean N., 1995). De plus, les mutants affectés dans la synthèse des  $\beta(1,6)$  glucanes et des chaînes *O*-glycosylées sont hypersensibles à l'hygromycine B (Lussier M. *et coll.*, 1997). Cet antibiotique pourrait donc constituer un nouveau moyen d'étude de la paroi, capable de révéler un large spectre de défauts de la surface cellulaire.

#### **1.2.3.1.4 Autre antifongique ayant une action sur la synthèse de la paroi.**

La staurosporine est un puissant inhibiteur de la protéine kinase C. Elle a permis d'isoler des mutants hypersensibles, notamment *sst1* qui correspond à une mutation allélique du gène *PKC1* (Yoshida S. *et coll.*, 1992), et *sst4*, qui identifie *SST4* comme le gène codant pour une activité phosphatidylinositol 4-kinase, impliqué dans la synthèse de PI4,5P<sub>2</sub>. Ce dernier est ensuite recruté par une petite protéine d'échange GDP-GTP Rom2p pour activer la voie de signalisation de la Pkc1 via Rho1 (Yoshida S. *et coll.*, 1994a; Yoshida S. *et coll.*, 1994b).

#### **1.2.3.2 Les toxines Killer.**

Les toxines Killer sont de petits peptides excrétés par certaines souches de levures dites « souches killers » (Bussey H. *et coll.*, 1979). Elles sont létales pour les souches sensibles dans lesquelles elles forment des pores qui laissent s'échapper le contenu cellulaire (Bussey H., 1991).

##### **1.2.3.2.1 La toxine killer K1 de *S. cerevisiae*.**

Cette toxine Killer, produite par certaines souches de *S. cerevisiae*, se fixe sur la paroi des souches sensibles au niveau d'un récepteur contenant des  $\beta(1,6)$  glucanes (Boone C. *et coll.*, 1991; Bussey H., 1991; Hutchins A. M. *et coll.*, 1995). La toxine killer K1 est ensuite absorbée au niveau de glucanes pariétaux, puis se fixe à un récepteur membranaire entraînant ainsi la destruction de la membrane plasmique et la fuite des métabolites cellulaires (de la Pena P. *et coll.*, 1981; Kurzweilova H. et Sigler K., 1994). La susceptibilité à cette toxine est maximum en phase S du cycle cellulaire (Bartunek M. *et coll.*, 2001). Elle a été utilisée pour étudier les  $\beta(1,6)$  glucanes par sélection d'une série de mutants *kre* pour Killer REsistants (Al Aidroos K. et Bussey H., 1978; Boone C. *et coll.*, 1990). Ces mutants sont affectés dans des gènes impliqués dans la synthèse des  $\beta(1,6)$  glucanes ou dans les mécanismes de *O*-glycosylation, et les protéines codées par ces gènes sont localisées le long de l'appareil sécrétoire jusqu'à la surface cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*.

### 1.2.3.2.2 La toxine killer K9 ou HM1 de *Hansenula mrakii*.

Cette toxine exerce son action létale chez *S. cerevisiae* par la formation de pores au niveau des sites de synthèse de la paroi : bourgeonnés et projections de conjugaison (Takasuka T. *et coll.*, 1995). Elle inhibe *in vitro* la  $\beta(1,3)$  glucane synthase (Yamamoto T. *et coll.*, 1986), et la nature de son récepteur à la surface cellulaire reste inconnu. Elle a permis d'isoler le gène *KNR4* pour Killer Nine Resistant 4 (Hong Z. *et coll.*, 1994a), (Voir section 1.6). Par ailleurs, la toxine killer K9 a également permis d'isoler le gène essentiel *HKR1* (pour *H. mrakii* Killer toxin Resistant 1), qui semble réguler à la fois la synthèse des  $\beta(1,3)$  glucanes et le bourgeonnement (Kasahara S. *et coll.*, 1994; Yabe T. *et coll.*, 1996). Enfin, la sélection de mutants résistants tel que *rhk1* (pour Resistant *Hansenula* Killer 1), affecté dans un gène codant pour une mannosyltransférase, a démontré le rôle majeur de la *N*-glycosylation dans la sensibilité à cette toxine (Kimura T. *et coll.*, 1997; Kimura T. *et coll.*, 1999).

### 1.2.3.3 Autres drogues affectant la synthèse de la paroi.

#### 1.2.3.3.1 La caféine (ou triméthylxantine).

Le mode d'action de la caféine a surtout été étudié chez les cellules de mammifères. Dans ces cellules, elle inhibe la phosphodiesterase dépendante de l'AMP cyclique, provoquant une augmentation du niveau cellulaire d'AMP cyclique, et donc également de l'activité protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (ou PKA). De plus, il a été montré qu'elle bloque le trafic membranaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Jantti J. et Kuismanen E., 1993). Chez la levure de fission *Schizosaccharomyces pombe*, la caféine semble affecter la séparation des chromosomes lors de la mitose, ainsi que l'expression de gènes impliqués dans la méiose (Ohkura H. *et coll.*, 1988). Enfin, chez *S. cerevisiae*, la caféine semble activer la voie de maintien de l'intégrité cellulaire dépendant de Pkc1 (Martin H. *et coll.*, 2000), comme le suggère l'existence de mutants affectés dans la morphogénèse et la voie de la Pkc1 qui présentent une sensibilité accrue à la caféine (Costigan C. *et coll.*, 1992; de Groot P. *et coll.*, 2001; Paravicini G. *et coll.*, 1992; Posas F. *et coll.*, 1993; Ram A. F. *et coll.*, 1994).

#### 1.2.3.3.2 Le blanc de Calcofluor et le Rouge Congo.

Le blanc de Calcofluor et le Rouge Congo sont des colorants qui interagissent avec différents polysaccharides (Maeda H. et Ishida N., 1967; Wood P. J., 1980). Ils perturbent l'assemblage des microfibrilles de chitine *in vitro* et *in vivo*, et inhibent la formation de la

paroi et la croissance chez *S. cerevisiae* (Kopecka M. et Gabriel M., 1992; Roncero C. et Duran A., 1985; Sentandreu R. *et coll.*, 1983).

#### **1.2.3.3.3 Intérêt particulier du blanc de Calcofluor.**

Le blanc de Calcofluor est un colorant fluorescent chargé négativement, capable de se lier à différents polysaccharides (Wood P. J., 1980). Excité par un rayonnement ultra-violet, il émet une importante fluorescence bleue. Il présente une affinité particulièrement forte pour la chitine et la cellulose, due à la fois à des liaisons hydrogènes (Maeda H. et Ishida N., 1967) et à des interactions dipolaires (Rattee I. D. et Greur M. M., 1974) avec les microfibrilles formées par ces deux composés. En raison de sa capacité à se lier à la cellulose, il a été utilisé industriellement pour blanchir papiers et textiles (DARKEN M. A., 1962; Harrington B. J. et Raper K. B., 1968). Par ailleurs, il a été employé pour marquer la paroi de cellules de plantes, d'algues et de champignons (Herth W. et Schnepf S., 1980; Nagata T. et Takebe I., 2002). Chez la levure *S. cerevisiae*, le blanc de Calcofluor permet de visualiser la chitine présente dans la paroi au niveau des cicatrices de bourgeonnement (Pringle J. R., 1991), mais aussi à la base du bourgeon dans les cellules en cours de division (Elorza M. V. *et coll.*, 1983). En plus de ce rôle de marqueur *in vitro*, le blanc de Calcofluor a permis d'étudier la biosynthèse de la chitine, et de la paroi en général. En effet, lorsqu'il est présent dans le milieu de culture, le blanc de Calcofluor se lie aux chaînes de chitine en formation, empêchant leur cristallisation et la formation de microfibrilles (Elorza M. V. *et coll.*, 1983). Dès lors, c'est l'assemblage global de la paroi qui est perturbé par le colorant, ce qui affecte la croissance et compromet la survie des cellules. En présence de ce colorant, on observe la formation d'agrégats multicellulaires résultant d'une séparation incomplète des cellules mère et fille. De plus, les septa observés entre ces cellules sont anormalement épais (Roncero C. et Duran A., 1985). Le blanc de Calcofluor induit l'activation des chitine synthases 1 et 2 probablement via un mécanisme dépendant de la synthèse protéique, puisque cette activation est abolie en présence de cycloheximide (Roncero C. *et coll.*, 1988b).

#### **1.2.3.3.4 Utilisation du Blanc de Calcofluor pour isoler des mutants pariétaux.**

Dans la mesure où le blanc de Calcofluor ne pénètre pas dans la cellule, il constitue un élément de choix pour étudier les modifications des propriétés de surface des levures. Il a donc été choisi pour caractériser des altérations de la structure ou de la composition de la paroi de la levure *S. cerevisiae*. Des mutants résistants au Blanc de Calcofluor ont été isolés (Roncero C. *et coll.*, 1988a), identifiant 5 loci *CAL1* à *CAL5*. Ces mutants se sont avérés très utiles pour l'étude de la biosynthèse de la chitine puisqu'ils ont permis l'identification du

gène *CHS3 (CAL1)* codant pour la chitine synthase 3 et des gènes *CHS4 (CAL2)* et *CHS5 (CAL3)* codant pour des régulateurs de l'activité de la chitine synthase 3. L'idée que les mutants affectés dans la synthèse ou l'assemblage de la paroi pourraient être incapables de supporter les perturbations additionnelles causées par le blanc de Calcofluor a permis la mise en œuvre de nouveaux cribles visant à isoler des mutants hypersensibles au blanc de Calcofluor par mutagenèse chimique à l'éthylméthane sulfonate (Ram A. F. *et coll.*, 1994) ou par mutagenèse par transposons (Lussier M. *et coll.*, 1997). Cette stratégie a permis d'une part la caractérisation de gènes déjà connus comme codant pour des protéines impliquées dans la synthèse des polysaccharides pariétaux (*FKS1, KRE6, KRE2, MNN9*), dans l'assemblage des composants pariétaux (*GAS1*), dans la stabilisation de la structure pariétale (*CWP2*), dans la synthèse de la paroi des asques (*DIT2*); et d'autre part l'identification de nouveaux gènes comme par exemple *ECM27* et *ECM33* codant pour des protéines pariétales, *CWH41* impliqué dans la synthèse des polysaccharides pariétaux et *CWH43* impliqué dans la régulation de la biogenèse pariétale.

#### **1.2.3.3.5 Autres méthodes.**

L'utilisation de la sonication permet de cribler des mutants dont la structure de la paroi est modifiée par rapport à une souche sauvage (Ruiz C. *et coll.*, 1999). La sensibilité ou la résistance à la sonication sont deux critères de criblage de mutants pariétaux à part entière, qui ont été pris en compte au cours d'un crible visant à identifier de nouveaux gènes impliqués dans la construction et la régulation de la paroi de la levure (de Groot P. *et coll.*, 2001).

### **1.3 Voies de biosynthèse des composants de la paroi.**

La synthèse des composants pariétaux a été décrite par plusieurs auteurs (Cid V. J. *et coll.*, 1995; Lipke P. N. et Ovalle R., 1998; Orlean P., 1997; Stratford M., 1994). Elle est étroitement liée aux événements du cycle cellulaire et se ferait par insertion des nouveaux composés après rupture de liaisons de type  $\beta$  (1,3) par des endo/exo  $\beta$ -glucanase encore imparfaitement caractérisées. La synthèse de la paroi a lieu lors de la formation du bourgeon et du septum (croissance polarisée) et lors de la croissance de la cellule fille (croissance non polarisée)

#### **1.3.1 Biosynthèse des $\beta$ (1,3) glucanes.**

Les  $\beta$ (1,3) glucanes sont des polymères linéaires constitués de 1500 résidus *D*-glucose reliés par des liaisons  $\beta$ (1,3). Ils ont une conformation hélicoïdale (Krainer E. *et coll.*, 1994; Manners D. J. *et coll.*, 1973). Les chaînes de  $\beta$ (1,3) glucanes sont associées par trois, grâce à

des liaisons hydrogènes, afin de former un réseau tridimensionnel élastique (Lipke P. N. et Ovalle R., 1998). Cette caractéristique explique la grande élasticité de la paroi cellulaire. Lorsque une cellule est transférée dans une solution hypertonique, elle rétrécit rapidement (Morris G. J. *et coll.*, 1986), (Martinez d. M., I *et coll.*, 1996) et la porosité de la paroi cellulaire diminue (De Nobel J. G. *et coll.*, 1990). Par contre, quand la cellule se trouve dans l'eau, elle grossit à nouveau.

### 1.3.1.1 Caractéristiques enzymatiques de la synthèse des $\beta(1,3)$ glucanes.

La synthèse des  $\beta(1,3)$  glucanes a tout d'abord été caractérisée au niveau enzymatique puis, dans un second temps au niveau génétique. La réaction de synthèse des  $\beta(1,3)$  met en jeu le transfert d'une unité glucose sur une chaîne de polymère en formation. Le donneur de glucose est l'UDP-glucose. L'activité  $\beta(1,3)$  glucane synthase qui est localisée au niveau membranaire est activée en présence d'EDTA, d'ATP et de GTP (Shematek E. M. *et coll.*, 1980), (Notario V. *et coll.*, 1982). Le produit de cette réaction s'est bien révélé être des  $\beta(1,3)$  glucanes du fait de leur alcali-solubilité, de leur insolubilité dans l'eau, et de leur sensibilité à la  $\beta(1,3)$  glucanase. L'activation de  $\beta(1,3)$  glucane synthase par le GTP est indépendante du transfert du  $\gamma$ -phosphate puisque des analogues du GTP incapable de transférer ce groupement agissent comme stimulateurs de l'activité  $\beta(1,3)$  glucane synthase.

Par la suite, il a été mis en évidence que cette activité enzymatique était séparable en deux fractions, l'une soluble et l'autre membranaire, chacune des deux étant inactive seule. L'activité est restaurée lorsqu'on mélange les deux fractions en présence de GTP ou de l'un de ses analogues. La fraction membranaire insoluble semble contenir la sous unité catalytique de l'enzyme et le site de fixation de l'UDP-glucose, alors que la fraction soluble serait une protéine capable de fixer le GTP, et pourrait avoir un rôle régulateur (Kang M. S. et Cabib E., 1986). Cette protéine fixant le GTP a été identifiée depuis comme étant le produit du gène *RHO1*.

### 1.3.1.2 Gènes impliqués dans la synthèse et la régulation des $\beta(1,3)$ glucanes.

Une approche génétique a été mise en place pour identifier les gènes impliqués dans la synthèse des  $\beta(1,3)$  glucanes, en utilisant une panoplie de molécules perturbant la formation de la paroi et des antifongiques (voir plus haut) et par approche biochimique. Elle a conduit au clonage et au séquençage d'un gène présentant trois caractéristiques intéressantes. Premièrement, l'hypersensibilité au blanc de Calacofluor des mutants affectés au niveau de la paroi permis de cloner le gène *CWH53* (Ram A. F. *et coll.*, 1995). Deuxièmement, l'échinocandine et la papulacandine B ont été utilisés pour isoler des mutants résistants et qui

ont permis de cloner les gènes *ETG1* (Douglas C. M. *et coll.*, 1994b) et *PRB1* (pour *Papulacandine B* Résistant) (Castro C. *et coll.*, 1995). En fait, *CWH53*, *ETG1* et *PRB1* représentent un seul gène. Il n'est pas essentiel, mais sa délétion réduit d'au moins 50% l'activité  $\beta(1,3)$  glucane synthase. Par ailleurs, des études sur la calcineurine (protéine phosphatase 2B dépendante du calcium et de la calmoduline) ont montré qu'elle était essentielle au maintien de l'intégrité cellulaire (Garrett-Engel P. *et coll.*, 1995). Le gène *CND1* a été cloné par complémentation d'une mutation *cmd1*, létale en combinaison avec l'absence de calcineurine. Enfin, le gène *FKS1* a été cloné par complémentation d'un mutant hypersensible au FK506 et à la cyclosporine A, ces deux molécules étant des inhibiteurs de la calcineurine (Eng W. K. *et coll.*, 1994; Parent S. A. *et coll.*, 1993). Les gènes *CND1* et *FKS1* sont identiques à *CWH53*, *ETG1* et *PRB1*. La nomenclature conservée est *FKS1*.

Un autre gène de séquence très proche de celle de *FKS1* a été isolé, il s'agit de *FKS2* (Douglas C. M. *et coll.*, 1994a). La délétion simultanée de ces deux gènes est létale et les protéines pour lesquelles ils codent sont identiques à 88%. Fks1 et Fks2 sont considérées comme des sous-unités catalytiques de deux formes distinctes de  $\beta(1,3)$  glucanes synthases, régulées de façon différente. La transcription de *FKS2* est dépendante de la calcineurine et est inhibée par le FK506 et la cyclosporine A (Mazur P. *et coll.*, 1995). En présence de ces inhibiteurs, la viabilité des cellules dépend donc uniquement de *FKS1*, ce qui explique pourquoi *FKS1* a été cloné par létalité synthétique avec la calcineurine, et comme responsable de l'hypersensibilité à ces drogues.

L'expression de ces deux gènes est régulée de façon complémentaire, *FKS1* prédomine lors de la croissance sur glucose, alors que *FKS2* est exprimé en absence de glucose. La transcription de *FKS1* est régulée au cours du cycle cellulaire, avec un pic maximum au moment de la transition G1/S, lors de la croissance du bourgeon (Ram A. F. *et coll.*, 1995). *FKS2* est fortement induit au cours de la sporulation (pour laquelle il est essentiel) et lors du traitement par la phéromone, de façon calcineurine-dépendante. Il semble que *FKS2* joue un rôle dans le remodelage de la paroi au cours du processus de conjugaison. La séquence de Fks1 et Fks2 présente 16 domaines transmembranaires, avec un grand domaine hydrophilique central localisé dans le cytosol. D'une façon intéressante, ce domaine central est fortement conservé dans les protéines FKS chez les champignons (Douglas C. M., 2001). Il semble que les protéines Fks1 et Fks2 jouent un rôle d'un scaffold pour d'autres protéines sous forme d'un complexe avec Rho1p (voir ci dessous). Le domaine central de la protéine FKS peut jouer un rôle important dans cette fonction de scaffolding (Klis F. M. *et coll.*, 2004).

Il a été montré que la sous-unité des  $\beta(1,3)$  glucane synthases qui lie le GTP (fraction "soluble") est une petite protéine G, codée par le gène essentiel *RHO1* (pour Ras Homologous, homologue à l'oncogène mammifère Ras). Les mutants *rho1* ont un phénotype de lyse à une étape spécifique du cycle cellulaire, lorsque les cellules ont un petit bourgeon. De plus, la protéine Rho1 présente une localisation cellulaire identique à celles des patches d'actine (Yamochi W. *et coll.*, 1994), et donc se trouve au sommet du bourgeon lorsque celui-ci se forme, puis au niveau du col entre les cellules mères et filles lors de la formation du septum (Yamochi W. *et coll.*, 1994) (voir partie Morphogénèse). L'identification de Rho1 comme la sous-unité régulatrice des  $\beta(1,3)$  glucane synthases liant le GTP a été réalisée de façon pratiquement simultanée par trois groupes différents. Ils ont montré d'une part que des mutants *rho1* présentent une activité  $\beta(1,3)$  glucane synthase réduite et d'autre part que la protéine Rho1 peut être copurifiée avec Fks1 (Drgonova J. *et coll.*, 1996; Mazur P. et Baginsky W., 1996; Qadota H. *et coll.*, 1996). En plus de ses implications dans le bourgeonnement et dans la synthèse des  $\beta(1,3)$  glucanes, Rho1 a au moins une autre fonction dans la cellule. En effet, elle est responsable de l'activation de la protéine kinase Pkc1, qui est elle-même au sommet de la cascade de MAP kinase (Mitogen Activated Proteins) et qui coordonne la synthèse des constituants de la paroi en réponse à des signaux extracellulaires (Kamada Y. *et coll.*, 1996; Nonaka H. *et coll.*, 1995) (voir partie Morphogénèse). L'activation de Rho1 est sous la dépendance des GEP (pour GDP/GTP Exchange Proteins) : Rom1 et Rom2 (pour *rho1* multicopy suppressor) (Delley P. A. et Hall M. N., 1999; Ozaki K. *et coll.*, 1996). L'inactivation de Rho1 quant à elle dépend des GAP (GTPase Activating Proteins) : Bem2, Sac7 et Lrg1 qui activent l'hydrolyse du GTP (associé à la forme activée de Rho1) en GDP. En conclusion, la protéine Rho1 est un élément central des mécanismes reliant la morphogénèse, la transmission des signaux extérieurs et la régulation de la synthèse des  $\beta(1,3)$  glucanes.

Un autre gène *GNS1* requis pour la synthèse normale de  $\beta(1,3)$  glucanes a été cloné par complémentation d'une mutation provoquant la résistance à un analogue de l'échinocandine, ainsi que par différents phénotypes pléiotropiques qui réduisant de 80-90% de l'activité spécifique  $\beta(1,3)$  glucane synthase (el Sherbeini M. et Clemas J. A., 1995a). Ce gène non essentiel code pour une protéine membranaire du réticulum endoplasmique susceptible d'interagir avec d'autres protéines, qui pourrait être une sous-unité ou un régulateur des  $\beta(1,3)$  glucane synthases. La délétion simultanée de *GNS1* et *FKS1* n'est pas létale, bien que la souche obtenue pousse très lentement et montre une activité  $\beta(1,3)$  glucane synthase plus faible que dans chacun des deux simples mutants. Récemment, il a été montré

qu'un mutant *gns1* accumule un inhibiteur non compétitif, le phytosphingosine, des  $\beta(1,3)$  glucane synthases dont la localisation est membranaire. Ce même mutant *gns1* contient 30 fois plus de phytosphingosines, un intermédiaire de la synthèse des sphingolipides. Il semble donc que la forte inhibition de l'activité  $\beta(1,3)$  glucane synthase observée dans un mutant *gns1* soit la conséquence de l'hyperaccumulation de phytosphingosines dans la cellule (Abe M. *et coll.*, 2001).

Une autre approche intéressante a été mise en place pour étudier la synthèse des  $\beta(1,3)$  glucanes, il s'agit de la sensibilité à la toxine killer qui a conduit à l'identification des deux gènes *HKR1* et *KNR4*. Ce dernier fait l'objet majeur de cet étude qui est développé en détail ultérieurement (voir partie *KNR4*, Section 1.7).

Gène	Fonction	Référence
<i>FKS1</i>	Sous-unité catalytique de la $\beta(1,3)$ glucane synthase (I)	(Castro C. <i>et coll.</i> , 1995; Douglas C. M. <i>et coll.</i> , 1994a; Eng W. K. <i>et coll.</i> , 1994; Inoue S. B. <i>et coll.</i> , 1995; Ram A. F. <i>et coll.</i> , 1995)
<i>FKS2</i>	Sous-unité catalytique de la $\beta(1,3)$ glucane synthase (II)	(Douglas C. M. <i>et coll.</i> , 1994a)
<i>RHO1</i>	Sous-unité régulatrice des $\beta(1,3)$ glucane synthases, fixe le GTP, joue un rôle clé dans la morphogenèse	(Drgonova J. <i>et coll.</i> , 1996; Mazur P. et Baginsky W., 1996; Qadota H. <i>et coll.</i> , 1996)
<i>GNS1</i>	Régulation de l'activité $\beta(1,3)$ glucane synthase	El-Sherbeini et Clemas, 1995
<i>KNR4</i>	Régulation de l'activité $\beta(1,3)$ glucane synthase	(Hong Z. <i>et coll.</i> , 1994a)
<i>HKR1</i>	Régulation de l'activité $\beta(1,3)$ glucane synthase et du site de bourgeonnement	(Yabe T. <i>et coll.</i> , 1996)

**Tableau 2 : Liste des gènes impliqués dans la synthèse et la dégradation des  $\beta(1,3)$  glucanes chez *S.cerevisiae***

### 1.3.2 Biosynthèse des $\beta(1,6)$ glucanes.

Les  $\beta(1,6)$  glucanes jouent un rôle clé dans la structure de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*. Ils constituent une sorte de ciment qui relie entre eux les autres composants : mannoprotéines,  $\beta(1,3)$  glucanes et chitine (Kollar R. *et coll.*, 1997). Ils représentent environ 7% du poids sec de la paroi et sont minoritaires par rapport aux  $\beta(1,3)$  glucanes, avec un degré de polymérisation de 140 à 350 résidus (Shahinian S. et Bussey H., 2000). Ils ont une structure plus complexe que les  $\beta(1,3)$  glucanes (Magnelli P. *et coll.*, 2002), car constitués

d'un cœur de résidus liés en  $\beta(1,6)$  branché par des liaisons  $\beta(1,3)$  portant des chaînes latérales  $\beta(1,6)$  (Bostian K. A. *et coll.*, 1980).

### 1.3.2.1 Gènes impliqués dans la synthèse des $\beta(1,6)$ glucanes.

Des cribles génétiques ont permis d'identifier plusieurs protéines impliquées dans la synthèse des  $\beta(1,6)$  glucanes, ces protéines sont localisées dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi, le cytoplasme et la surface cellulaire. Ces cribles ont utilisé principalement la toxine killer K1 (voir introduction, les toxines killer, section 1.2.3.2). Les mutants affectés dans la synthèse des  $\beta(1,6)$  glucanes présentent moins ou pas de récepteurs pour la toxine, ces mutants sont donc résistants à la toxine Killer K1 (Hutchins K. et Bussey H., 1983). Plusieurs mutants résistants à la toxine Killer K1 ont été isolés, il s'agit des mutants *kre* (pour Killer Resistant), de *kre1* à *kre11*, qui présentent une diminution de la teneur en  $\beta(1,6)$  glucanes dans leur paroi (Al Aidroos K. et Bussey H., 1978; Boone C. *et coll.*, 1990; Brown J. L. *et coll.*, 1993). Certains gènes *KRE* ont été identifiés, et sont requis pour la synthèse de ce polymère. L'ensemble de ces données a conduit à une hypothèse qui met la lumière sur le processus séquentiel de la biosynthèse de  $\beta(1,6)$  glucanes. Cette synthèse des  $\beta(1,6)$  glucanes est initiée dans le réticulum endoplasmique, ensuite dans l'appareil de golgi et jusqu'à la surface cellulaire (Azuma M. *et coll.*, 2002; Klis F. M., 1994; Orlean P., 1997; Shahinian S. et Bussey H., 2000). Cependant, les  $\beta(1,6)$  glucanes ont été détectés par immuno-marquage au niveau de la surface cellulaire, mais pas le long de l'appareil sécrétoire, suggérant ainsi que l'assemblage final des  $\beta(1,6)$  glucanes soit principalement localisé à la surface cellulaire. Les gènes *KRE5*, *BIG1*, *CWH41*, *ROT2* et *CNE1* codent pour des protéines du réticulum endoplasmique impliquées dans la synthèse des  $\beta(1,6)$  glucanes. Le mutant *kre5* dont la viabilité varie suivant le fond génétique, possède une paroi presque entièrement dépourvue de  $\beta(1,6)$  glucanes et une croissance extrêmement lente (Meaden P. *et coll.*, 1990; Shahinian S. *et coll.*, 1998). De plus, ces cellules présentent de nombreuses aberrations morphologiques : une paroi sans couche externe de mannoprotéines et une importante accumulation dans le cytoplasme de vacuoles issues du réticulum endoplasmique (Simons J. F. *et coll.*, 1998). De plus, les mutants *kre5* sécrètent dans le milieu extérieur des protéines qui sont normalement fixées à la paroi, comme Cwp1 ou l' $\alpha$ -agglutinine (Jiang B. *et coll.*, 1996; Lu C. F. *et coll.*, 1995). Le gène *KRE1* code pour une protéine riche en sérine et thréonine et fortement O-glycosylée, localisée à la surface cellulaire (Roemer T. et Bussey H., 1995). Dans les mutants *kre1* la proportion de  $\beta(1,6)$  glucanes dans la paroi est réduite de 40%, la structure de ces

glucanes est modifiées et la couche externe de mannoprotéines apparaît absente de la paroi (Boone C. *et coll.*, 1990)

Les gènes *KRE6* et *SKN1* codent pour deux glycoprotéines membranaires homologues ayant 66% d'identité et localisées au niveau de l'appareil Golgi (Roemer T. *et coll.*, 1994). La délétion de *KRE6* entraîne un ralentissement de la croissance cellulaire, une diminution de 50% de la fraction  $\beta$ -glucanes de la paroi, affectant à la fois les  $\beta(1,6)$  glucanes et les  $\beta(1,3)$  glucanes (Roemer T. et Bussey H., 1991). La disruption de *SKN1* ne cause aucun des phénotypes associés aux mutants *kre6*, et ne diminue pas non plus la sensibilité à la toxine killer K1, bien que *SKN1* en multicopie permette de supprimer les défauts associés à la délétion de *KRE6*. La double délétion de *KRE6* et *SKN1* est létale dans certains fonds génétiques.

*KRE9* et *SKN7* codent pour des protéines de la surface cellulaire. *KRE9* code pour une protéine fortement *O*-glycosylée, nécessaire à la synthèse des  $\beta(1,6)$  glucanes et à une croissance normale (Brown J. L. et Bussey H., 1993). Les mutants *kre9* ont une croissance extrêmement lente et une morphologie anormale. Le gène *SKN7* a été identifié comme supprimeur multicopie de *KRE9*. La surexpression du gène *SKN7* supprime le phénotype de lyse des mutants *pkc1*, et restaure l'expression des cyclines de la phase G1 dans les cellules dépourvues des facteurs de transcription SBF et MBF (voir partie 1.4) (Brown J. L. *et coll.*, 1994; Morgan B. A. *et coll.*, 1995).

Tout récemment, un dosage immunoenzymatique utilisant les anticorps anti- $\beta(1,6)$ -glucane mis en évidence une activité de synthèse de  $\beta(1,6)$ glucanes dans des extraits membranaires de levure. Cette activité est dépendante de la présence de GTP, au même titre que la  $\beta(1,3)$ -glucane synthase, et il a été montré que c'était la protéine Rho1 qui est responsable de cette activation. Cette activité enzymatique est en revanche réduite chez les mutants *kre5* et *kre1* (Vink E. *et coll.*, 2004).

### 1.3.2.2 Lien avec la voie de la Pkc1.

Des interactions génétiques ont été mises en évidence entre certains gènes impliqués dans la synthèse  $\beta(1,6)$  glucanes et différents éléments de la voie de transmission du signal dépendante de la Pkc1. Par exemple, le phénotype de lyse des mutants *pkc1* peut être supprimé par une surproduction même assez faible de Kre6, et la délétion simultanée des gènes *PKC1* et *KRE6* est létale, ainsi que celles de *MKK1,2* et *KRE6*, *PKC1* et *KRE11* (Roemer T. *et coll.*, 1994). Ces éléments plaident pour un contrôle de la synthèse des  $\beta(1,6)$

glucanes par la Pkc1, éventuellement par une branche distincte de la cascade de MAP kinase dépendante de la Pkc1.

Gène	Fonction proposée	Localisation cellulaire
<i>KRE1</i>	Fortification de la paroi	Surface cellulaire
<i>KRE5</i>	Homologie avec l'UGGT, glucosyl transférase impliquée dans la synthèse des N-glycanes	Réticulum Endoplasmique
<i>KRE6</i>	Interagit avec Pkc1	Golgi
<i>SKN1</i>	Homologue de <i>KRE6</i>	Golgi
<i>KRE9</i>	Régulateur ?	Surface cellulaire
<i>KNH1</i>	Homologue de <i>KRE9</i>	Surface cellulaire
<i>CWH41</i>	Glucosidase I	Réticulum Endoplasmique
<i>KRE11</i>	Transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de golgi ?	Cytoplasme
<i>SKN7</i>	Facteur de transcription, interagit avec Pkc1	Nucléaire et cytoplasmique ?

**Tableau 3 : Liste des gènes impliqués dans la synthèse des  $\beta(1,6)$ glucanes chez la levure *S.cerevisiae*.**

### 1.3.3 Synthèse des mannoprotéines.

Les mannoprotéines se trouvent dans la couche externe de la paroi et constituent le deuxième composant majoritaire de la paroi chez *S. cerevisiae*. Ces mannoprotéines sont des protéines de haut poids moléculaire glycosylées par des polysaccharides très ramifiés d'au moins 150 unités de *D*-mannose reliées par des liaisons  $\alpha(1,2)$ ,  $\alpha(1,3)$  et  $\alpha(1,6)$ . Elles peuvent être divisées en deux classes : les GPI-CWP ancrées aux  $\beta(1,6)$ -glucanes pariétaux via une ancre GPI, et les PIR-CWP attachées directement aux  $\beta(1,3)$ -glucanes (Kapteyn J. C. *et coll.*, 1999). D'autres mannoprotéines pariétales plus marginales sont attachées par des liaisons ioniques ou disulfides. Les mannoprotéines pariétales peuvent être des éléments structuraux participant à l'intégrité de la paroi, des enzymes localisées dans la paroi elle-même, dans l'espace périplasmique ou à la surface cellulaire ou bien des protéines destinées à être libérées dans le milieu. Les unités saccharidiques nécessaires à la synthèse des mannoprotéines sont issues du métabolisme intermédiaire des carbohydrates, sous forme de sucres nucléotidiques: UDP-GlcNAc, UDP-Glc et GDP-Man. La formation d'UDP-Glc débute par l'isomérisation du glucose-6P en glucose-1P sous l'action de deux phosphoglucomutases codées par les gènes *PGM1* et *PGM2*. (Boles E. *et coll.*, 1997; Oh D. et Hopper J. E., 1990). La formation d'UDP-Glc à partir de glucose-1P et d'UTP, est catalysée par l'UDP-Glc pyrophosphorylase codée par *UGPI* (Daran J. M. *et coll.*, 1995). Le transfert du glucose à partir d'UDP-glucose sur une molécule de dolichol-phosphate pour former du dolichol-phosphate-glucose (Dol-P-Glc) est

sous la dépendance de l'UDP-glucose:dolichol-phosphate glucosyltransférase fixée à la membrane du réticulum endoplasmique, codée par *ALG5* (Heesen S. *et coll.*, 1994).

La biosynthèse des mannanes débute dans le cytoplasme par l'isomérisation du fructose-6P en mannose-6P sous l'action de la mannose-6P phosphate isomérase Pmi40p (Paravicini G. *et coll.*, 1992). Après épimérisation du mannose-6P en mannose-1P par la mannose phosphate mutase codée par *SEC53* (Kepes F. et Schekman R., 1988), le GDP-mannose est formé à partir de GTP et de mannose-1P par la GDP-mannose pyrophosphorylase Psa1 (Hashimoto H. *et coll.*, 1997; Yoda K. *et coll.*, 2000).

Les mannoprotéines de la paroi peuvent porter des chaînes extérieures comprenant jusqu'à 150 mannoses reliés par des liaisons  $\alpha(1,6)$ , elles-mêmes ramifiées par des chaînes latérales d'unités mannose reliées en  $\alpha(1,2)$  et  $\alpha(1,3)$ . Ce complexe saccharidique est fixé sur un groupement amide de l'asparagine d'une suite de trois acides aminés Asn-X-Thr/Asn-XSer, où X est n'importe quel acide aminé sauf la proline (Cutler N. S. *et coll.*, 2001). Les chaînes de *N*-glycosylation sont constituées d'un cœur d'oligosaccharide comprenant huit mannoses et deux unités de *N*-acétylglucosamine. Dans certains cas, le cœur d'oligosaccharide peut contenir jusqu'à treize mannoses (Herscovics A. et Orlean P., 1993). L'étude des mutants *mnn* a également facilité la caractérisation d'autres gènes dont les produits sont impliqués indirectement dans la glycosylation ou dans d'autres fonctions cellulaires associées à l'appareil sécrétoire (Ballou C. E., 1990; Jigami Y. et Odani T., 1999; Lussier M. *et coll.*, 1997). La maturation des chaînes *N*-glycosylées, qui a lieu dans l'appareil de Golgi, peut conduire à l'ajout de quelques mannoses supplémentaires ou de chaînes extérieures de plusieurs centaines de résidus (Dean N., 1999). Ces chaînes extérieures constituent les mannanes à proprement dit des mannoprotéines. L'étude de l'élaboration de ces chaînes extérieures, grâce aux mutants *mnn*, a permis d'identifier d'une part le gène *MNN1* qui code pour l' $\alpha(1,3)$  mannosyltransférase terminale, mais aussi toute une kyrielle de gènes *MNN* codant pour des mannosyltransférases impliquées dans la maturation des chaînes de *N*-glycosylation comme *MNN9* (Yip C. L. *et coll.*, 1994).

La *O*-glycosylation consiste en une chaîne linéaire de quatre ou cinq mannoses reliés par des liaisons  $\alpha(1,2)$  et  $\alpha(1,3)$  (Ernst J. F. et Prill S. K., 2001). La synthèse de ces chaînes saccharidiques commence dans le réticulum endoplasmique par le transfert d'un mannose donné par le Dol *P*-Man sur un résidu sérine ou thréonine de la protéine (Strahl-Bolsinger S. *et coll.*, 1999). Ce sont les sept gènes de la famille *PMT* (pour Protein *O*-Mannosyl Transferase) qui interviennent dans cette première étape (Gentzsch M. et Tanner W., 1996; Girschbach V. *et coll.*, 2000; Immervoll T. *et coll.*, 1995; Lussier M. *et coll.*, 1995a; Strahl-

Bolsinger S. *et coll.*, 1999; Timpel C. *et coll.*, 2000). Les gènes de cette famille codent pour des *O*-mannosyltransférases ayant entre elles, 50 à 80% d'identité de séquence nucléotidique. Alors que les simples mutants n'ont pas de phénotype marqué, les triples mutants *pmt1pmt3pmt4* et *pmt2pmt3pmt4* ne sont pas viables (Gentzsch M. et Tanner W., 1996). En plus de son rôle de *O*-mannosyltransférase, Pmt1p pourrait avoir un rôle dans l'ancrage de certaines protéines pariétales (Bourdineaud J. P. *et coll.*, 1998). La synthèse des chaînes *O*-glycosylées se poursuit dans l'appareil de Golgi par l'ajout de mannoses supplémentaires à partir de GDP-mannose. Toutes les enzymes impliquées dans l'élongation des chaînes *O*-glycosylées sont des protéines membranaires dont le domaine catalytique est orienté vers le lumen de l'appareil de Golgi (Hausler A. *et coll.*, 1992; Lussier M. *et coll.*, 1995b; Lussier M. *et coll.*, 1997; Yip C. L. *et coll.*, 1994). Les protéines Ktr1, Ktr3 et Mnt1 semblent être responsables du transfert du second  $\alpha(1,2)$  mannose (Lussier M. *et coll.*, 1997; Ruiz C. *et coll.*, 1999). L'élongation continue grâce à la protéine Mnt1 responsable de l'ajout du troisième mannose (Hausler A. *et coll.*, 1992). Enfin, le quatrième et cinquième mannose sont transférés par Mnn1p, une enzyme qui participe donc à la fois au processus de *N*- et *O*-glycosylation. L'addition d'une ancre Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI) à l'extrémité C-terminale des protéines est un mécanisme, chez les eucaryotes, qui vise à attacher ces protéines à la surface cellulaire. Chez la levure, les ancres GPI sont essentielles à la morphogenèse cellulaire et à l'ancrage des mannoprotéines de type GPI-CWP aux  $\beta(1,6)$ glucanes (Lipke P. N. et Ovalle R., 1998; Orlean P., 1997).

Les protéines à ancre GPI sont synthétisées sous forme de précurseurs portant à la fois une séquence signal *N*-terminale hydrophobe leur permettant d'entrer dans la voie de sécrétion, et un peptide *C*-terminal hydrophobe qui sera clivé et remplacé par l'ancre. Le site de clivage de la protéine se situe 10 à 12 acides aminés en amont du domaine *C*-terminal hydrophobe. De plus, des expériences de mutagenèse ont montré que l'acide aminé à chaîne latérale courte (type isoleucine par ex.) sur lequel l'ancre est fixée doit être suivi de deux résidus également à chaîne latérale courte (Nuoffer C. *et coll.*, 1993).

#### 1.3.4 Biosynthèse de la chitine.

Malgré sa faible proportion (1 à 4% du poids sec de la paroi), la chitine est un composant essentiel de la paroi. Il s'agit d'un polymère linéaire constitué d'unités d'environ 120 résidus *N*-acétylglucosamine reliés par des liaisons  $\beta(1-4)$ . Les chaînes de chitine sont associées de façon antiparallèle par des ponts hydrogènes pour former des microfibrilles capables de retenir le blanc de Calcofluor (Elorza M. V. *et coll.*, 1983; Minke R. et Blackwell

J., 1978; Roncero C. et Duran A., 1985). Chez *S.cerevisiae*, ainsi que chez *C.albicans*, la chitine est attachée de façon covalente aux  $\beta(1-3)$  et  $\beta(1-6)$  glucanes (Kapteyn J. C. *et coll.*, 1997; Klis F. M. *et coll.*, 2001; Kollar R. *et coll.*, 1995; Kollar R. *et coll.*, 1997). En culture végétative, la chitine est très concentrée au niveau des cicatrices de bourgeonnement laissées à la surface de la cellule mère après la division cellulaire. Elle est également présente de façon dispersée dans l'ensemble de la paroi et peut atteindre 20% de la masse sèche totale de la paroi dans certaines conditions de stress ou chez des mutants affectés dans la synthèse de glucanes ou mannanes (Dallies N. *et coll.*, 1998; Magnelli P. *et coll.*, 2002). Cette hyperaccumulation de chitine sous ces conditions particulières s'explique par une activation transcriptionnelle du gène *GFA1* qui code pour la glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase, la première enzyme impliquée dans la voie de synthèse de la chitine (Lagorce A. *et coll.*, 2002).

#### 1.3.4.1 Gènes impliqués dans la synthèse de la chitine.

La synthèse de la chitine est sous le contrôle de trois chitine synthases codées par les gènes *CHS1*, *CHS2* et *CHS3* (Bulawa C. E. *et coll.*, 1986; Bulawa C. E., 1993; Silverman S. J. *et coll.*, 1988). La mutation de l'un de ces gènes conduit à une diminution de la quantité de chitine pariétale et donc à une résistance au blanc de Calcofluor (Roncero C. *et coll.*, 1988b). Alors que les simples mutants *chs1*, *chs2*, *chs3* et les doubles mutants *chs1chs2* et *chs1chs3* sont viables, le double mutant *chs2chs3* ne l'est pas (Shaw J. A. *et coll.*, 1991). *CHS1*, *CHS2* et *CHS3* codent pour des protéines transmembranaires dont le domaine catalytique est situé au niveau de la face cytoplasmique. D'autre part, Chs1, Chs2 et Chs3 ont également été observées au niveau de vésicules cytoplasmiques appelées chotosomes (Chuang J. S. et Schekman R. W., 1996; Leal-Morales C. A. *et coll.*, 1988; Leal-Morales C. A. *et coll.*, 1994; Ziman M. *et coll.*, 1996). La Chs1 exerce une fonction de réparation au niveau de la cicatrice de bourgeon lors de la séparation des cellules mère et fille (Cabib E. *et coll.*, 1989). La Chs2 est impliquée dans la synthèse du septum primaire entre les cellules mère et fille ( voir paragraphe Morphogenèse). Chs3 catalyse la formation de 90% de la chitine pariétale (Garcia-Rodriguez L. J. *et coll.*, 2000). Chs3 est une enzyme dont la localisation cellulaire et l'activité au cours de la division cellulaire sont régies par les protéines régulatrices codées par *CHS4*, *CHS5*, *CHS6* et *CHS7*. Cet ensemble de protéines est impliqué dans la régulation de la synthèse de la chitine au cours du cycle cellulaire et au cours des différents évènements morphologiques de différenciation tels que la conjugaison, la sporulation ou la croissance filamenteuse (voir partie Morphogenèse).

#### 1.3.4.2 Synthèse de la chitine au cours du cycle cellulaire.

Au cours du cycle cellulaire, les différentes activités chitine synthase sont régulées de façon transcriptionnelle, en particulier pour *CHS1* et *CHS2*, et post-traductionnelle par une activation de protéolyse et par des interactions avec des sous unités régulatrices. En fin de phase G1, un anneau de chitine est formé à la base du futur bourgeon (Drubin D. G., 1991). Cette déposition localisée de chitine se poursuit lors de croissance du bourgeon. En fin de phase G2, lorsque le bourgeon a atteint une taille proche de celle la cellule mère, une activation de la transcription du gène *CHS2* est observée (Pammer M. *et coll.*, 1992), ainsi que de l'activité CSII (Choi K. Y. *et coll.*, 1994) qui coïncide avec la synthèse d'un fin disque de chitine séparant les cellules mères et filles, le septum primaire. Une chitinase, codée par le gène *CHSI*, hydrolyse alors le septum primaire permettant la séparation des deux cellules. A ce stade du cycle cellulaire, la transcription du gène *CHSI* est activée (Pammer M. *et coll.*, 1992) et l'activité de réparation due à la CSI renforce la cicatrice de bourgeon à la surface de la cellule mère. Le gène *CHSI* pourrait être régulé au cours du cycle cellulaire d'une façon asymétrique entre les cellules mères et filles. La régulation de la CSIII est plus complexe. La transcription du gène *CHS3* présente des fluctuations au cours du cycle cellulaire (Pammer M. *et coll.*, 1992). La CSIII est responsable de la chitine déposée sous forme d'anneau à la base du bourgeon naissant (Shaw J. A. *et coll.*, 1991).

#### 1.3.4.3 Synthèse de chitine lors de la conjugaison.

Lors du traitement par la phéromone a (ou  $\alpha$ ), les cellules haploïdes de type a subissent un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire et d'importantes modifications morphologiques. Les cellules s'allongent, prennent une forme de poire (appelée projection de conjugaison ou shmoo) et la chitine est déposée au sommet de celle-ci (voir partie Morphogénèse). Il semble que cette chitine soit attribuée à l'activité *CHS3*, avec un rôle très important joué par la sous-unité Chs5. En effet, des mutants *chs5* présentent un grave défaut de formation de projections, plus marqué que celui des mutants *chs3* (Santos B. *et coll.*, 1997). Un rôle a été proposé pour la *CHSI* lors de la conjugaison : Elle pourrait assurer une fonction de réparation (comme au cours du cycle cellulaire) lors de la lyse de la paroi qui doit avoir lieu pour la fusion des deux cellules (Choi W. J. *et coll.*, 1994).

#### 1.3.4.4 Synthèse de chitine lors de la sporulation.

Après les deux divisions méiotiques, les quatre noyaux haploïdes sont d'abord entourés d'une double membrane. Puis des composants pariétaux sont déposés à l'intérieur de celle-ci, jusqu'à la formation d'une structure en quatre couches, extrêmement résistantes aux

attaques enzymatiques (proteases, chitinases, glucanases) ainsi qu'aux solvants organiques (éther, alcool) et aux chocs thermiques. A l'heure actuelle, les processus moléculaires conduisant à cet accroissement de la synthèse de chitine ne sont pas identifiés. Cependant, certains résultats présentés dans ce mémoire sont susceptibles de fournir des éléments de réponse (voir partie KNR4, section 1.7)

#### **1.4 Polarité cellulaire et morphogénèse chez la levure.**

Le nombre important de gènes responsables de la synthèse de la paroi et la nécessité d'un contrôle étroit de cette synthèse en réponse à des signaux extra et intra cellulaires impliquent l'existence de systèmes de régulation complexes. Ces systèmes doivent être capables d'organiser la morphogénèse et de la relier au cycle cellulaire d'une part, et aux changements environnementaux d'autre part. Si les gènes codant pour les enzymes de biosynthèse des composants de la paroi ont été isolés par des phénotypes de résistance ou de sensibilité à différentes drogues et toxines, ceux impliqués dans leur régulation ont plutôt été identifiés grâce à des mutants lytiques (ou auto-lytiques), ou affectés au niveau du bourgeonnement (blocage en phase G1, bourgeonnement anarchique...) et, plus généralement, présentant des défauts de morphogénèse, soit en condition de croissance végétative, soit en condition de différenciation (conjugaison, sporulation, formation de pseudo-hyphes). Parmi eux on trouve de nombreux gènes CDC (pour Cell Division Cycle), requis pour la mitose mais pas pour la croissance cellulaire.

Le processus de la morphogénèse cellulaire est un des processus fondamentaux communs chez les organismes unicellulaires et multicellulaires. Les changements morphologiques rendent la cellule capable de remplir des fonctions spécialisées et de construire des formes uniques.

Deux principaux types de mécanismes ont été mis en évidence dans la régulation de la morphogénèse. Le premier est constitué de cascades de phosphorylation du type MAP kinases (pour Mitogen Activated Proteins), avec une importance prépondérante de celle dépendant de la protéine kinase C ou Pkc1, l'homologue chez *Saccharomyces cerevisiae* de la PKC des mammifères (Lewin A. S. *et coll.*, 1990). Le second mécanisme de régulation est également un motif conservé dans de nombreux autres types de cellules (Hall A., 1990) (Bourne H. R. *et coll.*, 1991). Il met en jeu de petites GTPases (ou "protéines G", fixant le GTP) qui sont activées lorsqu'elles sont liées au GTP et inactives lorsqu'elles sont liées au GDP. Le cycle GTP/GDP de ces protéines fait intervenir plusieurs types de régulateurs, notamment les GEPs (pour GTP/GDP exchange proteins), les GDIs (pour guanine nucléotide

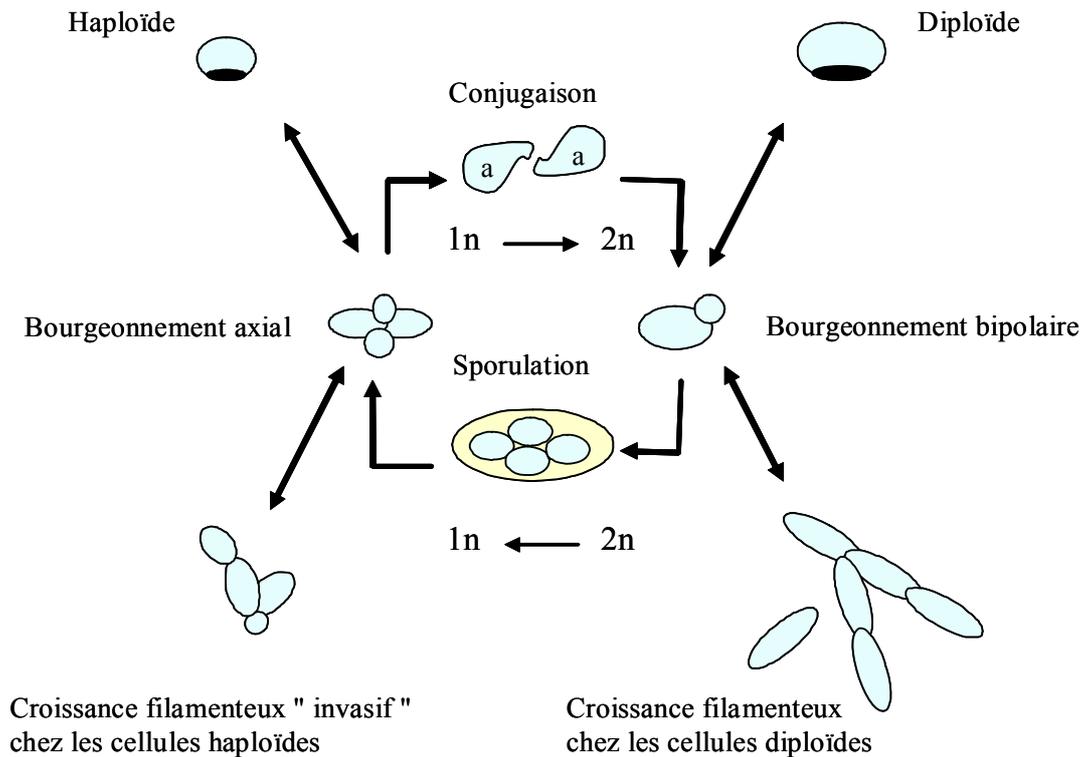
dissociation inhibitors) et les GAPs (pour GTPase activating proteins). Deux protéines du type GTPases jouent un rôle primordial dans la morphogenèse, il s'agit de Cdc42 et de Rho1.

Par ailleurs, les différents éléments du cytosquelette sont impliqués dans la morphogenèse. L'actine est indispensable à la croissance polarisée des cellules et les septines qui constituent l'anneau au niveau du col entre cellule mères et filles ("neck filaments") sont nécessaires à la formation du septum et à la cytokinèse (Longtine M. S. *et coll.*, 1996). Les microtubules semblent jouer un rôle moins important dans les processus morphogénétiques et notamment au cours du bourgeonnement puisqu'ils ne sont pas indispensables pour ces événements (Yang S. *et coll.*, 1997)

La « croissance polarisée » est une croissance asymétrique d'une région particulière de la cellule pour former une forme et structure particulière. La levure *Saccharomyces cerevisiae* induit une croissance polarisée durant différentes étapes de son cycle cellulaire, et cette croissance se produit à une position définie sur la surface de la cellule.

Quatre types de programmes morphogénétiques différents peuvent avoir lieu chez *Saccharomyces cerevisiae* :

- Une multiplication cellulaire par bourgeonnement se produit en présence d'une ample ressource nutritionnelle (croissance végétative).
- La formation de shmoos en réponse aux phéromones sexuelles.
- La sporulation à partir d'une cellule diploïde a/ $\alpha$  en carence nutritionnelle.
- La formation de pseudohyphes dans certaines conditions de carence en azote (voir paragraphe croissance pseudohyphale ou filamenteuse) (Figure 3).



**Figure 3: Les différentes options de développement chez *Saccharomyces cerevisiae*.**

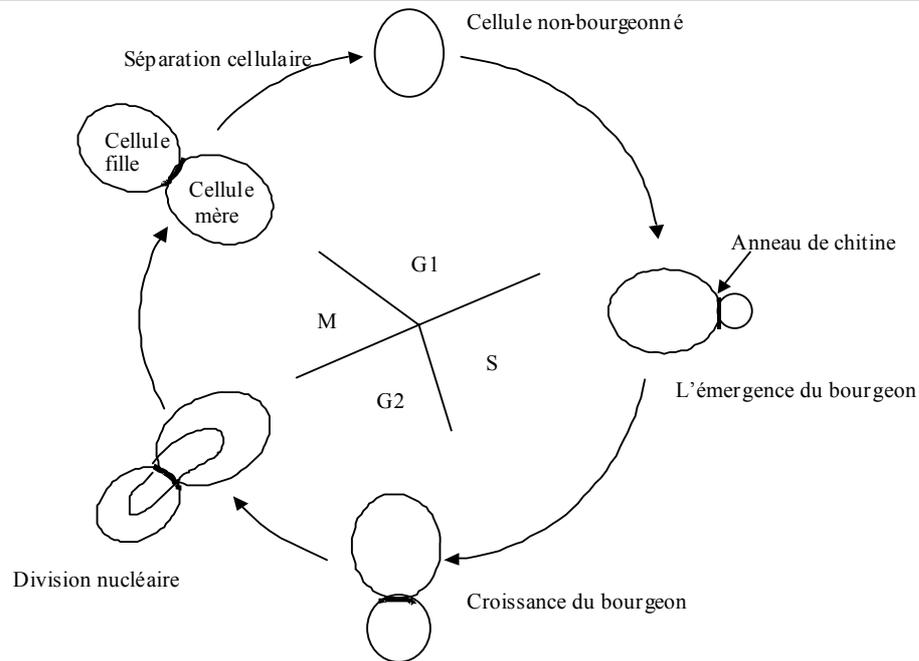
La croissance polarisée de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est nécessaire pour diriger le bourgeonnement durant la réplication cellulaire et la formation de shmoos durant la conjugaison. Plusieurs exigences sont requises pour que la croissance cellulaire se produise chez la levure :

- L'affaiblissement de la paroi cellulaire par des enzymes de digestion pour permettre l'expansion cellulaire.
- La synthèse d'une nouvelle paroi cellulaire par les enzymes biosynthétiques.

#### 1.4.1 Bourgeoisement.

En culture végétative, le cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* peut être divisé en quatre étapes morphogénétiques synchronisées avec les événements nucléaires. La première a lieu au cours de la phase G1, elle est constituée par la sélection du site de bourgeonnement. Ensuite, la localisation du cytosquelette d'actine ainsi que de nombreuses autres protéines au niveau du site sélectionné permet l'émergence du bourgeon, juste après le point START du cycle cellulaire. La croissance du bourgeon qui s'accompagne d'un relâchement de la localisation de l'actine, commence en fin de phase G1 et se poursuit à travers les phases S et G2. Enfin la séparation des cellules mère et fille ou cytokinèse, qui

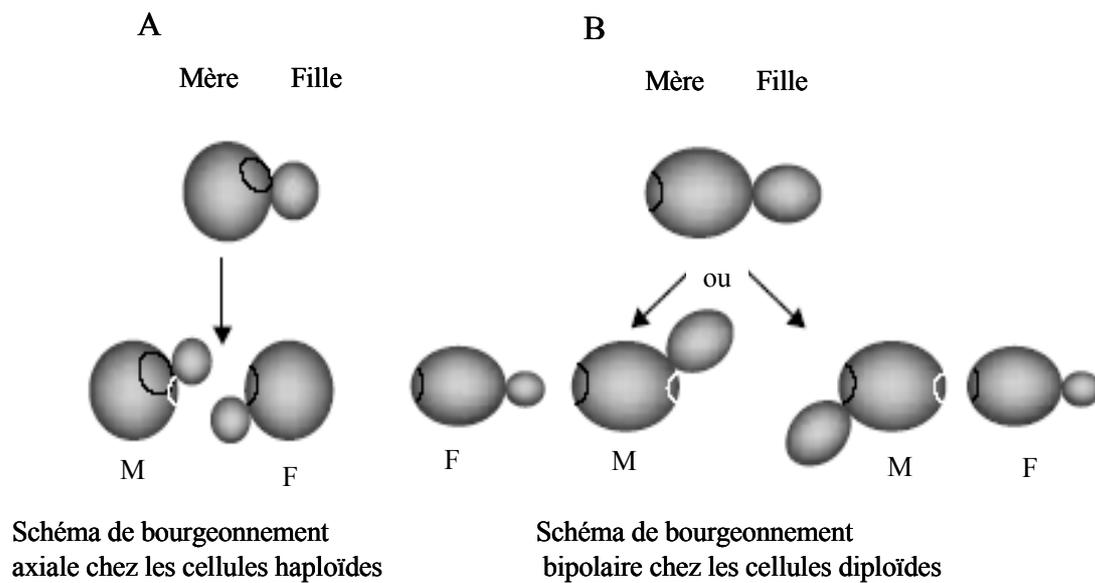
nécessite une redistribution préalable du cytosquelette d'actine vers la région du septum, a lieu en fin de phase M, après la division nucléaire (Figure 4).



**Figure 4 : Les différentes phases du cycle cellulaire végétatif de *Saccharomyces cerevisiae*.**

#### 1.4.1.1 Sélection du site de polarisation durant le bourgeonnement

Les divisions cellulaires se produisent par bourgeonnement sur des sites spécifiques, qui sont déterminés en fonction du type sexuel des cellules de *Saccharomyces cerevisiae*. Les cellules choisissent leur site de bourgeonnement selon deux schémas distincts (Madden K. et Snyder M., 1998), (Casamayor A. et Snyder M., 2002). Les cellules haploïdes  $a$  ou  $\alpha$  (ainsi que les diploïdes  $a/a$  ou  $\alpha/\alpha$ ) bourgeonnent selon un schéma axial dans lequel le nouveau bourgeon est placé immédiatement adjacent au site utilisé lors du cycle précédent. Les cellules  $a/\alpha$  (diploïde normal) utilisent un schéma bipolaire, dans lequel le nouveau bourgeon peut être placé soit près du dernier site utilisé soit au pôle opposé de la cellule. De plus, le premier bourgeon d'une cellule fille  $a/\alpha$  est en général placé au pôle distal, à l'opposé de sa cicatrice de naissance (Chant J. et Pringle J. R., 1995). Il semble que la sélection du site de bourgeonnement résulte de deux voies différentes dans les deux schémas, puisque l'un peut être perdu sans que l'autre soit affecté (Zahner J. E. *et coll.*, 1996)(Figure 5).



**Figure 5 : Les schémas de bourgeonnement axial et bipolaire chez *Saccharomyces cerevisiae*. La cicatrice marque la place où la cellule a été initialement attachée à la cellule mère (M), appelé la cicatrice de naissance, alors que les cicatrices qui sont plus petites provenant de la cellule fille sont appelées les cicatrices de bourgeon. De nombreuses protéines nécessaires pour la sélection du site de bourgeonnement ont été identifiées. Elles peuvent être classées en trois groupes selon les différents phénotypes de schéma de bourgeonnement associés.**

L'analyse des différentes protéines impliquées dans la sélection du site de bourgeonnement a révélé deux pistes importantes :

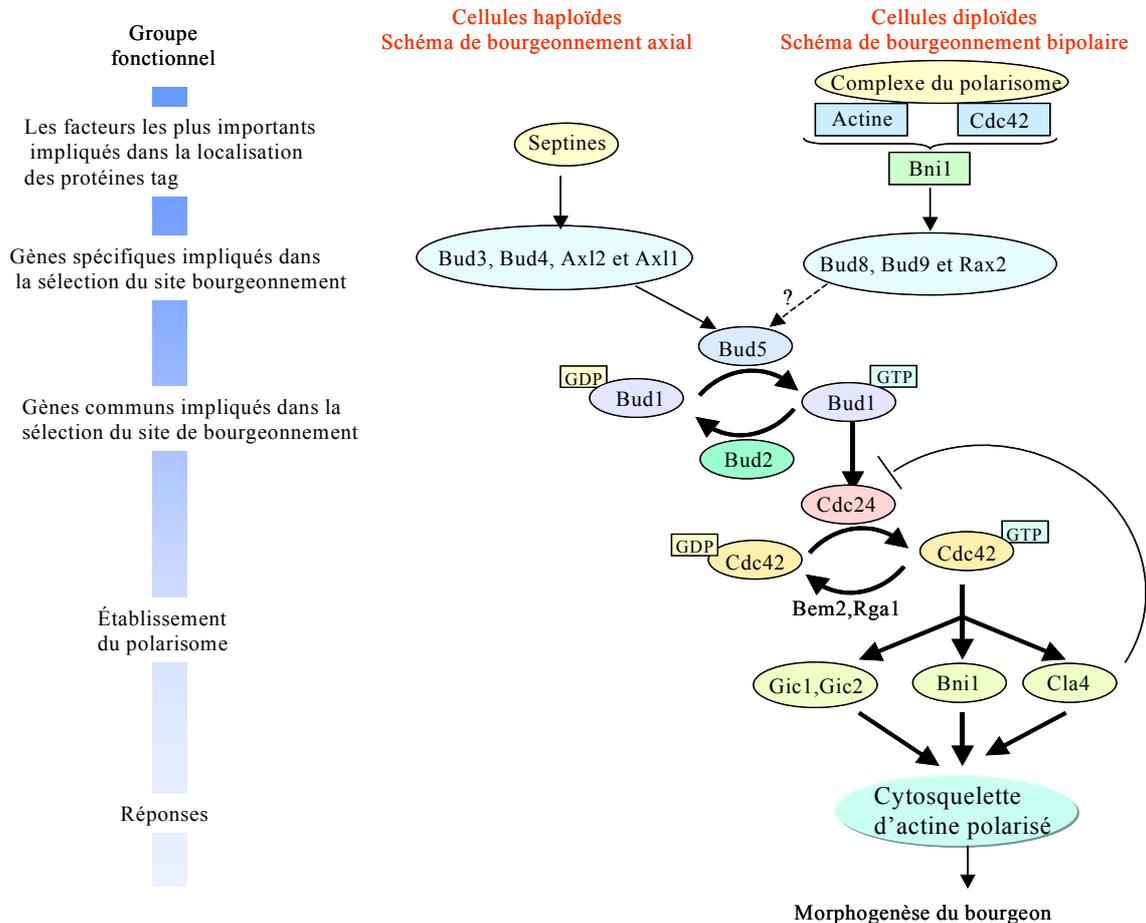
1- Il existe une hiérarchie des sites de bourgeonnement. Chez les cellules haploïdes, la perte par mutation ou par d'autres moyens des composants du mécanisme axial provoque la sélection des sites selon le schéma bipolaire (Chant J. et Pringle J. R., 1995; Madden K. et Snyder M., 1992; Snyder M. *et coll.*, 1991). Il existe donc chez les cellules haploïdes un mécanisme de sélection préférentiel pour le site axial, le mécanisme bipolaire étant utilisé par défaut.

2- Les études sur les protéines impliquées dans la sélection des sites de bourgeonnement ont montré qu'il existe différents types des composants (a)- Marqueurs moléculaires corticaux (cortical tags), un groupe des protéines qui se localisent au niveau du pôle cellulaire et qui marquent les nouveaux sites de croissance polarisée. (b)- GTPase, qui semble diriger les molécules ou aider à assembler des molécules sur des sites spécifiques. (c)- Des protéines réunies sur les nouveaux sites et qui participent à la formation des nouveaux bourgeons. (Casamayor A. et Snyder M., 2002; Madden K. et Snyder M., 1998).

Les protéines Spa2, Pea2, Bud6 et Bni1 forment ce qu'on appelle le « complexe 12S » ou « polarisome » (Fujiwara T. *et coll.*, 1998; Sheu Y. J. *et coll.*, 1998). Ces protéines se

présentent sous forme d'un patch sur le site de bourgeonnement naissant, puis, au cours du cycle cellulaire, elles se localisent sur la pointe du bourgeon et enfin sur la région du col de bourgeon avant la cytokinèse (Amberg D. C. *et coll.*, 1997; Evangelista M. *et coll.*, 1997; Gehrung S. et Snyder M., 1990; Snyder M., 1989). Chacune de ces protéines Spa2, Pea2, Bud6 et Bni1 est requise pour la croissance apicale (Sheu Y. J. *et coll.*, 2000), qui est la phase initiale de la croissance du bourgeon (dans laquelle le bourgeon croît par sa pointe) (Figure 6). De manière intéressante, il a été noté que des délétions de l'un des composants du polarisome *SPA2*, *PEA2*, *BUD6* ou *BNI1* (Fujiwara T. *et coll.*, 1998; Sheu Y. J. *et coll.*, 1998) provoquent un bourgeonnement au hasard chez les cellules diploïdes. Mais, elles n'affectent pas le schéma axial chez les cellules haploïdes ;(Ni L. et Snyder M., 2001). De plus, Spa2 et Bud6 interagissent dans le système double hybride avec des composants de la cascade de signalisation (MAP) kinase qui régule la croissance polarisée cellulaire chez la levure (Sheu Y. J. *et coll.*, 1998). Il semble donc que les protéines Spa2, Pea2 et Bud6 servent à lier les composants impliqués dans la sélection des sites de bourgeonnement avec les cascades de signalisation pour la croissance polarisée.(voir partie 1.6, section 1.6.2).

**Rsr1, Bud2 et Bud5 constituent un schéma (module) de signalisation de GTPase impliqués dans la sélection du site de bourgeonnement.** Des mutants déficients pour le schéma axial et bipolaire ont été isolés, ce qui a permis d'identifier une cascade commune aux deux schémas de bourgeonnement. Ainsi, des mutations sur *RSR1*, *BUD2* et *BUD5* provoquent un bourgeonnement au hasard dans les cellules haploïdes et diploïdes. Ces trois gènes semblent donc coder pour un module commun constitué d'une GTPase ras-related, Rsr1/Bud1 (Bender A. et Pringle J. R., 1989; Chant J. *et coll.*, 1991), de son régulateur de type GAP (GTPase-activating protein) Bud2 (Park H. O. *et coll.*, 1993) et du GEF (guanine-nucleotide exchange factor) Bud5 (Chant J. *et coll.*, 1991). Ces trois éléments sont des protéines corticales qui s'accumulent sur le site de bourgeonnement (Park H. O. *et coll.*, 1999) (Marston A. L. *et coll.*, 2001) ; (Park H. O. *et coll.*, 2002) ; (Pruyne D. *et coll.*, 2004). Ce module de GTPase est impliqué dans l'orientation des composants des bourgeons vers le site de croissance sélectionné. (Chant J. *et coll.*, 1991; Herskowitz I. *et coll.*, 1995; Michelitch M. et Chant J., 1996). D'après des expériences récentes, il semble que ce module de GTPase se fixe sur le site de croissance grâce au tag cortical.(Michaud G. A. et Snyder M., 2002) (Figure 6)



**Figure 6 : Un schéma récapitulatif représentant la voie de la régulation du cytosquelette d'actine et la croissance de bourgeon aux repères corticaux. Les protéines qui appartiennent au même groupe sont encadrées ensemble. La ligne pointillée représente la régulation des gènes hypothétique (*BUD1*, *BUD2* et *BUD5*) par des gènes spécifiques impliqués dans la sélection du site de bourgeonnement chez les cellules diploïdes.**

### 1.4.1.2 Le rôle du cytosquelette

Trois éléments du cytosquelette ont été caractérisés chez la levure : microtubules, septines et actine. Ces deux dernières sont importantes pour la morphogenèse cellulaire.

