



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Approche génétique du rôle du gène *ncs6* chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*

Bauer, Fanélie

Award date:
2007

[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.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des Sciences

**Approche génétique du rôle du gène *ncs6* chez la levure
*SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE***

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

Fanélie BAUER

Juin 2007

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 - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Approche génétique du rôle du gène *ncs6* chez la levure *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

BAUER Fanélie

Résumé

Les PAK kinases (p-21 activated kinases) jouent un rôle important dans la coordination entre le cytosquelette et l'entrée en mitose. Un crible de co-létalité avec la PAK Cla4 a identifié le gène *NCS6* (Needs CLA4 to Survive) chez *S. cerevisiae*.

Nous étudions l'homologue de *NCS6* chez la levure *S.pombe*. La purification de Ncs6 par TAP a permis d'isoler la protéine Ncs2 comme partenaire physique de Ncs6. La délétion de *ncs6*, *ncs2* ou le double délétant résulte en un phénotype thermosensible. Nous avons tenté de recréer l'interaction génétique entre *CLA4* et *NCS6* chez *S.pombe* mais aucune interaction entre les gènes encodant les PAK ou leurs régulateurs n'a été détectée chez *S. pombe*. Au contraire, la délétion de *ncs6* aggrave significativement les phénotypes associés à l'inactivation de *cdr2* et *cdc25* qui codent pour des activateurs de l'entrée en mitose, suggérant un rôle pour Ncs6 dans le contrôle mitotique.

Pour explorer cette voie, un crible de suppression multi-copie du phénotype thermosensible résultant de la délétion de *ncs6* a été conduit. Des inserts mitochondriaux, riches en ARNt ont été isolés comme supresseurs.

Une analyse *in silico* de Ncs6 révèle une forte conservation chez tous les eucaryotes et la présence d'un motif de type « P-loop » présent chez des thiolases d'ARNt bactériennes.

Ces données nous ont amené à poser l'hypothèse que Ncs6-Ncs2 serait une thiolase d'ARNt. Il a été proposé que l'absence de thiolation des ARNt affecte le décodage lors de la traduction qui pourrait expliquer le phénotype de la délétion de *ncs6* ou *ncs2*.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2007

Promoteur: J. Vandenhaute

*Il faut toujours connaître les
limites du possible. Pas pour
s'arrêter mais pour tenter
l'impossible dans les meilleures
conditions.*

R. Gary

Entre

Ce que je pense,

Ce que je veux écrire,

Ce que je crois écrire,

Ce que j'écris,

Ce que vous avez envie de lire,

Ce que vous croyez lire,

Ce que vous lisez,

Ce que vous avez envie de comprendre,

Ce que vous croyez comprendre,

Ce que vous comprenez,

Il y a dix possibilités qu'on ait des difficultés à communiquer.

Mais essayons quand même!

(d'après Bernard Werber, L'encyclopédie du savoir relatif et absolu)

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser un merci tout particulier au professeur Jean Vandenhoute pour m'avoir donné goût à la génétique, à la biologie et avoir façonné ma manière de penser au cours de ces quatre années d'étude ...

Je voudrais également remercier le docteur Damien Hermand pour m'avoir accueilli dans son équipe et m'avoir fait partager ses connaissances et son expérience avec enthousiasme.

Docteurs Patsy Renard, Didier Filopon, Catherine Lambert de Rouvroit et Sébastien Vankoningsloo :

Merci à vous, membres du jury qui allez prendre de votre temps pour lire ce mémoire. J'espère qu'il vous plaira et que vous serez aussi intéressés à sa lecture que je l'ai été à sa réalisation et à sa rédaction.

Je tiens également à remercier mes collègues GEMO :

Merci Monique en premier lieu pour ton savoir-faire, pour tes connaissances techniques sans limites, pour ton rire communicatif ... et pour beaucoup de choses encore ;

Merci Allan pour nos discussions et pour tes conseils sur les règles de stérilité !

Merci Max pour tes conseils de protocoles, pour tes choix judicieux en matière de sandwich, pour m'avoir accompagnée (et non pas guidée parce que ton sens de l'orientation laisse à désirer, tu l'as prouvé à Louvain-La-Neuve) tout au long de ma formation ...

Merci Damien Coudreuse, toi qui devais rester moins de temps que nous au labo et dont la présence aura finalement ponctué notre mémoire. Merci de nous avoir donné la perspective d'un « post-doc » sur la carrière de biologiste, merci pour tes conseils et tes encouragements...

Merci aussi aux autres mémorants : Julie pour ton caractère pas toujours facile à gérer mais qu'on aime comme ça, Mira pour ton 220V de tension !, Vaness' pour ta bonne humeur et ton accent carolo, Michaël pour ta non-présence, Charles pour ton « humour », Marie pour démontrer qu'on peut supporter quelqu'un comme Charles, Marie-Alice pour ta rigueur, Géra pour ton pétillant, Aurore pour ton bon boulot de déléguée. Un merci tout particulier à Milou pour ces quatre ans de TP côte à côte. Que de bons moments qui resteront gravés quelque part au fond de mon cerveau encombré !

