

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Approche génétique du rôle des systèmes de protéolyse dépendants de l'ubiquitine sur la CAK chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*

Gastellier, Mélanie

*Award date:*  
2002

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Approche génétique du rôle des systèmes de protéolyse dépendants de  
l'ubiquitine sur la CAK chez la levure *Schizosaccharomyces pombe***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Mélanie GASTELLIER

Juin 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
FACULTE DES SCIENCES  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR  
Téléphone : + 32(0)81.72.44.18. – Téléfax : + 32(0)81.72.44.20.  
E-mail : [joelle.jonet@fundp.ac.be](mailto:joelle.jonet@fundp.ac.be) – <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## **Approche génétique du rôle des systèmes de protéolyse dépendants de l'ubiquitine sur la CAK chez la levure *Schizosaccharomyces pombe***

Gastellier Mélanie

### Résumé

L'horloge du cycle cellulaire contrôle la progression des cellules eucaryotes à travers les phases principales de synthèse d'ADN (phase S) et de division mitotique (phase M). Un mécanisme clé de cette horloge repose sur l'activation successive de couples CDK (pour Cyclin Dependant Kinase) / cycline. L'activation d'une CDK est le résultat d'événements cumulés tels que des phosphorylations, déphosphorylations, liaisons d'activateurs (cycline), perte d'interaction avec des inhibiteurs (CKI), dégradation d'inhibiteurs,...

*Schizosaccharomyces pombe* constitue un prototype classique pour l'étude du cycle cellulaire des mammifères et essentiellement de la transition G2-M. L'analyse *in silico* du génome révèle la présence de deux CDKs : Cdc2 et Mcs6. Cdc2 est l'acteur principal de l'horloge cellulaire dont les phases sont rythmées par son association à des cyclines. L'entrée en mitose est déclenchée par l'activation de Cdc2 suite à sa liaison à Cdc13 et par la phosphorylation activatrice du « T-loop » due à la CDK Mcs6. La seconde CDK des levures de fission est Mcs6 qui, associée à la cycline Mcs2 et à Pmh1, constitue la CAK (CDK Activating Kinase).

Au laboratoire, antérieurement au travail présenté dans ce mémoire, des interactions double-hybride entre deux composants de la CAK (Pmh1 et Mcs2) et Shp1 (pour Skp1 homologue *S. pombe*) ont été mises en évidence. Shp1 forme, en association avec une Culline, le pilier d'un complexe (SCF) impliqué dans l'ubiquitinylation de substrats à dégrader par le protéasome 26S. Ce double ancrage de Shp1 sur la CAK tend à suggérer une régulation post-traductionnelle de la CAK par la protéolyse. Pour tester cette hypothèse, nous suivons en western-blot la concentration des constituants de la CAK dans des souches mutées dans deux complexes impliqués dans la protéolyse : le protéasome 26S (mutants : *mts2-1* et *mts3-1*) et l'ubiquitine ligase de type SCF (mutant : *shp1-3*).

L'ensemble de nos données n'a pas permis de mettre en évidence une influence significative des mutations des systèmes de protéolyse dépendants de l'ubiquitine sur l'accumulation des constituants de la CAK chez *S. pombe*, ce qui conduit à émettre d'autres hypothèses explicatives sur la signification biologique de l'interaction double-hybride.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2002

Promoteur : J. Vandenhoute, Laboratoire de Génétique Moléculaire, URBM

Pour ce mémorable mémoire,

Je tiens à remercier :

-Monsieur Vandenhoute pour son accueil au sein du laboratoire de génétique mais surtout pour avoir accordé de son temps et fait part de précieux conseils utiles à l'amélioration de la rédaction.

-les lecteurs de ce mémoire : Madame M. Raes et Messieurs X. De Bolle, T. Arnould et D. Hermand pour l'attention qu'ils porteront à ce manuscrit.

-également Madame K. Gould et Messieurs D. Hermand, G. Cottarel, Tomi P. Mäkelä pour avoir fourni les outils nécessaires à la démarche scientifique.

-tout particulièrement Sophie,  
pour le suivi efficace que j'ai reçu tout au long de ce semestre, tant du point de vue des manipulations que de la rédaction,  
pour avoir toujours été là en cas de problème et à la moindre question,  
pour ses encouragements,  
pour les magnifiques surnoms que je me suis vus attribuer ces derniers mois et enfin  
pour les nombreux fou rires qui ont allégé le labeur.

-Lionel qui comme Sophie a toujours été présent et prêt à m'aider,  
pour le sourcil en accent circonflexe dont on se sera bien moqué,  
et lui de me remercier d'avoir été la plus petite cette année.

-Rose-Marie pour ces éclats de rire entraînant.

En fait, toute la petite équipe *pombe* (en italique !!!) au sein de laquelle il fait bon vivre grâce à la bonne humeur qui y règne. Je ne sais pas comment vous remercier comme il se doit, vous avez été géniaux, et je l'avoue, je n'aurai pas pu mieux tomber.

-les autres membres du groupe de génétique, Monique qui a comme Rose-Ma un rire délirant, Godefroid pour ses improvisations et tous les délires de Fwed, Ben, Max et Vincent, j'ai beaucoup ri...

-tous les autres mémorants, thésards et techniciens qui par leurs conseils, leurs rires ont apporté une touche de légèreté au mémoire. Sans oublier Etienne et Jérôme pour qui les ordinateurs n'ont plus de mystère. Et Madame Libion.

-je remercie surtout mes parents qui ne m'auront pas supporté qu'un semestre mais toutes ces années à l'université, ce qui je le reconnais n'aura pas toujours du être facile, et ce n'est pas fini...

pour m'avoir donné la chance de faire ce que je souhaitais, et pour me pousser à aller jusqu'au bout de mes rêves,

pour avoir toujours été présents, de près comme de loin,

pour leurs encouragements et leur soutien qui m'ont tant aidé,

pour l'intérêt qu'ils ont toujours porté à ce que je fais.

-mais encore Matija grâce à qui ces études ont été plus supportables

pour avoir partagé ces quatre ans avec moi,

pour m'avoir supporté dans les bons comme dans les mauvais jours,

pour nos encouragements mutuels et notre travail assidu mais aussi

pour son sens de l'humour qui nous apporte gaieté et joie.

-et enfin, Cindy pour nos délires, angoisses et compagnie...

<i>Listes des abréviations courantes(1)</i> .....	<b>1</b>
<i>Conventions génétiques</i> .....	<b>2</b>
<i>Introduction</i> .....	<b>3</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>3</b>
<b>1. La protéolyse : une voie d'ubiquitinylation pour deux compartiments indépendants</b> .....	<b>4</b>
1.1. De l'ubiquitinylation au compartiment protéasique du protéasome : description générale. ....	4
1.2. Acteurs de l'ubiquitinylation. ....	5
1.2.1. Les éléments CIS de la dégradation.....	5
1.2.2. Les facteurs TRANS de la dégradation. ....	6
<b>2. La protéolyse fait tourner l'horloge cellulaire</b> .....	<b>7</b>
2.1. Description sommaire du cycle cellulaire. ....	7
2.1.1. Quatre étapes rythment l'horloge cellulaire. ....	7
2.1.2. Différents événements activent les CDKs.....	7
2.2. Les acteurs du cycle cellulaire chez <i>S. pombe</i> .....	8
2.2.1. <i>S. pombe</i> un prototype d'étude pour le cycle. ....	8
2.2.2. Le couple CDK-cycline central du cycle cellulaire. ....	9
2.3. Rum1 cible de protéolyse par le SCF <sup>Pop1</sup> . ....	10
<b>Objectifs du travail</b> .....	<b>12</b>
<b>Résultats</b> .....	<b>13</b>
<b>Données préliminaires à notre travail</b> .....	<b>13</b>
<b>1. Constructions d'outils</b> .....	<b>13</b>
1.1. Obtention de souches ayant intégré le « tag » en C-terminal du gène <i>Mcs6</i> . ....	13
1.1.1. Transformation intégrative de la cassette TAP-KAN MX6 dans les différentes souches.....	14
1.1.2. Caractérisation phénotypique et génotypique des candidats transformants.....	15
1.2. Construction de la souche <i>mcs6-TAP</i> dans un « background » <i>shp1-3</i> .....	16
<b>2. Stabilité de la CAK dans divers mutants des systèmes de protéolyse (<i>mts2-1</i>, <i>mts3-1</i> et <i>shp1-3</i>)</b> .....	<b>17</b>
2.1. Tableau récapitulatif des souches « protéolyse déficientes » exprimant les sous-unités de la CAK.	17
2.2. Effets sur la CAK des mutations dans les « pathways » ubiquitine - protéasome.....	18
2.2.1. Principe. ....	18
2.2.2. Suivi en Western-blot des composants de la CAK dans les souches « protéolyse déficientes ».....	18
2.2.3. Discussion des résultats.....	20
<b>Conclusions et perspectives</b> .....	<b>21</b>
<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>24</b>
<b>1. Techniques relatives à l'ADN</b> .....	<b>24</b>
1.1. La PCR ou « Polymerase Chain Reaction ».....	24
Principe. ....	24
Réalisation pratique.....	25
Cas particulier : PCR sur colonie chez <i>S. pombe</i> .....	25

1.2.	L'électrophorèse sur gel d'agarose.....	26
	But.....	26
	Principe et paramètres.....	26
	Réalisation pratique.....	27
1.3.	Récupération et purification des amplicons PCR.....	30
1.4.	Transformation de levure.....	31
	Principe.....	31
	Transformation.....	31
<b>2.</b>	<b>Techniques relatives aux protéines.....</b>	<b>33</b>
2.1.	Préparation d'extraits de protéines dénaturées.....	33
2.2.	Dosage des extraits protéiques par Bradford.....	34
2.3.	Electrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE).....	35
	Migration.....	37
2.4.	Transfert sur membrane de nitrocellulose (Western-blot).....	37
2.5.	Immunodétection.....	38
	Etape de « blocking ».....	39
	Mise en présence de l'anticorps primaire.....	39
	Mise en présence de l'anticorps secondaire.....	40
	Révélation.....	40
	Etape supplémentaire de « stripping ».....	41
<b>3.</b>	<b>Technique relative à la dissection de diploïdes <i>S. pombe</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>4.</b>	<b>Milieus de culture.....</b>	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>Souches et plasmides.....</b>	<b>44</b>
5.1.	Souches.....	44
5.2.	Plasmides.....	45
	<b><i>Bibliographie</i>.....</b>	<b>46</b>

## Listes des abréviations courantes<sup>(1)</sup>

A	:	Adénosine
aa	:	acide aminé
Amp	:	Ampicilline
ATP	:	Adénosine TriPhosphate
ADN	:	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	:	ADN complémentaire
ARN	:	Acide RiboNucléique
ARNm	:	ARN messenger
Da	:	Daltons
dNTP	:	désoxyriboNucléoside 5' TriPhosphate
D.O.	:	Densité Optique
kb	:	10 <sup>3</sup> bases
kd	:	10 <sup>3</sup> daltons
mM	:	milliMolaire
M	:	Molaire
pb	:	paire de bases
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
Rpm	:	Rotation par minute
µl	:	microlitre
µM	:	micromolaire

(1) Les abréviations et symboles des gènes, des protéines et des complexes utilisés sont expliqués dans le texte.

## Conventions génétiques

Notation du gène et de la protéine qu'il encode :

Les diverses conventions quant à la notation des gènes et des protéines sont reprises, au moyen d'exemple, dans le tableau ci-dessous.

Organisme	Gènes	Protéines
<i>S. pombe</i>	<i>skp1</i>	Skp1
<i>S. cerevisiae</i>	<i>LEU2</i>	Leu2
<i>E. coli</i>	<i>lac Z</i>	Lac Z
Mammifères	<i>Cdk2</i>	CDK2

Préfixes pour désigner l'appartenance spécifique d'un gène ou d'un produit d'un gène :

Sc : *Saccharomyces cerevisiae*  
Sp : *Schizosaccharomyces pombe*  
Ec : *Escherichia coli*

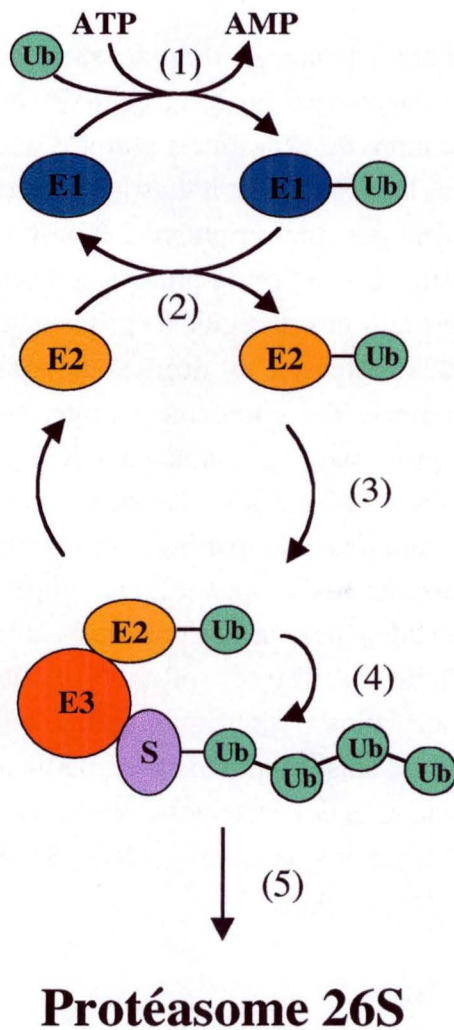
*Introduction*

## **Introduction**

### **Avant-propos**

Avec le séquençage de nombreux génomes, il est devenu évident à l'heure actuelle, que la complexité accrue du monde eucaryote par rapport à celui des procaryotes ne résulte pas d'un accroissement important du nombre de gènes mais plutôt d'une combinatoire d'interactions géniques. Celles-ci enrichissent les régulations à tous les niveaux, aussi bien transcriptionnel que traductionnel, mais également post-transcriptionnel et post-traductionnel.

Au titre de régulations post-traductionnelles, la protéolyse occupe une place prépondérante. D'un processus relativement primitif et peu régulé de grignotage des extrémités des protéines tel qu'on l'imaginait autrefois, la protéolyse est décrite aujourd'hui dans la littérature comme un mécanisme hautement complexe. Temporellement contrôlée et finement régulée, elle est impliquée dans de vastes processus tels que le cycle cellulaire, le métabolisme, ... (Hochstrasser, 1996a). Des études récentes sur les eucaryotes mettent en lumière des voies métaboliques complexes requérant deux compartiments protéolytiques : la vacuole-lysosome et le protéasome 26S. Quant aux signaux désignant les protéines à la dégradation, on distingue ceux que l'on peut qualifier d'endogènes car ils concernent la séquence protéique elle-même qui signale la protéine comme substrat de protéolyse, de ceux, exogènes, conférés secondairement via la phosphorylation, l'ajout d'ubiquitine ou d'autres modifications post-traductionnelles. La classification, ainsi proposée est en partie arbitraire puisque des signaux primaires de séquences (éléments CIS des protéines cibles) peuvent assurer le recrutement des appareils assurant les modifications (facteurs TRANS) desquels dépendra, *in fine*, l'inactivation et la destruction des protéines.



**Figure 1:**

Schéma représentant la cascade d'ubiquitylation d'une protéine cible menant à sa dégradation par le protéasome 26S.

- (1): Activation de l'ubiquitine par l'enzyme E1,
  - (2): Transfert de l'ubiquitine de E1 à E2,
  - (3): Recrutement du substrat par l'enzyme E3,
  - (4): Transfert de l'ubiquitine de E2 au substrat via l'enzyme E3,
  - (5): Ciblage du substrat polyubiquitylé vers le protéasome 26S.
- (Figure adaptée de Ciechanover and Schwartz, 1998).

## **1. La protéolyse : une voie d'ubiquitinylation pour deux compartiments indépendants.**

La protéolyse de régulateurs tels que les cyclines, les régulateurs transcriptionnels, les récepteurs membranaires... joue un rôle fondamental dans de nombreux processus cellulaires incluant le contrôle métabolique, la progression du cycle cellulaire, la transduction du signal...

Chez tous les eucaryotes, l'ubiquitine (protéine de 76 acides aminés) est l'étiquette désignant aux complexes protéasiques les cibles de la protéolyse (Johnson *et al.*, 1992). La cellule eucaryote possède deux compartiments de dégradation : d'une part, la vacuole-lysosome responsable principalement de la dégradation de récepteurs et transporteurs membranaires (Hicke, 1997) et, d'autre part, le protéasome 26S hydrolysant essentiellement les protéines cytosoliques, nucléaires ainsi que les protéines associées au réticulum endoplasmique (Sommer and Wolf, 1997).

Quelle que soit la machinerie de dégradation utilisée (organelle ou protéasome), le système de protéolyse dépendant de l'ubiquitine requiert des éléments CIS, signaux de l'ubiquitinylation inscrits dans la séquence primaire des protéines et des facteurs TRANS, cascades de réactions enzymatiques conduisant à l'ajout de chaînes polyubiquitinylées sur la cible.

### **1.1. De l'ubiquitinylation au compartiment protéasique du protéasome : description générale.**

L'organite responsable de la protéolyse est, pour les cellules animales, le lysosome et, pour les levures et les plantes, la vacuole. Toutes les cellules eucaryotes sont capables d'internaliser les composants extracellulaires ainsi que les constituants de leur membrane plasmique. Ces substances internalisées sont ensuite délivrées à la vacuole-lysosome après leur transit dans deux compartiments nommés endosomes précoces et tardifs (Geli and Riezman, 1998). Notre intérêt dans les paragraphes suivants se portera principalement sur le système de protéolyse qui est le protéasome.

La figure 1 schématise la cascade enzymatique conduisant à l'ubiquitinylation d'un substrat cible, c'est-à-dire à la liaison covalente de chaîne de polyubiquitines. Cette liaison covalente implique un transfert séquentiel d'ubiquitine aux résidus lysines spécifiques des protéines substrats via l'action de différentes enzymes notées E1, E2 et dans certains cas E3 (pour une revue voir : Ciechanover and Schwartz, 1998).

L'ubiquitine est d'abord activée par l'enzyme E1 (Ubiquitin-Activating enzyme) qui couple l'hydrolyse d'un ATP à la formation d'un lien thioester entre la glycine 76 de l'ubiquitine et le résidu cystéine conservé de E1. Par réaction de transestérification, l'ubiquitine est

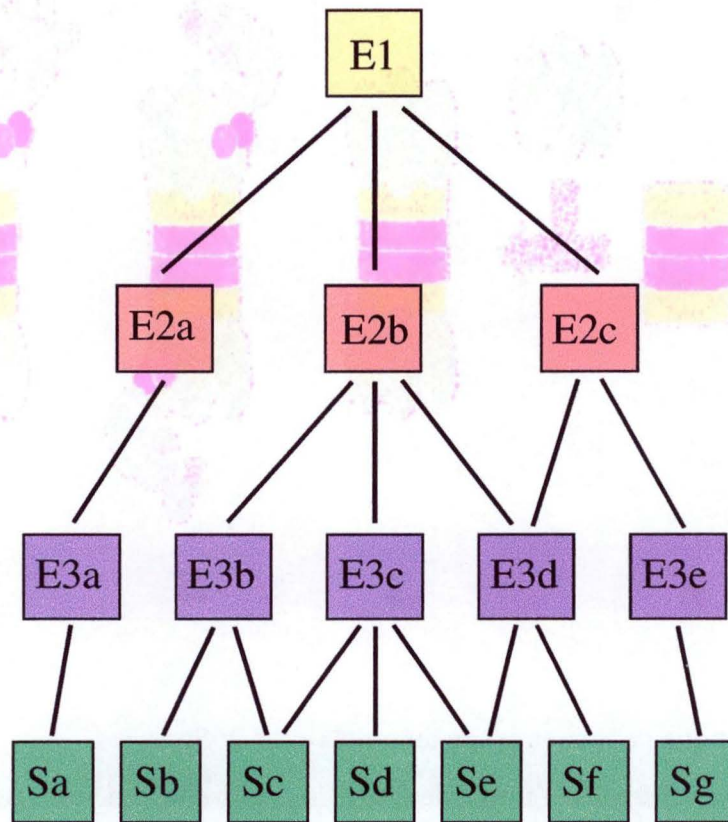
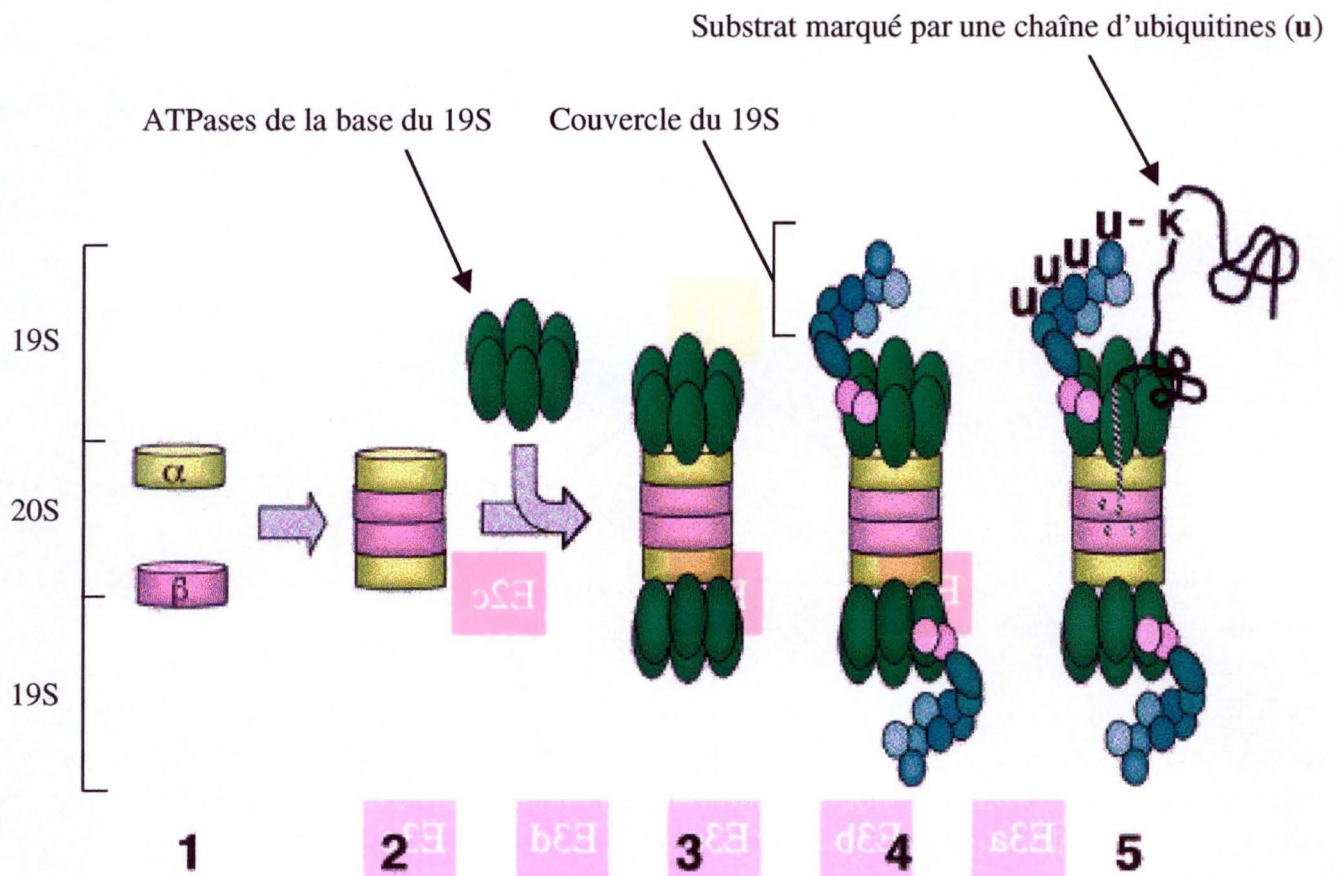


Figure 2:

Représentation schématique illustrant la diversité et la redondance des différentes familles d'enzymes E1-E2-E3.