### 1.4.1.3 Rôle des septines,

Une particularité qui distingue la levure par rapport aux autres eucaryotes, c'est que chez la levure, la préparation de la cytokinèse se passe tôt dans le cycle cellulaire. En effet, le site de formation du bourgeon devient par la suite le site de cytokinèse (Madden K. *et coll.*, 1992). Plusieurs composants importants pour la cytokinèse sont déposés au futur site de bourgeonnement avant même l'apparition du bourgeon. Il n'est donc pas étonnant, que

plusieurs composants essentiels pour la cytokinèse jouent un rôle important dans la formation des bourgeons et la croissance. Les protéines « septines » Cdc3, Cdc10, Cdc11 et Cdc12 (Madden K. *et coll.*, 1992; Sanders S. L. et Field C. M., 1994), trois autres gènes codant pour des septines ont été identifiés après le séquençage du génome de la levure, dont deux, SRP3 et SRP28, ne sont exprimés qu'au cours du processus de sporulation (De Virgilio C. *et coll.*, 1996; DeMarini D. J. *et coll.*, 1997). Des septines ont été mises en évidence dans d'autres champignons mais aussi chez certains insectes et vertébrés, ou elles semblent à chaque fois essentielles à la cytokinèse (Longtine M. S. *et coll.*, 1996). Toutes les septines connues présentent un site potentiel de fixation du GTP, ainsi, à l'exception de Cdc10, qu'un domaine d'interaction protéique (du type "coiled coil") près de leur extrémité C-terminale (Kartmann B. et Roth D., 2001). Ce domaine pourrait être impliqué dans leur association en structures d'ordre supérieur tel que les filaments du col de bourgeonnement. Les septines Cdc3, Cdc10, Cdc11 et Cdc12 s'associent comme des filaments *in vitro* (Ford S. K. et Pringle J. R., 1991; Kim H. B. *et coll.*, 1991) et forment *in vivo* un anneau, qui se localise à la périphérie cellulaire sur le site naissant du bourgeon et demeure visible à la base du col entre les cellules mères et filles ("neck filaments") (Cid V. J. *et coll.*, 2001). En plus de leur rôle dans la cytokinèse, elles semblent impliquées dans de nombreux autres aspects de la morphogenèse chez *Saccharomyces cerevisiae* ; sporulation, conjugaison (De Virgilio C. *et coll.*, 1996; Fares H. *et coll.*, 1996), localisation spécifique de la synthèse de chitine (Longtine M. S. *et coll.*, 1996; Roberts R. L. *et coll.*, 1983) (voir Emergence du bourgeon), choix du site de bourgeonnement (Flescher E. G. *et coll.*, 1993). Enfin, une nouvelle fonction des septines a été décrite : Elles seraient impliquées dans la maintenance de la polarité cellulaire par la formation des limites cortical entre la cellule mère et le bourgeon durant la croissance isotropique du bourgeon (Barral Y. *et coll.*, 2000). Les septines semblent également interagir avec Spa2 (Zahner J. E. *et coll.*, 1996), Bni1 (Longtine M. S. *et coll.*, 1996). En raison de leur localisation au futur site de bourgeonnement environ 10 minutes avant l'émergence du bourgeon, et de leur persistance à ce site après la cytokinèse, les septines ont été proposées comme éléments constitutifs du marquage cortical qui dirige le choix du site de bourgeonnement, notamment dans le schéma axial des cellules haploïdes ou le nouveau site est directement adjacent au précédent (Flescher E. G. *et coll.*, 1993).

#### **1.4.1.4 Rôle de l'actine,**

Il a été démontré que l'actine est essentielle pour la morphogenèse chez la levure et qu'elle joue un rôle clé dans le bourgeonnement. L'actine se localise en deux formes différentes,

câble d'actine ou "patches". Les câbles sont formés par des filaments d'actine qui s'alignent en parallèle à l'axe de croissance, alors que les "patches" d'actine s'organisent en anneau au futur emplacement du bourgeon quelques minutes avant l'émergence de ce dernier. (Govindan B. et Novick P., 1995; Kilmartin J. V. et Adams A. E., 1984; Mulholland J. *et coll.*, 1994). Le complexe du polarisome (Spa2, Bni1, Bud6 et Pea2) est requis pour la polarisation des câbles d'actine vers le bourgeon. Les câbles d'actine et les "patches" interagissent très souvent entre eux sur les sites de croissance cellulaire. Les câbles d'actine sont nécessaires pour la polarisation cellulaire. *ACT1* est le seul gène qui code pour l'actine chez la levure bourgeonnante (Novick P. et Botstein D., 1985). Deux gènes codant pour des protéines proches *ACT3* « actine-related protein » et *ACT5* « contractin » ont été aussi identifiés (Clark S. W. et Meyer D. I., 1994; Harata M. *et coll.*, 1994; Muhua L. *et coll.*, 1994; Schwob E. et Martin R. P., 1992). Mais, la protéine Act1 présente près de 90% d'identité de séquence avec l'actine de mammifère, alors que les autres actines sont plus divergentes. Deux classes de protéines se liant à l'actine ont une importance particulière : les myosines (Myo1 à Myo5) et les cofilines.

#### **Relations entre les protéines d'établissement de la polarité et le cytosquelette d'actine,**

Un grand nombre des composants sont impliqués dans l'établissement de la polarité et la formation du cytosquelette d'actine. Un nombre important d'interactions entre ces différentes protéines a été décrit et ce nombre ne cesse d'augmenter. Par exemple, il a été démontré que l'actine interagit avec les protéines Bni1, Bud6, Bem1, Sac6, la cofiline, la profiline Pfy1, Abp1 et beaucoup d'autres protéines (Adams A. E. *et coll.*, 1989; Moon A. L. *et coll.*, 1993). Les différentes classes de protéines impliquées dans la croissance polarisée chez la levure ont deux modes de localisation. Certaines de ces protéines se localisent de façon diffuse tout au long de la pointe du bourgeon (Lillie S. H. et Brown S. S., 1994; Snyder M., 1989; Valtz N. et Herskowitz I., 1996), alors que d'autres forment des patches bien définis. Parmi les protéines localisées de manière diffuse, on trouve des protéines interagissant avec les voies de signalisation cellulaire et avec les composants du cytosquelette : par exemple, Myo2 et Sec4, Spa2 et Sph1 qui interagissent avec MEK2 Ste7, Mkk1 Mkk2, Bud6 qui s'associe avec la MEK kinase Ste11p (Roemer T. *et coll.*, 1998; Sheu Y. J. *et coll.*, 1998), Cdc42 qui s'associe avec Ste20 (Simon M. N. *et coll.*, 1995). Au contraire, l'actine et un certain nombre de ses partenaires protéiques se localisent dans des patches.

## 1.4.2 Emergence du bourgeon

### 1.4.2.1 Evènements moléculaire au départ du point START.

Les évènements de la croissance polarisée sont étroitement liés au cycle cellulaire de la levure. A la fin de la phase G1, lorsque la cellule atteint une taille critique et que les conditions nutritionnelles et environnementales sont propices à la division cellulaire, les cellules passent un point critique, appelé START (PRINGLE J. R. et Hartwell L. H., 1981), qui est le point contrôle de cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*. La formation du bourgeon commence lorsque les cellules traversent START, et la croissance apicale se produit sur la pointe de bourgeon durant la phase S.

L'exécution de START nécessite l'activation de la cyclin-dependent kinase (CDKs) Cdc28 qui forme un complexe avec les cyclines de la phase G1 : Cln1, Cln2 et Cln3 (Cross F. *et coll.*, 1988; Lowndes N. F. *et coll.*, 1992; Nasmyth K., 1993; Richardson H. E. *et coll.*, 1989). Ces trois cyclines semblent avoir des fonctions partiellement redondantes puisque l'absence des trois est létale alors que la présence d'une seule d'entre elles, n'importe laquelle, est suffisante pour l'initiation du cycle cellulaire (Richardson H. E. *et coll.*, 1989). Elles ont cependant des rôles un peu différents puisque c'est l'association de Cln3 (qui est présente dans la cellule tout au long du cycle cellulaire de façon constitutive) avec Cdc28 qui permet aux deux facteurs de transcription SBF (pour Swi4 et Swi6 Binding Factor) et MBF (MluI Binding Factor) d'activer la transcription de nombreux gènes en fin de phase G1 dont ceux codant pour Cln1 et Cln2 (Igual J. C. *et coll.*, 1997). Ces deux dernières stimulent ensuite leur propre synthèse par une boucle de type rétrocontrôle positif. Cln1 et Cln2 s'associent alors à leur tour à Cdc28, ce qui entraîne une accumulation brutale de l'activité kinase des complexes Cln1-Cdc28 et Cln2-Cdc28. De plus, ces complexes ont une activité protéine kinase beaucoup plus importante que celle associée au complexe Cln3-Cdc28 (Tyers M. *et coll.*, 1993). Les complexes Cln1-Cdc28 et Cln2-Cdc28 gouvernent les trois événements majeurs de START : la réplication de l'ADN, la duplication du centre d'organisation des microtubules, et l'émergence du bourgeon. La majorité des gènes qui sont induits en START ont de multiples sites de fixation pour SBF et MBF sur leurs promoteurs (Spellman P. T. *et coll.*, 1998). SBF et MBF se fixent sur ces gènes (Iyer V. R. *et coll.*, 2001; Simon I. *et coll.*, 2001). La taille de la cellule est importante pour qu'elle traverse la phase START. Le niveau de cAMP joue un rôle clé dans le contrôle de cette étape par l'intermédiaire de la PKA (cAMP-dependent protein kinase) qui inhibe simultanément la transcription de *CLN1* et *CLN2* (Baroni M. D. *et coll.*, 1994) et pourrait provoquer la croissance par une stimulation directe de

la synthèse de protéines (Ashe M. P. *et coll.*, 2000). Le niveau de Cln3 étant régulé principalement par transcription, l'augmentation de la synthèse protéique conduit à une augmentation de la quantité de Cln3 dans la cellule ce qui provoque l'induction de *CLN1* et *CLN2* (Dickinson J. R. et Schweizer M., 2004). SBF et MBF sont des hétérodimères composés d'une sous-unité régulatrice commune, codée par le gène *SWI6*, et de sous-unités de liaison à l'ADN différente : Swi4 pour SBF (Andrews B. J. et Herskowitz I., 1989; Madden K. *et coll.*, 1997) et Mbp1 pour MBF (Koch C. *et coll.*, 1993). Ces deux sous-unités ont des sites de liaison à l'ADN spécifique : les séquences SCB (pour Swi4/6 Cell Cycle Box) reconnues par Swi4, et MCB (pour MluI Cell Cycle Box) reconnues par Mbp1. En plus, il a été montré que les sites de fixation de MBF se trouvent en amont de plusieurs gènes nécessaires pour la croissance cellulaire polarisée (ex, *SPA2*, *AXL2* et *CHS3*) (Roemer T. *et coll.*, 1996; Santos B. et Snyder M., 1997). Il semble donc que l'activation de SBF et MBF provoque la synthèse de composants de la paroi et d'autres facteurs importants pour la polarisation cellulaire et la croissance chez la levure.

Les séquences de régulation de type SCB se retrouvent dans les régions promotrices de nombreux gènes impliqués dans la synthèse des constituants ou dans l'assemblage de la paroi. Pour six d'entre eux, il a été mis en évidence que leur expression est régulée et coordonnée, avec un maximum en fin de phase G1, et que cette régulation est dépendante de la présence de Swi4. Il s'agit de *FKSI*, sous-unité catalytique de la  $\beta(1,3)$ glucane synthase, *GAS1/GPPI*, qui code pour une transglycosidase responsable des liaisons entre les différents types de glucanes, *MNN1* et *VAN2*, impliqués dans la mannosylation des protéines, et enfin *CHS3* qui code pour la sous-unité catalytique de la chitine synthase 3 (Igual J. C. *et coll.*, 1996). Certains de ces gènes impliqués dans la synthèse de la paroi sont également activés par un mécanisme dépendant de Slk2/Mpk1, une MAP kinase qui fait partie de la cascade de phosphorylation reliée à l'intégrité cellulaire dépendante de la Pkc1 (voir paragraphe Intégrité cellulaire, section 1.6.2). De plus, des mutations dans les gènes *PKCI* et *SWI4* entraînent une létalité conditionnelle (Igual J. C. *et coll.*, 1996). Il semblerait donc que les deux voies de régulation dépendantes de SBF/MBF et de Pkc1 agissent de concert pour activer les gènes de synthèse de paroi et permettre l'émergence du bourgeon. L'identification de la Pkc1 comme un des éléments cible de l'activité protéine kinase des complexes Cdc28/cyclines au moment de START est cohérente avec cette hypothèse (Marini N. J. *et coll.*, 1996). De plus, des mutants du gène *SWI4* présentent un défaut spécifique dans l'émergence du bourgeon qui peut être supprimé par surexpression du gène *PKCI*, de façon indépendante des cyclines Cln1 et Cln2 (Gray J. V. *et coll.*, 1997)

### 1.4.2.2 Rôle de RHO, CDC42 et des autres gènes dans l'émergence du bourgeon

Une fois qu'un site de bourgeonnement a été choisi, l'émergence du bourgeon est activée par une cascade de petites GTPases (RAS like factors Cdc42). Il existe cinq gènes codant pour des protéines « RAS-like » impliqués dans la morphogenèse chez la levure à bourgeon : *CDC42*, *RHO1*, *RHO2*, *RHO3*, *RHO4* et *RHO5* (Imaj J. *et coll.*, 1996; Madden K. et Snyder M., 1998; Matsui Y. et Toh E., 1992). *CDC42* est le mieux caractérisé parmi eux. Il semble que la structure et la fonction de *CDC42* soient très conservées, puisque des gènes homologues chez le *S.pombe* et chez les mammifères ont été identifiés (Miller P. J. et Johnson D. I., 1994). Cdc42 est impliquée dans l'assemblage du cytosquelette. Il semble que la polarisation de l'actine vers le site de bourgeonnement soit gouvernée par Cdc42, l'absence de Cdc42 provoquant une désorganisation complète des patchs corticaux et des câbles d'actine (Adams A. E. *et coll.*, 1990). Il a été démontré que des mutations dans certains gènes impliqués dans l'émergence du bourgeon (*CDC42*, *CDC24*, *BEM1* et *BEM2*) (Bender A. et Pringle J. R., 1989; Chant J. *et coll.*, 1991), rendent les cellules anormalement grandes, rondes et sans bourgeon mais avec plusieurs noyaux. La croissance cellulaire y est en effet délocalisée sur toute la surface, et les divisions nucléaires ne sont pas bloquées. Comme toutes les Rho GTPases, Cdc42 oscille entre l'état lié au GTP et lié au GDP. Elle envoie un signal vers ses effecteurs lorsqu'elle est en état actif (lié au GTP)- (Etienne-Manneville S. et Hall A., 2002) Cdc42p est régulée positivement par une GEF (GDP/GTP Exchange Factor) spécifique codée par *CDC24* (Zheng Y. *et coll.*, 1994), et négativement par au moins deux GAPs (GTPase Activating Proteins) : chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc24 est la seule GEF qui contrôle l'activité de Cdc42p et la polarisation cellulaire (Chang F. et Peter M., 2003).

Une autre GTPase de type Rho, Rho1, prend la suite après l'émergence du bourgeon (Kohno H. *et coll.*, 1996). *RHO1*, est un gène essentiel, les souches mutantes *rho1* température sensitive s'arrêtent à température restrictive avec des petits bourgeons. Ainsi, *RHO1* est requis pour maintenir la croissance du bourgeon. Ce phénotype est similaire à celui des mutants *pkc1* température sensitive. Rho1 fait partie des composants qui activent la Pkc1 (Kamada Y. *et coll.*, 1996; Nonaka H. *et coll.*, 1995). Rho1 est activé par l'action de deux GEF *ROM1* et *ROM2* (voir ci-dessous). Les souches délétés pour le gène qui code pour Bem2p (pour Bud Emergence), sont incapables de pousser à 37°C. Ce dernier sert comme de GAP *in vitro* pour Rho1 (Bender A. et Pringle J. R., 1991; Kim Y. J. *et coll.*, 1994; Peterson J. *et coll.*, 1994). Il a été proposé que la forme active (liée au GTP) de Cdc42 pourrait activer

Bem2, entraînant ainsi une inhibition de Rho1 jusqu'à ce que sa fonction soit requise, plus tard dans le cycle cellulaire (Cid V. J. *et coll.*, 1998). Par ailleurs, Bem2 semble avoir d'autres fonctions, notamment liées au cytosquelette. En effet, des mutations dans le gène *BEM2* présentent une létalité synthétique avec des mutations dans plusieurs gènes codant pour des composants structuraux du cytosquelette : *ACT1*, *MYO2* et *SAC6* (Wang T. et Bretscher A., 1995). Rho1 se localise dans des patchs sur le site du bourgeon et sur la pointe des petits bourgeons, ce qui est cohérent avec son rôle dans la formation des bourgeons et la croissance (Yamochi W. *et coll.*, 1994). *BEM1* est un autre gène important pour la polarité cellulaire, impliqué dans le développement du bourgeon, il contient sur sa séquence trois domaines SH3 d'interaction protéiques (Chenevert J. *et coll.*, 1992; Chenevert J. *et coll.*, 1994). Il a été démontré que Bem1p interagit physiquement avec Bud5p qui est un des éléments requis pour la sélection du site de bourgeonnement (Chant J. *et coll.*, 1991), ainsi qu'avec Cdc24 et Bem2 (Peterson J. *et coll.*, 1994). Il semble que Bem1 soit impliqué dans la polarisation du cytosquelette d'actine, peut-être grâce à ses trois domaines SH3 (Chenevert J. *et coll.*, 1992). Un rôle a été proposé pour Bem1 dans l'émergence de bourgeon, il pourrait constituer un support qui lie Cdc24 et Cdc42 (Pruyne D. et Bretscher A., 2000a) ; (Bose I. *et coll.*, 2001).

La formation du bourgeon, la polarisation du cytosquelette d'actine et la synthèse de la paroi cellulaire commencent lorsque la cellule traverse la phase G1/S. Cependant, plusieurs faits (indices) montrent que la formation du bourgeon se produit en conjonction avec la sélection du site de bourgeonnement. Premièrement, des mutations dans certains composants requis pour la formation du bourgeon (Cdc42, Bem2) entraînent une déficience dans la sélection du site de bourgeonnement. Deuxièmement, plusieurs protéines impliquées dans la formation du bourgeon interagissent physiquement avec des composants de sélection du site de bourgeonnement. Enfin, le gène de sélection du site de bourgeonnement *BUD2*, devient essentiel lorsque les cyclines Cln1 et Cln2 sont absentes (Benton B. K. *et coll.*, 1993; Cvrckova F. et Nasmyth K., 1993). Chez la levure *S. cerevisiae* les repères cellulaires (landmarks) sont reconnus par la machinerie de sélection du site de bourgeonnement, comprenant une protéine Rsr1-Bud1. Bud1 est une GTPase de la famille Ras régulé par son « guanine nucleotide exchange factor » (GEF) Bud5 et la « GTPase-activating protein » (GAP) Bud2 (Park H. O. *et coll.*, 1993; Park H. O. *et coll.*, 1999)(Figure 6). Bud1 fonctionnerait en aval des repères cellulaires (Bender A. et Pringle J. R., 1989; Chant J. *et coll.*, 1991) Elle interagirait avec les composants d'établissement de la polarité (Garrington T. P. et Johnson G. L., 1999) comprenant Cdc42 (une GTPase de type Rho), sa GEF Cdc24 et ses GAPs (Bem2, Bem3, Rga1 et Rga2p) (Caviston J. P. *et coll.*, 2003; Gladfelter A. S. *et*

*coll.*, 2002). Bud1-GTP interagit directement avec Cdc24 (Zheng Y. *et coll.*, 1995), et induit l'activité de GEF Cdc24 (Park H. O. *et coll.*, 2002). Ainsi, l'activation locale de Bud1 provoque directement une activation locale de Cdc42 au niveau des repères marquant le futur site de bourgeonnement (Chang F. et Peter M., 2003). Cependant, une délétion de l'un des gènes impliqués dans la sélection du site de bourgeonnement y compris Bud1, ne provoque pas une déficience importante dans la cytokinèse. Les éléments de sélection du site de bourgeonnement ne sont donc essentiels à la cytokinèse. En l'absence de machinerie de sélection du site de bourgeonnement, la protéine Cdc42 reste localisée sur un site unique aléatoire, par une boucle de rétro-contrôle positive impliquant la protéine Bem1 (Balasubramanian M. K. *et coll.*, 2004; Butty A. C. *et coll.*, 2002; Irazoqui J. E. *et coll.*, 2003).

Durant l'émergence de bourgeon, il semble que la protéine Cdc42 fonctionne probablement à travers plusieurs effecteurs. Une famille de protéines « effecteurs de Cdc42 » est constituée de p21-activated kinases ou PAKs, particulièrement impliquées dans la polarisation du cytosquelette d'actine. Deux protéines de la famille PAKs ont été identifiées, Ste20 et Cla4, toutes deux essentielles pour la signalisation de Cdc42 liée à l'actine pendant toutes les phases de croissances : une perte simultanée de Ste20 et Cla4 bloque l'émergence et la croissance du bourgeon et la cytokinèse (Cvrckova F. *et coll.*, 1995; Eby J. J. *et coll.*, 1998; Holly S. P. et Blumer K. J., 1999; Richman T. J. *et coll.*, 1999). Il semble que Cla4 atteigne un niveau d'activité maximal après l'émergence du bourgeon, et qu'elle soit capable de bloquer cette émergence du bourgeon par une boucle de rétro-contrôle négative en phosphorylant Cdc24 (Bose I. *et coll.*, 2001; Gulli M. P. *et coll.*, 2000) (Figure 6). En plus, Ste20 et Cla4 régulent les myosines de classe I (Myo3 et Myo5) (Etienne-Manneville S., 2004) qui sont les seuls substrats des PAKs identifiés chez la levure (Wu C., 1997). Enfin, Ste20 contrôle la phosphorylation de Bni1 et pourrait contribuer à son activation (Goehring A. S. *et coll.*, 2003). Deux autres effecteurs interagissent et participent à la localisation de Cdc42 sur la pointe du bourgeon, Gic1 et Gic2 (Brown J. L. *et coll.*, 1997; Chen G. C. *et coll.*, 1997). L'absence de Gic1 et Gic2 provoque une dépolarisation partielle du cytosquelette d'actine, ce qui suggère que ces dernières facilitent le rôle de Cdc42 pendant l'émergence de bourgeon (Pruyne D. et Bretscher A., 2000b) et fonctionnent comme des adaptateurs liant Cdc42 activé avec des composants impliqués dans l'organisation de l'actine et la croissance polarisée (Bni1, Spa2 et Bud6) (Jaquenoud M. et Peter M., 2000; Ozaki-Kuroda K. *et coll.*, 2001) (Figure 6).

*BEM4*, un autre gène impliqué dans l'émergence du bourgeon, code pour une protéine qui interagit physiquement avec Cdc42, ainsi qu'avec trois autres GTPases de type Rho : Rho1, Rho2 et Rho4 (Mack D. *et coll.*, 1996). Bem4 n'a pas d'activité GAP, GEF ou GDI pour Rho1 (Hirano H. *et coll.*, 1996). La protéine Bem4 pourrait jouer un rôle de chaperonne vis à vis des GTPases de type Rho, ou encore moduler leurs interactions avec certaines de leurs cibles ou régulateurs. *MSB1* et *MSB2* (pour suppressors of budding defect) sont des supresseurs multicopie de mutations dans *CDC24* (Bender A. et Pringle J. R., 1989; Bender A. et Pringle J. R., 1992), leurs fonctions sont inconnues, bien qu'il ait été établi que *MSB1* présente des interactions génétiques avec *BEM2*. Il a été démontré que Msb2 interagit génétiquement avec Cla4 (un membre de la famille p21-activated kinase PAK), ce qui suggère que la protéine Msb2 fait partie de la cascade Cdc42 (Drees B. L. *et coll.*, 2001).

Certaines protéines impliquées dans l'émergence du bourgeon se localisent au site de bourgeonnement sélectionné grâce à des interactions protéiques. Cette localisation a été mise en évidence pour plusieurs d'entre elles, telles que Cdc42 et Bem3, (Ziman M. *et coll.*, 1993), Rho1 (Yamochi W. *et coll.*, 1994), Spa2 (Snyder M., 1989), Bem1 (Peterson J. *et coll.*, 1994) ainsi que pour la calmoduline, une petite protéine liant les ions  $Ca^{2+}$ , très conservée parmi les cellules eucaryotes (Brockerhoff S. E. et Davis T. N., 1992).

#### **1.4.2.3 La synthèse de la paroi.**

Le premier composant de la paroi dont la synthèse est mise en place lors du bourgeonnement est la chitine, en accord avec son rôle majeur dans la morphogenèse et la division cellulaire. La déposition de chitine commence avant l'émergence du bourgeon sous forme d'un anneau. La déposition de chitine est produite par la chitine synthase III (Chs3), qui est dépendante de la présence des quatre septines Cdc3, Cdc10, Cdc11 et Cdc12. Chs3 se localise au niveau de l'anneau des septines grâce à son association avec la protéine Chs4, qui est un activateur de Chs3 (Madden K. et Snyder M., 1998). Chs4 interagit à la fois directement avec Chs3, et indirectement avec les septines par l'intermédiaire de la protéine Bni4 (DeMarini D. J. *et coll.*, 1997). (Drees B. L. *et coll.*, 2001), ont montré que Bni4 interagit avec Msb2. Il semble que la protéine Msb coordonne la croissance de la paroi avec les autres processus impliqués dans la régulation de Cdc42. La présence simultanée au site de bourgeonnement de Rho1, sous unité régulatrice de la  $\beta(1,3)$ -glucane synthase (Drgonova J. *et coll.*, 1996; Qadota H. *et coll.*, 1996), des enzymes de synthèse de la chitine, et de vésicules de sécrétion susceptibles d'apporter des constituants tels que les mannoprotéines, permet à la

synthèse de la nouvelle paroi de la future cellule fille de commencer : c'est l'émergence du bourgeon.

#### 1.4.2.4 Croissance du bourgeon.

Cette étape morphogénétique est marquée par le rôle majeur joué par la protéine Rho1. Elle est localisée dans des patches sur le site de bourgeonnement et sur la pointe de bourgeon des petites cellules bourgeonnée. Rho1 semble impliquée dans le contrôle de la croissance polarisée par plusieurs mécanismes. D'une part, elle assure le maintien de l'intégrité cellulaire en activant la protéine kinase C Pkc1 (Kamada Y. *et coll.*, 1996; Nonaka H. *et coll.*, 1995) qui elle-même active une cascade de signalisation cellulaire impliquée dans la biosynthèse de la paroi (Iguar J. C. *et coll.*, 1996). D'autre part, Rho1 est impliquée dans la régulation de la synthèse de la paroi car elle interagit physiquement et est requise pour activer la  $\beta(1-3)$ glucane synthase (Drgonova J. *et coll.*, 1996; Qadota H. *et coll.*, 1996). Enfin, elle contrôle l'organisation du cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de Bni1, qui interagit avec l'actine et la profiline. Le cycle GTP/GDP de Rho1 constitue le cœur d'un système global qui régule la synthèse de paroi et la polymérisation de l'actine. Rho1 est activé par l'action ce cycle qui fait intervenir des GEF (GDP/GTP exchange factor) Rom1 et Rom2 (pour Rho1 Multicopy suppressors) (Ozaki K. *et coll.*, 1996). En parallèle, le cycle GTP/GDP de Rho1 fait intervenir des GAPs (GTPase-activating proteins) Bem2 et Sac7 (Peterson J. *et coll.*, 1994; Schmidt A. *et coll.*, 1997). Rdi (pour RHO<sub>GDP</sub> dissociation inhibitor) a été décrit comme inhibiteur de l'activité de Rho1p (Masuda T. *et coll.*, 1994). Il a été démontré qu'une activité plus importante de *MPK1* à 30°C est produite, par la perte de *SAC7* et *BEM2*, ce qui suggère que l'activité de la cascade RHO-PKC1-MPK1 soit diminuée par ces deux GAPs (Martin H. *et coll.*, 2000).

Les quatre septines Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12 jouent un rôle majeur dans la séparation des cellules mère et filles. En effet, d'une part l'absence de fonction de n'importe laquelle d'entre elles empêche la septation et la cytokinèse d'avoir lieu correctement, d'autre part leur localisation est cohérente avec cette fonction, et enfin des mutants dans les septines forment des septa anormaux (Slater M. L. *et coll.*, 1985). Les septines semblent être impliquées notamment dans la réorganisation du cytosquelette d'actine au niveau du col entre les cellules mère et fille qui a lieu juste avant la cytokinèse et semble nécessaire à ce processus. En effet, cette réorganisation n'a pas lieu dans les mutants des septines (Adams A. E. et Pringle J. R., 1984).

Après la séparation des noyaux et la migration de l'un d'entre eux dans la cellule fille, un fin disque de chitine qui constitue le septum primaire est synthétisé par la chitine synthase II, à l'intérieur de l'anneau de chitine originel (Shaw J. A. *et coll.*, 1991; Silverman S. J. *et coll.*, 1988). Puis les cellules sont séparées par l'action de la chitinase qui digère le septum primaire, la chitine synthase I exerçant alors une activité de réparation contre une hydrolyse excessive de la chitine (Cabib E. *et coll.*, 1992). Ce processus aboutit à laisser la majeure partie de la chitine sur la cellule mère en une cicatrice de bourgeonnement.

### **1.4.3 Mécanismes de contrôle du cycle cellulaire.**

#### **1.4.3.1 La CDK Cdc28 est le cœur de la machinerie de la régulation du cycle cellulaire :**

Cdc28 est une CDK (cyclin-dependent kinases) qui fonctionne en conjonction avec neuf cyclines indispensable pour son activité (Mendenhall M. D. et Hodge A. E., 1998). Cdc28 forme un complexe avec les cyclines de la phase G1 : Cln1, Cln2 et Cln3 (voire partie émergence de bourgeon). Ces complexes avec les cyclines G1 provoquent l'émergence du bourgeon et la croissance apicale. Par contre, l'entrée dans la phase isotropique de croissance du bourgeon est régulée par les complexes formés par l'association de Cdc28 avec des cyclines G2 : Clb1, Clb2, Clb3, Clb4 (Lew D. J. et Reed S. I., 1995a). Ces cyclines de type B sont impliquées dans une étape de contrôle morphogénétique capable de retarder la division nucléaire dans les cellules qui n'ont pas formé de bourgeon, permettant ainsi d'éviter la formation de cellules multinucléées et d'inhiber un éventuel re-bourgeonnement plus tard dans le cycle cellulaire (Amon A. *et coll.*, 1994; Lew D. J. et Reed S. I., 1995b; Shimada Y. *et coll.*, 2000)

#### **1.4.3.2 Point de contrôle du bourgeonnement :**

Un point de contrôle clé du cycle cellulaire pendant le processus de bourgeonnement se produit au point START dans lequel le niveau des nutriments influence l'initiation de la formation du bourgeon. Par contre, un autre point de contrôle de cycle cellulaire appelé « checkpoint de bourgeonnement », coordonne la formation et la croissance du bourgeon avec les processus de division nucléaire (Lew D. J. et Reed S. I., 1995a). Ce point de contrôle régule le changement entre les complexes Cdc28/Cln et Cdc28/Clb, et il est dépendant de la présence de la protéine Swe1, qui active ou inactive les complexes Cdc28/cyclines B par le contrôle de la phosphorylation de la tyrosine 19 de Cdc28 (Sia R. A. *et coll.*, 1996). La surproduction de la cycline G2 Clb2, permet de dépasser ce point de contrôle morphogénétique (Lew D. J. et Reed S. I., 1995a). Il semble que l'organisation des septines

durant la phase apicale de croissance G1 donne lieu à une activation des trois protéines kinases Gin4, Hsl1 et Kcc1. Ces dernières phosphorylent et inactivent Swe1, ce qui active les complexes Cdc28/Clb et induit la mitose et la croissance isotropique (Lew D. J., 2000; Longtine M. S. *et coll.*, 2000; Madden K. et Snyder M., 1998; McMillan J. N. *et coll.*, 1999) ont montré qu'en réponse à la formation du bourgeon, Swe1p est négativement régulé par Hsl1. Swe1 est dirigé vers le col du bourgeon après sa formation. L'interaction entre les deux protéine Hsl1 et Hsl7 est requise pour la localisation au col (Longtine M. S. *et coll.*, 2000; Shulewitz M. J. *et coll.*, 1999). La morphogenèse est ainsi couplée avec la prolifération.

#### **1.4.3.3 Point de contrôle de l'intégrité cellulaire chez la levure *S.cerevisiae* .**

Les points de contrôle (checkpoints) sont des mécanismes qui renforcent l'organisation des événements du cycle cellulaire. Les points de contrôles les mieux connus, sont ceux qui sont impliqués dans l'organisation de la duplication du génome, tels que la synthèse de l'ADN et la formation des fuseaux mitotiques. Cependant, plusieurs processus morphologiques sont requis pour la duplication cellulaire, il est maintenant clair que des mécanismes distincts de checkpoint assurent une coordination spatio-temporelle entre ces processus et la division nucléaire. Récemment une étude de Suzuki et coll en 2004, décrit un nouveau checkpoint chez la levure *S.cerevisiae* capable de retarder la mitose lorsque la synthèse de la majorité des polysaccharides de la paroi cellulaire est bloquée. D'une façon intéressante, cette étude démontre que ce mécanisme est complètement distinct par rapport aux autres points de contrôle qui sont impliqués dans la morphogenèse cellulaire. Dans les conditions qui compromettent l'intégrité pariétale, ces auteurs ont démontré qu'une souche dans laquelle l'activité  $\beta(1,3)$  glucane synthase est sensible à la température (mutants *fks1<sup>ts</sup>*), est incapable de produire des bourgeons normaux. De plus, les cellules montrent des phénotypes liés à l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase qui précède la fusion mitotique. Ces données ont suggéré l'existence d'un point de contrôle qui coordonne l'intégrité cellulaire avec la formation du fuseau. Lorsque l'entrée en phase de mitose est stimulée par les cyclines Clb1 et Clb2, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 peut être induit soit par une diminution des cyclines (Clb1 et Clb2) soit par l'inactivation de Cdc28 (cycline kinase dépendante). Il a été observé que dans les cellules qui sont incapables de synthétiser les  $\beta(1,3)$  glucanes, la quantité de cycline Clb2 est réduite d'une façon remarquable. De plus il a été remarqué que l'activité du facteur de transcription Fkh2 (Forkhead 2) est nécessaire pour l'accumulation de Clb2. Le niveau élevé de Clb2 combiné à un niveau élevé de Fkh2 perturbe l'action du point de contrôle. Autrement dit, le produit final du point du contrôle de l'intégrité pariétale « cell

wall integrity checkpoint » régule d'une façon négative la phosphorylation de Fkh2, ce qui empêche la transcription de la cycline de type-B Clb2 nécessaire à la fusion mitotique. Un criblage a permis d'identifier *ARPI* impliqué dans le fonctionnement du point de contrôle pariétale. La délétion *Aarp1* provoque une déficience dans le fonctionnement du point de contrôle de l'intégrité pariétale et dans la migration nucléaire. *ARPI* code pour une forme d'actine non conventionnelle, une sous-unité essentielle du complexe de dynactine. Deux autres protéines, Nip100 et Jnm1, font également partie du complexe dynactine impliqué dans la division nucléaire et la migration. Une délétion indépendante de chacun des gènes codant Nip100 ou Jnm1 a montré que ces protéines sont nécessaires pour le point de contrôle de l'intégrité pariétale ainsi que pour la migration nucléaire. Il a été également montré (Suzuki M. *et coll.*, 2004), que le point de contrôle de l'intégrité pariétale est distinct des autres points de contrôles déjà connus (morphogénèse et taille de la cellule), et que ce point de contrôle possède sa propre voie de signalisation, distincte de la voie Pkc1-Slt2 (cfr plus loin).

#### 1.4.4 Méiose et sporulation.

Dans des conditions de carences nutritionnelles, les cellules diploïdes hétérozygotes (*MATa/MATa*) de *Saccharomyces cerevisiae* effectuent un programme génétique et morphologique particulier, appelé sporulation, qui conduit après une division méiotique à la formation de quatre spores haploïdes. Ces quatre spores formées se trouvent dans un asque. Les spores sont plus résistantes aux conditions environnementales extrême que les cellules en phase de croissance. Lorsque les spores se trouvent dans un milieu nutritionnel riche, elles commencent à germer et à croître comme des haploïdes. Expérimentalement, la sporulation est induite en transférant les cellules sur un milieu très pauvre, contenant uniquement de l'acétate de potassium. **Deux conditions nutritionnelles** sont requises pour l'induction de la sporulation. **La première** est la limitation en un élément essentiel, et en particulier l'azote, mais cela peut être le phosphate, le sulfate. **La seconde** condition est l'absence d'une source de carbone. La première étape du processus de sporulation est la réplication de l'ADN. Elle est suivie par une prophase prolongée, au cours de laquelle la recombinaison génétique entre les chromosomes homologues est particulièrement élevée. Le noyau reste intact durant les divisions méiotiques I (réductionnelle) et II (équationnelle), puis forme quatre lobes autour des quatre lots de chromosomes haploïdes ainsi séparés. Ils sont alors enveloppés par une double couche membranaire, la paroi des prés pores. Les parois très spécifiques des spores (voir partie 4.2, section 4.2.25) se forment ensuite progressivement autour des noyaux haploïdes, par dépôt des différents constituants entre les épaisseurs de membranes.

Le résultat final de la sporulation est un sac ou asque, contenant une tétrade de spores très résistantes aux stress, aux digestions enzymatiques et aux attaques par des solvants organiques (Byers B., 1981).

De manière très intéressante, la microscopie électronique à balayage (SEM) a montré que les spores isolées de l'asque sont liées entre elles par des structures appelées les ponts inter-spores (Coluccio A. *et coll.*, 2004). L'analyse des spores en utilisant la microscopie électronique par transmission (TEM), a permis d'étudier la nature de ces ponts inter-spores qui a montré que ces ponts sont formés par un branchement des couches externes de la paroi des spores. Ainsi, l'ensemble de ces couches pariétales entoure les spores individuelles et lie les spores adjacentes. Ceci a été confirmé en utilisant des mutants *chs3* le gène *CHS3* est requis pour la synthèse du chitosane de la paroi de spore. Les couches du chitosane et la dityrosine sont absents chez les mutants *chs3* (Pammer M. *et coll.*, 1992), et l'analyse par TEM en utilisant des mutants *chs3* a montré que les ponts inter-spores ne sont visibles, ce qui indique que le gène *CHS3* est nécessaire pour la construction des ponts inter-spores. La fonction exacte de ces ponts n'est pas encore connue, mais, il a été proposé que les ponts inter-spores favorisent le croisement entre les spores sœurs qui sont liées entre elles ce qui permet la production des cellules diploïdes et de restaurer le taux d'hétérozygotie présent chez les cellules parentales (Coluccio A. *et coll.*, 2004).

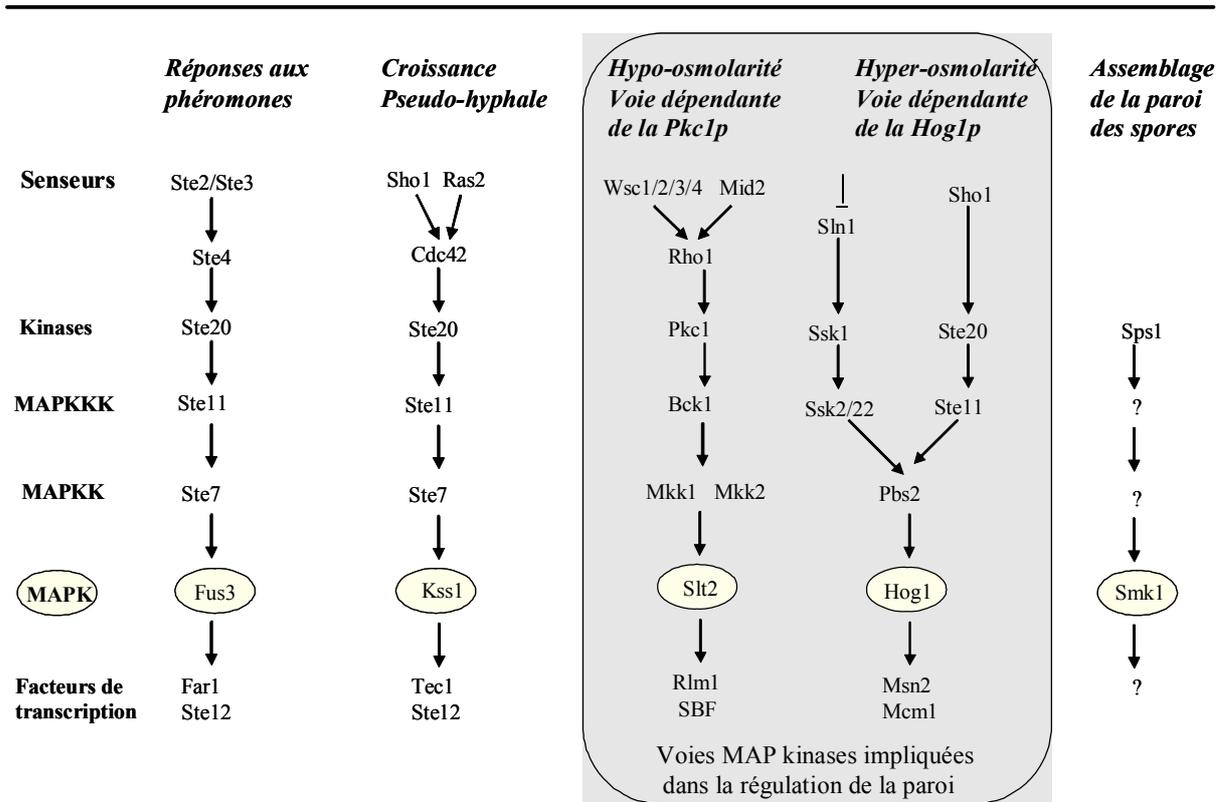
## **1.5 Voie de signalisation de l'intégrité cellulaire.**

La phosphorylation protéique joue un rôle crucial dans la régulation de nombreux processus cellulaires chez tous les organismes eucaryotes. Une protéine kinase peut modifier la fonction biologique de ses cibles par l'ajout d'un groupement phosphate. Cette phosphorylation est réversible par l'action d'une protéine phosphatase qui enlève le groupement phosphate. La levure *Saccharomyces cerevisiae* représente un excellent modèle pour explorer le rôle de la phosphorylation dans la régulation cellulaire. Bien que la fonction de certaines protéines kinases et phosphatases ait été démontrée, le rôle physiologique de plusieurs d'entre elles n'est pas encore bien élucidé. La majorité des protéines kinases phosphoryle les protéines sur des résidus sérine et thréonine, sur la tyrosine ou sur les deux types de résidus à la fois.

### **1.5.1 Les cascades de signalisation MAP kinase chez *S. cerevisiae*.**

Les cellules perçoivent et répondent aux stress environnementaux via des voies de signalisation cellulaire très complexes. Ces voies de signalisation font l'objet d'un domaine d'étude très important, car la dérégulation de ces voies conduit à des aberrations de type

cancer. Les voies MAP kinases (pour *Mitogen Activated Protein Kinase*) font partie des systèmes de signalisation des cellules eucaryotes les plus répandus. Il existe trois MAP kinases successives principales, ces kinases MAPKKK-MAPKK-MAPK constituent un module de signalisation conservé chez tous les eucaryotes et ont été caractérisées chez la levure *S. cerevisiae* (Banuett F., 1998; Gustin M. C. *et coll.*, 1998; Popolo L. *et coll.*, 2001). Les MAPKs sont des sérines/thréonines kinases qui possèdent un motif Thr-X-Tyr conservé dans la boucle d'activation du sous-domaine kinase.



**Figure 7 : Schéma récapitulatif des cascades MAPK qui régulent la croissance et la différenciation chez la levure *S. cerevisiae*. Les deux voies de signalisation encadrées sont connues comme étant impliquées dans la régulation de la paroi.**

La MAPK est activée par une MAPKK, elle-même activée par une MAPKKK (Figure 7). (Gustin M. C. *et coll.*, 1998; Popolo L. *et coll.*, 2001). Les MAPK peuvent activer par phosphorylation de nombreuses protéines, en particulier des facteurs de transcription. L'activation de ce type de voies de signalisation est en général transitoire et régulée par des protéines phosphatases qui reconnaissent la forme phosphorylée des MAPK et désactivent la voie de signalisation quand la cellule a répondu au stimulus extracellulaire ou s'est adaptée à la nouvelle condition.

A l'heure actuelle, cinq voies de signalisation basées sur l'activation de cascades de MAPK ont été identifiées chez la levure *S.cerevisiae* (Figure 7). Parmi les cinq voies de signalisation MAPK connues chez la levure *S. cerevisiae*, deux sont particulièrement impliquées directement dans la régulation de la structure pariétale : la voie dépendante de la kinase Pkc1 (appelée aussi voie de la Pkc1 ou voie de maintien de l'intégrité cellulaire) qui est reliée à la sensibilité à l'hypo-osmolarité du milieu (et la voie HOG (pour High Osmolarity Glycérol response), impliquée dans la réponse à l'hyperosmolarité (Figure 9).

## **1.5.2 Voie de signalisation MAPK dépendante de la protéine kinase (Pkc1) et Mpk1/Slt2.**

### **1.5.2.1 L'intégrité de la paroi cellulaire est majoritairement sous le contrôle de la voie Pkc1.**

La voie dépendante de la kinase Pkc1 est considérée comme la voie majeure impliquée dans le contrôle de l'intégrité de la paroi cellulaire. La voie Pkc1 est appelée souvent la voie de maintien de l'intégrité cellulaire, due aux phénotypes particuliers de cellules déficientes dans cette voie (Levin D. E., 2005).

La MAP kinase de cette cascade est le produit du gène MPK1, cloné par suppression dosage-dépendante du phénotype de lyse des mutants *bck1* (pour *bypass c kinase 1*) (Lee K. S. *et coll.*, 1993), et également cloné sous le nom de *SLT2* par complémentation d'un phénotype lytique (Torres L. *et coll.*, 1991). Slt2/Mpk1 est requise pour la croissance à 37°C (Martin H. *et coll.*, 1993). La cascade Slt2 est requise pour maintenir l'intégrité cellulaire durant les périodes de croissance polarisée, telles que l'émergence du bourgeon et la formation de la projection de conjugaison, pendant lesquelles elle pourrait agir sur la polarisation de l'actine (Zarzov P. *et coll.*, 1996) (Figure 8). Des conditions telles que le choc thermique ou une hypo-osmolarité provoquent la phosphorylation et l'activation de Slt2 (Kamada Y. *et coll.*, 1995). Le fait que le phénotype du mutant *pkc1* soit plus marqué que ceux des mutants plus bas dans la cascade MAPK suggère l'existence d'au moins une autre branche (Banuett F., 1998; Gustin M. C. *et coll.*, 1998; Popolo L. *et coll.*, 2001). Néanmoins les composants de cette seconde branche n'ont pas encore été mis complètement élucidés. L'activation de la Pkc1 en réponse à diverses excitations conduit à l'activation séquentielle des protéines kinases Bck1, Mkk1 et Mkk2, puis Slt2/Mpk1.

Cette dernière permet ensuite l'activation par phosphorylation de facteurs de transcription tels que Rlm1 et le complexe SBF (Dodou E. et Treisman R., 1997; Madden K. *et coll.*, 1997)

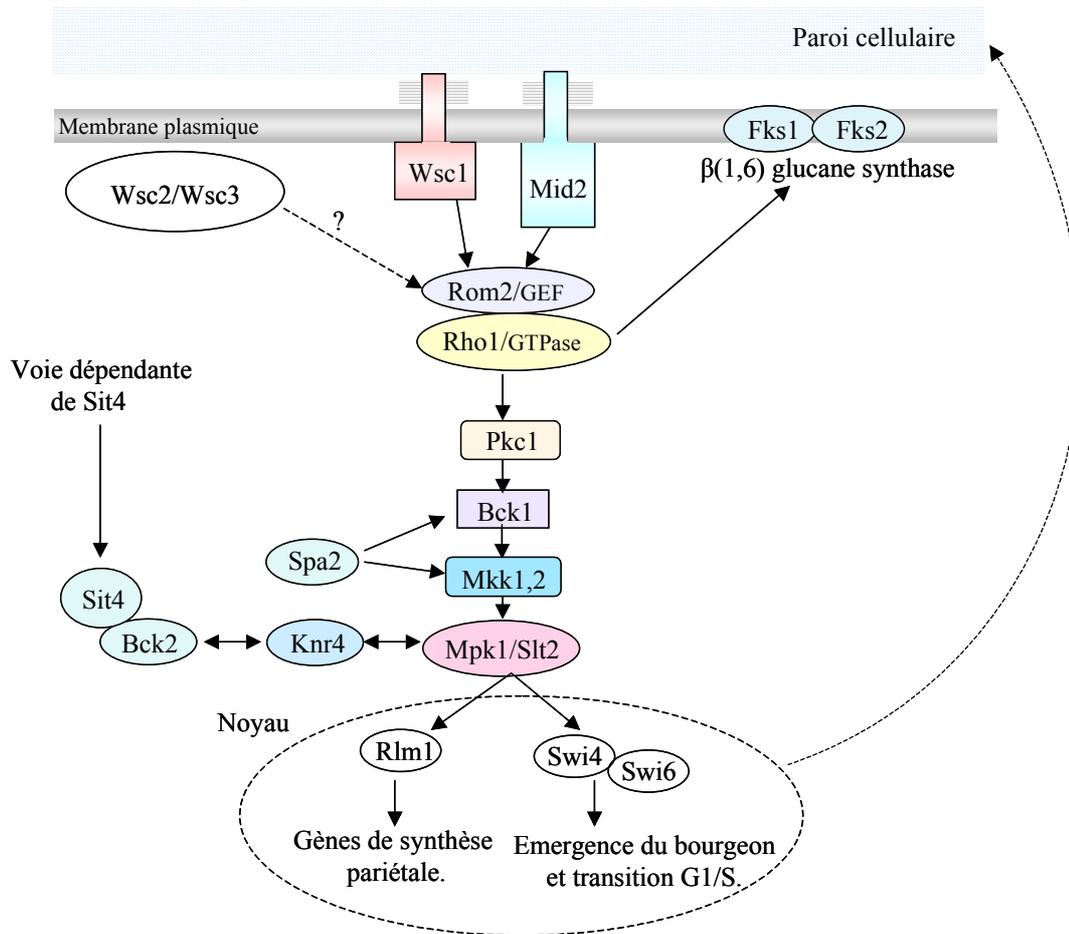


Figure 8 : Voie de la Pkc1-Mapk1/Slt2.

### 1.5.2.2 Régulation de l'activité de la voie de signalisation MAPK dépendante de Pkc1

Au niveau moléculaire, la GTPase Rho1p joue un rôle important dans l'activation de la protéine Pkc1. Rho1 est aussi la sous-unité régulatrice de la  $\beta(1,3)$  glucane synthase (Mazur P. et Baginsky W., 1996; Qadota H. *et coll.*, 1996), impliquée dans la formation du bourgeon et l'organisation du cytosquelette d'actine (Yamochi W. *et coll.*, 1994). De plus, l'activité de Pkc1 est régulée par une interaction directe avec Rho1 (Drgonova J. *et coll.*, 1996; Kamada Y. *et coll.*, 1996; Nonaka H. *et coll.*, 1995). Il semble donc que Rho1 stimule le métabolisme de la paroi cellulaire de deux manières indépendantes, directement en activant les  $\beta(1,3)$  glucane synthases et indirectement au travers d'une transmission du signal vers Pkc1 (Delley P. A. et Hall M. N., 1999). En plus, la localisation de Pkc1 sur les sites de polarisation est dépendant sur Rho1. (Andrews P. D. et Stark M. J., 2000; van Drogen F. et Peter M., 2002)

ont proposé que Spa2 joue un rôle de "Scaffold", en ramenant Mkk1 et Mkk2 aux sites où Rho1 et Pkc1 sont localisés. En réponse à un stress acide, l'expression du gène *RGD1* est activée via la voie HOG et les facteurs de transcription Msn2/Msn4. La protéine Rgd1 est une GAP (Rho GTPase-activating protéine) à son tour, va activer la voie Slt2-MAP kinase par une interaction indirecte avec la Pkc1 (Claret S. *et coll.*, 2005).

Plusieurs stimuli sont impliqués dans l'activation de la voie Pkc1, telles que des conditions de stress pariétaux, de stress thermiques, de mutations de gènes structuraux/régulateurs de la paroi et par des agents perturbant l'assemblage de la paroi comme le blanc de Calcofluor, le rouge de Congo, la caféine et la zymolyase (de Nobel H. *et coll.*, 2000; Martin H. *et coll.*, 2000). Il semble qu'il existe un élément commun qui permet aux cellules de répondre aux traitements qui provoquent l'activation de la voie Pkc1-Mpk1/Slt2 (Kamada Y. *et coll.*, 1995). La voie Pkc1 est activée via une famille de senseurs de la membrane plasmique, les protéines WSC (Wsc1/Hsc77-Wsc2-Wsc3-Wsc4) et Mid2 (Gray J. V. *et coll.*, 1997; Martin-Yken H. *et coll.*, 2001; Rajavel M. *et coll.*, 1999; Verna J. *et coll.*, 1997; Zu T. *et coll.*, 2001). Les gènes *MID2* et *HCS77* semblent avoir un rôle prédominant *in vivo* puisque la mutation de ces deux gènes est synthétique létale et que **les simples mutants ont des phénotypes comparables au mutant *pkc1*** (Ketela T. *et coll.*, 1999). Mid2 serait impliquée dans la transmission du signal calcium en réponse aux phéromones (Fujita A. *et coll.*, 1994) et du signal de perturbation de la paroi au cours de la morphogenèse (Ketela T. *et coll.*, 1999; Rajavel M. *et coll.*, 1999), ainsi que dans la perception des drogues blanc de calcofluor et rouge congo. Une étude récente a montré aussi que ce dernier intervenait dans la perception de l'acidification du milieu et que Mlt1, l'homologue de Mid2 est le senseur du stress oxydant (Vilella F. *et coll.*, 2005). En revanche, Hcs77 envoie probablement des signaux à la Pkc1 sur les défauts perçus au niveau de la membrane plasmique causés par des stress hypo-osmotiques ou thermiques (Verna J. *et coll.*, 1997). Ces senseurs interagissent avec Rom2 pour transmettre le signal à Rho1 (Philip B. et Levin D. E., 2001) (Figure 9). Une étude récente a montré que différents stress peuvent activer la voie de l'intégrité cellulaire Pkc1-Slt2 à différents niveaux sans nécessairement suivre une voie strictement linéaire depuis le senseur ou la protéine Rho1. En effet, Mpk1/Slt2 est encore activée en réponse à un choc thermique dans des souches délétées pour *PKC1* et *BCK1*. Il semble donc que les conditions de choc thermique activent une voie de signalisation régulant directement Mkk1/2 ou Mpk1. De plus, ils ont proposé que les conditions du choc hypo-osmotique activent la voie Mpk1 au niveau de Bck1 (Harrison J. C. *et coll.*, 2004).

### 1.5.2.3 La MAP kinase de l'intégrité cellulaire, Slt2 et ses cibles finales.

En réponse aux différents stress, la voie de la protéine kinase C est activée, ce qui provoque l'activation séquentielle par phosphorylation des protéines kinases MAPKKK Bck1, des MAPKK redondantes Mkk1 et Mkk2, et enfin de la MAPK Slt2 (Irie K. *et coll.*, 1993; Lee K. S. et Levin D. E., 1992; Torres L. *et coll.*, 1991). Slt2 est une MAP kinase Ser-Thr, de masse moléculaire de 56 kDa (484 aa). En réponse à différents stress, elle est phosphorylée sur deux résidus conservés Thr<sup>190</sup> et Tyr<sup>192</sup>. et peut sous cette forme entrer dans le noyau pour activer par phosphorylation ses cibles principales qui sont des facteurs de transcription, Rlm1, SBF et MBF (Huang K. N. et Symington L. S., 1995; Martin H. *et coll.*, 2000). Une des cibles directes et les mieux connues de la MAP kinase Slt2 est le facteur de transcription Rlm1, qui jouerait un rôle essentiel dans l'activation de nombreux gènes pariétaux tels que *FKS1*, *FKS2*, *MNN1*, *KTR2*, *CHS3* (Jung U. S. et Levin D. E., 1999; Watanabe Y. *et coll.*, 1995). Rlm1 est membre d'une famille de facteurs de transcription à boîte MADS (*MCM1*, *Agamous*, *Deficiens* et *Serum response factor*) agissant sous forme de dimères et contrôlée par des MAP kinases (Dodou E. et Treisman R., 1997). Une autre cible de la kinase Slt2 sont les facteurs de transcription SBF (pour *Swi4/6 Binding Factor*) et MBF (*MluI Binding Factor*), ce sont des hétérodimères composés d'une sous unité régulatrice commune codé par le gène *SWI6* (Andrews B. J. et Herskowitz I., 1989). Ils sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la croissance polarisée (Andrews B. J. et Herskowitz I., 1989; Dirick L. *et coll.*, 1992; Lowndes N. F. *et coll.*, 1992; Madden K. *et coll.*, 1997; Primig M. *et coll.*, 1992). Swi4, activée par phosphorylation par Slt2 (Madden K. *et coll.*, 1997), peut également activer un sous-groupe de gènes indépendamment de Swi6 (Baetz K. *et coll.*, 2001). Les deux protéines Swi4 et Swi6 sont des substrats *in vitro* de Mpk1/Slt2. La protéine Slt2 transite entre le cytoplasme et le noyau, elle se localise aux sites de la croissance polarisée de manière dépendante de Spa2. L'utilisation d'une construction GFP et d'essais "FRAP" ont permis de montrer que Slt2-GFP est principalement localisé dans le noyau durant toutes les phases du cycle cellulaire, puis se localise sur la pointe des petits bourgeons et s'accumule sur le col du bourgeon de la cellule mère plus tard pendant la phase de mitose (van Drogen F. et Peter M., 2002). Des études récentes suggèrent que Slt2 a également des cibles hors du noyau. Ainsi, il a été montré que sous sa forme cytoplasmique, elle interagit avec un canal aux ions Ca<sup>2+</sup> formé par les protéines membranaires Cch1 et Mid1. (Bonilla M. et Cunningham K. W., 2003).

#### 1.5.2.4 La coordination entre la voie de l'intégrité cellulaire et la prolifération cellulaire.

Afin que le processus de bourgeonnement se produise, une coordination entre la voie de l'intégrité cellulaire et la prolifération cellulaire est indispensable. Cette coordination est assurée par la cycline Cdc28. Il a été montré que la kinase cycline dépendante Cdc28 régule la cascade de l'intégrité cellulaire, qui à son tour induit l'expression des gènes de synthèse de la paroi cellulaire (voir partie Morphogénèse). Cependant, une variation dans l'activité de Cdc28 dans la cellule affecte l'activité de la MAP kinase Slt2/Mpk1 (Marini N. J. *et coll.*, 1996; Zarzov P. *et coll.*, 1996). Des conditions telles que le choc thermique ou l'hypo-osmolarité provoquent la phosphorylation et l'activation de Slt2 (Kamada Y. *et coll.*, 1995). Un autre aspect concernant la connection entre la voie Pkc1 et la voie Cln-Cdc28 est le contrôle du facteur de transcription SBF (le complexe Swi4 et Swi6) par ces deux kinases. Les deux facteurs de transcription Swi4 et Swi6 activent l'expression des gènes de la phase G1/S du cycle cellulaire et en particulier les gènes *CLN1* et *CLN2* (Igal J. C. *et coll.*, 1996; Iyer V. R. *et coll.*, 2001).

#### 1.5.2.5 Autres voies connectées à la protéine kinase Pkc1 mais indépendantes de la cascade MAPK.

Une voie agissant en parallèle de la voie de la Pkc1 a été identifiée par un criblage visant à isoler des suppresseurs de la lyse cellulaire chez les mutants *pkc1* et *mpk1*. Ce criblage a permis le clonage du gène *BCK2* (pour *Bypass of C Kinase 2*) qui code pour une protéine riche en sérine et thréonine, ainsi que les gènes *PPZ1* et *PPZ2* codant pour des protéines phosphatases redondantes. *BCK2*, *PPZ1* et *PPZ2* sont vraisemblablement des membres d'une voie dépendante de *SIT4*, un gène codant pour une protéine phosphatase qui intervient dans le cycle cellulaire (Clotet J. *et coll.*, 1999). De plus, Bck2 induit la transcription des gènes *CLN1* et *CLN2* en fin de phase G1, de façon indépendante de *SWI4* et *SWI6*. Bck2 semble agir dans une voie de régulation commune avec la phosphatase Sit4p, et parallèle à celle de Cln3 (Di Como C. J. *et coll.*, 1995). Par ailleurs, le gène *KNR4* (pour *Killer Nine Resistant 4*) cloné par complémentation d'un mutant résistant à la toxine killer K9 (Hong Z. *et coll.*, 1994a; Martin H. *et coll.*, 1999), interagit à la fois avec la voie de la Pkc1 et la voie dépendante de Bck2p (Martin-Yken H. *et coll.*, 2002a).

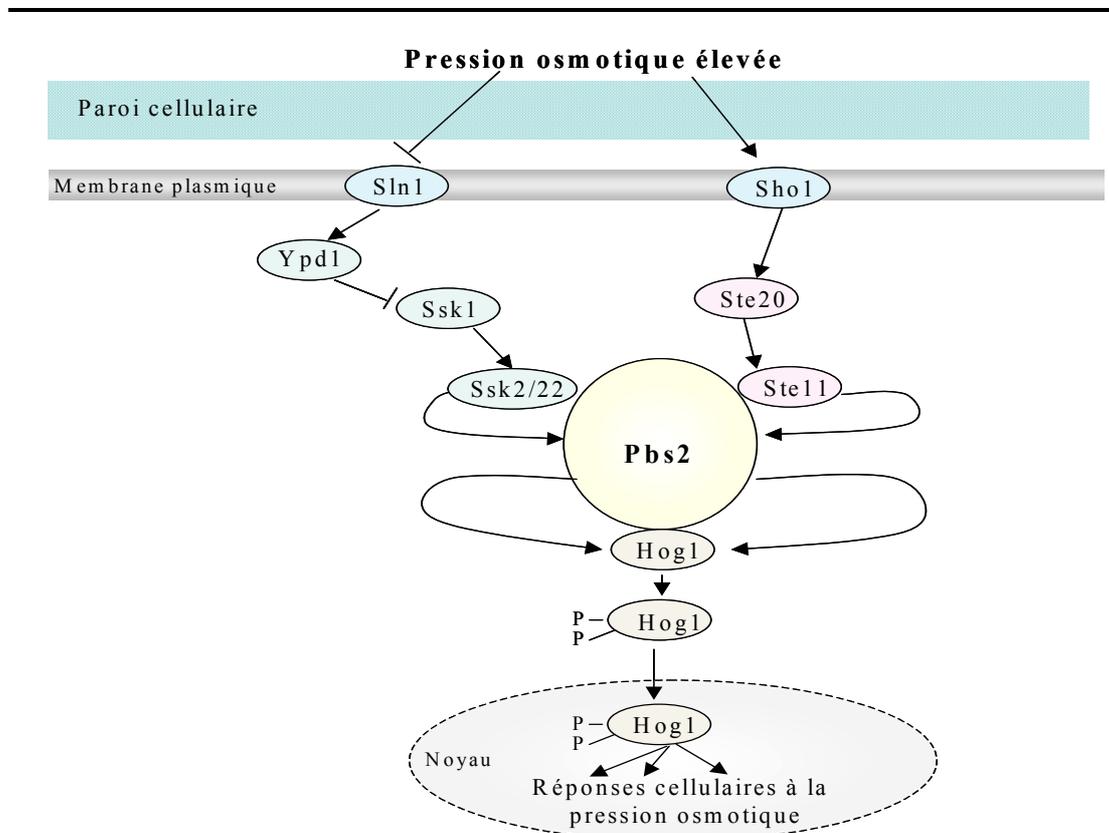
### 1.5.3 Voie de signalisation MAPK dépendante de la kinase Hog1 (High Osmolarity Glycerol response).

La deuxième voie de MAP kinases impliquée dans le maintien de l'intégrité pariétale et cellulaire est la voie HOG. Cette voie est impliquée dans l'adaptation cellulaire à un environnement hyperosmotique. Les cellules eucaryotes s'adaptent aux conditions de pression osmotique en augmentant leur osmolarité interne. La levure *S. cerevisiae* répond à ces conditions de stress en activant la synthèse de glycérol et par une diminution de sa perméabilité, qui provoque une accumulation importante de cette molécule dans le cytoplasme (Blomberg A. et Adler L., 1989). La voie HOG est composée essentiellement de trois kinases MAPKKK codé par les gènes *SSK2/22* ou *STE11*, MAPKK, MAPK codées respectivement par les gènes *PBS2* et *HOG1* figure 15; (Gustin M. C. *et coll.*, 1998; Hohmann S., 2002).

#### 1.5.3.1 Activation de la voie HOG.

Deux éléments cruciaux sont impliqués dans l'activation rapide et transitoire de la voie HOG en réponse à l'hyperosmolarité, ces éléments sont spécifiques pour répondre aux différentes conditions de stress. (O'Rourke S. M. *et coll.*, 2002). Le premier est un système comparable aux systèmes bactériens "à deux composants", constitués d'un senseur membranaire et d'un régulateur cytosolique. Dans ce système, l'osmosenseur transmembranaire est la protéine Sln1 (Maeda T. *et coll.*, 1994). La protéine Ypd1 complète le rôle de Sln1. Sln1-Ypd1, fonctionnent par un mécanisme de phospho-relais en plusieurs étapes, qui aboutit à l'inactivation par phosphorylation de Ssk1. Sous sa forme active (déphosphorylée), Ssk1 permet l'activation de la cascade MAP kinase en transmettant un signal aux MAPKKK Ssk2/22 puis à la MAPKK Pbs2 (Li S. *et coll.*, 1998; Maeda T. *et coll.*, 1995; Masuda T. *et coll.*, 1994; Posas F. *et coll.*, 1996; Posas F. *et coll.*, 1998; Posas F. et Saito H., 1997; Singh K. K., 2000) (Figure 9). Un autre senseur impliqué dans l'activation de la voie HOG en réponse à l'hyperosmolarité, est la protéine Sho1 qui présente un domaine SH3 d'interaction protéique (Maeda T. *et coll.*, 1995). Ce domaine permet une interaction directe de Sho1p avec la protéine Pbs2 qui active Hog1 par une phosphorylation. Il semble que l'interaction de Pbs2 avec Sho1p est requise pour activer Ste11 (la MAP kinase kinase des voies de réponse à la phéromone et de la croissance filamenteuse) et que Ste11 et Pbs2 interagissent (Posas F. *et coll.*, 1998; Posas F. et Saito H., 1997).

Un rôle de support "scaffold" a été proposé pour Pbs2, qui pourrait maintenir assemblées les protéines Sho1, Ste11 et Hog1.