A tous, bonne continuation dans la vie professionnelle autant que privée... Tiens, si on s'donnait rendez-vous dans dix ans... ? Même jour, même heure, mêmes pommes...

Last but not least : merci à mes parents sans qui je ne serais pas ici aujourd'hui (j'ai toujours rêvé de dire ça !!!) et à mon petit frère pour leur soutien pendant les nombreux blocus et pour leur correction (orthographique et non scientifique !) efficace de ce mémoire. Mais surtout pour tout le reste...

LISTE DES ABRÉVIATIONS COURANTES

	S. pombe	S. cerevisiae
Protéine	Ncs6	Ncs6p
Gène	<i>Ncs6</i>	<i>NCS6</i>

<i>S. pombe</i> ou Sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>S. cerevisiae</i> ou Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>C. elegans</i> ou Ce	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>H. sapiens</i> ou Hs	<i>Homo sapiens</i>
<i>A. thaliana</i> ou At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>D. melanogaster</i> ou Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>X. tropicalis</i> ou Xt	<i>Xenopus tropicalis</i>
<i>D. rerio</i> ou Dr	<i>Danio rerio</i>

ARNt	ARN de transfert
CBP	Calmoduline binding protein
<i>cdc</i>	Cell dependant cycle
CDK	Cyclin Dependant Kinase
DAPI	Diamidino-4',6-phénylindol-2 dichlorhydrate
dNTP	désoxyriboNucléoside 5' TriPhosphate
DO	Densité Optique
E value	Expected value
GFP	Green fluorescent protein
IgG	Immuno-globuline G
IP	Immuno-précipitation
Kan	Kanamycine
LC/MS	Liquid chromatography/ mass spectroscopy
Nat	Nourséothricine
Ncs6 Ncs2	Need CLA4 to survive
<i>nmt</i>	No message in thiamine
ORF	Open Reading Frame
PAK	P-21 Activated kinase
Phase M	Phase de Mitose
Phase S	Phase de Synthèse
Rpm	Rotations par minute
TAP	Tandem Affinity Purification
<i>yfg</i>	Your Favourite Gene

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	- 1 -
INTRODUCTION	- 4 -
A. Schizosaccharomyces pombe, un modèle d'étude	- 4 -
B. La génétique inverse comme méthode de travail	- 4 -
1. Mutations ponctuelles dirigées	- 5 -
2. Délétions du gène	- 6 -
3. Mutations ponctuelles aléatoires et allèles conditionnels	- 6 -
4. Surexpression de gènes	- 7 -
5. Gene silencing ou knock-down (ARNi)	- 7 -
C. Le gene d'intérêt : ncs6	- 8 -
D. Comparaisons de séquences protéiques de Ncs6	- 8 -
E. Identification de NCS6 chez S. cerevisiae	- 10 -
F. Le cycle cellulaire mitotique chez S. pombe	- 11 -
1. La régulation du complexe Cdc2-Cdc13	- 12 -
a) Wee1 et Cdc25 : kinase et phosphatase de la tyrosine 15 de Cdc2	- 12 -
b) Cdr1 et Cdr2 inhibent Wee1 par phosphorylation	- 13 -
c) Le rôle des PAKs dans le contrôle de Cdc2-Cdc13	- 14 -
RESULTATS	- 16 -
A. Recherche de partenaires physiques de Ncs6	- 16 -
1. TAP-Tagging de Ncs6	- 16 -
2. Co-immunoprécipitation de Ncs6 et Ncs2	- 17 -
3. Alignements Ncs6 et Ncs2	- 19 -
B. Surexpression de ncs6 et ncs2	- 20 -
1. Construction des simples mutants	- 20 -
a) Amplification d'un fragment linéaire à partir d'un plasmide	- 20 -
b) Intégration dans le génome de la levure	- 21 -
2. Croisement et double mutant	- 22 -
c) Types d'asques	- 22 -
d) Sélection des spores doubles mutantes	- 23 -
3. Analyse des souches de surexpression	- 24 -
C. Délétion de ncs6 et ncs2	- 25 -
1. Phénotype macroscopique et croissance	- 25 -
2. Phénotype de croissance en milieu liquide	- 27 -
3. Phénotype microscopique	- 28 -
D. Analyse de mutants coléaux avec ncs6::kanR	- 29 -
	- 1 -

E. Crible de létalité synthétique avec le délétant <i>nsc6</i>	- 31 -
F. Crible de suppresseurs du phénotype <i>ts</i> de <i>nsc6-ts</i>	- 32 -
1. Construction des <i>nsc6-ts</i>	- 32 -
2. Transformation de la banque génomique	- 32 -
3. Elimination des suppresseurs codant <i>nsc6</i>	- 33 -
4. Résultats du crible de suppression de <i>nsc6-ts</i>	- 33 -
a) Inserts mitochondriaux	- 34 -
b) Autres séquences obtenues	- 34 -
G. Etude in silico de Ncs6	- 35 -