La lettre S symbolise le substrat.

(Figure adaptée de Ciechanover and Schwartz, 1998).



**Figure 3:**

Représentation schématique de l'assemblage du protéasome 26S.

1° Le « core » 20S du protéasome est formé de quatre anneaux constitués chacun de 7 sous-unités de deux natures différentes: les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ .

2° Les deux anneaux internes sont constitués des sous-unités  $\beta$  et les deux anneaux externes sont constitués des sous-unités  $\alpha$ , lesquels s'autoassemblent de part et d'autre des deux anneaux  $\beta$ .

3° Une fois le « core » formé, il recrute la base (ATPases) du complexe 19S, lequel se fixe à ses deux extrémités.

4° Le couvercle s'ajoute à la base du complexe 19S terminant ainsi la formation du protéasome 26S.

5° Le couvercle du complexe 19S reconnaît la protéine à dégrader grâce à une interaction avec la chaîne de polyubiquitines. La base du complexe 19S est impliquée dans la dénaturation et dans le transport de la protéine jusque dans le core 20S. Ces deux réactions sont dépendantes de l'hydrolyse de l'ATP.

U: représente un module d'ubiquitine (peptide de 76 a.a.).

K: est une lysine du substrat sur laquelle est liée la chaîne de polyubiquitines de manière covalente.

(Figure issue de Verna and Deshaies, 2000).

transférée sur une cystéine de E2 (Ubiquitin-Conjugating enzyme) qui conjuguera, soit directement soit par le biais d'un adaptateur E3 (ubiquitine ligase), l'ubiquitine aux substrats cibles. L'enzyme E3 se lie au substrat à dégrader, soit directement par des motifs d'interaction protéine-protéine, soit via une protéine chaperone. E3 est en fait un adaptateur permettant le rapprochement entre l'ubiquitine liée à E2 et la protéine à dégrader (Hochstrasser, 1996b).

Cette cascade d'activation est hiérarchisée comme schématisé à la figure 2. Dans le génome de *S. pombe*, trois E1 responsables de l'activation de l'ubiquitine sont prédites. Chaque E1 peut transférer l'ubiquitine à plusieurs enzymes E2 (14 prédites chez *S. pombe* - Sanger Center : <http://www.sanger.ac.uk>). Chaque E2 peut à son tour contacter une ou plusieurs E3, lesquelles sélectionnent le substrat à ubiquitinyler. Chaque E3 peut quant à elle reconnaître spécifiquement un ou plusieurs substrats (Ciechanover and Schwartz, 1998). Le substrat ubiquitinylé va ensuite être dégradé par le protéasome 26S. Dans ce dernier cas, le signal minimum nécessaire pour la reconnaissance de la protéine cible est la présence d'une chaîne de quatre ubiquitines liées de manière covalente (Thrower *et al.*, 2000).

Le protéasome 26S (figure 3) est un complexe multimérique de 2 Md composé d'un corps catalytique 20S cylindrique flanqué à ses deux extrémités d'un complexe régulateur 19S. Cette protéase reconnaît généralement des protéines polyubiquitinylées, mais peut aussi dégrader certaines protéines non-ubiquitinylées comme, par exemple, l'ornithine décarboxylase (Murakami *et al.*, 1992).

Le complexe 19S est constitué de deux « sous-complexes » : le « couvercle » et la « base » composée notamment de 6 ATPases. Ce sont les complexes 19S qui reconnaissent le substrat à dégrader via une interaction avec la chaîne polyubiquitine, le dénaturent et le transportent jusque dans la cavité protéolytique du cylindre (Peters, 1994). Lorsque la protéine ubiquitinylée pénètre dans la structure catalytique du protéasome, l'ubiquitine est clivée du substrat par des ubiquitine-hydrolases et est ensuite recyclée.

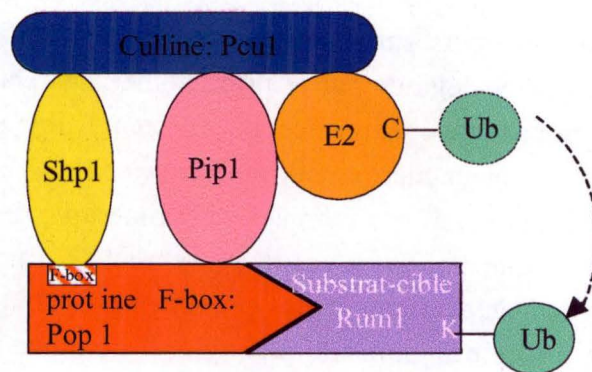
Les structures du protéasome sont très conservées à travers les eucaryotes. Par exemple, chez *S. pombe*, la sous-unité du complexe 19S encodée par le gène *mts2+* possède 75 % d'identité avec la sous-unité S4 du complexe 19S chez l'homme et est fonctionnellement interchangeable avec celle-ci (Gordon *et al.*, 1993).

## **1.2. Acteurs de l'ubiquitinylation.**

### **1.2.1. Les éléments CIS de la dégradation.**

Plusieurs éléments CIS dirigent une protéine vers les systèmes de dégradation dépendant de l'ubiquitine.

Le plus ancien connu est le signal de la « N-end rule ». Ce signal est constitué par les acides aminés de l'extrémité N-terminale de la protéine. Selon la nature des acides aminés présents,



**Figure 4:**

Schéma représentant les composants du complexe ubiquitine ligase SCF<sup>Pop1</sup> responsable de la protéolyse par la voie ubiquitine-protéasome de Rum1 (par exemple) chez *S. pombe*, ainsi que l'enzyme E2 portant l'ubiquitine. Le SCF permet de rapprocher l'ubiquitine couplée à l'enzyme E2 du substrat spécifiquement recruté par la protéine à F-box.

C: Cystéine.

K: Lysine.

on observe des stabilités parfois très différentes (Varshavsky, 1992). Ce signal de dégradation ne semble pas être impliqué dans des « pathways » essentiels de la cellule puisque des levures mutantes pour ce « pathway » de signalisation ne présentent pas de phénotype apparent.

Parmi les autres motifs affectant la stabilité des protéines, citons les motifs PEST (riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T)) et les motifs « destruction box ». La séquence consensus R-ALGDIGN de ces derniers a été observée principalement à l'extrémité N-terminale des cyclines (Glotzer *et al.*, 1991). Bien que constitutifs, puisque inscrits dans la protéine, ces signaux ne sont effectifs qu'à des moments déterminés de la vie cellulaire, conditionnés soit par une phosphorylation préalable du substrat cible, soit par une modification de la machinerie d'ubiquitylation elle-même.

### 1.2.2. Les facteurs TRANS de la dégradation.

Les facteurs TRANS sont les enzymes E3 ou complexes enzymatiques E2-E3 qui interagissent avec les substrats afin de les modifier. Les enzymes E3 du « pathway » d'ubiquitylation interviennent donc dans la reconnaissance de la cible et sont divisées en familles en fonction de leur séquence mais également de leur mécanisme d'action (Ciechanover, 1994).

Une première famille d'E3 comprend les enzymes capables de reconnaître le signal «N-end rule» ou de reconnaître certaines petites protéines à extrémité N-terminale non chargée. Une deuxième famille représente les E3 qui reconnaissent le motif « HECT » (pour Homologous to E6-AP C-Terminus). Cette famille lie l'ubiquitine avant de la transférer sur le substrat, notamment lorsque ces substrats sont des protéines de la membrane plasmique et des transporteurs métaboliques (Huibregtse *et al.*, 1995).

L'APC/C (pour Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) constitue une troisième famille d'E3. Ce complexe participe à la dégradation des protéines ayant un domaine « destruction box » (Peters, 1999). Des études menées chez *S. cerevisiae* et *Xenopus laevis* montrent que l'activité de l'APC/C varie au cours du cycle cellulaire ; il est spécifiquement activé en anaphase et désactivé en phase G1 (revue de Wolf and Jackson, 1998).

Un quatrième groupe est constitué d'un complexe de quatre protéines et est appelé SCF (Bai *et al.*, 1996 ; Krek, 1998; Skowyra *et al.*, 1997). La figure 4 présente les différents partenaires typiques de ce complexe chez *S. pombe*. Shp1 (pour Skp1 homologue pombe (Bamps, 1998; Hermand *et al.*, 1998a)) est la protéine pont entre une protéine de la famille des Cullines (par exemple, Pcu1) et une protéine à motif F-box (par exemple, Pop1) (Kominami *et al.*, 1998; Kominami and Toda, 1997; Wolf *et al.*, 1999). Le motif F-box correspond à une séquence d'une cinquantaine d'acides aminés qui est nécessaire à l'interaction avec Shp1. C'est la protéine à F-box qui, par ailleurs spécifie le substrat à dégrader. Enfin, une protéine à motif Ring Finger nommée Pip1 catalyse la réaction de transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E2 au substrat (Lyapina *et al.*, 2001).

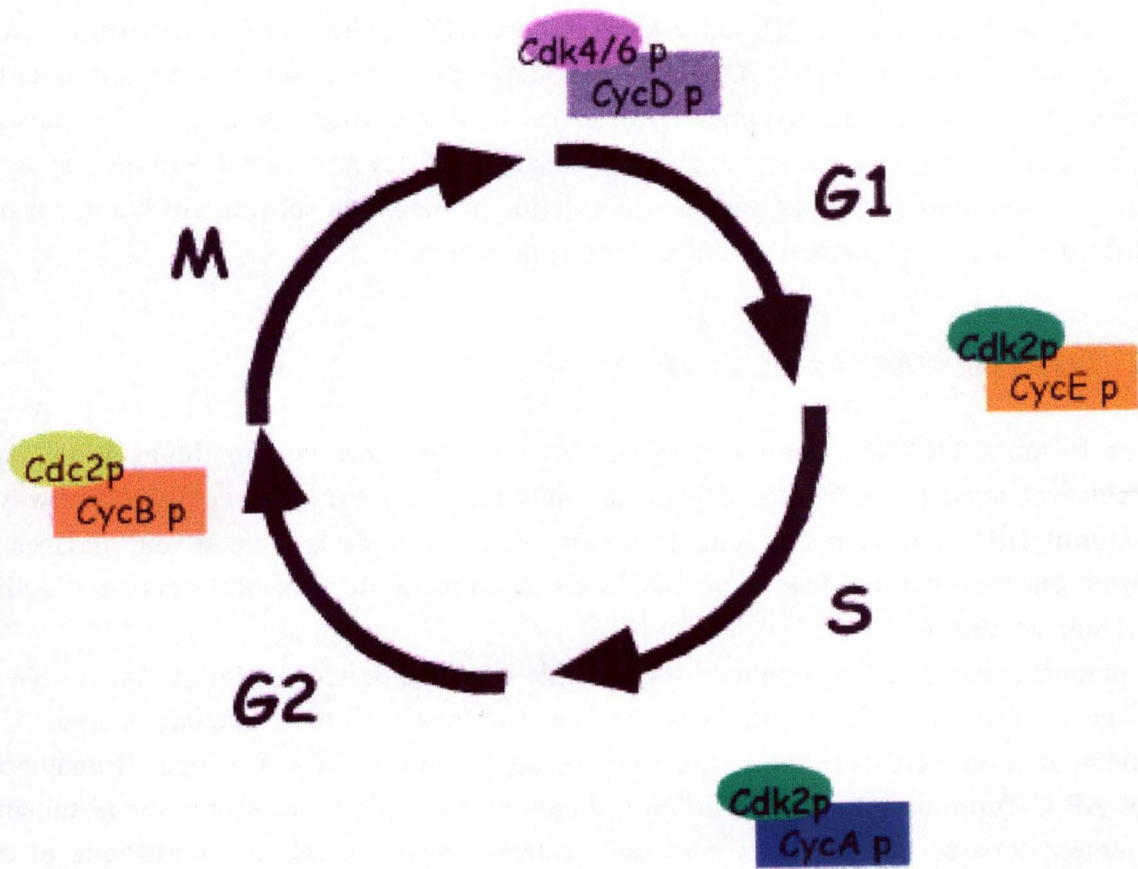


Figure 5:

Schéma du cycle cellulaire et des complexes CDK/cycline chez les mammifères.

## **2. La protéolyse fait tourner l'horloge cellulaire.**

### **2.1. Description sommaire du cycle cellulaire.**

#### *2.1.1. Quatre étapes rythment l'horloge cellulaire.*

Une cellule eucaryote se divise par mitose pour générer deux cellules filles. On distingue dans le cycle cellulaire (figure 5) 4 étapes principales définies en fonction de l'état du matériel génétique nucléaire (Hutchison and Glover, 1995).

Les étapes principales sont :

- la phase S (pour synthèse d'ADN) durant laquelle les chromosomes sont dupliqués,
- la phase M (pour mitose) durant laquelle on distingue la caryocinèse (séparation des noyaux) suivie de la cytokinèse (séparation des cytoplasmes),
- la phase G1 (pour Gap1) pendant laquelle la cellule synthétise tous les composants nécessaires à sa croissance cellulaire (organites, matériaux, ...),
- la phase G2 (pour Gap2) au cours de laquelle la cellule exprime les protéines créant un environnement adéquat pour le bon déroulement de la mitose.

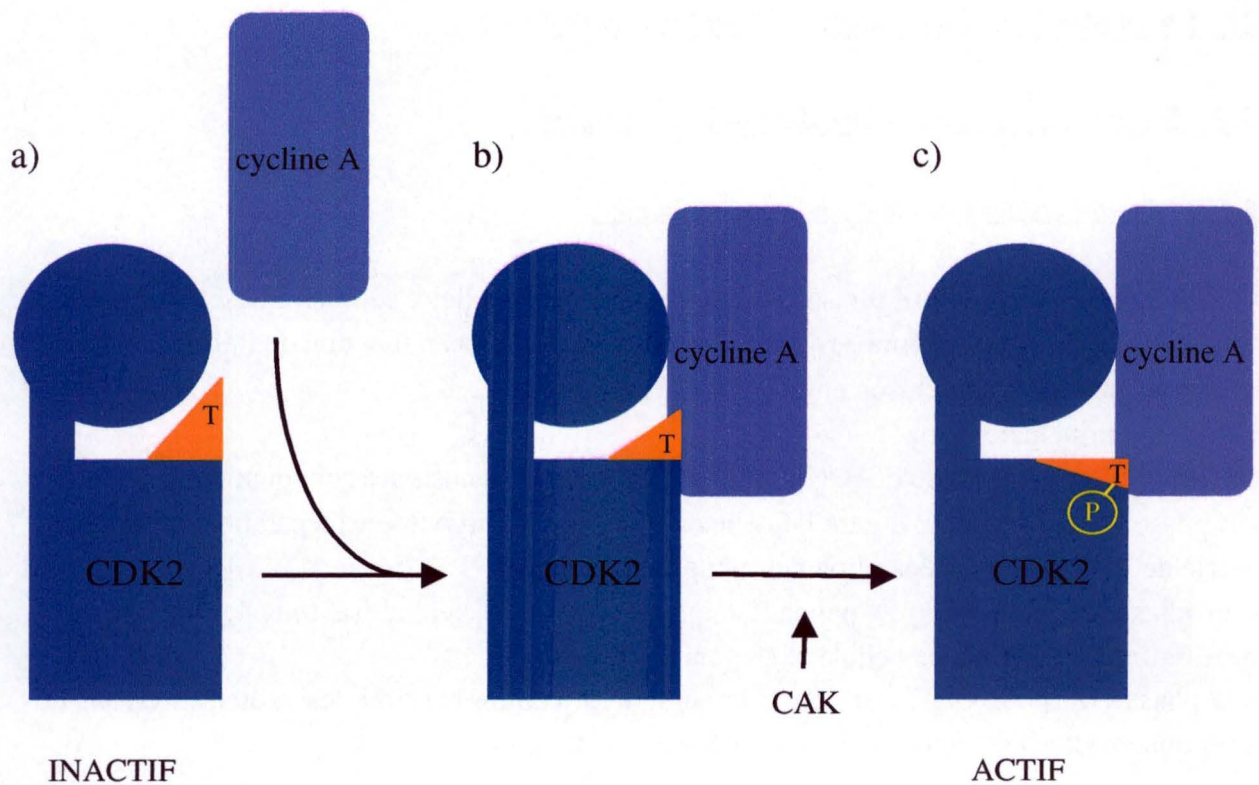
Le cycle cellulaire constitue un mécanisme complexe car il nécessite la coordination d'un grand nombre de gènes afin d'aboutir à deux cellules filles viables. Les niveaux de régulation sont donc nombreux et leurs effets s'additionnent pour aboutir à une régulation globale du cycle. Un des niveaux de régulation essentiel passe par l'activation successive et spécifique des complexes CDK-cycline nécessaires à la progression du cycle (Norbury and Nurse, 1992). A titre d'exemple, la figure 5 rappelle les facteurs de régulation bien connus intervenant dans le cycle d'une cellule mammalienne.

#### *2.1.2. Différents événements activent les CDKs.*

Les CDKs (Cyclin Dependant Kinase) sont des protéines qui sont les clefs activatrices du cycle cellulaire. Elles phosphorylent des substrats qui agissent soit directement à une étape du cycle soit indirectement en enclenchant une suite d'événements aboutissant à l'activation de facteurs de transcription ciblant les gènes requis pour cette étape (Norbury and Nurse, 1992).

En bref, la CDK a une organisation bipartite : le domaine amino-terminal est constitué de feuilletts  $\beta$  et le domaine carboxy-terminal est formé d'hélices  $\alpha$ . Ces deux domaines délimitent en leur interface le site catalytique de la kinase (De Bondt *et al.*, 1993).

Comme leur nom l'indique, les CDKs isolées ne présentent aucune activité catalytique et ce en raison de leur conformation. Deux étapes sont dès lors nécessaires pour assurer l'activation de la kinase : la liaison de la cycline (Hunt, 1989) et la phosphorylation d'un résidu thréonine



**Figure 6:**

Représentation schématique et modèle d'activation d'une CDK: l'exemple de CDK2 chez les mammifères.

(a): Structure inactive de CDK2 dans laquelle l'ATP est mal orienté et le site catalytique est obstrué par le « T-loop ».

(b): Fixation de la cycline A à CDK2. Cette fixation permet une réorganisation des acides aminés et un bon positionnement de l'ATP afin de permettre le transfert du phosphate  $\gamma$  au substrat de la CDK (non-représenté) et déplace légèrement le « T-loop » offrant la possibilité d'une activité catalytique faible.

(c): Phosphorylation du résidu thréonine du « loop ». Cette phosphorylation accroît l'activité catalytique d'un facteur 80 à 300 fois en libérant le site catalytique de la CDK.

(Figure issue de Morgan, 1996).

Tous les composants qui contrôlent l'initiation mitotique c-à-d : Cdc2, Cdc13, Cdc25 et Wee1 sont structurellement et fonctionnellement similaires chez tous les eucaryotes indiquant que ce mécanisme de contrôle est conservé dans l'évolution.

La deuxième CDK, activatrice de la première, est Mcs6. Elle requiert pour son activation la liaison à la cycline C nommée Mcs2 (Damagnez *et al.*, 1995). En outre, elle-même est activée par une phosphorylation du résidu Thréonine 165 par la kinase Csk1 (Hermand *et al.*, 1998b; Lee *et al.*, 1999). Cette dernière est donc nommée CAKAK pour « **CAK** **A**ctivating **K**inase ». La mutagenèse dirigée du site de phosphorylation de Mcs6 ou la délétion de Csk1 ne semble pas affecter la fonction CAK de Mcs6 (Hermand *et al.*, 2001). Ceci tend à suggérer une deuxième voie d'activation de la CAK différente des simples CDKs mais semblable à celle du complexe homologue (CDK7-cycline H) chez les mammifères. Cette activation passerait par la liaison de Mcs6-Mcs2 à un troisième partenaire Pmh1, l'homologue de Mat1 pour les eucaryotes supérieurs (Hermand *et al.*, 2001).

Pour ce qui concerne la sortie de mitose, celle-ci n'aura lieu que lorsque la CDK principale Cdc2 sera inactivée par dégradation de la cycline Cdc13 (Yamano *et al.*, 1996). Comme l'indique leur nom, les cyclines sont majoritairement des protéines dont la concentration varie de manière cyclique au travers du cycle cellulaire : elles sont dégradées à un moment donné de ce cycle pour permettre d'inactiver le complexe CDK/cycline et assurer la rotation de l'horloge cellulaire. Aussi importante que soit la disparition rapide des cyclines dans le cycle, d'autres facteurs intervenant notamment dans la dégradation de ces cyclines affectent les transitions observées.

### **2.3. Rum1 cible de protéolyse par le SCF<sup>Pop1</sup>.**

Un exemple type de régulation en relation avec le cycle cellulaire est celle de la protéine Rum1.

Rum1 est un inhibiteur de complexes CDK/cycline agissant notamment sur le complexe Cdc2/Cdc13 (initiateur de la phase M) chez la levure de fission. La concentration de Rum1 varie au cours du cycle cellulaire ; elle est élevée de l'anaphase à la fin de la phase G1 tant que la taille cellulaire critique n'est pas atteinte. Rum1 inhibe ainsi, par la liaison au couple CDK/cycline, l'initiation de la réplication (via son action sur le complexe Cdc2/cig2), le START et la mitose (via son action sur Cdc2/Cdc13). Par conséquent, si *rum1+* est délété, les cellules arrêtées en G1 subissent une entrée prématurée en mitose (Moreno and Nurse, 1994).

L'effet de Rum1 sur le complexe Cdc2/Cdc13 est double : d'une part, il se lie au complexe Cdc2/Cdc13 et l'inhibe ; d'autre part, sa présence est nécessaire à la dégradation de Cdc13. Cependant, il est à noter que le taux de protéolyse de Cdc13 est suffisant pour provoquer la sortie de la mitose mais il est insuffisant pour réduire l'activation du couple Cdc2/Cdc13 et donc pour éviter une entrée prématurée en mitose (Correa-Bordes and Nurse, 1995).

Lorsque la taille cellulaire est atteinte, l'action inhibitrice de Rum1 sur les complexes CDK/cycline est levée grâce à sa dégradation et la cellule entre en phase S. Cette phase sera suivie des étapes de transitions G2-M et entrée en mitose par la cascade d'activation du complexe Cdc2/Cdc13 (cfr point 2.2.2.).

La disparition de Rum1 en fin de G1 est médiée par une phosphorylation préalable partiellement dépendante d'un couple CDK/cycline : Cdc2/Cig1. En effet, dans une souche  $\Delta cig1$ , Rum1 présente une stabilité prolongée en fin de phase G1 mais est encore ciblée vers la voie de dégradation (Benito *et al.*, 1998; Correa-Bordes *et al.*, 1997). De plus, la protéine Rum1 s'accumule dans les souches mutées pour le protéasome 26S : *mts2-1* et *mts3-1* (Gordon *et al.*, 1996; Kominami and Toda, 1997) et dans une souche  $\Delta pop1$  (Kominami and Toda, 1997; Wolf *et al.*, 1999). Pop1 est une protéine à F-box capable d'interagir avec Shp1 et Pcu1 pour former un complexe SCF<sup>Pop1</sup> (Kominami *et al.*, 1998). Ces données suggèrent que Rum1 est régulée via le « pathway » ubiquitine-protéasome.

Nous pouvons donc conclure qu'en fin de G1, Rum1 est probablement phosphorylée par Cdc2/Cig1. Cette phosphorylation est le signal de déclenchement de la cascade d'ubiquitinylation par le SCF<sup>Pop1</sup>. Rum1 est alors polyubiquitinylée et ciblée vers le protéasome 26S pour sa dégradation. La disparition de Rum1 lève les inhibitions sur les couples CDK/cycline et permet au cycle cellulaire de tourner.