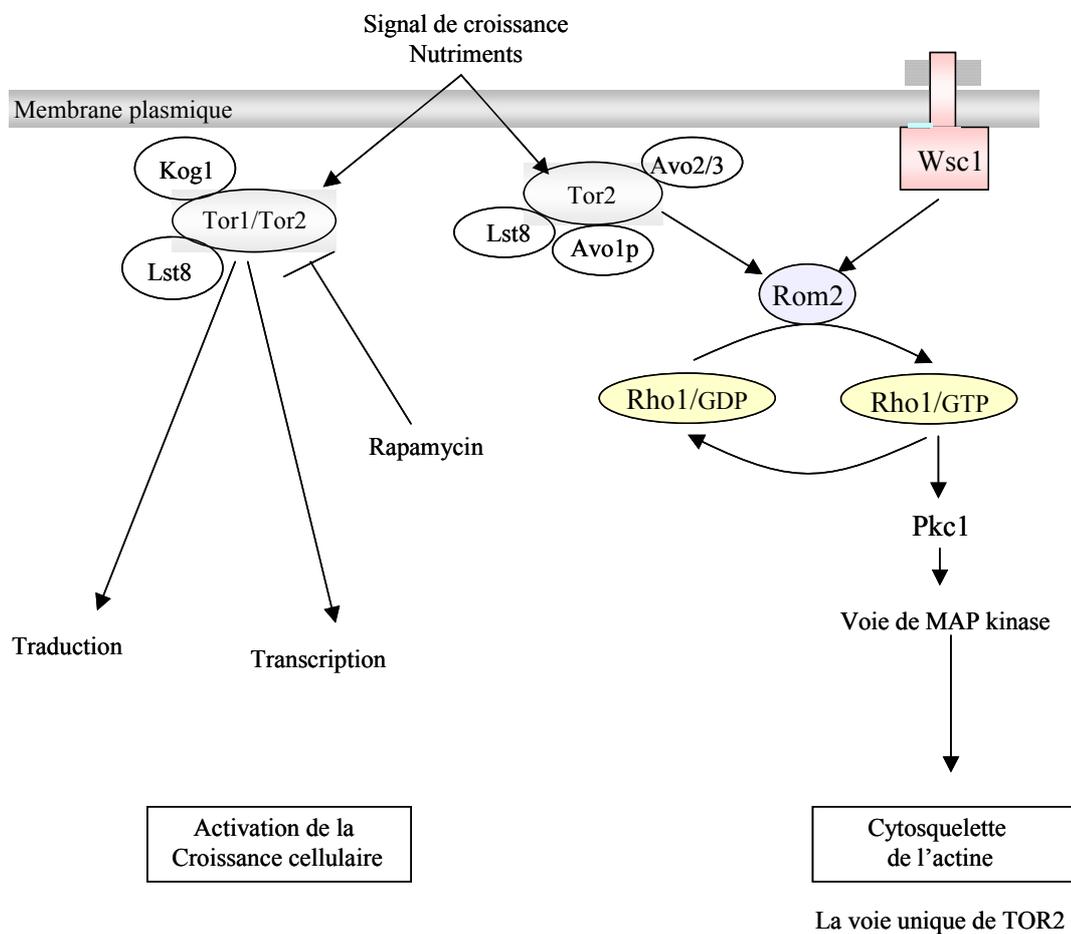
**Figure 9 : Voie de signalisation MAP kinase dépendante de Hog1, deux senseurs sont impliqués dans l'activation de la voie HOG.**

Une telle association permet aux cellules d'éviter une activation croisée entre des composants communs entre les voies (Lee B. N. et Elion E. A., 1999; O'Rourke S. M. *et coll.*, 2002). En plus de son activation en réponse à l'hyperosmolarité, la branche Sho1 de la voie HOG est activée en réponse au choc thermique (Winkler A. *et coll.*, 2002). La MAPKK Pbs2 phosphoryle alors la MAPK Hog1, qui est transférée dans le noyau entre autre grâce à Gsp1, une protéine impliquée dans l'importation dans le noyau de protéines possédant un signal de localisation nucléaire (Ferrigno P. *et coll.*, 1998; Oki M. *et coll.*, 1998). Du noyau, Hog1 sous sa forme phosphorylée induit différentes réponses (Gustin M. C. *et coll.*, 1998; Posas F. *et coll.*, 1998; Rep M. *et coll.*, 1999). Trois phosphatases sont impliquées dans la régulation négative de la voie HOG, il s'agit de Ptc1, Ptp2 et Ptp3 (Hohmann S., 2002). Les substrats de la kinase Hog1 n'ont toujours pas été clairement caractérisés, bien que les facteurs de transcription Msn2/Msn4, Hot1, Sko1, Mcm1 et Smp1 semblent en faire partie (Dodou E. et

Treisman R., 1997; Gustin M. C. *et coll.*, 1998; Proft M. *et coll.*, 2001; Rep M. *et coll.*, 1999; Rep M. *et coll.*, 2000).

#### 1.5.4 La voie de signalisation TOR

La voie de signalisation TOR a été identifiée pour la première fois chez la levure *S.cerevisiae*, puis chez des eucaryotes supérieurs. Chez la levure *S.cerevisiae* il existe deux gènes homologues, *TOR1* et *TOR2* (Target Of Rapamycin)(Heitman J. *et coll.*, 1991; Martin D. E. et Hall M. N., 2005).



**Figure 10 : La voie de signalisation TOR. Tor2 partage une fonction commune avec Tor1p et possède une autre fonction unique.**

Les protéines Tor sont des grandes protéines (280 kDa) qui possèdent toutes un domaine C-terminal catalytique phosphatidylinositol kinases (PIK-related proteins), et présentent une activité d'autophosphorylation sur résidus sérine. Deux complexes TOR ont été identifiés chez la levure (Inoki K. *et coll.*, 2005; Loewith R. *et coll.*, 2002). Le TOR

complexe 1 (TORC1), contient Tor1 ou Tor2, associé à un contrôleur de croissance Kog1 et une protéine Lst8. TORC1 est impliqué dans l'initiation de la traduction et la répression de la transcription de gènes spécifiques qui sont impliqués dans la réponse à la carence en nutriments. Le complexe TOR 2 est composé de Tor2, Avo1, Avo2 (Adheres Voraciously to Tor2), Avo3 et Lst8 (Figure 10). Tor2 est une protéine qui fonctionne simultanément dans deux voies de signalisation régulant la croissance cellulaire. En effet, ces deux kinases (Tor1 et Tor2) partagent une même fonction : elles sont impliquées dans le contrôle temporel de la croissance cellulaire et la progression pendant la phase G1 du cycle cellulaire en réponse à la disponibilité nutritionnelle. Ces fonctions partagées de Tor1 et Tor2 sont inhibées par l'action de rapamycine, un immunosuppresseur qui se fixe sur la sous-unité FKBP12 qui est une petite protéine de 12 kDa associée à Tor1/2 (Gingras A. C. *et coll.*, 2001; Schmelzle T. et Hall M. N., 2000). Par contre, Tor2 a une autre fonction essentielle qui lui est propre qu'elle ne partage pas avec Tor1. En effet, Tor2 est impliqué dans le contrôle spatial de la croissance cellulaire en contrôlant l'organisation du cytosquelette d'actine (Jacinto E. et Hall M. N., 2003; Loewith R. et Hall M. N., 2004; Martin D. E. et Hall M. N., 2005). D'une façon intéressante, cette fonction de Tor2 n'est pas sensible à la rapamycine, car le complexe rapamycine-FKBP12 n'est pas capable de se lier avec TOR complexe 2 (Schmidt A. *et coll.*, 1996; Zheng X. F. *et coll.*, 1995). La signalisation de Tor2 active Rho1 et Rho2 par l'intermédiaire de Rom2, ce qui déclenche la mise en place du cytosquelette d'actine (Helliwell S. B. *et coll.*, 1998; Schmidt A. *et coll.*, 1997). En activant la MAP kinase Pkc1, Rho1 transmet son signal vers le cytosquelette d'actine (Figure 10). La perte de cette fonction essentielle de Tor2 peut être supprimée par Rom2 et Rho1, mais aussi par la Pkc1. Cette seconde voie de signalisation dépendante de Tor2 semble donc contrôler la Pkc1, ce qui place Tor2 en position de régulateur global de la synthèse de la paroi et de l'organisation de l'actine. Le fait que Tor2, et éventuellement d'autres composants, interviennent à la fois dans ces deux voies de signalisation permet d'envisager une coordination entre le contrôle temporel (synthèse des protéines) et spatial (organisation de l'actine) de la croissance par le partage des composants communs à ces deux voies.

### **1.6 Knr4, une protéine de levure impliquée dans la régulation de la synthèse de la paroi cellulaire.**

Le gène *KNR4* (Killer Nine Resistant 4) a été cloné par complémentation d'un mutant résistant à la toxine killer K9. La toxine killer K9 (ou HM1) produite par la souche de levure *Hansenula mrakii* est létale pour les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*, provoquant leur

lyse spécifiquement au niveau des bourgeons et des tubes de conjugaison. Cette toxine a été décrite comme un inhibiteur de l'activité  $\beta(1-3)$  glucane synthase (Takasuka T. *et coll.*, 1995). La délétion du gène *KNR4* entraîne une diminution de trois fois de l'activité  $\beta(1-3)$  glucane synthase et une modification de la composition de la paroi (Hong Z. *et coll.*, 1994b; Hong Z. *et coll.*, 1994a). *KNR4* code pour une protéine de poids moléculaire de 57,044 kDa (Hong Z. *et coll.*, 1994a) qui présente un profil hydrophile, 5 motifs PEST caractéristiques des protéines rapidement dégradées et plusieurs sites de phosphorylation par différentes kinases dont la protéine kinase C (PKC) et la kinase dépendante de la calmoduline (CaM-K). Une analyse du phosphoprotéome par spectrométrie de masse a permis d'identifier deux résidus sérines comme phosphorylés "*in vivo*" (Ficarro S. B. *et coll.*, 2002). Bien que la séquence de *KNR4* ne présente aucun domaine de liaison à l'ADN, ce gène a également été cloné sous le nom de *SMII* par un crible recherchant les protéines se liant aux séquences MAR (Matrix Associated Regions) de l'ADN (Fishel B. R. *et coll.*, 1993). La protéine Knr4 est localisée en tâches cytoplasmiques regroupées au niveau du site d'émergence du bourgeon dans les cellules sans bourgeon, puis au niveau des petits bourgeons, et enfin au col entre les cellules mères et filles dans les cellules en division. (Martin H. *et coll.*, 1999)

La fonction exacte de cette protéine est inconnue mais les données existantes indiquent que Knr4 est impliquée dans la synthèse de la paroi de levure. Des mutations ponctuelles et la disruption de *KNR4* engendrent des phénotypes caractéristiques des mutants de la paroi: augmentation de la sensibilité cellulaire au SDS, détergent qui désorganise les membranes plasmiques; augmentation de la résistance cellulaire à la digestion par la  $\beta(1,3)$  glucanase, réduction de la quantité de  $\beta(1,3)$  glucanes ainsi que de l'activité de la  $\beta(1,3)$  glucan synthase, sensibilité au blanc de Calcofluor, rouge Congo, caféine et acide sorbique et résistance à la toxine killer K9. La disruption du gène *KNR4* provoque aussi un arrêt de croissance à 37-38°C, rémissible en présence d'un stabilisateur osmotique comme le sorbitol 1M ajouté dans le milieu. Les diploïdes homozygotes pour la délétion *KNR4* ont une sporulation très peu efficace qui peut être due aux changements des asques au niveau de la paroi cellulaire. Une analyse d'une collection des mutants a permis l'identification de 20 gènes provoquant l'augmentation de la sensibilité à la Caspofungine. Onze des gènes identifiés sont impliqués dans la fonction pariétale et membranaire, notamment des gènes de la voie PKC (*MID2*, *FKS1*, *SMII/KNR4* et *BCK1*), et des gènes impliqués dans la biosynthèse de la chitine et des mannane ( *CHS3*, *CHS4*, *CHS7* et *MNN10*) (Markovich S. *et coll.*, 2004). Par ailleurs, la surexpression du gène *KNR4* conduit également à des effets apparemment liés à la paroi : la sensibilité au blanc de Calcofluor de certains mutants de la paroi est réduite en présence d'un

plasmide multicopie portant le gène *KNR4*. L'analyse de la composition de la paroi de ces transformants montre une réduction de la teneur en chitine, ce qui est probablement la cause de leur résistance accrue au blanc de Calcofluor. De plus, la surexpression du gène *KNR4* a un effet sur le niveau de transcription de certains gènes responsables de la synthèse de la chitine. L'expression des trois gènes codant pour les sous-unités catalytiques des chitines synthases, *CHS1*, *CHS2* et *CHS3*, est fortement diminuée dans les souches portant le gène *KNR4* sur un plasmide multicopie (Martin H. *et coll.*, 1999).

### 1.6.1 La protéine Knr4 se trouve probablement au cœur d'un réseau d'interactions protéine-protéine.

Un crible global utilisant le système de double hybride afin de rechercher des partenaires fonctionnels, a montré que la protéine Knr4 pourrait interagir avec la protéine Bas1 a, ainsi que la pyruvate dehydrogenase Pda1 et Rpc40 sous unité de ARN polymérase I et II (Ito T. *et coll.*, 2001). La raison physiologique de cette interaction n'est pas évidente et sera discutée dans le chapitre (Résultats et Discussion) de cette thèse. Un autre crible génétique à grande échelle a été effectué pour chercher les interactions de type synthétique létal (voir partie résultats section 4.2.3) dans la levure *S. cerevisiae*. Ce crible a permis l'identification des gènes qui ont une fonction similaire à celle de *KNR4* (Tong A. H. *et coll.*, 2004). *BNI1* impliqué dans le polarisome, *CLA4* impliqué dans la localisation cellulaire pendant la croissance (Goehring A. S. *et coll.*, 2003), *MID2* un senseur membranaire qui active la voie de Pkc1-Slt2 (Green, 2003}. (Tong A. H. *et coll.*, 2004). Ensuite, dans une étude utilisant la même technologie mais dédié plus spécifiquement à des protéines impliquées dans la synthèse de la paroi, Lesage et ses collègues (2004) ont cherché les gènes qui mutés en combinaison avec la délétion d'un des quatre gènes, *FKS1*, *FKS2*, *GAS1* et *KNR4* conduit à une absence de croissance (ou une croissance très fortement compromise). Cette étude a permis d'identifier 135 délétions létales avec les  $\Delta fks1$ ,  $\Delta fks2$ ,  $\Delta gas1$  et  $\Delta knr4$ . Des gènes (*BEM2*, *SLT2*, *ROM2*, *RLM1* et *SWI4*) impliquées dans la voie de l'intégrité cellulaire ont été identifiés comme synthétiques létales avec les quatre délétions étudiées. De plus, des protéines qui se trouvent en aval de la voie PKC1-SLT2 ont été identifiées comme Rlm1 et Swi4. La suractivation de la voie de signalisation HOG par une délétion de la protéine phosphatase *PTC1*, et aussi une délétion de *FPS1*, est létale avec les mutations et  $\Delta fks1$  et  $\Delta knr4$ . Ceci soutient le fait déjà connu que les voies HOG et *PKC1-SLT2* jouent des rôles opposés dans la régulation de la synthèse de paroi. (Lesage G. *et coll.*, 2004; REYNOLDS T. B. *et coll.*, 1998). Les  $\Delta chs3$  et  $\Delta chs5$  sont synthétiques létales avec  $\Delta fks1$ ,

*Δknr4* et *Δgas1*. La protéine Knr4 montre une interaction létale avec des gènes impliqués dans l'établissement de la croissance polarisée (Cla4 et Bem1) ainsi qu'avec des gènes impliqués dans la morphogenèse et le bourgeonnement (Spa2, Bni1). De plus, parmi les gènes identifiés comme synthétiques létaux avec *KNR4*, se trouvent des gènes de l'ubiquitine dont les produits sont impliqués dans la dégradation protéique.

## **1.6.2 *KNR4* impliqué dans la régulation de la synthèse pariétale et la prolifération cellulaire ?**

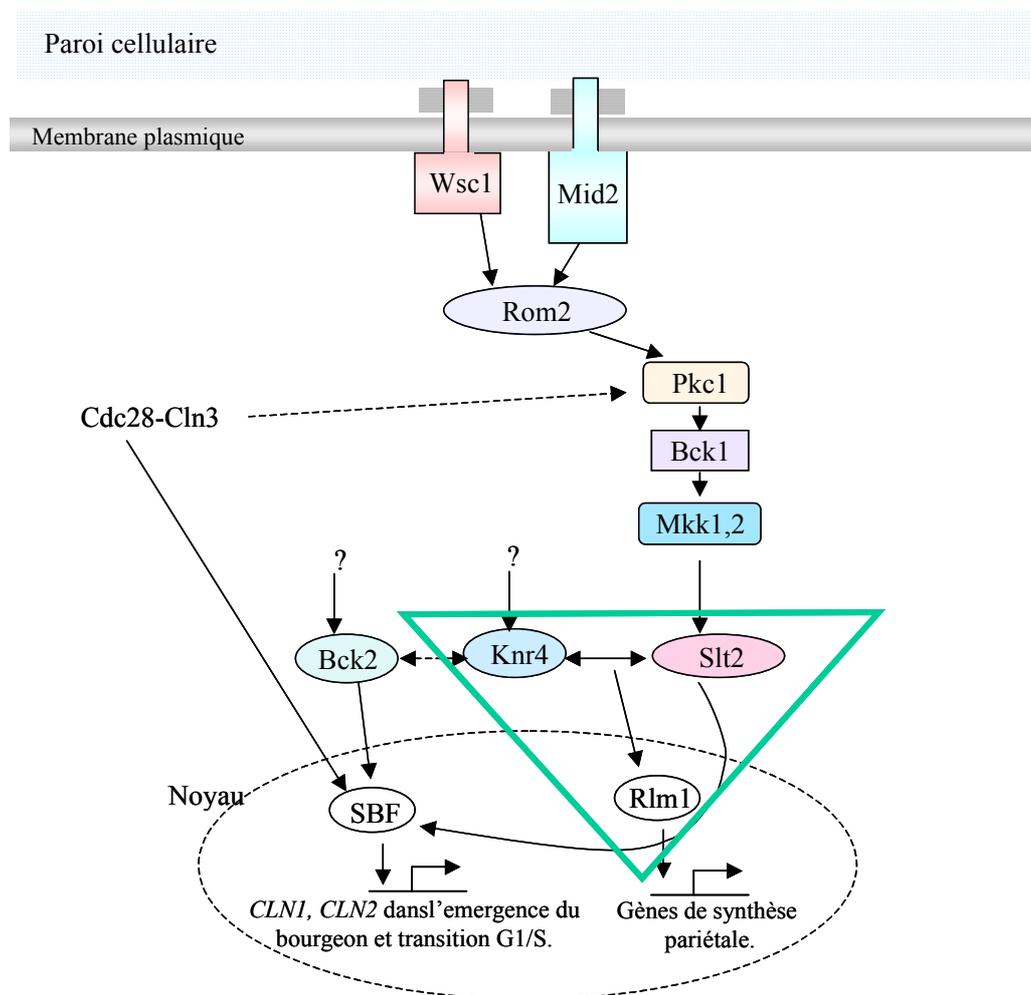
### **1.6.2.1 L'interaction entre Knr4 et le MAP kinase Slt2 est requise pour la signalisation cellulaire à travers la voie de l'intégrité cellulaire Pkc1.**

Il a été récemment montré par des différentes approches double hybride et *in vitro* immunoprecipitation que Knr4 interagit physiquement avec la MAP kinase Mpk1/Slt2. Dans les conditions de choc thermique, Knr4 est requise pour l'activation de Slt2. L'absence de Knr4 modifie la signalisation correcte de Slt2 vers ses substrats (Rlm1 et SBF). L'état d'activation de Rlm1 dans le mutant *Δknr4* a été étudié. Il a été démontré que l'activité du facteur de transcription Rlm1 est réduite de 90% dans une souche mutante *Δknr4* par rapport à la souche contrôle. Par contre, l'activité transcriptionnelle de SBF est augmentée d'une façon anormale. Ceci a été prouvé par une phosphorylation accrue de Swi6 dans le mutant *Δknr4*, et par une dérégulation de plusieurs gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Il semble que Knr4 agisse comme un modulateur de l'activité de Slt2, l'orientant correctement vers ses cibles pour assurer la bonne transmission du message de la Pkc1 en réponse aux sollicitations extérieures (Martin-Yken H. *et coll.*, 2002a; Martin-Yken H. *et coll.*, 2002b; Martin-Yken H. *et coll.*, 2003) (Figure 11).

### **1.6.2.2 Knr4 interagit avec la voie BCK2 pour le contrôle de la phase G1 en compagnie du complexe Cln3-Cdc28.**

Le gène *BCK2* (Bypass of C Kinase 2) est impliqué avec Cln3-Cdc28 dans la transition de la phase G1/S du cycle cellulaire. Il a été montré que la mutation de *KNR4* est synthétique létale avec les mutations des gènes de la cascade *PKC1-SLT2*, y compris *PKC1*. *KNR4* et *BCK2* ont été isolés comme suppresseur de mutants hypersensible au blanc de Calcofluor. De cela, une similitude de phénotypes des mutants *knr4* et *bck2* a été démontrée. En particulier, la délétion de *BCK2* comme celle de *KNR4* est synthétique létale avec les délétions de *PKC1*, *BCK1* et *SLT2*. En utilisant une souche mutante *cln2 cln3*, sauvée par la présence de *CLN3* sous la dépendance du promoteur *GALI*, Martin-Yken et coll, ont montré que *KNR4* est lui aussi essentiel en l'absence de *CLN3*. Une interaction entre Knr4 et Bck2

par une approche de double hybride a été mesurée. Bien qu'une interaction physique entre Bck2 et Knr4 n'ait pas été observée, toutes les données génétiques suggèrent que ces deux protéines font partie d'un même complexe impliqué avec Cln3-Cdc28 dans le contrôle des gènes de la phase G1 (Figure 11) (Martin-Yken H. *et coll.*, 2002a). Cependant, le produit de *BCK2* peut exercer des effets indépendants de Knr4 quand il est surproduit, et ces effets sont remarquablement bien illustrés par une comparaison des profils de transcrits issus de cellules surexprimant *BCK2* ou *KNR4*. En particulier, l'expression du gène *SWI4* est augmentée de 2 à 3 fois dans la souche surexprimant *BCK2*, ce qui peut en partie fournir l'explication de son effet de supprimer la lyse cellulaire de mutants *pkc1Δ* ou *mpk1Δ*, alors que la surexpression de *KNR4* ne peut exercer cette complémentation (Martin-Yken H. *et coll.*, 2002a; Martin-Yken H. *et coll.*, 2002b).



**Figure 11 : Un modèle proposé pour la fonction de Knr4 dans la voie de Slit2 MAP kinase de chez la levure *S.cerevisiae*.**

## 2 MATERIEL ET METHODES.

### 2.1 Souches, plasmides et oligonucleotides.

#### 2.1.1 Souches de levure et bactéries.

**Tableau 4 : Souches de levures utilisées.**

Souches	Génotype	Référence
AR27	MAT $\alpha$ <i>ura3-52</i>	(Ram A. F. <i>et coll.</i> , 1994)
PJ69-4A	Mata <i>trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4 v gal80 v LYS2::GAL1::HIS3 GAL2-ADE2 met2: :GAL7-lacZ</i>	(James P. <i>et coll.</i> , 1996)
W303-1A	MATa <i>SUC2 ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	(R. Rothstein)
HM10	AR27 <i>knr4: :KAN<sup>R</sup></i>	Martin <i>et coll.</i> (1999)
FB1	AR27 <i>KNR4-TAP-tag</i>	Cette étude
HM13	W303-1A <i>knr4::kan<sup>R</sup></i>	Martin-Yken <i>et coll.</i> , 2002)
HM1315	MATa/MAT $\alpha$ , <i>ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 knr4::kan/knr4::kan</i>	labo
BY4741-1a	MATa <i>met15<math>\Delta</math>0 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 TRP1 ura3<math>\Delta</math>0</i>	EUROSCARF

**Tableau 5 : Liste des mutants de la collection EUROSCARF utilisées.**

Nomenclature	Nom de gènes	Description
YEL061c	<i>CIN8</i>	MATa <i>met15<math>\Delta</math>0 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 TRP1 ura3<math>\Delta</math>0 cin8 ::kan<sup>R</sup></i>
YER155c	<i>BEM2</i>	MATa <i>met15<math>\Delta</math>0 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 TRP1 ura3<math>\Delta</math>0 bem::kan<sup>R</sup></i>
YFL039c	<i>ACT1</i>	MATa <i>met15<math>\Delta</math>0 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 TRP1 ura3<math>\Delta</math>0 act1::kan<sup>R</sup></i>
YGR229c	<i>KNR4/SMI1</i>	MATa <i>met15<math>\Delta</math>0 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 TRP1 ura3<math>\Delta</math>0 knr4::kan<sup>R</sup></i>
YHR030c	<i>SLT2/MPK1</i>	MATa <i>met15<math>\Delta</math>0 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 TRP1 ura3<math>\Delta</math>0 slt2::kan<sup>R</sup></i>
YLR319c	<i>BUD6</i>	MATa <i>met15<math>\Delta</math>0 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 TRP1 ura3<math>\Delta</math>0 bud6::kan<sup>R</sup></i>
YMR294w	<i>JNMI</i>	MATa <i>met15<math>\Delta</math>0 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 TRP1 ura3<math>\Delta</math>0 jnm1::kan<sup>R</sup></i>
YGR070w	<i>ROM1</i>	MATa <i>met15<math>\Delta</math>0 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 TRP1 ura3<math>\Delta</math>0 rom1::kan<sup>R</sup></i>
YKL201c	<i>MNN4</i>	MATa <i>met15<math>\Delta</math>0 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 TRP1 ura3<math>\Delta</math>0 mnn4::kan<sup>R</sup></i>

La souche d'*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  F<sup>-</sup> ( de génotype F<sup>-</sup>, *supE44*,  $\Delta$ *lacU169*, *endA1*, *hsdR17*, *thi-1*, *gyrA96*,  $\lambda$ <sup>-</sup>) a été utilisée pour l'amplification des plasmides. Une autre souche La souche bactérienne BL21 (F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS*(T<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), *gal*) a été utilisée pour l'expression des protéines de levures Tys1 et Knr4.

### 2.1.2 Plasmides.

Le plasmide pOBD-KNR4 a été construit par amplification du cadre ouvert de lecture de *KNR4* en utilisant les amorces Pr knr4-S-BamHI et Pr knr4-AS-PstI-end. Le fragment amplifié a ensuite été cloné dans les sites de restriction *Bam*HI/*Pst*I (soulignés). Les plasmides pOBD80-KNR4-D, pOBD80-KNR4-F, pOBD80-KNR4-C, pOBD80-KNR4-A et pOBD80-KNR4-B ont été construits de la même manière que le plasmide pOBD-KNR4 en utilisant respectivement les couples d'amorces (Pr knr4-S-BamHI/AS-knr4-760), (S-knr4-367/AS-knr4-1135), (S-knr4-367/Pr knr4-AS-PstI-end), (S-Knr4-742/Pr knr4-AS-PstI-end) et (S-knr4-1117/Pr knr4-AS-PstI-end).

Pour la construction des plasmides pFB1, pFB3, pHM64, pHM66 (voir section 2.5.2.3).

**Tableau 6 : Plasmides utilisés.**

Nom	Description	Source
pBS1539	Plasmide TAP-tag plasmid contenant le marqueur <i>URA3</i> de <i>K.lactis</i>	(Rigault <i>et coll.</i> , 1999)
pGEM®-T Easy	vecteur bactérien de clonage	Promega
pOBD80	Plasmide de double-hybride contenant le fragment d'ADN codant le domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription Gal4p.	(Louvet O. <i>et coll.</i> , 1997)
pGAD424	Plasmide de double-hybride contenant le domaine d'activation de GAL4	(James P. <i>et coll.</i> , 1996)
pRS316	Vecteur centromérique contenant le marqueur <i>URA3</i>	(Sikorski R. S. et Hieter P., 1989)
pUG35	Vecteur centomérique contenant <i>GFP</i> , promoteur <i>MET25</i> et le marqueur <i>URA3</i>	(Guldener <i>et coll.</i> , 1997)
YEep367	Vecteur navette <i>E. coli</i> / <i>S. cerevisiae</i> , 2 $\mu$ , contenant le gène rapporteur <i>LacZ</i> et un marqueur <i>LEU2</i> .	(Myers A. M. <i>et coll.</i> , 1986)
pSNF1 (BD)	Plasmide de double hybride qui exprime la protéine de fusion Snf1p au domaine de liaison à l'ADN de Gal4p	(Fields S. et Song O., 1989; James P. <i>et coll.</i> , 1996)
pGAD-SNF4	Plasmide de double hybride qui exprime la protéine de fusion Snf4P au domaine d'activation de l'ADN de Gal4p	(Fields S. et Song O., 1989; James P. <i>et coll.</i> , 1996)
pKNR4-BD	Gène <i>KNR4</i> fusionné au fragment <i>GAL4</i> codant le domaine de fixation à l'ADN dans pOBD80	Dagkessamankaia <i>et coll.</i> , (2001)
pOBD80-KNR4-D	Fragment du gène <i>KNR4</i> (759 pb) fusionné au fragment <i>GAL4</i> codant le domaine de fixation à l'ADN de GAL4 dans pOBD80	Cette étude

pOBD80-KNR4-F	Fragment de gène <i>KNR4</i> (768 pb) fusionné au fragment <i>GAL4</i> codant le domaine de fixation à l'ADN de <i>GAL4</i> dans pOBD80	Cette étude
pOBD80-KNR4-C	Fragment de gène <i>KNR4</i> (1149 pb) fusionné au fragment <i>GAL4</i> codant le domaine de fixation à l'ADN de <i>GAL4</i> dans pOBD80	Cette étude
pOBD80-KNR4-A	Fragment de gène <i>KNR4</i> (774 pb) fusionné au fragment <i>GAL4</i> codant le domaine de fixation à l'ADN de <i>GAL4</i> dans pOBD80	Cette étude
pOBD80-KNR4-B	Fragment de gène <i>KNR4</i> (400 pb) fusionné au fragment <i>GAL4</i> codant le domaine de fixation à l'ADN de <i>GAL4</i> dans pOBD80	Cette étude
pGal4a – TYS1	Gène <i>TYS1</i> fusionné au fragment <i>GAL4</i> codant le domaine de liaison à l'ADN de <i>GAL4</i> dans pGAD424	(Dagkessamankaia <i>et coll.</i> , 2001)
pGal4a – CIN5	Gène <i>CIN5</i> fusionné au fragment <i>GAL4</i> codant le domaine de liaison à l'ADN de <i>GAL4</i> dans pGAD424	(Dagkessamankaia <i>et coll.</i> , 2001)
pGal4a – SLT2	Gène <i>SLT2</i> fusionné au fragment <i>GAL4</i> codant le domaine de liaison à l'ADN de <i>GAL4</i> dans pGAD424	(Soler M. <i>et coll.</i> , 1995)
pGal4a–BCK2	Gène <i>BCK2</i> fusionné au fragment <i>GAL4</i> codant le domaine de liaison à l'ADN de <i>GAL4</i> dans pGAD424	(Martin-Yken H. <i>et coll.</i> , 2002a)
pGal4a–RLM1	Gène <i>RLM1</i> fusionné au fragment <i>GAL4</i> codant le domaine de liaison à l'ADN de <i>GAL4</i> dans pGAD424	(Watanabe Y. <i>et coll.</i> , 1995)
pGal4-PDA1	Gène <i>PDA1</i> fusionné au fragment <i>GAL4</i> codant le domaine de liaison à l'ADN de <i>GAL4</i> dans pGAD424	Cette étude
pFB1	Plasmide centromérique exprimant le gène codant $\text{Knr4}^{\text{S200A-S203A}}$ mutée sur les deux sites de phosphorylation (S200A-S203A),	Cette étude
pFB3	fragment de 1,6 kb du promoteur <i>KNR4</i> <i>HindIII</i> – <i>XbaI</i> , cloné dans YEp367	Cette étude
pHM64	Clonage du gène exprimant la protéine $\text{Knr4}^{\text{S200A-S203A}}$ au site <i>BamHI/EcoRI</i> en 5' du fragment GFP dans le vecteur pUG35.	Cette étude
PHM37	<i>KNR4</i> (2,95 kb) cloné aux sites <i>XbaI/SpeI</i> dans le plasmide épisomique pRS426 contenant un marqueur <i>URA3</i>	(Martin, H <i>et coll.</i> , 1999)
pHM38	<i>KNR4</i> (2,95 kb) cloné aux sites <i>XbaI/SpeI</i> dans le plasmide centromérique pRS316 contenant un marqueur <i>URA3</i> .	(Martin <i>et coll.</i> , 1999)
pHM66	Plasmide contenant le gène exprimant la protéine $\text{Knr4}^{\text{S200A-S203A}}$ plasmide de double-	Cette étude

	hybride pOBD80.	
pGEX-TYS1	Plasmide contenant le gène TYS1 dans le plasmide pGEX en phase avec la GST pour exprimer la protéine de fusion GST-Tys1.	(Dagkessamankaia <i>et coll.</i> , 2001)
pFD6	<i>KNR4</i> (1188pb) délaité dans la partie C-terminale cloné dans le plasmide pET21	Fabien Durand
pHSP100	Plasmide rapporteur contenant une fusion <i>lexA-RLM1</i> et le gène rapporteur LacZ .	(Kirchrath L. <i>et coll.</i> , 2000)

### 2.1.3 Oligonucléotides.

**Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés.**

Nom	Séquence	Utilisation
Pr knr4-S-BamHI	<u>GGATCCTGGATCTATTCAAAA</u> GAAAAGTT	Construction de plasmide de double hybride pOBD80-KNR4, Délétion progressive des domaines de <i>KNR4</i>
Pr knr4-AS-PstI-end	<u>ATCTGCAGAAGCTATATTTTC</u> AAATTCTTC	Construction de plasmide de double hybride pOBD80-KNR4, Délétion progressive des domaines de <i>KNR4</i>
S-knr4-1117	<u>CGGGATCCAGCCTTCTACCCT</u> CAACG	Délétion progressive des domaines de <i>KNR4</i>
AS-knr4-1135	<u>AACTGCAGCGTTGAGGGTAG</u> AAGGCTG	Délétion progressive des domaines de <i>KNR4</i>
S-knr4-367	<u>CGGGATCCACGCAGAGGAAG</u> ACTTGG	Délétion progressive des domaines de <i>KNR4</i>
AS-knr4-385	<u>AACTGCAGCCAAGTCTTCCTC</u> TGCGTG	Délétion progressive des domaines de <i>KNR4</i>
S-Knr4-742	<u>CGGGATCCATATCGGTGTTGA</u> CTTGG	Délétion progressive des domaines de <i>KNR4</i>
AS-knr4-760	<u>AACTGCAGCCAAGTCAACAC</u> CGATATG	Délétion progressive des domaines de <i>KNR4</i>
P1 NdeI-TAP	CATATGAATATCACAATTAAC ATTCTACAAC	Construction de la cassette <i>KNR4</i> -TAP-tag
P2 ApaI-TAP	GGGCCCACTAGTAGTATTTAT TTTCTTTTTTTA	Construction de la cassette <i>KNR4</i> -TAP-tag
P3 QF- TAP	GATGATGCTAAAGTGAAGA AGCGAGAAAGAATTTGAAAA TATAGCTTTATCCATGGAAAA GAGAAG	Construction de la cassette <i>KNR4</i> -TAP-tag
Pr1AS/NcoI-pHM38	<u>GTCTTTCCATGGCTGAAGAGG</u> CGCCAGTGATGTAACATGGG ATAAACC	Amorce interne pour réaliser une mutation dans le site de phosphorylation de <i>KNR4</i> par PCR recombinante
Pr1S-pHM38	ACGGAGTCAAACGATGGTGT CTC	Amorce externe pour réaliser une mutation dans le site de phosphorylation

		de <i>KNR4</i> par PCR recombinante
Pr2AS-pHM38	CGCTAAAGTAGTCGTCATTGT CATCTACT	Amorce externe pour réaliser une mutation dans le site de phosphorylation de <i>KNR4</i> par PCR recombinante
Pr2S/NcoI-pHM38	ATCTACTGGCGCCTCTTCAGC CATGGAAGACTAAATGGTAA CAAGTTCAAAC	Amorce interne pour réaliser une mutation dans le site de phosphorylation de <i>KNR4</i> par PCR recombinante
pr- <i>knr4</i> -sta	TAGGCGACAACCTTGGCAGAA TTTT	Séquençage de <i>KNR4</i>
pr- <i>knr4</i> -Mid	GGCTTGTTTTATGGCTTCCAA CTAA	Séquençage de <i>KNR4</i>
pr- <i>knr4</i> -End	GCAAAAGAAAGTGGCAGCTG AAC	Séquençage de <i>KNR4</i>
Pr-S Promoteur <i>KNR4</i>	CACATACAGCAAAAAAATAG GCCAATTTATGATCATCATCC G	Construction du plasmide pFB3
prom <i>KNR4</i> rev HindIII	GCAAGCTTCATTTTATACTAA AAAATTCTGCCAAGTTG	Construction du plasmide pFB3
Pr-S-PDA1 (EcoRI)	GAGAATTCATGTTTGTGCGCAC CTGTATCTTCACAA	Construction du plasmide pGal4-PDA1 pour le test du double-hybride
Pr-AS- (PstI)	PDA1 GACTGCAGATCCCTAGAGGC AAAACCTTGCTTTTTGAA	Construction du plasmide pGal4-PDA1 pour le test du double-hybride

**Tableau 8 : Liste des oligonucléotides utilisée pour la quantification des transcrits par PCR quantitative en temps réel**

Nom	Séquence
KNR4_QPCR_F	CGGTACTTCTGGCTTGTTTTATGGCTTCC
KNR4_QPCR_R	GATCTGGGATATTTGGCAGTTTGAAGTTGTTAC
PDA1_QPCR_F	CAGGCTTCTATGGTGGTAATGGTATCGTG
PDA1_QPCR_R	GCAGGCGTCCTCGTTCTTGTATTGG
RPN2_QPCR_F	CGATGATGTCAGAAGGGCAGCAGTC
RPN2_QPCR_R	GGCACAAGCAATCCCAAGAGCAAATG
UBC6_QPCR_F	GGACCTGCGGATACTCCTTACAAG
UBC6_QPCR_R	GGGTGGTAATCACTCATAGAAAGGCATAATCG
GSY2_QPCR_F	TGCCCAGTATAAAGACCATTACCACTTGATAGG
GSY2_QPCR_R	GCACCTTCAATCAGCCACCTCCATAAAC
ACT1_QPCR_F	TATCGTCGGTAGACCAAGACACCAAGG
ACT1_QPCR_R	ACTCTCAATTCGTTGTAGAAGGTATGATGCC

## 2.2 Milieux de culture.

### 2.2.1 Milieux de culture de levure

Les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Les milieux solides contiennent 2% d'agarose.

Milieu complet YPD: 1% extrait de levure, 2 % bacto-peptone, 2% glucose.

Milieu minimum YNB: 0,17% yeast nitrogen base (sans acides aminés ni sulfate d'ammonium), 0,5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2% glucose.

Ce milieu peut être complété par une solution d'acides aminés ainsi que par des acides aminés et des bases nucléiques (tyrosine, uracile, et adénine ; voir Rose *et al.*, "Methods in Yeast Genetics" A laboratory course manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990)

### 2.2.2 Milieux de culture de bactéries.

Milieu LB : 1% Tryptone, 0,5% extrait de levure, 0,5% NaCl. (Pour la sélection des plasmides après les transformations de bactéries, 50µg/ml d'ampicilline ou de kanamycine sont ajoutés au milieu LB).

Milieu SOB : 2% Tryptone, 0,5 % extrait de levure, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM pH 6,7

## 2.3 Tests phénotypiques sur boîtes de pétri

Lorsqu'il s'agit de tester la sensibilité au Blanc de Calcofluor des souches ne contenant pas de plasmides, le milieu est du milieu YPD solide, supplémenté 0,1 mg/ml de blanc de Calcofluor. Si par contre il s'agit de tester la complémentation ou la suppression de la sensibilité d'un mutant par un plasmide, un milieu de sélection (YNB plus les suppléments auxotrophiques) est utilisé afin d'assurer le maintien du plasmide dans les cellules. Pour les plasmides portant le marqueur d'auxotrophie *URA3*, ou du milieu YNB sans uracile, mais complétement par les autres acides aminés et bases nucléiques. Ce milieu est tamponné à pH 6,0 par 50 mM de MES (2-(N-morpholino)-éthane sulfonique acide) afin d'assurer la stabilité du blanc de Calcofluor (Ram *et al.*, 1995). Le blanc de Calcofluor (Sigma, ref n°F6259) est ajouté au milieu refroidi à 50°C, juste avant solidification, sous la forme d'une solution à 1% préparée extemporanément et stérilisée par filtration. Le rouge Congo est ajouté au milieu refroidi à 50°C, juste avant solidification, sous la forme d'une solution à 2 mg/ml préparée extemporanément et stérilisée par filtration. La sensibilité à l'acide sorbique a été réalisée sur des boîtes YPD contenant 1 mM d'acide sorbique pH 4.5. Les solutions de caféine (100mM), de SDS (0,05%) et de NaCl (1M) sont préparées sous forme de solutions stocks stériles aux

concentrations indiquées entre parenthèse. Elles sont ajoutées, à la concentration finale désirée, au milieu YPD juste avant solidification. Les souches sont cultivées une nuit dans 5 ml de milieu de culture YPD à 30°C pour atteindre généralement la phase stationnaire. En fonction des densités optiques des cultures mesurées à 530nm, elles sont concentrées pour obtenir des suspensions cellulaires à 8.0 unités de  $DO_{530}$ . Les cellules sont ensuite déposées en gouttes, à différentes dilutions (1/10, 1/100 et 1/1000) sur le milieu contenant les différents composés. Les boîtes de pétri sont incubées à 30°C pendant 2 jours

La sensibilité au stress thermique a été réalisée sur des boîtes YPD à température 37°C. La sensibilité à la pression osmotique a été étudiée par suivi de leur croissance en milieu YPD supplémenté par du sorbitol à une concentration de 1M.

## **2.4 Techniques de génie génétique.**

### **2.4.1 Préparation de bactéries thermocompétentes.**

La préparation de bactéries compétentes consiste en la fragilisation de leur membrane pour faciliter leur transformation par des plasmides. Les bactéries compétentes ont été préparées par la méthode SEM (Simple and Efficient Method), selon le protocole décrit (Inoue *et al.*, 1990). La souche DH5 $\alpha$  (Library Efficient DH5 $\alpha$  competent cells, Life Technologies) est mise en croissance sur une boîte LB à 37°C toute une nuit. Une dizaine de colonies sont inoculées dans 250ml de milieu SOB à 18°C jusqu'à l'obtention d'une  $DO_{600nm} = 0,6$ . La culture est alors refroidie pendant 10min. dans la glace, puis centrifugée à 3000 rpm/10min/4°C. Le culot est repris dans 80 ml de tampon TB froid (Pipes 10mM, CaCl<sub>2</sub>, 15mM, KCl 250mM, MnCl<sub>2</sub> 55mM, pH 6,7), puis laissé à nouveau 10 min dans la glace. Après centrifugation 3000rpm/10min/4°C, le culot est repris dans 20ml de tampon TB froid et l'on ajoute du DMSO (Diméthyl sulfoxyde) à une concentration finale de 7 %. L'ensemble est placé dans la glace pendant 10min, les cellules sont aliquotées par 200 $\mu$ l dans des tubes eppendorfs froids et congelées brutalement dans l'azote liquide. Elles sont conservées à -80°C jusqu'à l'utilisation.

### **2.4.2 Préparation de bactéries électrocompétentes.**

Un volume de 250 $\mu$ l de milieu LB est inoculé avec 50  $\mu$ l d'une préculture de DH5 $\alpha$ . Les bactéries sont cultivées jusqu'à une  $DO_{600nm} = 0,5$ , puis centrifugées à 4500rpm/10min/4°C. Après deux lavages à l'eau distillée froide et un lavage au glycérol 10% (v/v), les cellules sont reprises dans 700  $\mu$ l de glycérol 10%, puis aliquotées par fractions de 40  $\mu$ l et congelées dans l'azote liquide (Dower *et al.*, 1988).

### 2.4.3 Transformation de bactéries thermocompétentes.

Le tube contenant les cellules compétentes est laissé à dégeler dans la glace. Les cellules sont transférées dans un tube eppendorf froid contenant l'ADN plasmidique à amplifier (le produit d'une ligation ou 0,5µg de plasmide). Après 10 minutes à 4°C, le tube est placé dans un bain à 42°C pendant 2 minutes (choc thermique). Les cellules sont alors remises 10 minutes dans la glace, puis 500µl de LB froid sont rajoutés. Après 30 minutes d'expression phénotypique à 37°C, les cellules sont centrifugées à 10.000 g durant 1 minute, et les cellules sont resuspendues dans ~ 200µl d'eau pour être étalés sur une boîte LB+Ampicilline. Une nuit à 37°C suffit pour l'obtention de colonies.

### 2.4.4 Transformation de bactéries électrocompétentes.

L'électroporation consiste à soumettre les cellules à une très grande différence de potentiel pendant un temps de quelques millisecondes afin de provoquer la formation de pores dans la membrane plasmique, qui devient alors perméable à l'ADN transformant (Dower *et al.*, 1988). Les 40 µl de bactéries électrocompétentes sont incubés 1 minute dans la glace avec 1 à 2 µl d'ADN transformant. Les cellules sont ensuite transférées dans une cuve d'électroporation de 0,2 cm, puis soumises à une impulsion électrique de 1,5 KV, 200 Ω et 25 µF, à l'aide d'un électroporateur Gene Pulser (Bio-Rad) équipé du pulse contrôler (Bio-Rad). Les cellules sont immédiatement suspendues dans 1 ml de milieu LB, puis incubées 1 heure à 37°C avant d'être étalées sur un milieu sélectif.

### 2.4.5 Mini préparation d'ADN plasmidique de bactéries.

Ce protocole est destiné à récupérer du matériel plasmidique après son amplification chez la bactérie *E.coli*. La colonie isolée est repiquée dans 3 ml de milieu LB liquide (+ 50 µg/ml d'ampicilline) et laissée à 37°C durant une nuit. Les cellules sont récupérées par centrifugation dans un tube eppendorf (15000rpm/1min). Le surnageant est éliminé à la trompe à vide et le culot est repris dans 150µl de Solution I (Tampon de suspension) auxquels sont rajoutés 200µl de solution II (Solution de lyse).Après 5 minutes, la réaction est arrêtée par 200µl de solution III (Solution de neutralisation) et laissée 2 minutes dans la glace. La tube est centrifugé à 15000rpm/10min/4°C et la surnageant est transféré dans un tube contenant 360µl d'isopropanol. Le mélange est laissé au repos 5 min puis centrifugé à 15000rpm/5min/4°C. Après élimination du surnageant, le culot d'ADN est rincé par 200µl d'éthanol 70%. Le culot est séché 5 min à 50°C puis repris dans 15µl d'eau.

⇒ Solution I :            Glucose 50mM  
                                  EDTA 10mM pH = 8

Tris-Hcl 25mM pH = 8

Rnase à 7U/ml final

⇒ Solution II : NaOH 0,2M

SDS 1%

⇒ Solution III : Acétate de sodium 3M pH = 5,2

#### 2.4.6 Transformation de levure.

Quelques millilitres de milieu YPD sont ensemencés à l'anse de platine et les cellules sont mises en croissance à 30°C toute une nuit. Après une mesure de la DO à 600 nm, la culture est diluée dans 20 ml de milieu YPD frais à une  $DO_{600}$  de 0,1 afin de relancer la croissance des cellules. En effet, les cellules en phase exponentielle se prêtent davantage à la transformation que les cellules en stationnaire, plus résistantes. En parallèle, s'il s'agit d'une transformation visant l'intégration d'un plasmide ou d'une cassette de délétion dans le génome, le plasmide sera mis à digérer. Après une croissance à 30°C jusqu'à  $DO_{600} = 0,6$  (environ 6 heures pour une souche sauvage), 4 ml de la culture sont centrifugés à 5000rpm/5min/4°C, le culot est lavé avec de l'eau stérile puis centrifugée à 5000rpm/5min/4°C. Après élimination de l'eau, le culot est repris dans 800 µl d'une solution de LiAc/TE 1X. L'acétate de lithium va permettre de fragiliser la paroi de la levure. Cette réaction dure pendant 15 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, une solution d'ADN carrier à 10 mg/ml (qui favorise l'intégration de l'ADN dans la levure) est chauffée à 95°C durant 15 minutes (Schiestl R. H. et Gietz R. D., 1989). L'ADN carrier est ensuite brutalement plongé dans la glace pendant 5 minutes pour empêcher sa rehybridation. Ces 5 minutes servent aussi à centrifuger (5000rpm/5min/4°C) le mélange levures /LiAc. Le surnageant d'acétate de lithium est éliminé. Le culot de levures est alors repris dans 100µl d'une solution de LiAc/TE 1X/eau, auxquels l'ADN transformant et 5µl d'ADN carrier sont rajoutés. Les levures sont mélangées à 600µl d'une solution de LiAc/TE 1X/PEG 40% qui permet de concentrer l'ADN au niveau de la paroi de la levure. Le mélange est laissé 40 minutes à 30°C, puis 20 minutes dans un thermo-bloque à 42°C pour réaliser le choc thermique qui va permettre l'entrée de l'ADN transformant dans les cellules de levure. Après une centrifugation à 5000rpm/5min/4°C, les cellules sont reprises dans 100µl d'eau stérile, puis étalées sur un milieu qui permettra la sélection des transformants (Woods R. A. et Gietz R. D., 2001).

#### **2.4.7 Technique de construction de plasmides *in vivo* par recombinaison homologue chez la levure *S. cerevisiae*.**

Cette technique permet de cloner un gène ou un fragment de PCR quand les techniques de clonage conventionnelles se sont révélées peu fructueuses ou qu'il n'existe pas de sites de restriction compatibles (Ma H. *et coll.*, 1987; Oldenburg K. R. *et coll.*, 1997). Le fragment d'ADN à cloner (gène, produit d'une PCR) doit posséder aux extrémités 30 - 40pb d'homologie aux extrémités du plasmide receveur linéarisé (Baudin A. *et coll.*, 1993; Manivasakam P. *et coll.*, 1995). La co-transformation (fragment d'ADN + plasmide linéarisé) de la levure permet le clonage *in vivo* du fragment d'ADN dans le plasmide receveur par simple recombinaison homologue (Orr-Weaver *et coll.*, 1981). Le plasmide est ensuite extrait de la levure (Hoffman C. S. et Winston F., 1987), amplifié par des cellules rendues électrocompétantes ( voir section 2.4.1.4 ; Dower *et coll.*, 1988), puis isolés par minipréparation. Enfin, la construction est vérifiée par séquençage.

#### **2.4.8 Extraction d'ADN plasmidique de levure.**

Quelques ml de milieu YNB (plus les besoins auxotrophiques) sontensemencés par la levure contenant le plasmide à isoler, puis laissés sous agitation à 30°C durant la nuit. La culture est centrifugée (15000rpm/1min/TA) et le culot est repris dans 200 µl d'une solution de NaCl 100mM, Tris/HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM et 0.1 % SDS, puis transféré dans un tube eppendorf. Après ajout de 0,3gr de billes de verre (Glass beads 425-600µm de Sigma), l'eppendorf est vortéxé 1min. Après centrifugation à 15000rpm/2min/, la phase supérieure est transférée dans un nouveau tube et mélangée à 200 µl de phénol (non acide) par vortex (1 minute). Après centrifugation 15000rpm/2min/TA, la phase supérieure est isolée une seconde fois et de nouveau mélangée à 200µl de phénol (non acide) par vortex (1 minute). (Hoffman C. S. et Winston F., 1987). Le surnageant est alors purifié par le kit QiaexII de Qiagen (Protocol for desalting and concentrating DNA solutions). Le choix de ce kit est basé sur sa capacité à purifier des plasmides d'une taille supérieure à 10kb. L'ADN plasmidique est repris au final dans 15µl d'eau. Seuls 1 à 2µl de ce volume servent à transformer des bactéries *E. coli* rendues électrocompétentes (voir section 1.4.1.4)(Dower W. J. *et coll.*, 1988).

#### **2.4.9 Extraction d'ADN génomique de levure.**

Le kit Maestro Yeast TM d'Eurobio a été utilisé pour extraire l'ADN génomique de levure. Ce kit, utilisé suivant les indications du fournisseur, permet d'obtenir rapidement une quantité d'ADN génomique suffisante pour faire des PCR afin de vérifier des intégrations génomiques par exemple.

## 2.4.10 Extraction des ARN totaux de levure.

### 2.4.10.1 Culture et broyage cellulaire.

Les levures sont mises en culture en érlenmeyer dans 100ml de milieu YPD à 30°C. Des échantillons ont été prélevés en phase exponentielle de croissance  $DO_{600} = 0,7$ , ensuite, en phase diauxique  $DO_{600} = 4$  et stationnaire de croissance  $DO_{600} = 8$ . Les cellules sont alors recueillies par centrifugation (3000rpm/2min), puis remises en suspension dans le tout petit volume de milieu restant au niveau du culot après avoir jeté le surnageant. La suspension cellulaire est alors aspirée à la pipette puis versée directement sous forme de plusieurs gouttes dans l'azote liquide. Les gouttes de cellules sont conservées à -80°C. Deux ou trois gouttes de cellules sont broyées mécaniquement (2600rpm/2min) par une bille de tungstène de 7mm de diamètre, dans un broyeur (Braun Melsungen, Allemagne). Toute la vaisselle servant au broyage des cellules doit être préalablement refroidie dans l'azote liquide pour maintenir les fragments cellulaires gelés. Les débris cellulaires sont directement versés dans la solution RLT du kit Rneasy Mini Kit (Qiagen, Allemagne) afin d'extraire les ARN totaux.

### 2.4.10.2 Extraction des ARN totaux.

Les précautions habituelles nécessaires à la manipulation des ARN sont prises (port de gants, changements fréquents des gants, solutions traitées au DEPC, manipulations rapides...). Les ARN doivent être d'une pureté irréprochable pour éviter toutes contaminations par des produits susceptibles d'inhiber la réaction de transcription reverse. L'extraction des ARN totaux à partir des fragments cellulaires congelés est exécutée en suivant les recommandations du fournisseur du kit Rneasy Mini Kit (Qiagen). La méthode Qiagen combine les propriétés de fixation sélective des membranes de silice et de multiples étapes de centrifugation. Qiagen déclare que les ARN élués (dans 500µl) peuvent être directement utilisés pour la rétrotranscription.. La quantité et la qualité des ARN totaux sont déterminées en mesurant l'absorbance à 260nm et à 280nm, puis en calculant le rapport  $A_{260}/A_{280}$  qui doit être compris entre 1,9 et 2,1 (sinon l'échantillon est contaminé par des protéines). De plus, une électrophorèse (0,8% d'agarose, 100V pendant 10 minutes) sur laquelle sont chargés 10 µg d'ARN total permet de compléter cette vérification. Une autre méthode plus rapide qui a été utilisée par la suite est l'analyse des ARN sur des puces Agilent par le Bioanalyser (Agilent USA), technique de séparation par microfluidique et qui d'estimer à la fois la qualité et la quantité des ARN Il est important de noter que la bonne qualité des ARN joue un rôle important dans la fidélité des expérience réalisé avec le RT-PCR-Q).

## 2.4.11 Techniques de clonage et d'analyses de séquences.

### 2.4.11.1 Analyse informatique des séquences.

Les simulations de clonage, de digestions plasmidiques, de PCR recombinantes, ainsi que les alignements multiples de séquence et les pourcentages d'identité entre deux séquences en acides aminés ont été réalisés grâce au logiciel Vector NTI (InforMax, Inc, Bethesda, MD). Etant donné que la levure *S.cerevisiae* était l'un des premiers organismes d'être séquencés, cela a permis la mise en place de nombreux outils informatiques pour son exploitation, notamment sur internet. Je citerai certains sites que j'ai utilisés durant cette étude :

<http://Vectordb.atcg.com> (pour les séquences de vecteurs)

Ce site a été utilisé pour télécharger les séquences nucléotidiques.

<https://www.incyte.com/control/tools/proteome> (Incyte proteome)

<http://www.yeastgenome.org/> (SGD)

Ces deux sites sont des bases des données génomiques ont été utilisés très fréquemment au cours de cette thèse pour acquérir les différentes informations concernant un gène donné.

<http://www.swissmodel.expasy.org> (Swiss Model)

Ceci est une base des données protéiques. D'autres logiciels disponibles sur Internet ont également été utilisés pour analyser les séquences.

### 2.4.12 Enzymes.

Les endonucléases de restriction ainsi que les enzymes de modification de l'ADN (ligase, phosphatase alcaline, fragment de Klenow) utilisées proviennent de chez New England Biolabs ou de chez Gibco BRL. Elles ont été utilisées selon les indications des fournisseurs.

### 2.4.13 Purification de fragment d'ADN.

Le « Qiaquick Gel Extraction Kit » de Qiagen a été largement utilisé pour l'extraction de fragment à partir d'un gel. Pour les cas les plus difficiles, le kit QiaexII de Qiagen a été préféré.

## 2.5 Techniques de PCR.

### 2.5.1 Conditions de PCR.

Les conditions de PCR peuvent varier mais la condition générale est la suivante :

- Matrice : 1µl = 100ng de plasmide ou d'ADN génomique..
- Oligonucléotides ou amorces: 1µl = 100ng
- dNTPs : 8µl d'une solution 2,5mM pour chacun des quatre.

- Tampon de l'enzyme : 10µl car généralement 10X.
- Enzyme : 1µl.
- Volume réactionnel : H<sub>2</sub>O qsp 100µl.

L'enzyme et son tampon sont choisis selon les besoins de la PCR. Pour une amplification fidèle de la matrice, on utilisera plutôt la *Pfu* polymérase (Promega) ou la *Vent* polymérase (Biolabs). Pour une amplification destinée à un contrôle qualitatif, on utilisera la *Taq* polymérase (Sigma), plus rapide, moins coûteuse, mais moins fidèle. Les PCR sont réalisées avec un appareil Perkin Elmer (Gene Amp PCR system 2400) ou Hybaid (PCRExpress).

Les cycles utilisés sont généralement les suivants :

5 Premiers cycles (destinés à l'initiation de la réaction) :

⇒ 95°C pendant 45 secondes

⇒ 48°C pendant 45 secondes

⇒ 72°C pendant 1 à X minutes (le temps est variable car il dépend de la longueur de la séquence à amplifier et de la vitesse de l'enzyme : 2 minutes pour 1kb avec la *Pfu* ou la *Vent* et 1 minute pour la même distance avec la *Taq*).

✓ Puis 25 cycles durant lesquels les amorces s'hybrident sur toute leur longueur :

⇒ 95°C pendant 45 secondes

⇒ 53°C pendant 45 secondes

⇒ 72°C pendant 1 à X minutes

La PCR se termine par une étape durant deux fois le temps d'élongation à 72°C.

## 2.5.2 Mutagenèse par PCR.

### 2.5.2.1 PCR Recombinante.

La technique de mutagenèse dirigée par PCR Recombinante (Innis M. A. *et coll.*, 1990) a été utilisée aux cours de ces travaux pour changer les deux Serines de Knr4 par deux alanines.

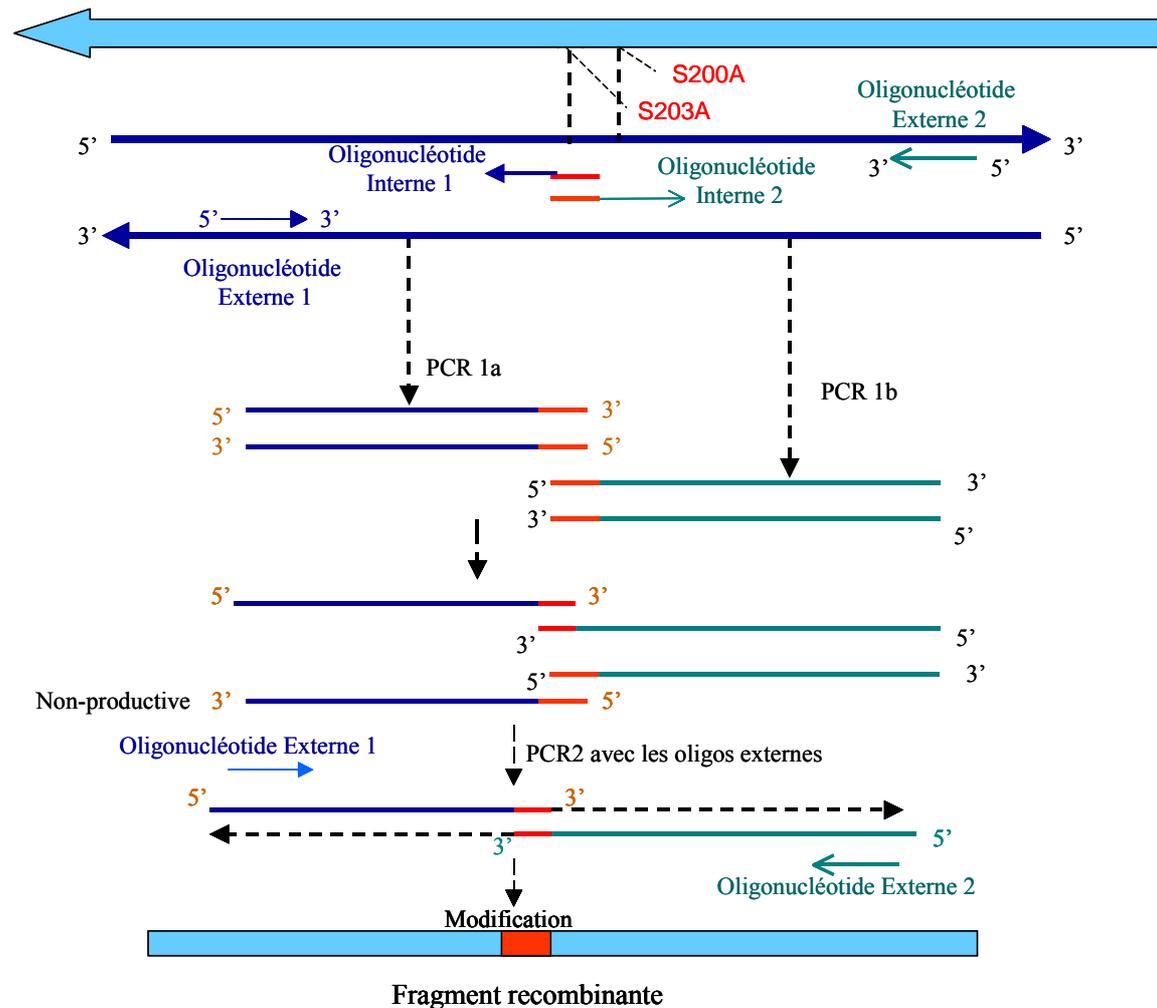


Figure 12 : Schéma représentant le principe de la mutagenèse dirigée par PCR recombinante.

#### 2.5.2.2 Principe de la mutagenèse dirigée par PCR recombinante.

Deux PCR sont initiées (Figure 12). La première est réalisée avec un oligonucléotide en amont de la séquence à modifier (Oligonucléotide Externe 1) et un oligonucléotide s'appariant en 3' de la matrice mais portant en 5' la séquence mutée (Oligonucléotide Interne 1). La seconde PCR est menée avec un oligonucléotide s'appariant en aval (Oligonucléotide Externe 2) et un oligonucléotide s'appariant en 5' de la matrice (Oligonucléotide Interne 2) mais portant en 5' la séquence complémentaire à la queue 5' de l'oligonucléotide muté

précédent (c'est-à-dire l'Oligonucléotide Interne 1 Les deux produits de PCR sont alors complémentaires au niveau de l'extrémité mutée permettant ainsi l'initiation d'une troisième PCR avec les deux oligonucléotides externes et les produits de PCR précédents comme matrice. La résultante de la réaction est l'obtention de la séquence modifiée au niveau de la région de chevauchement entre les deux produits de PCR. Après insertion du fragment recombinant dans un vecteur d'amplification, il est nécessaire de s'assurer de l'intégrité de la modification par séquençage. Nous avons appliqué cette méthodologie pour remplacer deux résidus serine 200 et 203 de la protéine Knr4 par deux alanines..

### 2.5.2.3 Construction des plasmides pFB1, pFB3, pHM64, pHM66.

Plasmide pFB1: Les deux résidus sérines de Knr4 qui ont été identifiés comme phosphorylés *in vivo* (Ficarro S. B. *et coll.*, 2002) ont été remplacés par deux résidus alanine par la technique de PCR recombinante (Innis M. A. *et coll.*, 1990). Les deux oligonucléotides Pr1S-pHM38 (amorce externe)/ Pr1AS/NcoI-pHM38 (amorce interne) ont été utilisées pour réaliser la PCR1: les deux amorces et Pr2S/NcoI-pHM38 (amorce interne)/ Pr2AS-pHM38 (amorce externe) ont été utilisées pour réaliser le PCR2. Les deux oligonucléotides externe ont été utilisé (Pr1S-pHM38/ Pr2AS-pHM38) pour le PCR3. Le fragment recombinant a été sous-cloné dans le plasmide pHM38 ouvert par BglII. Ceci a permis la construction du plasmide pFB1 (Table 6). Nous avons réalisé cette construction en introduisant dans le fragment de la PCR3 un site de restriction enzymatique, nous permettant par la suite de vérifier la construction d'une façon systématique (par NcoI ou PmeI+SfoI ou PmeI+NarI). L'amplification du fragment PCR a été réalisée en utilisant la "high fidelity pfu turbo polymérase" (Stratagene). La construction du plasmide pFB1 a été vérifiée par séquençage (Genome Express S.A., Grenoble, France).

Le plasmide pFB3 a été construit par amplification de la région promotrice de *KNR4* (1.5kB) en utilisant les oligonucléotides Pr-S Promoteur KNR4 et prom KNR4 rev HindIII. Le fragment amplifié a ensuite été cloné dans le plasmide linéarisé yEP367 dans le site de restriction HindIII (soulignés).

Le plasmide pHM64: Le plasmide pFB1 a été digéré par BamHI/EcoRI permettant de purifier le gène muté *knr4\*\** contenant les mutations qui remplace Ser 200 et 203 par Ala. Ce fragment a été cloné en 5' du fragment d'ADN exprimant la GFP dans le plasmide pUG35. La fusion *KNR4-GFP* est sous le contrôle de MET25.

Le plamide pHM66 : Le plasmide pFB1 a été digéré par *Bam*HI/*Eco*RI permettant de purifier le gène *knr4*\*\*. Ce fragment a été cloné dans le plasmide de double hybride en 3' du fragment BD codant le domaine de liaison à l'ADN de Gal4p.

### 2.5.3 RT-PCR quantitative en temps réel.

La PCR quantitative en temps réel est une technique récente qui permet de mesurer l'expression des gènes via l'amplification spécifique du gène étudié par PCR. En utilisant la fluorescence comme système rapporteur, l'augmentation de la quantité d'ADN au cours de la PCR est enregistrée au fur et à mesure. Après la PCR, les quantités d'ADN sont comparées dans la partie exponentielle, moment pendant lequel l'augmentation de la quantité d'ADNc est proportionnelle à la quantité initiale de matrice (Bustin S. A., 2002; Mingam A. *et coll.*, 2003).

Les amorces spécifiques pour la PCR quantitative ont été dessinées pour chacun des gènes *KNR4*, *GSY2* (contrôle) ainsi que pour les quatre gènes de ménages *ACT1*, *PDA1*, *RPN2* et *UBC6* à l'aide du logiciel Beacon Designer en utilisant les paramètres par défaut (Table 8). Les gènes de ménage présentent un profil d'expression relativement constant quelles que soient les conditions de croissance mises en œuvre. Le choix des amorces a été réalisé de façon à limiter la formation de structures secondaires et de dimères et pour éviter la perte de rendement de la PCR due au repliement et à la dimérisation des amorces.

Pour chaque échantillon (P1), (P2) et (P3), 1 µg d'ARN totaux (Voir partie extraction des ARN totaux, section 2.4.10) sont rétro-transcrits dans 20 µl de mélange réactionnel en utilisant "iScript cDNA synthesis kit" (BioRad). La réaction est réalisée selon le protocole du fournisseur, par incubation 5 min à 25°C/5, puis, 30 min. à 42°C et 5 min à 85°C. Une fraction du mélange d'ADNc est amplifiée par PCR à l'aide de l'appareil MyiQ™ (Bio-Rad, base thermocycler iCycler® et module optique MyiQ™). L'analyse des signaux est réalisée à l'aide du logiciel de MyiQ® (Bio-Rad). L'efficacité d'amplification du couple d'amorces est préalablement validée par une série de dilutions des ADN complémentaires. Une bonne efficacité (85 < rendement < 120%), avec un coefficient de corrélation « cycle seuil vs concentration matrice » proche de 1 traduit une amplification spécifique du gène cible et l'absence de dimères d'amorces.