DISCUSSIONS **- 37 -**

A. Rôle possible du complexe Ncs6-Ncs2 dans l'entrée en mitose:	- 37 -
1. Relation entre Ncs6 et Cdc25	- 37 -
2. Relation entre Ncs6 et Cdr2	- 38 -
B. Autres rôles possible du complexe Ncs6-Ncs2:	- 39 -
1. rôle de Ncs2p dans la thiolation des ARNt chez <i>S. cerevisiae</i>	- 39 -
2. Role de Ncs2/Ncs6 dans la thiolation des ARNt chez <i>S. POMBE</i>	- 39 -

CONCLUSION **- 40 -**

PERSPECTIVES **- 41 -**

A. Co-immunoprécipitation entre Ncs6 et ARNt	- 41 -
B. Liquid Chromatography / Mass Spectrosopy (LC/MS)	- 41 -
C. Gel APM	- 42 -

MATERIEL ET METHODES **- 43 -**

A. Souches utilisées	- 43 -
B. Extraction protéique	- 44 -
1. Préparation de protéines totales	- 44 -
2. Co-Immunoiprécipitation	- 44 -
a) Etape 1 : Lavage des cellules	- 44 -
b) Etape 2: Lyse des cellules et extraction des protéines solubles	- 44 -
c) Etape 4 : IP sur billes d'Agarose-IGg	- 44 -
d) Etape 5 : Lavages	- 45 -
3. Gel SDS-PAGE	- 45 -
a) Migration en gel d'acrylamide	- 45 -
b) Blotting 1/2 dry	- 46 -
c) Immunodétection	- 46 -
C. Coloration DAPI et Calcofluor	- 47 -
1. Préparer la solution stock de DAPI	- 47 -
2. Préparer la solution stock de CALCOfluor	- 47 -
3. Fixer les cellules #1	- 47 -

4. Fixer les cellules #2	- 48 -
5. Réhydrater les cellules	- 48 -
6. Coloration	- 48 -
D. PCR et électrophorèse sur gel d'agarose	- 48 -
1. PCR « gene targeting »	- 48 -
2. PCR sur colonie	- 49 -
3. QIAquick PCR purification Kit Protocole	- 50 -
E. Transformation de levures	- 50 -
F. Extraction d'ADN total	- 50 -
G. Génétique	- 51 -
1. Random spore analysis	- 51 -
2. Dissection de tétrades	- 51 -
H. Protocoles relatifs à E. coli	- 51 -
1. Préparation de cellules électrocompétentes et transformation par électroporation	- 51 -
2. Minipreparation d'ADN plasmidique	- 52 -
3. Création et caractéristiques de la banque d'ADN génomique	- 52 -
BIBLIOGRAPHIE	- 53 -

Introduction

INTRODUCTION	- 4 -
A. Schizosaccharomyces pombe, un modèle d'étude	- 4 -
B. La génétique inverse comme méthode de travail	- 4 -
1. Mutations ponctuelles dirigées	- 5 -
2. Délétions du gène	- 6 -
3. Mutations ponctuelles aléatoires et allèles conditionnels	- 6 -
4. Surexpression de gènes	- 7 -
5. Gene silencing ou knock-down (ARNi)	- 7 -
C. Le gene d'intérêt : ncs6	- 8 -
D. Comparaisons de séquences protéiques de Ncs6	- 8 -
E. Identification de NCS6 chez S. cerevisiae	- 10 -
F. Le cycle cellulaire mitotique chez S. pombe	- 11 -
1. La régulation du complexe Cdc2-Cdc13	- 12 -
a) Wee1 et Cdc25 : kinase et phosphatase de la tyrosine 15 de Cdc2	- 12 -
b) Cdr1 et Cdr2 inhibent Wee1 par phosphorylation	- 13 -
c) Le rôle des PAKs dans le contrôle de Cdc2-Cdc13	- 14 -

INTRODUCTION

A. SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE, UN MODELE D'ETUDE

Schizosaccharomyces pombe (*S. pombe*) est classée, dans le règne des mycètes, parmi les champignons ascomycètes c'est-à-dire capables de former des asques. Il a été démontré que *S. pombe* est aussi éloignée phylogénétiquement de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) que de *Homo sapiens* (Hedges, 2002). Dès lors, des « pathways » conservés chez *S. cerevisiae* et *S. pombe* ont toutes les chances de l'être également chez les eucaryotes supérieurs tels que l'homme.

La levure *S. pombe* a été isolée en 1893 par Lindner (Lindner, 1983) à partir de bières venant d'Afrique de l'est. La dénomination *Schizosaccharomyces* fait référence au mode de division par fission au contraire des levures bourgeonnantes comme *S. cerevisiae*.

Le fait que, chez *S. pombe*, la position dans le cycle cellulaire peut être directement déduite de la taille des cellules en a fait un modèle phare pour l'étude des mécanismes de la division cellulaire.

B. LA GENETIQUE INVERSE COMME METHODE DE TRAVAIL

Le propre de la génétique est l'étude de la fonction de gènes grâce à des organismes où cette fonction peut-être altérée. En génétique classique, les cellules sont traitées par des mutagènes pour introduire des mutations dans leur génome et l'on crible la population pour trouver des phénotypes intéressants. La génétique moléculaire permet ensuite de cloner le gène muté, et ce le plus souvent par complémentation.