Objectifs du  
travail

## Objectifs du travail

Au laboratoire, dans le cadre de la recherche de partenaires physiques de la CAK, nous avons mis en évidence une interaction double-hybride entre Mcs2-Shp1 (Hermand *et al.*, 1998a) et Pmh1-Shp1 (Bamps *et al.*, 2002).

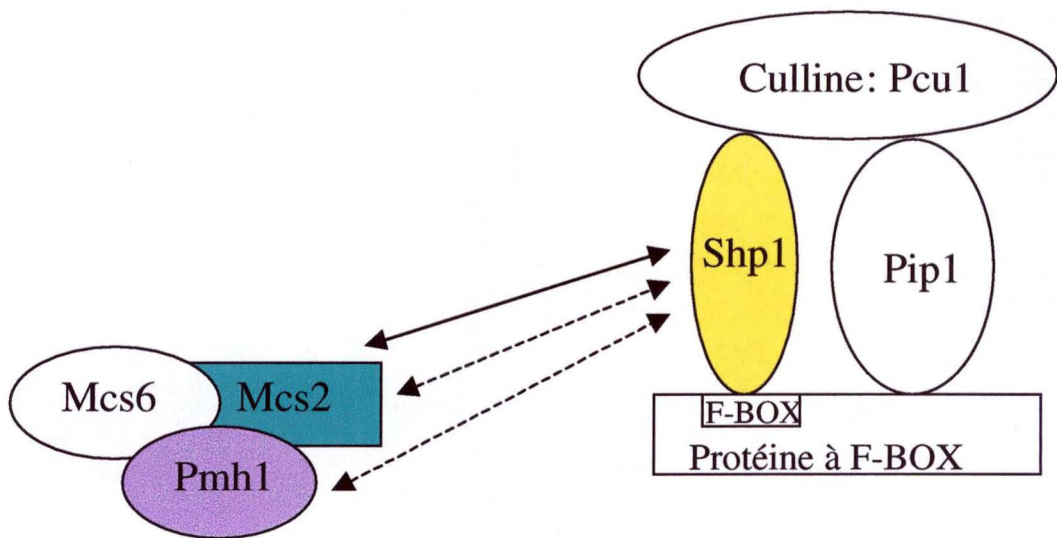
Pour rappel, Shp1 fait le pont entre les protéines à F-box et la culline dans le complexe ubiquitine ligase SCF, lequel cible les protéines ubiquitinylées pour leur dégradation par le protéasome (Bai *et al.*, 1996). Les données double-hybride suggèrent que Mcs2 et Pmh1, respectivement la cycline et la protéine à Ring Finger constituant la CAK, pourraient être régulées via le « pathway » ubiquitine-protéasome.

Pour éprouver cette hypothèse, nous allons suivre l'évolution de la concentration de ces protéines dans une souche mutée dans la voie de l'ubiquitinylation : *shp1-3* et dans deux souches mutées dans les sous-unités régulatrices du protéasome 26S : *mts2-1* et *mts3-1* (Gordon *et al.*, 1993; Gordon *et al.*, 1996).

La protéine Mts2 est l'homologue chez *S. pombe* de la sous-unité 4 du protéasome 26S humain tandis que Mts3 est l'homologue de la sous-unité 14.

Les deux mutants *mts* ont été isolés précédemment lors d'un crible réalisé pour isoler des mutants résistants au MBC (=méthylbenzylcarbamate qui déstabilise les microtubules) et sensibles à la température. Dans ces deux mutants, les protéines conjuguées à l'ubiquitine s'accumulent à température restrictive. La seule différence entre ces deux souches est une accumulation plus drastique chez le mutant *mts3-1*, lequel a d'ailleurs été utilisé pour mettre en évidence la dégradation protéolytique de Rum1.

Résultats



↔ = interaction double hybride

↔ = coimmunoprécipitation

Figure 1:

Représentation schématique des interactions entre le complexe CAK et le complexe SCF, établies préalablement au mémoire (Hermand *et al.*, 1998a and Bamps *et al.*, 2002).

## **Résultats**

### **Données préliminaires à notre travail.**

Au laboratoire, deux cribles double-hybride indépendants ont mis en évidence des interactions physiques, d'une part entre Mcs2 et Shp1 et, d'autre part, entre Pmh1 et Shp1.

Le premier crible (« Brent trap system » (Estojak *et al.*, 1995)) recherchait les partenaires physiques du couple Mcs6-Mcs2. Parmi cinq candidats isolés, un partenaire potentiel présentait une forte homologie avec le gène *SKP1* de *S. cerevisiae*. Shp1 (pour *Skp1* homologue pombe) interagit spécifiquement avec Mcs2 seul mais également avec Mcs2 complexé à Mcs6 (Hermand *et al.*, 1998b). Cette donnée double-hybride a été confirmée par un test de coimmunoprécipitation entre Shp1 et Mcs2. Rappelons que Shp1 a été identifié comme étant l'homologue de Skp1, composant du complexe SCF reconnaissant les motifs à F-box des protéines recrutant les cibles à ubiquitinyler.

Le second crible (Fields and Song trap system (Fields and Song, 1989)) nous a permis d'isoler comme partenaire potentiel de la protéine appât Shp1, un ADNc encodant la protéine Pmh1 (Bamps *et al.*, 2002). Rappelons que Pmh1 est l'homologue de Mat1 (Hermand *et al.*, 2001) et à ce titre serait un facteur activateur du complexe CAK. L'ensemble de ces données est schématisé dans la figure 1.

Ces deux cribles double-hybride (confirmés par coimmunoprécipitation) ont révélé deux points d'ancrage (Mcs2 et Pmh1) entre le complexe CAK et le « pathway » d'ubiquitinylation via la protéine Shp1. Ceci suggère une régulation potentielle de l'activité de la CAK, et donc du cycle cellulaire, par la protéolyse dépendante de l'ubiquitine.

C'est cette hypothèse qui est à l'origine de notre travail.

### **1. Constructions d'outils.**

#### **1.1. Obtention de souches ayant intégré le « tag » en C-terminal du gène Mcs6.**

Dans l'hypothèse d'un rôle régulateur de la protéolyse, l'idée est de suivre les trois composants de la CAK (Mcs6, Mcs2 et Pmh1) dans plusieurs environnements : soit des souches déficientes pour le protéasome 26S (*mts2-1* et *mts3-1*), soit une souche déficiente pour le « pathway » de l'ubiquitinylation (*shp1-3*). Ne possédant pas d'anticorps dirigés contre les protéines de la CAK, nous avons décidé de les marquer par un épitope (HA ou TAP) contre lequel des anticorps commerciaux existent.

Figure 2a:

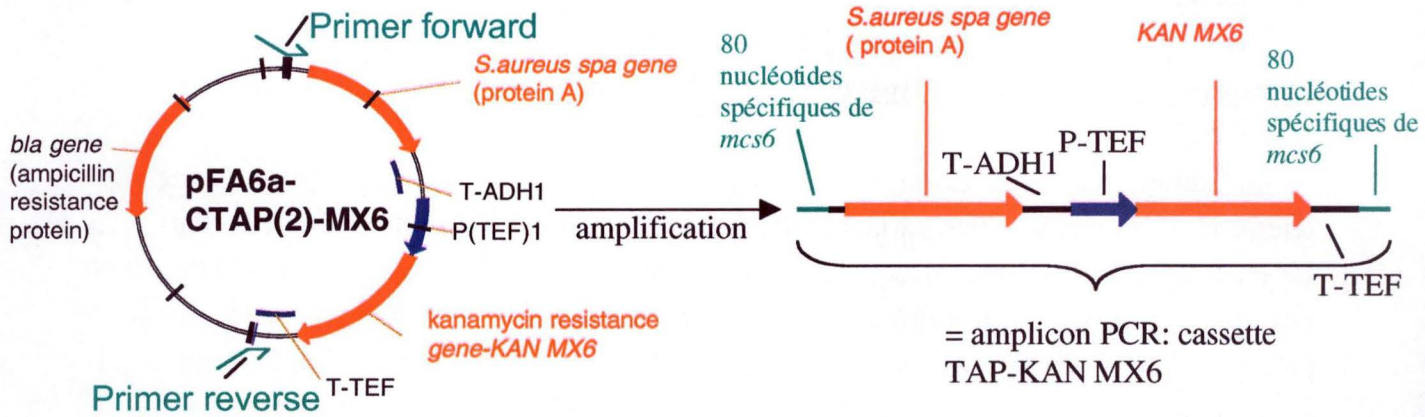


Figure 2b:

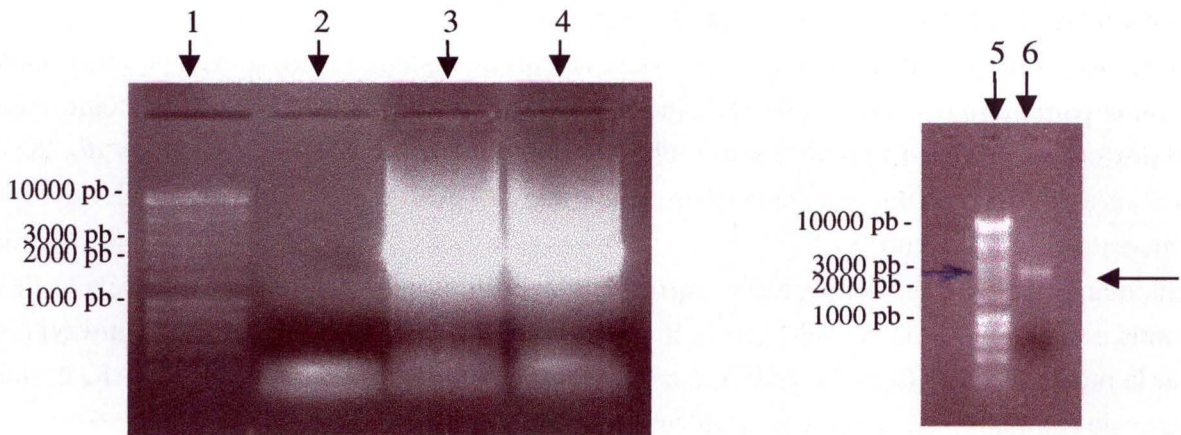


Figure 2:

Amplification de la cassette d'intégration TAP-KAN MX6 permettant la formation de la protéine de fusion Mcs6-TAP-KAN MX6.

La figure 2a schématise le plasmide contenant la cassette TAP-KAN MX6 ainsi que la position des « primers » utilisés pour l'amplification. La cassette est amplifiée par des « primers » de 100 nucléotides, dont 20 nucléotides du côté 3' s'hybrident et dont les 80 autres sont flottants. Le « primer » 1 s'hybride en amont de la cassette et le « primer » 2 s'hybride en aval de cette même cassette. L' amplicon PCR est bordé des 80 nucléotides qui permettront l'intégration au locus *mcs6* grâce à une double recombinaison homologue.

La figure 2b représente les profils de migration des amplicons PCR sur gel agarose.

Pistes 1 et 5: Marqueur de taille (BIOLINE).

2: Contrôle négatif de PCR.

3 et 4: Contrôle positif (PCR sur plasmide). Comme attendu, on observe des amplicons à une taille approximative de 2500 pb.

6: Amplicon purifié.

L' amplicon migre à la taille attendue de 2579 pb et a une concentration estimée de 25 ng/μl.

étapes du mémoire consistent en l'obtention des souches dans lesquelles la CDK Mcs6 est « taggée ».

### 1.1.1. Transformation intégrative de la cassette TAP-KAN MX6 dans les différentes souches.

Afin d'intégrer le « tag » TAP en aval du gène *mcs6* et en fusion traductionnelle avec celui-ci, nous avons préalablement effectué une PCR amplificatrice de la cassette TAP-KAN MX6 présente dans le plasmide pFA6a-CTAP-MX6 (Tasto *et al.*, 2001).

Cette cassette comprend de 5' en 3' le domaine de liaison de la CBP (Calmodulin Binding Peptide), suivi de celui de la TEV (Tobacco Etch Virus) protéase, les deux domaines de liaison aux IgG (qui permettront la détection des protéines « taggées » TAP), un polyA et une cassette conférant la résistance à la généticine, analogue de la kanamycine utilisé chez la levure.

Cette cassette est amplifiée via des « primers » de 100 nucléotides. De ces 100, seulement 20 nucléotides, du côté 3' des « primers », s'hybrident aux 20 premiers et 20 derniers nucléotides de la cassette, les 80 autres nucléotides forment une extrémité flottante. La figure 2a schématise le plasmide possédant la cassette TAP-KAN MX6 ainsi que la disposition des « primers » permettant l'amplification de celle-ci. Cette figure reprend également les photos qui ont permis de vérifier la taille mais aussi de quantifier par gel agarose les amplicons.

L'intégration de la cassette TAP-KAN en C-terminal du gène *mcs6* résulte d'une double recombinaison homologue grâce aux 80 nucléotides flottants des « primers », lesquels bordent à présent les amplicons. Les 80 nucléotides, en 5' de la cassette, sont homologues aux 80 derniers du gène *mcs6*, à l'exclusion du codon STOP, et les 80 nucléotides en aval de la cassette sont homologues aux nucléotides directement adjacents à la fin du gène *mcs6*.

Le résultat de cette double recombinaison au locus, si elle a eu lieu en phase, est une fusion traductionnelle entre Mcs6 et les domaines de liaison aux IgG (soit le TAP), codant la protéine hybride de fusion Mcs6-TAP.

Les étapes ultérieures consistent en la transformation des souches de *S. pombe* par l'amplicon PCR et en la sélection des intégrants sur milieu supplémenté en généticine.

La cassette TAP-KAN MX6 est intégrée par transformation dans les deux souches mutées pour le protéasome : *mts2-1* et *mts3-1*. L'obtention des protéines Mcs6 « taggées » TAP dans la souche mutée pour la voie de l'ubiquitinylation : *shp1-3* se fera quant à elle par croisement (voir point : 1.2.).

Les produits de transformation sont étalés à 30°C sur milieu riche sans sélection (YES), afin de permettre l'expression du gène de résistance à la généticine. Une fois que les colonies apparaissent sur milieu YES, les boîtes sont répliquées sur milieu riche supplémenté en généticine où cette fois ne pousseront que les colonies ayant intégré le produit PCR.

Figure 3a:

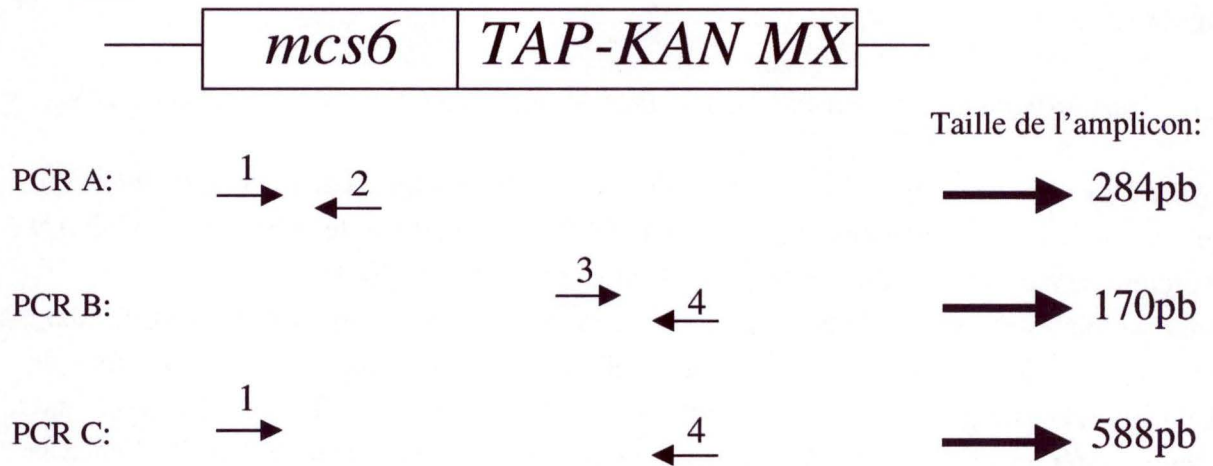


Figure 3b:

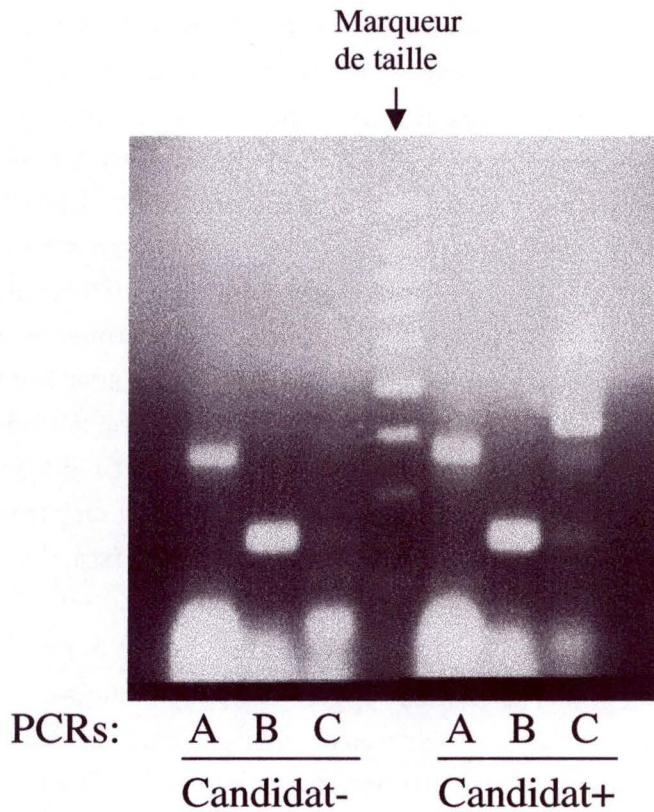


Figure 3:

La figure 3a présente schématiquement les trois amplifications (A-B-C) pour vérifier l'intégration de la cassette au locus.

La figure 3b représente le profil en gel agarose du résultat des amplifications (A-B-C) des PCRs sur colonie.

Le candidat négatif correspond à des produits d'amplification où l'intégration a eu lieu de manière ectopique.

Le candidat positif correspond à des produits d'amplification où l'intégration a eu lieu au locus authentique.

La piste centrale correspond au marqueur de taille.

### 1.1.2. Caractérisation phénotypique et génotypique des candidats transformants.

Authentification génotypique des candidats :

L'étape suivante vise à discriminer les intégrants au locus authentique des intégrants ectopiques. L'idée explicitée à la figure 3 est d'utiliser une PCR diagnostique sur colonie avec trois combinaisons de « primers ».

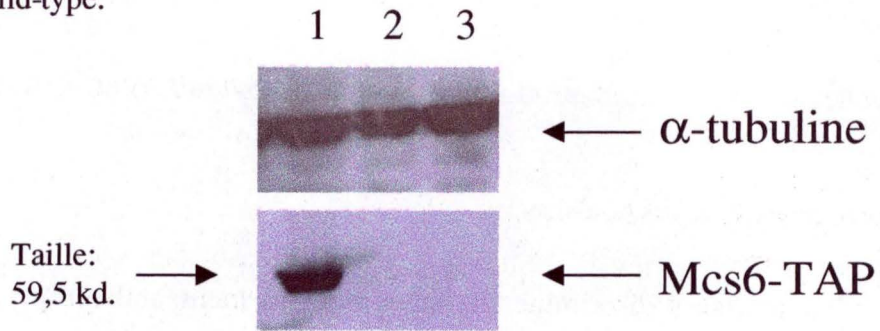
La figure 3a positionne les « primers » utilisés pour les différentes PCR.

Les PCR A (« primers » 1 et 2) et B (« primers » 3 et 4) sont effectuées afin de vérifier que les « primers » s'hybrident correctement sur l'ADN puisqu'ils donnent un amplicon de la taille attendue tandis que la PCR C (« primers » 1 et 4) quant à elle permet de spécifier que le « tag » TAP est présent directement en aval du gène et donc que l'intégration locus spécifique s'est produite. En effet, la PCR C amplifie un fragment chevauchant le locus *mcs6* et la cassette TAP. Cette PCR C sera positive uniquement si la cassette s'est intégrée au bon locus. La figure 3b présente le résultat d'une PCR sur colonie pour un candidat négatif et un candidat positif. On peut observer, comme attendu, des amplicons de taille identique pour les deux PCRs (PCR A et B) contrôles de chacun des candidats. La PCR C fournit un signal uniquement dans le cas du « candidat + » c-à-d qui a intégré la cassette au locus *mcs6*. Dans ce dernier cas, on observe bien une bande à la taille attendue de 588 pb mais également de faibles bandes parasites qui ont la même taille que les amplicons correspondant aux PCRs A et B, ce qui pourrait s'expliquer par une contamination des « primers ». De plus, on observe une deuxième bande à une taille de plus ou moins 300 pb. Deux hypothèses peuvent être émises : premièrement la température d'« annealing » choisie était trop basse, ce qui a entraîné une hybridation aspécifique des « primers ». Deuxièmement, la cassette est intégrée au locus mais en amont du C-terminal disruptant le locus *mcs6*.

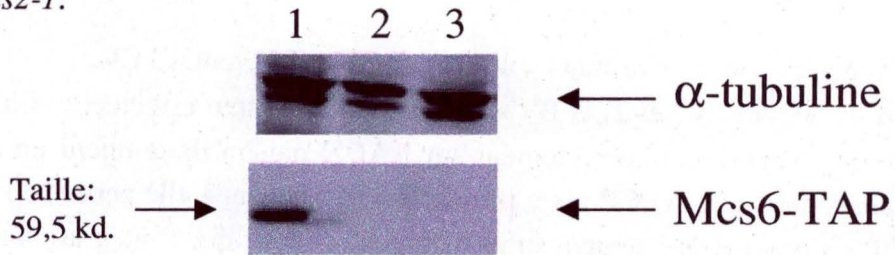
Après ce premier « screen » sur les intégrants, nous vérifions que l'intégration de la cassette respecte la phase du gène *mcs6*. Si la fusion est correcte, nous obtenons une protéine de fusion Mcs6-TAP, d'une taille estimée à 60 kdaltons (Mcs6 a une taille de 38,5 kd et le TAP a une taille de 21 kd), révélée par des anticorps anti-TAP en « Western-blot ». Au contraire, si la phase de Mcs6 n'est pas respectée, les anticorps anti-TAP ne révèlent aucune protéine.

Pour réaliser le « Western-blot », des extractions protéiques sont effectuées pour chacun des intégrants au locus. Les extraits sont séparés sur gel polyacrylamide 10%. Après transfert sur une membrane de nitrocellulose, nous immunodétections par un anticorps (soit un anticorps dirigé contre l'alpha-tubuline lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, soit l'anticorps PAP directement couplé à la peroxydase).

A) background wild-type:



B) background *mts2-1*:



C) background *mts3-1*:

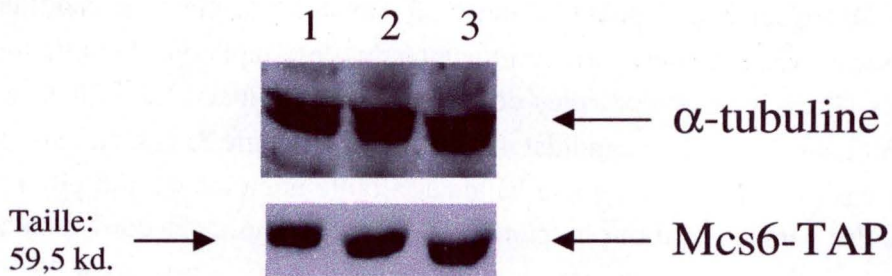


Figure 4:

Figure 4a:

Western-blot d'authentification des candidats intégants de Mcs6-TAP dans un background sauvage.

1: candidat positif.

2-3: candidats négatifs.

Figure 4b:

Western-blot d'authentification des candidats intégants de Mcs6-TAP dans un background *mts2-1*.

1: candidat positif.