Les réactions PCR sont effectuées en microplaques 96 puits (25 µL de volume total) en utilisant un mélange réactionnel commercial (IQ SYBR Green supermix, Bio-Rad) contenant une Taq polymérase protégée par anticorps (hot start), 12,5 µl de SYBR Green

supermix, 2,5  $\mu$ M de chacune des amorces, 2,5 $\mu$ l H<sub>2</sub>O et 5  $\mu$ l d'ADNc. Le protocole utilisé consiste en une étape de dénaturation de 3 min à 95°C, 40 cycles à deux étapes (10 sec à 95°C, 45 sec à 56°C [hybridation + élongation]), puis une étape de dénaturation de 30 sec à 95°C suivie d'un palier de 30 sec à 60°C pour permettre la renaturation de tous les amplicons. Les courbes de dénaturation des produits PCR sont alors obtenues en augmentant la température de 60°C jusqu'à 90°C en effectuant une incrémentation de la température de 0,3°C pendant 100 paliers de 10 secondes chacun.

## 2.6 Dosage biochimique.

### 2.6.1 Dosage de l'activité $\beta$ -galactosidase.

Au cours de la culture, un volume correspondant à 14,8 UDO soit environ  $5 \times 10^8$  cellules est prélevé et centrifugé à 4800rpm/4min/4°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans 1ml d'eau mR, transféré dans un tube de 2 ml avec un joint d'étanchéité prévu pour le beadbeater et centrifugé 15000rpm/15s/TA. Le surnageant est retiré à la trompe à vide et l'échantillon est directement stocké à - 20°C. Le tube est sorti du congélateur et laissé à dégeler dans la glace ou l'on prendra soin de toujours laisser l'échantillon entre les manipulations. On y ajoute 500 mg de billes de verre (Glass beads 425-600 $\mu$ m de Sigma) soit un volume d'environ 500  $\mu$ l dans un tube eppendorf. Sous la hôte, le tampon LACZ et le beta-mercapto-2-éthanol sont mélangés dans un ration 20 ml/ 71  $\mu$ l afin d'obtenir suffisamment de solution pour ajouter aux nombres de tests à effectuer. L'échantillon est alors broyé au Fastprep en 3 fois 20sec à vitesse maximale puis centrifugée à basse vitesse 2500rpm/10/min/4°C. L'extrait est alors prêt pour le dosage. Un volume de surnageant allant de 20 $\mu$ l à 100 $\mu$ l selon l'activité attendue est déposé dans un tube à hémolyse. Ce dernier est placé dans un bain préchauffé à 37°C et 400 $\mu$ l d'une solution d'ONPG à 4mg/ml préchauffée à 37°C sont ajoutés au temps  $t_0$ . La réaction se produit jusqu'à l'obtention d'une coloration jaune paille et est stoppée par l'addition de 1ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M à 4°C. Le mélange est homogénéisé au vortex et stocké à 4°C. Le blanc est réalisé en remplaçant l'extrait par de l'eau mQ.

200 $\mu$ l de la coloration sont alors déposés sur une plaque éliasa sans oublier le blanc) et la plaque est immédiatement lue à 420nm sur le lecteur de Dynatech MR7000. La gamme de fiabilité se situe entre 0,01 et 0,3. L'activité  $\beta$ -galactosidase (nmol/ml/min) correspond à la formule suivante :

$$220,2 \times DO_{405nm} \times 1000 / \text{volume d'extrait } (\mu\text{l}) / \text{temps}(\text{min}).$$

L'activité spécifique (nmol/min/mg de protéine) correspond au rapport de l'activité  $\beta$ -galactosidase (nmol/ml/min) par la concentration en protéine (mg/ml).

Tampon lacZ : 0,06M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O  
0,04M NaHPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O  
0,01M KCl  
0,001M MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O

### 2.6.2 Dosage des protéines.

Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Elle nécessite de diluer l'extrait. Classiquement, 100 $\mu$ l d'extrait sont dilués dans 900 $\mu$ l d'eau mQ. Bien que fastidieux dans la mise en œuvre, cette manière de procéder donne d'excellents résultats en précision et reproductibilité. 200 $\mu$ l de la dilution au centième sont déposés sur une plaque éliisa (200 $\mu$ l d'eau pour le blanc) et on rajoute avec soin au pipetman 50 $\mu$ l de solution de Bradford commerciale (Bio-Rad protein assay). Après apposition d'un autocollant pour le mélanger par inversion, on met le plaque a l'abri de lumière pour 30min, ensuite, le plaque sera lue à DO<sub>550nm</sub>. La gamme de linéarité se situe entre 0,05 et 0,3 unités de OD à 550 nm.

## 2.7 Détection spécifique des protéines: technique de " Western Blotting ".

### 2.7.1 Expression et purification de la protéine de fusion GST-Tys1.

Le système utilisant la Glutathion S-transférase (GST) permet l'expression et la purification de protéines recombinantes produites dans *Escherichia coli*. Le système est basé sur l'expression inductible de fragments de gènes fusionnés avec la GST de *Schistosoma japonicum*, conduisant à la production de protéines de fusion contenant la GST en N-terminal et une protéine d'intérêt en C-terminal qui s'accumulent en grande quantité. Un extrait cellulaire cellules a été préparé à partir d'une culture de la souche d'*E.coli* BL21 transformée par les plasmides pGEX-TYS1 ou pMBP-KNR4 cultivées jusqu'à DO<sub>600</sub>= 0,6 dans 1,5 ml de milieu LB contenant 100  $\mu$ g/ml ampicilline. Ensuite, l'expression de la protéine de fusion a été induite en ajoutant 0,1 mM d'IPTG pendant 4 heures à 37°C. Les cellules ont été récoltées par une centrifugation pendant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire obtenu à partir de 1,5 ml de culture est lavé avec 200  $\mu$ l de tampon STE froid, puis resuspendu dans 13,5 ml de tampon STE contenant 50  $\mu$ g/ml de lysozyme et incubé dans la glace pendant 30 min. Du DTT est ensuite ajouté à une concentration finale de 5 mM. Les bactéries sont lysées après addition de Sarcosyl à la concentration finale de 1,5%. La suspension est agitée pendant 5 secondes au

vortex puis soniquée dans la glace pendant 10 secondes. Les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation de 5 min à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse (Frangioni J. V. et Neel B. G., 1993).

composition du tampon STE Tris 10mM pH = 8,0

NaCl 150mM

EDTA 1mM

La résine pour la fixation de la protéine de fusion est réalisée selon les recommandations de fournisseur (Pharmacia Biotech). Un extrait cellulaire (100 µl) contenant la protéine de fusion GST-Tys1 ainsi qu'un contrôle négatif GST seul ont été mélangés avec les billes Glutathion-Sepharose (50% v/v dans un tampon PBS). Ce mélange est alors incubé à 4°C pendant 1 h sous agitation. Un extrait cellulaire contenant la protéine Knr4-MBP a ensuite été ajoutée sur les billes associées d'une part à la fusion GST-Tys1 et d'autre part à la GST seule. Le mélange a été incubé une nuit à 4°C sous agitation. Après 6 - 8 lavages avec du tampon PBS, les complexes GST-Tys1 et Knr4-MBP ont été élués 3 fois avec 20 µl de tampon d'éluion (HEPES 75mM, pH 7,5, NaCl 150mM et de l'EDTA 1mM). Un gel de protéines SDS-PAGE 12 % a été réalisé en conditions dénaturantes et les protéines GST et GST-Tys1 ont été révélées par une coloration du gel au bleu de Coomassie. La protéine Knr4 est révélée par un " Western-blot" en utilisant des anticorps dirigés contre elle (voir partie détection spécifique des protéines).

### **2.7.2 Extraction des protéines totales de levure.**

La pré-culture est lancée durant toute la nuit dans du milieu liquide YPD à 24°C pour atteindre le milieu de la phase exponentielle. Le lendemain, les cellules sont alors diluées dans le même milieu afin d'obtenir une  $DO_{595} = 0.3$ , puis laissées pendant trois heures sous agitation à 24°C. Les cellules sont collectées par centrifugation, reprises dans du tampon d'extraction de manière à obtenir une concentration cellulaire équivalente à une densité optique comprise entre 50 et 100

Composition du tampon d'extraction :

Tris acétate 50mM pH 7.5

glycérol 10%,

EGTA 0.1 mM

acétate de magnésium 0.2mM

Pepstatine 1µM, PMSF 1mM

Une tablette de protéase inhibiteur pour chaque 10ml du tampon

Des billes de verre (diamètre 0.2 à 0.5 mm, 0,3gr) sont ajoutées jusqu'au ménisque de la suspension cellulaire. Le cassage est effectué par agitation au vortex durant 6 périodes de 20 secondes, entre lesquelles le tube est refroidit pendant 1 minute dans la glace. L'extrait cellulaire est récupéré à l'aide d'une seringue, 1% de SDS est ajouté, et l'ensemble est chauffé à 95°C pendant 5 minutes, avant d'être centrifugé à 1400g/4°C/15min. Les protéines de cet extrait sont dosées par la méthode de Bradford (Bradford M. M., 1976). Avant d'être déposés sur gel, les extraits sont repris dans du tampon de dénaturation 1 X (Tris/HCl 20mM pH 6.9, SDS 0.4%, glycérol 2%, bleu de bromophénol). Ils sont chauffés à nouveau 5 minutes à 95°C, puis centrifugés à 10000g pendant 5 minutes. Seul le surnageant est déposé sur gel.

### 2.7.3 Gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes.

Les protéines de levure sont séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes en présence de 8 % de SDS selon la technique "SDS-PAGE" décrite par Laemmli (Laemmli U. K., 1970). Les protéines migrent successivement à travers deux gels. Un premier gel d'alignement (ou de concentration), faiblement concentré en acrylamide (4%), permet de s'affranchir de la hauteur du puits de dépôt en concentrant les protéines à la limite du second gel. Le second gel dit de séparation est plus concentrée en acrylamide (8 ou 12%) et il permet de séparer les protéines selon leur taille.

#### Composition du tampon de dénaturation des protéines 5 X :

Tampon Tris-Hcl (pH6,8)	0,1M
Glycérol	10% (v/v)
SDS	2%
Bleu de bromophénol	0,05%

#### Composition du gel de concentration :

		/10ml
Mélange acrylamide/bisacrylamide, 40% (37,5 :1)	4%	1ml
Tampon Tris-Hcl, 1M (pH 6,8)	0,25M	2,5ml
SDS (20%)	0,1%	50µl
APS (10%)	0,05%	50µl
TEMED	0,05%	10µl
H2O		qsp 10ml

#### Composition du gel de séparation :

/20ml

Mélange acrylamide/bisacrylamide, 40% (37,5 :1)	12%	6ml
Tampon Tris-Hcl, 1,5 M(pH 8,8)	0,375M	2,5ml
SDS (20%)	0,1%	0,1ml
APS (10%)	0,05%	0,1ml
TEMED	0,05%	10 $\mu$ l
H2O		qsp 20ml

L'APS et le TEMED (N-N-N'-N'-tétraméthyléthyldiamine) sont ajoutés juste avant de couler les gels (polymérisation rapide).

La migration a lieu pendant 30 minutes à 70V dans le gel d'alignement, puis 2 heures à 100V à travers le gel de séparation.

#### Composition du tampon de migration (5X) :

Tris base pH 8,3	15,1g
Glycine	74g
SDS 20%	25ml
H2O	qsp 1 l

#### Composition du tampon de transfert :

Tris base pH 8,3	3g
Glycine	14,4 g
Méthanol	200 ml
H2O	qsp 1 l

Les marqueurs de taille moléculaire utilisés au cours de cette étude sont le marqueur précoloré d'Invitrogen (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard) et le marqueur précoloré SDS-PAGE de BioLabs (P7708).

### **2.7.4 Migration et Coloration.**

Après migration, le gel peut être coloré (2h) dans une solution de bleu de Coomassie (acide acétique (10%), méthanol (30%) et de bleu de Coomasie (0,3%). La décoloration est réalisé par plusieurs lavage dans une solution d'acide acétique (10%) et éthanol (30%). Pour la coloration avec le bleu colloïdal, le kit Colloidal blue Staining de Invitogen a été utilisé. Après coloration, les gels sont traités 10 minutes dans une solution d'éthanol 70% / glycérol 3%, puis 15 minutes dans une solution de glycérol 3 % avant d'être séchés sous vide entre deux feuilles de cellophane (Sigma) pendant au moins 1 heure à 80°C.

### 2.7.5 Transfert sur membrane en milieu liquide.

Le gel est rincé dans de l'eau puis positionnée entre la membrane de nylon, deux couches de trois papiers Whateman et deux éponges, imbibées dans le tampon de transfert.

Le transfert est réalisé avec l'appareillage Minitrans Blot Module BIORAD, à 70V/4°C/1h. Après transfert, la membrane peut être colorée dans une solution de rouge Ponceau (rouge Ponceau, 0,1%, acide acétique 5%, v/v) pour vérifier que le transfert des protéines sur la membrane a été complet.

Les membranes sont des filtres de nitrocellulose HYBOND C (Amersham).

<u>Composition du tampon de transfert :</u>	Tris base	3g/l
	glycine	14g/l
	SDS	1g/l
	méthanol	10% (v/v)

### 2.7.6 Détection immunologique:

#### Anticorps anti-Prot-A

La présence de la protéine Prot-A de la double étiquette TAP-tag est réalisé avec des anticorps peroxydase –antiperoxydase complexe (PAP, Sigma P-2026) dilué à 1/500, la révélation est réalisé grâce à la solution révélatrice suivante :

- 2 ml d'une tablette 4C1N (4-chloro-1-naphtol, Sigma) dissoute dans 10 ml de méthanol.
- 10 ml d'une solution saline (pour 1Litre) : 7,5 g NaCl + 2,8 ml de triéthanolamine + 17 ml d'HCl 0,1 M
- 5 µl de peroxyde d'hydrogène à 30 %

#### Anticorps anti-Knr4 et anticorps anti-Slt2

Des anticorps anti-Knr4 ont été largement utilisés au cours de ce travail pour détecter la présence de la protéine Knr4. Il ont été préparés à partir de la protéine MBP-Knr4 excisée du gel SDS et injectés dans les lapins (Eurogentec Sa, Belgium) (Dagkessamanskaia *et coll.* 2001). Pour détecter la présence de Knr4 par Western blotting, la membrane de nylon est saturée pendant deux heures dans une solution de saturation. Elle est ensuite incubée avec l'anticorps primaire, anti KNR4-MBP dilué au 1:5000 pour une durée d'incubation de 4 heures. Ensuite, elle est lavée plusieurs fois avec du tampon de lavage. Elle est incubée avec l'anticorps secondaire, IgG anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline, dilué au 1/2000) pendant une heure. Elle est à nouveau lavé plusieurs fois avec du tampon de lavage. Toutes ces étapes ont lieu sous agitation à température ambiante. Enfin, le signal présent sur la membrane est révélé en présence d'un substrat chromogénique de la phosphatase alcaline (BCIP/NBT pour 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphate et NitroBlue Tetrazolium)

<u>Composition du tampon de lavage (TBS) :</u>	Tris-HCl	20mM
--	----------	------

<u>Composition de la solution de saturation :</u>	NaCl	150g/l
	TBS + Lait écrémé	

La détection de Slt2p est réalisée en utilisant des anticorps anti Slt2p polyclonaux (donné par l'équipe de Dr Maria Molina, Faculté de Pharmacie, Université de Complutense, Madrid).

## 2.8 Méthodes de séparation des protéines.

### 2.8.1 Gel filtration (ou chromatographie d'exclusion ou tamisage moléculaire).

La gel-filtration est une technique chromatographique qui permet de séparer des molécules, en fonction de leur taille moléculaire apparente. On utilise des granules de gel poreux, le diamètre des pores étant une caractéristique de chaque type de gel. Un mélange de solutés de masse moléculaire variable traverse une épaisseur donnée de gel : les grosses molécules, celles dont le diamètre est supérieur à celui des pores, sont exclues et sont éluées les premières, les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car leur migration est freinée en diffusant dans le gel. La séparation est donc réalisée par le fait que les solutés sont élués dans l'ordre inverse entre le volume d'éluion et le logarithme de la masse moléculaire.

Pour estimer la masse moléculaire apparente de la protéine native Knr4, 3 ml d'une extrait brut (32mg de protéines totales) ont été préparés à partir de la souche AR27. L'extrait cellulaire a été préparé dans le tampon K-HEPES (20mM K-HEPES pH 7.2, 250 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT et 1 mM phenylmethylfluoride). La séparation par exclusion des protéines a été réalisée dans une colonne Sephacril S-300 (HR, 60 cm x 2 cm) (Amersham Pharmacia). Cette colonne a été équilibrée par 5 volumes du même tampon. Des fractions de 3 ml ont été collectées, et l'activité protéique a été détectée par mesure de l'absorbance à 280 nm. Pour chaque fraction, un aliquot de 300µl a été prélevé et précipité par TCA/DOC. Après précipitation, le culot a été dilué dans 30µl de tampon SDS-PAGE Laemmli 1X (Sambrook J. et Gething M. J., 1989) et déposé sur le gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide à 8% s, après électrotransfert sur membrane de nitrocellulose Hybond N (Amersham), un Western-blot a ensuite été réalisé en utilisant des anticorps anti-Knr4. Un courbe d'étalonnage de l'exclusion par le colonne a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant un mélange des standards protéiques de 2.5 mg.ml<sup>-1</sup> (Thyroglobuline 750 kDa, catalase 211 kDa, Aldolase 158kDa, bovine albumine 68 kDa, ovalbumine 42kDa).

## 2.8.2 Gradient de saccharose.

La préparation de l'extrait cellulaire et les étapes de gradient de saccharose ont été effectuées suivant le protocole de (Sheu Y. J. *et coll.*, 1998). Deux litres de culture de levures ayant atteint une  $DO_{600} = 3$  sont centrifugés à 4800 rpm pendant 5 min et lavés une fois à l'eau distillée. Le culot de levure est resuspendu dans un tampon Kpi (20mM  $Na_2HPO_4$  pH7.2, 20mM NaCl, 1mM DTT, 1mM PMSF et 1 tablette de cocktail d'inhibiteur de protéase pour 10 ml de tampon). Les cellules sont cassées à 4°C en vortexant vigoureusement avec des billes de verre 4 fois/30 sec. Le culot est récupéré grâce après une première centrifugation à 4000 rpm pendant 5 minutes. Le culot est ensuite transféré dans un autre tube pour une deuxième centrifugation à 15000 rpm pendant 45 minutes. Le surnageant a été transférée dans un nouveau tube pour réaliser une centrifugation à 100,000 g pendant 1 heure à 4°C. 200µl (environ 4 mg de protéines totales) de l'extrait cellulaire ont été prélevés pour réaliser une séparation des protéines sur gradient de saccharose.

Le gradient de saccharose a été effectué selon la méthode décrite par (Sheu Y. J. *et coll.*, 1998). 4 ml de gradients linéaires de saccharose (5% à 20%) sont réalisés avec le même tampon utilisé pour la préparation de l'extrait cellulaire. 200µl de l'extrait obtenu ont été déposés sur le haut du gradient de saccharose et le tout est centrifugé pendant 20 heures à 4°C à 40,000g. 200µl d'un mélange des marqueurs de taille (5mg/ml de thyroglobuline (19.4S), 5mg/ml de catalase (11.3S), 5mg/ml d'aldolase (7.4S) et sérum albumine (4.4S)) sont utilisés comme marqueurs de sédimentation. 20 fractions de 175µl sont collectées à partir du haut du tube. Ces fractions sont précipitées par TCA/déoxycholate et elles sont analysées par un Western-blot en utilisant des anticorps anti-Knr4.

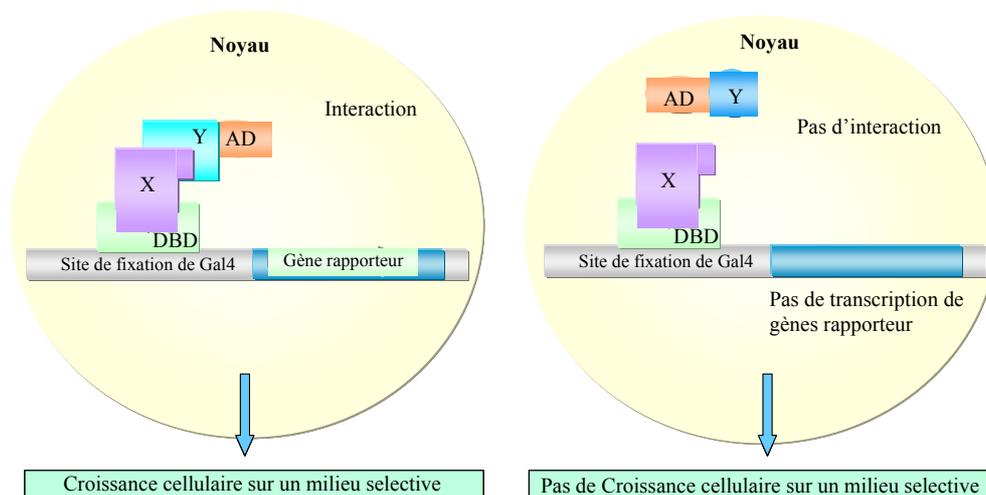
## 2.9 Méthodes utilisées pour identifier les interactions protéiques.

### 2.9.1 Système de double hybride.

#### 2.9.1.1 Principe.

Depuis son introduction, la méthode du double hybride est devenue un outil idéal dans les études des interactions protéine-protéine (Fields S. et Song O., 1989). Cette technique est maintenant bien établie, et ses défauts, en particulier en termes de faux positifs interactions sont mieux appréhendés. Le double hybride est une méthode génétique utilisant un caractère spécifique du facteur de transcription de la levure codé par *GAL4*. En général, un facteur de transcription est composé d'un domaine de liaison à l'ADN (BD) et d'un domaine d'activation (AD) qui active la transcription. La subtilité de cette méthode repose sur l'utilisation de ces deux domaines séparément. Une protéine X est fusionnée avec le domaine

de liaison à l'ADN (BD), et une autre protéine Y est fusionnée avec le domaine d'activation (AD). Ces deux protéines sont co-exprimées dans le noyau de la cellule de levure qui contient des gènes rapporteurs.



**Figure 13 : La principe de la méthode de double hybride.**

En cas d'interaction entre ces deux protéines, les deux domaines sont reconstitués, ce qui a pour conséquence d'activer l'expression des gènes rapporteurs. Sur les trois gènes rapporteurs utilisés, deux sont des marqueurs d'auxotrophie: *Ade2* et *His3*, qui vont donc, s'ils sont exprimés, permettre la croissance sur milieu sans adénine ou histidine. Le troisième gène rapporteur *LacZ*, qui permet de quantifier la force de l'interaction.

L'approche double-hybride présente plusieurs avantages :

- 1- Elle est indépendante du niveau d'expression naturel des protéines
- 2- C'est une approche *in vivo*

Elle permet de détecter facilement des interactions protéiques entre des protéines peu abondantes dans la cellule ou de détecter des interactions transitoires.

### 2.9.1.2 Criblage de double-hybride.

La souche de levure de double-hybride pJ69-4A (James P. *et coll.*, 1996) a été transformé par le plasmide pOBD-KNR4 qui exprime la protéine Knr4 fusionnée au domaine de fixation à l'ADN de la protéine Gal4p (voir section 2.1.2). Les cellules transformées ont été mises en croissance sur un milieu minimum  $\text{Trp}^-$  toute une nuit à 30°C. Après une mesure de la DO à 600 nm, la culture est diluée dans du milieu YPD frais à une  $\text{DO}_{600} = 0,25$  afin de relancer la croissance des cellules. Après une croissance à 30°C jusqu'à  $\text{DO}_{600} = 0,6$  (environ 4-6 heures), les cellules sont collectées par centrifugation. Les cellules sont ensuite

transformées avec une banque d'ADNg construite par fusion du domaine d'activation de transcription du gène *GAL4* avec des fragments génomiques de levure *S.cerevisiae* dans les trois cadres de lecture (pour représenter le maximum de gènes). Les cellules transformées sont mises en croissance sur milieu minimum Trp<sup>-</sup> et Leu<sup>-</sup>. Après trois jours de croissance à 30°C, les boîtes sont répliquées sur milieu Ade<sup>-</sup>. Tous les clones issus de ce milieu ont été sélectionnés pour une vérification phénotypique sur un milieu Ade<sup>+</sup> et His<sup>+</sup> en présence de 2 mM de 3-aminotriazole. Ces clones ont été également pour l'activité β-galactosidase. Les plasmides issus de ces clones positifs ont été isolés et retransformés dans la souche pJ67-4A pour confirmer l'interaction avec *GAL4BD-KNR4* après une croissance sur milieu *ade<sup>-</sup>* et sur un milieu *his<sup>-</sup>*. Les plasmides qui confèrent une croissance soutenue aux cellules transformées sur les milieux sélectifs ont été envoyés pour séquençage partiel (Genome Express, France). Des séquences complètes ont été récupérées en utilisant les banques des données YPD et SGD.

## 2.9.2 Tandem Affinity purification

### 2.9.2.1 Introduction.

Ces dernières années, la spectrométrie de masse est devenue un outil indispensable pour l'identification des protéines avec une sensibilité très importante (Wilm M. *et coll.*, 1996). Cette avancée a été exploitée pour analyser des mélanges de complexes protéiques (Shevchenko A. *et coll.*, 1996). De plus, il est devenu clair qu'une fraction des protéines totales cellulaires, pourraient être détectées grâce à cette stratégie (Gygi S. P. et Aebersold R., 2000). Etant donné sa sensibilité élevée, la spectrométrie de masse est bien adaptée pour l'identification des sous-unités des complexes protéiques et les partenaires protéiques interagissant entre eux. (Lamond A.I et Mann M., 1997).

Une stratégie de purification des protéines a été développée et elle est particulièrement bien adaptée pour la purification des complexes protéiques et d'identification des partenaires protéiques (interaction protéine-protéine). Cette stratégie a été appelé TAP (tandem affinity purification, Rigault et al, 1999). Cette méthode repose sur la fusion d'une cassette de TAP-tag comprenant deux domaines d'affinité ProtA et CBP (calmoduline binding protéine) séparés par un site de clivage par la protéase TEV avec la protéine d'intérêt. La protéine d'intérêt est produite à un niveau proche de son niveau naturel dans la levure. On obtient ainsi après deux étapes de purification sur colonne des complexes protéiques contenant la protéine d'intérêt avec les partenaires protéiques associés. Le matériel purifié sera ensuite fractionné sur un gel et les protéines co-purifiées sont identifiées par spectrométrie de masse (Figure 14).

## 2.9.2.2 Protocole.

### 2.9.2.2.1 Construction des cellules qui exprime la protéine TAP-tag.

Une souche de levure a été construite par intégration dans le génome d'une cassette comprenant le gène *KNR4* fusionné avec l'extrémité 3' du TAP-tag comprenant la double étiquette issue du plasmide pBS1539 (Puig O. *et coll.*, 2001). Dans ce but, un fragment de 400pb de la région non codante de *KNR4* a été amplifiée en utilisant deux oligonucléotides pR(1) et Pr(2). Le fragment amplifié a été cloné dans pBS1539 en aval du gène *URA3* de *K.lactis*. Un fragment de 4 kb contenant la région codant TAP-tag, gène *URA3* et la région non codante de *KNR4* a ensuite été amplifié en utilisant l'oligonucléotide Pr(1) et un autre oligonucléotide Pr(3), qui s'hybride sur l'extrémité 5' du TAP-tag. Cet oligonucléotide contient une queue flottante homologue à la partie 3' du gène *KNR4*, qui permet une recombinaison directe sur le locus *KNR4* dans le génome. Cette intégration de la cassette *KNR4*-TAP a été vérifiée par southern-blot et la présence de la protéine de fusion Knr4-TAP a été vérifiée en utilisant des anticorps anti-protA.

### 2.9.2.2.2 Culture et préparation de l'extrait,

#### I- Récolte des Cellules:

Une culture de 2 litres à 20 litres dans un fermenteur a été réalisée dans le milieu YPD jusqu'à  $DO_{600} = 3$ . La culture est ensuite centrifugée à 4500rpm/20min/4°C. Le culot est lavé 2 fois avec de l'eau froide. Il est soit congelé dans l'azote liquide, pour être conservé à -80°C, soit resuspendu dans le tampon A pour la préparation de l'extrait. Le volume des cellules récoltées (VCR) est mesuré avant d'être congelé dans l'azote liquide.

#### II- Préparation de l'extrait :

Pour un volume des cellules, un volume de tampon A est ajouté. A partir de cette étape, toutes les étapes suivantes sont réalisées à 4°C. Les cellules sont cassées par le dismembrator 3 fois 20Sec. L'extrait sera transféré dans un tube Falcon et 2M de KCl est ajouté à une concentration de 0,2M KCl final. (L'efficacité du cassage est mesuré sous microscope ). (Un volume de 0,5 ml de l'extrait est gardé pour mesurer la quantité de protéines présente dans l'extrait). On centrifuge l'extrait dans un tube (Ti50) déjà refroidi à 20,5Krpm/30min/4°C et le surnageant est transféré dans un nouveau tube. L'extrait est centrifugé de nouveau à 35000 rpm/1h30/4°C. Après cette étape de centrifugation, trois phases sont visibles dans le tube : une phase lipidique qui flotte au dessus, un culot de débris cellulaires au fond et une phase intermédiaire qui contient l'extrait protéique et qui sera

récupérée (la quantité des protéines est mesurée). Cette dernière est récupérée et dialysée avec le tampon D 3 à 5 h à 4°C. Après la dialyse, l'extrait est conservé avec 15 % de glycérol à – 80°C.

<b><u>Tampon A</u></b>		<b>100ml</b>
K-HEPES 1M	10mM	1ml
KCl 2M	10mM	0,5ml
MgCl <sub>2</sub> 1M	1,5mM	150µl
DTT 1M	0,5mM	50µl
PMSF 0,1M	0,5mM	500µl
Protéase inhibiteur		1 Tab/10ml
H <sub>2</sub> O		qsp 100ml

**Remarque :**

D'autres protocoles préconisent une suppression de l'étape de dialyse, nous avons réalisé des expériences en supprimant cette étape de dialyse (Puig O. *et coll.*, 2001).

### 2.9.2.2.3 Purification sur colonne d'affinité

#### I- Préparation des billes

200µl d'une suspension de billes IgG sépharose (PHARMACIA 17-0969-01) est prise pour la première étape de purification et les billes sont lavés avec 5ml du tampon IPP150. 200µl d'une suspension de billes calmoduline (STRATAGENE # 214303) est prise pour la deuxième étape de purification. Les billes sont lavées avec 5ml du tampon IPP150 CBB. Des petites colonnes ( Econocolumn, Bio-Rad) sont utilisées pour le lavage des billes et les étapes de purification.

<b>IPP150</b>		<b>100ml</b>
Tris-Cl pH 8,0 2M	10mM	0,5ml
NaCl 5M	150mM	3ml
NP40 10%	0,1%	1,0ml
H <sub>2</sub> O		qsp 100ml

<b><u>IPP150 CBB</u></b>		<b>100ml</b>
β-mercaptoethanol	10mM	69,7µl
Tris-Cl pH 8,0 2M	10mM	0,5ml
NaCl 5M	150mM	3ml

Mg-acetate 1M	1mM	100µl
Imidazole 1M	1mM	100µl
CaCl <sub>2</sub> 1M	2mM	200µl
NP40 10%	0,1%	1,0ml
H <sub>2</sub> O		qsp 100ml

### II- Fixation protéine A sur les billes IgG,

10 ml de l'extrait est transféré dans l'éconocolonne contenant les billes IgG lavées sur laquelle on ajoute : 50µl de Tris-Cl pH 8,0 à 2M (concentration finale 10mM), 200µl de NaCl 5M (concentration finale de 150mM) et 100µl de NP40 10% (finale 0,1%). Ensuite, la colonne est fermée et on la laisse tourner sur la roue pour 2 heures à 4°C

### III- Clivage TEV protéase

Le bouchon du haut est enlevé en première et celui du bas en second, le non retenu est récupéré par gravité, la colonne est lavée avec 30ml d'IPP150 puis avec 10ml de tampon de clivage TEV. Ensuite, la colonne sera fermée d'en bas et on la remplit avec 1ml de tampon de clivage et 100 unités d'enzyme TEV (Gibco). La colonne est fermée en haut et on la fait tourner sur la roue à 16°C. Deux heures plus tard, les bouchons du haut et du bas sont enlevés et l'éluat est récupéré par gravité. 200µl de tampon de clivage TEV est repassé pour récupérer le maximum des billes sur le côté de la colonne et le volume mort.

<b><u>Tampon de clivage</u></b>		100ml
Tris-Cl pH 8,0 2M	10mM	0,5ml
NaCl 5M	150mM	3ml
NP40 10%	0,1%	1,0ml
EDTA 0,5M	0,5mM	100µl
DTT 1M	1mM	
H <sub>2</sub> O		qsp 100ml

### X- Fixation CBP et élution sur les billes Calmodulin

Trois volumes de tampon de fixation à la calmoduline et 3µl de CaCl<sub>2</sub> 1M est ajouté à l'éluat de 1ml pour bloquer l'EDTA du tampon de clivage TEV. Le mélange est transféré dans une autre colonne contenant les billes calmoduline déjà lavées, on fait tourner pour 1 heure à 4°C. Le non retenu est récupéré par gravité. On lave avec 30 ml de tampon IPP150 CBB. Enfin, cinq fractions de l'éluat sont récupérées en ajoutant 200µl d'IPP150 CEB.

<b><u>IPP150 CEB</u></b>		100ml
$\beta$ -mercaptoethanol	10mM	69,7 $\mu$ l
Tris-Cl pH 8,0 2M	10mM	0,5ml
NaCl 5M	150mM	3ml
Mg-acetate 1M	1mM	100 $\mu$ l
Imidazole 1M	1mM	100 $\mu$ l
EGTA 0,5M	2mM	400 $\mu$ l
NP40 10%	0,1%	1,0ml
H2O		qsp 100ml

### **Précipitation des échantillons élués au TCA DOC**

- Pour un volume de protéine solution, ajouter deoxycholate de sodium (stock à 2%) au 1/100<sup>ème</sup>.
- Vortex et incuber dans la glace 30 min.
- Ajouter du TCA (stock à 100%) à 1/10<sup>ème</sup> vol.
- Vortex et incuber dans la glace sur la nuit.
- Centrifuger 15 min à 15000 rpm, enlever la surnageant et garder le culot.
- Laver 2 fois avec un volume de l'acétone froide (acétone a  $-20^{\circ}\text{C}$ ).
- Sécher le culot sur le paillasse ou speed vac.
- Pour l'analyse sur la gel de protéine SDS-PAGE, ajouter un volume minimum de tampon de charge 1X. chauffer les échantillons 10min à  $96^{\circ}\text{C}$ . Afin de séparer toutes les protéines, un gel SDS-PAGE 12% dans des conditions dénaturantes est réalisé. Le gel de protéines est conservé dans 1% acide acétique à  $4^{\circ}\text{C}$  pour les analyses par spectrométrie de masse. L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée à la plateforme protéomique de Toulouse.

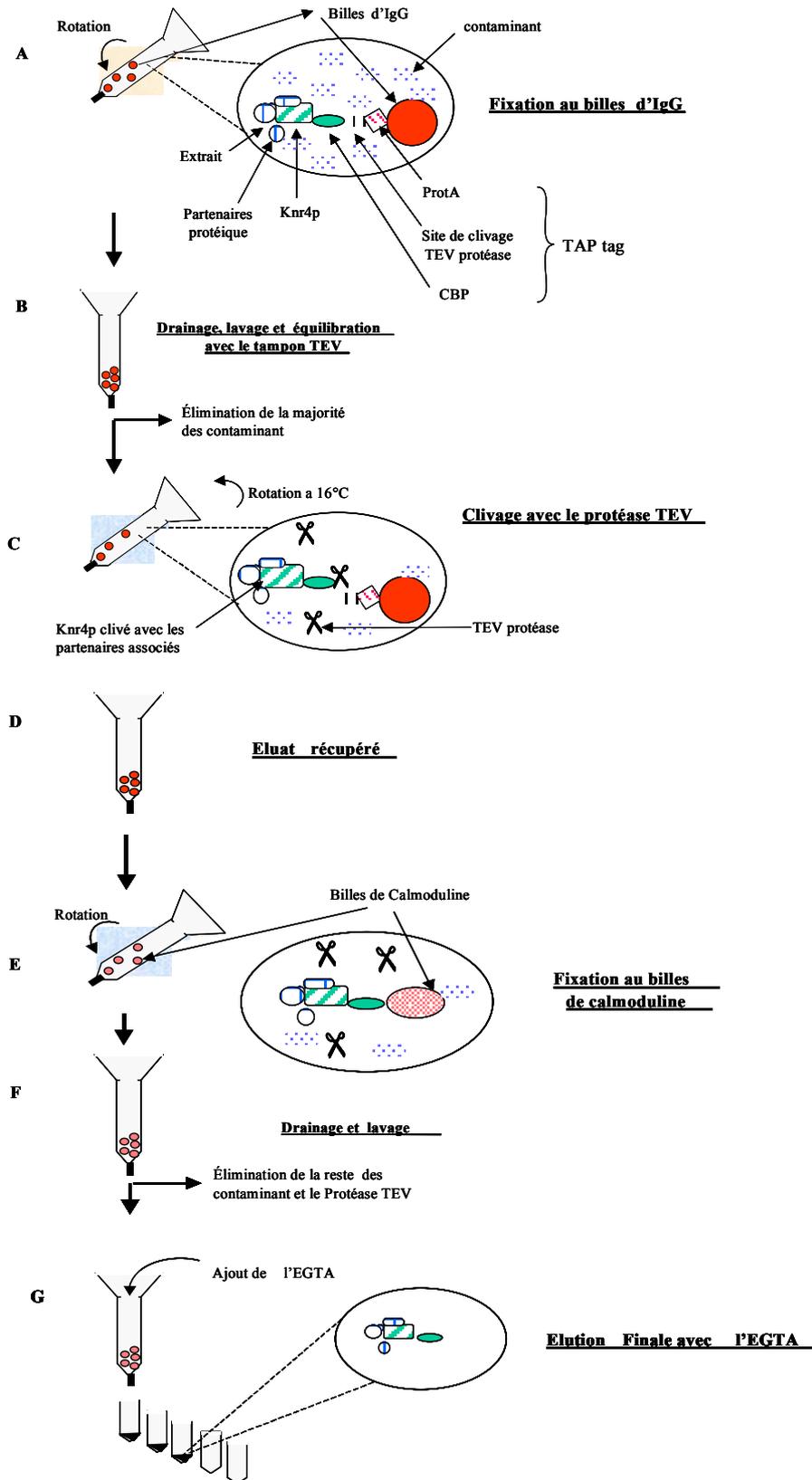


Figure 14 : schéma représentant les étapes du purification sur colonne par affinité (TAP-tag)

### **3 OBJECTIF DE LA THESE.**

Des études précédentes menées dans l'équipe de physiologie moléculaire des eucaryotes inférieurs du Pr J. François par Héléne Martin-Yken et coll (Martin H. *et coll.*, 1999; Martin-Yken H. *et coll.*, 2001) (Martin-Yken H. *et coll.*, 2002a) ont montré que la surproduction et la délétion de *KNR4* entraînent de fortes variations de la teneur en  $\beta$ -(1,3) glucanes et en chitine dans la paroi, ce qui indique clairement que le gène *KNR4* est impliqué dans le contrôle de la synthèse de la paroi chez *S. cerevisiae*. Le mécanisme par lequel la protéine intervient dans cette synthèse est à ce jour encore inconnu. Le but de cette étude est d'étudier la fonction de la protéine Knr4 et de mieux comprendre son rôle dans l'assemblage de la paroi.

La première partie de cette étude est consacrée à une analyse moléculaire préliminaire de Knr4. Cette partie s'attachera à étudier la stabilité de cette protéine dans des conditions de croissance et à estimer la masse moléculaire de Knr4 afin notamment d'apporter des indications que cette protéine peut faire partie d'un complexe protéique.

La deuxième partie de cette thèse, objet central de cette étude, est consacrée à l'identification des partenaires fonctionnels potentiels de Knr4. Pour atteindre cet objectif, trois méthodes de criblage complémentaires ont été mises en place. La première approche a été la technique génétique du double-hybride. La deuxième, a eu pour but d'identifier des mutations "synthétiques" létales avec la délétion de *KNR4*. Enfin, la troisième approche est celle de la recherche de complexes physiques qui peut être abordée par la méthode appelée "TAPtag" (Tandem Affinity Purification).

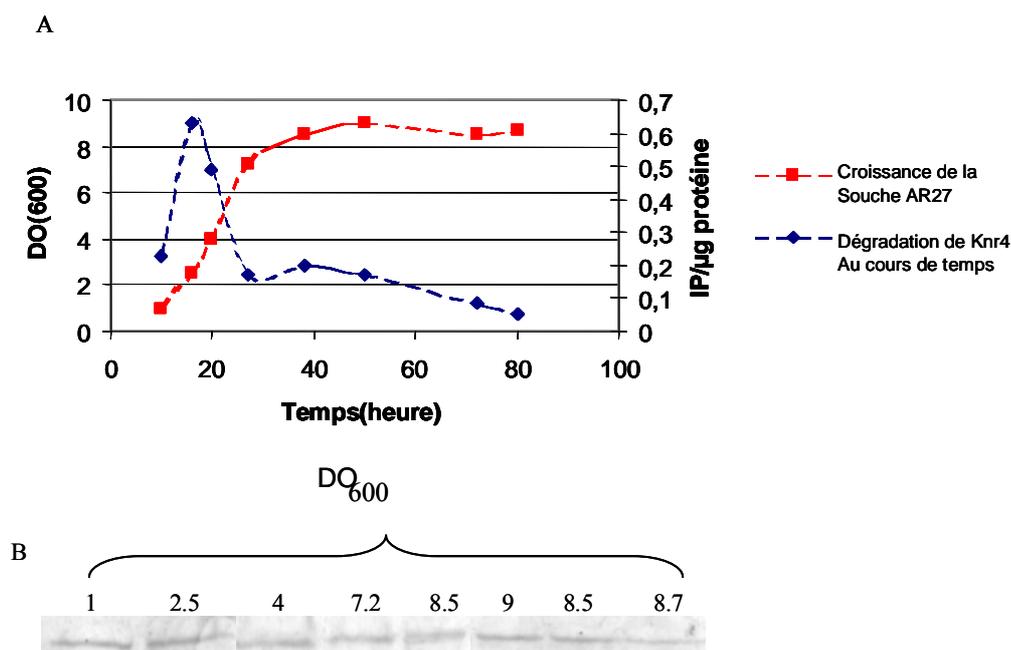
Dans la troisième partie nous avons tenté d'obtenir des indications supplémentaires sur la fonction de cette protéine en explorant les relations entre la fonction de Knr4 et sa structure moléculaire. Dans ce but, nous avons réalisé des délétions progressives de *KNR4* afin d'attribuer une fonction à ces domaines et de rechercher des régions spécifiques d'interaction avec les partenaires protéiques identifiés. Cette étude pourrait permettre de mieux comprendre la structure de la protéine Knr4, car à ce jour la structure tridimensionnelle de la protéine Knr4 est inconnue. De plus, il est impossible de la prévoir d'après sa séquence car elle n'appartient à aucune famille de protéines de structure connue. Enfin, la dernière partie de mon travail a été de vérifier le rôle physiologique des deux résidus de sérine identifiés sur la protéine Knr4 comme phosphorylés "*in-vivo*" par une technique globale de protéomique (Ficarro S. B. *et coll.*, 2002).

## 4 RESULTATS ET DISCUSSION.

### 4.1 Analyse moléculaire de la protéine Knr4.

#### 4.1.1 Relation protéine/transcrit de *KNR4* au cours de la croissance.

Le gène *KNR4* code pour une protéine soluble, présentant 5 domaines et de nombreux sites potentiels de phosphorylation par différentes kinases. Nous nous sommes donc intéressés à étudier la stabilité de Knr4 au cours de la croissance sur un milieu YPD. La souche AR27 a été utilisée lors de cette étude. Les cellules sont mises en croissance à 30°C toute une nuit. Après une mesure de la *DO*, la culture a été diluée dans 2 litres de milieu YPD pour obtenir une  $DO_{600} = 0.1$  afin de relancer la croissance des cellules. Au cours de la culture, des échantillons ont été prélevés en phase exponentielle et stationnaire de croissance, puis centrifugés à 4800rpm/4min/4°C et extraits comme décrits dans le Matériel & Méthodes.

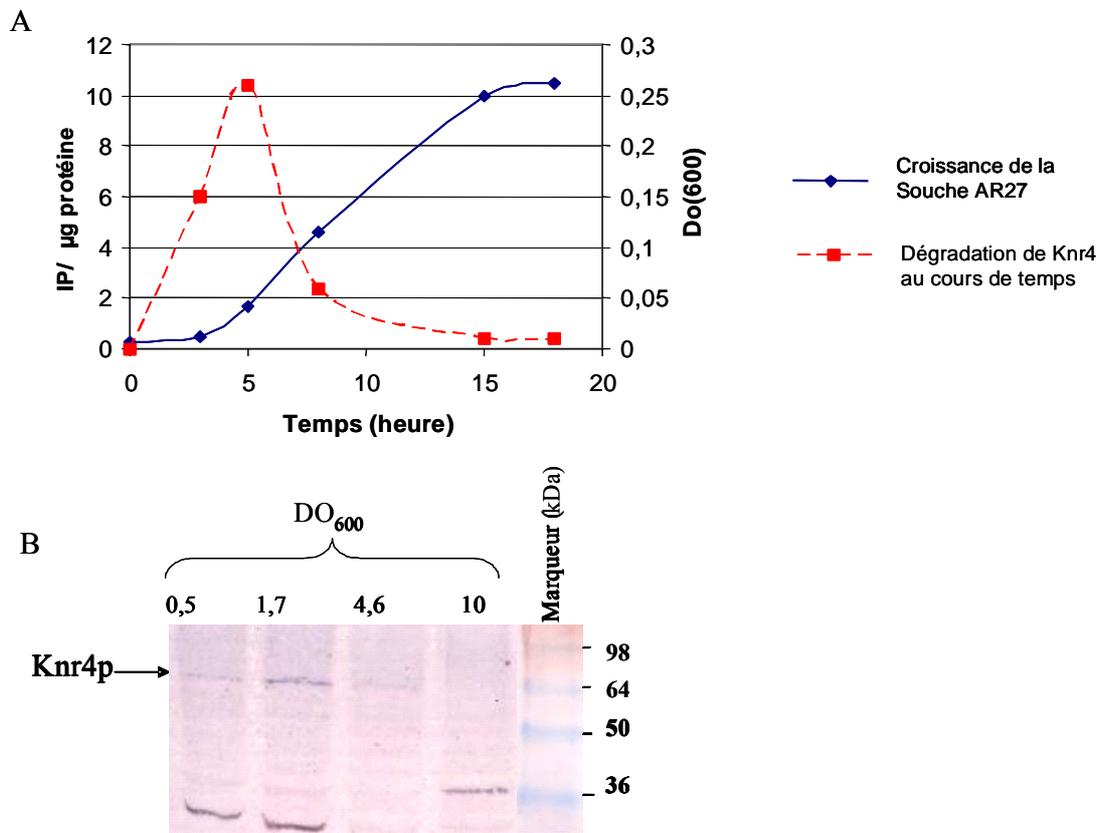


**Figure 15: Abondance de la protéine Knr4 au cours de la croissance (souche AR27). A- cinétique de croissance de la souche AR27 et cinétique de la dégradation de Knr4. B- western-blot réalisé sur des échantillons prélevés au cours de la croissance en utilisant des anticorps anti-Knr4, dilution 1/5000. (IP/µg est la quantité de protéines quantifiés par rapport à l'intensité des bandes mesurées).**

Un Western-blot a été réalisé et les signaux de la protéine Knr4 ont été détectés en utilisant des anticorps anti Knr4 (dilution 1/5000). L'intensité du signal de chacune des bandes

protéiques a été quantifiées avec le logiciel ImageQuant version 5.2 a donc été rapportée à la quantité de protéines totales déposée

Nous observons à figure 15 que Knr4 est faiblement abondante au début de la croissance sur le milieu YPD, mais qu'elle atteint un maximum au milieu de la phase exponentielle de croissance ( $DO_{600}$  de 2 à 4), pour ensuite diminuer de façon importante en début de phase stationnaire de croissance. Il est à noter que la protéine Knr4 migre dans ce gel dénaturant à une taille bien supérieure à celle estimée par la séquence en acides aminés (environ 80 kDa au lieu de 57 kDa). Nous reviendrons plus loin sur ce problème.

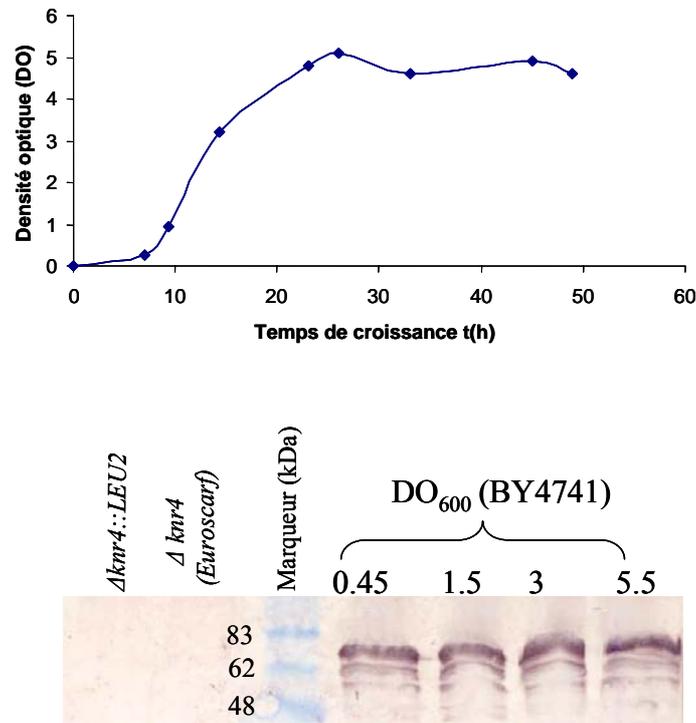


**Figure 16 : Abondance de la protéine Knr4 au cours de la croissance (AR27). A- Intensité relative de la protéine Knr4 exprimée par µg de protéine totale au cours de la croissance sur un milieu YPD. B- Abondance de Knr4 estimée par un Western-blot réalisé sur des échantillons prélevés au cours de la croissance en utilisant des anticorps anti-Knr4 (1/10000). La quantité de protéines a été dosée afin de déposer une quantité équivalente sur le gel et l'intensité des bandes détectées sur le gel a été quantifiée en utilisant le logiciel ImageQuant Version 5.2. (IP/µg est la quantité de protéines quantifiées par rapport à l'intensité des bandes mesurées).**

Nous avons répété cette expérience en utilisant un tampon d'extraction différent du premier tampon utilisé (100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.1% TritonX-100, 0.1% beta-mercaptoethanol (BME), 0.5 mM PMSF, 50mM TRIS pH 7.5). Les échantillons ont été

prélevés en phases exponentielle et stationnaire de croissance. Comme dans la première expérience réalisée, nous constatons que la quantité de Knr4 est très faible au début de la croissance sur le milieu YPD. Ensuite, cette expression est maximale à  $DO_{600} = 2$  (phase exponentielle) et Knr4 diminue et devient presque indétectable à une  $DO_{600}$  de 10 (phase stationnaire ; Figure 16)

Une troisième expérience a été réalisée en utilisant la souche BY4741 transformée par le plasmide multicopie pHM37 portant le gène *KNR4*, afin de mieux observer la stabilité de Knr4 au cours de la croissance. Une culture a été réalisée dans le milieu YNB sans uracile, des échantillons ont été prélevés au cours de la croissance et en parallèle un dosage des protéines a été effectué.



**Figure 17: Dégradation de la protéine Knr4 au cours de la croissance dans la souche BY4741 transformée par le plasmide multicopie pHM37. A- cinétique de croissance de la souche BY4741-pHM37. B- Western-blot réalisé sur des échantillons prélevés de la souche BY4741-pHM37, en utilisant les anticorps anti-Knr4.(1/5000).**

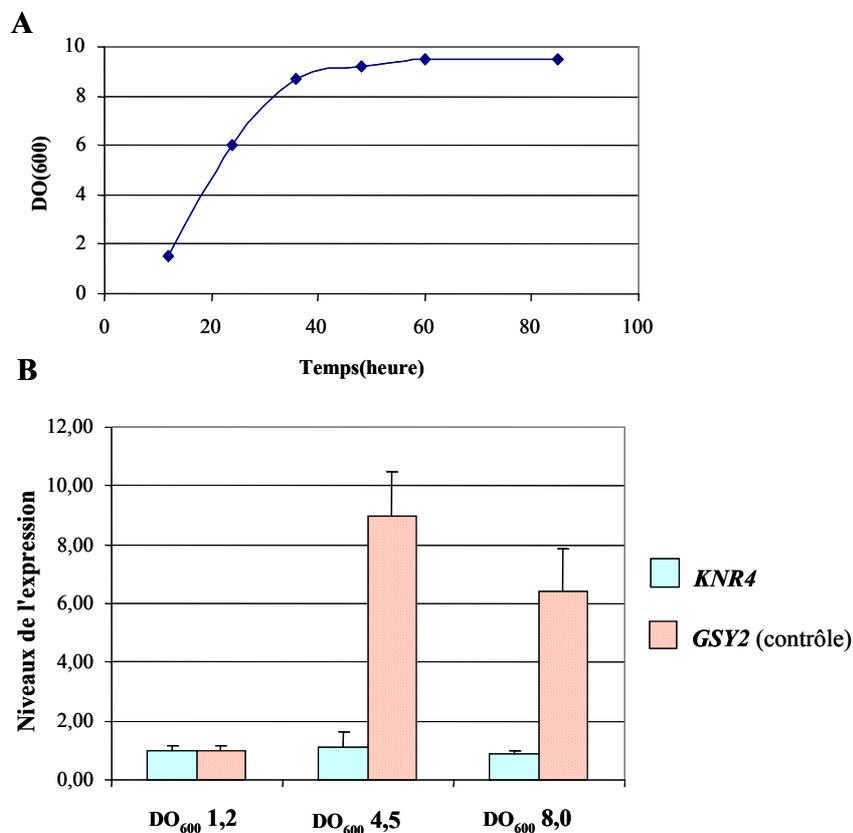
Un Western-blot a été réalisé en utilisant les anticorps anti-Knr4, les souches *knr4Δ::Kan2* (Euroscarf) et *knr4Δ::leu2* ont été utilisé comme contrôle négatif. Cette expérience révèle la présence d'une bande majoritaire qui migre à une taille proche de 80 kDa et des bandes mineures qui migrent aux alentours de 75 et 55 kDa. Ces bandes sont plus abondantes dans la

cellule pendant la phase exponentielle que pendant la phase stationnaire de croissance sur glucose. Par contre, aucune de ces bandes n'a été détectée dans les deux souches portant une délétion *knr4* (ces deux souches ont deux fonds génétiques différents), ce qui montre les 'bandes supplémentaires' proviennent de Knr4. Bien que non montré, nous avons vérifié que la quantité de KnR4 est plus faible à DO 5.0 que D0 0.45.

En conclusion, la protéine Knr4 montre une grande instabilité, du moins dans les cellules qui entrent en phase stationnaire. Nos résultats sont en accord avec des études précédentes qui ont indiqué (mais non montré) que cette Knr4 semblait absente en phase stationnaire (Hong Z. *et coll.*, 1994a).

#### 4.1.2 Quantification du niveau de l'expression de *KNR4* par une analyse utilisant l'approche de RT-PCR quantitative en temps réel (RT-Q-PCR).

Pour tester l'expression de *KNR4* au cours de la croissance et relier celle-ci à la quantité de protéine mesurée ci-dessus, nous avons effectué une RT-PCR quantitative en temps réel sur des échantillons prélevés aussi au cours de la croissance (exponentielle, diauxique et stationnaire). Nous avons utilisé le gène *GSY2* comme contrôle 'positif' d'induction et 4 gènes "de ménage": *ACT1*, *PDA1*, *RPN2* et *UBC6* ont été utilisé comme contrôle d'expression 'constitutive' au cours de la croissance (voir matériel et méthodes).



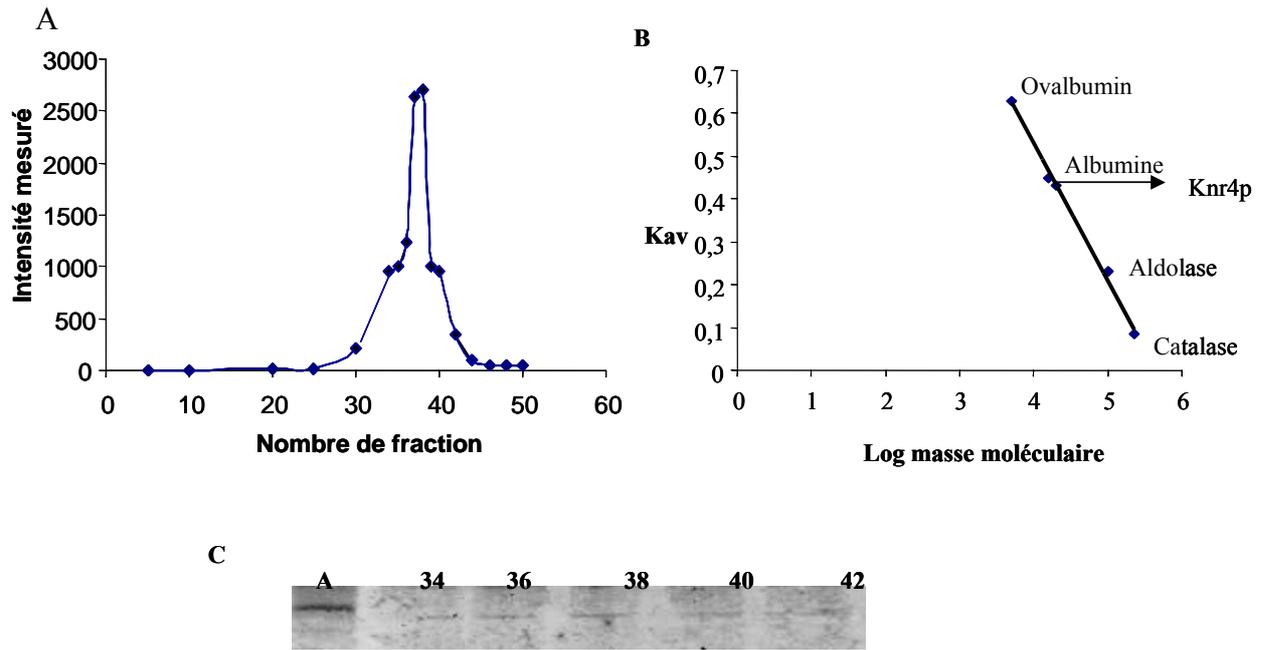
**Figure 18 : Quantification des ARNm de *KNR4* et *GSY2* par RT-PCR quantitative en temps réel**  
**A-** Croissance de la souche AR27 sur milieu YPD. Des échantillons ont été prélevés à  $DO_{600} = 1,2$ ,  $DO_{600} = 4,5$  et  $DO_{600} = 8,0$  pour les analyser par RT-Q-PCR. **B-** Le niveau de l'expression des gènes *KNR4* et *GSY2* (contrôle) a été quantifié par RT-Q-PCR par rapport aux niveaux des ARNm de quatre gènes de référence. Les résultats sont analysés par le logiciel geNorm.

Alors que le gène contrôle *GSY2* montre une induction importante en phase diauxique ( $DO_{600} = 4,5$ ) en accord avec des résultats déjà obtenus (Enjalbert B. *et coll.*, 2004), nous constatons que l'expression du gène *KNR4* reste relativement 'constante' au cours de la croissance. Par conséquent, nous pouvons conclure que la diminution de la quantité de protéine Knr4 en

phase stationnaire est essentiellement le résultat d'une dégradation de la protéine. Pour raisons de temps, nous n'avons pas été plus loin dans nos investigations sur le rôle potentiel des régions PEST ou du système Ubiquitine-Protéasome qui pourrait rendre compte de cette instabilité.

#### **4.1.3 Estimation de la masse moléculaire de la protéine Knr4 par l'approche de Chromatographie par filtration sur gel.**

En utilisant la chromatographie de filtration nous souhaitons estimer la masse moléculaire de la protéine Knr4 et également déterminer si cette protéine est présente sous forme 'monomérique' ou multimérique. Pour cela, nous avons utilisé une colonne Sephacryl S-300 qui permet la séparation par exclusion des protéines dans une gamme comprise entre 50 et 300.000 Da. Nous avons déposé 3 ml d'un extrait brut (32mg de protéines totales) sur cette colonne (HR 60 cm x 2cm) équilibrée dans le tampon K-HEPES (20mM K-HEPES pH 7.2, 250 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT et 1 mM phénylméthylfluoride). Une courbe d'étalonnage de l'exclusion par la colonne a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant un mélange des standards protéiques de 2.5 mg.ml<sup>-1</sup> (Thyroglobuline 750 kDa, catalase 211 kDa, Aldolase 158kDa, albumine bovine 68 kDa, ovalbumine 42kDa). Des fractions de 3 ml ont été collectées, et la présence des protéines a été détectée par mesure de l'absorbance à 280 nm. Quarante fractions ont été précipitées et analysées sur un gel de protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), suivi d'un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose Hybond N (Amersham) pour identifier la présence de Knr4 par immunoblotting. Ce Western-blot montre que la protéine Knr4 se trouve dans les fractions 35-40, avec un maximum dans la fraction 37. Ces fractions présentent un volume d'élution  $V_e = 111\text{ml}$ . Le volume total de cette colonne  $V_t = 189\text{ml}$  et le volume "vide" qui représente l'espace qui se trouve à l'extérieur des granules, calculé par rapport au volume auquel le bleu dextrane est élué  $= 51\text{ml}$ .



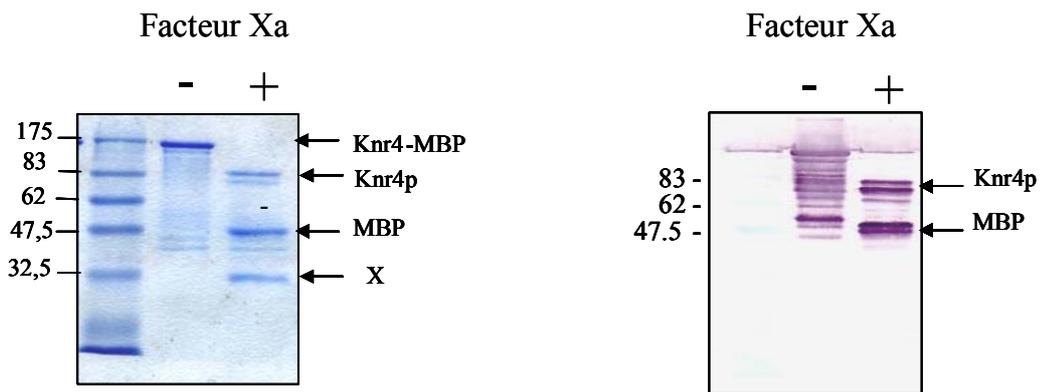
**Figure 19: Estimation de la masse moléculaire de Knr4. A- Profil de gel de filtration de Knr4. 75 fractions ont été collectées. B- courbe d'étalonnage pour la détermination de la masse moléculaire de la protéine Knr4 sur chromatographie de gel de filtration. C- Western-blot réalisé sur les fractions de la colonne (seules les fractions qui ont donné un signal sont présentées). L'intensité des bandes identifiées à été mesurée par le logiciel ImageQuant V 5.2. A= révélation de Knr4 dans l'extrait cellulaire de départ.**

Ces valeurs nous ont permis de calculer le coefficient de partition  $K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$ ,  $K_{av}(\text{Knr4}) = 0.43$ . D'après la courbe de calibration (Figure 19-B),  $K_{av}(Y) = -0.3184 \text{ MW}(X) + 1.8031$ , la masse moléculaire de la protéine Knr4 est de 75 Kda. Cette valeur est encore supérieure à la masse moléculaire attendue de 57 Kda, calculée à partir de la séquence protéique de Knr4. Cette différence pourrait indiquer que des modifications post-traductionnelles de cette protéine, du type glycosylation ou phosphorylation peuvent modifier la taille de cette protéine (voir discussion).

#### 4.1.4 Migration inhabituelle de la protéine Knr4 sur le gel SDS-PAGE.

Les résultats précédents indiquent que Knr4 est une protéine d'une mobilité surprenante sur le gel d'électrophorèse SDS-PAGE. En effet, le poids moléculaire prédit pour Knr4 d'après sa séquence protéique est de 57 kDa, alors que sa mobilité électrophorétique est d'environ 75 - 80 kDa (Fishel B. R. *et coll.*, 1993; Hong Z. *et coll.*, 1994a; Martin-Yken H. *et coll.*, 2003), nos résultats). Ce résultat nous a conduit à chercher les raisons pour lesquelles il existe une telle différence d'estimation de la masse moléculaire de Knr4. La protéine Knr4

pourrait donc être exposée à des modifications post-traductionnelles (glycosylations ou phosphorylations). Ces modifications sont attendues car Knr4 possède deux sites potentiels de N-glycosylation et 9 sites potentiels de phosphorylation par différentes protéines kinases (Hong Z. *et coll.*, 1994b), nos propres analyses "*in silico*"). Afin d'apporter plus d'explication, nous avons réalisé une expérience utilisant la protéine de fusion MBP-KNR4. Cette dernière a été exprimée dans *E.coli*. Un extrait cellulaire a été préparé à partir d'une culture de la souche d'*E.coli* BL21 transformée par le plasmide pMBP-KNR4, cultivée jusqu'à  $DO_{600} = 0,6$  dans 100 ml de milieu LB contenant 100  $\mu\text{g/ml}$  d'ampiciline. Après migration sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE, les protéines issues du lysat bactérien et ayant été au préalable purifiées sur résine d'amyose (qui retient MBP) ont été transférées sur membrane. D'une part, on a réalisé un western-blot utilisant des anticorps anti Knr4 sur une piste, alors que sur l'autre, on a excisé la bande pour la soumettre à analyse par spectrométrie de masse.

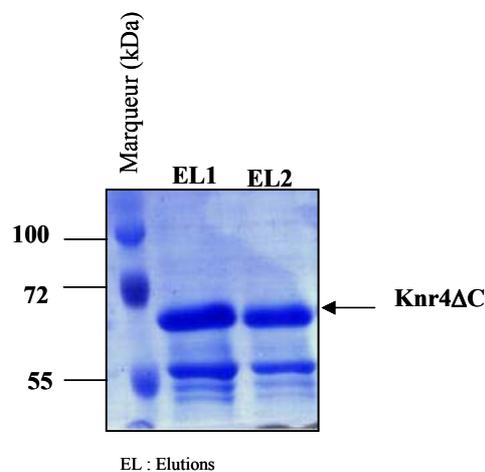


**Figure 20 : Analyse de la protéine de fusion MBP-Knr4 exprimée dans *E.coli* BL21. Après 4 heures d'induction par 0,5mM d'IPTG, les cellules sont récoltées et lysées par la suite. Un gel de protéine 8% a été réalisé sur une partie du lysat cellulaire non-traité (-) par le facteur Xa, et une autre partie traité (+). A- Gel de protéine SDS-PAGE (12%) coloré par le bleu de coomassie. B- Western-blot utilisant des anticorps anti-Knr4, dilution 1/5000. Une bande correspondant à la MBP a été identifiée par les anticorps, car ces anticorps ont été réalisés à partir de la fusion Knr4-MBP.**

Nous constatons (Fig 20), que la mobilité électrophorétique de MBP-Knr4 est  $> 120$  et que celle de Knr4 obtenu après incubation de l'extrait protéique avec le facteur Xa qui clive au niveau du lien entre MBP et Knr4 est d'environ 85 kDa. Ce poids moléculaire obtenu est en désaccord avec le poids moléculaire théorique de cette protéine (57kDa). En revanche, l'analyse menée par spectrométrie de masse sur MBP-KNR4 a montré que la bande purifiée d'après ce gel a une taille de 101 kDa. En sachant que la taille de MBP est de 42 kDa, celle calculée pour Knr4 serait donc de 59 kDa, soit très proche de la masse moléculaire réelle de

cette protéine. La bande supplémentaire qui migre à une taille de 32 kDa correspond en réalité au facteur Xa

Sachant que des protéines riches en acides aminés ‘acides’ peuvent montrer une mobilité électrophorétique anormale sur gel de protéines SDS-PAGE (Klenova E. M. *et coll.*, 1997), nous avons constaté que la séquence de Knr4 présente une forte proportion en acides aminés acides sur la partie C-terminal. Sur les 100 derniers acides aminés, Knr4 contient 27 résidus Glu. Nous avons donc cherché à vérifier si ce domaine C-terminal très acide était la cause de la mobilité électrophorétique anormale de Knr4.