La disponibilité de la séquence complète des génomes de nombreux organismes a permis l'émergence d'une génétique dite « inverse ». Ici au contraire de la génétique dite directe où on va du phénotype au génotype, la génétique inverse a comme point de départ la séquence ou le gène dont on déterminera ensuite la fonction. Dans ce but, la fonction du gène d'intérêt sera altérée, modifiée ou annulée et l'on observera alors le phénotype qui en découle. La génétique inverse permet de se poser une question biologique au delà des limites d'un seul organisme modèle. Comme nous le soulignons ci-dessus, la grande distance évolutive entre *S. pombe* et *S. cerevisiae* permet de distinguer les mécanismes fondamentaux, le plus souvent très conservés, des mécanismes plus spécifiques fortement divergents ou absents dans une autre espèce. *A fortiori*, étendre la comparaison à des organismes encore plus éloignés comme le nématode ou la drosophile enrichit d'autant l'étude. La séquence des génomes de ces

organismes modèles étant publiée, il est relativement aisé d'identifier la présence des orthologues du gène d'intérêt.

Dans une démarche de génétique inverse en levure, on peut interférer avec un gène de plusieurs manières, rapidement évoquées ci-après.

1. MUTATIONS PONCTUELLES DIRIGÉES

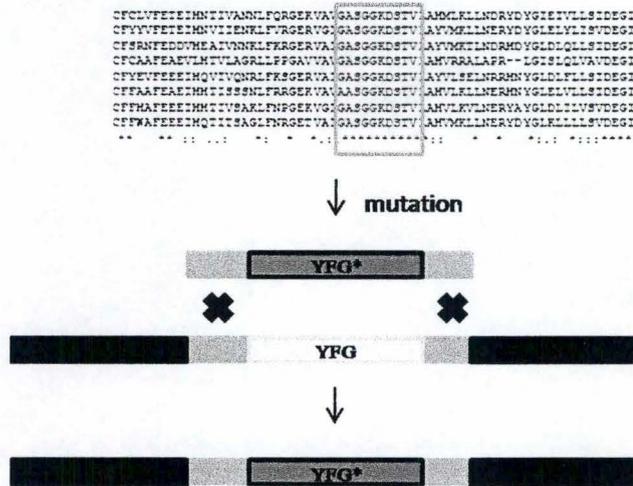


Figure 1 – Mutation ponctuelle dirigée de “Your Favorite Gene” et remplacement au locus de l’allèle sauvage par l’allèle muté.

La comparaison de séquence entre orthologues met en évidence des résidus conservés et une variabilité à d’autres positions. L’hypothèse la plus simple pour expliquer ce phénomène est que tous les acides aminés de la séquence primaire n’ont pas la même importance relative pour la conformation ou l’activité d’une protéine¹. Au cours de l’évolution, certains résidus ou certaines régions sont inaltérables et apparaissent comme des « boîtes » dans l’alignement. La mutation ponctuelle de ces résidus *in vitro* (le plus souvent par PCR) et le remplacement au locus de l’allèle sauvage par l’allèle muté est une méthode classique pour aborder cette question. En effet, on produit ainsi un mutant isogénique à la souche sauvage, hormis précisément la mutation ponctuelle générée.

¹ Notons que l’effet phénotypique est ici, par simplification, rapportée à la seule fonction de la protéine codée par une séquence d’ARNm donnée. Cependant la séquence d’un ARNm peut porter des mutations parfaitement neutres du point de vue de la séquence de la protéine codée mais qui modifient le phénotype pour diverses raisons (p.ex. la stabilité de l’ARNm, sa traductibilité, son interaction avec d’autres partenaires nucléiques ou protéiques) (Parmley et al. 2007)

2. DELETIONS DU GÈNE

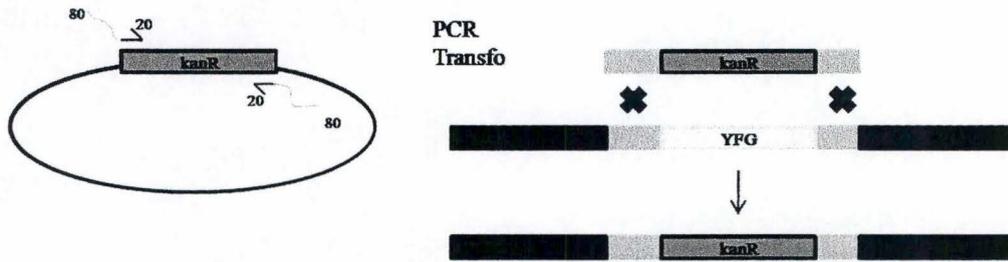


Figure 2 - Délétion de "Your Favorite Gene" par la méthode de remplacement de gène au locus. Une cassette de résistance à un antibiotique est amplifiée via des oligonucléotides introduisant des régions d'homologie correspondant à l'amont et l'aval du gène. Une transformation et une double recombinaison permettent le remplacement de l'ORF du gène par la cassette de résistance.