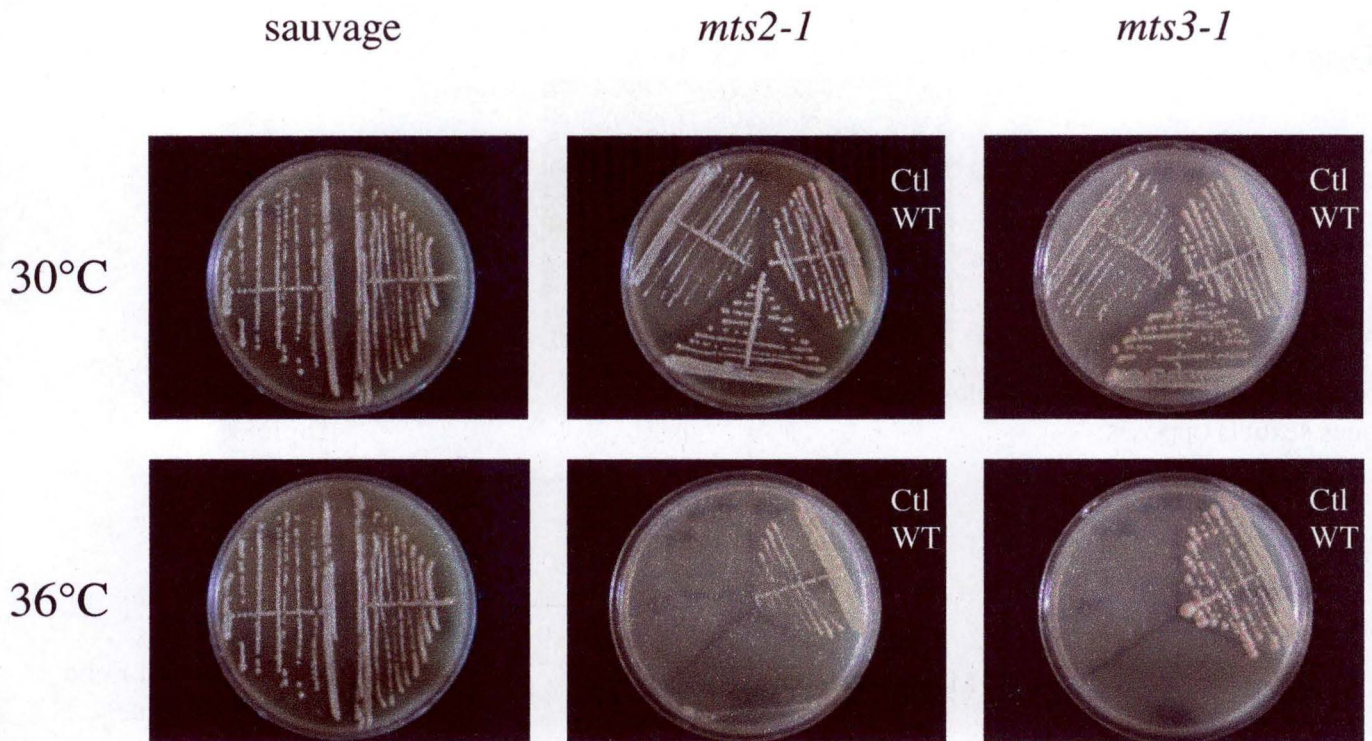
2-3: candidats négatifs.

Figure 4c:

Western-blot d'authentification des candidats intégants de Mcs6-TAP dans un background *mts3-1*.

3 candidats positifs.

La tubuline est utilisée comme contrôle de chargement. Elle est détectée sous forme d'un doublet étant donné l'existence de deux gènes codant pour l' $\alpha$ -tubuline. (Radcliffe *et al.*, 1998).



**Figure 5:**

Stries permettant de définir si l'intégration du tag TAP au locus *mcs6* modifie ou non le phénotype de naissance des différentes souches.

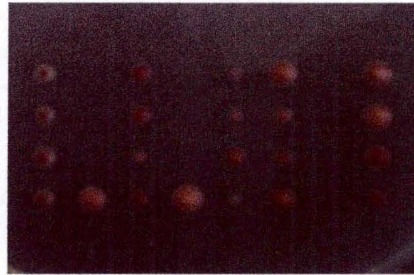
La souche sauvage pousse à 30 et 37°C, celle-ci est utilisée comme contrôle.

*mts2-1* et *mts3-1* sont des souches mutées dans une des sous-unités du protéasome. Ces souches étant thermosensibles, elles poussent à 30°C mais pas à 37°C.

Comme on peut le constater, l'intégration de la cassette TAP-KAN MX6 au locus *mcs6*, dans la souche sauvage et dans les deux souches mutées pour le protéasome, ne modifie pas le phénotype de sensibilité à la température.

Figure 6a:

Tétrades: 1 2 3 4 5 6 7

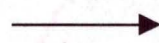
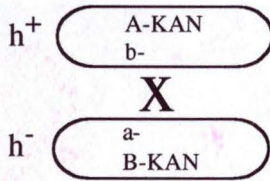


Spores:

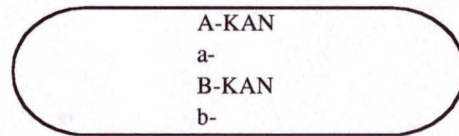
a  
b  
c  
d

Figure 6b:

Croisement de deux souches haploïdes de signes sexuels opposés:



Diploïde



Méiose et sporulation

Ségrégation sur milieu riche additionné de généticine:  
poussent/ ne poussent pas:

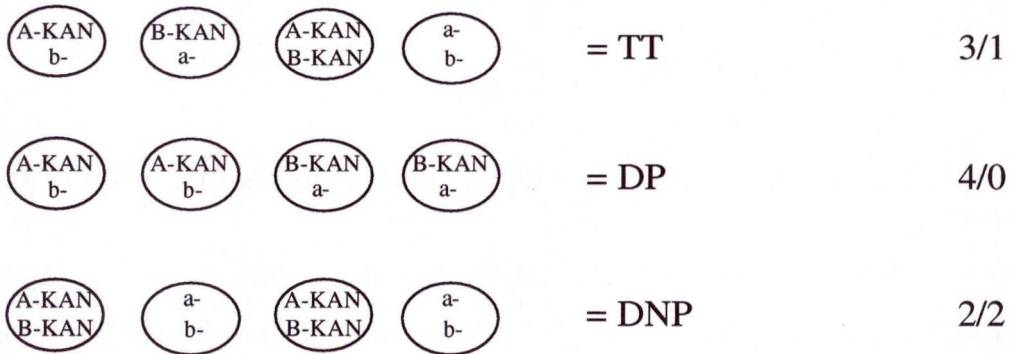


Figure 6:

La figure 6a montre une photo des résultats de dissection: les 4 spores (a-d) d'une tétrade (1-7) sont isolées en colonne. Les spores sont disséquées sur milieu riche. On observe 5 tétrades (1-3-5-6-7) pour lesquelles chaque spore a formé une colonie, comme attendu. Les deux autres tétrades n'ont formé qu'une colonie, ce qui peut être expliqué par le fait que les quatre spores n'ont pu être séparées. Une analyse poussée est réalisée pour les tétrades dont les quatre spores ont poussé. Des tests à température restrictive ainsi que des tests de ségrégation sur milieu supplémenté en généticine sont en cours.

La figure 6b présente les différents types de ségrégation résultant de la sporulation d'un diploïde après méiose.

- |  |                   |                     |                             |
|--|-------------------|---------------------|-----------------------------|
|  | = souche haploïde | A = allèle dominant | TT = tétratypes             |
|  | = souche diploïde | a = allèle récessif | DP= ditypes parentaux       |
|  | = ascospore       | B = allèle dominant | DNP = ditypes non-parentaux |
|  |                   | b = allèle récessif |                             |

La figure 4 montre le résultat de cette détection, avec comme contrôle de chargement une détection avec un anticorps dirigé contre la tubuline ; plusieurs candidats intégrants sont analysés et ce dans les différents « background ». Nous voyons que, bien qu'une quantité similaire de protéines ait été engagée dans chacune des pistes du Western-blot, peu de candidats expriment des protéines de fusion Mcs6-TAP à la taille souhaitée.

Au vu de cette analyse, nous pouvons affirmer qu'un candidat exprime des protéines de fusion Mcs6-TAP dans le background sauvage (a) et dans la souche mutée pour le protéasome *mts2-1* (b). Tandis que trois candidats expriment ces protéines dans la souche où le protéasome est muté : *mts3-1*.

Caractérisation phénotypique.

Nous avons vérifié que la fusion d'un « tag » à la protéine Mcs6 respecte la fonction de celle-ci dans l'environnement considéré. Cela a été effectué en vérifiant que la croissance des souches à différentes températures, sur milieu additionné de généticine, était inchangée.

Les photos de ces boîtes se trouvent à la figure 5.

On peut y voir que la souche « wild-type » contenant le gène de fusion *mcs6*-TAP pousse à la fois à 30 et à 37°C alors que les souches *mts2-1* et *mts3-1* contenant la fusion traductionnelle Mcs6-TAP poussent, comme attendu, uniquement à 30°C (température permissive).

Nous observons donc que l'introduction en C-terminal de Mcs6 du TAP ne modifie pas les caractéristiques de croissance de la souche dans les différentes conditions testées .

## **1.2. Construction de la souche *mcs6*-TAP dans un « background » *shp1-3*.**

Cette souche mutée dans la voie de l'ubiquitinylation et dont les protéines Mcs6 doivent être « taggées » TAP n'est pas obtenue par transformation intégrative de la cassette TAP-KAN MX6 mais par croisement.

En effet, la souche *shp1-3* mutée dans la voie de l'ubiquitinylation possède déjà le gène KAN intégré au locus *shp1*. *shp1-3* est donc croisée avec la souche wild-type dans laquelle les protéines Mcs6 sont déjà « taggées ».

Le croisement est réalisé sur milieu ME solide. Les diploïdes formés sporulent en méiose et les tétrades sont disséquées sur milieu riche au moyen d'un micromanipulateur. La boîte de dissection est placée à 30°C. Une photo des résultats de dissection est présentée à la figure 6a. Après germination, les spores forment des colonies. L'étape suivante consiste en la sélection des spores possédant le génotype : *mcs6*-TAP-KAN MX6 et *shp1-3* KAN MX6. Après avoir strié les quatre spores d'une tétrade sur milieu additionné en généticine, nous sélectionnons les colonies à ségrégation de type ditype non parental (DNP) et tétratype (TT).

Nous cherchons à sélectionner une levure dont le génotype est *mcs6*-TAP-KAN MX6, *shp1-3*-KAN MX6. Selon le principe de ségrégation de tétrades (figuré en 6b), nous suivons la ségrégation du marqueur de résistance à la généticine (KAN MX6) par croissance sur milieu

supplémenté en généticine. Lorsque seulement deux spores sur les quatre de la tétrade poussent sur ce milieu, nous pouvons assurer que ces deux spores possèdent le génotype attendu. Si trois spores sur les quatre poussent sur milieu additionné de généticine, une des trois possède le génotype attendu. Dans ce dernier cas des tests supplémentaires doivent être effectués : test de croissance à 37°C pour la sélection du caractère ts dû à l'allèle *shp1-3* et « Western-blot » afin de détecter la protéine Mcs6-TAP.

A ce stade du travail, nous avons disséqué les tétrades ; il reste à établir le type de ségrégation du marqueur d'intérêt KAN MX6.

## **2. Stabilité de la CAK dans divers mutants des systèmes de protéolyse (*mts2-1*, *mts3-1* et *shp1-3*).**

### **2.1. Tableau récapitulatif des souches « protéolyse déficientes » exprimant les sous-unités de la CAK.**

Le tableau ci-dessous rappelle l'état d'avancement de l'obtention des outils décrits au point 1. Chacune des trois protéines « taggées » de la CAK, c-à-d Mcs2-3HA, Pmh1-TAP ou Mcs6-TAP est exprimée dans une souche sauvage, dans deux souches ts mutées pour le protéasome (*mts2-1* et *mts3-1*) et dans une souche ts mutée pour la voie de l'ubiquitinylation (*shp1-3*).

Background Protéines « taggées »	Sauvage	Mutants du protéasome 26S		Mutant de l'ubiquitinylation
		<i>mts2-1</i>	<i>mts3-1</i>	<i>shp1-3</i>
Aucun « tag »	Spq01	TP48=ctl-	TP49=ctl-	SB1=ctl-
Mcs2-3HA	GP126=ctl+	SB9	SB10	DH14
Pmh1-TAP	DH21=ctl+	SB12	SB13	N.D.
Mcs6-TAP	SB15=ctl+	SB16	SB17	N.D.

Tous les transformants exprimant une construction CAK-« taggée » (Mcs6-TAP, Mcs2-3HA et Pmh1-TAP) dans la souche wild-type constituent un contrôle positif. Dans ce contexte, en effet nous nous attendons à observer en Western-blot une concentration constante de la protéine « taggée » au cours du « shift » de température à 37°C. Les différentes souches mutées pour la protéolyse ne possédant aucune protéine « taggée » constituent quant à elles des contrôles négatifs. Ces mêmes souches dans lesquelles une des protéines de la CAK est « taggée », vont permettre de suivre toute modification de concentration des protéines au cours d'un « shift » à la température, non-permissive (37°C) c-à-d lorsque les mutations *mts* ou *shp* s'expriment.

(N.D. pour non-déterminé).

Figure 7a:

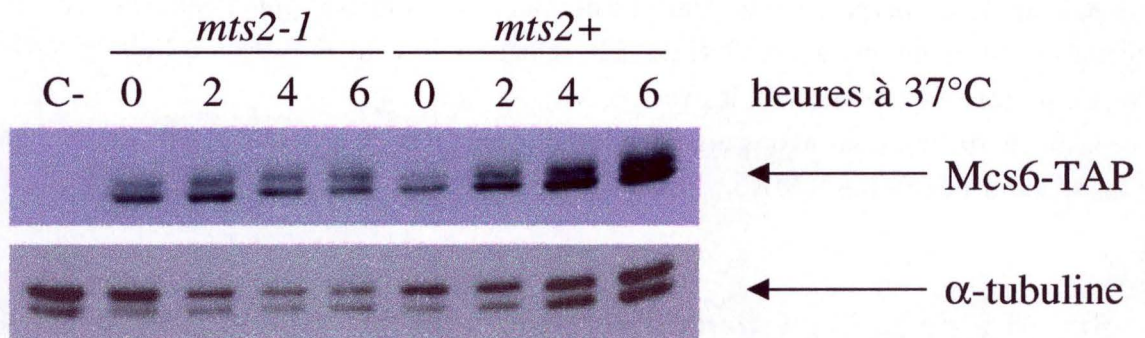


Figure 7b:



Figure 7: détection de Mcs6-TAP dans les souches mutées pour le protéasome.

Figure 7a: détection de Mcs6-TAP dans la souche *mts2-1*.

Figure 7b: détection de Mcs6-TAP dans la souche *mts3-1*.

La première piste constitue le contrôle négatif (C-) c-à-d des protéines issues d'une souche dans laquelle ces protéines ne sont pas taggées.

Les quatre pistes suivantes (*mts2-1* et *mts3-1*: 0,2,4,6) révèlent les protéines Mcs6-TAP dans la souche mutée pour le protéasome *mts2-1* (figure 7a) ou *mts3-1* (figure 7b) aux temps T0-T2-T4 et T6 après respectivement 0h, 2h, 4h et 6h de shift à la température restrictive de 37°C.

Les quatre pistes suivantes des figures 7a et 7b correspondent aux résultats obtenus avec la souche sauvage dans les mêmes conditions.

## **2.2. Effets sur la CAK des mutations dans les « pathways » ubiquitine - protéasome.**

### 2.2.1. Principe.

Pour rappel, notre hypothèse de travail est qu'une régulation s'exerce sur l'activité CAK via la protéolyse dépendante de l'ubiquitine. Nous allons donc suivre par Western-blot l'évolution de la concentration de chacun des composants de la CAK (Mcs6, Mcs2 et Pmh1) « taggés » dans les différents contextes génétiques suivants : *mts2-1*, *mts3-1* et *shp1-3* à température restrictive (37°C).

Les trois souches sont cultivées en milieu liquide. Dès qu'elles sont en phase exponentielle, nous les plaçons à la température restrictive de 37°C et nous prélevons un échantillon de culture au moment du « shift » et ensuite toutes les deux heures, cela pendant six heures.

Pour l'analyse de profil de Western-blot en fonction du temps, les extraits protéiques sont préparés en parallèle et chargés sur gel SDS-page 10 % soumis après migration à un transfert sur membrane de nitrocellulose. Une coloration au rouge ponceau est réalisée afin de visualiser les niveaux de chargement des protéines. Ensuite, la membrane de nitrocellulose est soumise à une détection grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre le « tag » : TAP, pour les protéines de fusion Pmh1-TAP et Mcs6-TAP, ou d'anticorps dirigés contre le « tag » : 3HA pour les protéines Mcs2-3HA, afin de détecter les protéines « taggées ». Une deuxième détection, utilisant cette fois des anticorps dirigés contre la tubuline, permet d'estimer les quantités chargées dans chacune des pistes et constitue un contrôle interne.

### 2.2.2. Suivi en Western-blot des composants de la CAK dans les souches « protéolyse déficientes ».

La figure 7 montre le taux d'expression des protéines Mcs6-TAP, aux temps T0-T2-T4 et T6 après un « shift » à température restrictive de 37°C, dans les souches mutées pour le protéasome et en parallèle dans une souche sauvage. Cette figure reprend également la détection tubuline qui permet de vérifier le chargement similaire de chacune des pistes.

La figure 7a montre le taux d'expression de Mcs6-TAP dans la souche mutée pour le protéasome : *mts2-1* et dans la souche sauvage *mts2+*.

On peut observer une augmentation de l'expression des protéines Mcs6-TAP dans la souche sauvage (*mts2+*) mais cette augmentation est également observée dans le contrôle interne, indiquant qu'elle est due à un chargement croissant des pistes T0 à T6. En regardant le contrôle tubuline pour la souche mutée (*mts2-1*), on constate que les pistes T0 et T2 ont été chargées de façon plus importante que les pistes T4 et T6 qui ont reçu quant à elles un chargement protéique similaire. Ces différences dans le chargement expliquent les variations observées dans l'expression des protéines Mcs6-TAP. Au vu du contrôle de chargement, on ne peut pas conclure à une accumulation, du moins importante, des protéines Mcs6-TAP dans cette souche mutée pour le protéasome (*mts2-1*).

Figure 8a:

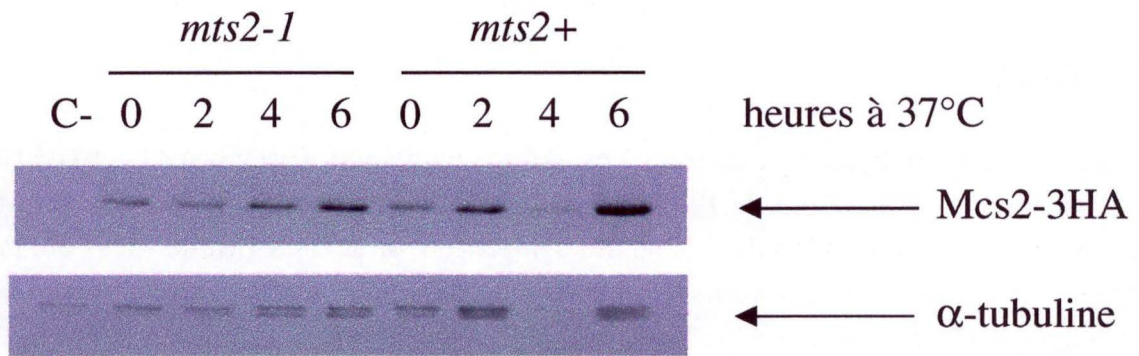


Figure 8b:

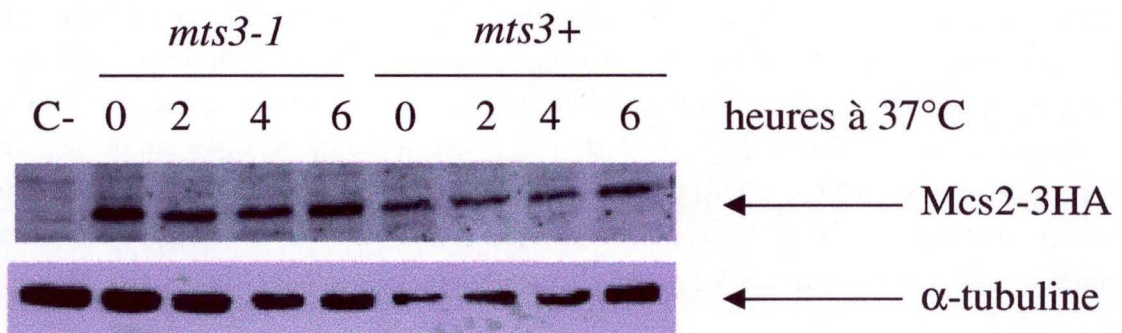


Figure 8: détection de Mcs2-3HA dans les souches mutées pour le protéasome.

La figure 8a: détection de Mcs2-3HA dans la souche *mts2-1*.

La figure 8b: détection de Mcs2-3HA dans la souche *mts3-1*.

La première piste constitue le contrôle négatif (C-) c-à-d des protéines issues d'une souche dans laquelle ces protéines ne sont pas taggées.

Les quatre pistes suivantes (*mts2-1* et *mts3-1*: 0,2,4,6) révèlent les protéines Mcs2-3HA dans la souche mutée pour le protéasome *mts2-1* (figure 8a) ou *mts3-1* (figure 8b) aux temps T0-T2-T4 et T6 après respectivement 0h, 2h, 4h et 6h de shift à la température restrictive de 37°C.

Les quatre pistes suivantes des figures 8a et 8b correspondent aux résultats obtenus avec la souche sauvage dans les mêmes conditions.

On observe deux bandes protéiques pour la détection de Mcs6-TAP. Plusieurs hypothèses peuvent être suggérées. Rappelons que la PCR, nous permettant de diagnostiquer le type d'intégration obtenu, a révélé deux bandes d'amplification (une bande attendue à 580 pb et un amplicon parasite à 300 pb). Cette amplification parasite pourrait être le signe d'une intégration du « tag » plus en amont dans le gène *mcs6*, ce qui pourrait aboutir à la production d'une protéine de fusion de 90 acides aminés plus petite ( $\pm 270$  pb de différence par rapport à la taille attendue) soit une taille de 10 kd inférieure à la taille attendue. La seconde hypothèse repose sur la migration différentielle d'une forme phosphorylée de la protéine par rapport à sa forme non-phosphorylée. Nous savons que Mcs6 est phosphorylée par la kinase Csk1, CAKAK de *S. pombe* (Hermand *et al.*, 2001). Nous pensons dès lors que le doublet observé résulte de la migration des formes phosphorylée et non phosphorylée de Mcs6. Pour avérer cette donnée, des tests de phosphorylation devraient être effectués.

La figure 7b présente les résultats en Western-blot de la révélation de Mcs6-TAP dans la souche mutée pour le protéasome : *mts3-1* et dans la souche sauvage *mts3+* après différents temps en condition restrictive pour ce mutant.

On peut observer une augmentation du signal des protéines Mcs6-TAP dans la souche *mts3-1* aux temps T0 et T2. Cela s'explique par un chargement protéique plus important dans ces deux pistes, comme le montre le contrôle interne tubuline. Les deux autres pistes, T4 et T6 dans la même souche sont chargées de façon équivalente et ne montre pas de différence de signal.

On ne peut donc pas conclure, sur base du contrôle interne, à une accumulation marquée au cours du temps des protéines Mcs6-TAP dans la souche mutée pour le protéasome : *mts3-1*.