**Figure 21 : La protéine mutée Knr4<sup>400aa</sup> migre avec une taille proche de 65kDa. La souche de bactérie BL21 transformée par le plasmide pFD6 (KNR4<sup>1-1188</sup>-HIS<sub>6</sub>) a été mise en croissance. L’expression de la protéine de fusion a été induite avec 1mM d’IPTG. Après la purification, un gel de protéine SDS-PAGE (12%) a été réalisé sur l’éluat obtenu.**

Nous avons donc effectué une délétion de 327pb dans la partie 3’ du gène *KNR4*. Le fragment de *KNR4*<sup>1-1188</sup> a été cloné dans un plasmide pET21 en phase avec le domaine HIS<sub>6</sub> pour obtenir le plasmide pFD6. La protéine de fusion a été induite chez *E. coli* par ajout de 1mM d’IPTG pendant 4 heures à 37°C. Après centrifugation, les cellules sont lysées par sonication et l’extrait est purifié sur résine Ni<sup>2+</sup> pour retenir la protéine HIS-Knr4ΔC. Celle-ci a été éluée de la résine par un tampon imidazole et déposée sur gel SDS-Page (Figure 21). Alors que la taille attendue de cette protéine Knr4ΔC est de 47kDa, nous pouvons observer que Knr4 tronquée migre à une masse apparente de 65kDa. Il semble donc que la région C-terminale de Knr4 riche en acides aminés acides ne soit pas la seule raison expliquant la différence entre la masse apparente et la masse moléculaire attendue de Knr4.

#### 4.1.5 Discussion.

La protéine Knr4 présente 5 domaines PEST qui pourrait être impliqués dans la dégradation des protéines. Nos analyses concernant la stabilité de Knr4 au cours de la croissance ont permis d'apporter des preuves quantitatives indiquant que Knr4 est soumis à une dégradation rapide à l'entrée des cellules en phase diauxique. Par contre, l'expression de *KNR4* n'a pas été modifiée d'une façon importante. Cette dégradation rapide de Knr4 en phase stationnaire serait en accord avec son rôle proposé dans la coordination entre la formation du bourgeon cellulaire et l'assemblage de la paroi cellulaire, puisque des cellules en phase stationnaire ne bourgeonnent plus. D'autre part, cette analyse a été importante pour connaître les conditions optimales de production de Knr4 en vue de rechercher ses partenaires protéiques de Knr4 par l'approche de TAP-tag.

Etant donné que cette mobilité aberrante est aussi observée pour la protéine exprimée dans les bactéries, la différence entre la masse théorique (57kDa) et la masse apparente (80 Kda) ne peut pas être expliquée uniquement par des modifications post-traductionnelles du type N glycosylation ou phosphorylations. En réalité, plusieurs arguments indiquent que Knr4 présente une conformation atypique, et que cette conformation est très stable dans les conditions dénaturantes SDS. L'analyse réalisée par gel filtration suggère que cette protéine migre en associant avec un partenaire, ou alors elle ne possède pas une structure intrinsèque globulaire habituelle. La première possibilité semble être exclue car les conditions extrêmement salines utilisées ont probablement éliminé les interactions protéiques. La seconde proposition semble devoir être retenue. Cette hypothèse est renforcée par l'analyse "*in silico*" de Knr4 avec le logiciel "GLOBE" disponible sur le site ([http://cubic.bioc.columbia.edu/papers/1999\\_globe/paper.html](http://cubic.bioc.columbia.edu/papers/1999_globe/paper.html)), qui prédit pour cette protéine une structure non-globulaire. De plus, le logiciel DisEMBL, (<http://dis.embl.de/>), qui estime la propension d'une protéine à présenter des structures organisées ou désorganisées, indique que la séquence de Knr4 du résidu 383 jusqu'à la partie C-terminale possède une structure secondaire désorganisée. Ces résultats ont été confirmés par une autre analyse "*in silico*", utilisant le logiciel NORSp, disponible sur le site ([http://cubic.bioc.columbia.edu/services/1999\\_globe/NORSp](http://cubic.bioc.columbia.edu/services/1999_globe/NORSp)), où une grande région NORSp (not helix nor sheet) a été identifiée dans la région C-terminale de Knr4.

Il est possible que cette structure atypique de Knr4 soit un avantage lui permettant de se lier avec un grand nombre de cibles. En effet, bien qu'il soit démontré que la structure 3D des protéines joue un rôle très important dans leur fonction, plusieurs études démontrent maintenant que des protéines ayant des structures secondaires et tertiaires désorganisées

acquièrent une conformation ordonnée suite à l'interaction avec des partenaires protéiques (Wright P. E. et Dyson H. J., 1999). C'est par exemple le cas de la liaison entre l'inhibiteur p21 de la cycline kinase humaine Cdk2 (Kriwacki R. W. *et coll.*, 1996). Ce manque de structure intrinsèque peut d'une part permettre à une protéine de se lier à un grand nombre de cibles et aussi d'être impliqué dans l'interaction entre plusieurs composants de la cellule. De plus, il a été montré que la structure atypique des protéines en font des cibles pour une dégradation rapide. (Wright P. E. et Dyson H. J., 1999). Il est intéressant de remarquer que Knr4 possède ces mêmes caractéristiques.

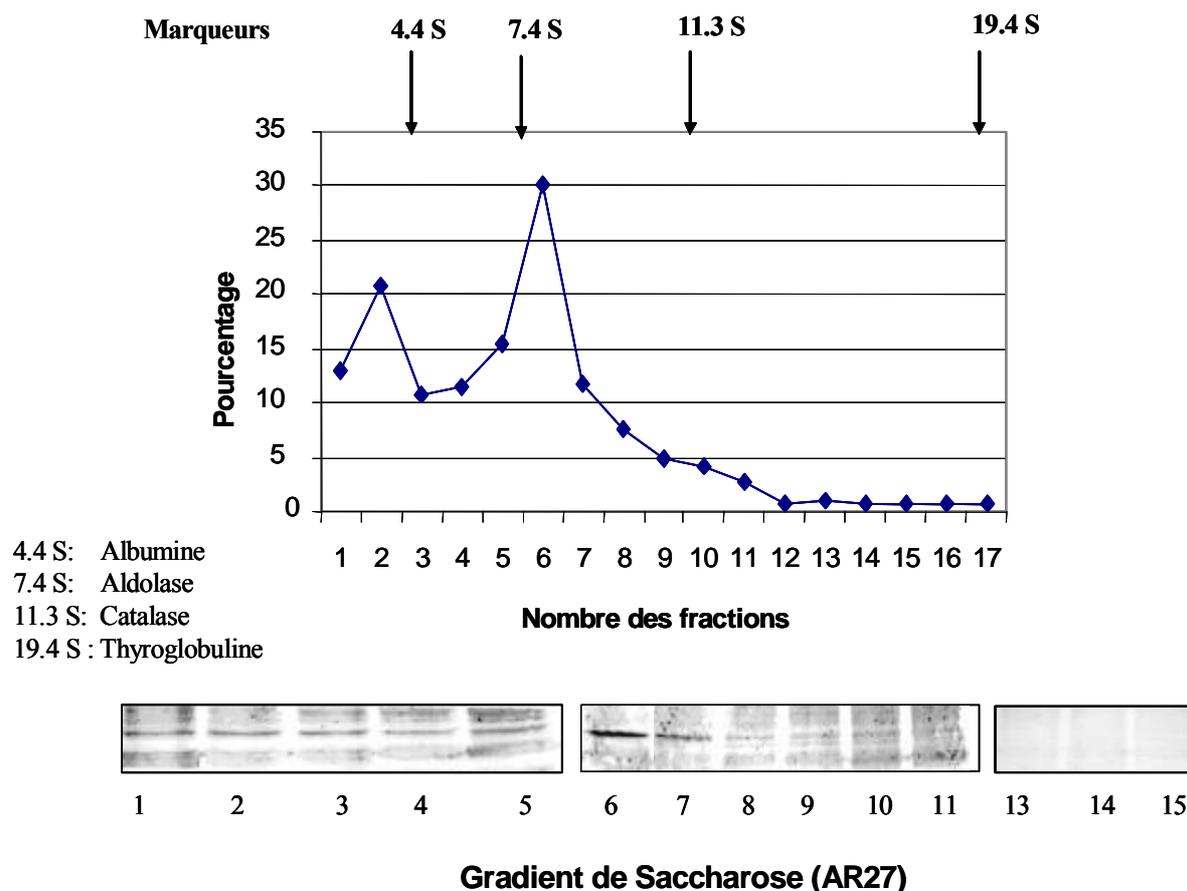
## 4.2 Recherche de partenaires fonctionnels de la protéine Knr4.

Il a été montré que la protéine Knr4 contrôlait l'expression des gènes de synthèse de la paroi, en particulier les chitine-synthases. De plus, la délétion de *KNR4* entraîne des phénotypes caractéristiques de mutants affectés dans la voie de la Pkc1p (défaut de croissance à 37°C, sensibilité accrue au blanc de Calcofluor et à la caféine). Le fait que la localisation de Knr4 soit non-nucléaire (cytoplasmique) (Martin H. *et coll.*, 1999) semble indiquer que la protéine Knr4 exerce ses effets par une interaction avec d'autres protéines. Afin d'établir une carte de l'interactome de Knr4 permettant une meilleure compréhension de la fonction de Knr4, nous avons mené une recherche des partenaires de Knr4 en utilisant trois méthodes différentes de criblages. **La première** approche est la technique génétique du double-hybride. **La deuxième**, avait pour but d'identifier des mutations "synthétiques" létales avec la délétion de *KNR4*. **La troisième** approche est celle d'une méthode appelée 'TAPtag' (Tandem Affinity Purification) basée sur l'affinité des protéines à Knr4.

### 4.2.1 Knr4 fait-elle partie d'un complexe protéique ?

Des approches de criblage à grande échelle (double-hybride et létalité synthétique) ont permis l'identification d'un grand spectre d'interaction génétique entre *KNR4* et des gènes impliqués dans différentes fonctions cellulaires, telles que la polarisation, l'organisation de la paroi cellulaire et la sporulation (Lesage G. *et coll.*, 2004; Uetz P. et Hughes R. E., 2000). Ces résultats suggèrent que Knr4 peut faire partie d'un complexe multi-protéique. D'une façon étonnante, l'expérience de gel de filtration que nous avons réalisée (voir section 3.1.3) ne semble pas supporter une telle hypothèse. Cependant, cette expérience a été réalisée dans des conditions de forces ioniques élevées, conditions qui pourraient détruire des complexes protéiques d'interactions faibles formés avec Knr4. Afin d'établir si oui ou non Knr4 fait partie d'un complexe protéique, nous avons réalisé une nouvelle expérience, utilisant la méthode de vitesse de sédimentation par ultracentrifugation dans un gradient de saccharose.

La souche de levure AR27 a été utilisée. Un extrait cellulaire a été préparé à partir de cette souche, les débris cellulaires ont été ensuite enlevés. Nous avons séparé le lysat obtenu sur un gradient de saccharose de 5 à 20%. Après une ultracentrifugation sur la nuit à 4°C/100.000g, les fractions ont été collectées et précipitées par le TCA-DOC. Un Western-blot a été réalisé sur toutes les fractions collectées pour révéler la présence de Knr4 après transfert du gel SDS-PAGE sur membrane (Fig. 22).



**Figure 22: Profil du gradient de saccharose de Knr4.** L'extrait cellulaire a été chargé sur un gradient de 5 à 20%, ensuite une centrifugation de 12h/100,000g a été réalisée. 18 fractions ont été collectées. Les protéines ont été analysées par Western-blot en utilisant des anticorps anti-Knr4 (dilution 1/5000). L'intensité des bandes identifiées sur la membrane a été quantifiée en utilisant le logiciel ImagQuant Ver5.2

Le logiciel ImagQuant Ver5.2 a été utilisé pour déterminer la densité des bandes détectées par les anticorps anti-Knr4. Comme le montre la figure 22, deux pics correspondant à la protéine Knr4 ont été identifiés. Le premier pic, minoritaire, se trouve dans un seuil entre 4,4-7,4S, ce qui correspond à une masse moléculaire apparente entre 70 et 80 kDa ; et correspond vraisemblablement à la forme monomérique de la protéine Knr4. De plus, une

quantité plus abondante de Knr4 a été également identifiée dans un autre pic correspondant à une masse moléculaire supérieure à 200 kDa. Ce dernier résultat est donc une indication de la présence de la protéine dans un complexe de haut poids moléculaire, en plus de la forme libre (monomérique) dans la cellule.

#### 4.2.2 Identification des partenaires de la protéine Knr4 par l'approche de double-hybride.

Le gène *KNR4* a été utilisé comme un appât après fusion de *KNR4* au domaine de liaison à l'ADN de *GAL4*. Une banque construite par fusion du domaine d'activation de la transcription du gène *GAL4* avec des fragments génomiques de *S.cerevisiae* dans les trois cadres de lecture (pour avoir le maximum de chances que les fragments insérés soient traduits) a été utilisée comme proie (James P. *et coll.*, 1996). La souche de levure de double-hybride pJ69-4A a été utilisée. Sur ses trois gènes rapporteurs possédant dans leur promoteur le motif de séquence qui lie le facteur de transcription *GAL4*, deux sont des marqueurs d'auxotrophie : *ADE2* et *HIS3*, qui vont donc, s'ils sont exprimés, permettre la croissance sur milieu sans adénine et histidine. Le 3<sup>ème</sup> gène rapporteur est *lacZ*, qui nous permet de quantifier la force de l'interaction (James P. *et coll.*, 1996). La souche pJ69-4A a été transformée par le plasmide pOBD-KNR4 (qui exprime la protéine Knr4 fusionnée avec le domaine de fixation à l'ADN de la protéine Gal4). Les cellules ont été ensuite transformées par la banque génomique où les fragments peptidiques exprimés possèdent le domaine d'activation de transcription de *GAL4*. Les cellules transformées sont mises en croissance sur milieu minimum Trp<sup>-</sup> et Leu<sup>-</sup>. Le gène *ADE2* étant le marqueur le plus sélectif pour cette souche, les boîtes ont été répliquées sur milieu ade<sup>-</sup>. Tous les clones issus de ce milieu ont été sélectionnés pour une vérification phénotypique sur un milieu ade<sup>-</sup> et his<sup>-</sup>. Ce crible nous a permis d'identifier 10 clones montrant une croissance efficace sur un milieu sans histidine ni adénine.

Pour déterminer la nature des gènes présents dans chaque clone détecté, les plasmides ont été isolés et séquencés. Trois de ces plasmides contenaient un fragment d'ADN correspondant au gène *TYS1*, qui code la tyrosyl-tRNA synthétase. Le gène *CIN5* a été identifié dans 4 autres plasmides, et il code une protéine de liaison à l'ADN du type bZIP (pour "basic leucin zipper", une famille de protéines regroupant plusieurs facteurs de transcription). Le gène *YMR262* codant une protéine de fonction inconnue a été également identifié trois fois. Nous avons quantifié la force de l'interaction entre Knr4 et les protéines identifiées en mesurant l'activité  $\beta$ -galactosidase

Souche pJ69 transformé avec les plasmides :	Croissance sur milieux		Activité $\beta$ -Galactosidase (nmol/mg. prtoéine, min)
	ADE <sup>-</sup>	HIS <sup>-</sup>	
pOBD80-KNR4+pGAD	-	-	11
pOBD80-KNR4+pGAD-TYS1	+	+	189
pOBD80+pGAD-TYS1	-	-	12
pOBD80-KNR4+pGAD-CIN5	+	+	24
pOBD80+pGAD-CIN5	-	-	10
pOBD80-KNR4+pGAD-YMR262	+	+	10
pOBD80+pGAD-YMR262	-	-	13
PSNF1(BD)+pGAD-SNF4	+	+	42

**Tableau 9: Croissance sur milieu ade<sup>-</sup> ou his<sup>-</sup> et activité  $\beta$ -Galactosidase résultante de l'interaction de Knr4 avec les trois protéines isolées par l'approche de double-hybride**

Nous observons que la protéine Tys1 présente une interaction très forte avec Knr4. Dans notre cas, cette interaction est par ailleurs 3 fois plus forte que celle obtenue dans le cas de l'interaction entre Snf1p-Snf4p utilisée comme contrôle positif. Par contre, l'activité  $\beta$ -galactosidase mesurée dans le cas de l'interaction entre la protéine Knr4 et les deux protéines, Cin5p et YMR262, est proche de l'activité mesurée dans le cas du plasmide vide. Du fait que Tys1 montre une interaction très forte avec Knr4, nous nous sommes intéressés à étudier la signification physiologique de cette interaction.

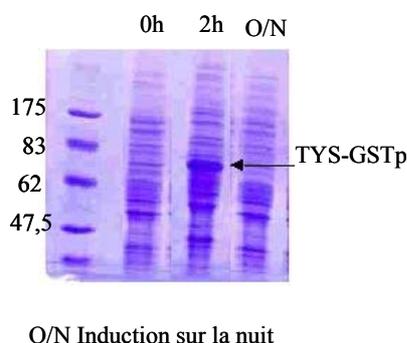
#### 4.2.2.1 Knr4 interagit physiquement avec Tys1.

Pour confirmer cette interaction (entre Knr4 et Tys1) observée "*in vivo*" par l'approche de double-hybride, nous avons réalisé une approche différente, permettant de détecter une interaction "*in vitro*" entre ces deux protéines. Les protéines Tys1 et Knr4 ont été exprimées chez *E. coli* sous forme de protéines de fusion (Tys1-GST et Knr4-MBP). La séquence codante de gène *TYS1* a été cloné en phase dans le plasmide pGEX qui contient le gène GST sous le contrôle du promoteur Ptac. Cette construction doit résulter en la production après induction à l'IPTG d'une protéine d'une taille de 75 Kda.

#### **Vérification de l'induction de la protéine de fusion GST-Tys1 dans la souche hôte BL21.**

La souche (BL21) recommandée pour l'expression de protéines de fusion, a été utilisée pour produire la protéine de fusion GST-Tys1. Les cellules d'*E. coli* de la souche BL21 transformée par le plasmide pGEX-TYS ont été cultivées une nuit dans 1 ml de milieu LB-AMP. Ensuite, la culture a été diluée dans 1.5 ml de milieu LB-Amp frais pour une DO<sub>600</sub> = 0,1.

L'expression de la protéine de fusion a été induite en ajoutant 0,1mM d'IPTG pendant 2-4 heures à 37°C. Une forte induction a été obtenue au bout de deux heures (Figure 23).

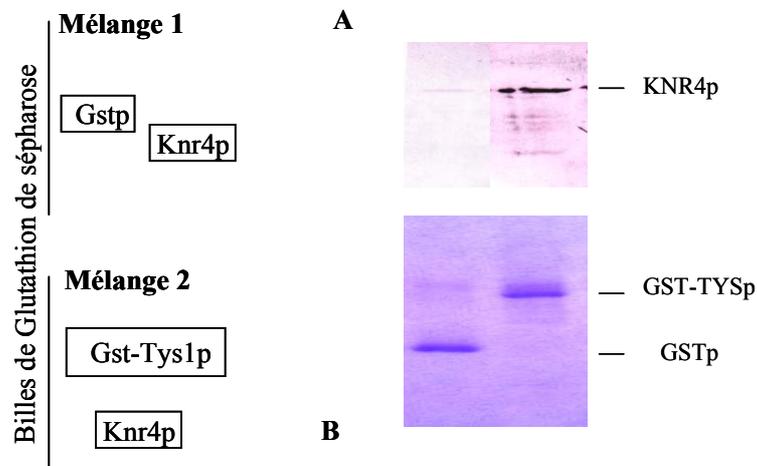


**Figure 23 : induction de la protéine de fusion GST-Tys1, une induction élevée a été obtenue au bout de 2 heures.**

Afin de fixer les protéines sur le gel de Sépharose, celles-ci doivent être sous forme soluble. Dans un premier temps, nous avons suivi le protocole recommandé par le manuel de Pharmacia Biotech, mais nous avons constaté que cette méthode n'a pas été efficace pour solubiliser la protéine. Nous avons alors utilisé la méthode recommandée par Frangioni et Neel (1993). Celle-ci est basée sur l'utilisation de Sarcosyl à la place de Triton 100-X, comme agent de solubilisation. En utilisant cette méthode nous avons pu augmenter la quantité de la protéine soluble de façon satisfaisante pour nos tests d'immunoprécipitation.

#### 4.2.2.2 Mise en évidence de l'interaction physique entre les protéines Knr4 et Tys1.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des colonnes d'affinité en fixant sur la colonne de glutation Sépharose la protéine de fusion GST-Tys1. Un contrôle négatif a été réalisé en parallèle en fixant la protéine GST seule sur les billes. Ensuite, un extrait cellulaire contenant la protéine Knr4-MBP a été ajouté sur les billes portant d'une part la fusion GST-Tys1 et d'autre part la GST seule, et incubé une nuit à 4°C sous agitation. Après 6-8 lavages avec du tampon PBS, les complexes GST-Tys1+Knr4-MBP ont été élués grâce à un tampon d'éluion (HEPES 75mM pH 7,4, NaCl 150mM, EDTA 1mM), 3 fois/20µl. Afin de détecter si Knr4 interagit avec Tys1, un gel de d'électrophorèse SDS-polyacrylamide a été réalisé en conditions dénaturantes. La protéine Knr4 est ensuite révélée par "Western-blot" en utilisant des anticorps dirigés contre elle. Ce Western-blot a été réalisé sur l'éluat et sur les billes.



**Figure 24: Interaction physique entre Knr4 et Tys1 par une expérience de type "pull-down". Un gel de protéine SDS-PAGE (12%) a été réalisé. A- Visualisation de la protéine Knr4 après élution de la colonne d'affinité, les anticorps polyclonaux anti-Knr4 ont été utilisés. B- Gel de protéine SDS-PAGE réalisé sur les éluats contenant GST et la fusion GST-Tys1, le gel a été coloré par le bleu de coomassie.**

Comme le montre la figure 24, aucune bande correspondant à la protéine Knr4 n'a été détectée dans le cas de GST seule. Par contre, nous constatons que la bande de Knr4 révélée par les anticorps anti-MBP-Knr4 est très intense dans le cas de la présence de la fusion GST-Tys1 après élution, ce qui signifie que la protéine Knr4 a co-élué avec cette dernière, et a montré qu'une interaction '*in vitro*' entre Knr4 et Tys1 est bien réelle.

#### **4.2.2.3 La teneur en dityrosine dans les spores issues des diploïdes portant des mutations dans les gènes *TYS1* ou *KNR4* est fortement réduite.**

Quel peut être le rôle physiologique de cette interaction entre Knr4, une protéine impliquée dans la synthèse pariétale et Tys1, une tyrosyl aminoacyl-ARNt synthétase. En amont du processus de synthèse protéique chaque acide aminé est lié spécifiquement à un ARNt par une réaction catalysée par une aminoacyl-ARNt synthétase (AARS). L'acide aminé est ainsi activé pour son futur transfert à la chaîne peptidique naissante. De façon générale chez les eucaryotes, l'aminocyclation de l'ARNt se produit dans le noyau. Cette réaction est également importante pour l'export de l'ARNt dans le cytoplasme. Certaines mutations de l'aminocyclation de l'ARNt synthétase peuvent inhiber l'export de l'ARNt à l'extérieur du noyau (Ibba M. et Söll D., 2000; Lund E. et Dahlberg J. E., 1998; Sarkar S. *et coll.*, 1999).

La réaction générale des AARS est la suivante :



La Tyrosyl-ARNt synthétase catalyze l'amination de l'ARNt lors d'une réaction en deux étapes: Activation (eq1) puis Transfert (eq2) (Fersht A. R. et Leatherbarrow R. J., 1987; Ibbas M. et Söll D., 2000).



La Tyr-ARNt synthétase (Tys1) de *S.cerevisiae* est une protéine de 394 acides aminés et sa masse molaire est de 44,020 Kda (Beikirch et col., 1972, Plohl et col 1988). Le gène de la Tyr-ARNt synthétase de levure a été cloné par complément fonctionnelle chez un mutant d'*E.coli* déficient pour l'amination de Tyr-ARNt. L'alignement des séquences de Tyr-ARNt synthétase de différents organismes a montré que tous les acides aminés importants pour la fonction d'amination, sont hautement conservés et localisés dans la partie N-terminale de la protéine (Ming C. C. et RajBhandary L., 1993).

En condition végétative, la fonction de cette protéine est impliquée dans la fixation de la tyrosine sur l'ARNt correspondant pour produire le tyrosine-ARNt, lequel va être utilisé pour la synthèse protéique. Cette fonction est essentielle dans les cellules en croissance. Donc l'interaction avec Knr4 ne semble pas être un prérequis pour cette fonction en condition végétative car la délétion de *KNR4* n'est pas létale. Nous étions donc un peu surpris de trouver une interaction entre Knr4 et l'amination tRNA synthétase Tys1. Nous avons cherché à comprendre dans quel processus cellulaire, les deux protéines Tys1 et Knr4 pourraient être impliquées ensemble. Une analyse des données transcriptomiques au cours du processus de sporulation (Chu S. *et coll.*, 1998), a été réalisée, et cette analyse a montré que l'expression de *TYS1* est fortement activée au milieu de la sporulation, au début de la division méiotique, ce qui est également le cas de *KNR4*. Globalement, au cours de la sporulation, ces deux gènes présentent une régulation transcriptionnelle très similaire. De plus, *TYS1* est le seul gène codant une amino acyl ARNt synthétase présentant ce profil d'expression, et que l'on retrouve aussi pour les gènes *DIT1* et *DIT2*, qui codent deux enzymes clés de la synthèse de la dityrosine, un composant majeur de la paroi des spores (Briza P. *et coll.*, 1990a; Briza P. *et coll.*, 1994). Dit1p et Dit2p sont impliqués dans la formation de la couche externe de

dityrosine. Dans une première étape, Dit1 permet la synthèse d'un précurseur contenant une molécule de L-tyrosine. Dans une deuxième étape, deux molécules de précurseurs sont liées de manière covalente par l'intermédiaire de Dit2. La protéine Dit2, qui présente une homologie importante avec le cytochrome P-450s, pourrait se fixer à la membrane des spores et catalyser l'oxydation des résidus tyrosine, provoquant ainsi, de façon spore-spécifique, la formation de dityrosine par réaction peroxydative. La paroi des spores est différente de la paroi des cellules végétatives par sa structure et par sa composition chimique. Quatre couches sont visibles en microscopie électronique (Kreger-Van Rij N. J., 1978). Les deux couches les plus internes, sont constituées de mannanes et de glucanes. La couche suivante est constituée de glucosamine polymérisée à 95% sous forme de chitosane et à 5% sous forme de chitine. La couche la plus externe est composée de dityrosine, un polycation dont les interactions avec le polyanion chitosane pourraient être responsables de la résistance chimique et mécanique exceptionnelle de la paroi des spores (Briza P. *et coll.*, 1990b). De plus, la couche de chitosane est nécessaire à la déposition de celle de dityrosine, ce qui est cohérent avec l'hypothèse d'interactions très importantes entre ces deux composants (Pammer M. *et coll.*, 1992). Dans la couche externe, à l'extérieur du chitosane, une couche fine composée principalement de molécules de dityrosine est formée.

Du fait que Knr4 est impliqué dans l'assemblage de la paroi, la co-induction de ces deux gènes à la fin de la méiose soulève une possibilité que Knr4 et Tys1 peuvent participer ensemble dans la formation de la paroi des spores pendant la sporulation. Cependant, une difficulté expérimentale empêche l'estimation de ces besoins, car la délétion de *TYS1* est létale. Seules les souches diploïdes hétérozygotes portant une délétion dans le gène *TYS1* peuvent être utilisées pour étudier cette hypothèse.

Génotype	Dityrosine totale/10 <sup>8</sup> cellules (nmol)	DL-Tyrosine (DL/DL+LL-dityrosine)	% Efficacité de la sporulation (% spores/cellules totales)	Dityrosine totale /10 <sup>8</sup> asques
+/+	3.8	42	70	5.4
<i>Δknr4</i> <i>TYS1/TYS1</i> <i>KNR4</i>	2.9	39	70	4.1
<i>KNR4</i> <i>TYS1/KNR4</i> <i>Δtys1</i>	2.5	41	70	3.6
<i>Δknr4</i> <i>TYS1/Δknr4</i> <i>TYS1</i>	1.1	39	25	4.4

**Tableau 10: Teneur en dityrosine dans les spores chez les cellules diploïdes mutées pour *KNR4* et *TYS1***

Pourtant, nous constatons au tableau 10 que le niveau de dityrosine totale est diminué de 25 à 40% dans les spores formées par les souches diploïdes hétérozygotes portant une mutation

dans les gènes *TYS1* ou *KNR4*. Par contre, l'efficacité de sporulation de ces mutants est similaire à celle de la souche sauvage. Ces données sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle ces deux protéines sont impliquées dans la formation des couches de dityrosine. Du fait que Tys1 est capable de lier la L-tyrosine, cette protéine peut fonctionner dans les étapes initiales de la formation de dityrosine. Knr4 étant impliquée dans la synthèse de la chitine, son interaction avec Tys1 pourrait être un des éléments responsables du couplage entre la synthèse des deux composants majeurs de la paroi des spores, le chitosan (dérivé de chitine) et la dityrosine (voir discussion).

#### 4.2.2.4 Les protéines Knr4 et Tys1 sont-elles nécessaires pour une sporulation efficace ?

Comme le montre le tableau 10, les spores formées par la souche diploïde homozygote portant une mutation du *KNR4* contiennent des niveaux très réduits de dityrosine. De plus, l'efficacité de sporulation est significativement réduite dans la souche mutante  $\Delta knr4$  homozygote, ce qui indique que la présence de Knr4 est requise pour la formation des spores. Toutefois, cette relation ne semble pas causale, car des cellules incapables de produire la dityrosine n'a pas d'effet sur l'efficacité de la sporulation (Briza P. *et coll.*, 1990a). Néanmoins, nous avons cherché à savoir si *TYS1* peut affecter l'efficacité de sporulation. Pour cela, un mutant *tys1<sup>ts</sup>* sensible à la température a été utilisé (Sarkar S. *et coll.*, 1999). Une souche diploïde isogénique *tys1<sup>ts</sup>* a été créée en utilisant un plasmide portant le gène HO sous la dépendance du promoteur *GAL10*, dans la souche portant le mutant *tys1<sup>ts</sup>*, qui permet de changer le signe sexuel via une procédure d'induction en milieu galactose et donc de générer des diploïdes. La sporulation a été effectuée à 24°C. Comme dans la souche diploïde homozygote *knr4/knr4*, l'efficacité de sporulation dans la souche diploïde *tys1<sup>ts</sup>/tys1<sup>ts</sup>* est significativement diminuée par rapport à la souche diploïde contrôle. La déficience de sporulation de la souche diploïde *tys1<sup>ts</sup>/tys1<sup>ts</sup>* peut être restaurée après la transformation par un plasmide portant le gène *TYS1* sous le contrôle du promoteur *GAL10*, croissance sur un milieu galactose suivie par une sporulation sur un milieu K-acétate. D'une façon curieuse, nous avons remarqué que la plupart des asques obtenues dans ces conditions contiennent seulement deux spores. Une explication possible de ce phénomène est que la sur-expression du gène *TYS1* est toxique pour la cellule (Robert Martin, Strasbourg, communication personnelle).

Les résultats obtenus indiquent que les deux gènes *KNR4* et *TYS1* sont impliqués dans la production de dityrosine au cours de la formation des spores. Par contre, nous ne sommes

pas capables d'affirmer que l'interaction entre Knr4 et Tys1 est absolument nécessaire pour assumer cette fonction car nous ne pouvons pas travailler avec une souche diploïde homozygote pour les deux délétions.

#### 4.2.2.5 Discussion.

Les biais de la technique de double-hybride sont multiples. Tout d'abord, elle met en jeu des fusions protéiques susceptibles de modifier la structure et les propriétés des protéines cibles. De plus, les interactions menées en double hybride se déroulent dans le noyau, c'est à dire hors du compartiment cellulaire de beaucoup de protéines. Donc, certaines interactions ne seront pas mesurées car les protéines cibles n'auront pas pu être importées correctement dans le noyau (faux négatifs). Enfin, certaines interactions détectées peuvent être indirectes si elles font intervenir un troisième partenaire.

Lors de la formation du chitosane, il y a une induction simultanée de Knr4 et Tys1. Il est donc possible que ces protéines interagissent à ce moment là, pour d'une part, réprimer la synthèse de chitine et d'autre part activer la synthèse de dityrosine. Knr4 étant impliqué dans la synthèse de la chitine, son interaction avec Tys1 pourrait être un des éléments responsables du couplage entre la synthèse des deux composants majeurs de la paroi des spores, le chitosan (dérivé de chitine) et la dityrosine. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication (Dagkessamanskaia A. *et coll.*, 2001).

À côté de l'interaction Tys1-Knr4 que nous venons de caractériser et dont le rôle biologique reste à préciser, on peut aussi s'interroger sur celle entre Cin5p et Knr4. Sachant que Cin5 est un facteur de transcription, il est peut probable que cette interaction ait lieu '*in vivo*' dans le noyau mais plutôt dans le cytoplasme où se trouve essentiellement Knr4. Partant de ce postulat, nous pouvons alors donner une explication à l'observation que la surexpression de Knr4 provoque une diminution très forte de l'expression de trois gènes codant les sous-unités catalytiques des chitines synthases (*CHS1*, *CHS2* et *CHS3*) (Martin H. *et coll.*, 1999). En effet, très récemment, l'équipe Klis a montré que Cin5 est un régulateur positif de l'expression de ces gènes (Zakrzewska A. *et coll.*, 2005). Ainsi, un excès de Knr4 pourrait séquestrer Cin5 dans le cytoplasme.

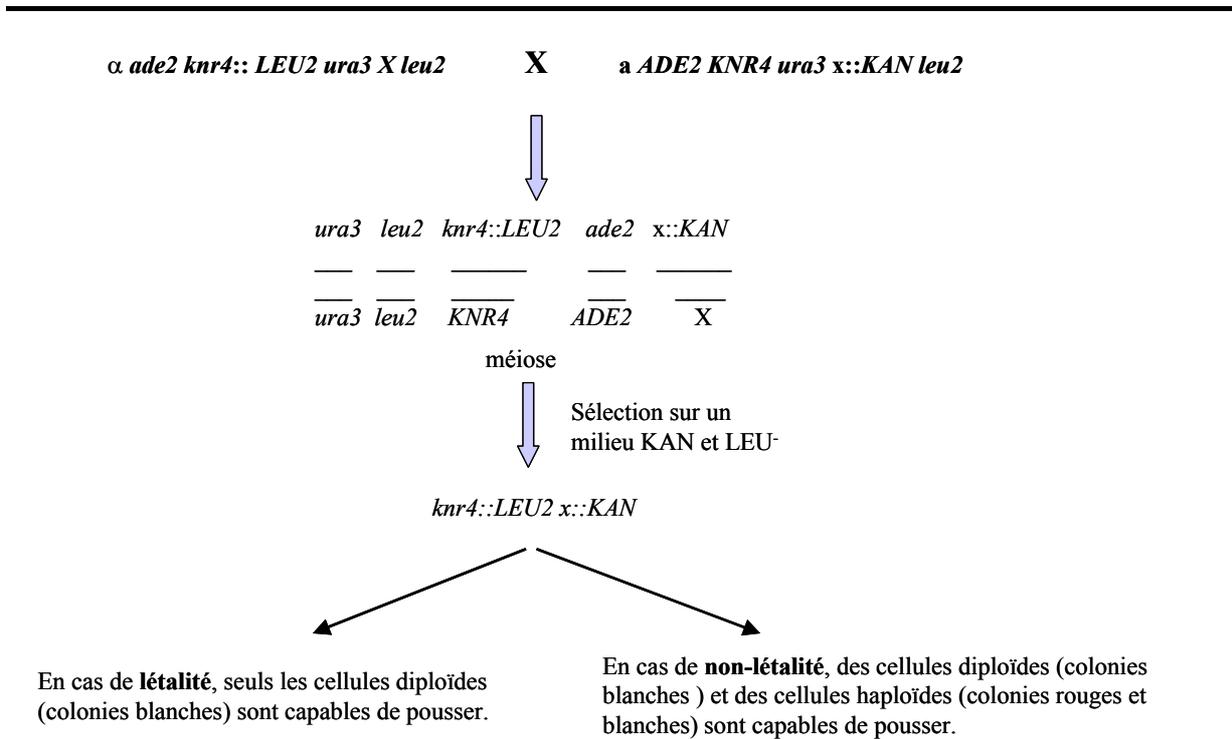
## 4.2.3 Recherche des gènes synthétiques létaux avec la délétion de *KNR4*.

### 4.2.3.1 Méthodologie.

Pour rechercher d'autres partenaires potentiels de la protéine Knr4, nous avons réalisé un crible de létalité synthétique (approche SL). Afin d'être le plus exhaustif possible dans cette approche, nous avons utilisé la collection 'Euroscarf' de mutants haploïdes (environ 4200 mutants disponibles lors de son achat en 2001) dans laquelle chacun des gènes de *S. cerevisiae* a été interrompu par l'insertion du gène KAN, qui donne dans la levure une résistance à la généticine G418.

Cette approche 'SL' est basée sur le fait que si deux protéines agissent ensemble dans un mécanisme essentiel, nous pouvons nous attendre à ce que la délétion simultanée de deux gènes correspondant ait un effet léthal. Les interactions synthétiques létales peuvent se produire soit entre deux gènes codant pour des protéines impliquées dans la même voie biochimique, (chacune d'elles ayant une action non essentielle dans cette voie), soit entre deux protéines impliquées dans deux voies biochimiques distinctes dans le cas où la fonction d'une protéine peut compenser la déficience de l'autre.

Afin de réaliser un criblage de la létalité synthétique pour le gène *KNR4*, nous avons construit la souche ( $\alpha$  *knr4::LEU2 trp1 ura3 leu2 ade2*). Cette souche a été croisée avec différentes souches de la collection EUROSCARF. Le phénotype de la mutation *ade2* (couleur rouge) permet donc par un criblage en masse (expliqué ci-dessous) de distinguer les colonies haploïdes des cellules diploïdes. Les cellules diploïdes ont été mises à sporuler, et nous nous sommes intéressés à chercher les ségregants haploïdes qui combinent simultanément une délétion *knr4* et une autre délétion (X) provenant de la souche EUROSCARF étudiée. La souche haploïde issue de ce croisement doit porter deux marqueurs *KAN* et *LEU*<sup>+</sup>, permettant ainsi la sélection sur un milieu *KAN*<sup>+</sup> et *leu*<sup>-</sup>. En cas de létalité synthétique, les clones haploïde portant les deux délétions ne peuvent pas pousser sur ce milieu sélectif *KAN*<sup>+</sup> et *leu*<sup>-</sup>. Après sporulation, les cellules diploïdes ayant sporulées sont incubées dans l'éther, ce traitement est censé tuer toutes les cellules diploïdes et aider à libérer les spores. Celles-ci sont ensuite étalées sur un milieu solide sélectif *KAN*<sup>+</sup> *LEU*<sup>+</sup>. Si aucun clone rouge est détecté sur ce milieu, alors notre candidat diploïde qui a donné naissance à ses spores sera retenu. Par contre, du fait que cette méthode ne permet pas de se débarrasser de tous les diploïdes, on s'attend à trouver des colonies blanches sur la boîte sélective.



**Figure 25: Schéma représentant la méthodologie utilisée pour réaliser la recherche des gènes synthétiques létaux avec la délétion *knr4*.**

#### 4.2.3.2 Difficultés rencontrées.

En réalisant les premières expériences, nous nous sommes rendu compte que des colonies rouges poussent toujours y compris avec des délétions contrôles, connues comme létales avec la délétion *knr4*. Nous avons trouvé que certaines de ces colonies rouges sont des cellules diploïdes. Il est fort probable que ces diploïdes rouges ont été formés au cours de la sporulation sur acétate qui a libéré des haploïdes, lesquels ont donc pu se refusionner entre deux mating opposés

De plus, un article est apparu à cette période qui nous a contraint à arrêter cette approche (Lesage G. *et coll.*, 2004). Un criblage de létalité synthétique à grande échelle a été réalisé, les auteurs ont mis en place une approche de sélection qui ressemble à la notre, mais cette approche de sélection dépend strictement du type sexuel permettant une sélection stricte des colonies haploïdes. En effet, ils ont utilisé un marqueur de sélection *his* qui a été introduit sous le contrôle d'un promoteur MFA1pr-*HIS3*, qui ne s'exprime que dans les cellules haploïdes (Mat a). De cette manière, après la méiose, les auteurs ont été capables d'observer uniquement la croissance de cellules haploïdes, et ont pu éviter les problèmes de

contamination par des cellules diploïdes. Ce criblage a permis d'identifier près de 80 partenaires synthétiques létaux avec la délétion  $\Delta knr4$ . Ces gènes codent notamment des protéines impliquées dans le polarisome, le cycle cellulaire, et la synthèse de la paroi (voir partie discussion générale) (Lesage G. *et coll.*, 2004; Tong A. H. *et coll.*, 2001; Tong A. H. *et coll.*, 2004).

#### **4.2.4 Recherche des partenaires fonctionnels de la protéine Knr4 par l'approche du TAP-tag.**

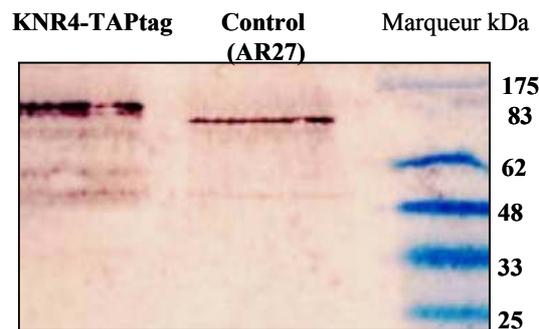
Une stratégie pour la purification des protéines a été développée qui est particulièrement bien placée pour isoler les complexes protéiques. Cette stratégie s'appelle "TAP" (tandem affinity purification, Rigault et coll, 1999). Elle conjugue les avantages de plusieurs méthodes de purification classiques à celle de la co-immunoprécipitation. Cependant, contrairement à la méthode de co-immunoprécipitation, le fait que la méthode TAP repose sur une purification en plusieurs étapes successives permettant en principe de réduire les contaminations par des protéines cellulaires abondantes ou par le matériel utilisé lors de la purification.

La méthode TAP-tag est constituée de deux étapes de purifications successives. Elle repose sur la fusion de la protéine d'intérêt (Knr4) à une cassette de TAP-tag comprenant deux domaines d'affinité ProtA et CBP (calmoduline binding protéine). La protéine Knr4 est produite proche de son niveau naturel dans la levure. Dans la première étape de purification la protéine d'intérêt (Knr4) est fixée sur des billes d'IgG par l'intermédiaire de la protA : cette fixation est très spécifique (Lohman T. M. *et coll.*, 1989). Un site de clivage par la protéase TEV qui se trouve entre les deux domaines d'affinité ProtA et CBP permet une élution spécifique et efficace dans des conditions d'élution douces. Ensuite, dans la deuxième étape de purification, la protéine va se fixer sur les billes de calmoduline en présence de calcium par l'intermédiaire du domaine CBP. Cette étape de purification est très importante car elle permet d'éliminer le maximum de contaminants et les traces de TEV protéase restant de la première étape de purification. L'élution est réalisée en présence d'EGTA qui permet la libération de la protéine d'intérêt avec ses partenaires associés. On obtient ainsi après ces deux étapes de purification sur colonne, un complexe protéique qui contient essentiellement la protéine d'intérêt et ses partenaires protéiques associés. Le matériel purifié est fractionné sur un gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide. Les bandes individuelles sont ensuite digérées par une protéase comme la trypsine. Le traitement est suivi par une analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) ou par tandem (MALDI-MS/MS). Les données obtenues sont

analysées en effectuant une recherche dans les bases de données sur le web pour identifier les protéines (Cho S. *et coll.*, 2004).

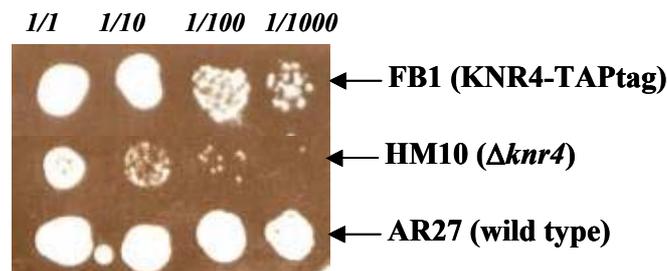
#### 4.2.4.1 Vérification de la construction KNR4-TAPtag.

Après intégration dans le génome d'une cassette comprenant le gène *KNR4* fusionné avec l'extrémité 3' du TAPtag comprenant la double étiquette, nous avons vérifié par Southern-blot que cette intégration était correcte ainsi que l'expression de la protéine Knr4- par un Western-blot en utilisant des anticorps anti-Knr4 (Figure 26).



**Figure 26: Knr4-TAPtag a une taille supérieure à celle de Knr4 (contrôle). Un gel de protéine (12%) SDS-PAGE a été réalisé suivi par un Western-blot réalisé avec des anticorps anti-Knr4.**

Nous pouvons constater que la taille de la cassette KNR4-TAPtag est de  $\approx 105$  Kda et celle-ci est supérieure à celle de la protéine Knr4 non tagguée qui ne porte pas la fusion et migre aux environs de 80 kDa (contrôle). Nous avons ensuite testé la fonctionnalité de la construction en réalisant un test de sensibilité au blanc de Calcofluor.



**Figure 27 : Test de sensibilité au blanc de Calcofluor (CFW) de la souche FB1 (*KNR4-TAPtag*). Le test a été réalisé sur un milieu YPD contenant 0,05mg/ml de CFW.**

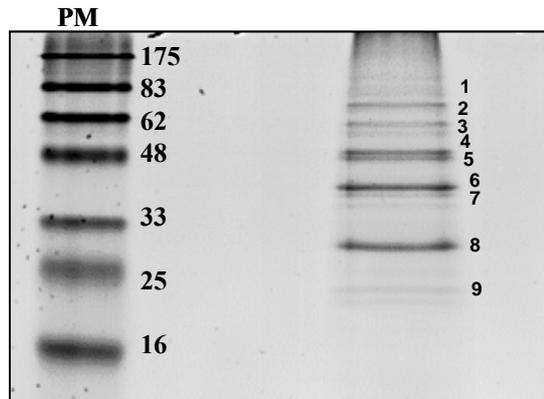
La sensibilité au blanc de Calcofluor de la souche obtenue FB1 (*KNR4-TAPtag*) est similaire à celle de la souche contrôle AR27 (*MAT $\alpha$  ura3-52*). Par contre, la souche HM10 (*AR27*

*knr4*: :KAN<sup>R</sup>) présente une hypersensibilité au blanc de Calcofluor. La protéine de fusion Knr4-TAPtag est donc fonctionnelle.

#### **4.2.4.2 Purification de la protéine Knr4-TAP sur colonne de chromatographie d'affinité et analyse des bandes par spectrométrie de masse MALDI-TOF.**

Nous avons réalisé une culture de 25 litres jusqu'à  $DO_{600} = 3$ . La culture a été récoltée par centrifugation et lavée avec de l'eau. Nous avons obtenu une quantité de cellules qui correspondait à 25 g en poids sec. Ensuite, les cellules ont été congelées dans de l'azote liquide sous forme de petites boules. Pour la préparation de l'extrait, un volume de cellules congelées correspondant à 1 g a été utilisé. Nous avons utilisé le tampon IPP150, dans lequel des tablettes d'inhibiteurs de protéases ont été ajoutées, ainsi que 1 % de TritonX100. Après cassage des cellules vérifié par microscope (Extrait brut EB1/10ml), l'extrait a été centrifugé dans un tube (Ti50) déjà refroidi à 20500 rpm/30min/4°C et le surnageant est transféré dans un nouveau tube a été centrifugé de nouveau à 35000rpm/1h30/4°C. Après cette étape de centrifugation, trois phases sont visibles dans le tube : une phase lipidique qui flotte au dessus, un culot de débris cellulaires au fond et une phase intermédiaire qui contient l'extrait protéique et qui sera récupérée. La quantité de protéines a été mesurée (Extrait brut EB2/5ml). L'étape de dialyse a été supprimée. L'extrait obtenu après la deuxième centrifugation a été concentré en utilisant des filtres (Amicon ultra 10,000 MWCO). Nous avons enchaîné directement les étapes de purification afin d'éviter la congélation de l'extrait et une éventuelle modification des protéines (comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes)

A la deuxième étape de purification sur une colonne contenant des billes de calmoduline, nous avons récupéré les fractions qui ont été précipitées par la méthode de TCA-DOC. Les protéines dans ce culot ont été resuspendues et séparées sur un gel de protéines. Ce gel de protéine (Figure 29) a été gardé dans l'acide acétique 1% à 4°C et envoyé à analyser par la plate-forme protéomique de Toulouse.



**Figure 28: Gel de protéines en conditions dénaturantes réalisé pour séparer les protéines copurifiées avec Knr4 après la purification sur la colonne de chromatographie d'affinité. Le gel a été coloré en présence de bleu colloïdal et les bandes les plus visibles ont été excisées, et après une digestion par la trypsine, les peptides sont analysés par MALDI-TOF.**

Les bandes les plus visibles sur le gel de protéines ont été excisées et analysées. La digestion des bandes en peptides est réalisée sur la nuit par la trypsine. L'analyse de tous les peptides a été effectuée par spectrométrie de masse MALDI-TOF-peptide Mass Fingerprinting pour (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*). Elle permet d'obtenir une carte peptidique massique représentant la distribution des masses des fragments peptidiques obtenus par digestion trypsique d'une protéine. Sa sensibilité de détection est très élevée (quelques femtomoles de peptides). Les échantillons de peptides sont mélangés avec une matrice et ionisés par pulse laser sans que les peptides soient détruits. Le ratio masse/charge ( $m/z$ ) de chaque échantillon ionisé est mesuré par un détecteur. Les valeurs ( $m/z$ ) recueillies sont analysées par une méthode appelée "masse fingerprinting peptide" (Henzel W. J. *et coll.*, 1993), qui permet l'identification de la protéine dans les bases de données disponibles sur plusieurs sites web. La protéine peut être identifiée en comparant la carte peptide massique obtenue expérimentalement aux cartes peptidiques massiques théoriques déduites de chacune des séquences présentes dans les banques de données protéiques (en effectuant une digestion "*in silico*" de chacune de ces protéines par la trypsine), ce qui permet de calculer un score qui représente la qualité de correspondance. Plusieurs logiciels existent actuellement, qui permettent de calculer un score en fonction de plusieurs facteurs (le nombre des peptides qui "collent" avec une protéine dans les bases de données, et le nombre de peptides observés, (Figeys D. *et coll.*, 2001).

**Rendement protéique au cours de cette expérience de purification :**

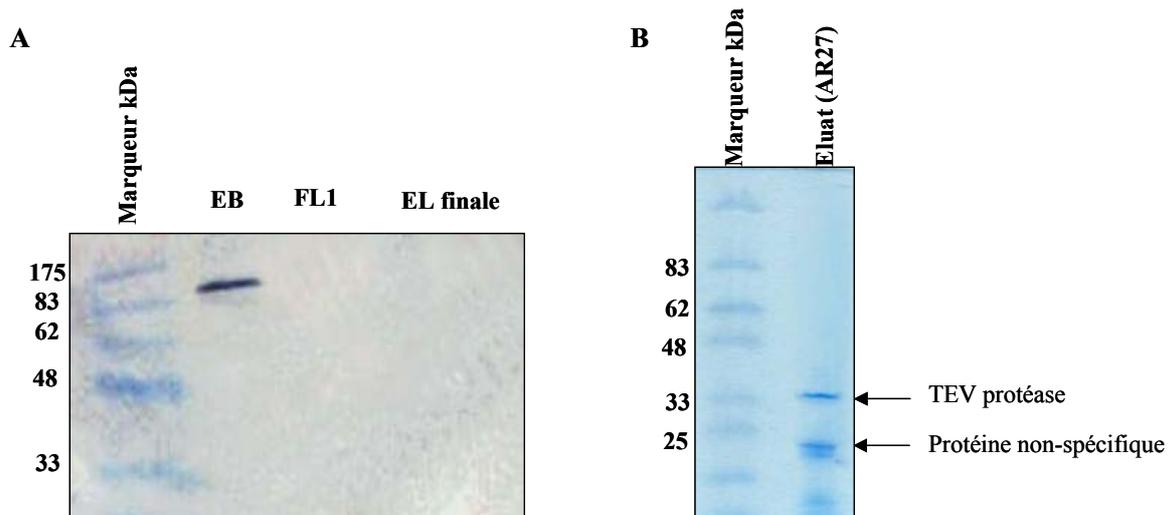
Afin de suivre les étapes de purification et de vérifier le rendement de cette purification, un bilan protéique a été établi sur les échantillons prélevés.

	Volume (ml)	quantité de protéines (mg)	Facteur de purification
Extrait brut après cassage des cellules (EB1)	10	150	100
Extrait brut après la deuxième étape de l'ultra centrifugation à 35000 rpm (EB2)	5	55	37
Protéines retenues après la 1ère étape de purification sur une colonne d'IgG. (calculé à partir de EB2- Eluat de cette chromatographie)	± 2	17,5	11,6
Protéines récupérées après lavage de la colonne	1	< 1	nd

**Tableau 11 : Rendement protéique estimé au cours de l'expérience de TAP-tag.**

Nous constatons d'après ce tableau 11 que nous avons récupéré près de 37 % de protéines dans la solution après l'étape de centrifugation. Après passage de ce surnageant sur la colonne contenant les billes d'IgG, environ 25 % des protéines totales sont récupérés dans la fraction non-retenue. Nous pouvons donc en déduire qu'avant lavage de la colonne, 12 % des protéines totales ont été fixées sur la résine. Enfin, à la suite de trois lavages successifs de la colonne, nous avons estimé que moins de 1 % des protéines totales ont été retenues, ce qui peut augurer d'une bonne 'purification' du complexe. Afin de vérifier les étapes de purification sur certains échantillons prélevés au cours de cette expérience, nous avons réalisé un Western-blot utilisant des anticorps anti-protéine A

A la figure 29-A, nous constatons qu'après l'étape d'extraction, l'extrait que nous obtenons est correct, il contient la construction KNR4-TAPtag (EB). Nous observons, après la première étape de purification (éluat obtenu après le clivage par la protéase TEV, FL1) et la deuxième étape de purification (éluat obtenu après élution de la colonne de Calmoduline, EL finale), que la partie ProtA qui sert à la fixation sur les billes d'IgG est bien clivée après la première étape de purification.



**Figure 29: Vérification des étapes de la purification TAP. A- Western-blot réalisé en utilisant des anticorps anti-ProtA pour vérifier d'une part la construction Knr4-TAPtag et d'autre part les étapes de purification après le clivage par la TEV protéase sur la colonne de chromatographie TAP-tag. B- Gel de protéines SDS-PAGE réalisé après une purification TAP sur la souche AR27 (wild type). L'éluat obtenu après la 2<sup>ème</sup> étape de purification sur la colonne contenant les billes de Calmoduline a été concentré par le TCA/DOC.**

Sur la Figure 29-B est montré une purification avec utilisant la souche sauvage AR27 qui transformée par la construction TAP-tag qui ne contient pas la protéine *KNR4*, afin de déduire de cette expérience les protéines qui ne sont pas spécifiques. La préparation de l'extrait cellulaire (AR27) et toutes les étapes de la purification ont été réalisées de la même manière que pour la souche contenant la construction *KNR4-TAPtag*. Nous constatons qu'une bande migrant à une taille proche de 30 kDa a été observée. Cette bande pourrait correspondre à la TEV protéase que nous ajoutons pour cliver les complexes protéiques qui théoriquement s'accrochent sur les billes d'IgG par l'intermédiaire de la partie ProtA. Une autre bande d'une taille proche de 23kDa a été identifiée (Figure 29-B). Ces résultats sont comparables à ce qui a été montré dans des expériences réalisées par d'autres équipes (Ohi M. D. *et coll.*, 2002; Yoon H. J. *et coll.*, 2002).

Nous avons analysé les 9 dans la figure 28 bandes isolées sur le gel SDS obtenue issue de la fraction éluée de la colonne Calmoduline. D'après le tableau 12, nous constatons que la plupart des protéines identifiées sont des protéines très abondantes dans les cellules, de type "chaperone" et glycolytiques. Bien que nous n'avons pas identifié ces protéines dans la purification de 'contrôle', elles sont sans doute considérées comme des contaminants car elles sont souvent isolées dans les procédures TAP (Dziembowski A. et Seraphin B., 2004; Gavin A. C. *et coll.*, 2002; Gould K. L. *et coll.*, 2004).

**Résultats des analyses effectuées par la spectrométrie de masse MALDI-TOF**

protéine	Fonction cellulaire ou Processus biologique	Localisation	Score	Nombre de molécules/cellule
Hsc82	protéine de choc thermique	Cytoplasme	8,59 <sup>e</sup> +008	132000
Ssa2p	protéine de choc thermique Protéine folding,	Cytoplasme	3,04 <sup>e</sup> +003	364000
Ssa1	protéine de choc thermique	Cytoplasme	3,04 <sup>e</sup> +003	269000
Pyk1	pyruvate Kinase/Glycolyse	Cytoplasme	2,27 <sup>e</sup> +003	291000
Adh1	Alcool déshydrogénase I/ glycolyse	Cytoplasme	1,79 <sup>e</sup> +004	Non-estimé
Tdh3	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase 3/glycolyse	Cytoplasme	2,5 <sup>e</sup> +005	169000
Pgm1	Phosphoglycérate mutase 1/ glycolyse	Cytoplasme	9,93 <sup>e</sup> +005	9820

**Tableau 12: Protéines identifiées après une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF.****4.2.4.3 Purification de la protéine Knr4-TAP sur colonne de chromatographie d'affinité et analyse des bandes identifiées sur le gel de protéine par spectrométrie de masse LC-MS/MS.**

Dans les cas où la recherche dans les bases de données de fingerprinting peptide est obscure en raison de la basse couverture des peptides, le séquençage des peptides en utilisant la spectrométrie de masse en tandem MS/MS est une étape supplémentaire indispensable pour identifier les protéines (Cho S. *et coll.*, 2004; Medzihradzky K. F. *et coll.*, 2000). La spectrométrie de masse en tandem MS/MS permet de sélectionner un à un les peptides provenant de la digestion trypsique de la protéine étudiée. Chaque peptide est alors fragmenté (par collision avec de l'argon) dans le spectromètre de masse. L'analyse des fragments (spectre MS/MS) permet de déterminer des éléments de la séquence en acides aminés du peptide, séquence qui sera utilisée pour chercher à identifier la protéine dans les banques protéiques et génomiques. Les éléments d'une séquence peptidique obtenus sont comparés avec les pics observés ; cette comparaison permet d'obtenir un score. Le score reflète la signification statistique du match entre le spectre MS/MS et les séquences dans les bases de données (Aebersold R. et Mann M., 2003).

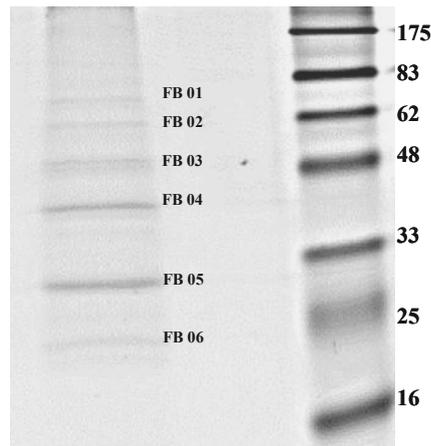
Les résultats que nous avons obtenus lors de la première analyse par MALDI-TOF n'ont pas été assez convaincants. Pour cela, nous avons répété l'expérience en utilisant le restant de la culture effectuée en fermenteur. Les protéines séparées sur le gel après la seconde chromatographie ont été par contre analysées par spectrométrie de masse LC-MS/MS. Pour la première expérience, nous avons utilisé environ 3 gr de cellules auxquels 10

ml de tampon IPP150 supplémenté par une tablette de protéase inhibiteur/10ml et 1% de Triton X100 ont été ajoutés. L'extrait protéique a été préparé de la même manière que ci-dessus. Ensuite, deux étapes de purification ont été réalisées comme décrit dans le chapitre Matériel et méthodes). Un bilan du rendement protéique a été réalisé sur tous les échantillons prélevés au cours de cette expérience.

	Volume (ml)	Quantité de protéines (mg)	Facteur de purification
Extrait brut après cassage des cellules (EB1)	20	360	100
Extrait brut après la deuxième étape de l'ultra centrifugation à 35000 rpm (EB2)	10	170,3	47,5
Protéines retenues après la 1 <sup>ère</sup> étape de purification sur une colonne d'IgG. (EB2- Eluat1)	1,5	7,3	2
Protéines récupérées après lavages de la colonne	1	nd	nd

**Tableau 13 : Bilan récapitulatif de protéines quantifiées au cours de l'expérience de TAPtag, de la préparation de l'extrait brut jusqu'à l'étape de lavages de la colonne d'IgG.**

Nous constatons d'après le tableau 13 que nous avons récupéré près de 47,5 % des protéines totales dans la solution après l'étape de centrifugation. Par contre, la quantité de protéines récupérées à la première étape de chromatographie n'a été que de 2,3 % des protéines par rapport à 12 % dans l'expérience précédente, ce qui pourrait être en faveur d'une meilleure 'purification' due à un meilleur lavage avant élution. Enfin, à la suite de trois lavages successifs de la seconde colonne, nous n'avons pas été en mesure de mesurer la quantité de protéines récupérées dans l'éluat, mais nous avons quand même procédé à un gel SDS-PAGE qui a été coloré au bleu colloïdal (il est 5 fois plus sensible que le bleu de coomassie). Les bandes colorées les plus visibles (au nombre de 6 dans ce cas) ont été excisées (Figure 31) et les polypeptides qui se trouvent dans ces bandes ont été soumis à une digestion par la trypsine. Tous les peptides obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse LC/MS-MS.



**Figure 30: Caractérisation du complexe TAP. Gel de protéines SDS/PAGE (12%) réalisé après une purification TAP-tag en deux étapes. L'éluat a été concentré par le TCA/DOC et le gel a été coloré par le bleu colloïdal. Les bandes sont excisées et analysées par LC-MS/MS**

**Protéines identifiées après analyse par spectrométrie de masse LC-MS/MS :**

Protéine	Fonction cellulaire ou processus biologique	Localisation	Score	Nombre de molécules/cellule
Hsc82	Protéine de choc thermique	cytoplasme	50.2	132000
Ssa2	Protéine de choc thermique/ Protéine folding,	cytoplasme	20.1	269000
Pyk1	Glycolyse, pyruvate kinase	cytoplasme	20.3	291000
Pdc1	Pyruvate décarboxylase isozyme 1	cytoplasme	20.2	2880
Tdh2	Glycéraldéhyde 3- phosphate déshydrogénase 2/ Glycolyse	cytoplasme	78.2	121000
Eno1p	Enolase 1 ( 2-phosphoglycérate déhydratase/ glycolyse	cytoplasme	30.2	76700
Ino4p	Biosynthèse de phospholipides	cytoplasme	20.1	521
Pgm1	Phosphoglycérate mutase 1	cytoplasme	90.2	

**Tableau 14 : Protéines considérées comme des contaminants identifiés après les analyses par spectrométrie de masse LC-MS/MS**

Comme le montrent les tableaux 14 et 15, les analyses par spectrométrie de masse en tandem MS/MS ont permis d'identifier un grand nombre de protéines. Des protéines ont été considérées comme non-spécifiques à cause de leur abondance dans la cellule, et du fait que ces protéines sont très souvent identifiées dans ce genre d'analyse. Par contre, des protéines impliquées dans la morphogénèse (Bud6 and Bem2), ainsi que des protéines de l'ubiquitine impliquées dans la dégradation rapide des protéines à courte durée de vie ont été identifiées.

De plus, la protéine Jnm1 impliquée dans le checkpoint de l'intégrité cellulaire a été identifiée, ainsi que la protéine Cin8, une protéine de type "kinésine like motor". Cette protéine contribue à la structuration et la fonction du fuseau mitotique. Contrairement à la première expérience, nous avons retrouvé la protéine Knr4 lors de cette expérience.

protéine	Fonction cellulaire ou processus biologique	Localisation	Score	Nombre de molécules/cellule
Knr4	Organisation et biogénèse de la paroi cellulaire	Cytoplasme/col du bourgeon	10.1	5680
Bud4	Sélection du site de bourgeonnement	Col du bourgeon	10.1	1600
Bud6	Polarisome cellulaire et émergence du bourgeon	Cytoplasme/col du bourgeon/périphérie cellulaire	10	2610
Cin8	Yeast kinesin-like protein, impliquée dans l'assemblage des fuseaux mitotiques	Complexe de kinesin/ Fuseau de microtubules	10.1	238
Jnm1	Organisation du fuseau mitotique et polarisation cellulaire	Cytoplasme/ spindle pole body	15	nd
Ulp1	Ubiquitin like specific protease/ transition G2/M	Membrane du noyau	18.1	377
Ubc9	Ubiquitin conjugating enzyme/ transition G2/M	Noyau	5	2600
Ubc1	Protéine du système de l'ubiquitine	Cytoplasme/ Complexe du protéasome 26S	12	8690
Bem2	Croissance du bourgeon/ organisation de la paroi cellulaire	Noyau/Cytoplasme	5	1230
Mkk1	MAP kinase kinase	col du bourgeon	10.4	10.4

**Tableau 15: partenaires protéiques potentiels co-purifiant avec Knr4 par le TAP-tag. Les protéines ont été identifiées par LC-MS/MS.**

Il est important de remarquer qu'un bas score des peptides n'est pas forcément signe d'une identification incorrecte. Une validation manuelle pour certains peptides est nécessaire, permettant d'identifier des protéines importantes (Steen H. et Mann M., 2004).

#### 4.2.4.4 Validation des résultats obtenus précédemment en réalisant une troisième expérience de purification par affinité.

Une troisième expérience a été réalisée pour confirmer les résultats obtenus. Nous avons utilisé un nouveau lot de cellules (environ 6 g) obtenu à partir de quatre litres de culture. Après cassage et une première centrifugation à basse vitesse (3000 g/ 5 min), une deuxième centrifugation de 45 min à 15000g a été réalisée au lieu de celle à haute vitesse utilisée antérieurement. Au cours de cette expérience des échantillons ont été prélevés et un bilan quantitatif des protéines a été établi. Nous avons aussi vérifié la présence de la protéine Knr4 au cours de cette expérience en réalisant un Western-blot avec l'anticorps anti Knr4.

	Volume (ml)	Quantité de protéines mg	Facteur de purification
Extrait brut après cassage des cellules (EB1)	67	1340	100 %
Extrait brut après une centrifugation à 15000 rpm/45min (EB2)	55	1036	77 %
Protéines retenues après la 1ère étape de purification sur une colonne d'IgG. (EB2- EL 1)	± 2	30	2,2 %
Protéines récupérées dans l'éluat	1	nd	nd

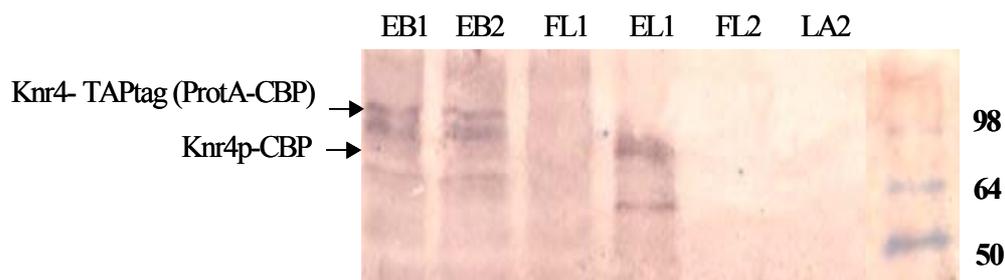
**Tableau 16 : Bilan des protéines quantifiées au cours de l'expérience de purification TAPtag.**

##### **Bilan des protéines au cours de cette purification :**

Comme indiqué au tableau 16, nous observons que 77% des protéines totales récupérées après l'étape de centrifugation 15000 rpm/45 min. Après dépôt de ce surnageant sur la colonne contenant les billes d'IgG, 98 % de protéines déposées sont passées dans le filtrat de lavage, et nous pouvons donc en déduire qu'avant élution de la colonne, environ 2% des protéines totales ont été retenues sur la résine de la colonne IGg. Enfin, la quantité de protéines récupérées à la dernière étape de chromatographie n'a pas été mesurée mais utilisée pour analyse par LC/MS/MS après séparation sur gel SDS-PAGE.