Une méthode plus brutale consiste à créer des allèles nuls du gène en remplaçant le gène d'intérêt par une cassette de résistance à un antibiotique, par exemple. Ce remplacement a lieu par transformation de la cassette marqueur bordée par des régions d'homologie avec le locus ciblé pour faciliter l'intégration par recombinaison homologue. Notons que cette méthode n'exige pas d'avoir cloné le gène d'intérêt au préalable. Des mutants « Knock Out » (KO) ont été réalisés pour chaque gène chez la levure *S. cerevisiae* (Giaever et al., 2002).

3. MUTATIONS PONCTUELLES ALEATOIRES ET ALLELES CONDITIONNELS

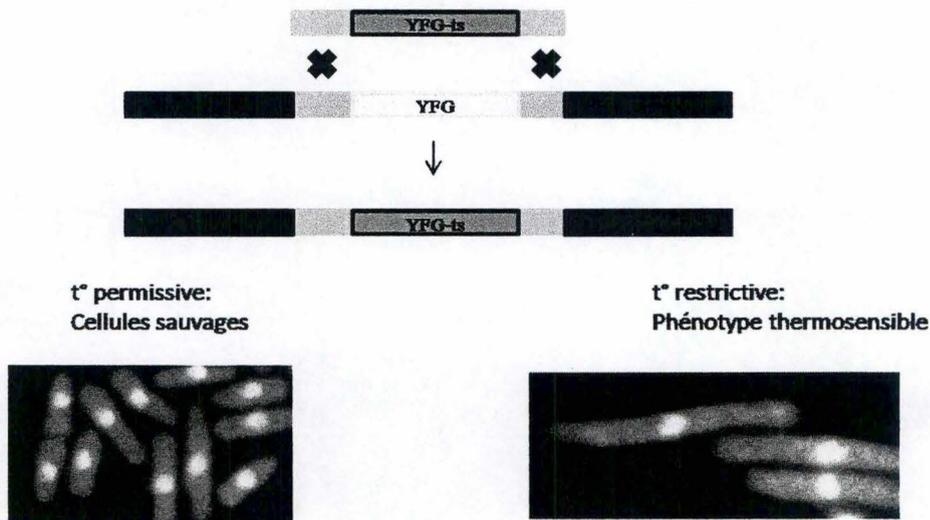


Figure 3 - Remplacement au locus de l'allèle sauvage par l'allèle thermosensible. Exemple de mutants *ts cdc* (cell division cycle). A gauche, à température permissive, les cellules ne sont pas affectées et sont de type sauvage, à droite, à température restrictive, la mutation fait son effet et les cellules sont allongées.

Grâce à des mutations ponctuelles aléatoires, on peut créer des allèles conditionnels. Ces allèles sont fonctionnels à une certaine température (le plus souvent 25°C, condition permissive) mais inactifs quand la température est élevée (le souvent à 37°C, condition

restrictive). On procède par amplification PCR de la phase ouverte de lecture dans des conditions mutagènes (en altérant le ratio des 4 dNTPs). La librairie d'allèles mutés est alors intégrée au locus et criblée *in vivo* pour le phénotype thermosensible.

4. SUREXPRESSON DE GENES

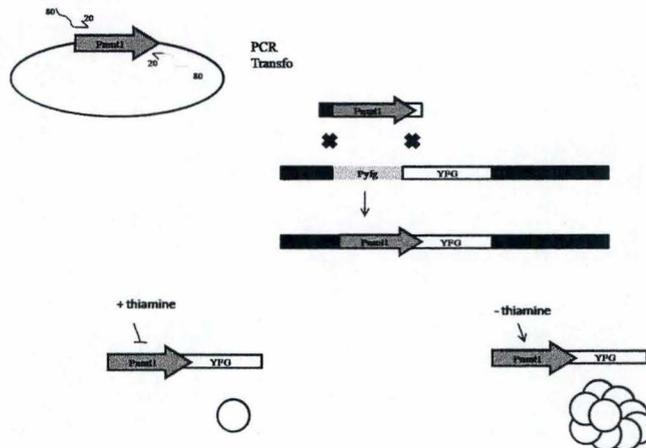


Figure 4 – Remplacement du promoteur de “Your Favorite Gene” (Pyfg) par le promoteur Pmnt1 répressible par la thiamine. En présence de cette vitamine, l’expression de YFG est basale tandis qu’en l’absence de thiamine, l’expression de YFG est fortement induite.

Il est en principe possible, chez tous les organismes modèles, de créer des souches où une protéine est surexprimée. Chez la levure, ces souches sont réalisées en remplaçant le promoteur endogène du gène par un promoteur régulable. Ces promoteurs sont chez *S. pombe* de type *nmt* (no message in thiamine). Le promoteur natif *nmt1* régule l’expression d’un gène qui intervient dans la voie de synthèse de la thiamine (Maundrell, 1990). Lorsqu’il n’y a pas de thiamine dans le milieu, la protéine codée est nécessaire et l’expression du gène qui la produit est fortement induite.