La figure 8 représente le taux d'expression des protéines Mcs2-3HA aux temps T0-T2-T4 et T6 après un « shift » à température restrictive de 37°C, dans les souches mutées pour le protéasome et en parallèle dans une souche sauvage. Cette figure reprend également la détection tubuline qui permet de vérifier le chargement similaire de chacune des pistes.

La figure 8a montre le taux d'expression de Mcs2-3HA dans la souche mutée pour le protéasome (*mts2-1*) et dans la souche sauvage.

On observe une détection plus importante au temps T6 dans la souche *mts2-1* et aux temps T2 et T6 dans la souche sauvage *mts2+*. Comme le montre le contrôle interne de détection tubuline, cela s'explique par un chargement en protéines plus important dans ces pistes.

On ne peut donc pas conclure, en tenant compte du contrôle tubuline, à une accumulation de Mcs2-3HA dans la souche mutée pour le protéasome.

La figure 8b indique le taux d'expression de Mcs2-3HA dans la souche mutée pour le protéasome (*mts3-1*) et dans la souche sauvage.

Comme le montre le contrôle tubuline, chacune des pistes de la souche mutée est chargée de façon similaire. Dans le contrôle tubuline de la souche sauvage, on constate une légère augmentation du chargement de la piste T6. Au vu des chargements et des détections des

Figure 9a:

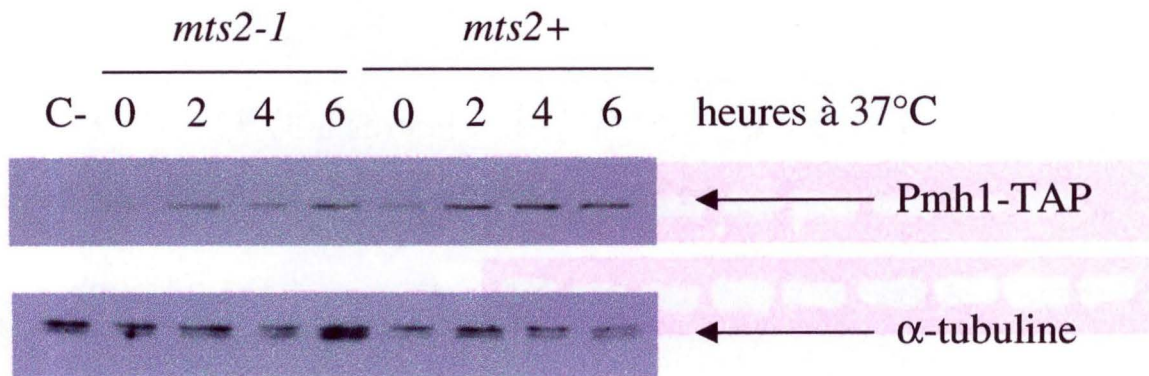


Figure 9b:

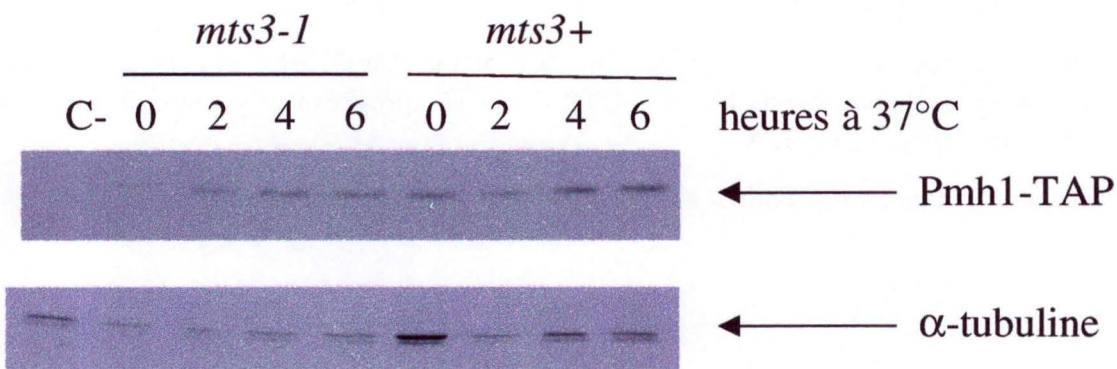


Figure 9: détection de Pmh1-TAP dans les souches mutées pour le protéasome.

La figure 9a: détection de Pmh1-TAP dans la souche *mts2-1*.

La figure 9b: détection de Pmh1-TAP dans la souche *mts3-1*.

La première piste constitue le contrôle négatif (C-) c-à-d des protéines issues d'une souche dans laquelle ces protéines ne sont pas taggées.

Les quatre pistes suivantes (*mts2-1* et *mts3-1*: 0,2,4,6) révèlent les protéines Pmh1-TAP dans la souche mutée pour le protéasome *mts2-1* (figure 9a) ou *mts3-1* (figure 9b) aux temps T0-T2-T4 et T6 après respectivement 0h, 2h, 4h et 6h de shift à la température restrictive de 37°C.

Les quatre pistes suivantes des figures 9a et 9b correspondent aux résultats obtenus avec la souche sauvage dans les mêmes conditions.

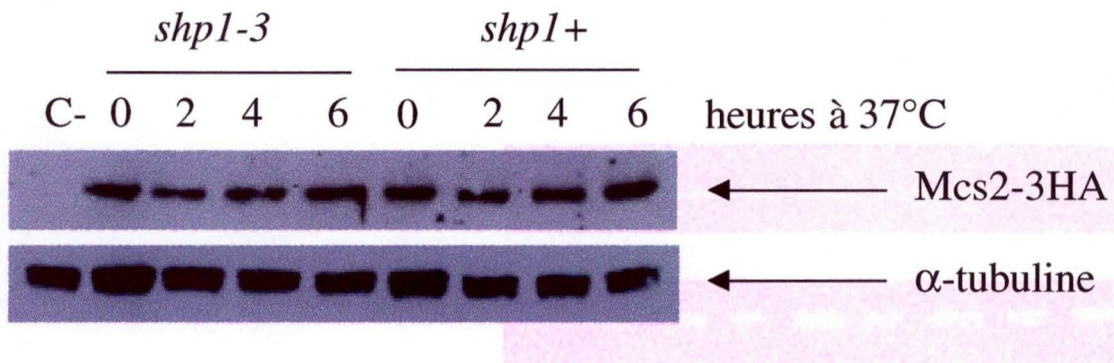


Figure 10: détection de Mcs2-3HA dans la souche mutée pour la voie de l'ubiquitylation: *shp1-3*.

La première piste constitue le contrôle négatif (C-) c-à-d des protéines issues d'une souche dans laquelle ces protéines ne sont pas taggées.

Les quatre pistes suivantes (*shp1-3*: 0,2,4,6) révèlent les protéines Mcs2-3HA dans la souche mutée pour la voie de l'ubiquitylation *shp1-3* aux temps T0, T2, T4 et T6 après respectivement 0h, 2h, 4h et 6h de shift à la température restrictive de 37°C.

Les quatre pistes suivantes correspondent aux résultats obtenus avec la souche sauvage dans les mêmes conditions.

protéines Mcs2-3HA, on ne constate pas d'accumulation détectable, au cours du temps, de Mcs2-3HA dans la souche mutée pour le protéasome *mts3-1*.

La figure 9 représente le taux d'expression des protéines Pmh1-TAP aux temps T0-T2-T4 et T6 après un « shift » à température restrictive de 37°C, dans les souches mutées pour le protéasome et en parallèle dans une souche sauvage. Cette figure reprend également la détection tubuline qui permet de vérifier le chargement similaire de chacune des pistes. L'analyse des données nous amène à conclure qu'il n'y a pas d'accumulation, du moins importante, des protéines Pmh1-TAP ni dans la souche *mts2-1* mutée pour le protéasome ni dans la souche *mts3-1*.

L'ensemble de ces Western-blots nous permettent de conclure que dans les conditions testées, nous n'observons pas d'accumulation sévère d'un des composants de la CAK aux conditions de température restrictive pour lesquelles la fonction du protéasome est affectée.

La figure 10 indique les effets de la mutation *shp1-3* sur la concentration de la protéine Mcs2-3HA aux temps 0h, 2h, 4h et 6h après un « shift » à température restrictive de 37°C, dans la souche mutée pour la voie de l'ubiquitinylation (*shp1-3*) et, en parallèle, dans une souche sauvage (*shp1+*). Cette figure reprend également la détection tubuline qui permet de vérifier le chargement similaire de chacune des pistes.

Ni dans la souche wild-type ni dans la souche mutée, on n'observe d'augmentation significative du signal Mcs2-3HA. Ceci suggère que la protéine Mcs2 ne subit pas de régulation via la voie d'ubiquitinylation.

### 2.2.3. Discussion des résultats.

Les résultats présentés aux figures 7 à 10 indiquent qu'il n'y a pas de modification significative au cours du temps, dans la concentration des protéines Mcs6, Mcs2 et Pmh1 dans les souches censées être affectées dans la protéolyse, soit via une mutation dans la voie de l'ubiquitinylation soit, via la mutation d'une sous-unité du protéasome.

On peut donc conclure que dans les conditions testées, on ne peut mettre en évidence une régulation de Mcs6, Mcs2 et Pmh1 par la voie de l'ubiquitinylation et du protéasome 26S.

*Conclusions et  
perspectives*

## Conclusions et perspectives

Chez la levure *S. pombe*, le complexe unique CAK (pour kinase activatrice de CDK) constitué de la CDK Mcs6, de la cycline Mcs2 et d'une protéine à Ring Finger Pmh1 joue un rôle essentiel dans l'accomplissement du cycle cellulaire (Hermand *et al.*, 1998b; Hermand *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1999; Westerling *et al.*, 2001). La CAK active par phosphorylation la CDK Cdc2 du complexe CDK-cycline (Cdc2-Cdc13), laquelle joue alors le rôle d'activateur direct de la transition de la phase G2-M.

Des cribles « double-hybride », réalisés précédemment à notre travail, ont mis en évidence une interaction à la fois entre Mcs2 et Shp1 (pour SKP1 homologue *S. pombe* (Hermand *et al.*, 1998b)) et entre Shp1 et Pmh1 (Bamps *et al.*, 2002). La protéine codée par le gène *SKP1* est impliquée, chez *S. cerevisiae*, dans le complexe ubiquitine-ligase de type SCF responsable de la protéolyse via le « pathway » ubiquitine-protéasome (Bai *et al.*, 1996; Skowyra *et al.*, 1997).

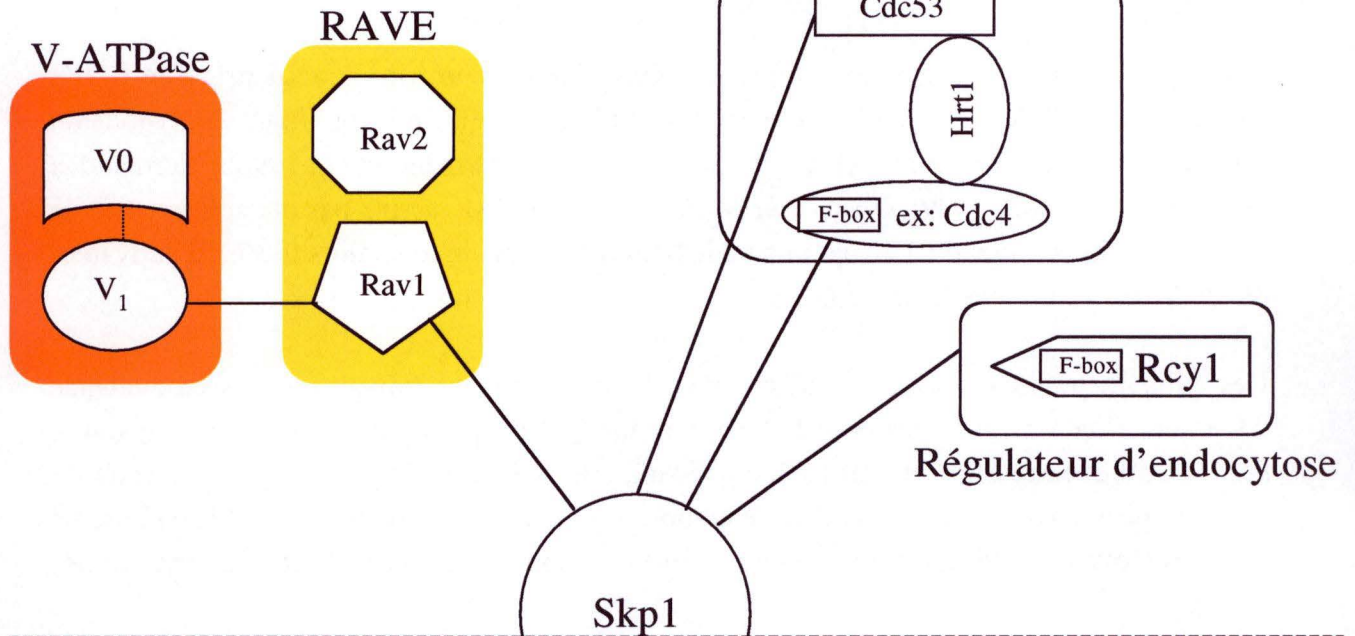
Les complexes multiprotéiques SCF sont constitués de trois partenaires : Shp1 recrutant d'une part la culline, qui interagit avec l'« ubiquitin-conjugating enzyme », et, d'autre part, la protéine à F-box spécifiant le substrat à ubiquitinyler (Kominami *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 1999).

Le rôle d'activation que détient la CAK sur la CDK Cdc2 du complexe Cdc2/Cdc13, à un moment précis du cycle, suggère qu'elle-même puisse être régulée de façon temporelle. L'évidence double-hybride d'interaction avec le système SCF laisse penser que cette régulation puisse résulter de la protéolyse. En effet, parmi les divers mécanismes de régulation de CDK, et donc du cycle cellulaire connus actuellement, on relève la liaison de la cycline, la phosphorylation de la CDK, mais également la dégradation des inhibiteurs de CDK,... (Peter, 1997; Peter and Herskowitz, 1994). En relation avec ce dernier mécanisme, on sait que chez *S. pombe* les SCF<sup>Pop1/Pop2</sup> ubiquitinylent Rum1, inhibiteur de CDK et le ciblent vers la dégradation. De ce fait l'inhibition que Rum1 exerçait sur Cdc2/Cdc13 est levée de telle sorte que ce dernier complexe peut ensuite être la cible d'activateurs mitotiques (Mcs6-Mcs2, Cdc25) (Kominami and Toda, 1997), ce qui va relancer la mitose.

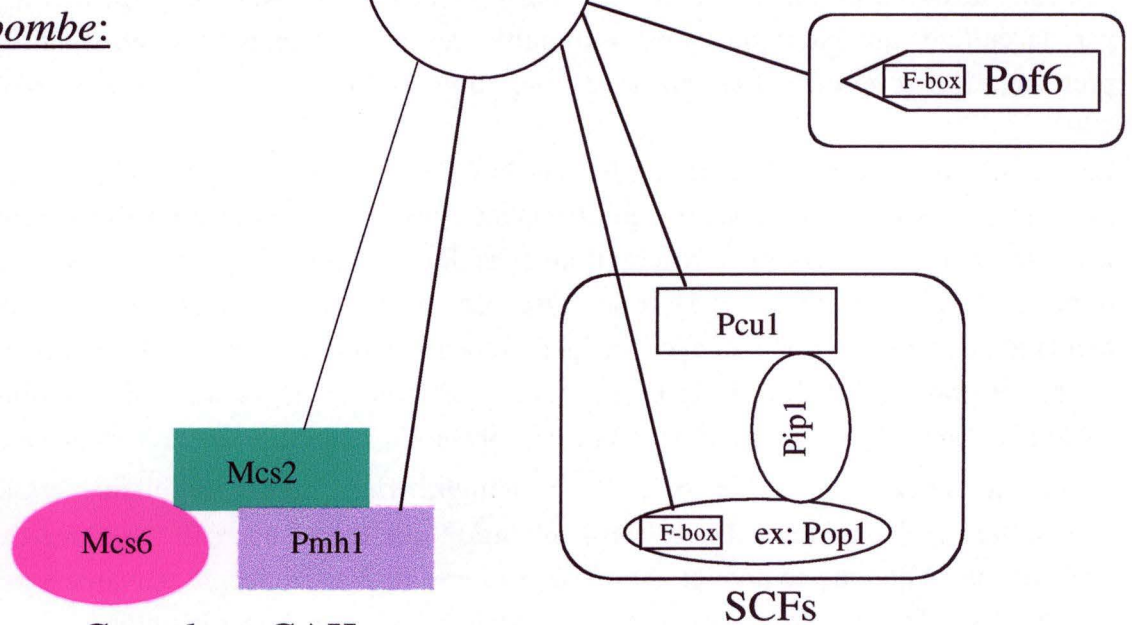
Notre objectif a été d'éprouver l'hypothèse, issue des données double-hybride d'interactions physiques entre la CAK et Shp1, selon laquelle au moins un des composants de la CAK est régulé post-traductionnellement via son ubiquitinylation par le complexe SCF et est orienté vers le protéasome 26S en vue de sa dégradation.

De façon à tester cette hypothèse, nous avons, dans un premier temps, « taggé » les trois protéines formant le complexe CAK dans une souche mutée pour la voie de l'ubiquitine, d'une part, et dans deux souches mutées pour le protéasome, d'autre part. Dans un second temps, nous avons suivi la concentration de ces protéines au cours d'un « shift » à température restrictive (c-à-d, température à laquelle la mutation s'exprime), dans les souches mutées en comparaison avec la souche sauvage.

Chez *S. cerevisiae*:



Chez *S. pombe*:



**Figure 1:** Complexe CAK

Schéma comparatif du réseau d'interactions impliquant Skp1 chez *S. cerevisiae* (partie supérieure du schéma) et *S. pombe* (partie inférieure du schéma).

Les lignes continues symbolisent les interactions physiques directes avérées par double-hybride ou coimmunoprécipitation .

En couleur sont représentés les complexes impliquant Skp1 spécifiques à chacune des levures.

Skp1 participe à deux autres types de complexes communs aux deux types de levures : SCF et Rcy1/Pof6. Ceux-ci sont représentés à droite de Skp1 sur le schéma.

(Schéma adapté de Seol, *et al.*, 2001).

L'ensemble de nos données indique que les composants de la CAK (Mcs6-TAP, Mcs2-3HA ainsi que Pmh1-TAP) ne s'accumulent pas sensiblement au cours du temps dans les souches mutées pour le protéasome (*mts2-1*, *mts3-1*). De même, si dans une souche mutée dans la voie de l'ubiquitine (*shp1-3*) on se réfère au contrôle interne que constitue la tubuline, on ne constate pas d'accumulation, du moins drastique, de la protéine Mcs2-3HA.

Etant donné ces résultats, dans les conditions testées (à savoir le suivi des concentrations totales de chaque composant de la CAK), on peut conclure que les différents composants de la CAK à savoir Mcs6, Mcs2 et Pmh1 ne sont pas les cibles directes d'une régulation globale post-traductionnelle par le « pathway » impliquant le protéasome 26S et l'ubiquitine ligase de type SCF. Cependant, l'hypothèse d'une dégradation d'une sous-population des partenaires de la CAK ne peut être écartée.

Nos résultats expérimentaux nous conduisent donc à remettre en cause l'hypothèse, émise à partir des données double-hybride, selon laquelle la liaison CAK-Shp1 signifie l'intervention régulatrice de la protéolyse à ce niveau. Compte tenu des données récentes montrant que chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*, Skp1 peut interagir spécifiquement avec une protéine à F-box (Rcy1 pour *S. cerevisiae* (Galan *et al.*, 2001) et Pof6 pour *S. pombe* (D. Hermand, communication personnelle)) sans impliquer la protéine de la famille des cullines, une hypothèse alternative émerge. En effet, chez *S. cerevisiae*, Snc1 est une protéine v-SNARE impliquée dans les phénomènes d'exocytose et assure la fusion de vésicules golgiennes à la membrane plasmique. Cette protéine est recyclée de la membrane plasmique vers les endosomes afin d'être réutilisée dans le processus d'exocytose. Ce phénomène est perturbé dans des délétants *Arcy1*. Etant donné la présence d'un motif F-box dans Rcy1, et sachant que l'ubiquitine constitue un signal d'internalisation de protéines membranaires (Galan and Haguenaer-Tsapis, 1997), l'hypothèse d'un recyclage de Snc1 par la voie des ubiquitines ligases s'impose. Cependant, les études de localisation de Snc1 dans des mutants *rcy1* et *skp1* suggèrent que Snc1 est bien relarguée depuis la membrane plasmique mais est bloquée à une des étapes de la voie de recyclage. Ceci suggère que le complexe Rcy1-Skp1 intervient dans la voie de recyclage en aval du relargage de Snc1 de la membrane plasmique (Galan *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2000; Wiederkehr *et al.*, 2000).

D'autres protéines, Rav1 et Rav2 s'associent également à Skp1 pour constituer un complexe RAVE (pour Régulateur des V-ATPases des membranes Vacuolaires et Endosomales). Ce complexe semble promouvoir l'assemblage de deux sous-unités constituant les ATPases (Seol *et al.*, 2001).

Ces exemples d'association (schématisés à la figure 1) où intervient Skp1 montrent que le partenaire est ou non une protéine à F-box et que les systèmes fonctionnels conservés sont variables. Dans tous ces cas (RAVE, Rcy1, ...) l'intervention du système ubiquitine-protéasome dans la régulation est écartée dans la mesure où il a été montré qu'il n'y a pas de culline impliquée.

Ces données relatives à des fonctions de Skp1 (chez *S. cerevisiae*) sans lien avec le système SCF ni le ciblage des substrats vers la protéolyse dépendante du protéasome 26S sont à rapprocher des résultats rapportés dans ce mémoire, pour Shp1 (chez *S. pombe*), comme le montre la figure 1.

Nous examinerons, dans cette optique, si la culline fait effectivement défaut du complexe en procédant à des expériences de coimmunoprécipitations.

Au terme de notre travail, nous sommes incités à penser que l'interaction CAK-Shp1 qui en avait motivé le projet pourrait relever, elle aussi, d'une fonction méconnue et peut-être nouvelle chez *S. pombe*. On se retrouverait une fois encore en présence d'une protéine dont l'effet joue, selon les contextes, particulièrement en fonction des associations avec d'autres facteurs, dans des mécanismes ou processus biologiques pouvant être totalement différents. Ce type d'observation est de plus en plus souvent rapporté dans la littérature. Il illustre comment des génomes à la complexité limitée réalisent une plasticité d'expression parfois extrême en recourant entre autres à des combinaisons d'interactions.

Dans le cas présent, l'approche interactomique par diverses techniques (double-hybride, coimmunoprécipitation,...) pourrait aboutir à révéler que les interactions Mcs2-Shp1 et Pmh1-Shp1 sont-elles-mêmes à connecter avec un partenaire actuellement encore inconnu.

C'est donc bien la recherche des partenaires du complexe CAK-Shp1, identifié lui-même par interaction double-hybride, qu'il s'agit de poursuivre afin de tenter d'étendre les mailles des interactions en présence. C'est de la sorte, en effet, qu'on pourrait espérer découvrir dans quel réseau fonctionnel, par exemple du contrôle de la division cellulaire, pourrai(en)t s'exercer le(s) véritable(s) rôle(s) biologique(s) de l'interaction CAK-Shp1.