##### **4.2.4.4.1 Vérification de la présence de la protéine Knr4 au cours de la purification.**

Nous avons réalisé un Western-blot en utilisant des anticorps anti-Knr4 sur chaque échantillon prélevé au cours de cette expérience. Notre but était de bien vérifier que la protéine Knr4 est bien présente dans l'extrait brut avant la purification, et ensuite de vérifier que le clivage par la protéase TEV est correct (Figure 31).

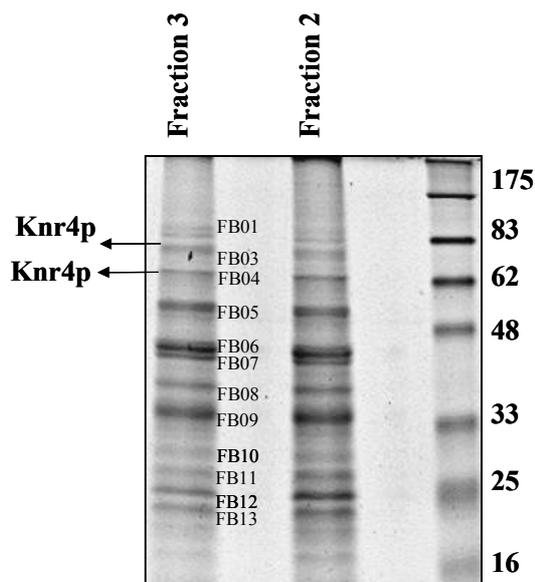


**Figure 31: Western-blot réalisé sur différents échantillons prélevés lors de la purification de KNR4-TAP. Des échantillons au cours de l'étape d'extraction ont été prélevés ainsi qu'au cours de la purification. Des anticorps anti-Knr4 ont été utilisés (dilution 1/4000).** EB1: extrait brut, EB2: Extrait brut, FL1: Protéines non-retenues après la 1<sup>ère</sup> étape de purification sur une colonne d'IgG, EL1: Eluat récupéré après le clivage par la protéase TEV, FL2: Protéines non-retenues après la 2<sup>ème</sup> étape purification de colonne contenant les billes de Calmoduline (Flow through), LA2: Protéines éluées dans le lavage de la colonne par le tampon IPP150 CEB avant l'étape d'élution.

Nous pouvons constater que la protéine Knr4-TAPtag migre à une taille de 105kDa qui correspond bien à la taille de KNR4-ProtA-CBP, (EB1 et EB2), mais il y a aussi présence d'une autre bande qui migre un peu plus vite et qui réagit aussi avec l'anticorps anti-Knr4. Par contre, après passage de l'extrait sur billes d'IgG, nous observons que le 'filtrat' contenant les protéines non-retenues ne contient plus la protéine Knr4, ce qui montre que la fixation de la protéine Knr4-TAPtag sur les billes d'IgG a été correcte. Nous récupérons la protéine Knr4 (EL1) qui migre à une taille d'environ 85kDa après son clivage sur la colonne par la protéase TEV (EL1). Enfin, dans les deux échantillons (FL2 et LA2) récupérés avant l'élution finale par le tampon (Calmodulin Elution Buffer CEB), aucune bande de la protéine Knr4 n'a été détectée, ce qui semble indiquer que la protéine étiquetée Knr4 s'est fixée sur les billes de calmoduline par l'intermédiaire de la partie CBP. Nous n'avons pas vérifié les fractions éluées par le tampon CEB, car les protéines qui se trouvent dans ces fractions seront séparées sur un gel de protéines pour le séquençage.

#### 4.2.4.4.2 Séparation des protéines sur gel de protéine SDS-PAGE et séquençage.

Afin d'identifier les protéines qui se trouvent dans chaque fraction récupérée, un gel de protéines en conditions dénaturantes a été réalisé sur les cinq fractions obtenues après l'éluion par le tampon (CEB), pour comparer ces fractions et choisir celle qui montre la plus grande abondance de 'bandes protéiques'. La troisième fraction a été retenue pour réaliser les analyses par spectrométrie de masse LC-MS/MS (Figure 32).



**Figure 32: Analyse de l'interaction entre Knr4 et ses partenaires protéiques. Après précipitation un gel de protéine SDS-PAGE 12% a été réalisé permettant la séparation des protéines interagissant avec Knr4 et le gel a été coloré avec le bleu colloïdal.**

#### 4.2.4.4.3 Protéines identifiées par spectrométrie de masse LC MS/MS.

Les bandes ont été excisées et digérées par la trypsine. Les identifications de protéines ont été obtenues par confrontation des informations de masse à la banque de données protéiques NCBI, par l'intermédiaire du programme de calcul Mascot (MatrixScience) disponible sur Internet ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Les caractéristiques des protéines (masse moléculaire, point isoélectrique et biais de codon) ont été obtenues par interrogation du site [www.proteome/databases/YPD](http://www.proteome/databases/YPD), qui contient toutes les données concernant le génome de *S. cerevisiae*.

protéine	Fonction cellulaire	Localisation	Score	Nombre de molécules/cellule
Knr4	Organisation et biogénèse de la paroi cellulaire.	Cytoplasme/ col du bourgeon	62	5680
Bud6	Polarisome cellulaire et l'émergence du bourgeon	Cytoplasme/ col du bourgeon/	8	2610

Kin3	Protéine kinase	ND	17	Non-estimé
Ubp3	Activité protéase ubiquitin spécifique	Cytoplasme	10	2210
Hsc82	Protéine cofacteur chaperone (isoforme constitutive de Hsp90)	Cytoplasme	84	32800
Swi4	Facteur de transcription	Noyau	7	589
Bem1	Morphogenèse	Col du bourgeon	5	6490
Pho85	Protéine kinase cycline dépendante	Noyau/Cytoplasme	5	6160
Bem2	Croissance du bourgeon	Noyau/Cytoplasme	2	1230
Jnm1	Organisation du fuseau mitotique et polarisation cellulaire	Cytoplasme/ spindle pole body	16	Non-estimé
Act1	Organisation de la paroi cellulaire, polarisome	Cytoplasme/ bourgeon	26	Non-estimé
Asc1	Protéine impliquée dans la régulation de la traduction	Cytoplasme	170	15500
Gin4	Activité protéine kinase/ Croissance du bourgeon	Col du bourgeon	21	736
Bgl2	Organisation de la paroi cellulaire	Paroi cellulaire	15	45000
Bud31	Sélection du site de bourgeonnement	Noyau	15	1900
Ubc1	Protéine du système de l'ubiquitine	Cytoplasme	32	8690
Pil1	inhibiteur de la protéine kinase (Mpk1p/Slt2)	Cytoplasme	49	11500
Gvp36	Protéine de fonction inconnue	Cytoplasme/ col du bourgeon	25	7720

**Tableau 17: Protéines co-purifiant avec Knr4 après la purification TAP-tag, Ces protéines sont considérées comme potentiellement spécifiques pour Knr4.**

Protéine	Fonction cellulaire	Localisation	Score	Nombre de molécules/cellule
Ssa1/	Protein folding,	Cytoplasme	219	269000
Ssa2	Protein folding	Cytoplasme	178	364000
Pyk1	Pyruvate kinase, Glycolyse	Cytoplasme	60	291000
Eno2	Activité phosphopyruvate hydratase	Cytoplasme	148	2610
Bmh1	Fixation d'ADN/ Croissance pseudohyphale	Noyau	189	158000
Hor2	Réponse à l'hyperosmolarité	Cytoplasme/ Noyau	77	5000
Rnr4	Réductase ribonucléotide, réplication de l'ADN	Cytoplasme/ noyau	87	88900

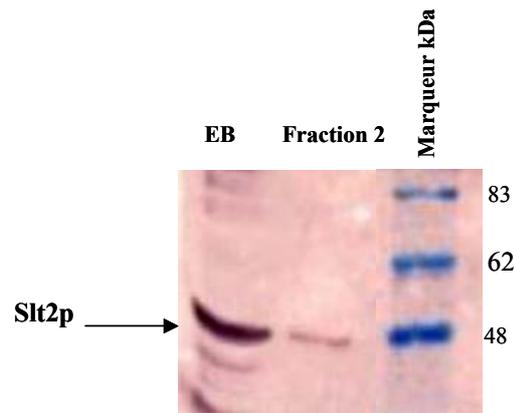
Pgk1	Kinase phosphoglycérate, glycolyse	Cytoplasme	54	31400
Fba1	Aldolase, glycolyse	Cytoplasme		102000
Adh1	Alcohol déshydrogénase I	Cytoplasme	76	Non estimé

**Tableau 18 : Protéines non-spécifiques identifiées après une purification de Knr4-TAP.**

Trois critères ont été retenus pour valider le choix des protéines pouvant être retenues et ensuite être potentielles partenaires de Knr4: le score auquel cette protéine est identifiée, l'abondance de cette protéine dans la cellule et sa localisation cellulaire. Des partenaires potentiels de Knr4 ont été identifiés avec un score assez élevé. Ces protéines se regroupent essentiellement dans 3 processus : l'organisation de la paroi cellulaire, l'émergence du bourgeon, la stabilité/dégradation des protéines et la polarisation cellulaire (Table 17). Par contre, des protéines considérées comme des contaminants ou non-spécifiques ont été également identifiées après la purification TAP-tag, (Table 18), telles que les protéines de choc thermique ou les protéines de la glycolyse. Ces protéines sont fréquemment identifiées dans les études utilisant l'approche de TAP-tag (Dziembowski A. et Seraphin B., 2004; Gavin A. C. *et coll.*, 2002). Par conséquent, la spécificité de leur interaction avec Knr4 n'est pas certaine. D'une façon intéressante, nous avons trouvé Knr4 après les analyses par spectrométrie de masse dans une bande avec une taille d'environ 80 kDa ainsi que dans une autre bande à une taille de 62 kDa. Mais dans cette analyse, nous n'avons pas détecté la présence de Slt2, la MAP kinase de la voie de l'intégrité cellulaire dépendante de Pkc1, alors que nous avons montré auparavant que celle-ci interagit très fortement avec Knr4 par test double hybride et approche 'SL' (Martin-Yken *et coll.* 2003).

### Confirmation de l'interaction physique entre Knr4 et Slt2.

Pour vérifier que Slt2 est présente dans notre fraction purifiée de Knr4-Tap, nous avons réalisé un Western-blot en utilisant les anticorps anti-Slt2 à partir d'un gel SDS-page sur lequel a migré la fraction issue de l'éluat de la seconde chromatographie du procédé TAP-Tag. Nous montrons à la figure 38 qu'une bande correspondant à la protéine Slt2 a été identifiée dans l'extrait brut et que cette même bande correspondant à la protéine Slt2 a été également identifiée dans l'éluat final de la purification Knr4-TAPtag. Ceci confirme les résultats que nous avons montrés suggèrent une interaction physique entre Knr4 et Slt2 (Figure 33).



**Figure 33 : Knr4 interagit physiquement avec Slit2. Un Western-blot en utilisant des anticorps anti-Slit2 (1/2000) a été réalisé. EB : extrait brut obtenu après le cassage des cellules, Fraction 2 : éluat obtenue après l'éluion par le tampon CEB de la colonne contenant les billes d'IgG.**

#### 4.2.5 Les protéines co-purifiées avec Knr4 par l'approche de TAP-tag retenues comme des partenaires potentiels.

Nous avons compilé les résultats des trois expériences TAP-Tag (voir plus haut) pour retenir les protéines qui sont les plus probablement de vrais partenaires de Knr4. Comme un nombre important de protéines ont été identifiées par l'approche de TAP-tag, nous avons donc imposé plusieurs critères permettant d'éliminer les contaminants. Des protéines considérées comme non-spécifiques ont été identifiées dans l'éluat de Knr4-TAP après la deuxième étape de chromatographie d'affinité à côté d'autres protéines. Tout d'abord, les protéines non-spécifiques que nous avons identifiées se regroupent dans les familles des protéines de choc thermique et les enzymes de la glycolyse (Table 19).

protéine	Fonction cellulaire ou processus biologique	Localisation	Nombre de molécules/cellule
Ssa1/Ssa2	Protéine folding,	Cytoplasme	269000
Pyk1	Glycolyse	Cytoplasme	291000
Rnr4	Ribonucléotide réductase, réplication de l'ADN	Cytoplasme/ noyau	88900
Pgk1	Phosphoglycérate kinase, glycolyse	Cytoplasme	31400
Tdh1	Glycéraldehyde3-P-déshydrogénase, glycolyse	Cytoplasme	120000
Fba1	Aldolase, glycolyse	Cytoplasme	102000
Adh1	Alcohol déshydrogénase I	Cytoplasme	Non estimé
Eno1	Enolase/ glycolyse	Cytoplasme	76700

Pdc1	Pyruvate décarboxylase	Cytoplasme	89700
Tpi1	Triose isomérase	Cytoplasme	200700
Tif1	Facteur d'élongation	Cytoplasme	106000
Tif2	Facteur d'élongation	Cytoplasme	Non estimé

**Tableau 19 : protéines « non-spécifiques » identifiées après une purification de Knr4-TAP.**

Deux arguments peuvent indiquer que ces protéines sont des contaminants c'est à dire des protéines non-spécifiquement liées à Knr4. Tout d'abord, la quantité de ces protéines par cellule est 5 à 25 fois plus importante que celle de Knr4 (Table 19). Ensuite, la plupart de ces protéines sont systématiquement identifiées dans les autres analyses utilisant l'approche TAP-tag (Dziembowski A. et Seraphin B., 2004; Gavin A. C. *et coll.*, 2002; Gould K. L. *et coll.*, 2004; Rigaut G. *et coll.*, 1999).

Les protéines qui ont été retenues comme des partenaires potentiels de Knr4 ont été sélectionnées sur la base d'un seuil de confiance (avec une  $p < 0.05$  pour des 'matches de séquence protéiques obtenus au hasard) et sur la présence de deux à trois séquences peptidiques qui ont été attribués à une même protéine lors des analyses LC-MS/MS. De plus, nous avons considéré comme des partenaires plausibles de Knr4 que les protéines qui présentent une quantité dans la cellule proche de celle de Knr4 et qui sont co-localisées avec elle, c'est à dire cytosoliques et éventuellement au niveau du col du bourgeon. En se basant sur ces critères, nous avons retenu neuf protéines aux quelles nous avons ajouté la protéine Slt2 (tableau 20). Cette dernière a été identifiée par un Western-blot (voir plus haut).

Une étude récente utilisant un crible de double hybride a mis en évidence une interaction entre Slt2 et Hsp90 «Heat shock protein». Cette dernière est une protéine chaperone essentielle et relativement abondante dans la cellule. (Millson S. H. *et coll.*, 2005). Malgré le fait que la protéine Hsp90 soit très abondante dans la cellule et fréquemment identifiée dans les analyses de spectrométrie de masse (Tong A. H. *et coll.*, 2004), nous l'avons ajoutée dans la liste des protéines considérées comme un partenaire putatif (potentiel) de Knr4, par le biais que cette protéine et Slt2 montre une forte interaction et dès lors que ceci peut créer un complexe tripartite Hsp90-Slt2-Knr4.

Protéine	Fonction cellulaire ou processus biologique	Localisation	Nombre de molécules/cellule
Knr4	Organisation et biogénèse de la paroi cellulaire.	Cytoplasme/ col du bourgeon	5680
Slt2	Organisation et biogénèse de la paroi cellulaire.	Bourgeon/ noyaux/	3230
Bud6	Polarisome cellulaire et émergence du bourgeon	Cytoplasme/ col du bourgeon/ périphérie cellulaire	2610
Cin8	Organisation du fuseau mitotique et polarisome cellulaire	spindle pole body, microtubule	238
Jnm1	Organisation du fuseau mitotique et polarisome cellulaire	Cytoplasme/ spindle pole body	Non-estimé
Act1	Organisation de la paroi cellulaire, polarisome	Cytoplasme/ bourgeon	Non-estimé
Asc1	Protéine impliquée dans la régulation de traduction	Cytoplasme	15500
Hsp90	Protéine cofacteur chaperone	Cytoplasme	32800
Ubc1	Protéine du système de l'ubiquitine	Cytoplasme	8690
Pil1	inhibiteur de la protéine kinase (Mpk1/Slt2)	Cytoplasme	11500
Gvp36	Protéine de fonction inconnue	Cytoplasme/ col du bourgeon	7720

**Tableau 20: Protéines co-purifiées avec Knr4 avec la purification TAP-tag, Ces résultats sont issus de deux expériences indépendantes.**

Les neuf protéines identifiées peuvent être groupées selon trois fonctions biologiques :

**Le première groupe**, regroupe les protéines impliquées dans l'organisation et la biogénèse de la paroi cellulaire ; Slt2 et Pil1 en font partie. Une interaction physique entre Knr4 et Slt2 a déjà été démontrée par l'approche de double hybride (Martin-Yken H. *et coll.*, 2003). La protéine Pil1 a été également proposée comme faisant partie d'un complexe avec Slt2 qui a été isolé par la technique d'immuno-affinité en utilisant un anticorps anti-Slt2 suivie d'une électrophorèse SDS-PAGE du complexe et d'un séquençage MS/MS (Ho Y. *et coll.*, 2002). De plus, il a été montré que la quantité de Slt2 phosphorylée (activité kinase) est trois fois supérieure dans un mutant *Apil1*, en conditions normales ou activatrices (37°C). Ce résultat suggère que Pil1 est impliquée dans la régulation négative de la voie de signalisation cellulaire Pkc1-Slt2 Map kinase. L'interaction observée ici entre Knr4 et Pil1 est cohérente avec la régulation de Slt2 par ces deux protéines, et pourrait indiquer un complexe ternaire (les trois protéines ensemble) (Martin-Yken H. *et coll.*, 2003; Zhang X. *et coll.*, 2004).

**Le deuxième groupe** regroupe une série de quatre protéines (Bud6, Act1, Cin8 et Jnm1) impliquées dans le bourgeonnement cellulaire. La co-purification de ces protéines avec Knr4 est en accord d'une part avec leur localisation dans le col du bourgeon pendant la mitose (Huh W. K. *et coll.*, 2003; Martin H. *et coll.*, 1999), et d'autre part, avec leur fonction dans la synthèse de la paroi cellulaire et le bourgeonnement. En effet, la protéine Bud6 est requise pour la sélection du site de bourgeonnement (Amberg D. C. *et coll.*, 1997) et cette dernière interagit à la fois avec Slt2 et Act1p. La protéine Cin8 est impliquée dans la dynamique des microtubules pendant la mitose, régulée par l'activation de la voie de signalisation cellulaire qui affecte la polarité cellulaire (Samaj J. *et coll.*, 2004). Le gène *CIN8* code une protéine de type "kinésine like motor". L'action de cette protéine contribue à la structuration et la fonction du fuseau mitotique chez la levure *S. cerevisiae* (Hildebrandt ER et Hoyt MA, 2000). Il a été récemment démontré que l'absence de cette protéine provoque des phénotypes liés à la paroi cellulaire en utilisant des drogues perturbant la paroi (voir plus loin). Le fait que la perte de cette protéine entraîne une déficience dans la synthèse de la paroi cellulaire, indique un lien fonctionnel entre les protéines du moteur mitotique et l'intégrité de la paroi cellulaire (Korolyev E. *et coll.*, 2005). De plus, il semble que cette interaction entre le système du remodelage du cytosquelette des microtubules et la paroi cellulaire peut se produire via l'une des kinases de la voie MAP kinase. En effet, il a été montré que la stabilisation des microtubules en condition hyperosmotique est médiée par la voie de l'intégrité cellulaire MAP kinase Slt2. (Korolyev E. *et coll.*, 2005). La protéine Jnm1 qui a été également identifiée, fait partie du complexe de dynactine. Ce complexe constitué de trois protéines Arp1, Jnm1 et Nip100, est impliqué dans le processus de checkpoint qui assure la synthèse de la paroi cellulaire et la mitose. Une délétion indépendante de chacun des gènes codant Nip100 ou Jnm1 a montré que ces protéines sont nécessaires pour le point de contrôle de l'intégrité pariétale ainsi que pour la migration nucléaire (Suzuki M. *et coll.*, 2004). La délétion du gène *JNMI* est synthétique létale avec la délétion *CIN8* (Tong A. H. *et coll.*, 2004). De plus, les mutants  $\Delta jnm1$  et  $\Delta cin8$ , sont sensibles à la rapamycine, phénotype liée à la voie de signalisation TOR (*Target Of Rapamycine*) (Choi J. H. *et coll.*, 2000).

**Le troisième groupe** de protéines identifiées comprend trois protéines cytosoliques (Ubc1, Asc1 et Gvp36) qui pourraient être impliquées dans l'activité et la stabilité de Knr4. Plusieurs protéines du système de l'ubiquitine ont été identifiées après les analyses par spectrométrie de masse, mais nous n'avons retenu que la protéine Ubc1 comme un partenaire de Knr4 car elle a été retrouvée deux fois avec des scores raisonnables. Ubc1 est une enzyme de liaison de l'ubiquitine impliquée dans la dégradation sélective de plusieurs protéines à courte durée de

vie chez les cellules eucaryotes. Cette dégradation est dirigée par le système de l'ubiquitine dans lequel différentes enzymes sont impliquées (Seufert W. et Jentsch S., 1990). Dans ce système, après ligation covalente avec l'ubiquitine, les protéines sont dégradées par un complexe multi-protéases localisé dans le cytoplasme et le noyau appelé le protéasome 26S. La dégradation sélective est programmée par l'action plusieurs protéines régulatrices impliquées dans le cycle cellulaire, tels que les cyclines. Il a été démontré que les protéines à courte durée de vie contiennent généralement des régions riches en prolines, acides glutamiques, sérines et thréonines, appelés les régions PEST (Rechsteiner M. et Rogers S. W., 1996; Rogers S. *et coll.*, 1986). Ces séquences PEST contrôlent l'ubiquitination de protéines régulatrices à courte durée de vie telles que par exemple les cyclines de la phase G1 dans la levure et les cellules de mammifères. Plus précisément, c'est la phosphorylation de certains résidus sérine ou thréonine spécifiques situés dans les régions PEST de ces cyclines qui entraîne leur reconnaissance et leur destruction par la voie du protéasome-ubiquitine (Lanker S. *et coll.*, 1996; Willems A. R. *et coll.*, 1996). La séquence de Knr4 contient 5 motifs PEST. La présence de ces 5 éléments dans la protéine Knr4 permet donc d'envisager pour cette protéine un temps de vie assez court, éventuellement régulé par la phosphorylation des résidus clés des séquences PEST par différentes kinases.

Asc1 est une protéine ribosomale de 40S, impliquée dans l'efficacité de la transcription et la taille de cellule. La délétion de ce gène est synthétique létale avec plusieurs délétions des gènes liés à la paroi cellulaire (*Δchs3*, *Δchs5*, *Δknr4*, *Δkre11*, *Δzuo1* et *Δkrr1*) (Lesage G. *et coll.*, 2004). D'autre part, il a été montré que le niveau de l'ARNm de *ASCI* est fortement diminué après un shift en condition d'osmolarité élevé et que le mutant *asc1Δ* présente une hypersensibilité à la toxin killer K1 (Page N. *et coll.*, 2003), au même titre que *knr4Δ*. Ce dernier phénotype pourrait être dû aux pertes des interactions de cette protéine avec les protéines de paroi y compris Knr4, rendant ces dernières instables.

La protéine Gvp36 a été également identifiée dans la fraction Knr4-TAP. La fonction de cette protéine n'a pas encore été élucidée, bien qu'il est connu que la surproduction de Gvp36 provoque un arrêt du cycle cellulaire à la fin de la phase M (Stevenson L. F. *et coll.*, 2001). Il semble qu'elle se localise dans l'appareil de Golgi-ER (Huh W. K. *et coll.*, 2003).

#### **4.2.6 Tests phénotypiques des mutants des gènes codant pour les protéines co-purifiées avec Knr4 par TAP-tag.**

L'association des protéines dans un système complexe peut suggérer que chacun des partenaires du complexe puisse être impliqué dans une fonction commune. Un moyen indirect

permettant la vérification de cette hypothèse est d'examiner le phénotype obtenu après la délétion de chaque gène codant pour chacune de ces protéines. Les mutants de délétion de certains des ces gènes ont été sélectionnés afin d'étudier leur sensibilité aux différentes drogues perturbant la paroi cellulaire de la levure. Le but de ce test est de comparer la sensibilité de ces mutants par rapport au mutant *knr4* (Figure 34).

Comme le montre la figure 34, nous observons que les mutants de délétion des gènes *JNMI* et *CIN8* présentent une sensibilité comparable à celle du mutant *knr4Δ* sur la plupart des tests effectués, sauf sur le test de sensibilité à la température à 38°C et à la caféine, pour lequel *jnm1Δ* présente une résistance comparable à la souche BY4741. Une sensibilité du mutant *cin8Δ* à la caféine a été mise en évidence auparavant (de Jesus Ferreira M. C. *et coll.*, 2001), et elle a été également constatée dans notre analyse. En ce qui concerne le mutant *bud6Δ*, il ne présente aucune différence significative de sensibilité par rapport à la souche sauvage BY4741. Le mutant *slt2Δ* montre une sensibilité importante à la caféine, ce qui est en accord avec des résultats déjà montrés (Martin H. *et coll.*, 1996). Par contre, il a été montré que le mutant *slt2Δ* est sensible à la température, ce que nous n'avons pas observé dans notre mutant. Étonnamment, nous avons observé que le mutant *slt2Δ* est aussi résistant au SDS. En revanche, les trois mutants *cin8Δ*, *jnm1Δ* et *knr4Δ* révèlent une sensibilité équivalente au SDS. (Table 21).

	SDS 0,05%	CFW 25µg/ml	Caféine 2mg/ml	Rouge congo 100µg/ml	Acide sorbique 1mM (pH4 ?5)	Température 38°C
By4741	+++	+++	+++	+++	+++	++
<i>Δknr4</i>	-	-	+	-	+	-
<i>Δslt2</i>	++	-	-	-	+++	-
<i>Δbud6</i>	-	+	++	++	+++	++
<i>Δcin8</i>	-	-	+	-	++	-
<i>Δjnm1</i>	-	-	+++	+	+	++
<i>Δasc1</i>	-	-	+	-	++	++
<i>Δbem2</i>	-	++	+	++	+++	-

**Tableau 21: Score des mutants de levure délétés pour les gènes dont les produits ont été co-purifiés avec Knr4 par l'approche de TAP-tag.**

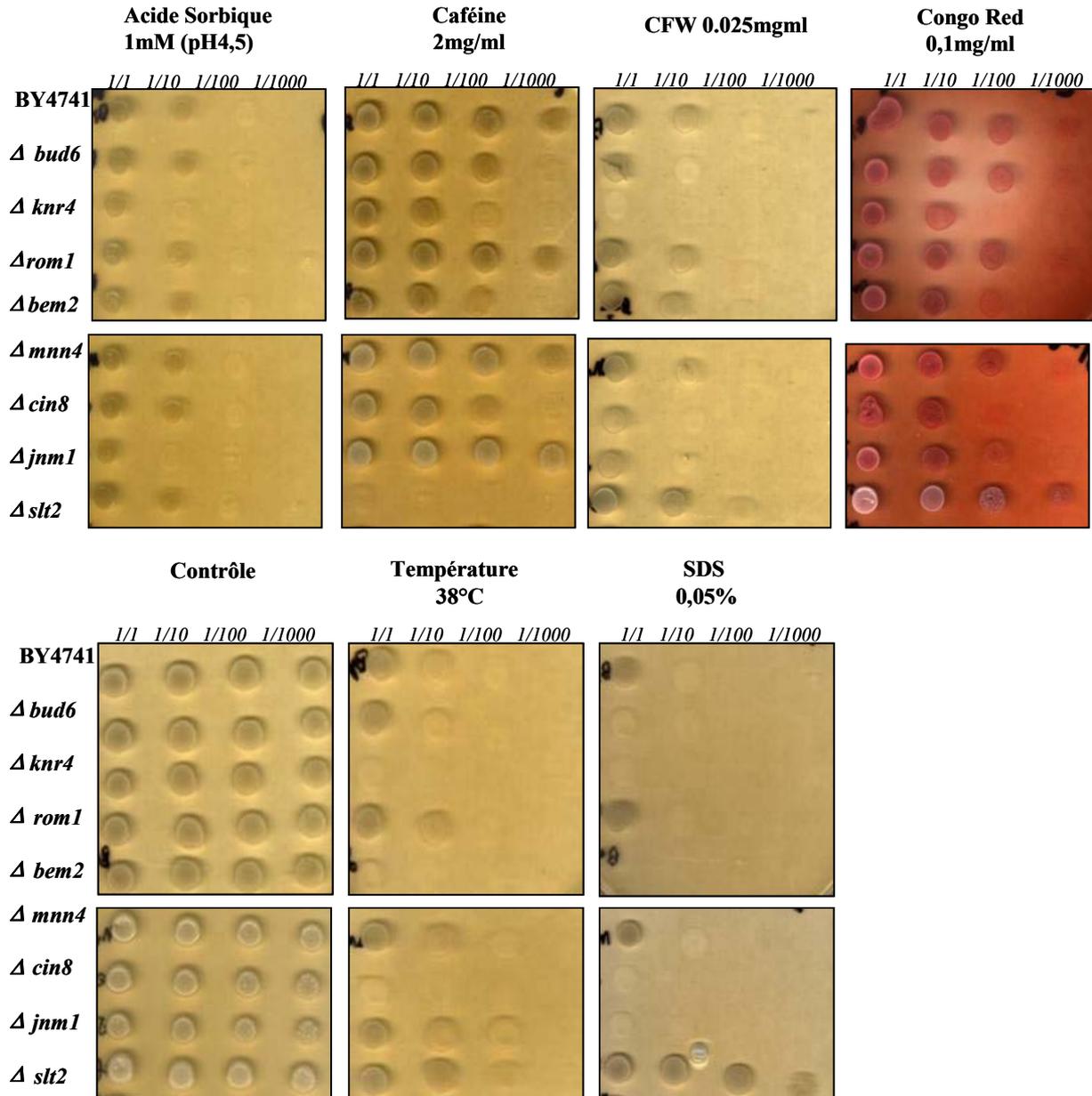


Figure 34: Tests de sensibilité au Calcofluor (CFW), rouge congo (rouge Congo) , Acide sorbique, SDS, caféine, des souches de levure délétées pour certains gènes dont les produits ont été identifiés par TAP-tag. Les souches contrôles et mutantes ont été mises en culture dans du milieu liquide YNB toute une nuit jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance ( $DO_{530} = 2,0$ ). Les cellules sont alors récoltées par centrifugation puis reprises dans de l'eau stérile à la  $DO_{530} = 8,0$  et déposées à différentes dilutions sur le milieu solide.

## 4.2.7 Discussion

### 4.2.7.1 Les différentes méthodes de recherche des partenaires protéiques : avantages, inconvénients et complémentarité.

Depuis ces quatre dernières années, les études visant à identifier des interactions protéiques physiques, directes ou indirectes chez la levure, se sont multipliées. Ainsi, deux groupes ont principalement contribué à l'identification de plus de 5000 interactions par la technique du double-hybride impliquant plus des deux tiers du protéome de *S.cerevisiae* (Ito T. *et coll.*, 2001; Uetz P. et Hughes R. E., 2000). D'autre part, deux autres études utilisant la technique TAP-tag pour identifier des complexes associés à des protéines étiquetées ont grandement contribué à la mise en évidence d'interactions physiques entre quelques 6000 protéines de la levure *S.cerevisiae* (Gavin A. C. *et coll.*, 2002; Ho Y. *et coll.*, 2002). Ainsi, plus de 1300 protéines de levure ont été utilisées comme « appât » lors de ces deux études. La publication de ces résultats a généré une somme considérable de données.

Les questions qui se posent sont évidemment de savoir dans quelle mesure les données issues de ces expériences à grande échelle et présentes dans les banques sont fiables.

#### Devons nous considérer ces données comme exhaustives ?

Sans doute pas et ce pour plusieurs raisons. Nous remarquons que chacune des approches utilisées pour la recherche des interactions protéines-protéines (double-hybride, TAP-tag et létalité synthétique) présente des avantages et des inconvénients. De plus, le faible taux de recouvrement des données issues des différents cribles suggère que ceux ci sont loin du niveau de saturation.

Les interactions de type synthétiques létales sont basées sur le fait que la délétion simultanée de deux gènes est létale, tandis que la délétion indépendante de chacun d'entre eux ne l'est pas. Ces interactions génétiques ne sont pas forcément l'indication d'une interaction protéique directe. Elles peuvent se produire entre deux gènes de la même voie ou de deux voies indépendantes. Des analyses systématiques de la létalité synthétique à grande échelle ont été réalisées (Tong A. H. *et coll.*, 2004). L'un des énormes avantages mais aussi ce qui en constitue une complication en terme d'interprétation biologique de ces analyses, est qu'un grand nombre d'interactions génétiques pour un gène sont identifiées sans que ces résultats puissent être validés par une analyse de tétrades. De plus, les analyses de la létalité synthétique ne sont valables que pour les gènes non-essentiels, ce qui limite l'utilisation de cette approche.

La technique de double hybride étant basée sur l'activation transcriptionnelle, elle nécessite de forcer les interactions entre deux protéines à se faire dans le noyau. Ceci peut

conduire à l'identification d'un nombre important de faux positifs et faux négatifs. De plus, la détection de deux protéines à la fois présente une limitation de cette méthode. En effet, certaines protéines interagissent sous forme de complexes de plus de 2 protéines et l'approche de double-hybride ne permet pas d'identifier toutes ces protéines. Il est important de remarquer que cette méthode détecte les interactions physiques binaires y compris les interactions avec des protéines qui sont en faible concentration dans la cellule, interactions qui ne sont pas forcément détectées par l'approche de TAP-tag. Par conséquent, les interactions protéiques identifiées par le système de double-hybride nécessitent une complémentation par d'autres méthodes. Par rapport à la méthode de double-hybride qui permet d'identifier une interaction entre deux protéines, la méthode de purification par affinité (TAP-tag) couplée avec la spectrométrie de masse offre certains avantages majeurs. Cette méthode permet de déterminer des complexes protéiques à l'échelle de cellules entières. De plus, l'approche de TAP-tag permet de minimiser les interférences stériques possibles car seule la protéine étudiée est exprimée comme une protéine de fusion (Drewes G. et Bouwmeester T., 2003). L'intégration de la méthode de létalité synthétique avec les autres approches (double-hybride et TAP-tag) permet une meilleure compréhension du rôle d'une protéine et d'établir une carte représentant le réseau de ses partenaires protéiques.

### **Toutes les interactions identifiées reflètent-elles la réalité physiologique ?**

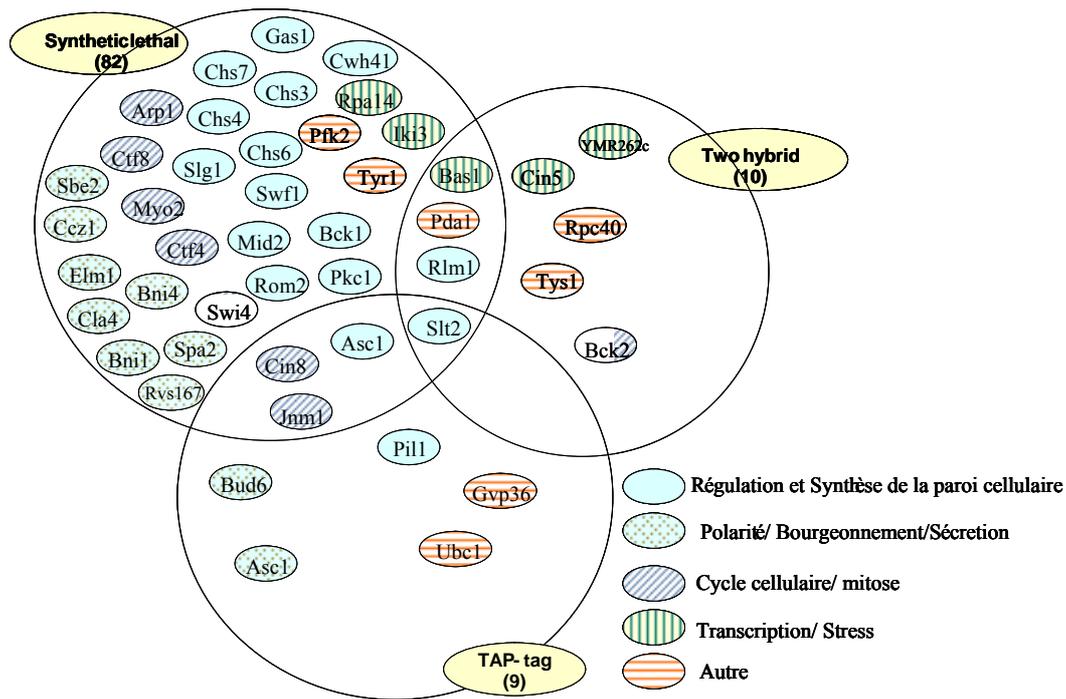
Il est assez difficile de répondre à cette question. On peut imaginer que certains facteurs fortement exprimés pourraient « contaminer » certaines préparations. Nous remarquons que l'approche TAP-tag présente deux difficultés majeures. La première est de se débarrasser difficilement des interactions non-spécifiques. Bien que la méthode du TAP-tag soit basée sur une purification en deux étapes successives (Honey S. *et coll.*, 2001; Rigaut G. *et coll.*, 1999) qui permet l'élimination d'un maximum de contaminants, nous remarquons que tous les contaminants n'ont pas été éliminés. Ces contaminants sont des protéines cellulaires abondantes comme les protéines de la glycolyse, du cytosquelette et les chaperones (Gavin A. C. *et coll.*, 2002). Il est souvent difficile de conclure si ces "contaminants" détectés sont de vrais partenaires ou s'ils sont des artefacts. Le second problème est celui de la faible affinité entre les partenaires et la difficulté pour identifier les protéines peu abondantes. Ce genre de problèmes peut conduire à la perte de certaines interactions. De plus, l'approche de TAP-tag est extrêmement dépendante du traitement du gel après les purifications (excision des bandes) et de la précision de la spectrométrie de masse utilisée (Dziembowski A. et Seraphin B., 2004). C'est le cas par exemple de l'interaction de Slt2 avec Knr4 par le TAP-tag. Cette

interaction a été démontrée par un Western-blot mais nous n'avons pas été capables de le retrouver dans nos bandes du gel obtenu dans la fraction Tap-tag purifiée, probablement parce que nous n'avons retenu que les bandes visibles sur le gel. Nous aurions pu effectuer un séquençage directement sur la fraction éluée. De plus, il est vraisemblable que si les interactions de Knr4 avec certains de ses partenaires sont transitoires ou faibles, ces partenaires peuvent également avoir échappé à notre analyse. Cependant, un lavage très abondant de la colonne du TAP-tag lors de la purification est tout de même intéressant car il permet de diminuer le nombre des protéines non-spécifiques identifiées, ce qui, par conséquent, peut permettre une meilleure identification de tous les candidats potentiels.

Il faudra donc se méfier lors de la sélection des candidats, car il n'est pas exclu que certaines protéines exprimées à un taux plus faible puissent aussi « contaminer » une préparation. D'où l'importance de mettre plusieurs paramètres de filtration permettant la sélection de "vrais" partenaires. Pour cela nous avons imposé plusieurs facteurs permettant l'élimination de certaines protéines considérées comme non-spécifiques, ces facteurs ont également permis de confirmer l'interaction des protéines sélectionnées comme partenaires avec Knr4. Il s'agit d'une part de vérifier leur abondance cellulaire, car la plupart des protéines non-spécifiques ont une abondance cellulaire assez élevée, et d'autre part, de savoir si ces partenaires ont la même localisation cellulaire ou une fonction commune et de savoir s'ils ont des partenaires protéiques communs (Cho S. *et coll.*, 2004; Deane C. M. *et coll.*, 2002; Jansen R. *et coll.*, 2002). Nous avons constaté que certains gènes dont les délétions sont synthétiques létales avec la délétion de *KNR4*, ont été identifiés après séquençage, mais, le faible score de recouvrement de ces protéines nous a empêché de retenir ces protéines comme des candidats potentiels avec Knr4. Ces protéines sont impliquées dans la même fonction que Knr4 et leur localisation cellulaire est comparable à celle de Knr4.

### **Recouvrement entre les méthodes de l'interaction protéine-protéine.**

Les résultats obtenus par la méthode de TAP-tag donnent une vue globale du réseau d'interaction au centre duquel se trouve Knr4. Cette vue globale de l'interactome de Knr4 représente des résultats obtenus par l'approche de double-hybride, un crible génétique de létalité synthétique et le TAP-tag (Dagkessamanskaia A. *et coll.*, 2001; Lesage G. *et coll.*, 2004; Uetz P. *et coll.*, 2000). Ces trois approches se complètent permettant l'obtention d'une vue d'ensemble des partenaires de Knr4 (Figure 35).



**Figure 35 : Recouvrement entre les méthodes de létalité synthétique, double-hybride et les données de TAP-tag. Pour simplifier l'image, seuls certains gènes représentatifs du crible synthétique létal (Lesage G. *et coll.*, 2004) sont présentés.**

Nous avons remarqué comme attendu un faible recouvrement entre ces trois approches, car chaque méthode possède ses propres biais techniques (Hazbun T. R. *et coll.*, 2003; von Mering C. *et coll.*, 2002). Nous pouvons constater d'après les résultats obtenus par l'approche de double hybride, que six partenaires protéiques de Knr4 sur dix sont des protéines nucléaires. Les protéines Tys1 et Pda1 sont des protéines cytosoliques abondantes. Malgré le fait que Tys1 ait été isolé par la méthode de double hybride d'une façon très fréquente avec Knr4, cette protéine n'a pas été identifiée par l'approche de TAP-tag. Une raison possible de cet échec est due au fait que l'interaction entre Knr4 et Tys1 pourrait n'être fonctionnelle que lors de la formation des spores, comme suggéré précédemment, ces deux protéines étant impliquées dans la formation de dityrosine pendant la sporulation. D'autre part, une analyse génétique globale de type létalité synthétique (Lesage G. *et coll.*, 2004; Tong A. H. *et coll.*, 2004) a été réalisée. Ce crible a permis l'identification d'un grand nombre de gènes dont les délétions sont synthétiques létales avec la délétion de *KNR4*. Du fait que cette méthode est indépendante de l'abondance ou de la localisation cellulaire des protéines,

82 délétions létales avec la délétion de *KNR4* ont été identifiées. Des gènes codant pour des protéines de la paroi cellulaire ou des protéines membranaires ont été identifiées (Cwh41, Chs3, Chs4, Chs7, Wsc1, Mid2, etc). Ces protéines n'ont pas été retrouvées par l'approche de TAP-tag, peut être parce que certaines n'ont sans doute pas de raison d'interagir avec Knr4, et surtout parce que la fraction membranaire a été éliminée au cours de l'étape de centrifugation dans la technique TAP-tag. De plus, le crible de létalité synthétique a également permis l'identification de gènes codant pour des protéines impliquées dans la polarité cellulaire et l'émergence du bourgeon (Spa2, Bni4, Bck1, Cla4, Bem1, Bni1, etc), ainsi que pour des protéines impliquées dans la mitose (Arp1, Cf8, Ctf4, Myo2, Swi4, Swi6, etc). L'abondance de ces protéines est 5 à 10 fois inférieure à celle de Knr4 dans la cellule (Huh W. K. *et coll.*, 2003) ; cette faible abondance a pu empêcher leur détection par MS/MS.

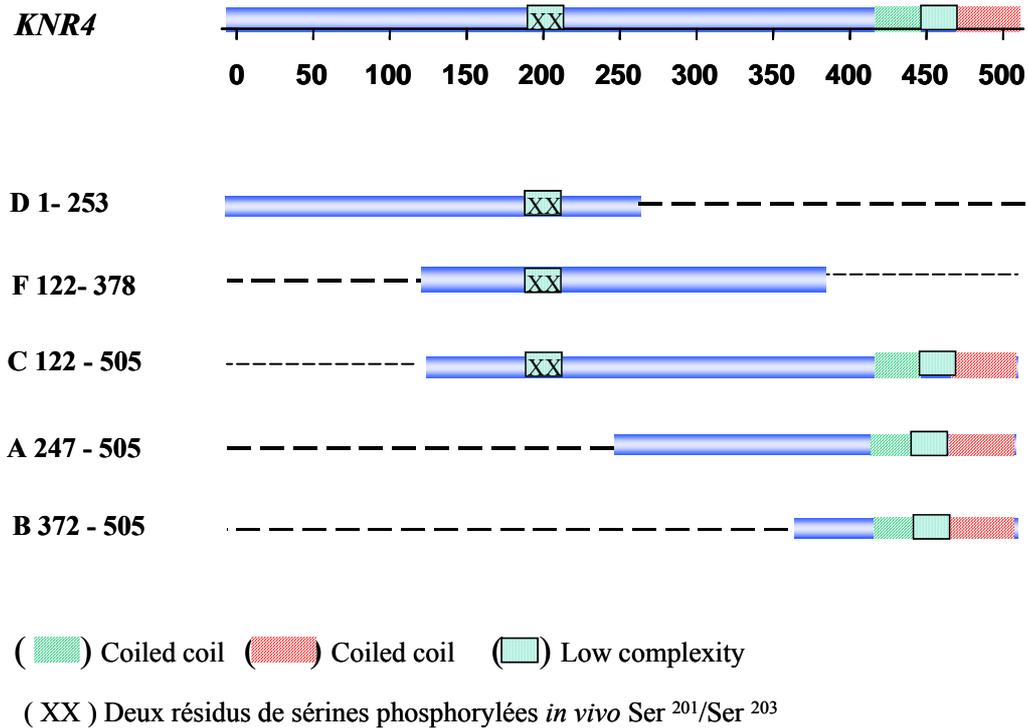
Dans cette étude apparaît toutefois la protéine Slt2 qui est la seule protéine identifiée par les trois méthodes (double-hybride, synthétique létal et le TAP-tag), ce qui permet de confirmer définitivement l'implication de Knr4 dans l'activité de la voie de l'intégrité pariétale Pkc1-Slt2. D'autre part, l'identification de Jnm1, un composant du complexe de dynactine, impliqué dans le point de contrôle de la paroi cellulaire (Suzuki M. *et coll.*, 2004), comme partenaire de la protéine Knr4 par deux approches indépendantes, peut appuyer nos résultats précédents obtenus (Martin-Yken H. *et coll.*, 2002a), suggérant que Knr4 soit impliqué dans la progression du cycle cellulaire.

### 4.3 Etude préliminaire structure-fonction de la protéine Knr4.

#### 4.3.1 Recherche des domaines de Knr4 impliqués dans son interaction avec certains de ses partenaires identifiés par le système double hybride.

La structure tridimensionnelle de la protéine Knr4 est inconnue, et il est impossible de la prévoir d'après sa séquence car elle n'appartient à aucune famille de protéines de structure connue (Herman Van Tilbeurgh, communication personnelle). Nous avons entrepris de découper *KNR4* en plusieurs fragments. L'analyse de la séquence de Knr4 par le logiciel "SMART" a permis de mettre en évidence deux régions "Coiled-coil" putatifs sur la partie C-terminale de cette protéine (Figure. 36). Nous espérons en "découpant" Knr4 pouvoir d'une part mieux comprendre la nature de l'interaction de Knr4 avec ses partenaires et plus particulièrement avec les protéines identifiées au préalable par la méthode double-hybride qui à côté de Tys1 et Slt2 comprend aussi Bas1 (Uetz P. *et coll.*, 2000), Pda1 (Ito T. *et coll.*, 2001) et Rpc40, et pour lesquelles un rôle physiologique de l'interaction avec Knr4 est difficile à proposer

Nous avons réalisé des délétions progressives du cadre ouvert de lecture de *KNR4* pour obtenir cinq fragments de *KNR4* (Figure 36). Ces fragments ainsi que *KNR4* entier ont été clonés dans un plasmide double hybride pODB80 en phase avec le domaine de fixation à l'ADN de Gal4. Il est à noter que à part la construction pODB80-KNR4 complet, les autres constructions ne permettent pas une complémentation fonctionnelle chez un mutant *knr4Δ*. En parallèle, tous les gènes dont les produits ont été identifiés comme des partenaires de Knr4 par la méthode de double hybride, ont été introduits dans le plasmide pGAL424 de fusion de double hybride en phase avec le domaine d'activation de la transcription par Gal4.



**Figure 36: Schéma représentant les différents domaines tronqués de *KNR4* clonés dans le plasmide de double-hybride pOBD-80. Les positionnements possibles des régions Coiled-coil et des zones de "Low-complexity" sont prédits par SMART.**

Nous avons transformé la souche hôte pJ69-4A par une paire de plasmides. Ces paires comportent chacune un plasmide pODB80 contenant le gène *KNR4* entier ou un de ses fragments et la plasmide pGAL424 exprimant *TYS1*, *PDAl*, *CIN5* ou *SLT2*. On a étudié l'interaction entre les 2 fusions en suivant l'expression des trois gènes rapporteurs de la souche hôte, et deux expériences indépendantes ont été réalisées afin de mesurer l'activité  $\beta$ -galactosidase sur des échantillons prélevés en phase exponentielle de croissance ( $DO_{600} = 1$ ). Le tableau 23 montre les résultats de la quantification pour chaque interaction.

Nous observons (Tableau 22) que la protéine Tys1 montre une interaction très forte avec Knr4 complet, et que cette interaction est attribuée à la partie N-terminale de la protéine Knr4 (résidus 1 à 122). Cette région N-terminale montre une interaction également forte avec la protéine Bck2, alors que cette interaction est 2 fois moins forte si elle a lieu avec la protéine Knr4 complète et Bck2. Par contre, nous observons que les régions d'interaction des protéines Slt2, Pkc1 et Cin5 sont plutôt localisées entre les résidus 122 et 253 de Knr4. Enfin, il est montré que la région qui se trouve entre les résidus 257 et 372 de Knr4 est spécifique pour

l'interaction avec Pda1. Dans la partie de Knr4 qui est montrée ces interactions, se trouvent deux résidus de sérines identifiés comme phosphorylés "*in vivo*" (Ficarro S. B. *et coll.*, 2002)..

Proie dans pGAD424 (domaine d'activation de GAL4)	Appât dans pOBD80 (domaine de fixation de Gal4)						
	POBD80 (vide)	KNR4 (1-505)	D (1-253)	F (122-253)	C (122-505)	A (247-505)	B (372-505)
Vide	5.0	4	3	4.5	6.5	10	4.5
Tys1	9.2	104	143	3.5	6.7	9.7	7.4
Pda1	7.3	36	4	9.5	17	21	4.5
Cin5	20	33	nd	25	57	15	7.5
Slt2	5.7	44	18	36	8	6.5	3.0
Pkc1	6.2	6.4	5.6	4	22	9	4.9
Rlm1	8.5	17	6	7	9	14.5	nd
Bck2	6.5	27	53	6	9.8	12.6	5.6

**Tableau 22: Quantification de l'activité  $\beta$ -galactosidase (nmol/ min. mg protéine) entre les domaines de Knr4 et ses partenaires protéiques par l'approche de double-Hybride.**

#### 4.3.2 Les deux résidus sérines Ser200 et Ser203 identifiés comme phosphorylés *in-vivo* ont-ils un rôle physiologique sur la phosphorylation de Knr4 ?

La protéine Knr4 présente de nombreux sites consensus de phosphorylation par différentes kinases dont certaines sont impliquées dans la prolifération cellulaire et la morphogénèse. Ces sites comprennent : sept sites potentiels pour la CK2 (caséine kinase II), deux sites pour la protéine tyrosine kinase, un site pour la protéine kinase dépendante de la calmoduline et un pour la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA), six sites de phosphorylation potentiels pour la protéine kinase C (PKC). Parmi eux, il existe cinq sites localisés dans la partie C-terminale de la protéine Knr4 (déterminés par le ScanProsite algorithme, <http://www.expasy.org/cgi-bin/scanprosite>).

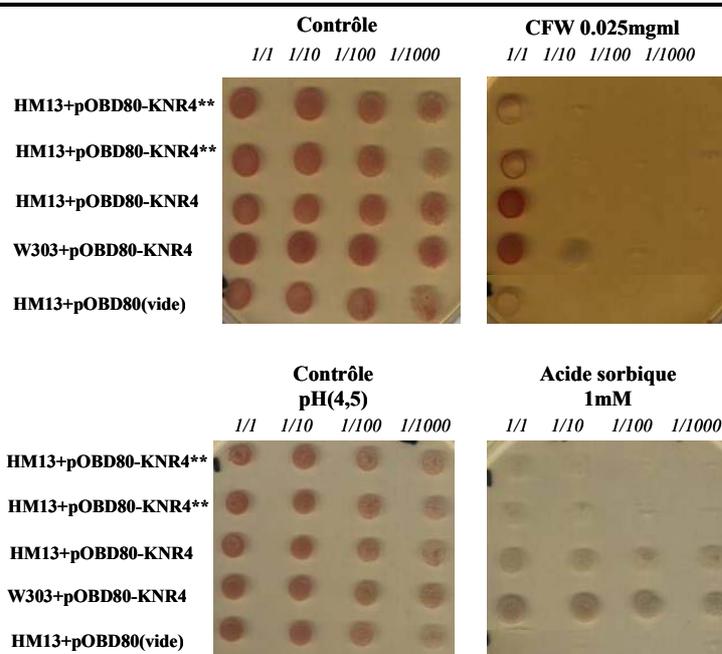
D'une façon intéressante, les deux résidus de sérine qui ont été identifiés comme phosphorylés "*in vivo*" ne sont pas localisés sur ces sites potentiels de phosphorylation (Ficarro S. B. *et coll.*, 2002). Par contre, ces deux résidus Ser 200 et Ser203 se trouvent dans un site consensus de type différent, un site potentiel de N- myristylation, localisé entre les résidus 189 et 206 de la protéine (SQQGLSHVTSTG**SSSS**MER). Ce type d'acylation qui se produit sur la partie N-terminale de la protéine, permet à la protéine de s'attacher à la membrane cellulaire par l'addition de l'acide gras saturé C14. (Towler D. A. *et coll.*, 1988). Le fait que ces deux résidus se trouvent loin de la partie N-terminale de la protéine Knr4, nous a conduit à penser que ce site n'est pas fonctionnel pour la myristylation.

Afin de comprendre le rôle éventuel de ces sites de phosphorylation et de leur contribution à la fonction de Knr4, nous avons remplacé les deux résidus sérine par deux résidus alanine par une mutagenèse dirigée, permettant d'obtenir le variant protéique Knr4<sup>(S200A-S203A)</sup>.

**Le plasmide pOBD-KNR4<sup>(S200A-S203A)</sup> complémente partiellement le phénotype de KNR4.**

Le gène *KNR4*\*\* portant la mutation qui conduit à la protéine Knr4<sup>S200AS203A</sup> a été cloné dans le plasmide de double hybride pOBD80 en phase avec le domaine de fixation de l'ADN de Gal4. Ensuite, nous avons vérifié la fonctionnalité de la protéine Knr4<sup>S200AS203A</sup> correspondante exprimée à partir de ce plasmide par tests de sensibilité à certaines drogues (blanc de calcofluor (CFW) et acide sorbique) (Figure 37). Pour cela, le plasmide pOBD-KNR4\*\* a été transformé dans la souche HM13 (mutant *knr4Δ*).

**Résultats des tests**



**Figure 37: Tests de sensibilité blanc de Calcofluor (CFW) et acide sorbique de la souche HM13 transformée par le plasmide pOBD80-KNR4<sup>(S200A-S203A)</sup>.**

Nous observons que le plasmide (pOBD-KNR4<sup>(\*\*)</sup>) complémente faiblement la croissance du mutant  $\Delta knr4$  sur milieu contenant le blanc de Calcofluor et sur acide sorbique. Ces données suggèrent que la protéine de fusion Knr4<sup>(S200A-S203A)</sup>-BD(Gal4) n'est que partiellement fonctionnelle. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette perte partielle de fonction : premièrement, le remplacement des sérines S200 et S203 par des alanines pourrait réduire

l'activité de Knr4, laquelle serait d'autant plus réduite que la construction force cette dernière à se localiser dans le noyau.

#### 4.3.2.1 L'interaction entre Knr4 mutée et les protéines Slt2, Bck2 et Tys1 est fortement réduite.

Comme décrit plus haut, nous avons répété les expériences de double hybride mais cette fois nous avons utilisé le plasmide pOBD-KNR4\*\* en combinaison avec les plasmides suivants : pGAD-TYS1, pGAD-CIN5, pGAD-SLT2, pGAD-WSC1, pGAD-BCK2 et le plasmide vide pGAD. La souche Snf1-Snf4 a été utilisée comme un contrôle positif.

	pGAD-TYS1	pGAD-CIN5	pGAD-BCK2	pGAD-SLT2	pGAD-WSC1	pGAD (vide)
pOBD-KNR4	104	33	27	44	7	5
pOBD-KNR4**	11	13	23	18	nd	5,5

**Tableau 23: l'interaction entre Knr4\*\*(pHM66) et certains partenaires.**

Nous observons dans le tableau 23 que la protéine Knr4<sup>(S200A-S203A)</sup> perd sa capacité d'interaction avec la protéine Tys1. D'autre part, nous constatons que l'interaction de Slt2 avec Knr4<sup>(S200A-S203A)</sup> est 3 fois moins forte qu'avec la protéine Knr4 native. En revanche, nous n'avons pas observé de changement significatif concernant l'interaction entre la protéine Knr4\*\* et la protéine Bck2 par rapport à celle obtenue avec la protéine native. Ce résultat montre que les sites de phosphorylation (S200A-S203-A) sont requis dans l'efficacité de l'interaction de Knr4 avec certains de ses partenaires.

#### La mutation Knr4\*\*(S200A-S203A) entraîne-t-elle une modification de l'activité transcriptionnelle de la protéine Rlm1 ?

La facteur de transcription Rlm1 est l'une des cibles directe de la MAP kinase Slt2, qui joue un rôle essentiel dans l'activation de nombreux gènes pariétaux tels que *FKS1*, *FKS2*, *MNN1*, *KTR2*, *CHS3*. Il a été récemment montré que la présence de Knr4 est nécessaire à l'activation de Rlm1 par Slt2 (Martin-Yken H. *et coll.*, 2003). Nous nous sommes intéressés à mettre en évidence l'effet physiologique de la protéine Knr4\*\*<sup>(S200A-S203A)</sup> sur l'activité transcriptionnelle de Rlm1. Afin de quantifier l'activité de Rlm1, le plasmide pHSP100 qui exprime la protéine de fusion lexA-Rlm1 permettant l'activation Rlm1-dépendante du gène rapporteur *LacZ* a été introduit dans la souche W303 (sauvage), la souche mutante HM13 (*Δknr4*) ainsi que cette souche ayant été transformée au préalable avec pFB1 (gène muté *KNR4\*\**) ou pHM38 (*KNR4*)

	Activité $\beta$ -galactosidase (nmol/mg.min protéines)
Wt pRS316-pHSP100	85,17
$\Delta knr4$ pRS316-pHSP100	24,41
$\Delta knr4$ pHM38-pHSP100	83,90
$\Delta knr4$ pFB1-pHSP100	111,38

**Tableau 24 : Quantification de l'activité  $\beta$ -galactosidase du facteur de transcription Rlm1. Cette analyse a été réalisée dans une souche  $\Delta knr4$  transformée par le plasmide pFB1 portant le gène muté  $KNR4^{**}$  et le plasmide pHSP100 permettant de mesurer l'activité transcriptionnelle de Rlm1.**

Nos résultats montrent que dans le cas des contrôles réalisés, la souche W303 ( $KNR4^+$ ) transformée par les plasmides pRS316 et pHSP100 montre une activité très proche de celle de la souche HM13 ( $\Delta knr4$ ) transformée par le plasmide pHM38 exprimant  $KNR4$  et le plasmide pHSP100. En accord avec nos précédents résultats (Martin-Yken *et coll.*, 2003), cette activité est réduite de 4 fois dans la souche HM13 ( $\Delta knr4$ ) transformée par le plasmide vide pRS316 et le plasmide pHSP100. Cependant, nous observons que l'activité transcriptionnelle de Rlm1 mesurée dans la souche HM13 ( $\Delta knr4$ ) transformée par les plasmides pFB1 exprimant le variant  $Knr4^{(S200A-S203A)}$  et le plasmide pHSP100 est équivalente à celle mesurée dans le cas de la souche la HM13 ( $\Delta knr4$ ) qui exprime  $KNR4$  (wild type). Ces résultats permettent de penser que l'interaction réduite (de 3 fois) entre  $Knr4^{(S200A-S203A)}$  et Slt2 (montré ci dessus), est toujours suffisante pour assurer l'activité de Rlm1.

#### **L'interaction entre $Knr4^{(S200A-S203A)}$ -Tys1 est-elle requise pour assurer une sporulation efficace ?**

Nous avons déjà montré que l'efficacité de la sporulation est réduite dans une souche diploïde homozygote  $\Delta knr4/\Delta knr4$ . Un test de l'efficacité de sporulation a été réalisé dans une souche  $\Delta knr4/\Delta knr4$  transformée avec le plasmide pOBD80- $knr4^{**}$ (SS-AA). Nous avons constaté que l'efficacité de sporulation a été récupérée ce qui semble indiquer que l'interaction entre  $Knr4$  et Tys1 n'interviendrait pas sur cette efficacité

#### **4.3.2.2 Les deux résidus sérines Ser200 et Ser203 affectent-elle l'activité de $Knr4$ ?**

Nous avons également cloné le gène muté  $KNR4^{**}$  dans un plasmide centromérique pRS316, permettant d'obtenir le plasmide pFB1 sous la dépendance du promoteur de  $KNR4$ . Nous nous sommes intéressés à savoir si cette construction complémente le phénotype de mutant  $knr4\Delta$ . Pour cela, nous avons réalisé différents tests phénotypiques (sensibilité au

blanc de Calcuofluor, Rouge congo, SDS, Température, Acide sorbique, Figure 38)., réalisés dans deux fonds génétiques différents, l'un dans la souche AR27 transformée par le plasmide centromérique pRS316 et la souche HM10 interrompue dans le gène *KNR4* transformée respectivement par les plasmide pRS316, pHM38 et le plasmide pFB1. L'autre fond génétique utilisé est la souche Euroscarf BY4741 sauvage (BY4741) et délétée pour le gène *KNR4*.

Dans le cas du fond génétique AR27, les tests montrent que pFB1 complète relativement bien le phénotype de *KNR4*. Nous pouvons constater que sur le test au blanc de Calcuofluor (plusieurs transformants sont testés), la souche HM10 transformée par le plasmide pFB1 pousse plus lentement que la souche HM10 transformée par le plasmide centromérique pHM38 (contrôle positif) et aussi moins vite que la souche AR27 transformée par le plasmide pRS316 (plasmide simple copie). Par contre, sur les autres tests, nous constatons que la souche HM10 transformée par le plasmide pFB1 pousse d'une façon comparable à celle des contrôles. Dans le fond génétique BY4741, l'allèle mutant de *KNR4* complète aussi les phénotypes de  $\Delta knr4$  et les résultats obtenus sont similaires à ceux effectués dans le fond génétique de la souche AR27 (non montré).

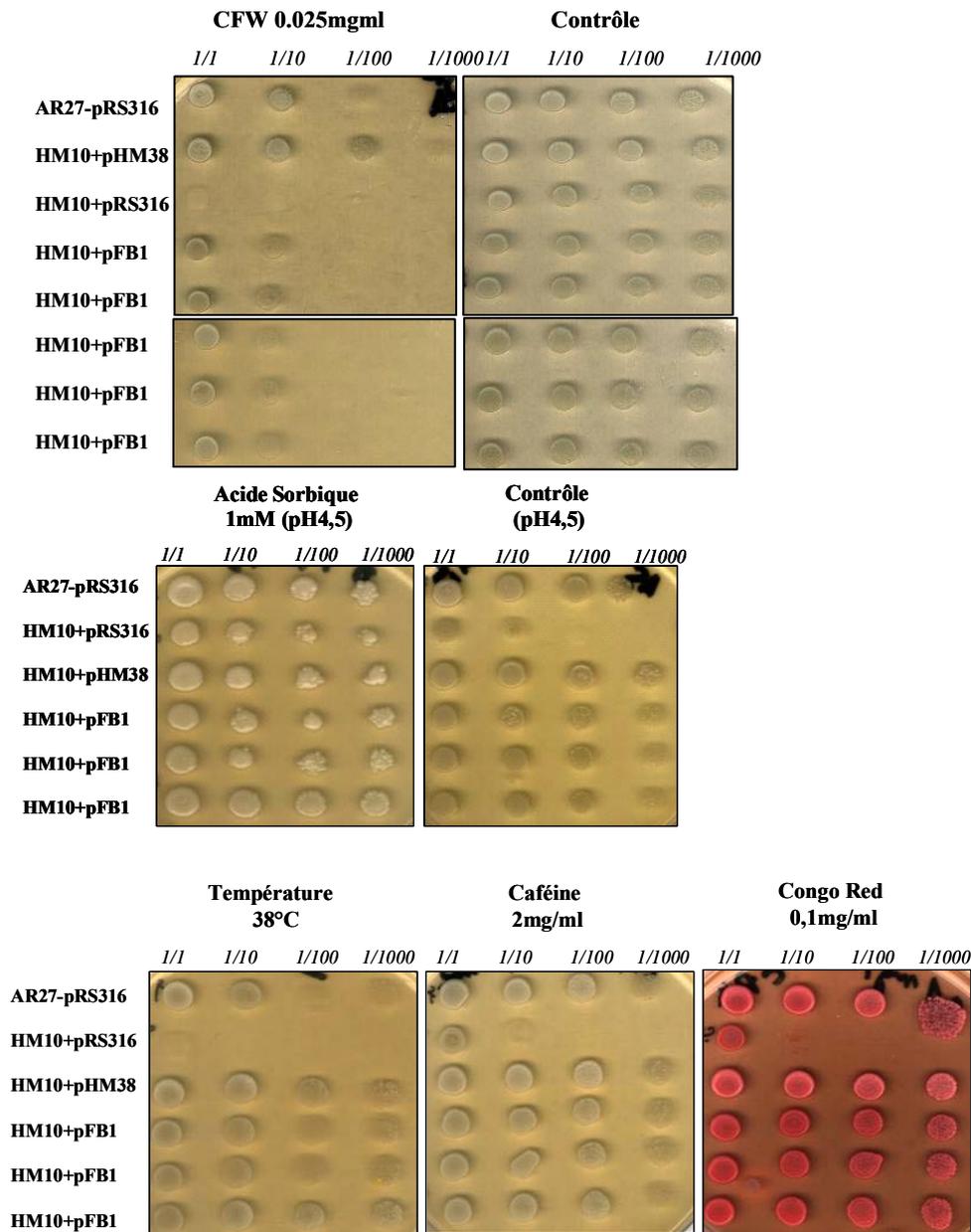
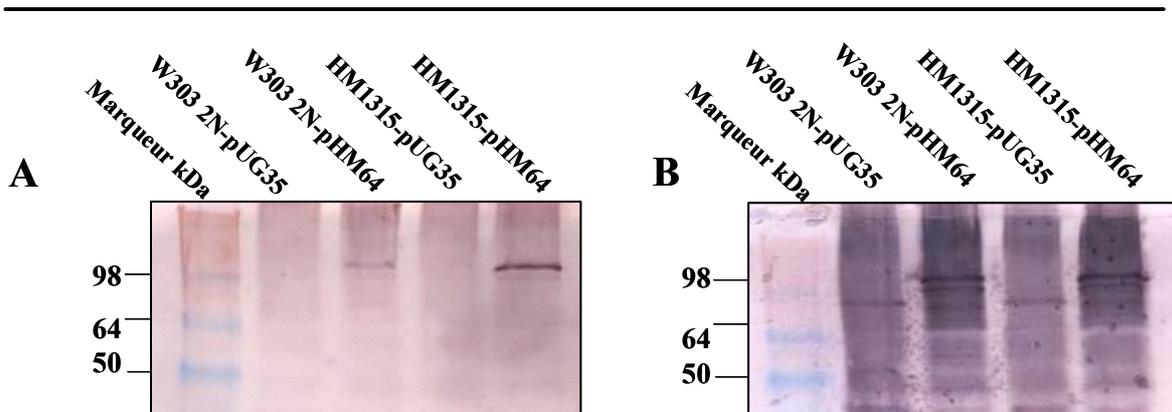


Figure 38: Complémentation de la délétion *knr4* par l'allèle mutant dans la souche AR27. La photographie est prise après 2 jours de croissance à 30°C.