Comme la délétion, la surexpression modifie drastiquement le niveau de présence d’une protéine et permet donc d’étudier un phénotype potentiel. Cette surexpression peut, par exemple, modifier la dynamique d’un « pathway » métabolique ou entraîner la séquestration d’un partenaire ou encore rompre l’équilibre entre une protéine et son partenaire, permettant dès lors l’apparition de phénotypes particuliers causés par la présence anormale de la protéine à un moment ou elle devrait être dégradée.

5. GENE SILENCING OU KNOCK-DOWN (ARNi)

Chez les eucaryotes supérieurs où la recombinaison homologue est inefficace (*C. elegans*) ou plus difficile à mettre en place (souris, drosophile), on peut éteindre l’expression d’un gène par l’introduction ou la génération de petits ARNi dans l’organisme. Ceux-ci vont induire le « silencing » de l’ARNm transcrit à partir du gène d’intérêt. Le système est relativement facile à développer mais l’efficacité n’est pas toujours totale.

La liste de techniques de génétique inverse évoquée ci-dessus est loin d'être exhaustive.

C. LE GENE D'INTERET : *nsc6*

Lors d'un crible ARNi « genome wide » visant à identifier les gènes qui protègent le nématode *C. elegans* contre les mutations, 61 gènes ont été identifiés (Pothof et al., 2003) et regroupés en 5 grands groupes:

1. Gènes connus pour jouer dans la réplication et la réparation de l'ADN,
2. Gènes connus et impliqués dans le remodelage de la chromatine,
3. Gènes connus et impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire,
4. Gènes inconnus ayant des orthologues chez *S. cerevisiae*, *S. pombe* et *H. sapiens*
5. Gènes inconnus n'ayant pas d'orthologue chez d'autres espèces.

Le laboratoire étudie le gène F29C4.6 chez *C. elegans*. Ce gène, classé dans la quatrième catégorie possède des orthologues chez tous les eucaryotes analysés (voir plus loin). Les seules données disponibles concernent l'homologue présente chez *S. cerevisiae* (voir point E). Il est dénommé *NCS6* et pour la facilité, nous maintiendrons cette nomenclature dans la suite du travail.

Comme mentionné plus haut, l'étude d'orthologues dans des espèces éloignées est riche en enseignements sur la fonction d'un gène.

Lors de ce travail, nous avons élargi l'étude de *NCS6* à la levure *S. pombe*. Nous commencerons par analyser la séquence de la protéine Ncs6 et par récapituler les données disponibles chez *S. cerevisiae*.

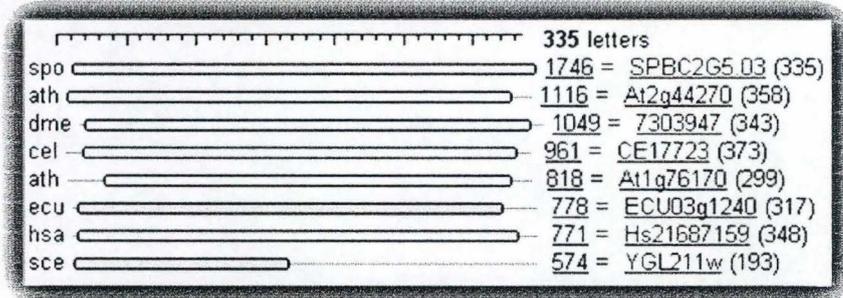
D. COMPARAISONS DE SEQUENCES PROTEIQUES DE *Ncs6*

L'algorithme BLAST (Altschul et al., 1990) permet d'identifier par une recherche d'homologie locale les orthologues de la protéine d'intérêt chez d'autres espèces. Une fois ces séquences obtenues, leur alignement multiple nous renseigne sur le taux de conservation de cette protéine au cours de l'évolution et sur la présence éventuelle de régions identiques ou très conservées entre homologues.

Un alignement multiple réalisé avec ClustalW (Thompson et al., 1994) entre les orthologues de Ncs6 chez différentes espèces eucaryotes modèles est présenté ci-après :

- ScNcs6, protéine Ncs6p chez *Saccharomyces cerevisiae*,
- SpNcs6, protéine Ncs6 chez *Schizosaccharomyces pombe*,
- CeNcs6, homologue de Ncs6 chez *Caenorhabditis elegans*,
- HsNcs6, homologue de Ncs6 chez *Homo sapiens*,
- AtNcs6, homologue de Ncs6 chez *Arabidopsis thaliana*,
- DmNcs6, homologue de Ncs6 chez *Drosophila melanogaster*,
- XtNcs6, homologue de Ncs6 chez *Xenopus tropicalis*,
- DrNcs6, homologue de Ncs6 chez *Danio rerio*.

Le site internet YOGY « Eukaryotic Orthology » confirme la présence de séquences apparentées à Ncs6 chez différents eucaryotes. On voit par exemple que le gène SPBC2G5.03 code la séquence présente chez *S.pombe*.