Matériel et  
méthodes

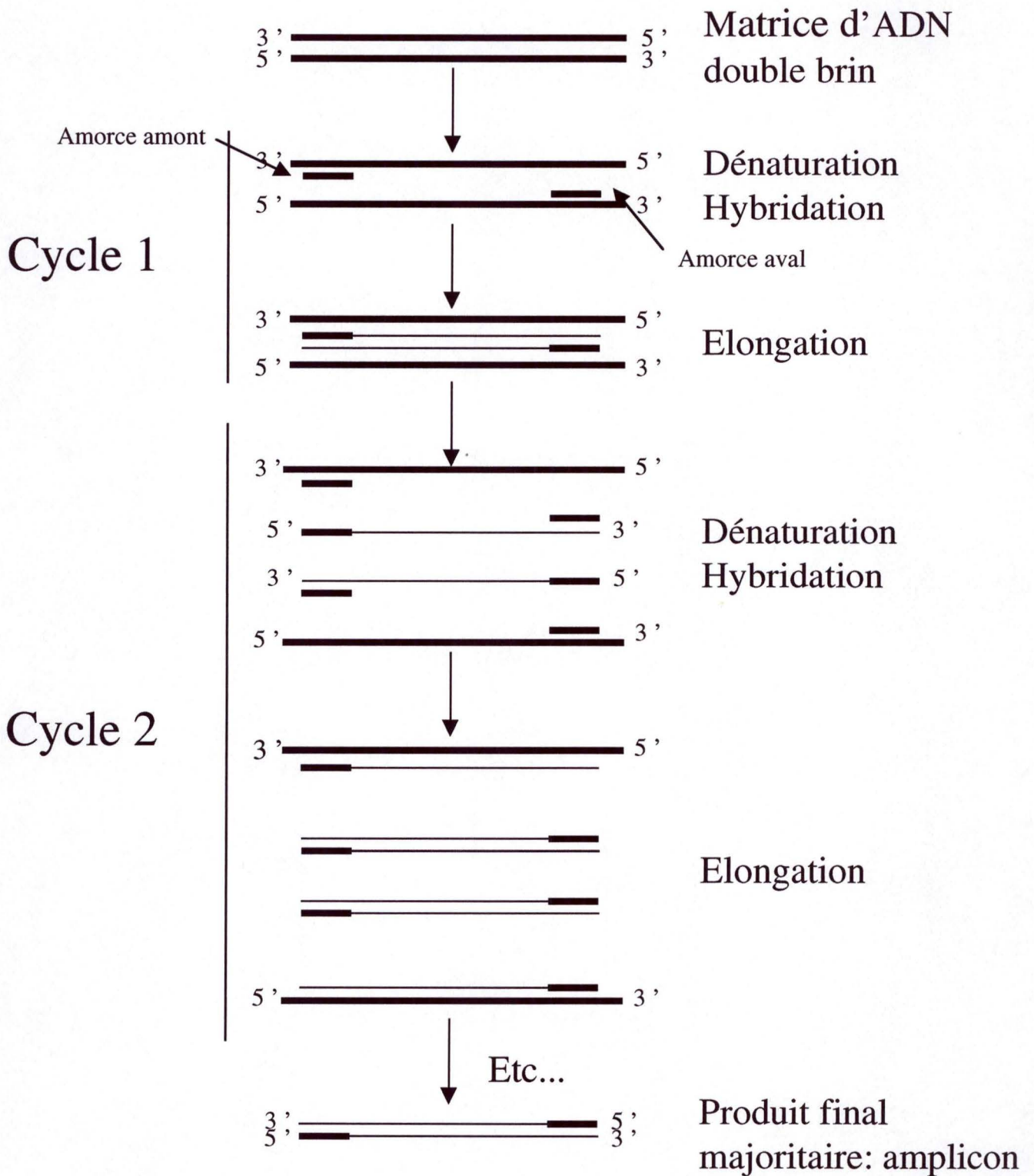


Figure 1:

Schéma représentant l'amplification d'une matrice par réaction en chaîne de la polymérase ou PCR. Le nombre de cycles est fonction de la quantité d'amplicon finale souhaitée.

## Matériel et méthodes

### 1. Techniques relatives à l'ADN.

#### 1.1. La PCR ou « Polymerase Chain Reaction ».

##### Principe.

Cette technique est utilisée pour amplifier rapidement un fragment d'ADN d'intérêt compris entre deux amorces oligonucléotidiques.

Les séquences bordant le fragment à amplifier doivent être connues afin de pouvoir synthétiser les oligonucléotides qui serviront de « primers ». Ceux-ci sont complémentaires des brins opposés et leurs extrémités 3' sont orientées l'une vers l'autre.

La matrice d'ADN est dénaturée par chauffage en présence d'un excès d'oligonucléotides et de désoxynucléotides.

Ensuite, la diminution de température permet l'hybridation spécifique des oligonucléotides avec les séquences anticcomplémentaires.

L'ADN compris entre les deux amorces est amplifié en présence de désoxynucléotides et d'une enzyme thermorésistante: la Taq DNA Polymerase (isolée de la bactérie *Thermus brockianus*) qui allonge l'ADN de 5' en 3', ou la Pfu (isolée de *Pyrococcus furiosus*).

Après une élongation des amorces sur base de la matrice, à la température optimale d'action de l'enzyme, les deux brins (parental et néosynthétisé) sont dénaturés par chauffage et le cycle de température recommence.

On recommence ce cycle un nombre de fois déterminé de telle sorte que l'amplification reste exponentielle. Le nombre d'amplicons est, en théorie, doublé à chaque cycle, ceci est schématisé à la figure 1.

Le produit de la PCR peut être utilisé pour le séquençage, pour l'analyse diagnostique de clones ou pour son insertion dans un vecteur.

Réalisation pratique.

Différents éléments doivent être mis en présence :

- l'ADN d'intérêt : 1  $\mu$ l,
- les déoxynucléotides: 2  $\mu$ l d'une solution concentrée 20 mmoles/ $\mu$ l,
- les amorces oligonucléotidiques (concentration de 0,01nmole/ $\mu$ l: 2,5  $\mu$ l),
- le tampon de PCR (10X): 5  $\mu$ l,
- l'enzyme: 1 $\mu$ l (l'activité est de 2 unités/ $\mu$ l),
- l'eau stérile afin d'arriver au volume désiré de 50  $\mu$ l.

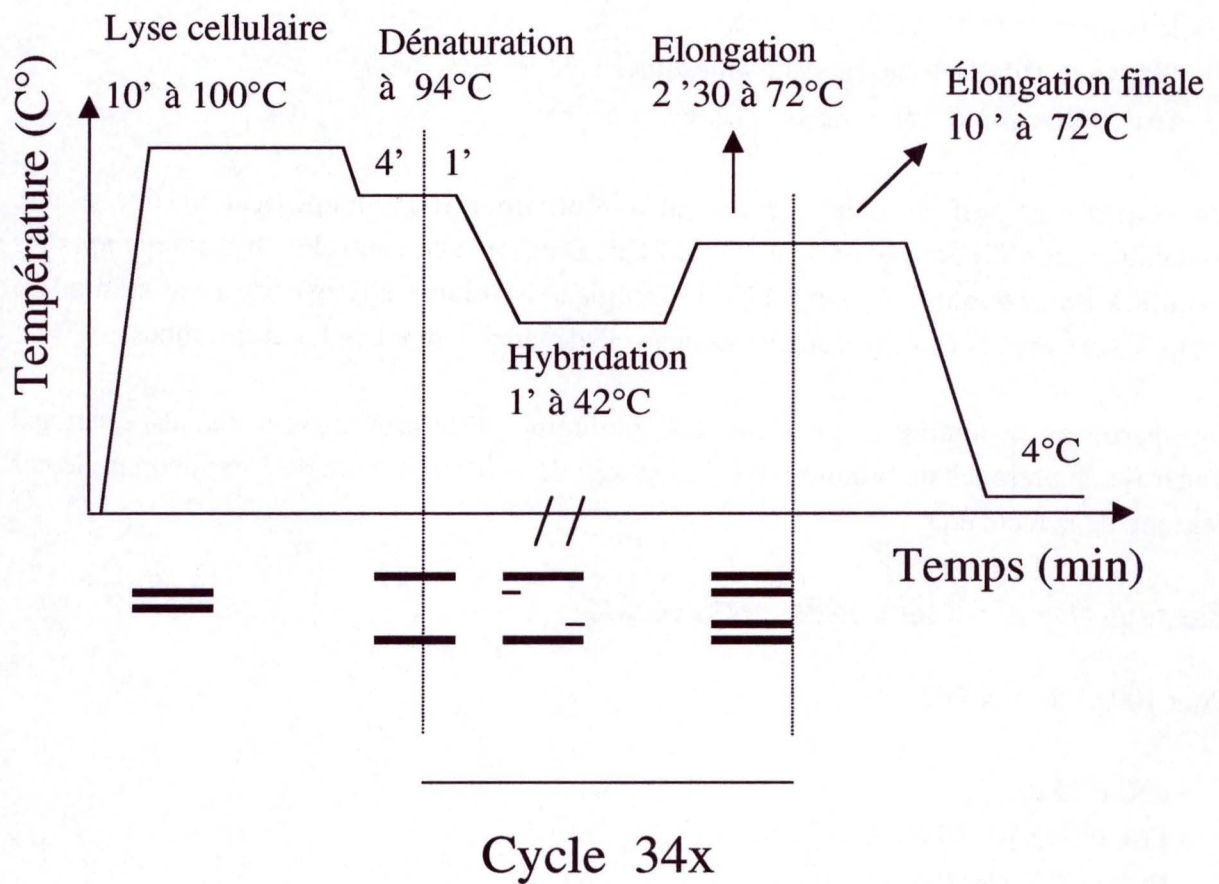
Un contrôle négatif doit être réalisé afin d'éliminer toute amplification liée à une contamination d'un des composants de la PCR. Dans le tube contrôle, on retrouve tous les réactifs à l'exception de l'ADN qui sera remplacé à volume égal par de l'eau stérile. Ce contrôle sera soumis au même processus de cycle de température que les autres tubes.

Une partie ou la totalité du produit PCR additionné d'un alourdisseur est placé sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium afin de vérifier la taille de l'amplicon et, le cas échéant, de le récupérer.

Cas particulier : PCR sur colonie chez *S. pombe*.

Pour 100  $\mu$ l de mix PCR :

- dNTP : 5  $\mu$ l,
- Primer 1: 8  $\mu$ l (80 picomoles),
- Primer 2: 8  $\mu$ l (80 picomoles),
- eau : 68,5  $\mu$ l,
- buffer : 10  $\mu$ l,
- ADN sous forme de 1 mm<sup>3</sup> de la colonie à tester, prélevé avec un tips stérile.



**Figure 2:**

Représentation schématique reprenant les températures et durées des différentes étapes utilisées pour la PCR sur colonie.

Programme PCR utilisé (voir figure 2):

- 10 min 100°C
- 4 min 94°C
- 34 fois le cycle de trois étapes suivantes :
- 1 min 94°C
- 1 min 42°C
- 2,30 min 72°C
- et pour terminer
- 10 min 72°C

Ajouter la Taq (0,7 µl) après la première étape PCR : 10 min 100°C.

#### dNTP :

Le stock fourni par Roche se compose du mélange des quatre nucléotides à une concentration de 20 mmoles/µl, chaque nucléotide étant à une concentration de 5 mmoles/µl. Lors de la PCR 4 µl de cette solution contenant les quatre nucléotides est utilisée dans un volume total de 100 µl.

## **1.2. L'électrophorèse sur gel d'agarose.**

### But.

L'électrophorèse sur gel d'agarose peut être envisagée dans plusieurs cas de figures. D'une part, cette technique permet de séparer des fragments de taille différente. D'autre part, elle permet d'estimer la taille ainsi que la concentration de l'ADN grâce à la migration simultanée et en parallèle d'un marqueur de taille de concentration connue. Une dernière possibilité offerte par cette technique est d'estimer la qualité de la préparation et son degré de purification.

### Principe et paramètres.

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode de séparation de molécules qui repose sur des vitesses de migration différentielles.

La vitesse de migration dépend de plusieurs paramètres :

1° la taille des molécules ou fragments d'ADN: au plus le fragment est grand, au moins il migrera rapidement. En effet, la migration s'effectue de manière inversement proportionnelle au logarithme du poids moléculaire;

2° le pourcentage d'agarose: au plus le pourcentage d'agarose est élevé, au plus on sépare efficacement les fragments de petite taille comme le présente le tableau suivant :

Agarose (%)	Tailles séparées de façon optimale (kb)
0,5	30 à 1
0,7	12 à 0,8
1,0	10 à 0,5
1,2	7 à 0,4
1,5	3 à 0,2

3° l'intensité du champ électrique: la migration sera d'autant plus rapide que l'ampérage est important;

4° la conformation de la molécule d'ADN.

#### Réalisation pratique.

*La première étape : couler un gel.*

Dissoudre par chauffage 0,8% d'agarose dans du TAE 1X. Prendre un support pour gel, y déposer une petite quantité de bromure d'éthidium (de l'ordre de 2 à 5  $\mu$ l par 100 ml). Ensuite, dès que le berlin contenant la solution peut être pris en main, couler la solution dans le support et ajouter les peignes adéquats.

#### Agarose :

1% dans du TAE 1X : 1g pour 100 ml de TAE.

#### TAE 50X :

Pour 100 ml :

Tris HCl pH 8	40 mM
EDTA	0,002 M
Acide acétique glacial	51,7 ml

*La deuxième étape : charger le gel avec les échantillons et le marqueur.*

Afin de pouvoir charger les échantillons dans les puits, il faut leur ajouter un tampon de chargement. Celui-ci permet d'alourdir l'échantillon de façon à ce qu'il se dépose au fond du puits. Il faut en ajouter un dixième du volume total.

Alourdisseur/colorant pour gels d'agarose :

		pour 10 ml
Bleu de bromophénol	0,25%	25 mg
EDTA	25 mM	0,5 ml EDTA 0,5 M
Glycérol	50%	5 ml
Eau distillée		4,5 ml

Marqueurs de poids moléculaires pour gel d'agarose :

Hyperladder (Bioline)

La solution fournie est prête à l'emploi. Pour un gel, 5 µl de la solution sont utilisés.

Taille	Concentration (totale = 720 ng)
10000 bp	100 ng
8000 bp	80 ng
6000 bp	60 ng
5000 bp	50 ng
4000 bp	40 ng
3000 bp	30 ng
2500 bp	25 ng
2000 bp	20 ng
1500 bp	15 ng
1000 bp	100 ng
800 bp	80 ng
600 bp	60 ng
400 bp	40 ng
200 bp	20 ng

**Smartladder SF (Eurogentec)**

La solution fournie est prête à l'emploi. Pour un gel, 5 µl de la solution sont utilisés.

Taille	Concentration (totale = 500 ng)
1000 bp	100 ng
800 bp	80 ng
700 bp	80 ng
600 bp	60 ng
500 bp	60 ng
400 bp	40 ng
300 bp	40 ng
200 bp	20 ng
100 bp	20 ng

*La troisième étape : la migration proprement dite.*

On distingue deux types de migration :

1° analytique dont le but est de déterminer la taille et la quantité d'ADN.

2° préparative dont le but est de récupérer un fragment de taille déterminée en vue de le cloner dans un vecteur.

*La quatrième étape: visualiser les bandes aux ultraviolets.*

Le bromure d'éthidium est une molécule qui absorbe l'énergie lumineuse à une longueur d'onde de 302 nm (dans les ultraviolets), celui-ci va s'intercaler dans la double-hélice de l'ADN et la rendre visible lorsqu'elle est exposée à une lumière ultraviolette.

**Bromure d'éthidium :**

2 mg par ml d'eau distillée.

### **1.3. Récupération et purification des amplicons PCR.**

Après migration et visualisation grâce aux ultraviolets, on coupe le morceau de gel contenant l'amplicon et on le purifie via le kit de purification d'ADN: « QIAquick Spin » fourni par la firme QIAGEN.

Le temps nécessaire pour effectuer cette récupération est de 20 minutes.

Les étapes sont :

1° exciser la bande d'intérêt du gel d'agarose au moyen d'un scalpel. Cette opération doit être réalisée le plus rapidement possible afin de diminuer l'exposition de l'ADN aux ultraviolets qui lui sont néfastes.

2° pour chaque 100 mg de gel d'agarose, ajouter 300 µl de tampon QG fourni dans le kit. Pour des gels d'agarose plus concentrés (2%), ajouter le double du volume du tampon QG.

3° incuber les échantillons 10 minutes à 55°C. Vortexer les échantillons toutes les deux à trois minutes pour faciliter la dissolution de l'agarose.

4° après dissolution complète, vérifier que la couleur de la solution est jaune. Si elle est orange ou violette, le pH a changé. Dans ce cas, ajouter 10 µl d'acétate de sodium 3M, à pH 5. L'adsorption de l'ADN sur la colonne est optimale à pH égal ou inférieur à 7,5.

5° ajouter un volume d'isopropanol (égal au volume de la bande) et mélanger. Cette étape est optionnelle et fonction de la taille de l'ADN à récupérer. Pour les fragments d'ADN compris entre 500 pb et 4 kb, l'ajout d'isopropanol n'a pas d'effet.

6° charger chaque échantillon sur une colonne QIAquick et placer chaque colonne sur un tube de 2 ml, centrifuger 1 minute à 13000 rpm.

7° ôter le liquide et replacer la colonne sur le tube, ajouter 750 µl de tampon PE pour laver la colonne. Laisser cinq minutes sur table, puis centrifuger à vitesse maximale une minute.

8° ôter le surnageant et centrifuger à nouveau une minute à vitesse maximale.

L'éthanol résiduel inhibe les réactions ultérieures.

9° placer la colonne sur un eppendorf de 1,5 ml et ajouter 50 µl d'eau sur le centre de la membrane. Laisser sur table cinq minutes et centrifuger 60 secondes à vitesse maximale. L'ADN peut aussi être élué dans du tampon EB (Tris HCl 10 mM, pH 8,5), fourni dans le kit.

## **1.4. Transformation de levure.**

*La transformation utilisant le LiAc.*

### Principe.

Cette procédure permet de transformer des levures avec un voire deux plasmides en même temps.

L'acétate de lithium et le choc thermique perméabilisent la membrane ce qui permet des mouvements de molécules vers l'intérieur ou vers l'extérieur de la cellule.

L'ADN de sperme de saumon (ssDNA) dénaturé augmente l'efficacité de transformation car il offre une fonction de « carrier » à l'ADN plasmidique. L'efficacité de transformation est estimée de  $10^4$  à  $10^5$  transformants par  $\mu\text{g}$  d'ADN.

### Transformation.

1° inoculer 5 ml de milieu sélectif pour la levure et incubé sous agitation toute la nuit à 30°C.

2° inoculer une culture de 15 ml du même milieu avec un petit volume de la préculture et incubé à 30°C sous agitation jusqu'à ce que la D.O.<sub>600nm</sub> = 0,8 (délai: entre 4 à 5 heures).

Pour deux transformations :

3° transférer 20 ml de culture dans un falcon et centrifuger à 5000 rpm à température ambiante pendant 5 minutes. Oter le surnageant.

4° resuspendre dans 20 ml d'eau stérile.

5° centrifuger 5 minutes à 5000 rpm à température ambiante. Oter le surnageant. Recommencer l'opération jusqu'à ce que l'eau stérile soit claire.

6° resuspendre dans 200  $\mu\text{l}$  de LiAc 100 mM et transférer dans un eppendorf.

7° microcentrifuger les cellules à haute vitesse 15 secondes et ôter le LiAc.

8° resuspendre dans du LiAc de telle sorte que le volume total représente 100  $\mu\text{l}$  (le culot représente environ 20  $\mu\text{l}$ ).

9° séparer en deux tubes, un pour chaque transformation.

Solution d'acétate de lithium (LiAc 1M) :

La solution de LiAc est préparée et stockée à la concentration de 1,0 M dans l'eau distillée et est autoclavée. La solution ne doit pas être mise à pH car celui-ci peut varier entre 8,4-8,9 pour les applications réalisées.

Par transformation (pour un tube):

10° faire bouillir 50 µl de SS DNA pendant 5 minutes et mettre sur glace.

11° centrifuger à grande vitesse pendant 15 secondes et ôter le LiAc.

12° ajouter le mix de transformation dans l'ordre mentionné ci-dessous car le PEG protège les cellules des effets néfastes des fortes concentrations de LiAc.

Mix de transformation :

- 240 µl de PEG 50% (SIGMA 3350)
- 36 µl de LiAc 1M
- 50 µl de SS DNA (2 mg/ml)
- 25 µl d'ADN à intégrer (0,1 à 1 µg/ml).

PEG Polyéthylène glycol :

Placer 50 g de PEG MW 3350 (Sigma) dans un berlin de 150 ml et ajouter 35 ml d'eau distillée.

Mélanger au moyen d'un barreau magnétique jusqu'à dissolution complète. Cela prend environ 30 minutes. Transférer la solution dans un cylindre gradué de 100 ml et rincer le berlin avec une petite quantité d'eau distillée. Ajouter cela au cylindre gradué et amener la solution à un volume total de 100 ml. Mixer par inversion.

Autoclaver 20 minutes et stocker la solution dans une bouteille fermant correctement afin d'éviter l'évaporation de l'eau distillée et donc l'augmentation de concentration du PEG. Une concentration en PEG plus élevée est néfaste pour l'efficacité de la transformation.

ADN de sperme de saumon :

Peser 200 mg d'ADN de haut poids moléculaire (Deoxyribonucleic Acid Sodium Salt type III from Salmon Testes, Sigma D 1626) dans 100 ml de TE Buffer. Disperser l'ADN dans la solution grâce à une pipette 10 ml. Mixer vigoureusement avec un agitateur magnétique jusqu'à ce que tout soit dissout.

Aliquoter l'ADN par un ml et le conserver à -20°C.

Avant l'utilisation, la solution doit être bouillie pendant 5 minutes et ensuite rapidement

placée sur glace. Cette étape permet la dénaturation de l'ADN en simple brin.

13° vortexer chaque tube pendant une minute.

14° incuber 30 minutes à 30°C.

15° faire un choc thermique pendant 20 minutes dans un bain à 42°C.

16° centrifuger à 5000 rpm pendant 5 minutes et ôter le mix de transformation.

17° ajouter 500 µl d'eau stérile et resuspendre avec la pipette doucement.

18° étaler sur milieu solide sélectif pour les intégrants. Etaler sur deux boîtes 250 µl du mix de transformation et sur 2 autres 250 µl du mix de transformation où l'ADN a été remplacé par de l'eau et constitue un contrôle négatif.

## **2. Techniques relatives aux protéines.**

### **2.1. Préparation d'extraits de protéines dénaturées.**

1° incuber la culture cellulaire dans 50 ml de milieu à 30°C jusqu'à ce qu'elle atteigne une DO de 0,250, soit environ  $2,5 \times 10^8$  cellules.

Toutes les étapes suivantes se font sur glace et les centrifugations sont effectuées à 4°C.

2° prélever 20 ml de la culture et ajouter directement de l'azide de sodium à une concentration finale de 1 mM (ce qui correspond pour un volume de 20 ml à 0,0325g). L'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) inhibe la respiration cellulaire. Centrifuger la culture 5 minutes à 3000 rpm. Resuspendre le culot avec 5 ml de STOP buffer froid et transférer dans un Falcon 15 ml. Le STOP Buffer arrête la croissance cellulaire.

#### STOP buffer :

150 mM NaCl

50 mM NaF

10 mM EDTA

1mM  $\text{NaN}_3$  pH 8

3° centrifuger 5 minutes à 5000 rpm ; enlever le surnageant. Resuspendre le culot dans 150 µl de HB buffer + PMSF et transférer les cellules dans un tube 1,5ml (sarstedt 72,692).

**HB buffer :**

25 mM MOPS pH 7,2,  
60 mM  $\beta$ -glycérophosphate,  
15 mM MgCl<sub>2</sub>,  
15 mM EGTA,  
1 mM DTT,  
0,1 mM sodium vanadate,  
1% Triton X-100,  
1 mM PMSF ajouté fraîchement.

**PMSF :**

La solution stock est concentrée à 100 mM  
Pour 5 ml : 0,087 g dans 5 ml d'isopropanol.

4° faire bouillir durant 6 minutes et plonger directement les échantillons dans l'azote liquide.  
Le culot peut être congelé à -80°C à cette étape.