#### 4.3.2.3 La mutation des sites de phosphorylation Ser200 et Ser203 n'affecte pas la localisation de la protéine Knr4.

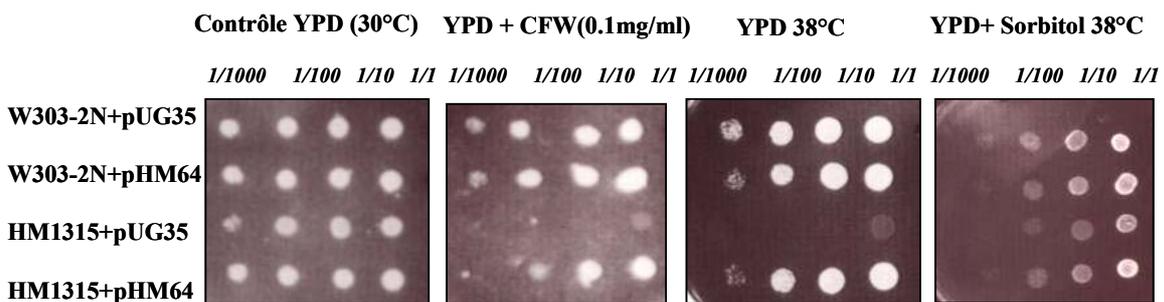
Dans le but de vérifier la localisation du variant de la protéine  $\text{Knr4}^{(\text{S}200\text{A},\text{S}203\text{A})}$ , nous avons construit une protéine de fusion entre  $\text{Knr4}^{(\text{S}200\text{A}-\text{S}203\text{A})}$  et la GFP (Green Fluorescent Protein) (Chalfie M. *et coll.*, 1994). La construction pHM64 (produisant  $\text{Knr4}^{(\text{S}200\text{A}-\text{S}203\text{A})}$ -GFP) est réalisée à partir du vecteur centomérique contenant *GFP* dans le plasmid pUG35. Dans un premier temps nous avons voulu tester l'expression de la protéine Knr4 dans le

plasmide pHM64. Pour cela, la souche diploïde W303-2N a été transformée par le plasmide pHM64 et par le plasmide pUG35.



**Figure 39 : Vérification de l’expression de la fusion Knr4\*\*-GFP. Un western-blot a été réalisé, A- la membrane a été révélée en utilisant des anticorps anti-Knr4. B- la membrane a été révélée en utilisant des anticorps anti-GFP.**

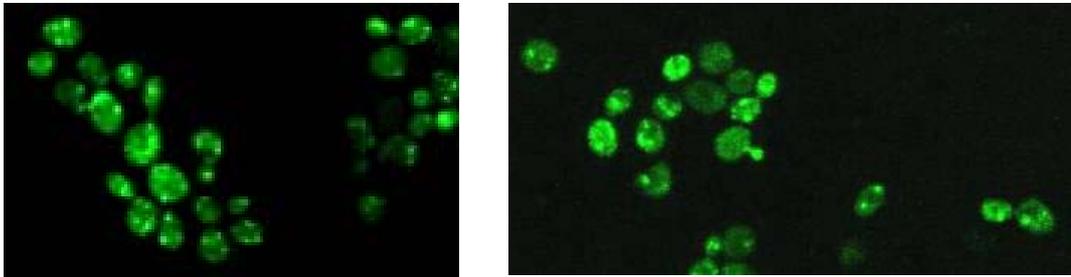
Nous avons également transformé la souche HM1315 ( $\Delta knr4/\Delta knr4$ ) interrompue pour le gène *KNR4* par le plasmide pHM64 et le plasmide pUG35. Un Western-blot a été réalisé pour tester l’expression de la protéine Knr4\*\* dans ces souches (Figure 39). Comme indiqué à la figure 39, les anticorps anti-GFP et anti-Knr4 reconnaissent bien la protéine mutée Knr4\*\* fusionnée à GFP, et que cette construction complète les phénotypes du mutant *knr4D* vis à vis de la sensibilité au blanc de calcofluor et de la température 38°C (Figure 40).



**Figure 40 : Test de sensibilité au blanc de calcofluor (CFW) et à la température 38°C de la souche HM1315( $\Delta knr4$ ) transformée par le plasmide pHM64 portant la fusion Knr4<sup>(S200A-S203A)</sup>-GFP.**

Enfin, l’observation en microscopie des cellules HM1315 transformées par le plasmide pHM64 exprimant la protéine de fusion Knr4<sup>(S200A-S203A)</sup>-GFP a permis de constater que la localisation de la protéine de fusion Knr4<sup>(S200A-S203A)</sup>-GFP est comparable à celle de la

protéine sauvage. Ainsi, dans les deux cas nous observons dans les cellules sans bourgeon des taches vertes aux endroits présumés de l'émergence du bourgeon, et dans les cellules en division, au niveau du col du bourgeon (Figure 41).



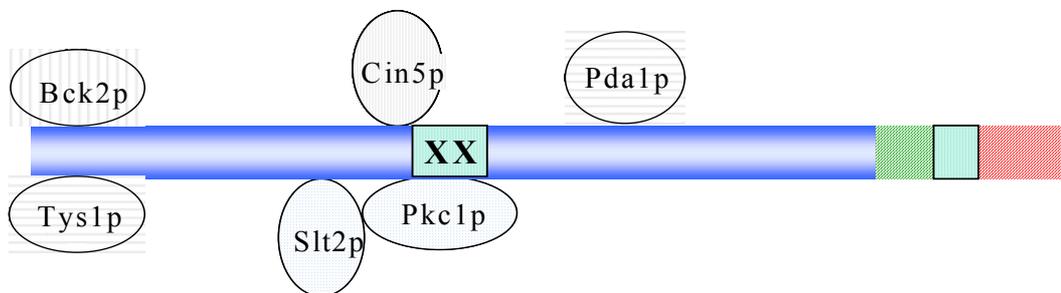
---

**Figure 41 : La localisation de Knr4-GFP (panneau de gauche) et de Knr4<sup>(S200A-S203A)</sup>-GFP – (panneau de droite) est observée dans le cytoplasme et au col du bourgeon. L'observation des cellules a été réalisée par la microscopie de fluorescence.**

---

### 4.3.3 Discussion

Les résultats que nous avons obtenus concernant l'étude des domaines de Knr4 d'interaction avec certains de ses partenaires, indiquent que les régions de Knr4 impliquées dans ces interactions sont réparties sur les deux tiers du côté N-terminal de Knr4. La partie C-terminale localisée entre les résidus 372 et 505aa contenant les deux régions putatives « coiled-coil », n'est pas impliquée dans ces interactions. D'une façon intéressante, il a été constaté que dans la partie de Knr4 qui est nécessaire à la plupart de ces interactions, se trouvent en amont ou au voisinage des deux résidus de sérines identifiés comme phosphorylés "in vivo" (Figure 42).



**Figure 42 : Vue globale des différents fragments délétés de *KNR4* montrant les domaines de Knr4 impliqués dans son interaction avec ses partenaires.**

Il est à noter que les deux sérines S200 et S203 sont localisées précisément dans la région de "low complexity" prédite par "SMART". Ces régions séparent habituellement deux domaines d'une protéine. La localisation de ces deux sérines les rendent donc probablement plus accessibles à la phosphorylation. Par contre, elle les rend moins susceptibles d'être à l'intérieur d'un site actif, et donc d'être moins impliquées dans la fonction de Knr4. Il est possible que la mutation à ces sites de phosphorylation affecte la conformation de la protéine Knr4, empêchant ainsi son interaction avec certains de ses partenaires.

## 5 Conclusion générale et perspectives.

Le gène *KNR4* avait initialement été cloné par complémentation d'un mutant résistant à la toxine killer K9. Le gène *KNR4* code une protéine soluble, présentant 5 domaines PEST impliqués dans la dégradation rapide des protéines, et de nombreux sites potentiels de phosphorylation par différentes kinases. Sa délétion entraîne de fortes variations de la teneur en  $\beta(1,3)$  glucanes et en chitine dans la paroi. Cette protéine est localisée au niveau du col de bourgeon entre les cellules mères et filles dans les cellules en division (Martin H. *et coll.*, 1999, Hu W.K. *et coll.*, 2002). La disruption de *KNR4* engendre des phénotypes caractéristiques des mutants de la paroi: augmentation de la sensibilité cellulaire au SDS, sensibilité au calcofluor blanc, acide sorbique et la caspofungine. La disruption du gène *KNR4* provoque un arrêt de croissance à 37°C, remédiable en présence d'un stabilisateur osmotique dans le milieu. De plus, la perte de cette protéine provoque une déficience dans la sporulation.

Cette thèse a été consacrée à l'étude fonctionnelle de Knr4, et plus particulièrement, à la recherche de ses partenaires protéiques principalement par les approches de double-hybride et de purification par affinité (TAP-tag). Nos résultats présentés ont apporté quelques réponses concernant la fonction et la structure de Knr4. Cependant, malgré toutes ces données biochimiques et génétiques, le rôle de Knr4 dans la synthèse de la paroi n'est toujours pas beaucoup plus clair, bien que des arguments décisifs pour affirmer que cette protéine est impliquée dans la coordination entre la synthèse de la paroi cellulaire et le processus de bourgeonnement ont été présentés. Et donc la question brûlante qui demeure est 'comment' exerce-t-elle cette fonction avec ses partenaires ?

### 5.1 La structure atypique et l'instabilité de la protéine Knr4 sont-elles des avantages fonctionnels ?

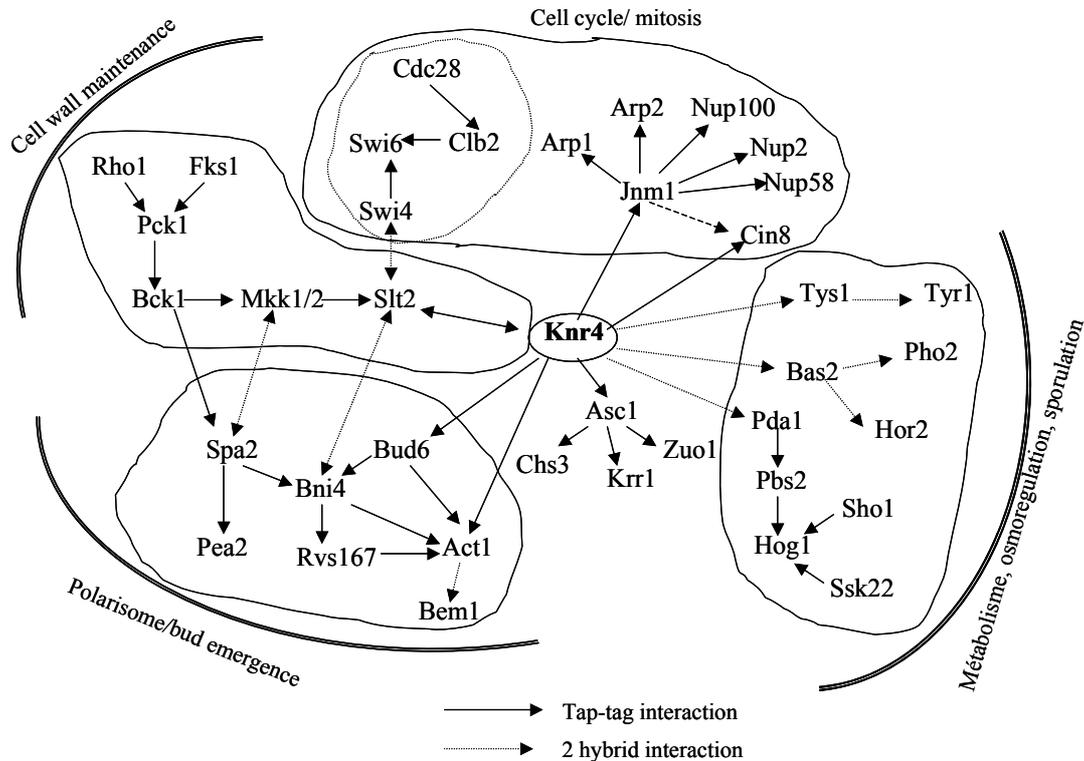
Les analyses en Western Blot comparées à celle de RT-PCR quantitative nous ont permis de mettre en évidence que Knr4 est soumise à une dégradation importante à l'entrée des cellules en phase diauxique sur milieu YPD. Le mécanisme sous-jacent à cette rapide dégradation reste à élucider. Toutefois, nos analyses "*in silico*" de Knr4 utilisant différents logiciels disponibles sur Internet indiquent que Knr4 est une protéine peu structurée. De plus, il est impossible de déduire la structure 3D de la protéine. Nous cherchons actuellement à cristalliser Knr4 par 'petits' fragments afin d'en établir une probable structure 3D (collaboration avec le Pr Van Tilbeurgh de la plate-forme de génomique structurale d'Orsay-Gif sur Yvette). Les résultats préliminaires que nous avons obtenus en étudiant les

interactions des différents fragments de la protéine tronquée Knr4 avec plusieurs de ses partenaires laissent à penser que une structure désorganisée atypique mais intéressante pour accomplir diverses interactions fonctionnelles. Donc, il est tout à fait possible que Knr4 soit une protéine de type « scaffold » assurant la mise en contact d'autres protéines devant interagir entre elles dans une voie de transmission du signal. Ainsi, la cristallisation de la protéine Knr4 pourrait être complétée par une analyse utilisant la RMN, sur des fragments ciblés, comme notamment le fragment N et C-terminal. Ces analyses peuvent permettre d'étudier la protéine Knr4 en solution, ce qu'on ne peut pas observer par la cristallisation de cette protéine.

L'une des spécificités de la séquence de Knr4 est la présence de 5 régions PEST, caractéristiques des protéines à courte durée de vie. Ces régions sont reconnues par le complexe Ubiquitine-protéasome qui assure leur dégradation. Knr4 étant dégradée très rapidement, il est possible qu'elle soit une cible de ce complexe. Plusieurs techniques sont envisagées pour déterminer si Knr4 est effectivement ubiquitinylée *in vivo*, et dans quelles conditions. Répondre à ces questions nous permettra de comprendre si Knr4 a effectivement une fonction de régulation fine, qui implique que cette protéine n'est présente dans la cellule que de façon temporaire, en réponse à un signal ou à un moment précis du cycle cellulaire. Une étude utilisant différentes souches portant chacune des délétions simples ou doubles des gènes de l'ubiquitine *Aubc* (*Aubc1*, *Auba1*, *Aubc5/ubc6* et *Aubc4/ubc5*) est en cours. De plus, il est envisagé de réaliser une mutagenèse dirigée sur ces régions PEST et d'analyser la durée de vie de ces protéines modifiées et les phénotypes associés.

## **5.2 Réseau de l'interactome de Knr4, le lien entre synthèse de la paroi cellulaire et le bourgeonnement pendant la croissance cellulaire.**

Les données obtenues par l'approche de double hybride et la purification par affinité (TAP-tag) ont permis d'obtenir une meilleure compréhension concernant le rôle de la protéine Knr4. Comme attendu, nous avons observé que le recouvrement entre les 3 méthodes (TAP-tag, double-hybride et le crible de la létalité synthétique) est assez faible. Cependant, les résultats de ces trois méthodes ramènent au même processus biologique dans lequel Knr4 est impliquée. L'ensemble des protéines identifiées comme partenaires de Knr4 a permis d'établir une carte d'un réseau d'interactions "*in vivo*" rassemblant tous les partenaires protéiques de Knr4 (Figure 43).



**Figure 43 : Réseau de l'interaction de Knr4. Ce schéma regroupe les résultats des approches 'physiques' d'interaction (TAPtag et double hybride) identifiés avec Knr4.**

Sur ce schéma, on peut proposer que Knr4 joue un rôle de connecteur physique entre la voie de l'intégrité pariétale Pck1 et le complexe du polarisome (Bni1, Bud6, Spa2, Pea2 et Rvs167), dont la fonction principale est de stimuler la croissance cellulaire polarisée (Pruyne D. et Bretscher A., 2000a; Sheu Y. J. *et coll.*, 1998). Ce rôle de connexion de Knr4 n'est cependant pas essentiel. En effet, contrairement au mutant  $\Delta spa2$ , la perte de *KNR4* ne provoque que de faibles phénotypes liés à la morphogénèse (van Drogen F. et Peter M., 2002) (base des données morphologiques de *S.cerevisiae* <http://yeast.gi.k.u/tokyo.ac.jp/>). De plus, du fait que les deux protéines Act1 et Bud6p interagissent fortement ensemble, il est possible que ces deux dernières puissent jouer un rôle de médiateur dans l'interaction entre la voie de signalisation cellulaire et le polarisome et que l'interaction de Knr4 avec une d'entre elles soit indirecte (Evangelista M. *et coll.*, 1997; Fujiwara T. *et coll.*, 1998; Sheu Y. J. *et coll.*, 1998).

D'autre part, l'interaction entre Knr4 et Jnm1 suggère une contribution de Knr4 dans les processus du point de contrôle de la synthèse de la paroi "cell wall integrity checkpoint" et la mitose. Jnm1 est un composant du complexe de dynactine dont l'implication dans ce processus a récemment été démontrée (Suzuki M. *et coll.*, 2004). Plusieurs arguments sont en

faveur de cette hypothèse. Le premier est la régulation de l'expression de *KNR4* au cours du cycle cellulaire. La présence dans le promoteur du gène *KNR4* d'une boîte SCB d'activation de la transcription par le facteur de transcription SBF permet en effet de penser que son expression est activée à la transition G1/S du cycle cellulaire (Igual J. C. *et coll.*, 1996). Le deuxième argument en faveur de l'implication de Knr4 dans le point de contrôle de la synthèse de la paroi cellulaire est le fait que les mutants *knr4* sont sensibles à une température de 39°C (Fishel B. R. *et coll.*, 1993), et s'arrêtent à la phase du petit bourgeon. Ce phénotype est très similaire à celui du mutant *fks1<sup>ts</sup>*, déficient pour l'activité  $\beta(1,3)$  glucane synthase à 37°C (Suzuki M. *et coll.*, 2004). De plus, ces résultats sont en accord avec les données montrant que la perte de fonction de *KNR4* provoque une réduction de 50% de l'activité  $\beta(1,3)$  glucane synthase (Hong Z. *et coll.*, 1994a). Un troisième argument, est le fait que le mutant  $\Delta jnm1$  présente des phénotypes associés à la déficience de la paroi cellulaire. Ces phénotypes observés sont similaires à ceux de mutant  $\Delta knr4$ , et pourraient s'expliquer par une perte de l'interaction entre Knr4 et Jnm1. L'ensemble de ces arguments suggèrent que la protéine Knr4 peut jouer un rôle d'intermédiaire entre la voie de signalisation cellulaire et le « cell wall checkpoint ». Ce positionnement permettrait à la voie Pkc1-Slt2 de remédier à la déficience de la paroi cellulaire en stimulant l'activation des gènes régulateurs de la paroi cellulaire à travers les facteurs de transcription Rlm1 et SBF. En effet, Rlm1 joue un rôle essentiel dans l'activation de nombreux gènes pariétaux (Jung U. S. et Levin D. E., 1999). De son côté, le facteur de transcription SBF est un hétérodimère composé d'une sous-unité régulatrice, codée par le gène *SWI6*, et d'une sous-unité catalytique, Swi4p (Madden K. *et coll.*, 1997). Les deux facteurs de transcription Swi4 et Swi6 activent l'expression des gènes de la transition G1/S du cycle cellulaire et en particulier les gènes *CLN1* et *CLN2*. Ils activent également la transcription des gènes de synthèse de la paroi cellulaire (Igual J. C. *et coll.*, 1996; Iyer V. R. *et coll.*, 2001). Autrement dit, cette activation permet de contourner le « cell wall integrity checkpoint » et la progression du cycle cellulaire.

Les analyses de l'interaction de Knr4 ont permis de mettre en évidence le réseau de l'interactome de Knr4. Etudier le sens de l'interaction d'une part, entre Knr4 et Slt2 et d'autre part de Knr4 avec la protéine Jnm1 pourra permettre de mieux comprendre sa fonction. Il sera envisageable de réaliser également une recherche des partenaires protéiques de Knr4 dans les conditions de sporulation, car il est possible que cette analyse permette de caractériser d'autres partenaires de Knr4.

**Le mécanisme moléculaire de l'interaction entre Knr4 et la voie Pkc1-Slt2, Knr4 joue-t-il un rôle de connecteur entre la voie de signalisation Pkc-Slt2 et le « cell wall integrity checkpoint » ?**

Une étude approfondie permettant de mieux affiner le positionnement de Knr4 dans le contrôle de l'intégrité cellulaire est une priorité pour une meilleure compréhension du rôle de Knr4. Une interaction physique entre Knr4 et Slt2 a été mise en évidence (Martin-Yken H. *et coll.*, 2003). Mais plusieurs questions restent sans réponse : Comment Knr4 dirige-t-elle la MAP kinase Slt2 vers l'une ou l'autre de ses cibles, et ce en réponse à quels signaux ? Knr4 est-elle une sorte de « scaffolding protein », assurant un rôle de squelette, de structure, capable de mettre en contact (et dans la conformation *adéquate*), la MAP kinase et ses substrats ? Ou, à l'inverse, Knr4 modifie-t-elle Slt2, altérant ainsi l'affinité de la MAP kinase pour ses différents substrats ? Et, dans les deux cas, d'autres partenaires encore non-identifiés sont-ils nécessaires à cette interaction ? Des expériences seront réalisées *in vitro* en incubant d'une part, Slt2 immunoprécipitée avec la protéine Knr4 purifiée, et d'autre part avec des extraits bruts de levures contrôles et inactivées pour le gène *KNR4*. Les substrats Rlm1 et SBF seront exprimés dans des systèmes hétérologues et purifiés, afin d'être utilisés dans ces essais. De plus, il serait intéressant de tester l'activité *in vitro* de la protéine Knr4\*\* (mutant obtenu par remplacement de deux résidus de sérine Ser200 et Ser203 par deux résidus d'alanine), dans des essais de phosphorylation de Rlm1 et/ou SBF par Slt2, et ainsi d'établir si les résidus Ser200 et Ser203 sont impliqués ou non dans l'activité de Knr4. Il a été très récemment montré que la protéine Hsp90 interagit avec la MAP kinase Slt2 (Millson S. H. *et coll.*, 2005). Cette interaction est renforcée dans les conditions de stress « *in vivo* » (caféine, choc thermique). De plus, cette étude a montré que la fonction de Hsp90 est requise pour la double phosphorylation de Slt2 afin de permettre à cette dernière d'activer l'un de ses substrats, le facteur de transcription Rlm1. Il semble que l'association entre Slt2 et Hsp90 est essentielle pour l'activité MAP kinase de Slt2. D'autre part, Martin-Yken et coll. (2003) ont montré que dans les conditions de choc thermique, Knr4 est requise pour l'activation de Slt2. Ces résultats peuvent permettre de penser que les protéines Knr4 et Hsp90 jouent ensemble un rôle dans l'activité de MAP kinase Slt2. Nous réaliserons un test d'interaction entre Hsp90 et Knr4 par une approche de double hybride. Nous testerons également la létalité synthétique entre les deux délétions codant respectivement les deux protéines Hsp90 et Knr4. De plus il sera envisageable d'analyser l'activité de Slt2 dans ce double mutant.

**Complémentarité de Knr4 de levure avec les autres organismes.**

Etant donné que le gène *KNR4* a des homologues chez la plupart des levures et champignons mais pas chez les eucaryotes supérieurs, nous souhaitons cloner certains de ces homologues et les exprimer chez *S.cerevisiae* afin d'établir si la fonction de Knr4 est conservée entre ces espèces. Ce travail est déjà entrepris avec les gènes homologues de *KNR4* chez *Candida albicans* (deux gènes distincts), *Neurospora crassa* et *Ashbya gossypii*. Ils seront suivis par ceux de *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Magnaporthe grisea* et *Yarrowia lipolytica*. Etant donné le rôle de Knr4 dans le couplage entre le déroulement du cycle cellulaire et l'intégrité pariétale, la possibilité que sa fonction soit conservée parmi ces différentes espèces est très attrayante. Cette étude pourra être complétée par une analyse des phénotypes des mutants de délétion de ces gènes orthologues dans les différentes espèces considérées. En particulier, des effets sur le déroulement du cycle cellulaire chez *Schizosaccharomyces pombe* et sur la pathogénicité chez *Candida albicans* pourraient être envisageables.

## 6 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- Abe M., Nishida I., Minemura M., Qadota H., Seyama Y., Watanabe T., et Ohya Y.,** 2001. Yeast 1,3-beta-glucan synthase activity is inhibited by phytosphingosine localized to the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 276:26923-26930.
- Adams A. E., Botstein D., et Drubin D. G.,** 1989. A yeast actin-binding protein is encoded by SAC6, a gene found by suppression of an actin mutation. *Science.* 243:231-233.
- Adams A. E., Johnson D. I., Longnecker R. M., Sloat B. F., et Pringle J. R.,** 1990. CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* 111:131-142.
- Adams A. E. et Pringle J. R.,** 1984. Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* 98:934-945.
- Aebersold R. et Mann M.,** 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 422:198-207.
- Aguilar-Uscanga B. et Francois J. M.,** 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett.Appl.Microbiol.* 37:268-274.
- Al Aidroos K. et Bussey H.,** 1978. Chromosomal mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the cell wall binding site for killer factor. *Can.J.Microbiol.* 24:228-237.
- Amberg D. C., Zahner J. E., Mulholland J. W., Pringle J. R., et 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.* 8:729-753.
- Amon A., Irniger S., et Nasmyth K.,** 1994. Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell.* 77:1037-1050.
- Andrews B. J. et Herskowitz I.,** 1989. The yeast SWI4 protein contains a motif present in developmental regulators and is part of a complex involved in cell-cycle-dependent transcription. *Nature.* 342:830-833.
- Andrews P. D. et Stark M. J.,** 2000. Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J.Cell Sci.* 113 ( Pt 15):2685-2693.
- Ashe M. P., De Long S. K., et Sachs A. B.,** 2000. Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Mol.Biol Cell.* 11:833-848.
- Ataoglu H., Dogan M. D., Mustafa F., et Akarsu E. S.,** 2000. *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannans produce fever in rats: role of nitric oxide and cytokines. *Life Sci.* 67:2247-2256.

- Azuma M., Levinson J. N., Page N., et Bussey H.**, 2002. Saccharomyces cerevisiae Big1p, a putative endoplasmic reticulum membrane protein required for normal levels of cell wall beta-1,6-glucan. *Yeast*. 19:783-793.
- Baetz K., Moffat J., Haynes J., Chang M., et Andrews B.**, 2001. Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol.Cell Biol*. 21:6515-6528.
- Baguley B. C., Rommele G., Gruner J., et Wehrli W.**, 1979. Papulacandin B: an inhibitor of glucan synthesis in yeast spheroplasts. *Eur.J.Biochem*. 97:345-351.
- Balasubramanian M. K., Bi E., et Glotzer M.**, 2004. Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr.Biol*. 14:R806-R818.
- Ballou C. E.**, 1990. Isolation, characterization, and properties of Saccharomyces cerevisiae mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol*. 185:440-470.
- Ballou L., Hitzeman R. A., Lewis M. S., et Ballou C. E.**, 1991. Vanadate-resistant yeast mutants are defective in protein glycosylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:3209-3212.
- Banuett F.**, 1998. Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol.Mol.Biol.Rev*. 62:249-274.
- Baroni M. D., Monti P., et Alberghina L.**, 1994. Repression of growth-regulated G1 cyclin expression by cyclic AMP in budding yeast. *Nature*. 371:339-342.
- Barral Y., Mermall V., Mooseker M. S., et Snyder M.**, 2000. Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Mol.Cell*. 5:841-851.
- Bartunek M., Jelinek O., et Vondrejs V.**, 2001. Susceptibility of individual cells of Saccharomyces cerevisiae to the killer toxin K1. *Biochem.Biophys.Res.Commun*. 283:526-530.
- Baudin A., Ozier-Kalogeropoulos O., Denouel A., Lacroute F., et Cullin C.**, 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Res*. 21:3329-3330.
- Beaulieu D., Tang J., Yan S. B., Vessels J. M., Radding J. A., et Parr T. R., Jr.**, 1994. Characterization and cilofungin inhibition of solubilized Aspergillus fumigatus (1,3)-beta-D-glucan synthase. *Antimicrob.Agents Chemother*. 38:937-944.
- Beaulieu D., Tang J., Zeckner D. J., et Parr T. R., Jr.**, 1993. Correlation of cilofungin in vivo efficacy with its activity against Aspergillus fumigatus (1,3)-beta-D-glucan synthase. *FEMS Microbiol.Lett*. 108:133-137.
- Bender A. et Pringle J. R.**, 1989. Multicopy suppression of the cdc24 budding defect in yeast by CDC42 and three newly identified genes including the ras-related gene RSR1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:9976-9980.

- Bender A. et Pringle J. R.**, 1991. Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 11:1295-1305.
- Bender A. et Pringle J. R.**, 1992. A Ser/Thr-rich multicopy suppressor of a *cdc24* bud emergence defect. *Yeast.* 8:315-323.
- Benton B. K., Tinkelenberg A. H., Jean D., Plump S. D., et Cross F. R.**, 1993. Genetic analysis of *Cln/Cdc28* regulation of cell morphogenesis in budding yeast. *EMBO J.* 12:5267-5275.
- Blomberg A. et Adler L.**, 1989. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 171:1087-1092.
- Boles E., Schulte F., Miosga T., Freidel K., Schluter E., Zimmermann F. K., Hollenberg C. P., et Heinisch J. J.**, 1997. Characterization of a glucose-repressed pyruvate kinase (Pyk2p) in *Saccharomyces cerevisiae* that is catalytically insensitive to fructose-1,6-bisphosphate. *J Bacteriol.* 179:2987-2993.
- Bonilla M. et Cunningham K. W.**, 2003. Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca<sup>2+</sup> is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol.Cell Biol.* 14:4296-4305.
- Bony M., Thines-Sempoux D., Barre P., et Blondin B.**, 1997. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J.Bacteriol.* 179:4929-4936.
- Boone C., Sdicu A., Laroche M., et Bussey H.**, 1991. Isolation from *Candida albicans* of a functional homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* KRE1 gene, which is involved in cell wall beta-glucan synthesis. *J.Bacteriol.* 173:6859-6864.
- Boone C., Sommer S. S., Hensel A., et Bussey H.**, 1990. Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J.Cell Biol.* 110:1833-1843.
- Bose I., Irazoqui J. E., Moskow J. J., Bardes E. S., Zyla T. R., et Lew D. J.**, 2001. Assembly of scaffold-mediated complexes containing Cdc42p, the exchange factor Cdc24p, and the effector Cla4p required for cell cycle-regulated phosphorylation of Cdc24p. *J.Biol Chem.* 276:7176-7186.
- Bostian K. A., Hopper J. E., Rogers D. T., et Tipper D. J.**, 1980. Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA encodes toxin. *Cell.* 19:403-414.
- Bourdineaud J. P., van der Vaart J. M., Donzeau M., de Sampaio G., Verrips C. T., et Lauquin G. J.**, 1998. Pmt1 mannosyl transferase is involved in cell wall incorporation of several proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* 27:85-98.
- Bourne H. R., Sanders D. A., et McCormick F.**, 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* 349:117-127.

- Bradford M. M.**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-254.
- Briza P., Breitenbach M., Ellinger A., et Segall J.**, 1990a. Isolation of two developmentally regulated genes involved in spore wall maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 4:1775-1789.
- Briza P., Eckerstorfer M., et Breitenbach M.**, 1994. The sporulation-specific enzymes encoded by the DIT1 and DIT2 genes catalyze a two-step reaction leading to a soluble LL-dityrosine-containing precursor of the yeast spore wall. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:4524-4528.
- Briza P., Ellinger A., Winkler G., et Breitenbach M.**, 1990b. Characterization of a DL-dityrosine-containing macromolecule from yeast ascospore walls. *J.Biol.Chem.* 265:15118-15123.
- Brockerhoff S. E. et Davis T. N.**, 1992. Calmodulin concentrates at regions of cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* 118:619-629.
- Brown J. L. et Bussey H.**, 1993. The yeast KRE9 gene encodes an O glycoprotein involved in cell surface beta-glucan assembly. *Mol.Cell Biol.* 13:6346-6356.
- Brown J. L., Bussey H., et Stewart R. C.**, 1994. Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *EMBO J.* 13:5186-5194.
- Brown J. L., Jaquenoud M., Gulli M. P., Chant J., et Peter M.**, 1997. Novel Cdc42-binding proteins Gic1 and Gic2 control cell polarity in yeast. *Genes Dev.* 11:2972-2982.
- Brown J. L., Kossaczka Z., Jiang B., et Bussey H.**, 1993. A mutational analysis of killer toxin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* identifies new genes involved in cell wall (1->6)-beta-glucan synthesis. *Genetics.* 133:837-849.
- Bulawa C. E.**, 1993. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu.Rev.Microbiol.* 47:505-534.
- Bulawa C. E., Slater M., Cabib E., Au-Young J., Sburlati A., Adair W. L., Jr., et Robbins P. W.**, 1986. The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis in vivo. *Cell.* 46:213-225.
- Bussey H.**, 1991. K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol.Microbiol.* 5:2339-2343.
- Bussey H., Saville D., Hutchins K., et Palfree R. G.**, 1979. Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 140:888-892.
- Bustin S. A.**, 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 29:23-39.

- Butty A. C., Perrinjaquet N., Petit A., Jaquenoud M., Segall J. E., Hofmann K., Zwahlen C., et Peter M.**, 2002. A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *EMBO J.* 21:1565-1576.
- Byers B.**, 1981. Cytology of the yeast life cycle. In the molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Strathern and J.R.Braod, eds.(New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Cabib E.**, 1991. Differential inhibition of chitin synthetases 1 and 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by polyoxin D and nikkomycins. *Antimicrob.Agents Chemother.* 35:170-173.
- Cabib E. et Bowers B.**, 1971. Chitin and yeast budding. Localization of chitin in yeast bud scars. *J Biol Chem.* 246:152-159.
- Cabib E., Roh D. H., Schmidt M., Crotti L. B., et Varma A.**, 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J.Biol.Chem.* 276:19679-19682.
- Cabib E., Sburlati A., Bowers B., et Silverman S. J.**, 1989. Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* 108:1665-1672.
- Cabib E., Silverman S. J., et Shaw J. A.**, 1992. Chitinase and chitin synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Gen.Microbiol.* 138 ( Pt 1):97-102.
- Cameron D. R., Cooper D. G., et Neufeld R. J.**, 1988. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Appl.Environ.Microbiol.* 54:1420-1425.
- Carrow D.**, 1996. Beta-1,3-D-glucan as a primary immune activator. *Townsend letter.* 86:
- Casamayor A. et Snyder M.**, 2002. Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Curr.Opin.Microbiol.* 5:179-186.
- Castro C., Ribas J. C., Valdivieso M. H., Varona R., del Rey F., et Duran A.**, 1995. Papulacandin B resistance in budding and fission yeasts: isolation and characterization of a gene involved in (1,3)beta-D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 177:5732-5739.
- Caviston J. P., Longtine M., Pringle J. R., et Bi E.**, 2003. The role of Cdc42p GTPase-activating proteins in assembly of the septin ring in yeast. *Mol.Biol.Cell.* 14:4051-4066.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., et Prasher D. C.**, 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 263:802-805.
- Chang F. et Peter M.**, 2003. Yeasts make their mark. *Nat.Cell Biol.* 5:294-299.
- Chant J., Corrado K., Pringle J. R., et Herskowitz I.**, 1991. Yeast BUD5, encoding a putative GDP-GTP exchange factor, is necessary for bud site selection and interacts with bud formation gene BEM1. *Cell.* 65:1213-1224.

- Chant J. et Pringle J. R.**, 1995. Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* 129:751-765.
- Chen G. C., Kim Y. J., et Chan C. S.**, 1997. The Cdc42 GTPase-associated proteins Gic1 and Gic2 are required for polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 11:2958-2971.
- Chenevert J., Corrado K., Bender A., Pringle J., et Herskowitz I.**, 1992. A yeast gene (BEM1) necessary for cell polarization whose product contains two SH3 domains. *Nature.* 356:77-79.
- Chenevert J., Valtz N., et Herskowitz I.**, 1994. Identification of genes required for normal pheromone-induced cell polarization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 136:1287-1296.
- Cho S., Park S. G., Lee d. H., et Park B. C.**, 2004. Protein-protein interaction networks: from interactions to networks. *J.Biochem.Mol.Biol.* 37:45-52.
- Choi J. H., Adames N. R., Chan T. F., Zeng C., Cooper J. A., et Zheng X. F.**, 2000. TOR signaling regulates microtubule structure and function. *Curr.Biol.* 10:861-864.
- Choi K. Y., Satterberg B., Lyons D. M., et Elion E. A.**, 1994. Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell.* 78:499-512.
- Choi W. J., Santos B., Duran A., et Cabib E.**, 1994. Are yeast chitin synthases regulated at the transcriptional or the posttranslational level? *Mol.Cell Biol.* 14:7685-7694.
- Chu S., DeRisi J., Eisen M., Mulholland J., Botstein D., Brown P. O., et Herskowitz I.**, 1998. The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science.* 282:699-705.
- Chuang J. S. et Schekman R. W.**, 1996. Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J Cell Biol.* 135:597-610.
- Cid V. J., Adamikova L., Cenamor R., Molina M., Sanchez M., et Nombela C.**, 1998. Cell integrity and morphogenesis in a budding yeast septin mutant. *Microbiology.* 144 ( Pt 12):3463-3474.
- Cid V. J., Adamikova L., Sanchez M., Molina M., et Nombela C.**, 2001. Cell cycle control of septin ring dynamics in the budding yeast. *Microbiology.* 147:1437-1450.
- Cid V. J., Duran A., del Rey F., Snyder M. P., Nombela C., et Sanchez M.**, 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Rev.* 59:345-386.
- Claret S., Gatti X., Doignon F., Thoraval D., et Crouzet M.**, 2005. The Rgd1p Rho GTPase-Activating Protein and the Mid2p Cell Wall Sensor Are Required at Low pH for Protein Kinase C Pathway Activation and Cell Survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot.Cell.* 4:4(8):1375-86-1386.

- Clark S. W. et Meyer D. I.**, 1994. ACT3: a putative centractin homologue in *S. cerevisiae* is required for proper orientation of the mitotic spindle. *J.Cell Biol.* 127:129-138.
- Clotet J., Gari E., Aldea M., et Arino J.**, 1999. The yeast ser/thr phosphatases *sit4* and *ppz1* play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol.Cell Biol.* 19:2408-2415.
- Coates N. J. et McColl S. R.**, 2001. Production of chemokines *in vivo* in response to microbial stimulation. *J.Immunol.* 166:5176-5182.
- Coluccio A., Bogengruber E., Conrad M. N., Dresser M. E., Briza P., et Neiman A. M.**, 2004. Morphogenetic pathway of spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot.Cell.* 3:1464-1475.
- Costigan C., Gehrung S., et Snyder M.**, 1992. A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol.Cell Biol.* 12:1162-1178.
- Cross F., Hartwell L. H., Jackson C., et Konopka J. B.**, 1988. Conjugation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu.Rev.Cell Biol.* 4:429-457.
- Cutler N. S., Pan X., Heitman J., et Cardenas M. E.**, 2001. The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Mol.Biol.Cell.* 12:4103-4113.
- Cvrckova F., De Virgilio C., Manser E., Pringle J. R., et Nasmyth K.**, 1995. Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes Dev.* 9:1817-1830.
- Cvrckova F. et Nasmyth K.**, 1993. Yeast G1 cyclins CLN1 and CLN2 and a GAP-like protein have a role in bud formation. *EMBO J.* 12:5277-5286.
- Czop J. K. et Austen K. F.**, 1985. A beta-glucan inhibitable receptor on human monocytes: its identity with the phagocytic receptor for particulate activators of the alternative complement pathway. *J.Immunol.* 134:2588-2593.
- D**agkessamanskaia A., Martin-Yken H., Basmaji F., Briza P., et Francois J., 2001. Interaction of Knr4 protein, a protein involved in cell wall synthesis, with tyrosine tRNA synthetase encoded by *TYS1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.Lett.* 200:53-58.
- Dallies N., Francois J., et Paquet V.**, 1998. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 14:1297-1306.
- Daran J. M., Dallies N., Thines-Sempoux D., Paquet V., et Francois J.**, 1995. Genetic and biochemical characterization of the *UGP1* gene encoding the UDP-glucose pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur.J.Biochem.* 233:520-530.
- DARKEN M. A.**, 1962. Absorption and transport of fluorescent brighteners by microorganisms. *Appl.Microbiol.* 10:387-393.

- Dawson K. A., Evans J., et Kudupoje M.**, 2001. Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. *In* Biotechnology in Feed Industry, Proceedings of Alltech's 17<sup>th</sup> Annual Symposium. Nottingham University Press. 169-181.
- de Groot P., Ruiz C., V. d. A. C. R., Duenas E., Cid V. J., Del Rey F., Rodriguez-Pena J. M., Perez P., Andel A., Caubin J., Arroyo J., Garcia J. C., Gil C., Molina M., Garcia L. J., Nombela C., et Klis F.**, 2001. A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp.Funct.Genom.* 2:124-142.
- de Jesus Ferreira M. C., Bao X., Laize V., et Hohmann S.**, 2001. Transposon mutagenesis reveals novel loci affecting tolerance to salt stress and growth at low temperature. *Curr.Genet.* 40:27-39.
- de la Pena P., Barros F., Gascon S., Lazo P. S., et Ramos S.**, 1981. Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol Chem.* 256:10420-10425.
- de Nobel H., Ruiz C., Martin H., Morris W., Brul S., Molina M., et Klis F. M.**, 2000. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology.* 146 ( Pt 9):2121-2132.
- De Nobel J. G., Klis F. M., Munnik T., Priem J., et van den E. H.**, 1990. An assay of relative cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 6:483-490.
- De Virgilio C., DeMarini D. J., et Pringle J. R.**, 1996. SPR28, a sixth member of the septin gene family in *Saccharomyces cerevisiae* that is expressed specifically in sporulating cells. *Microbiology.* 142 ( Pt 10):2897-2905.
- Dean N.**, 1999. Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim.Biophys.Acta.* 1426:309-322.
- Dean N.**, 1995. Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:1287-1291.
- Deane C. M., Salwinski L., Xenarios I., et Eisenberg D.**, 2002. Protein interactions: two methods for assessment of the reliability of high throughput observations. *Mol.Cell Proteomics.* 1:349-356.
- Delley P. A. et Hall M. N.**, 1999. Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J.Cell Biol.* 147:163-174.
- DeMarini D. J., Adams A. E., Fares H., De Virgilio C., Valle G., Chuang J. S., et Pringle J. R.**, 1997. A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J.Cell Biol.* 139:75-93.
- Devegowda G., Aravind K. L., Morton M. G., et Rajendra K.**, 1995. A biotechnological approach to counteract the aflatoxicosis in broiler chickens and ducklings by the use of *Saccharomyces cerevisiae*. *In* Proc. Feed. Ingredients Asia' 95. 161-171.

- Devegowda G., Arivind B. I. R., Baburathna A., et Sudarshan C.**, 1994. A biological approach to counteract aflatoxicosis in broiler chickens and ducklings by the use of *Saccharomyces cerevisiae* cultures added to feed. *In* Biotechnology in Feed Industry, Proceeding of Alltech's 10<sup>th</sup> Annual Symposium. Nottingham University Press. 235-245.
- Devegowda G., Raju M. V. L. N., et Swamy H. V. L.**, 1998. Mycotoxins: Novel solutions for their counteraction. *In* Feedstuffs. 15-
- Di Como C. J., Chang H., et Arndt K. T.**, 1995. Activation of CLN1 and CLN2 G1 cyclin gene expression by BCK2. *Mol.Cell Biol.* 15:1835-1846.
- Di Luzio N.**, 1983. Immunopharmacology of glucan : a broad spectrum enhancer of host defense mechanisms. *Trends in Pharma Sciences.* 4:344-347.
- Dickinson J. R. et Schweizer M.**, 2004. The Metabolisme and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. CRC PRESS.
- Dirick L., Moll T., Auer H., et Nasmyth K.**, 1992. A central role for SWI6 in modulating cell cycle Start-specific transcription in yeast. *Nature.* 357:508-513.
- Dodou E. et Treisman R.**, 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol.Cell Biol.* 17:1848-1859.
- Dogan M. D., Ataoglu H., Ataoglu O., et Akarsu E. S.**, 1999. Polysaccharide mannan components of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* cell wall produce fever by intracerebroventricular injection in rats. *Brain.Res.Bull.* 48:509-512.
- Donzis B.**, 1990. Method and Composition for Treating Hyperlipidemia. U.S.Patent.
- Douglas C. M.**, 2001. Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis. *Med.Mycol.* 39 Suppl 1:55-66.
- Douglas C. M., Foor F., Marrinan J. A., Morin N., Nielsen J. B., Dahl A. M., Mazur P., Baginsky W., Li W., el Sherbeini M., et .**, 1994a. The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:12907-12911.
- Douglas C. M., Marrinan J. A., Li W., et Kurtz M. B.**, 1994b. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with echinocandin-resistant 1,3-beta-D-glucan synthase. *J.Bacteriol.* 176:5686-5696.
- Dower W. J., Miller J. F., et Ragsdale C. W.**, 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16:6127-6145.
- Drees B. L., Sundin B., Brazeau E., Caviston J. P., Chen G. C., Guo W., Kozminski K. G., Lau M. W., Moskow J. J., Tong A., Schenkman L. R., McKenzie A., III, Brennwald P., Longtine M., Bi E., Chan C., Novick P., Boone C., Pringle J. R., Davis T. N., Fields S., et Drubin D. G.**, 2001. A protein interaction map for cell polarity development. *J.Cell Biol.* 154:549-571.
- Drewes G. et Bouwmeester T.**, 2003. Global approaches to protein-protein interactions. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15:199-205.

- Drgonova J., Drgon T., Tanaka K., Kollar R., Chen G. C., Ford R. A., Chan C. S., Takai Y., et Cabib E.**, 1996. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science*. 272:277-279.
- Drubin D. G.**, 1991. Development of cell polarity in budding yeast. *Cell*. 65:1093-1096.
- Dziembowski A. et Seraphin B.**, 2004. Recent developments in the analysis of protein complexes. *FEBS Lett*. 556:1-6.
- Eby J. J., Holly S. P., van Drogen F., Grishin A. V., Peter M., Drubin D. G., et Blumer K. J.**, 1998. Actin cytoskeleton organization regulated by the PAK family of protein kinases. *Curr.Biol*. 8:967-970.
- el Sherbeini M. et Clemas J. A.**, 1995a. Cloning and characterization of GNS1: a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in synthesis of 1,3-beta-glucan in vitro. *J.Bacteriol*. 177:3227-3234.
- el Sherbeini M. et Clemas J. A.**, 1995b. Nikkomycin Z supersensitivity of an echinocandin-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob.Agents Chemother*. 39:200-207.
- Elorza M. V., Rico H., et Sentandreu R.**, 1983. Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J.Gen.Microbiol*. 129 (Pt 5):1577-1582.
- Eng W. K., Faucette L., McLaughlin M. M., Cafferkey R., Koltin Y., Morris R. A., Young P. R., Johnson R. K., et Livi G. P.**, 1994. The yeast FKS1 gene encodes a novel membrane protein, mutations in which confer FK506 and cyclosporin A hypersensitivity and calcineurin-dependent growth. *Gene*. 151:61-71.
- Enjalbert B., Parrou J. L., Teste M. A., et Francois J.**, 2004. Combinatorial control by the protein kinases PKA, PHO85 and SNF1 of transcriptional induction of the *Saccharomyces cerevisiae* GSY2 gene at the diauxic shift. *Mol.Genet.Genomics*. 271:697-708.
- Ernst J. F. et Prill S. K.**, 2001. O-glycosilation. *Med.Mycol*. 39:67-74.
- Etienne-Manneville S.**, 2004. Cdc42--the centre of polarity. *J.Cell Sci*. 117:1291-1300.
- Etienne-Manneville S. et Hall A.**, 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420:629-635.
- Evangelista M., Blundell K., Longtine M. S., Chow C. J., Adames N., Pringle J. R., Peter M., et Boone C.**, 1997. Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science*. 276:118-122.
- Fares H., Goetsch L., et Pringle J. R.**, 1996. Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol*. 132:399-411.

- Ferrigno P., Posas F., Koepf D., Saito H., et Silver P. A.,** 1998. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J.* 17:5606-5614.
- Fersht A. R. et Leatherbarrow R. J.,** 1987. Structure and activity of Tyrosyl-tRNA synthetase. *Protein Engineering.* 269-278.
- Ficarro S. B., McClelland M. L., Stukenberg P. T., Burke D. J., Ross M. M., Shabanowitz J., Hunt D. F., et White F. M.,** 2002. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat.Biotechnol.* 20:301-305.
- Fields S. et Song O.,** 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 340:245-246.
- Figeys D., McBroom L., et Moran M. F.,** 2001. Mass Spectrometry for the Study of Protein-Protein Interactions. *Methods.* 24:230-239.
- Fishel B. R., Sperry A. O., et Garrard W. T.,** 1993. Yeast calmodulin and a conserved nuclear protein participate in the *in vivo* binding of a matrix association region. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:5623-5627.
- Fitzpatrick F. et DiCarlo J.,** 1964. Zymosan. In *Annals of the New York Academy of Sciences.* 233-262.
- Fleet G. H.,** 1991. Cell Walls. *In The Yeast* (2 ed). Academic Press, London. 199-277.
- Flescher E. G., Madden K., et Snyder M.,** 1993. Components required for cytokinesis are important for bud site selection in yeast. *J.Cell Biol.* 122:373-386.
- Font d. M., Sentandreu R., et Herrero E.,** 1991. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to aculeacin A. *Antimicrob.Agents Chemother.* 35:2596-2601.
- Ford S. K. et Pringle J. R.,** 1991. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC11 gene product and the timing of events at the budding site. *Dev.Genet.* 12:281-292.
- Frangioni J. V. et Neel B. G.,** 1993. Solubilization and purification of enzymatically active Glutathione-S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal.Biochem.* 210:179-187.
- Fujita A., Oka C., Arikawa Y., Katagai T., Tonouchi A., Kuhara S., et Misumi Y.,** 1994. A yeast gene necessary for bud-site selection encodes a protein similar to insulin-degrading enzymes. *Nature.* 372:567-570.
- Fujiwara T., Tanaka K., Mino A., Kikyo M., Takahashi K., Shimizu K., et 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.* 9:1221-1233.

- Garcia-Rodriguez L. J., Trilla J. A., Castro C., Valdivieso M. H., Duran A., et Roncero C.**, 2000. Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the *fks1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 478:84-88.
- Garrett-Engle P., Moilanen B., et Cyert M. S.**, 1995. Calcineurin, the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H(+)-ATPase. *Mol.Cell Biol.* 15:4103-4114.
- Garrington T. P. et Johnson G. L.**, 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11:211-218.
- Gaughran J. P., Lai M. H., Kirsch D. R., et Silverman S. J.**, 1994. Nikkomycin Z is a specific inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* chitin synthase isozyme Chs3 in vitro and in vivo. *J.Bacteriol.* 176:5857-5860.
- Gavin A. C., Bosche M., Krause R., Grandi P., Marzioch M., Bauer A., Schultz J., Rick J. M., Michon A. M., Cruciat C. M., Remor M., Hofert C., Schelder M., Brajenovic M., Ruffner H., Merino A., Klein K., Hudak M., Dickson D., Rudi T., Gnau V., Bauch A., Bastuck S., Huhse B., Leutwein C., Heurtier M. A., Copley R. R., Edlmann A., Querfurth E., Rybin V., Drewes G., Raida M., Bouwmeester T., Bork P., Seraphin B., Kuster B., Neubauer G., et Superti-Furga G.**, 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature.* 415:141-147.
- Gehring S. et Snyder M.**, 1990. The SPA2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is important for pheromone-induced morphogenesis and efficient mating. *J.Cell Biol.* 111:1451-1464.
- Gentsch M. et Tanner W.**, 1996. The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J.* 15:5752-5759.
- Georgopapadakou N. H.**, 1997. Antifungals targeted to the cell wall. *Exp.Opin.Invest.Drugs.* 6:147-150.
- Georgopapadakou N. H.**, 1998. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr.Opin.Microbiol.* 1:547-557.
- Georgopapadakou N. H.**, 2000. Infectious disease 2000: drug resistance and new drugs. *Drug Resist.Updat.* 3:265-269.
- Georgopapadakou N. H. et Walsh T. J.**, 1994. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science.* 264:371-373.
- Gingras A. C., Raught B., et Sonenberg N.**, 2001. Control of translation by the target of rapamycin proteins. *Prog.Mol.Subcell.Biol.* 27:143-174.
- Girrbach V., Zeller T., Priesmeier M., et Strahl-Bolsinger S.**, 2000. Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem.* 275:19288-19296.

- Gladfelter A. S., Bose I., Zyla T. R., Bardes E. S., et Lew D. J.,** 2002. Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. *J.Cell Biol.* 156:315-326.
- Goehring A. S., Mitchell D. A., Tong A. H., Keniry M. E., Boone C., et Sprague G. F., Jr.,** 2003. Synthetic lethal analysis implicates Ste20p, a p21-activated protein kinase, in polarisome activation. *Mol.Biol.Cell.* 14:1501-1516.
- Goffeau,A., Barrell,B.G., Bussey,H., Davis,R.W., Dujon,B., Feldmann,H., Galibert,F., Hoheisel,J.D. , Jacq,C., Johnston,M., Louis,E.J., Mewes,H.W., Murakami,Y., Philippsen,P., Tettelin,H., and Oliver,S.G.** (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 563-546, 567.
- Gould K. L., Ren L., Feoktistova A. S., Jennings J. L., et Link A. J.,** 2004. Tandem affinity purification and identification of protein complex components. *Methods.* 33:239-244.
- Govindan B. et Novick P.,** 1995. Development of cell polarity in budding yeast. *J.Exp.Zool.* 273:401-424.
- Gray J. V., Ogas J. P., Kamada Y., Stone M., Levin D. E., et Herskowitz I.,** 1997. A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J.* 16:4924-4937.
- Gulli M. P., Jaquenoud M., Shimada Y., Niederhauser G., Wiget P., et Peter M.,** 2000. Phosphorylation of the Cdc42 exchange factor Cdc24 by the PAK-like kinase Cla4 may regulate polarized growth in yeast. *Mol.Cell.* 6:1155-1167.
- Gustin M. C., Albertyn J., Alexander M., et Davenport K.,** 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 62:1264-1300.
- Gygi S. P. et Aebersold R.,** 2000. Mass spectrometry and proteomics. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 4:489-494.
- H**all A., 1990. The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science.* 249:635-640.
- Hamada K., Terashima H., Arisawa M., Yabuki N., et Kitada K.,** 1999. Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J.Bacteriol.* 181:3886-3889.
- Harata M., Karwan A., et Wintersberger U.,** 1994. An essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* coding for an actin-related protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:8258-8262.
- Harrington B. J. et Raper K. B.,** 1968. Use of a fluorescent brightener to demonstrate cellulose in the cellular slime molds. *Appl.Microbiol.* 16:106-113.
- Harrison J. C., Zyla T. R., Bardes E. S., et Lew D. J.,** 2004. Stress-specific activation mechanisms for the "cell integrity" MAPK pathway. *J.Biol.Chem.* 279:2616-2622.

- Hashimoto H., Sakakibara A., Yamasaki M., et Yoda K.,** 1997. *Saccharomyces cerevisiae* VIG9 encodes GDP-mannose pyrophosphorylase, which is essential for protein glycosylation. *J Biol Chem.* 272:16308-16314.
- Hausler A., Ballou L., Ballou C. E., et Robbins P. W.,** 1992. Yeast glycoprotein biosynthesis: MNT1 encodes an alpha-1,2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:6846-6850.
- Hazbun T. R., Malmstrom L., Anderson S., Graczyk B. J., Fox B., Riffle M., Sundin B. A., Aranda J. D., McDonald W. H., Chiu C. H., Snyderman B. E., Bradley P., Muller E. G., Fields S., Baker D., Yates J. R., et Davis T. N.,** 2003. Assigning function to yeast proteins by integration of technologies. *Mol.Cell.* 12:1353-1365.
- Heesen S., Lehle L., Weissmann A., et Aebi M.,** 1994. Isolation of the ALG5 locus encoding the UDP-glucose:dolichyl-phosphate glucosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur.J Biochem.* 224:71-79.
- Heitman J., Movva N. R., et Hall M. N.,** 1991. Target of cell cycle arrest by the immunosuppressant Rapamycin in yeast. *Science.* 905-909.
- Helliwell S. B., Howald I., Barbet N., et Hall M. N.,** 1998. TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 148:99-112.
- Henzel W. J., Billeci T. M., Stults J. T., Wong S. C., Grimley C., et Watanabe C.,** 1993. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:5011-5015.
- Herscovics A. et Orlean P.,** 1993. Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.* 7:540-550.
- Herskowitz I., Park H. O., Sanders S., Valtz N., et Peter M.,** 1995. Programming of cell polarity in budding yeast by endogenous and exogenous signals. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 60:717-727.
- Herth W. et Schnepf S.,** 1980. The fluorochrome Calcofluor White binds oriented to structural polysaccharide fibrils. *Protoplasma.* 105:129-133.
- Hildebrandt ER et Hoyt MA,** 2000. Mitotic motors in *S. cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1496:99-116.
- Hirano H., Tanaka K., Ozaki K., Imamura H., Kohno H., Hihara T., Kameyama T., Hotta K., Arisawa M., Watanabe T., Qadota H., Ohya Y., et Takai Y.,** 1996. ROM7/BEM4 encodes a novel protein that interacts with the Rho1p small GTP-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 16:4396-4403.
- Ho Y., Gruhler A., Heilbut A., Bader G. D., Moore L., Adams S. L., Millar A., Taylor P., Bennett K., Boutilier K., Yang L., Wolting C., Donaldson I., Schandorff S., Shewnarane J., Vo M., Taggart J., Goudreault M., Muskat B., Alfarano C., Dewar D., Lin Z., Michalickova K., Willems A. R., Sassi H., Nielsen P. A., Rasmussen K. J., Andersen J. R., Johansen L. E., Hansen L. H., Jespersen H., Podtelejnikov A., Nielsen E., Crawford J., Poulsen V., Sorensen B. D., Matthiesen**

- J., Hendrickson R. C., Gleeson F., Pawson T., Moran M. F., Durocher D., Mann M., Hogue C. W., Figeys D., et Tyers M., 2002.** Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*. 415:180-183.
- Hoffman C. S. et Winston F., 1987.** A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. 57:267-272.
- Hohmann S., 2002.** Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol.Mol.Biol Rev.* 66:300-372.
- Holly S. P. et Blumer K. J., 1999.** PAK-family kinases regulate cell and actin polarization throughout the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* 147:845-856.
- Honey S., Schneider B. L., Schieltz D. M., Yates J. R., et Futcher B., 2001.** A novel multiple affinity purification tag and its use in identification of proteins associated with a cyclin-CDK complex. *Nucleic Acids Res.* 29:E24-
- Hong Z., Mann P., Brown N. H., Tran L. E., Shaw K. J., Hare R. S., et Didomenico B., 1994a.** Cloning and characterization of KNR4, a yeast gene involved in (1,3)-beta-glucan synthesis. *Mol.Cell Biol.* 14:1017-1025.
- Hong Z., Mann P., Shaw K. J., et Didomenico B., 1994b.** Analysis of beta-glucans and chitin in a *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mutant using high-performance liquid chromatography. *Yeast*. 10:1083-1092.
- Huang K. N. et Symington L. S., 1995.** Suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* *pkc1* mutation identify alleles of the phosphatase gene *PTC1* and of a novel gene encoding a putative basic leucine zipper protein. *Genetics*. 141:1275-1285.
- Huh W. K., Falvo J. V., Gerke L. C., Carroll A. S., Howson R. W., Weissman J. S., et O'Shea E. K., 2003.** Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*. 425:686-691.
- Hutchins A. M., Phillips P. A., Venter D. J., Burrell L. M., et Johnston C. I., 1995.** Molecular cloning and sequencing of the gene encoding a sheep arginine vasopressin type 1a receptor. *Biochim.Biophys.Acta.* 1263:266-270.
- Hutchins K. et Bussey H., 1983.** Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 leads to 6)-beta-D-glucan. *J.Bacteriol.* 154:161-169.
- Ibba M. et Söll D., 2000.** Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu.Rev.Biochem.* 69:617-650.
- Igual J. C., Johnson A. L., et Johnston L. H., 1996.** Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J.* 15:5001-5013.
- Igual J. C., Toone W. M., et Johnston L. H., 1997.** A genetic screen reveals a role for the late G1-specific transcription factor Swi4p in diverse cellular functions including cytokinesis. *J.Cell Sci.* 110 ( Pt 14):1647-1654.

- Imaj J., Toh-e A, et 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*. 142:359-369.
- Immervoll T., Gentsch M., et Tanner W.**, 1995. PMT3 and PMT4, two new members of the protein-O-mannosyltransferase gene family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 11:1345-1351.
- Innis M. A., Gelfand D. H., Sinsky J. J., et White T. J.**, 1990. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, CA.482 pp.
- Inoki K., Ouyang H., Li Y., et Guan K. L.**, 2005. Signaling by target of Rapamycin Proteins in Cell Growth Control. *Microbiol Mol.Biol Rev.* 69:79-100.
- Inoue S. B., Takewaki N., Takasuka T., Mio T., Adachi M., Fujii Y., Miyamoto C., Arisawa M., Furuichi Y., et Watanabe T.**, 1995. Characterization and gene cloning of 1,3-beta-D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur.J.Biochem.* 231:845-854.
- Irazaqui J. E., Gladfelter A. S., et Lew D. J.**, 2003. Scaffold-mediated symmetry breaking by Cdc42p. *Nat.Cell Biol.* 5:1062-1070.
- Irie K., Takase M., Lee K. S., Levin D. E., Araki H., Matsumoto K., et Oshima Y.**, 1993. MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol.Cell Biol.* 13:3076-3083.
- Ito T., Chiba T., Ozawa R., Yoshida M., Hattori M., et Sakaki Y.**, 2001. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98:4569-4574.
- Iyer V. R., Horak C. E., Scafe C. S., Botstein D., Snyder M., et Brown P. O.**, 2001. Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature*. 409:533-538.
- Jacinto E. et Hall M. N.**, 2003. TOR signaling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:117-126.
- James P., Halladay J., et Craig E. A.**, 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*. 144:1425-1436.
- Jansen R., Greenbaum D., et Gerstein M.**, 2002. Relating whole-genome expression data with protein-protein interactions. *Genome Res.* 12:37-46.
- Jantti J. et Kuismanen E.**, 1993. Effect of caffeine and reduced temperature (20 degrees C) on the organization of the pre-Golgi and the Golgi stack membranes. *J.Cell Biol.* 120:1321-1335.
- Jaquenoud M. et Peter M.**, 2000. Gic2p may link activated Cdc42p to components involved in actin polarization, including Bni1p and Bud6p (Aip3p). *Mol.Cell Biol.* 20:6244-6258.

- Jiang B., Sheraton J., Ram A. F., Dijkgraaf G. J., Klis F. M., et Bussey H.**, 1996. CWH41 encodes a novel endoplasmic reticulum membrane N-glycoprotein involved in beta 1,6-glucan assembly. *J.Bacteriol.* 178:1162-1171.
- Jigami Y. et Odani T.**, 1999. Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochim.Biophys.Acta.* 1426:335-345.
- Jung U. S. et Levin D. E.**, 1999. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol.Microbiol.* 34:1049-1057.
- Kamada Y., Jung U. S., Piotrowski J., et Levin D. E.**, 1995. The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* 9:1559-1571.
- Kamada Y., Qadota H., Python C. P., Anraku Y., Ohya Y., et Levin D. E.**, 1996. Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J.Biol.Chem.* 271:9193-9196.
- Kang M. S. et Cabib E.**, 1986. Regulation of fungal cell wall growth: a guanine nucleotide-binding, proteinaceous component required for activity of (1----3)-beta-D-glucan synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 83:5808-5812.
- Kapteyn J. C., Ram A. F., Groos E. M., Kollar R., Montijn R. C., van den E. H., Llobell A., Cabib E., et Klis F. M.**, 1997. Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J.Bacteriol.* 179:6279-6284.
- Kapteyn J. C., ter Riet B., Vink E., Blad S., de Nobel H., van den E. H., et Klis F. M.**, 2001. Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol.Microbiol.* 39:469-479.
- Kapteyn J. C., van den E. H., et Klis F. M.**, 1999. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim.Biophys.Acta.* 1426:373-383.
- Kartmann B. et Roth D.**, 2001. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis. *J.Cell Sci.* 114:839-844.
- Kasahara S., Yamada H., Mio T., Shiratori Y., Miyamoto C., Yabe T., Nakajima T., Ichishima E., et Furuichi Y.**, 1994. Cloning of the *Saccharomyces cerevisiae* gene whose overexpression overcomes the effects of HM-1 killer toxin, which inhibits beta-glucan synthesis. *J.Bacteriol.* 176:1488-1499.
- Kasai T., Eguchi T., Ishiwaki N., Kaneshige J., Ozeki T., et Yuasa H.**, 2000. Application of acid-treated yeast cell wall (AYC) as a pharmaceutical additive I. AYC as a novel coating material. *Int.J.Pharm.* 204:53-59.
- Kepes F. et Schekman R.**, 1988. The yeast SEC53 gene encodes phosphomannomutase. *J Biol Chem.* 263:9155-9161.
- Ketela T., Green R., et Bussey H.**, 1999. *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J.Bacteriol.* 181:3330-3340.

- Kilmartin J. V. et Adams A. E.**, 1984. Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces*. *J.Cell Biol.* 98:922-933.
- Kim H. B., Haarer B. K., et Pringle J. R.**, 1991. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. *J.Cell Biol.* 112:535-544.
- Kim M. K., Park H. S., Kim C. H., Park H. M., et Choi W.**, 2002. Inhibitory effect of nikkomycin Z on chitin synthases in *Candida albicans*. *Yeast.* 19:341-349.
- Kim Y. J., Francisco L., Chen G. C., Marcotte E., et Chan C. S.**, 1994. Control of cellular morphogenesis by the Ip12/Bem2 GTPase-activating protein: possible role of protein phosphorylation. *J.Cell Biol.* 127:1381-1394.
- Kimura T., Kitamoto N., Kito Y., Iimura Y., Shirai T., Komiyama T., Furuichi Y., Sakka K., et Ohmiya K.**, 1997. A novel yeast gene, RHK1, is involved in the synthesis of the cell wall receptor for the HM-1 killer toxin that inhibits beta-1,3-glucan synthesis. *Mol.Gen Genet.* 254:139-147.
- Kimura T., Komiyama T., Furuichi Y., Iimura Y., Karita S., Sakka K., et Ohmiya K.**, 1999. N-glycosylation is involved in the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to HM-1 killer toxin secreted from *Hansenula mrakii* IFO 0895. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 51:176-184.
- Kirchrath L., Lorberg A., Schmitz H. P., Gengenbacher U., et Heinisch J. J.**, 2000. Comparative genetic and physiological studies of the MAP kinase Mpk1p from *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol.Biol.* 300:743-758.
- Klenova E. M., Nicolas R. H., Carne A. F., Lee R. E., Lobanenko V. V., et Goodwin G. H.**, 1997. Molecular weight abnormalities of the CTCF transcription factor: CTCF migrates aberrantly in SDS-PAGE and the size of the expressed protein is affected by the UTRs and sequences within the coding region of the CTCF gene. *Nucleic Acids Res.* 25:466-474.
- Klis F. M., de Groot P., Brul S, et Hellingwerf K.**, 2004. *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae* (edited by Dickinson,R et Schweizer,M. ). CRC PRESS. 117-139.
- Klis F. M.**, 1994. Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast.* 10:851-869.
- Klis F. M., de Groot P., et Hellingwerf K.**, 2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med.Mycol.* 39 Suppl 1:1-8.
- Koch C., Moll T., Neuberg M., Ahorn H., et Nasmyth K.**, 1993. A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science.* 261:1551-1557.
- Kohno H., Tanaka K., Mino A., Umikawa M., Imamura H., Fujiwara T., Fujita Y., Hotta K., Qadota H., Watanabe T., Ohya Y., et Takai Y.**, 1996. Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15:6060-6068.