Pour certaines protéines, une prédiction de structure est proposée:

Espèce	Locus tag :	Fonctions prédites :
<i>Dosophila melanogaster</i>	Dmel_CG8078	This is a subfamily of Adenine nucleotide alpha hydrolases superfamily which includes N type ATP PPases and ATP sulphurylases. It forms a apha/beta/apha fold which binds to Adenosine group.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT1G76170	expressed protein, contains Pfam profile PF01171: PP-loop family
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT2G44270	expressed protein, contains Pfam profile PF01171: PP-loop family
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YGL211W	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	3D707	Predicted ATPase of the PP-loop superfamily implicated in cell cycle control; Cell division and chromosome partitioning; Amino acid transport and metabolism
<i>Caenorhabditis elegans</i>	F29C4.6	This is a subfamily of Adenine nucleotide alpha hydrolases superfamily which includes N type ATP PPases and ATP sulphurylases. It forms a apha/beta/apha fold which binds to Adenosine group.
<i>Homo sapiens</i>	ATPBD3	This is a subfamily of Adenine nucleotide alpha hydrolases superfamily which includes N type ATP PPases and ATP sulphurylases. It forms a apha/beta/apha fold which binds to Adenosine group.

Tableau 1 - Tableau regroupant les différents orthologues de Ncs6, le locus les codant et leur éventuelle fonction prédite.

Alignement multiple réalisé par ClustalW (Thompson et al., 1994)

```

ScNcs6p      MSFTAPSDPVNKPPTKVVSQLCELCHSRKALIRRPKNLSKLCQKQCFVLFETEIHNHTIVA
SpNcs6       -----MSNKLQCLNERRPALVRPKTGQKICKECFYVVFETEIHNVIIE
CeNcs6       -----MEKRRGPPPCQSGSGCSNPAKIRKAKDGAQLCGPCFSRNFFEDDVHEAIVN
HsNcs6       -----MPAPPCASCHAARAALRRPLSGQALCGACFCAAFEAFLHTVLA
AtNcs6       -----MEAKNKKAVASRLCCLNLRPVLKRPKTLQIQICRECFYEVFEEIHQVIVQ
DmNcs6       -----MHIICKSQCGNRAALKRPKTGDALCKECCFFAAFEAEIHTISS
XlNcs6       -----MPVNCSSCEERRAVLRPKTGHSLCKDCFFHAFEEIHTIVS
DrNcs6       -----MPVQCSNCEQKRAVLKRPKTGHSLCKDCFFWAFEEIHTITS
               .       . : : .       : * ** ** : : . :

ScNcs6p      NNLFQRGEKVAVGASGGKDVLAHMLKLLNDRYDYGIEIVLLSIDEGIIIGYRDDSLATV
SpNcs6       NKLFVRGERVIGASGGKDVLAAYVMKLLNERYDYGLEYLISVDEGIRYRDDSLDTV
CeNcs6       NKLFKRGERVAIGASGGKDVLAAYVMKTLNDRHDYGLDLQLLSIDEGIKGYRDDSLAV
HsNcs6       GRLLPPGAVVAVGASGGKDVLAHVRRALAPR--LGISLQLVAVDEGIGYRDAALAAV
AtNcs6       NRLFKSGERVAIGASGGKDVLAAYVLSLNRNRYGLDLFLLSIDEGITGYRDDSLAV
DmNcs6       SNLFRRGEKVAVGASGGKDVLAHVLLKLLNERNRYGLEYLISVDEGITGYRDDSLAV
XlNcs6       AKLFNPGKVGIGASGGKDVLAHVLLKLLNERYAYGLDLILVSVDEGISGYRDDSLAV