5° ajouter 1 ml de billes de verre (0,5 mm de diamètre) et placer les tubes dans le FASTPREP (marque BIO101 ThermoSavant) 20 secondes à une agitation maximale. Percer les tubes avec une aiguille et les placer sur un eppendorf. Centrifuger 5 minutes à 2500 rpm.

**2.2. Dosage des extraits protéiques par Bradford.**

1° mettre 10  $\mu$ l de l'échantillon dans une cuvette de 1 ml (pour spectrophotomètre) et y ajouter 990  $\mu$ l de solution de Bradford.

2° recouvrir de papier parafilm et mélanger par inversion.

3° attendre 15 minutes et lire la densité optique à 595 nm.

Solution stock 5X du Bradford :

	200 ml
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,1 g
Ethanol	50 ml
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85%	100 ml
Eau	50 ml

*Courbe d'étalonnage :*

Standard : BSA à 100 µg/ml.

Après avoir laissé sur table 15 minutes, prendre la D.O.<sub>595nm</sub> de 0; 5; 10; 50; 100; 150; 200 µl de BSA complétée de Bradford pour arriver à 1 ml. Faire un graphe de la densité optique en fonction de la concentration de BSA.

Reporter les valeurs obtenues pour l'échantillon sur le graphe. On obtient alors la concentration en protéines de l'extrait.

**2.3. Electrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE).***Préparation du gel.*

Le Running Gel, à 10% de polyacrylamide

	20 ml
Eau	7,9 ml
29,2% Acrylamide/0,8% bis-Acrylamide	6,7 ml
1,5M Tris pH8,8	5 ml
SDS 10%	0,2 ml
APS 10%	0,2 ml
TEMED	0,008 ml

Couler la solution entre les deux plaques de verre préalablement fixées sur leur support.

Afin de permettre une polymérisation optimale de l'acrylamide (qui est inhibée en présence de l'air), mettre 1ml d'isopropanol au-dessus du gel. Une fois que le gel est pris, enlever l'isopropanol en retournant le montage.

Composition de la solution de polyacrylamide « 30% »:

Acrylamide	29,2%
Bis-Acrylamide	0,8%
Eau distillée	<i>ad</i> 100 ml

Cette solution est filtrée et stockée à 4°C.

SDS (sodium docéylsulphate)10% :

10 g de SDS dans 100 ml d'eau distillée.

Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane :

MM = 121,14 g.

Firme ICN Biomedicals.

APS (ammonium persulfate) 10%:

10g dans 100 ml d'eau distillée.

TEMED (N,N,N',N'-Tetraméthyléthylène-diamide) :

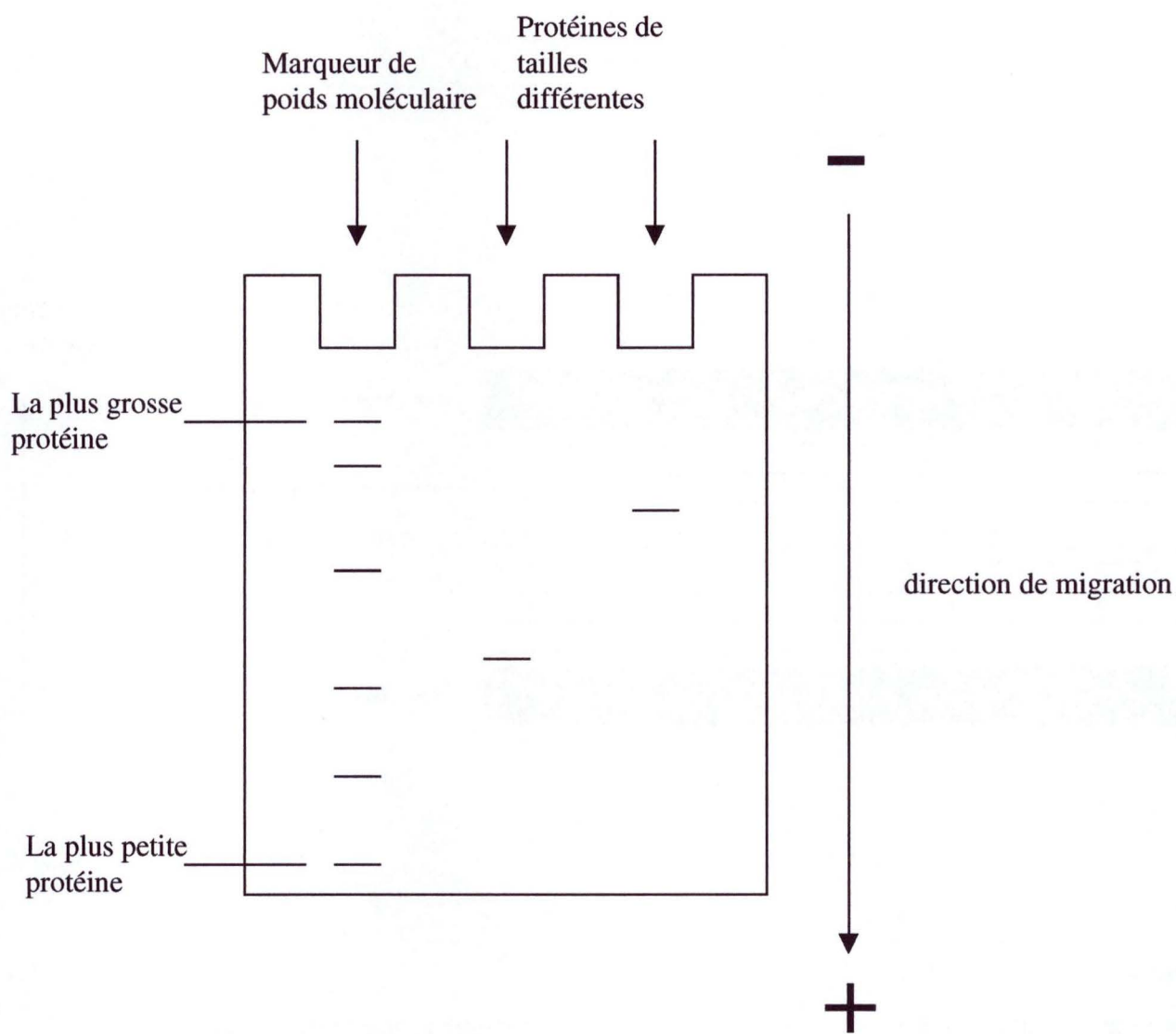
MM = 116,21 g.

Firme : MERCK.

## Le Stacking Gel

	6 ml
Eau	3,3 ml
29,2% Acrylamide/0,8% bis-Acrylamide	1 ml
0,5M Tris pH6,8	1,5 ml
SDS 10%	0,06 ml
APS 10%	0,06 ml
TEMED	0,006 ml

Placer le peigne entre les deux plaques de verre avant de couler le Stacking gel. Le couler à la P 1000 jusqu'à ce que le liquide arrive au sommet des puits. Laisser polymériser puis retirer lentement le peigne. Remplir les puits avec le tampon d'électrophorèse (SDS-PAGE buffer 1x).



**Figure 3:**

Schéma représentant la migration sur gel polyacrylamide, en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), de deux types de protéines ayant des tailles différentes. Les tailles des protéines d'intérêt peuvent être estimées par comparaison aux protéines de tailles connues du marqueur.

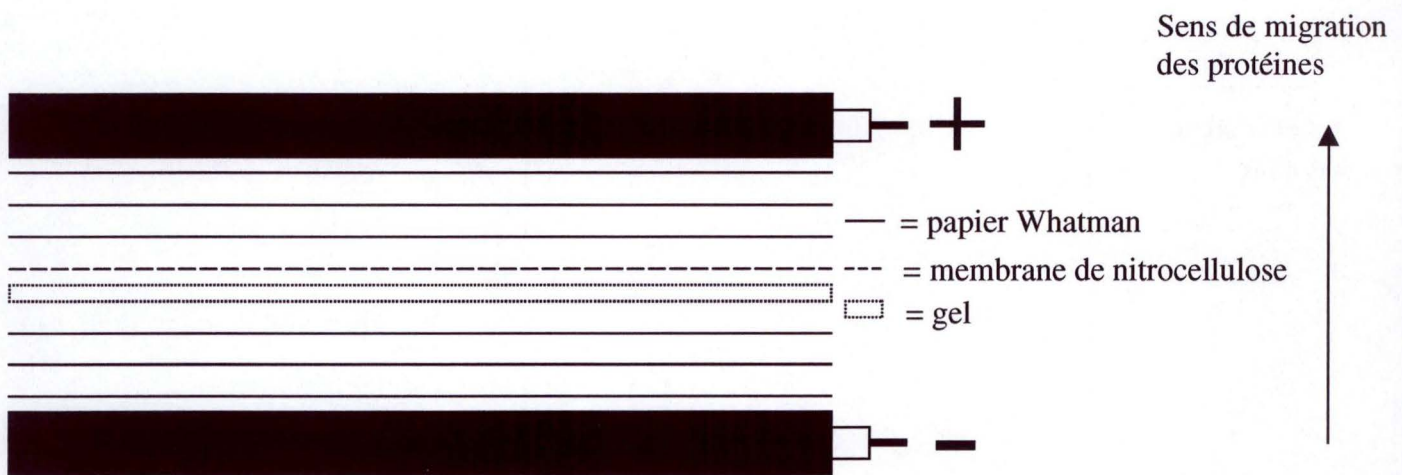


Figure 4:

Technique de transfert « semi-dry » basée sur le champ électrique produit entre deux électrodes.

Préparation des échantillons.

Le volume correspondant à la quantité de protéines à charger est fonction de la concentration en protéines de chacun des extraits. Il faut ajouter à ce volume un tampon de chargement protéique à base de glycérol dont la concentration-stock est 5x. On veillera à ce que le volume à charger dans les puits soit identique de sorte à assurer une migration équivalente dans toutes les pistes et ainsi éviter toute formation de « sourire ».

On charge les échantillons à la pipette Hamilton. Un puits est utilisé par un marqueur de poids moléculaire (Bio Rad prestained SDS-PAGE standards low range).

Tampon de chargement protéique 5X :

	10 ml
Glycérol	5 ml
$\beta$ -mercapto-éthanol	2,5 ml
SDS	1 g
Tris 312,5 mM pH6,8	3,125 ml d'une solution 1M
Bleu de Bromophénol	0,5 mg

Migration.

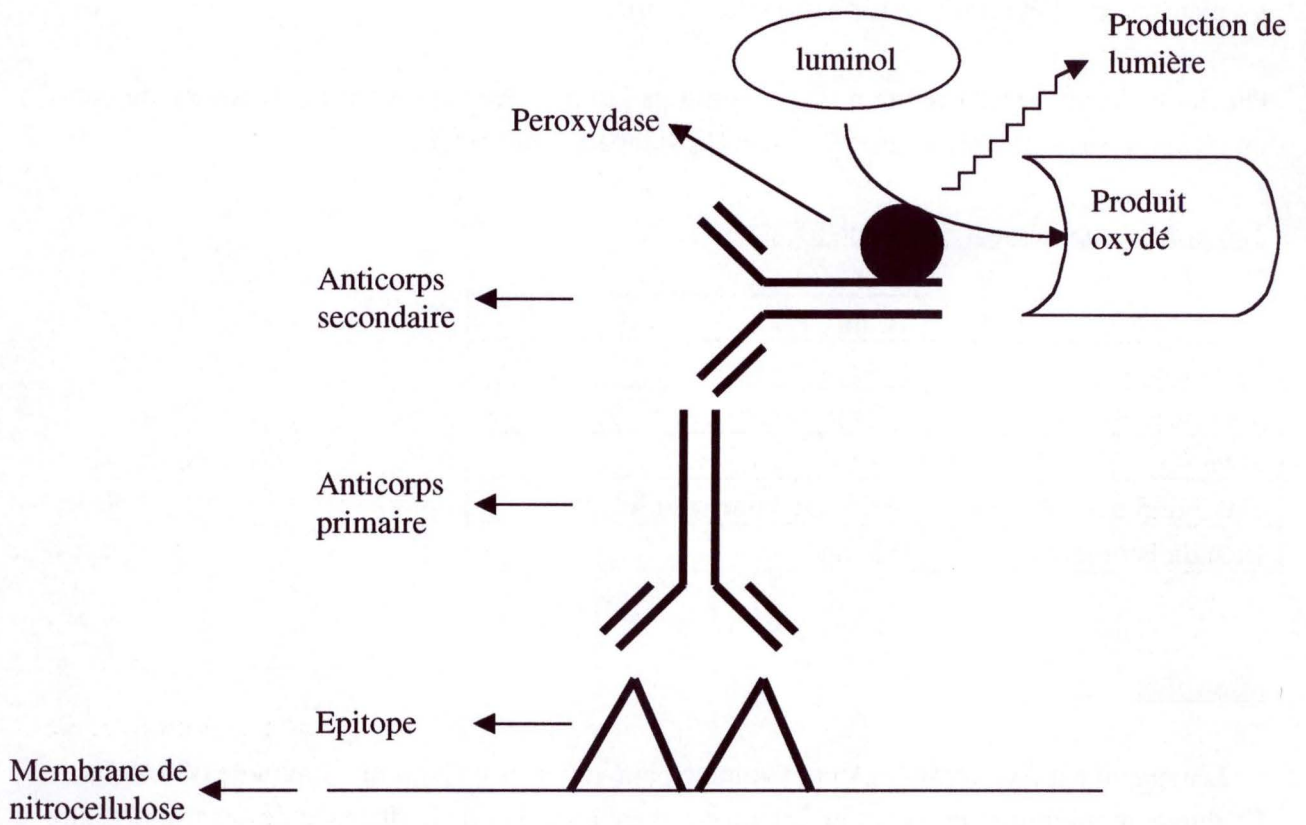
L'appareil est fixé sur 40 mA et le voltage peut varier jusqu'à un maximum de 600 Volts. La durée de migration est fonction du pourcentage du gel et de la distance de séparation entre les différentes protéines du marqueur protéique (voir figure 3).

**2.4. Transfert sur membrane de nitrocellulose (Western-blot).**

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est un transfert de type semi-dry. Ce type de transfert est schématisé à la figure 4.

On découpe une membrane de nitrocellulose ainsi que 6 papiers Whatman (1 mm d'épaisseur) aux dimensions de la partie du gel que l'on veut transférer. La membrane est humidifiée dans de l'eau distillée tandis que les papiers Whatman sont humidifiés dans le tampon de transfert. On place le tout dans l'appareil de transfert (Panther Semi-dry Electrobloetter, model HEP1 OWL).

Afin que le transfert des protéines soit optimal, l'ampérage doit varier entre 0,8 et 3 mA par  $\text{cm}^2$  de membrane de nitrocellulose. Le voltage doit varier entre 10 et maximum 14 V afin d'éviter de brûler les électrodes.



**Figure 5:**

Méthode de détection en deux étapes: un anticorps primaire spécifique à un épitope est reconnu par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Cette enzyme catalyse une réaction d'oxydation qui produit de la lumière.

La durée du transfert varie quant à elle entre 30 minutes et deux heures, en fonction de la taille des protéines à faire transférer (la vitesse de transfert des protéines dépend de leur poids moléculaire: plus le poids moléculaire est élevé, plus le transfert sera lent) et cette durée doit tenir compte de la thermorésistance des protéines.

Tampon de transfert :

	pour 1000 ml
Tris 48 mM	5,80 g
Glycine 39 mM	2,90 g
SDS 0,037%	0,37 g
Méthanol	200 ml
Eau distillée	porter à volume

Ensuite, la membrane est rincée dans de l'eau distillée.

La qualité du transfert ainsi que celle du chargement en protéines dans les différentes pistes peut être visualisée par une coloration aspécifique au rouge ponceau des protéines sur la membrane de nitrocellulose. Cette coloration s'effectue par simple immersion, pendant environ une minute, de la membrane dans le colorant, suivie immédiatement par des rinçages à l'eau distillée afin d'ôter l'excédent de colorant. Cette coloration est ensuite éliminée par un rinçage au PBS 1X.

Ponceau 1X :

Dissoudre 0,5g de Ponceau S dans 1 ml d'acide acétique glacial, amener à 100 ml avec de l'eau.

## **2.5. Immunodétection.**

Cette étape utilise une technique de révélation dite indirecte.

Un anticorps primaire reconnaît son épitope et s'y fixe. C'est la reconnaissance spécifique du substrat.

Un second anticorps est utilisé pour la révélation: il va reconnaître l'anticorps primaire et s'y fixer. Cet anticorps secondaire est conjugué à la peroxydase, une enzyme qui va catalyser une réaction produisant de la lumière qui sera captée sur un film autoradiographique.

La figure 5 représente très schématiquement l'immunodétection des protéines « taggées » par des anticorps primaires reconnaissant cet épitope. Des anticorps secondaires dirigés contre les anticorps primaires, les reconnaissent. Ils sont couplés à la peroxydase, une enzyme oxydant un substrat. Cette réaction permet un dégagement de lumière (voir paragraphe concernant la révélation).

Etape de « blocking ».

Avant de mettre en présence les anticorps primaires, une étape préliminaire consiste à saturer les sites non spécifiques de la membrane, pour éviter un bruit de fond important lors de la révélation. Par la suite, une réaction de compétition permettra un déplacement des protéines du lait, fixées de manière non spécifique, en faveur des anticorps primaires dirigés spécifiquement contre un épitope.

Pour cela, la membrane est incubée dans une solution de blocking pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation. Cette étape peut aussi se faire à 4°C pendant une nuit.

Solution de blocking (à préparer extemporanément):

	100 ml :
PBS 1X	10ml PBS10X
Tween 0,05%	50µl
Lait en poudre 5%	5 g

PBS 10X :

	1 l
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g

Mettre la solution à pH 7,6.

Enlever la solution de « blocking » et laver la membrane 3 x 10 minutes sous agitation dans du PBS-Tween 0,05%.

Mise en présence de l'anticorps primaire.

La concentration du réactif immunologique varie de 1 à 50 mg/ml, en fonction de l'affinité des immunoglobulines pour leur épitope. Pour une immunodétection, les anticorps sont dilués à une concentration de 1 à 50 µg/ml.

Mettre la membrane en présence de l'anticorps primaire dilué à la concentration recommandée par la firme dans une solution de PBS-Tween 0,05% sous agitation pendant une

heure. Récupérer la solution contenant les anticorps et laver 3 x 10 minutes la membrane avec la solution PBS-Tween sous agitation.

#### Mise en présence de l'anticorps secondaire.

Ces anticorps sont dirigés contre le domaine F(c) des anticorps primaires. Ceux qui sont le plus couramment utilisés sont dirigés contre des IgG murins ou de lapins.

Ils sont conjugués à la peroxydase, enzyme permettant un dégagement de lumière par l'oxydation d'un substrat peracide (le luminol) en un composé oxydé. L'émission de lumière est amplifiée par la présence d'agents chimiques comme les phénols, et maintenue plus longtemps.

Mettre la membrane en présence de l'anticorps secondaire à la dilution recommandée par la firme le commercialisant, sous agitation pendant une demi-heure. Laver 6 x 5 minutes la membrane avec la solution PBS-Tween 0,05% sous agitation.

#### Révélation.

La technique de détection utilise les réactifs ECL (Amersham Pharmacia Biotech) et se déroule en chambre noire.

La membrane est mise en présence d'un mélange en volume égal de deux solutions: S1 et S2. Ce volume est fonction de la surface à couvrir: surface en  $\text{cm}^2 \times 0,125$  ml.

Mélanger S1 et S2 et en recouvrir la membrane sur la face où les protéines ont été transférées. Incuber durant une minute.

Oter la solution de détection et placer la membrane recouverte d'un film plastique (type SaranWrap) dans une cassette de révélation, et exposer à un film autoradiographique pendant différentes durées en fonction de l'intensité du signal: 10 secondes, 30 secondes, 60 secondes, 5 minutes et 10 minutes.

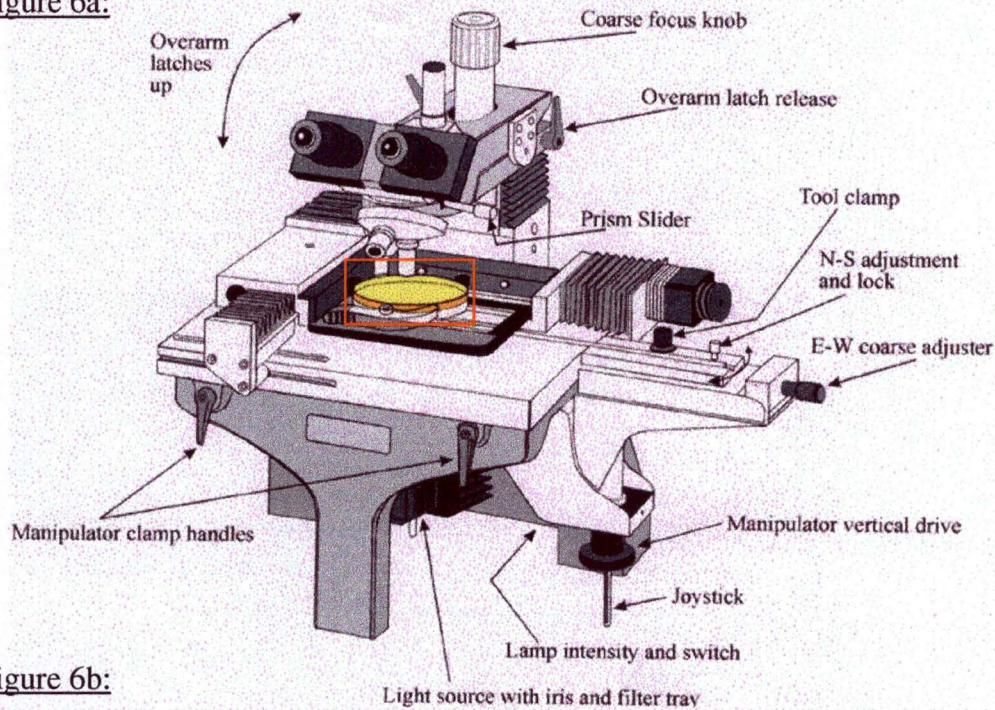
Il faut savoir qu'une fois S1 et S2 mélangées, l'activité maximale de la peroxydase a lieu une à cinq minutes après le mélange puis elle décroît en fonction du temps.

Révéler les bandes par un bain de révélateur: le film est plongé dans la cuve jusqu'à ce qu'apparaissent des bandes ou, le cas échéant, les bords de la membrane.

Ensuite rincer le film par un passage dans l'eau et enfin le passer une dizaine de secondes dans le fixateur. Rincer abondamment à l'eau et laisser sécher.

Garder la membrane pour positionner les bandes en fonction des puits chargés et pour renseigner de l'échelle de taille.

Figure 6a:



Vue agrandie de la position de l'aiguille sur la boîte de petri.