- Kollar R., Petrakova E., Ashwell G., Robbins P. W., et Cabib E.**, 1995. Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta-1,3-glucan. *J.Biol.Chem.* 270:1170-1178.
- Kollar R., Reinhold B. B., Petrakova E., Yeh H. J., Ashwell G., Drgonova J., Kapteyn J. C., Klis F. M., et Cabib E.**, 1997. Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->)3-glucan, and chitin. *J.Biol.Chem.* 272:17762-17775.
- Kopecka M.**, 1984. Papulacandin B: inhibitor of biogenesis of (1----3)-beta-D-glucan fibrillar component of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts. *Folia Microbiol.(Praha)*. 29:441-449.
- Kopecka M. et Gabriel M.**, 1992. The influence of congo red on the cell wall and (1----3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch.Microbiol.* 158:115-126.
- Korolyev E., Steinberg-Neifachand O., et Eshel D.**, 2005. Mutations in the yeast kinesin-like Cin8p are alleviated by osmotic support. *FEMS Microbiol.Lett.* 244:379-383.
- Krainer E., Stark R. E., Naider F., Alagramam K., et Becker J. M.**, 1994. Direct observation of cell wall glucans in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* by magic-angle spinning <sup>13</sup>C-NMR. *Biopolymers.* 34:1627-1635.
- Kreger-Van Rij N. J.**, 1978. Electron microscopy of germinating ascospores of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch.Microbiol.* 117:73-77.
- Kriwacki R. W., Hengst L., Tennant L., Reed S. I., et Wright P. E.**, 1996. Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:11504-11509.
- Kunz J. et Hall M. N.**, 1993. Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. *Trends Biochem.Sci.* 18:334-338.
- Kurtz M. B. et Douglas C. M.**, 1997. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *J.Med.Vet.Mycol.* 35:79-86.
- Kurzweilova H. et Sigler K.**, 1994. Kinetic studies of killer toxin K1 binding to yeast cells indicate two receptor populations. *Arch.Microbiol.* 162:211-214.
- Laemmli U. K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lagorce A., Berre-Anton V., Aguilar-Uscanga B., Martin-Yken H., Dagkessamanskaia A., et Francois J.**, 2002. Involvement of GFA1, which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur.J.Biochem.* 269:1697-1707.

- Lamond A.I et Mann M.**, 1997. Cell biology and the genome projects-A concerted strategy for characterizing multi-protein complexes using mass-spectrometry. *trends cell biol.* 7:139-142.
- Lanker S., Valdivieso M. H., et Wittenberg C.**, 1996. Rapid degradation of the G1 cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. *Science.* 271:1597-1601.
- Leal-Morales C. A., Bracker C. E., et Bartnicki-Garcia S.**, 1988. Localization of chitin synthetase in cell-free homogenates of *Saccharomyces cerevisiae*: chitosomes and plasma membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85:8516-8520.
- Leal-Morales C. A., Bracker C. E., et Bartnicki-Garcia S.**, 1994. Subcellular localization, abundance and stability of chitin synthetases 1 and 2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 140 ( Pt 9):2207-2216.
- Lee B. N. et Elion E. A.**, 1999. The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:12679-12684.
- Lee J. N., Lee D. Y., Ji I. H., Kim G. E., Kim H. N., Sohn J., Kim S., et Kim C. W.**, 2001. Purification of soluble beta-glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 65:837-841.
- Lee K. S., Hines L. K., et Levin D. E.**, 1993. A pair of functionally redundant yeast genes (PPZ1 and PPZ2) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway. *Mol.Cell Biol.* 13:5843-5853.
- Lee K. S. et Levin D. E.**, 1992. Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol.Cell Biol.* 12:172-182.
- Lesage G., Sdicu A. M., Menard P., Shapiro J., Hussein S., et Bussey H.**, 2004. Analysis of beta-1,3-glucan assembly in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin. *Genetics.* 167:35-49.
- Levin D. E.**, 2005. Cell Wall integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol.Biol Rev.* 69:262-291.
- Lew D. J.**, 2000. Cell-cycle checkpoints that ensure coordination between nuclear and cytoplasmic events in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 10:47-53.
- Lew D. J. et Reed S. I.**, 1995a. A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast. *J.Cell Biol.* 129:739-749.
- Lew D. J. et Reed S. I.**, 1995b. Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 5:17-23.
- Lewin A. S., Hines V., et Small G. M.**, 1990. Citrate synthase encoded by the CIT2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is peroxisomal. *Mol.Cell Biol.* 10:1399-1405.
- Li S., Ault A., Malone C. L., Raitt D., Dean S., Johnston L. H., Deschenes R. J., et Fassler J. S.**, 1998. The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates

- phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J.* 17:6952-6962.
- Lillie S. H. et Brown S. S.**, 1994. Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* 125:825-842.
- Lipke P. N. et Ovalle R.**, 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J.Bacteriol.* 180:3735-3740.
- Loewith R. et Hall M. N.**, 2004. TOR signaling in yeast: temporal and spatial control of cell growth. In *Cell Growth: Control of Cell Size* (ed. M. N. Hall, M. Raff and G. Thomas). Cold Spring Harbor Laboratory Press. 139-165.
- Loewith R., Jacinto E., Wullschleger S., Lorberg A., Crespo J. L., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P., et Hall M. N.**, 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol.Cell.* 10:457-468.
- Lohman T. M., Chao K., Green J. M., Sage S., et Runyon G. T.**, 1989. Large-scale purification and characterization of the *Escherichia coli* rep gene product. *J Biol Chem.* 264:10139-10147.
- Longtine M. S., DeMarini D. J., Valencik M. L., Al Awar O. S., Fares H., De Virgilio C., et Pringle J. R.**, 1996. The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr.Opin.Cell Biol.* 8:106-119.
- Longtine M. S., Theesfeld C. L., McMillan J. N., Weaver E., Pringle J. R., et Lew D. J.**, 2000. Septin-dependent assembly of a cell cycle-regulatory module in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 20:4049-4061.
- Louvet O., Doignon F., et Crouzet M.**, 1997. Stable DNA-binding yeast vector allowing high-bait expression for use in the two-hybrid system. *Biotechniques.* 23:816-8, 820.
- Lowndes N. F., Johnson A. L., Breeden L., et Johnston L. H.**, 1992. SWI6 protein is required for transcription of the periodically expressed DNA synthesis genes in budding yeast. *Nature.* 357:505-508.
- Lu C. F., Montijn R. C., Brown J. L., Klis F., Kurjan J., Bussey H., et Lipke P. N.**, 1995. Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J.Cell Biol.* 128:333-340.
- Lund E. et Dahlberg J. E.**, 1998. Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science.* 282:2082-2085.
- Lussier M., Gentsch M., Sdicu A. M., Bussey H., et Tanner W.**, 1995a. Protein O-glycosylation in yeast. The PMT2 gene specifies a second protein O-mannosyltransferase that functions in addition to the PMT1-encoded activity. *J.Biol.Chem.* 270:2770-2775.

- Lussier M., Sdicu A. M., Ketela T., et Bussey H.**, 1995b. Localization and targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* Kre2p/Mnt1p alpha 1,2-mannosyltransferase to a medial-Golgi compartment. *J.Cell Biol.* 131:913-927.
- Lussier M., White A. M., Sheraton J., di Paolo T., Treadwell J., Southard S. B., Horenstein C. I., Chen-Weiner J., Ram A. F., Kapteyn J. C., Roemer T. W., Vo D. H., Bondoc D. C., Hall J., Zhong W. W., Sdicu A. M., Davies J., Klis F. M., Robbins P. W., et Bussey H.**, 1997. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 147:435-450.
- Ma H., Kunes S., Schatz P. J., et Botstein D.**, 1987. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene.* 58:201-216.
- Mack D., Nishimura K., Dennehey B. K., Arbogast T., Parkinson J., Toh-e A, Pringle J. R., Bender A., et Matsui Y.**, 1996. Identification of the bud emergence gene BEM4 and its interactions with rho-type GTPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 16:4387-4395.
- Madden K., Costigan C., et Snyder M.**, 1992. Cell polarity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Cell Biol.* 2:22-29.
- Madden K., Sheu Y. J., Baetz K., Andrews B., et Snyder M.**, 1997. SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science.* 275:1781-1784.
- Madden K. et Snyder M.**, 1992. Specification of sites for polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae* and the influence of external factors on site selection. *Mol.Biol.Cell.* 3:1025-1035.
- Madden K. et Snyder M.**, 1998. Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu.Rev.Microbiol.* 52:687-744.
- Maeda H. et Ishida N.**, 1967. Specificity of binding of hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. *J.Biochem.(Tokyo).* 62:276-278.
- Maeda T., Takekawa M., et Saito H.**, 1995. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science.* 269:554-558.
- Maeda T., Wurgler-Murphy S. M., et Saito H.**, 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature.* 369:242-245.
- Magnelli P., Cipollo J. F., et Abeijon C.**, 2002. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and beta-1,6-glucan fine structure. *Anal.Biochem.* 301:136-150.
- Manivasakam P., Weber S. C., McElver J., et Schiestl R. H.**, 1995. Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 23:2799-2800.
- Manners D. J., Masson A. J., et Patterson J. C.**, 1973. The structure of a beta-1,3-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem.J.* 135:19-30.

- Mansell P., Rowden G., et Hammer C.**, 1978. Clinical experiences with the use of glucan. Immune Modulation and Control of Neoplasia by Adjuvant Therapy.
- Marini N. J., Meldrum E., Buehrer B., Hubberstey A. V., Stone D. E., Traynor-Kaplan A., et Reed S. I.**, 1996. A pathway in the yeast cell division cycle linking protein kinase C (Pkc1) to activation of Cdc28 at START. *EMBO J.* 15:3040-3052.
- Markovich S., Yekutieli A., Shalit I., Shadkchan Y., et Osherov N.**, 2004. Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3871-3876.
- Marston A. L., Chen T., Yang M. C., Belhumeur P., et Chant J.**, 2001. A localized GTPase exchange factor, Bud5, determines the orientation of division axes in yeast. *Curr. Biol.* 11:803-807.
- Martin D. E. et Hall M. N.**, 2005. The expanding TOR signaling network. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:158-166.
- Martin H., Arroyo J., Sanchez M., Molina M., et Nombela C.**, 1993. Activity of the yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37 degrees C. *Mol. Gen. Genet.* 241:177-184.
- Martin H., Castellanos M. C., Cenamor R., Sanchez M., Molina M., et Nombela C.**, 1996. Molecular and functional characterization of a mutant allele of the mitogen-activated protein-kinase gene SLT2(MPK1) rescued from yeast autolytic mutants. *Curr. Genet.* 29:516-522.
- Martin H., Dagkessamanskaia A., Satchanska G., Dallies N., et Francois J.**, 1999. KNR4, a suppressor of *Saccharomyces cerevisiae* cwh mutants, is involved in the transcriptional control of chitin synthase genes. *Microbiology.* 145 ( Pt 1):249-258.
- Martin H., Rodriguez-Pachon J. M., Ruiz C., Nombela C., et Molina M.**, 2000. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275:1511-1519.
- Martin-Yken H., Dagkessamanskaia A., Basmaji F., Lagorce A., et Francois J.**, 2003. The interaction of Slt2 MAP kinase with Knr4 is necessary for signalling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 49:23-35.
- Martin-Yken H., Dagkessamanskaia A., de Groot P., Ram A., Klis F., et Francois J.**, 2001. *Saccharomyces cerevisiae* YCRO17c/CWH43 encodes a putative sensor/transporter protein upstream of the BCK2 branch of the PKC1-dependent cell wall integrity pathway. *Yeast.* 18:827-840.
- Martin-Yken H., Dagkessamanskaia A., Talibi D., et Francois J.**, 2002a. KNR4 is a member of the PKC1 signalling pathway and genetically interacts with BCK2, a gene involved in cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 41:323-332.
- Martin-Yken H., Lagorce A., et Francois J.**, 2002b. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall: Molecular architecture, regulatory pathways, remodeling mechanism in

- reponse to environmental conditions, and biotechnological values. *Recent Research Devel.Microbiology*. 6:503-526.
- Martinez d. M., I, Marechal P. A., et Gervais P.**, 1996. Passive response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shifts: cell volume variations depending on the physiological state. *Biochem.Biophys.Res Commun*. 227:519-523.
- Masuda T., Tanaka K., Nonaka H., Yamochi W., Maeda A., et Takai Y.**, 1994. Molecular cloning and characterization of yeast rho GDP dissociation inhibitor. *J.Biol.Chem*. 269:19713-19718.
- Matsui Y. et Toh E.**, 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*. 12:5690-5699.
- Mazur P. et Baginsky W.**, 1996. In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J.Biol.Chem*. 271:14604-14609.
- Mazur P., Morin N., Baginsky W., el Sherbeini M., Clemas J. A., Nielsen J. B., et Foor F.**, 1995. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol.Cell Biol*. 15:5671-5681.
- McMillan J. N., Longtine M. S., Sia R. A., Theesfeld C. L., Bardes E. S., Pringle J. R., et Lew D. J.**, 1999. The morphogenesis checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*: cell cycle control of Swe1p degradation by Hsl1p and Hsl7p. *Mol.Cell Biol*. 19:6929-6939.
- Meaden P., Hill K., Wagner J., Slipetz D., Sommer S. S., et Bussey H.**, 1990. The yeast KRE5 gene encodes a probable endoplasmic reticulum protein required for (1----6)-beta-D-glucan synthesis and normal cell growth. *Mol.Cell Biol*. 10:3013-3019.
- Medzihradzsky K. F., Campbell J. M., Baldwin M. A., Falick A. M., Juhasz P., Vestal M. L., et Burlingame A. L.**, 2000. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal.Chem*. 72:552-558.
- Mendenhall M. D. et Hodge A. E.**, 1998. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol Rev*. 62:1191-1243.
- Mibelle AG Biochemistry**, 2002. Carboxymethylated beta-1,3-glucan in skin care: prophylactic and therapeutic activities.
- Michaud G. A. et Snyder M.**, 2002. Proteomic approaches for the global analysis of proteins. *Biotechniques*. 33:1308-1316.
- Michelitch M. et Chant J.**, 1996. A mechanism of Bud1p GTPase action suggested by mutational analysis and immunolocalization. *Curr.Biol*. 6:446-454.
- Miller P. J. et Johnson D. I.**, 1994. Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol.Cell Biol*. 14:1075-1083.

- Millson S. H., Truman A. W., King V., Prodromou C., Pearl L. H., et Piper P. W., 2005.** A two-hybrid screen of the yeast proteome for Hsp90 interactors uncovers a novel Hsp90 chaperone requirement in the activity of a stress-activated mitogen-activated protein kinase, Slt2p (Mpk1p). *Eukaryot.Cell.* 4:849-860.
- Ming C. C. et RajBhandary L., 1993.** *Saccharomyces cerevisiae* cytoplasmique Tyrosyl-tRNA synthetase gene. *J Biol Chem.* 268:12855-12863.
- Mingam A., Gachon C., et Charrier B., 2003.** Quantifying nucleic acids with fluorescent probes: Contribution of real-time PCR to applied and fundamental plant research. *Adv Plant Physiol.* 7:423-458.
- Minke R. et Blackwell J., 1978.** The structure of alpha-chitin. *J Mol.Biol.* 120:167-181.
- Miyata M., Kitamura J., et Miyata H., 1980.** Lysis of growing fission-yeast cells induced by aculeacin A, a new antifungal antibiotic. *Arch.Microbiol.* 127:11-16.
- Moon A. L., Janmey P. A., Louie K. A., et Drubin D. G., 1993.** Cofilin is an essential component of the yeast cortical cytoskeleton. *J.Cell Biol.* 120:421-435.
- Morgan B. A., Bouquin N., Merrill G. F., et Johnston L. H., 1995.** A yeast transcription factor bypassing the requirement for SBF and DSC1/MBF in budding yeast has homology to bacterial signal transduction proteins. *EMBO J.* 14:5679-5689.
- Morris G. J., Winters L., Coulson G. E., et Clarke K. J., 1986.** Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol.* 132 ( Pt 7):2023-2034.
- Mrsa V., Seidl T., Gentsch M., et Tanner W., 1997.** Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 13:1145-1154.
- Muhua L., Karpova T. S., et Cooper J. A., 1994.** A yeast actin-related protein homologous to that in vertebrate dynactin complex is important for spindle orientation and nuclear migration. *Cell.* 78:669-679.
- Mulholland J., Preuss D., Moon A., Wong A., Drubin D., et Botstein D., 1994.** Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J.Cell Biol.* 125:381-391.
- Myers A. M., Tzagoloff A., Kinney D. M., et Lusty C. J., 1986.** Yeast shuttle and integrative vector with multiple cloning sites suitable for construction of LacZ fusions. *Gene.* 45:299-310.
- Nagata T. et Takebe I., 2002.** Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta (Berlin).* 92:301-308.
- Nasmyth K., 1993.** Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr.Opin.Cell Biol.* 5:166-179.

- Nguyen T. H., Fleet G. H., et Rogers P. L.**, 1998. Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 50:206-212.
- Ni L. et Snyder M.**, 2001. A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Biol.Cell.* 12:2147-2170.
- Nicoletti A., Nicolette G., Ferraro G., Palmieri G., Mattaboni P., et Germogli R.**, 1992. Preliminary evaluation of immunoadjuvant activity of an orally administered glucan extracted from *Candida albicans*. *Arzneimittelforschung.* 42:1246-1250.
- Nonaka H., Tanaka K., Hirano H., Fujiwara T., Kohno H., Umikawa M., Mino A., et Takai Y.**, 1995. A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14:5931-5938.
- Notario V., Kawai H., et Cabib E.**, 1982. Interaction between yeast beta-(1 to 3)glucan synthetase and activating phosphorylated compounds. A kinetic study. *J Biol Chem.* 257:1902-1905.
- Novick P. et Botstein D.**, 1985. Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants. *Cell.* 40:405-416.
- Nuoffer C., Horvath A., et Riezman H.**, 1993. Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J.Biol.Chem.* 268:10558-10563.
- O'Rourke S. M., Herskowitz I., et O'Shea E. K.**, 2002. Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Genet.* 18:405-412.
- Oh D. et Hopper J. E.**, 1990. Transcription of a yeast phosphoglucomutase isozyme gene is galactose inducible and glucose repressible. *Mol.Cell Biol.* 10:1415-1422.
- Ohi M. D., Link J. A., Ren L., Jennings J. L., McDonald W. H., et Gould K. L.**, 2002. Proteomics Analysis Reveals Stable Multiprotein Complexes in Both Fission and Budding Yeasts Containing Myb-Related Cdc5p/Cef1p, Novel Pre-mRNA Splicing Factors, and snRNAs. *Mol.Cell Biol.* 22:2011-2024.
- Ohkura H., Adachi Y., Kinoshita N., Niwa O., Toda T., et Yanagida M.**, 1988. Cold-sensitive and caffeine-supersensitive mutants of the *Schizosaccharomyces pombe* dis genes implicated in sister chromatid separation during mitosis. *EMBO J.* 7:1465-1473.
- Oki M., Noguchi E., Hayashi N., et Nishimoto T.**, 1998. Nuclear protein import, but not mRNA export, is defective in all *Saccharomyces cerevisiae* mutants that produce temperature-sensitive forms of the Ran GTPase homologue Gsp1p. *Mol.Gen.Genet.* 257:624-634.
- Oldenburg K. R., Vo K. T., Michaelis S., et Paddon C.**, 1997. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res.* 25:451-452.

- Orlean P.**, 1997. Biogenesis of yeast wall and surface components. In the molecular biology and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 229-362.
- Orlean P., Kuranda M. J., et Albright C. F.**, 1991. Analysis of glycoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 194:682-697.
- Osumi M.**, 1998. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron.* 29:207-233.
- Ozaki K., Tanaka K., Imamura H., Hihara T., Kameyama T., Nonaka H., Hirano H., Matsuura Y., et Takai Y.**, 1996. Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15:2196-2207.
- Ozaki-Kuroda K., Yamamoto Y., Nohara H., Kinoshita M., Fujiwara T., Irie K., et Takai Y.**, 2001. Dynamic localization and function of Bni1p at the sites of directed growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 21:827-839.
- Page N., Gerard-Vincent M., Menard P., Beaulieu M., Azuma M., Dijkgraaf G. J., Li H., Marcoux J., Nguyen T., Dowse T., Sdicu A. M., et Bussey H.**, 2003. A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics.* 163:875-894.
- Pammer M., Briza P., Ellinger A., Schuster T., Stucka R., Feldmann H., et Breitenbach M.**, 1992. DIT101 (CSD2, CAL1), a cell cycle-regulated yeast gene required for synthesis of chitin in cell walls and chitosan in spore walls. *Yeast.* 8:1089-1099.
- Paravicini G., Cooper M., Friedli L., Smith D. J., Carpentier J. L., Klig L. S., et Payton M. A.**, 1992. The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional PKC1 gene product. *Mol.Cell Biol.* 12:4896-4905.
- Parent S. A., Nielsen J. B., Morin N., Chrebet G., Ramadan N., Dahl A. M., Hsu M. J., Bostian K. A., et Foor F.**, 1993. Calcineurin-dependent growth of an *F. J.Gen.Microbiol.* 139 ( Pt 12):2973-2984.
- Park H. O., Chant J., et Herskowitz I.**, 1993. BUD2 encodes a GTPase-activating protein for Bud1/Rsr1 necessary for proper bud-site selection in yeast. *Nature.* 365:269-274.
- Park H. O., Kang P. J., et Rachfal A. W.**, 2002. Localization of the Rsr1/Bud1 GTPase involved in selection of a proper growth site in yeast. *J.Biol.Chem.* 277:26721-26724.
- Park H. O., Sanson A., et Herskowitz I.**, 1999. Localization of bud2p, a GTPase-activating protein necessary for programming cell polarity in yeast to the presumptive bud site. *Genes Dev.* 13:1912-1917.
- Patchen M. L., D'Alesandro M. M., Brook I., Blakely W. F., et MacVittie T. J.**, 1987. Glucan: mechanisms involved in its "radioprotective" effect. *J.Leukoc.Biol.* 42:95-105.

- Peterson J., Zheng Y., Bender L., Myers A., Cerione R., et Bender A.**, 1994. Interactions between the bud emergence proteins Bem1p and Bem2p and Rho-type GTPases in yeast. *J.Cell Biol.* 127:1395-1406.
- Philip B. et Levin D. E.**, 2001. Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol.Cell Biol.* 21:271-280.
- Pillemer L. et Ecker E. E.**, 1941. Anticomplementary factor in fresh yeast. *J Biol Chem.* 139-142.
- Ponton J., Omaetxebarria M. J., Elguezabal N., Alvarez M., et Moragues M. D.**, 2001. Immunoreactivity of the fungal cell wall. *Med.Mycol.* 39:101-110.
- Popolo L., Gualtieri T., et Ragni E.**, 2001. The yeast cell-wall salvage pathway. *Med.Mycol.* 39 Suppl 1:111-121.
- Posas F., Casamayor A., et Arino J.**, 1993. The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. *FEBS Lett.* 318:282-286.
- Posas F. et Saito H.**, 1997. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science.* 276:1702-1705.
- Posas F., Takekawa M., et Saito H.**, 1998. Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr.Opin.Microbiol.* 1:175-182.
- Posas F., Wurgler-Murphy S. M., Maeda T., Witten E. A., Thai T. C., et Saito H.**, 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell.* 86:865-875.
- Primig M., Sockanathan S., Auer H., et Nasmyth K.**, 1992. Anatomy of a transcription factor important for the start of the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 358:593-597.
- PRINGLE J. R. et Hartwell L. H.**, 1981. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle, in *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Pringle J. R.**, 1991. Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor. *Methods Enzymol.* 194:732-735.
- Proft M., Pascual-Ahuir A., de Nadal E., Arino J., Serrano R., et Posas F.**, 2001. Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J.* 20:1123-1133.
- Pruyne D. et Bretscher A.**, 2000a. Polarization of cell growth in yeast. *J.Cell Sci.* 113 ( Pt 4):571-585.
- Pruyne D. et Bretscher A.**, 2000b. Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J.Cell Sci.* 113 ( Pt 3):365-375.

- Pruyne D., Legesse-Miller A., Gao L., Dong Y., et Bretscher A.,** 2004. Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 20:559-591.
- Puig O., Caspary F., Rigaut G., Rutz B., Bouveret E., Bragado-Nilsson E., Wilm M., et Seraphin B.,** 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods.* 24:218-229.
- Qadota H., Python C. P., Inoue S. B., Arisawa M., Anraku Y., Zheng Y., Watanabe T., Levin D. E., et Ohya Y.,** 1996. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science.* 272:279-281.
- Raclavsky V., Novotny R., Smigova J., et Vojkuvka Z.,** 1999. Nikkomycin Z counteracts Rylux BSU and Congo red inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth but does not prevent formation of aberrant cell walls. *Folia Microbiol.(Praha).* 44:663-668.
- Rajavel M., Philip B., Buehrer B. M., Errede B., et Levin D. E.,** 1999. Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 19:3969-3976.
- Ram A. F., Brekelmans S. S., Oehlen L. J., et Klis F. M.,** 1995. Identification of two cell cycle regulated genes affecting the beta 1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 358:165-170.
- Ram A. F., Wolters A., Ten Hoopen R., et Klis F. M.,** 1994. A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast.* 10:1019-1030.
- Rattee I. D. et Greur M. M.,** 1974. The physical chemistry of dye absorption. Academic Press, New York.
- Rechsteiner M. et Rogers S. W.,** 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem.Sci.* 21:267-271.
- Rep M., Krantz M., Thevelein J. M., et Hohmann S.,** 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J.Biol.Chem.* 275:8290-8300.
- Rep M., Reiser V., Gartner U., Thevelein J. M., Hohmann S., Ammerer G., et Ruis H.,** 1999. Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol.Cell Biol.* 19:5474-5485.
- REYNOLDS T. B., Hopkins B. D., Lyons M. R., et Graham T. R.,** 1998. The high osmolarity glycerol response (HOG) MAP kinase pathway controls localization of a yeast Golgi glycosyltransferase. *J Biol Chem.* 143:935-946.
- Reynolds T. B. et Fink G. R.,** 2001. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science.* 291:878-881.

- Richardson H. E., Wittenberg C., Cross F., et Reed S. I.**, 1989. An essential G1 function for cyclin-like proteins in yeast. *Cell*. 59:1127-1133.
- Richman T. J., Sawyer M. M., et Johnson D. I.**, 1999. The Cdc42p GTPase is involved in a G2/M morphogenetic checkpoint regulating the apical-isotropic switch and nuclear division in yeast. *J.Biol Chem*. 274:16861-16870.
- Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B., Wilm M., Mann M., et Seraphin B.**, 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat.Biotechnol*. 17:1030-1032.
- Roberts R. L., Bowers B., Slater M. L., et Cabib E.**, 1983. Chitin synthesis and localization in cell division cycle mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol*. 3:922-930.
- Roemer T. et Bussey H.**, 1991. Yeast beta-glucan synthesis: KRE6 encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis in vivo and for glucan synthase activity in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 88:11295-11299.
- Roemer T. et Bussey H.**, 1995. Yeast Kre1p is a cell surface O-glycoprotein. *Mol.Gen.Genet*. 249:209-216.
- Roemer T., Paravicini G., Payton M. A., et Bussey H.**, 1994. Characterization of the yeast (1-->6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J.Cell Biol*. 127:567-579.
- Roemer T., Vallier L., Sheu Y. J., et Snyder M.**, 1998. The Spa2-related protein, Sph1p, is important for polarized growth in yeast. *J.Cell Sci*. 111 ( Pt 4):479-494.
- Roemer T., Vallier L. G., et Snyder M.**, 1996. Selection of polarized growth sites in yeast. *Trends Cell Biol*. 6:434-441.
- Rogers S., Wells R., et Rechsteiner M.**, 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*. 234:364-368.
- Roncero C. et Duran A.**, 1985. Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J.Bacteriol*. 163:1180-1185.
- Roncero C., Valdivieso M. H., Ribas J. C., et Duran A.**, 1988a. Effect of calcofluor white on chitin synthases from *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol*. 170:1945-1949.
- Roncero C., Valdivieso M. H., Ribas J. C., et Duran A.**, 1988b. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor white. *J.Bacteriol*. 170:1950-1954.
- Ruiz C., Cid V. J., Lussier M., Molina M., et Nombela C.**, 1999. A large-scale sonication assay for cell wall mutant analysis in yeast. *Yeast*. 15:1001-1008.

- Samaj J., Baluska F., et Hirt H.**, 2004. From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. *J.Exp.Bot.* 55:189-198.
- Sambrook J. et Gething M. J.**, 1989. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature.* 342:224-225.
- Sanders S. L. et Field C. M.**, 1994. Cell division. Septins in common? *Curr.Biol.* 4:907-910.
- Santos B., Duran A., et Valdivieso M. H.**, 1997. CHS5, a gene involved in chitin synthesis and mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 17:2485-2496.
- Santos B. et Snyder M.**, 1997. Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J.Cell Biol.* 136:95-110.
- Sarkar S., Azad A. K., et Hopper A. K.**, 1999. Nuclear tRNA aminoacylation and its role in nuclear export of endogenous tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:14366-14371.
- Schiestl R. H. et Gietz R. D.**, 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr.Genet.* 16:339-346.
- Schmelzle T. et Hall M. N.**, 2000. TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* 103:253-262.
- Schmidt A., Bickle M., Beck T., et Hall M. N.**, 1997. The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell.* 88:531-542.
- Schmidt A., Kunz J., et Hall N. M.**, 1996. TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:13780-13785.
- Schwob E. et Martin R. P.**, 1992. New yeast actin-like gene required late in the cell cycle. *Nature.* 355:179-182.
- Sentandreu R., Herrero E., Elorza M. V., Rico H., et Pastor J.**, 1983. Synthesis and assembly of wall polymers on regenerating yeast protoplasts. *Experientia Suppl.* 46:187-195.
- Seufert W. et Jentsch S.**, 1990. Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.* 9:543-550.
- Shahinian S. et Bussey H.**, 2000. beta-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* 35:477-489.
- Shahinian S., Dijkgraaf G. J., Sdicu A. M., Thomas D. Y., Jakob C. A., Aebi M., et Bussey H.**, 1998. Involvement of protein N-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall beta-1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 149:843-856.

- Shaw J. A., Mol P. C., Bowers B., Silverman S. J., Valdivieso M. H., Duran A., et Cabib E.**, 1991. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J.Cell Biol.* 114:111-123.
- Shematek E. M., Braatz J. A., et Cabib E.**, 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall. I. Preparation and properties of beta-(1 leads to 3)glucan synthetase. *J.Biol.Chem.* 255:888-894.
- Sheu Y. J., Barral Y., et Snyder M.**, 2000. Polarized growth controls cell shape and bipolar bud site selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 20:5235-5247.
- Sheu Y. J., Santos B., Fortin N., Costigan C., et Snyder M.**, 1998. Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol.Cell Biol.* 18:4053-4069.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Jensen O. N., Podtelejnikov A. V., Neubauer G., Shevchenko A., Mortensen P., et Mann M.**, 1996. A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone. *Biochem.Soc.Trans.* 24:893-896.
- Shimada Y., Gulli M. P., et Peter M.**, 2000. Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat.Cell Biol.* 2:117-124.
- Shulewitz M. J., Inouye C. J., et Thorner J.**, 1999. Hsl7 localizes to a septin ring and serves as an adapter in a regulatory pathway that relieves tyrosine phosphorylation of Cdc28 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 19:7123-7137.
- Sia R. A., Herald H. A., et Lew D. J.**, 1996. Cdc28 tyrosine phosphorylation and the morphogenesis checkpoint in budding yeast. *Mol.Biol Cell.* 7:1657-1666.
- Sikorski R. S. et Hieter P.**, 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 122:19-27.
- Silverman S. J., Sburlati A., Slater M. L., et Cabib E.**, 1988. Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85:4735-4739.
- Simon I., Barnett J., Hannett N., Harbison C. T., Rinaldi N. J., Volkert T. L., Wyrick J. J., Zeitlinger J., Gifford D. K., Jaakkola T. S., et Young R. A.**, 2001. Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle. *Cell.* 106:697-708.
- Simon M. N., De Virgilio C., Souza B., Pringle J. R., Abo A., et Reed S. I.**, 1995. Role for the Rho-family GTPase Cdc42 in yeast mating-pheromone signal pathway. *Nature.* 376:702-705.
- Simons J. F., Ebersold M., et Helenius A.**, 1998. Cell wall 1,6-beta-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on ER glucosidases I and II, and the molecular chaperone BiP/Kar2p. *EMBO J.* 17:396-405.
- Singh K. K.**, 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p-Ssk1p two-component system mediates response to oxidative stress and in an oxidant-specific fashion. *Free Radic.Biol Med.* 29:1043-1050.

- Slater M. L., Bowers B., et Cabib E.**, 1985. Formation of septum-like structures at locations remote from the budding sites in cytokinesis-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 162:763-767.
- Snyder M.**, 1989. The SPA2 protein of yeast localizes to sites of cell growth. *J.Cell Biol.* 108:1419-1429.
- Snyder M., Gehrung S., et Page B. D.**, 1991. Studies concerning the temporal and genetic control of cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* 114:515-532.
- Soler M., Plovins A., Martin H., Molina M., et Nombela C.**, 1995. Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slt2 (Mpk1) required for functional activity and in vivo interaction with protein kinases Mkk1 and Mkk2. *Mol.Microbiol.* 17:833-842.
- Spellman P. T., Sherlock G., Zhang M. Q., Iyer V. R., Anders K., Eisen M. B., Brown P. O., Botstein D., et Futcher B.**, 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol.Biol Cell.* 9:3273-3297.
- Steen H. et Mann M.**, 2004. The ABC'S (and XYZ'S) of peptide sequencing. *Nature.* 5:699-711.
- Stevenson L. F., Kennedy B. K., et Harlow E.**, 2001. A large scale over expression screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies previously uncharacterized cell cycle genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98:3946-3951.
- Strahl-Bolsinger S., Gentsch M., et Tanner W.**, 1999. Protein O-mannosylation. *Biochim.Biophys.Acta.* 1426:297-307.
- Stratford M.**, 1994. Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. *Yeast.* 10:1741-1752.
- Suarit R., Gopal P. K., et Sheperd M. G.**, 1988. Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 134:
- Suzuki M., Igarashi R., Sekiya M., Utsugi T., Morishita S., Yukawa M., et Ohya Y.**, 2004. Dynactin is involved in a checkpoint to monitor cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat.Cell Biol.*
- T**akasuka T., Komiyama T., Furuichi Y., et Watanabe T., 1995. Cell wall synthesis specific cytocidal effect of *Hansenula mrakii* toxin-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol.Biol.Res.* 41:575-581.
- Timpel C., Zink S., Strahl-Bolsinger S., Schroppel K., et Ernst J.**, 2000. Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *candida albicans*. *J Bacteriol.* 182:3063-3071.
- Tong A. H., Evangelista M., Parsons A. B., Xu H., Bader G. D., Page N., Robinson M., Raghbizadeh S., Hogue C. W., Bussey H., Andrews B., Tyers M., et Boone C.**,

2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science*. 294:2364-2368.
- Tong A. H., Lesage G., Bader G. D., Ding H., Xu H., Xin X., Young J., Berriz G. F., Brost R. L., Chang M., Chen Y., Cheng X., Chua G., Friesen H., Goldberg D. S., Haynes J., Humphries C., He G., Hussein S., Ke L., Krogan N., Li Z., Levinson J. N., Lu H., Menard P., Munyana C., Parsons A. B., Ryan O., Tonikian R., Roberts T., Sdicu A. M., Shapiro J., Sheikh B., Suter B., Wong S. L., Zhang L. V., Zhu H., Burd C. G., Munro S., Sander C., Rine J., Greenblatt J., Peter M., Bretscher A., Bell G., Roth F. P., Brown G. W., Andrews B., Bussey H., et Boone C., 2004.** Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science*. 303:808-813.
- Torres L., Martin H., Garcia-Saez M. I., Arroyo J., Molina M., Sanchez M., et Nombela C., 1991.** A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol.Microbiol.* 5:2845-2854.
- Towler D. A., Gordon J. I., Adams S. P., et Glaser L., 1988.** The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu.Rev.Biochem.* 57:69-99.
- Tyers M., Tokiwa G., et Futcher B., 1993.** Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J.* 12:1955-1968.
- Uetz P., Giot L., Cagney G., Mansfield T. A., Judson R. S., Knight J. R., Lockshon D., Narayan V., Srinivasan M., Pochart P., Qureshi-Emili A., Li Y., Godwin B., Conover D., Kalbfleisch T., Vijayadamodar G., Yang M., Johnston M., Fields S., et Rothberg J. M., 2000.** A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 403:623-627.
- Uetz P. et Hughes R. E., 2000.** Systematic and large-scale two-hybrid screens. *Curr.Opin.Microbiol.* 3:303-308.
- Valtz N. et Herskowitz I., 1996.** Pea2 protein of yeast is localized to sites of polarized growth and is required for efficient mating and bipolar budding. *J.Cell Biol.* 135:725-739.
- van Drogen F. et Peter M., 2002.** Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr.Biol.* 12:1698-1703.
- Vassallo R. K. T. J. S. J. E. a. L. A. H., Kottom T. J., Standing J. E., et Limper A. H., 2001.** Vitronectin and fibronectin function as glucan binding proteins augmenting macrophage responses to *Pneumocystis carinii*. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 25:203-211.
- Verna J., Lodder A., Lee K., Vagts A., et Ballester R., 1997.** A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:13804-13809.

- Vilella F., Herrero E., Torres J., et De La Torre-Ruiz MA**, 2005. Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J Biol Chem.* 280:9149-9159.
- Vink E., Rodriguez-Suarez R. J., Gérard-Vincent M., Ribas J. C., de Nobel H., van den Ende H., Duran A., Klis F. M., et Bussey H.**, 2004. An in vitro assay for (1 → 6)-beta-D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 21:1121-1131.
- von Mering C., Krause R., Snel B., Cornell M., Oliver S. G., Fields S., et Bork P.**, 2002. Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature.* 417:399-403.
- Wang T. et Bretscher A.**, 1995. The rho-GAP encoded by BEM2 regulates cytoskeletal structure in budding yeast. *Mol.Biol.Cell.* 6:1011-1024.
- Watanabe M., Gomi S., Tohyama H., Ohtsuka K., Shibahara S., Inouye S., Kobayashi H., Suzuki S., Kondo S., Takeuchi T., et Yamaguchi H.**, 1996. Binding of benanomycin A to fungal cells in reference to its fungicidal action. *J.Antibiot.* 49:366-373.
- Watanabe Y., Irie K., et Matsumoto K.**, 1995. Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol.Cell Biol.* 15:5740-5749.
- Willems A. R., Lanker S., Patton E. E., Craig K. L., Nason T. F., Mathias N., Kobayashi R., Wittenberg C., et Tyers M.**, 1996. Cdc53 targets phosphorylated G1 cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell.* 86:453-463.
- Wilm M., Shevchenko A., Houthaeve T., Breit S., Schweigerer L., Fotsis T., et Mann M.**, 1996. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature.* 379:466-469.
- Winkler A., Arkind C., Mattison C. P., Burkholder A., Knoche K., et Ota I.**, 2002. Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot.Cell.* 1:163-173.
- Wood P. J.**, 1980. Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr.Res.* 81:271-287.
- Woods R. A. et Gietz R. D.**, 2001. High-efficiency transformation of plasmid DNA into yeast. *Methods Mol.Biol.* 177:85-97.
- Wright P. E. et Dyson H. J.**, 1999. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol.Biol.* 293:321-331.
- Wu C.**, 1997. Chromatin remodeling and the control of gene expression. *J Biol Chem.* 272:28171-28174.

- Yabe T., Yamada-Okabe T., Kasahara S., Furuichi Y., Nakajima T., Ichishima E., Arisawa M., et Yamada-Okabe H., 1996.** HKR1 encodes a cell surface protein that regulates both cell wall beta-glucan synthesis and budding pattern in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 178:477-483.
- Yamamoto T., Hiratani T., Hirata H., Imai M., et Yamaguchi H., 1986.** Killer toxin from *Hansenula mrakii* selectively inhibits cell wall synthesis in a sensitive yeast. *FEBS Lett.* 197:50-54.
- Yamochi W., Tanaka K., Nonaka H., Maeda A., Musha T., et Takai Y., 1994.** Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* 125:1077-1093.
- Yang S., Ayscough K. R., et Drubin D. G., 1997.** A role for the actin cytoskeleton of *Saccharomyces cerevisiae* in bipolar bud-site selection. *J.Cell Biol.* 136:111-123.
- Yip C. L., Welch S. K., Klebl F., Gilbert T., Seidel P., Grant F. J., O'Hara P. J., et MacKay V. L., 1994.** Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:2723-2727.
- Yoda K., Kawada T., Kaibara C., Fujie A., Abe M., Hitoshi, Hashimoto, Shimizu J., Tomishige N., Noda Y., et Yamasaki M., 2000.** Defect in cell wall integrity of the yeast *saccharomyces cerevisiae* caused by a mutation of the GDP-mannose pyrophosphorylase gene VIG9. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 64:1937-1941.
- Yoon H. J., Feoktistova A., Wolfe B. A., Jennings J. L., Link A. J., et Gould K. L., 2002.** Proteomics Analysis Identifies New Components of the Fission and Budding Yeast Anaphase-Promoting Complexes. *Curr.Biol.* 12:2048-2054.
- Yoshida S., Ikeda E., Uno I., et Mitsuzawa H., 1992.** Characterization of a staurosporine- and temperature-sensitive mutant, *stt1*, of *Saccharomyces cerevisiae*: STT1 is allelic to PKC1. *Mol.Gen.Genet.* 231:337-344.
- Yoshida S., Ohya Y., Goebel M., Nakano A., et Anraku Y., 1994a.** A novel gene, STT4, encodes a phosphatidylinositol 4-kinase in the PKC1 protein kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 269:1166-1172.
- Yoshida S., Ohya Y., Nakano A., et Anraku Y., 1994b.** Genetic interactions among genes involved in the STT4-PKC1 pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.* 242:631-640.
- Yuasa H., Kaneshige J., Ozeki T., Kasai T., Eguchi T., et Ishiwaki N., 2000.** Application of acid-treated yeast cell wall (AYC) as a pharmaceutical additive. II: effects of curing on the medicine release from AYC-coated tablets. *Int.J.Pharm.* 209:69-77.
- Yuasa H., Kaneshige J., Ozeki T., Kasai T., Eguchi T., et Ishiwaki N., 2002.** Application of acid-treated yeast cell wall (AYC) as a pharmaceutical additive. III. AYC aqueous coating onto granules and film formation mechanism of AYC. *Int.J.Pharm.* 237:15-22.

- Zahner J. E., Harkins H. A., et Pringle J. R.**, 1996. Genetic analysis of the bipolar pattern of bud site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 16:1857-1870.
- Zakrzewska A., Boorsma A., Brul S., Hellingwerf K., et Klis F. M.**, 2005. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryot.Cell.* 4:703-715.
- Zarzov P., Mazzone C., et Mann C.**, 1996. The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J.* 15:83-91.
- Zhang D. et Miller M. J.**, 1999. Polyoxins and nikkomycins: progress in synthetic and biological studies. *Curr.Pharm.Des.* 5:73-99.
- Zhang X., Lester R. L., et Dickson R. C.**, 2004. Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *J Biol Chem.* 279:22030-22038.
- Zheng X. F., Florentino D., Chen J., Crabtree G. R., et Schreiber S. L.**, 1995. TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. *Cell.* 82:121-130.
- Zheng Y., Bender A., et Cerione R. A.**, 1995. Interactions among proteins involved in bud-site selection and bud-site assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 270:626-630.
- Zheng Y., Cerione R., et Bender A.**, 1994. Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. Catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *J.Biol.Chem.* 269:2369-2372.
- Zhu H. et Snyder M.**, 2001. Protein arrays and microarrays. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 5:40-45.
- Ziman M., Chuang J. S., et Schekman R. W.**, 1996. Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. *Mol.Biol Cell.* 7:1909-1919.
- Ziman M., Preuss D., Mulholland J., O'Brien J. M., Botstein D., et Johnson D. I.**, 1993. Subcellular localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol.Biol.Cell.* 4:1307-1316.
- Zlotnik H., Fernandez M. P., Bowers B., et Cabib E.**, 1984. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J.Bacteriol.* 159:1018-1026.
- Zu T., Verna J., et Ballester R.**, 2001. Mutations in WSC genes for putative stress receptors result in sensitivity to multiple stress conditions and impairment of Rlm1-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Genet.Genomics.* 266:142-155.

## 7 ANNEXES.

### 7.1 Liste des figures.

Figure 1 : Représentation schématique de la structure moléculaire de la paroi cellulaire chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	12
Figure 2 : Bloc de construction typique de la paroi chez <i>S. cerevisiae</i> . Les relations entre des différents composants d'un bloc de construction sont représentées par les flèches continues (Klis <i>et coll</i> , 2002)(adapté par Martin-Yken <i>et coll</i> , 2002) .....	14
Figure 3: Les différentes options de développement chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . .....	33
Figure 4 : Les différentes phases du cycle cellulaire végétatif de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . .....	34
Figure 5 : Les schémas de bourgeonnement axial et bipolaire chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . La cicatrice marque la place où la cellule a été initialement attachée à la cellule mère (M), appelé la cicatrice de naissance, alors que les cicatrices qui sont plus petites provenant de la cellule fille sont appelées les cicatrices de bourgeon. De nombreuses protéines nécessaires pour la sélection du site de bourgeonnement ont été identifiées. Elles peuvent être classées en trois groupes selon les différents phénotypes de schéma de bourgeonnement associés. ....	35
Figure 6 : Un schéma récapitulatif représentant la voie de la régulation du cytosquelette d'actine et la croissance de bourgeon aux repères corticaux. Les protéines qui appartiennent au même groupe sont encadrées ensemble. La ligne pointillée représente la régulation des gènes hypothétique ( <i>BUD1</i> , <i>BUD2</i> et <i>BUD5</i> ) par des gènes spécifiques impliqués dans la sélection du site de bourgeonnement chez les cellules diploïdes.....	37
Figure 7 : Schéma récapitulatif des cascades MAPK qui régulent la croissance et la différenciation chez la levure <i>S. cerevisiae</i> . Les deux voies de signalisation encadrées sont connues comme étant impliquées dans la régulation de la paroi.....	51
Figure 8 : Voie de la Pkc1-Mapk1/Slr2.....	53
Figure 9 : Voie de signalisation MAP kinase dépendante de Hog1, deux senseurs sont impliqués dans l'activation de la voie HOG. ....	58
Figure 10 : La voie de signalisation TOR. Tor2 partage une fonction commune avec Tor1p et possède une autre fonction unique. ....	59
Figure 11 : Un modèle proposé pour la fonction de Knr4 dans la voie de Slr2 MAP kinase de chez la levure <i>S.cerevisiae</i> . ....	64
Figure 12 : Schéma représentant la principe de la mutagenèse dirigée par PCR recombinante. ....	78

- Figure 13 : La principe de la méthode de double hybride..... 89
- Figure 14 : schéma représentant les étapes du purification sur colonne par affinité (TAP-tag)  
..... 95
- Figure 15: Abondance de la protéine Knr4 au cours de la croissance (souche AR27). A- cinétique de croissance de la souche AR27 et cinétique de la dégradation de Knr4. B- western-blot réalisé sur des échantillons prélevés au cours de la croissance en utilisant des anticorps anti-Knr4, dilution 1/5000. (IP/ $\mu$ g est la quantité de protéines quantifiés par rapport à l'intensité des bandes mesurées)..... 97
- Figure 16 : Abondance de la protéine Knr4 au cours de la croissance (AR27). A- Intensité relative de la protéine Knr4 exprimée par  $\mu$ g de protéine totale au cours de la croissance sur un milieu YPD. B- Abondance de Knr4 estimée par un Western-blot réalisé sur des échantillons prélevés au cours de la croissance en utilisant des anticorps anti-Knr4 (1/10000). La quantité de protéines a été dosée afin de déposer une quantité équivalente sur le gel et l'intensité des bandes détectées sur le gel a été quantifiée en utilisant le logiciel ImageQuant Version 5.2. (IP/ $\mu$ g est la quantité de protéines quantifiées par rapport à l'intensité des bandes mesurées)..... 98
- Figure 17: Dégradation de la protéine Knr4 au cours de la croissance dans la souche BY4741 transformée par le plasmide multicopie pHM37. A- cinétique de croissance de la souche BY4741-pHM37. B- Western-blot réalisé sur des échantillons prélevés de la souche BY4741-pHM37, en utilisant les anticorps anti-Knr4.(1/5000). ..... 99
- Figure 18 : Quantification des ARNm de *KNR4* et *GSY2* par RT-PCR quantitative en temps réel A- Croissance de la souche AR27 sur milieu YPD. Des échantillons ont été prélevés à  $DO_{600} = 1,2$ ,  $DO_{600} = 4,5$  et  $DO_{600} = 8,0$  pour les analyser par RT-Q-PCR. B- Le niveau de l'expression des gènes *KNR4* et *GSY2* (contrôle) a été quantifié par RT-Q-PCR par rapport aux niveaux des ARNm de quatre gènes de référence. Les résultats sont analysés par le logiciel geNorm. .... 101
- Figure 19: Estimation de la masse moléculaire de Knr4. A- Profil de gel de filtration de Knr4. 75 fractions ont été collectées. B- courbe d'étalonnage pour la détermination de la masse moléculaire de la protéine Knr4 sur chromatographie de gel de filtration. C- Western-blot réalisé sur les fractions de la colonne (seules les fractions qui ont donné un signal sont présentées). L'intensité des bandes identifiées à été mesurée par le logiciel ImageQuant V 5.2. A= révélation de Knr4 dans l'extrait cellulaire de départ. .... 103
- Figure 20 : Analyse de la protéine de fusion MBP-Knr4 exprimée dans *E.coli* BL21. Après 4 heures d'induction par 0,5mM d'IPTG, les cellules sont récoltées et lysées par la suite.

- Un gel de protéine 8% a été réalisé sur une partie du lysat cellulaire non-traité (-) par le facteur Xa, et une autre partie traité (+). A- Gel de protéine SDS-PAGE (12%) coloré par le bleu de coomassie. B- Western-blot utilisant des anticorps anti-Knr4, dilution 1/5000. Une bande correspondant à la MBP a été identifiée par les anticorps, car ces anticorps ont été réalisés à partir de la fusion Knr4-MBP. .... 104
- Figure 21 : La protéine mutée Knr4<sup>400aa</sup> migre avec une taille proche de 65kDa. La souche de bactérie BL21 transformée par le plasmide pFD6 (KNR4<sup>1-1188</sup>-HIStag) a été mise en croissance. L'expression de la protéine de fusion a été induite avec 1mM d'IPTG. Après la purification, un gel de protéine SDS-PAGE (12%) a été réalisé sur l'éluat obtenu... 105
- Figure 22: Profil du gradient de saccharose de Knr4. L'extrait cellulaire a été chargé sur un gradient de 5 à 20%, ensuite une centrifugation de 12h/100,000g a été réalisée. 18 fractions ont été collectées. Les protéines ont été analysées par Western-blot en utilisant des anticorps anti-Knr4 (dilution 1/5000). L'intensité des bandes identifiées sur la membrane a été quantifiée en utilisant le logiciel ImagQuant Ver5.2 ..... 108
- Figure 23 : induction de la protéine de fusion GST-Tys1, une induction élevée a été obtenue au bout de 2 heures. .... 111
- Figure 24: Interaction physique entre Knr4 etTys1 par une expérience de type "pull-down". Un gel de protéine SDS-PAGE (12%) a été réalisé. A- Visualisation de la protéine Knr4 après élution de la colonne d'affinité, les anticorps polyclonaux anti-Knr4 ont été utilisés. B- Gel de protéine SDS-PAGE réalisé sur les éluats contenant GST et la fusion GST-Tys1, le gel a été coloré par le bleu de coomassie. .... 112
- Figure 25: Schéma représentant la méthodologie utilisée pour réaliser la recherche des gènes synthétiques létaux avec la délétion *knr4*. .... 118
- Figure 26: Knr4-TAPtag a une taille supérieure à celle de Knr4 (contrôle). Un gel de protéine (12%) SDS-PAGE a été réalisé suivi par un Western-blot réalisé avec des anticorps anti-Knr4. .... 120
- Figure 27 : Test de sensibilité au blanc de Calcofluor (CFW) de la souche FB1 (KNR4-TAPtag). Le test a été réalisé sur un milieu YPD contenant 0,05mg/ml de CFW. .... 120
- Figure 28: Gel de protéines en conditions dénaturantes réalisé pour séparer les protéines copurifiées avec Knr4 après la purification sur la colonne de chromatographie d'affinité. Le gel a été coloré en présence de bleu colloïdal et les bandes les plus visibles ont été excisées, et après une digestion par la trypsine, les peptides sont analysés par MALDI-TOF. .... 122

- Figure 29: Vérification des étapes de la purification TAP. A- Western-blot réalisé en utilisant des anticorps anti-ProtA pour vérifier d'une part la construction Knr4-TAPtag et d'autre part les étapes de purification après le clivage par la TEV protéase sur la colonne de chromatographie TAP-tag. B- Gel de protéines SDS-PAGE réalisé après une purification TAP sur la souche AR27 (wild type). L'éluat obtenu après la 2<sup>ème</sup> étape de purification sur la colonne contenant les billes de Calmoduline a été concentré par le TCA/DOC. 124
- Figure 30: Caractérisation du complexe TAP. Gel de protéines SDS/PAGE (12%) réalisé après une purification TAP-tag en deux étapes. L'éluat a été concentré par le TCA/DOC et le gel a été coloré par le bleu colloïdal. Les bandes sont excisées et analysées par LC-MS/MS ..... 127
- Figure 31: Western-blot réalisé sur différents échantillons prélevés lors de la purification de KNR4-TAP. Des échantillons au cours de l'étape d'extraction ont été prélevés ainsi qu'au cours de la purification. Des anticorps anti-Knr4 ont été utilisés (dilution 1/4000). EB1: extrait brut, EB2: Extrait brut, FL1: Protéines non-retenues après la 1<sup>ère</sup> étape de purification sur une colonne d'IgG, EL1: Eluat récupéré après le clivage par la protéase TEV, FL2: Protéines non-retenues après la 2<sup>ème</sup> étape purification de colonne contenant les billes de Calmoduline (Flow through), LA2: Protéines éluées dans le lavage de la colonne par le tampon IPP150 CEB avant l'étape d'élution..... 130
- Figure 32: Analyse de l'interaction entre Knr4 et ses partenaires protéiques. Après précipitation un gel de protéine SDS-PAGE 12% a été réalisé permettant la séparation des protéines interagissant avec Knr4 et le gel a été coloré avec le bleu colloïdal..... 131
- Figure 33 : Knr4 interagit physiquement avec Slt2. Un Western-blot en utilisant des anticorps anti-Slt2 (1/2000) a été réalisé. EB : extrait brut obtenu après le cassage des cellules, Fraction 2 : éluat obtenue après l'élution par le tampon CEB de la colonne contenant les billes d'IgG..... 134
- Figure 34: Tests de sensibilité au Calcofluor (CFW), rouge congo (rouge Congo) , Acide sorbique, SDS, caféine, des souches de levure délétées pour certains gènes dont les produits ont été identifiés par TAP-tag. Les souches contrôles et mutantes ont été mises en culture dans du milieu liquide YNB toute une nuit jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance ( $DO_{530} = 2,0$ ). Les cellules sont alors récoltées par centrifugation puis reprises dans de l'eau stérile à la  $DO_{530} = 8,0$  et déposées à différentes dilutions sur le milieu solide. .... 140

Figure 35 : Recouvrement entre les méthodes de létalité synthétique, double-hybride et les données de TAP-tag. Pour simplifier l'image, seuls certains gènes représentatifs du crible synthétique létal (Lesage G. <i>et coll.</i> , 2004) sont présentés. ....	144
Figure 36: Schéma représentant les différents domaines tronqués de <i>KNR4</i> clonés dans le plasmide de double-hybride pOBD-80. Les positionnements possibles des régions Coiled-coil et des zones de "Low-complexity" sont prédits par SMART. ....	147
Figure 37: Tests de sensibilité blanc de Calcuofluor (CFW) et acide sorbique de la souche HM13 transformée par le plasmide pOBD80-KNR4 <sup>(S200A-S203A)</sup> . ....	149
Figure 38: Complémentation de la délétion <i>knr4</i> par l'allèle mutant dans la souche AR27. La photographie est prise après 2 jours de croissance à 30°C.....	153
Figure 39 : Vérification de l'expression de la fusion Knr4** <sup>-</sup> -GFP. Un western-blot a été réalisé, A- la membrane a été révélée en utilisant des anticorps anti-Knr4. B- la membrane a été révélée en utilisant des anticorps anti-GFP.....	154
Figure 40 : Test de sensibilité au blanc de calcofluor (CFW) et à la température 38°C de la souche HM1315( $\Delta knr4$ ) transformée par le plasmide pHM64 portant la fusion Knr4 <sup>(S200A-S203A)</sup> -GFP.....	154
Figure 41 : La localisation de Knr4-GFP (panneau de gauche) et de Knr4 <sup>(S200A-S203A)</sup> -GFP – (panneau de droite) est observée dans le cytoplasme et au col du bourgeon. L'observation des cellules a été réalisée par la microscopie de fluorescence.....	155
Figure 42 : Vue globale des différents fragments délétés de <i>KNR4</i> montrant les domaines de Knr4 impliqués dans son interaction avec ses partenaires. ....	156
Figure 43 : Réseau de l'interaction de Knr4. Ce schéma regroupe les résultats des approches 'physiques' d'interaction (TAPtag et double hybride) identifiés avec Knr4. ....	159

## 7.2 Liste des tableaux.

Tableau 1 : Composition de la paroi de <i>S. cerevisiae</i> exprimé en pourcentage (d'après Fleet, 1991, Klis, 1994, Dallies <i>et coll</i> , 1998).....	12
Tableau 2 : Liste des gènes impliqués dans la synthèse et la dégradation des $\beta(1,3)$ glucanes chez <i>S.cerevisiae</i> .....	23
Tableau 3 : Liste des gènes impliqués dans la synthèse des $\beta(1,6)$ glucanes chez la levure <i>S.cerevisiae</i> .....	26
Tableau 4 : Souches de levures utilisées. ....	65
Tableau 5 : Liste des mutants de la collection EUROSCARF utilisées.....	65
Tableau 6 : Plasmides utilisés. ....	66
Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés. ....	68
Tableau 8 : Liste des oligonucléotides utilisée pour la quantification des transcrits par PCR quantitative en temps réel.....	69
Tableau 9: Croissance sur milieu $ade^-$ ou $his^-$ et activité $\beta$ -Galactosidase résultante de l'interaction de Knr4 avec les trois protéines isolées par l'approche de double-hybride .....	110
Tableau 10: Teneur en dityrosine dans les spores chez les cellules diploïdes mutées pour <i>KNR4</i> et <i>TYS1</i> .....	114
Tableau 11 : Rendement protéique estimé au cours de l'expérience de TAP-tag.....	123
Tableau 12: Protéines identifiées après une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF. ....	125
Tableau 13 : Bilan récapitulatif de protéines quantifiées au cours de l'expérience de TAPtag, de la préparation de l'extrait brut jusqu'à l'étape de lavages de la colonne d'IgG. ....	126
Tableau 14 : Protéines considérées comme des contaminants identifiés après les analyses par spectrométrie de masse LC-MS/MS .....	127
Tableau 15: partenaires protéiques potentiels co-purifiant avec Knr4 par le TAP-tag. Les protéines ont été identifiées par LC-MS/MS.....	128
Tableau 16 : Bilan des protéines quantifiées au cours de l'expérience de purification TAPtag. ....	129
Tableau 17: Protéines co-purifiant avec Knr4 après la purification TAP-tag, Ces protéines sont considérées comme potentiellement spécifiques pour Knr4. ....	132
Tableau 18 : Protéines non-spécifiques identifiées après une purification de Knr4-TAP. ....	133
Tableau 19 : protéines « non-spécifiques » identifiées après une purification de Knr4-TAP. ....	135

---

Tableau 20: Protéines co-purifiées avec Knr4 avec la purification TAP-tag, Ces résultats sont issus de deux expériences indépendantes.....	136
Tableau 21: Score des mutants de levure délétés pour les gènes dont les produits ont été co-purifiés avec Knr4 par l'approche de TAP-tag. ....	139
Tableau 22: Quantification de l'activité $\beta$ -galactosidase (nmol/ min. mg protéine) entre les domaines de Knr4 et ses partenaires protéiques par l'approche de double-Hybride. ....	148
Tableau 23: l'interaction entre Knr4** (pHM66) et certains partenaires. ....	150
Tableau 24 : Quantification de l'activité $\beta$ -galactosidase du facteur de transcription Rlm1. Cette analyse a été réalisée dans une souche $\Delta knr4$ transformée par le plasmide pFB1 portant le gène muté <i>KNR4**</i> et le plasmide pHSP100 permettant de mesurer l'activité transcriptionnelle de Rlm1. ....	151

### 7.3 Abréviations.

<b>A :</b>	Absorbance
<b>Acétyl-CoA :</b>	Acétyl coenzyme A
<b>AD :</b>	Activation domain = Domaine d'activation
<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc :</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>AMP :</b>	Adénosine monophosphate
<b>AMPe :</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>APS :</b>	Ammonium perosulfate
<b>ARN :</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm :</b>	Acide ribonucléique messager
<b>ARNt :</b>	Acide ribonucléique de transfert
<b>Asn :</b>	Asparagine
<b>Asp :</b>	Aspartate
<b>ATP :</b>	Adénosine triphosphate
<b>ATPMg :</b>	Adénosine triphosphate préparé avec du magnésium en concentration équimolaire
<b>BD:</b>	Binding domain = Domaine de fixation
<b>CBB:</b>	Calmodulin binding buffer
<b>CEB:</b>	Calmodulin eluion buffer
<b>Co<sup>2+</sup> :</b>	Ion cobalt
<b>Cu<sup>2+</sup> :</b>	Ion cuivre
<b>CWP :</b>	Cell wall protein = protéine de la paroi
<b>dATP :</b>	Acide désoxyadénosine-5'-triphosphate
<b>dCTP :</b>	Acide désoxycytidine-5'-triphosphate
<b>DEPC :</b>	Diéthyl pyrocarbonate
<b>dGTP :</b>	Acide désoxyguanosine-5'-triphosphate
<b>DMSO :</b>	Diméthyl sulfoxyde
<b>dNTPs :</b>	Désoxyribonucléotides-5'-triphosphate

---

<b>DO :</b>	Densité optique cellulaire
<b>DOC :</b>	Déoxycholate
<b>dTTP :</b>	Acide désoxythymidine-5'-triphosphate
<b>dUTP :</b>	Acide désoxyuridine-5'-triphosphate
<b>DTT:</b>	Dithioerythriol
<b>EDTA :</b>	Acide éthylène diamine tétra-acétate
<b>EGTA :</b>	Acide éthylène glycole tétra-acétique
<b>GFP :</b>	Green fluorescent protein = Protéine fluorescente verte
<b>Glc :</b>	Glucose
<b>GPI :</b>	Glycosyl phosphatidyl inositol
<b>GST:</b>	Glutathione-S-Transferase
<b>GTP :</b>	Guanosine-5' triphosphate
<b>H<sub>2</sub>O :</b>	Eau
<b>HCl :</b>	Acide chlorydrique
<b>Hepes :</b>	<i>N</i> -[2-hydroxyéthyl]piperazine- <i>N'</i> -[acide 2-éthane sulfonique]
<b>IPTG :</b>	isopropyl β-D-thiogalactopyranoside
<b>Kac :</b>	Acétate de potassium
<b>kb :</b>	Kilobase
<b>KCl:</b>	Chlorure de potassium
<b>kDa :</b>	Kilodalton
<b>K<sub>m</sub> :</b>	Constante michaélienne
<b>LiAc :</b>	Acétate de lithium
<b>ln :</b>	Logarithme népérien
<b>Log :</b>	Logarithme décimal
<b>M :</b>	mol.L <sup>-1</sup>
<b>Man :</b>	Mannose
<b>MAP kinase :</b>	Mitogen activated protein kinase
<b>MAT :</b>	Locus déterminant le type sexuel chez la levure <i>S. cerevisiae</i>
<b>MBP :</b>	Maltose binding protein

---

<b>Mg<sup>2+</sup></b> :	Ion magnésium
<b>mol, mmol, μmol, nmol</b> :	Mole, millimole, micromole, nanomole
<b>Mn<sup>2+</sup></b> :	Ion manganèse
<b>MOPS</b> :	Acide sulfonique <i>N</i> -morpholino propane
<b>NaCl</b> :	Sodium chlorure
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> :	Dissodium hydrogène phosphate
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> :	Sodium déshydrogénophosphate
<b>NaOAc</b> :	Oxaloacétate de sodium
<b>nm</b> :	Nanomètre
<b>ONPG</b> :	<i>O</i> -nitro β- <i>D</i> galactopyranoside
<b>ORF</b> :	Open reading frame = cadre ouvert de lecture
<b>Pi</b> :	Phosphate
<b>PAGE</b> :	Polyacrylamide gel electrophoresis = gel d'électrophorèse en polyacrylamide
<b>Pb</b> :	Paire de bases
<b>PCR</b> :	Polymerase chain reaction = Réaction de polymérisation en chaîne
<b>PEG</b> :	Polyéthylène glycole
<b>PMSF</b> :	Fluorure de phénylméthyl sulfonate
<b>Qsp</b> :	Quantité suffisante pour
<b>Q-RT-PCR</b> :	PCR quantitative en temps réel
<b>R<sup>2</sup></b> :	Coefficient de détermination
<b>RE</b> :	Réticulum endoplasmique
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>rpm</b> :	Rotations par minute
<b>SDS</b> :	Sodium dodécyl sulfate
<b>SEM</b> :	Scanning electron microscope = Microscope électronique à balayage
<b>Ser</b> :	Sérine
<b>TA</b> :	Température ambiante
<b>TCA</b> :	Acide trichloroacétique
<b>TE</b> :	Tris-EDTA

---

<b>TEM :</b>	Transmission Electron Microscope = Microscope électronique à transmission
<b>TEMED :</b>	N-N-N'-N'-tétraméthyléthyldiamine
<b>TEV :</b>	Tobacco Etch Virus
<b>Thr :</b>	Thréonine
<b>Tris :</b>	Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane
<b>ts :</b>	Allèle thermosensible
<b>UDO :</b>	Unité de densité optique
<b>UV :</b>	Ultraviolet
<b>V, kV :</b>	Volt, Kilovolt
<b>v/v :</b>	Volume à volume
<b>w/v :</b>	Poids à volume
<b>X-Gal :</b>	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactoside
<b>°C :</b>	Degré Celsius
<b><math>\mu</math> :</b>	Taux de croissance
<b><math>\mu</math>F :</b>	Microfaraday
<b><math>\mu</math>l :</b>	Microlitre
<b><math>^{32}\text{P}</math>, <math>^{33}\text{P}</math> :</b>	Phosphore 32; Phosphore 33

## 7.4 Congrès, Communications et Publications.

### 7.4.1 Congrès et communication.

**Congrès Européen (Levure, modèle et outil). Genève, Suisse, (2003), Communication par affiche** : Etude des partenaires de la protéine Knr4 impliquée dans la régulation de l'assemblage de la paroi cellulaire chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

**Congrès Européen (Levure, modèle et outil). Bruxelles, Belgique, (2001), Communication par affiche** : Interaction de la protéine Knr4p, impliquée dans la synthèse de la paroi, avec le tyrosyl tARNt synthétase Tys1p chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

**Journée de l'Ecole doctorale Sciences–Vétérinaires–Ecologie–Agronomie–Bioingénierie (SEVAB) de Toulouse, (2004), Communication orale**. Etude des partenaires de Knr4p impliqués dans la régulation de l'assemblage de la paroi cellulaire chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

### 7.4.2 Publications.

**Adilia Dagkessamanskaia, Helene Martin-Yken, Fadi Basmaji, Peter Briza and Jean François.** (2001). Interaction of Knr4 protein, a protein involved in cell wall synthesis, with tyrosine tRNA synthetase encoded by *TYS1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* 200 (2001) 53-58.

**Helene Martin-Yken, Adilia Dagkessamanskaia, Fadi Basmaji, Arnaud Lagorce and Jean François.** (2003). The interaction of Slt2 MAP kinase with Knr4 is necessary for signaling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* (2003) 49 (1), 23–35.

**Fadi Basmaji, Helene Martin-Yken, Fabien DURAND, Adilia Dagkessamanskaia , Carole PICHEREAUX, Michel ROSSIGNOL and Jean M FRANCOIS.** (2005). The interactome of the Knr4/Smi1, a protein implicated in coordinating cell wall assembly with cellular growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Accépté dans Molecular Genetic and Genomics*.