Figure 6b:

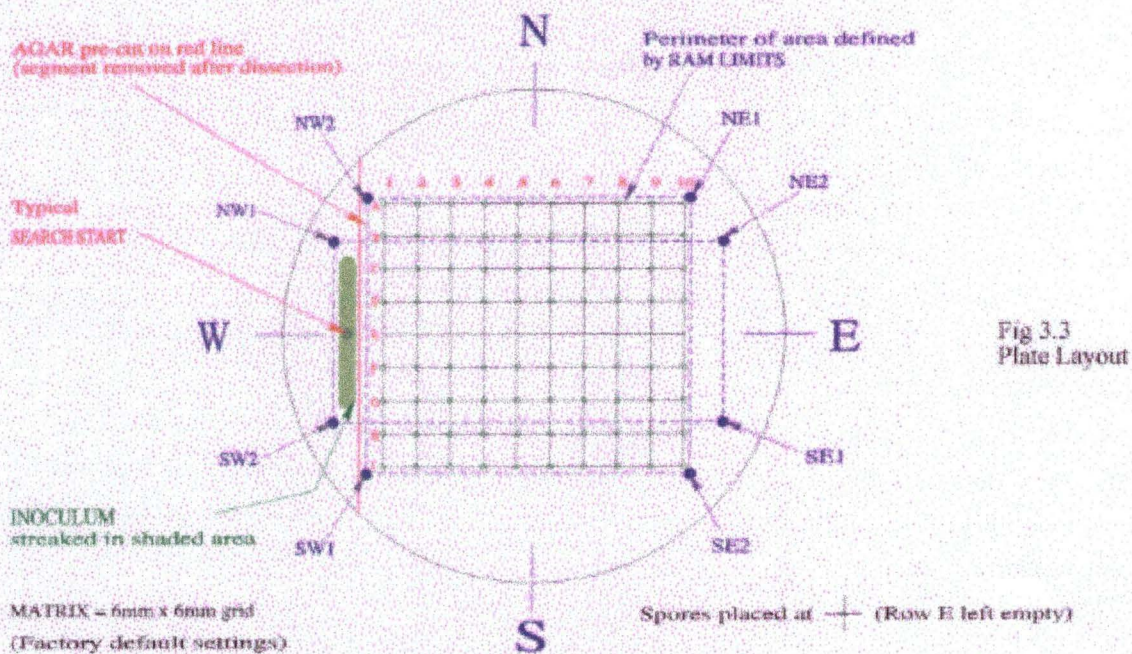


Fig 3.3 Plate Layout

Figure 6:

Représentation schématique du micromanipulateur.

Figure 6a:

Visualisation du micromanipulateur et plus précisément de la disposition de la boîte de dissection et de l'aiguille permettant de prélever et de séparer les spores d'une tétrade.

Figure 6b:

Les levures issues du croisement sont déposées sur un bord de la boîte de dissection (surface représentée en vert). Les tétrades sont déposées, à l'aide de l'aiguille, sur les colonnes et les quatre spores d'une même tétrade sont isolées selon les lignes.

Etape supplémentaire de « stripping ».

On peut effectuer plusieurs réactions d'immunodétection sur la même membrane, en utilisant des anticorps primaires différents. Pour cela, il faut « stripper », décrocher les anticorps primaires par une étape de dénaturation.

Incuber la membrane 30 minutes à 50°C en présence d'un tampon de « stripping ». La température et le temps du stripping peuvent être augmentés pour obtenir une stringence plus élevée.

Laver 2 x 15 minutes au PBS-Tween 0,05%, sous agitation et à température ambiante.

Recommencer l'étape de blocking.

Tampon de « stripping »:

	Pour 100 ml
Tris HCl pH 6,7 1,5 M	4,2 ml
$\beta$ -mercapto-éthanol 100 mM	710 $\mu$ l
SDS 10%	20 ml
eau distillée	porter à volume

**3. Technique relative à la dissection de diploïdes *S. pombe*.**

La levure *S. pombe* est un microorganisme préférentiellement haploïde. Des diploïdes peuvent être obtenus suite au croisement de deux haploïdes de signes sexuel opposé ( $h^+$  et  $h^-$ ). Le croisement de levure *S. pombe* s'effectue sur un milieu ME (pour Malt Extract) favorable à la conjugaison et à la sporulation.

La construction du diploïde requiert de partir de deux souches fraîchement striées. Au moyen d'une oëse de platine, nous strions en un patch de 1 cm<sup>2</sup> la première souche. Sur ce carré de un cm<sup>2</sup>, nous strions de manière similaire la deuxième souche. Afin d'optimiser le mélange de ces deux souches, une goutte d'eau stérile est déposée sur le cm<sup>2</sup> du mix et au moyen de la oëse de platine nous mélangeons les deux souches dans l'eau.

La boîte est placée dans l'étuve à 25°C.

Le croisement est suivi chaque jour, par observation au microscope optique, de façon à arrêter la croissance une fois que l'on voit apparaître les premières tétrades.

La dissection est effectuée sur milieu YE (pour Yeast Extract), un milieu riche permettant la germination des spores.

Les levures issues du croisement sont prélevées à l'aide d'une oëse de platine et déposées sous forme de lignes sur un des bords de la boîte de dissection. Celle-ci est ensuite placée sur le micromanipulateur (voir figure 6a). Le micromanipulateur divise la boîte de dissection en une grille dont les colonnes sont numérotées de un à dix et dont les lignes sont nommées de A à I (voir figure 6b). Les tétrades sont recherchées soit sur l'écran soit au niveau de l'optique du microscope qui offre un champ plus large. Les quatre spores d'une tétrade sont ensuite séparées à l'aide de l'aiguille du micromanipulateur et déposées en une colonne des lignes A à D ou F à I.

#### **4. Milieux de culture.**

##### Milieu riche :

Pour 200 ml de milieu YES (Yeast Extract Supplemented) liquide, 7 capsules de milieu fourni par la firme Polylab sont placées dans 200 ml d'eau distillée. Ce milieu doit être autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

Pour 400 ml de milieu YES solide, 14 capsules de milieu lyophilisé + 8 g d'agar sont placés dans 400 ml d'eau distillée.

Ce milieu doit être autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

##### Milieu riche supplémenté en généticine :

400 ml de milieu YES solide est préparé et autoclavé. Une fois que la bouteille peut-être prise en main, la généticine est ajoutée à une dilution 1000X. Pour 400 ml de milieu, 400 µl de généticine sont ajoutés.

##### Antibiotiques :

Le stock de généticine (G-418 sulphate, firme GibcoBRL)10% est gardé à - 20°C.

Généticine 10%: 1 g/10 ml d'eau distillée.

Stériliser par filtration sur un filtre Millipore 0,22 µm. Lors de son utilisation, cette solution 10% doit être diluée 1000X c'est à dire 400 µl de généticine 10% dans 400 ml de milieu riche YES.

##### Milieu minimum :

EMM (Edimburg Minimal Medium) est une poudre fournie par la firme Polylab dont la quantité à utiliser est de 32g/litre.

Pour 500 ml, on prend 16 g de EMM que l'on dissout dans 480 ml d'eau distillée.

Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Le milieu EMM est un milieu plus complexe que le milieu minimum de *Saccharomyces cerevisiae*. Il contient en plus, des vitamines, des sels minéraux, ... Il doit être complété par les acides aminés leucine, histidine, lysine et par les bases azotés adénine et uridine, suivant le génotype des souches utilisées.

	pour un litre	concentration finale
KH phthalate	3 g	14,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,2 g	15,5 mM
NH <sub>4</sub> Cl	5 g	93,5 mM
Glucose	20 g	111 mM
Salts stock 50X	20 ml	
Minerals stock (10000X)	0,1 ml	
Vitamins stock (1000X)	1 ml	

Pour un milieu solide, ajouter 20 g/l d'agar. Amener à un litre avec de l'eau distillée. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Milieu minimum sélectif pour un des marqueurs.

Composants à rajouter à la solution de base EMM :

Solutions stocks 100X ou 50X placées dans l'étuve à 30°C :

Leucine : 1,25 g/100 ml (50X) pour la souche *leu1-2*

Lysine : 0,175 g/100 ml (100X) pour la souche *lys1*

Histidine : 0,75 g/100 ml (100X) pour la souche *his*

Adénine : 0,375 g/100 ml (50X) pour la souche *ade6*

Uridine : 0,375 g/100 ml (100X) pour la souche *Δura4*

Bouteille :	200 ml	400 ml	500 ml
Leucine	4 ml	8 ml	10 ml
Lysine	2 ml	4 ml	5 ml
Histidine	2 ml	4 ml	5 ml
Adénine	4 ml	8 ml	10 ml
Uridine	2 ml	4 ml	5 ml

Pour un milieu sans leucine par exemple, il faut ajouter tous les éléments exception faite de la leucine.

**Milieu ME (Malt Extract) :**

Pour 400 ml de milieu :

Malt Extract : 12 g

Agar : 8 g.

Amener à 400 ml avec de l'eau distillée.

Autoclaver 20 minutes à 120°C.

**Milieu YE (Yeast Extract) solide :**

Pour 400 ml de culture :

Yeast Extract : 2 g

Glucose : 12 g

Agar : 8 g.

Amener à 400 ml avec de l'eau distillée.

Autoclaver 20 minutes à 120°C.

**5. Souches et plasmides.****5.1. Souches.**

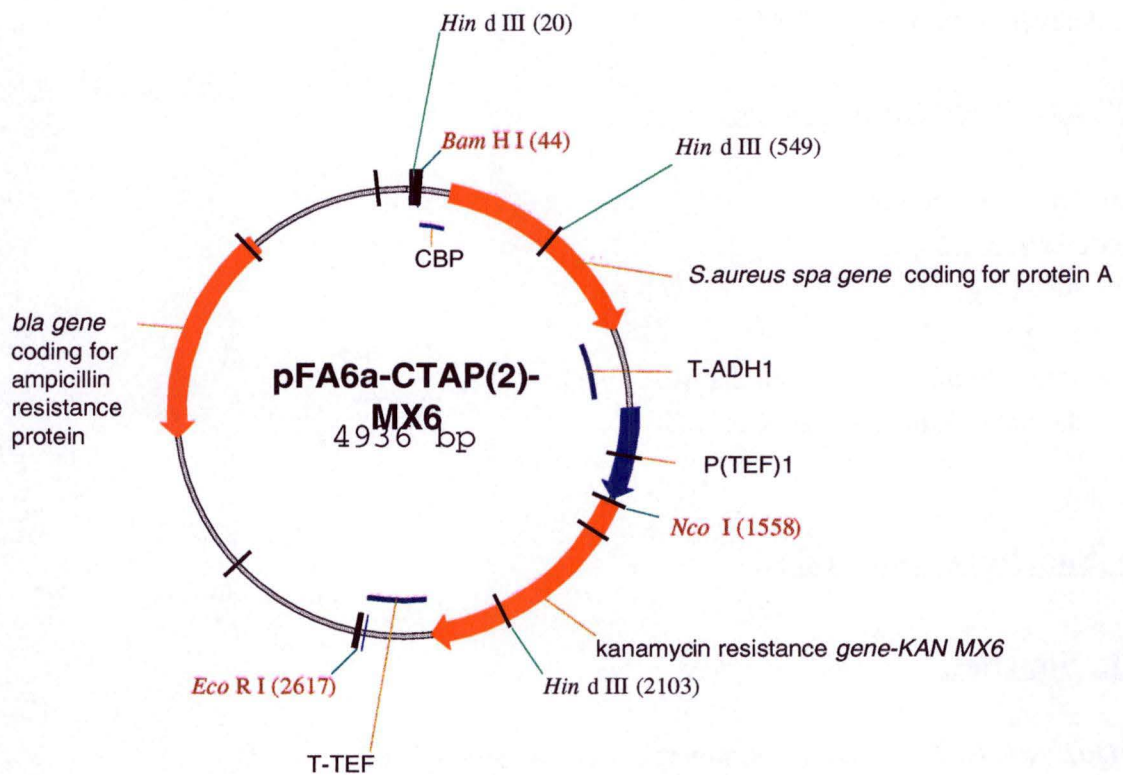
**SPQ01** : h+, *leu1-32* (souche commercialisée par Stratagène)

**TP48** : h-, *leu1-32*, *mts2-1* (souche construite par (Gordon *et al.*, 1993) et reçue de Tomi P. Mäkelä)

**TP49** : h-, *leu1-32*, *mts3-1* (souche construite par (Gordon *et al.*, 1996) et reçue de Tomi P. Mäkelä)

**SBI** : h-, *ade6-210*, *ura4Δ18*, *leu1-32*, *shp1* : *:shp1-3-KAN MX6*

Ces trois souches sont utilisées comme souches de départ pour l'intégration de la cassette TAP-KAN MX6 en fusion traductionnelle du côté C-terminal du gène *mcs6*.



**Figure 7:**

Représentation schématique du plasmide utilisé pour amplifier la cassette TAP-KAN MX6.

P-TEF/T-TEF: séquences promotrice et terminatrice du facteur d'élongation de la traduction  $1\alpha$  (TEF) de *Ashbya gossypii*.

T-ADH: séquence terminatrice de l'ADH (alcool déshydrogénase).

**GP126** : h+, *mcs2* : :*mcs2-3HA*, *ade6*-, *ura4Δ18*, *leu1-32* (souche construite par Molz and Beach, 1993 et reçue de Guillaume Cottarel).

**SB9** : h-, *mcs2* : :*mcs2-3HA*, *ade6-216*, *ura4Δ18*, *leu1-32*, *mts2-1*

**SB10** : h-, *mcs2* : :*mcs2-3HA*, *ade6-216*, *ura4Δ18*, *leu1-32*, *mts3-1*

**DH14** : h-, *mcs2-3HA*, *ade6*, *ura4Δ18*, *leu1-32*, *shp1-3-KAN MX6* (souche construite par Damien Hermand)

**DH21** : h+, *ade6-210*, *ura4Δ18*, *leu1-32*, *his3D1*, *pmh1* : : *pmh1TAP-KAN MX6* (souche construite par Damien Hermand)

**SB12** : h+, *ade6+*, *ura4Δ18*, *leu1-32*, *his3Δ1*, *pmh1* : : *pmh1TAP-KAN MX6*, *mts2-1*

**SB13** : h+, *ade6-210*, *ura4Δ18*, *leu1-32*, *his3Δ1*, *pmh1* : : *pmh1TAP-KAN MX6*, *mts3-1*

## **5.2. Plasmides.**

pFA6a-CTAP-MX6: ce plasmide a été construit par K. Gould (Tasto *et al.*, 2001) et reçu de D. Hermand. Il contient une cassette encodant le site de liaison aux IgG de la protéine A, un site reconnu par la protéase TEV et un domaine de liaison à la calmoduline. En aval de cette cassette, se trouve le gène encodant la résistance à la généticine (KAN MX6). La carte de ce plasmide est représentée à la figure 7.

Bibliographie

## **Bibliographie**

- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1996) *SKP1* connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, **86**, 263-274.
- Bamps, S. (1998) Clonage et séquençage du gène *Sp. Skp1* identifié comme interacteur potentiel du complexe Mop1p-Mcs2p en "double-hybride plus un". FUNDP, Namur.
- Bamps, S., Hermand, D., Tafforeau, L., Mäkelä, T.P. and Vandenhaute, J. (2002) Regulation of CAK complex by proteolysis in fission yeast. *Arch. Int. Physiol. Biochem. Biophys.*, **180**, sous presse.
- Beach, D., Durkacz, B. and Nurse, P. (1982) Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature*, **300**, 706-709.
- Benito, J., Martin-Castellanos, C. and Moreno, S. (1998) Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25Rum1 CDK inhibitor. *Embo J.*, **17**, 482-497.
- Booher, R. and Beach, D. (1986) Site-specific mutagenesis of *cdc2+*, a cell cycle control gene of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3523-3530.
- Booher, R. and Beach, D. (1987) Interaction between Cdc13 and Cdc2 in the control of mitosis in fission yeast; dissociation of the G1 and G2 roles of the Cdc2 protein kinase. *Embo J.*, **6**, 3441-3447.
- Botstein, D., Chervitz, S.A. and Cherry, J.M. (1997) Yeast as a model organism. *Science*, **277**, 1259-1260.
- Buck, V., Russell, P. and Millar, J.B. (1995) Identification of a cdk-activating kinase in fission yeast. *Embo J.*, **14**, 6173-6183.
- Chang, F. and Nurse, P. (1996) How fission yeast fission in the middle. *Cell*, **84**, 191-194.
- Ciechanover, A. (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, **79**, 13-21.
- Ciechanover, A. and Schwartz, A.L. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 2727-2730.
- Correa-Bordes, J., Gulli, M.P. and Nurse, P. (1997) p25Rum1 promotes proteolysis of the mitotic B-cyclin p56Cdc13 during G1 of the fission yeast cell cycle. *Embo J.*, **16**, 4657-4664.
- Correa-Bordes, J. and Nurse, P. (1995) p25Rum1 orders S phase and mitosis by acting as an inhibitor of the p34Cdc2 mitotic kinase. *Cell*, **83**, 1001-1009.
- Damagnez, V., Makela, T.P. and Cottarel, G. (1995) *Schizosaccharomyces pombe* Mop1-Mcs2 is related to mammalian CAK. *Embo J.*, **14**, 6164-6172.
- De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O. and Kim, S.H. (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, **363**, 595-602.
- Desai, D., Gu, Y. and Morgan, D.O. (1992) Activation of human cyclin-dependent kinases *in vitro*. *Mol. Biol. Cell.*, **3**, 571-582.

- Estojak, J., Brent, R. and Golemis, E.A. (1995) Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5820-5829.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Galan, J.M., Wiederkehr, A., Seol, J.H., Haguenaer-Tsapis, R., Deshaies, R.J., Riezman, H. and Peter, M. (2001) Skp1p and the F-box protein Rcy1p form a non-SCF complex involved in recycling of the SNARE Snc1p in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 3105-3117.
- Galan, J.M., Haguenaer-Tsapis, R., (1997) Ubiquitin Lys63 is involved in ubiquitination of yeast plasma membrane protein. *Embo J.*, **16**, 5847-5854.
- Geli, M.I. and Riezman, H. (1998) Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. *J. Cell Sci.*, **111**, 1031-1037.
- Glotzer, M., Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, **349**, 132-138.
- Gordon, C., McGurk, G., Dillon, P., Rosen, C. and Hastie, N.D. (1993) Defective mitosis due to a mutation in the gene for a fission yeast 26S protease subunit. *Nature*, **366**, 355-357.
- Gordon, C., McGurk, G., Wallace, M. and Hastie, N.D. (1996) A conditional lethal mutant in the fission yeast 26 S protease subunit *mts3+* is defective in metaphase to anaphase transition. *J. Biol. Chem.*, **271**, 5704-5711.
- Gould, K.L., Moreno, S., Owen, D.J., Sazer, S. and Nurse, P. (1991) Phosphorylation at Thr167 is required for *Schizosaccharomyces pombe* p34Cdc2 function. *Embo J.*, **10**, 3297-3309.
- Gu, Y., Rosenblatt, J. and Morgan, D.O. (1992) Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *Embo J.*, **11**, 3995-4005.
- Hartwell, L.H. (1974) *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol. Rev.*, **38**, 164-198.
- Hermand, D., Bamps, S., Mäkelä, T.P. and Vandenhaute, J. (1998a) Cloning of the *S.pombe* homologue of *ScSKP1* by a triple hybrid strategy. *Arch. Int. Physiol. Biochem. Biophys.*, **169**, B7.
- Hermand, D., Pihlak, A., Westerling, T., Damagnez, V., Vandenhaute, J., Cottarel, G. and Makela, T.P. (1998b) Fission yeast Csk1 is a CAK-activating kinase (CAKAK). *Embo J.*, **17**, 7230-7238.
- Hermand, D., Westerling, T., Pihlak, A., Thuret, J.Y., Vallenius, T., Tiainen, M., Vandenhaute, J., Cottarel, G., Mann, C. and Makela, T.P. (2001) Specificity of Cdk activation in vivo by the two Caks Mcs6 and Csk1 in fission yeast. *Embo J.*, **20**, 82-90.
- Hicke, L. (1997) Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. *Faseb J.*, **11**, 1215-1226.
- Hochstrasser, M. (1996a) Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell*, **84**, 813-815.
- Hochstrasser, M. (1996b) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 405-439.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S. and Howley, P.M. (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 5249.

- Hunt, T. (1989) Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **1**, 268-274.
- Hutchison, C. and Glover, D.M. (eds.) (1995) Cell cycle control. *IRL PRESS*, Oxford.
- Johnson, E.S., Bartel, B., Seufert, W. and Varshavsky, A. (1992) Ubiquitin as a degradation signal. *Embo J.*, **11**, 497-505.
- Kominami, K., Ochotorena, I. and Toda, T. (1998) Two F-box/WD-repeat proteins Pop1 and Pop2 form hetero- and homo- complexes together with cullin-1 in the fission yeast SCF (Skp1-Cullin-1-F-box) ubiquitin ligase. *Genes Cells*, **3**, 721-735.
- Kominami, K. and Toda, T. (1997) Fission yeast WD-repeat protein Pop1 regulates genome ploidy through ubiquitin-proteasome-mediated degradation of the CDK inhibitor Rum1 and the S-phase initiator Cdc18. *Genes Dev.*, **11**, 1548-1560.
- Krek, W. (1998) Proteolysis and the G1-S transition: the SCF connection. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**, 36-42.
- Lee, K.M., Saiz, J.E., Barton, W.A. and Fisher, R.P. (1999) Cdc2 activation in fission yeast depends on Mcs6 and Csk1, two partially redundant Cdk-activating kinases (CAKs). *Curr. Biol.*, **9**, 441-444.
- Lee, M.G. and Nurse, P. (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, **327**, 31-35.
- Lyapina, S., Cope, G., Shevchenko, A., Serino, G., Tsuge, T., Zhou, C., Wolf, D.A., Wei, N. and Deshaies, R.J. (2001) Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science*, **292**, 1382-1385.
- Molz, L. and Beach, D. (1993) Characterization of the fission yeast Mcs2 cyclin and its associated protein kinase activity. *Embo J.*, **12**, 1723-1732.
- Molz, L., Booher, R., Young, P. and Beach, D. (1989) *cdc2* and the regulation of mitosis: six interacting *mcs* genes. *Genetics*, **122**, 773-782.
- Moreno, S. and Nurse, P. (1994) Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the *rum1+* gene. *Nature*, **367**, 236-242.
- Morgan, D.O. (1996) The dynamics of cyclin dependent kinase structure. *Curr. Op. Cell Biology*, **8**, 767-772.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K. and Ichihara, A. (1992) Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature*, **360**, 597-599.
- Norbury, C. and Nurse, P. (1992) Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 441-470.
- Nurse, P. and Thuriaux, P. (1980) Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, **96**, 627-637.
- Peter, M. (1997) The regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Prog. Cell Cycle Res.*, **3**, 99-108.
- Peter, M. and Herskowitz, I. (1994) Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell*, **79**, 181-184.

- Peters, J.M. (1994) Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 377-382.
- Peters, J.M. (1999) Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Exp. Cell. Res.*, **248**, 339-349.
- Russell, P. and Nurse, P. (1986) *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*, **45**, 145-153.
- Russell, P. and Nurse, P. (1987) Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*, **49**, 559-567.
- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J. and Harper, J.W. (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*, **91**, 209-219.
- Solomon, M.J., Lee, T. and Kirschner, M.W. (1992) Role of phosphorylation in p34Cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol. Biol. Cell.*, **3**, 13-27.
- Sommer, T. and Wolf, D.H. (1997) Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *Faseb J.*, **11**, 1227-1233.
- Tasto, J.J., Carnahan, R.H., McDonald, W.H. and Gould, K.L. (2001) Vectors and gene targeting modules for tandem affinity purification in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **18**, 657-662.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. and Pickart, C.M. (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J.*, **19**, 94-102.
- Varshavsky, A. (1992) The N-end rule. *Cell*, **69**, 725-735.
- Westerling, T., Hermand, D. and Mäkelä, T.P. (2001) Cdk activation in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* : Specificity mediated by distinct CAK kinases. In Kaldis, P. (ed.) *The CDK-Activating Kinase*, pp. 1-9.
- Wolf, D.A., McKeon, F. and Jackson, P.K. (1999) F-box/WD-repeat proteins Pop1p and Sud1p/Pop2p form complexes that bind and direct the proteolysis of Cdc18p. *Curr. Biol.*, **9**, 373-376.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E.J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R.G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schafer, M., Muller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Fritz, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T.M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves,

S.J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S.M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V.A., garzon, A., Thode, G., Daga, R.R., Cruzado, L., Jiminez, J., Sanchez, M., del Rey, F., Benito, J., Dominguez, A., Revuelta, J.L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S.L., Cerrutti, L., Lowe, T., McCombie, W.R., Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G.V., Ussery, D., Barrell, B.G., Nurse, P. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, **415**, 871-880.

Yamano, H., Gannon, J. and Hunt, T. (1996) The role of proteolysis in cell cycle progression in *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J.*, **15**, 5268-5279.