```

```

ScNcs6p      KRNQQQYGLPLEIFSFKDLVD-WTMDEIVSVAG----IRNSCTYCGVFRRQSLDRGAALK
SpNcs6       KRNQQQYGLPMKIVSYADLYDGWTMDNVVARIG----TKNNCTYCGVFRRQALDRAALS
CeNcs6       EKNRVEYGLPLTILSYRDLYG-WTMDDIVAKIG----KNNCTFCGVFRRQALDRGAFKI
HsNcs6       RRQAVRWELPLTVVAYEDLFGGWTMDAVARSTAGSGRSRSCCTFCGVLRRRALEEGARRV
AtNcs6       KRNEVQYGLPLKIVSYKDLVD-WTMDEIVKMG----LKNCTFCGVFRRQALDRGAALL
DmNcs6       KQNRDDYQMPKILSYEELYG-WTMDRIVAQIG----RSNNCTFCGVFRRQALDRGAKLL
XlNcs6       KRNQQQYELPLKIVSYQELYG-WTMDQIVKQVG----LKNCTFCGVFRRQALDRGAMML
DrNcs6       KRNQQQYELPLKIVSYEELYG-WTMDAIVKQVG----LKNCTFCGVFRRQALDRGAMML
              .: : : * : : : : * : . * * * * . . . * * * * * : * : * . :

ScNcs6p      GISHVVTGHNADDMAETVLMNLRGDVARLEKSTAIITQSSGS-PIKRSKPFKYSYQKEI
SpNcs6       DIHHLVTGHNADDIAETILMNLRLRGDVARLPRSTEITQSDSS-PTKRSKPFKYSYEKEI
CeNcs6       GATKLVGTGHNADDMAETLLMNVLRGDIARLERCTNIVTGEEGD--LPRAKPLKYCFERDI
HsNcs6       GATHIVTGHNADDMAETVLMNLRGDAGRLARGGGLGSPGEGG-ALPRCRPLQFASQKEV
AtNcs6       KVEKLVGTGHNADDIAETVLMNLRGDIARLSRCTSITTGEDG--PIPRCKPFKYTYEKEI
DmNcs6       GVDSIATGHNADDIAETVLMNLRGDTARLRRTSIRTGG-GEDTI PRVKPLKYSYEKEI
XlNcs6       GVNKICTGHNADDIAETVLMNLRGDIARLRRTSITTGSEG--AIPRCKPLKYAYEKEI
DrNcs6       NVDKICTGHNADDVAETVLMNLRGDIARLRCTAISTSSGEGDAIPRCKPLKYAYEKEI
              : * * * * * : * * * * * . * * : : : . * : * : : : : : :

ScNcs6p      VLYAHYMKLDYFSTECTYAPEAFRGTAREYMKNLAVRPSIIIDIIQSGENLALKAKKSN
SpNcs6       VLYAHYKLDYFSTECTYSPAEFRGTARAMIKOLENIRPSSILDIIYSGESMQLASS---
CeNcs6       VMYARTNQLEYFYTECIYAPNAYRGYARKYVRDLEKRVHPRALDLIRSGEKVSVKKE---
HsNcs6       VLYAHFRRLDYFSEECVYAPEAFRGHARDLLKRLAARPSAVLDLVHSAERLALAPA---
AtNcs6       VMYAYFKLDYFSTECIYSPNAYRGFAREFIKDLERIRPRAILDIKSGEDFRIATT---
DmNcs6       VMYAHYKLDYFSTECVFPNAYRGHARAFKDLKLEKVRPSVIMDIIYSGEQLRFKDT---
XlNcs6       VLYAYFKLDYFSTECIYSPNAYRGHARAFKDLAIRPSSIMDIIHSGENLSVKED---
DrNcs6       VLYAYFKLDYFSTECIYSPNAYRGHARAFKDLSEVRPSAIDVIHSGETLSVKEG---
              * : * * : * * * * * : * : * * * * * : : * * : * : : : * . .

ScNcs6p      AGKRVVFKVDGNRCARCGLSSNNICKACMLLEGLEKSRQVAIENDTSADGAALKLRLAL
SpNcs6       ---VQEQLPQQTTCERCYFISNNRICKACMLLEGLNKGITGLGLGSRDKTKKLSQIPAC
CeNcs6       -----VEMPTLKICERCYMTSQKLCACLLIEGLNTGNTDLGVRKSKSKKVTVEADEL
HsNcs6       -----ARPPRPAGACSRGALASRALCQACALLDGLNRGRPRLAIGKRRGLDEEATPGTP
AtNcs6       -----TKMPEQGTCERCGYISSQKWCACVLEGLNLRGLPKMGIGRPRGVNDHNETKK
DmNcs6       -----VKKPERGTCTRCGFVSSQPCACVLEGLNLRGLPKLIGKSKKGERMIAKQOQE
XlNcs6       -----VRMPVQGTCTRCGYISSQSLCKACVLEGLNLRGLPKLIGKHHKLLHKLKLSQEPL
DrNcs6       -----VKMPVQGTCSRGCYISSQALCKSCVLEGLNLRGLPKLIGKHHRLHGKILAQEPL
              . * * * * : * : * * * * : : * * : * : : : * . . : :

ScNcs6p      EKLSF-----
SpNcs6       AE-----
CeNcs6       NKEGCGSGGGGGCGCAGAEDAENEETRQLKDLQF
HsNcs6       GPARPPASKAVPTF-----
AtNcs6       PGSVAKSIESKQCGSLDF-----
DmNcs6       LALREANLVKNDF-----
XlNcs6       SEQEERKLVKAVDF-----
DrNcs6       TEQEERKLVKAVDF-----

```

Cet alignement révèle que les homologues de *NCS6* codent une protéine très conservée au cours de l'évolution. Plusieurs boîtes contenant des résidus identiques sont identifiables (« * » = résidu conservé – « : » et « . » = Résidus de structures proches)

E. IDENTIFICATION DE NCS6 CHEZ *S. CEREVISIAE*

Les PAK kinases (p21-activated kinases) constituent une large famille très conservée chez les eucaryotes. Ces kinases sont activées par la liaison des petites GTPases (p21) Cdc42 et Rac (Bokoch, 2003). Comme celle-ci, les PAKs jouent un rôle déterminant dans plusieurs aspects de la biologie de la cellule eucaryote mais c'est leur rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine et la polarité cellulaire qui est le mieux caractérisé (Miller and Johnson, 1994). Chez *S. cerevisiae*, deux kinases apparentées aux PAK (Ste20 et Cla4) sont activées par Cdc42 et jouent des rôles mal compris dans la polarisation du cytosquelette. La double délétion de *STE20* et *CLA4* est co-letale, ce qui suggère que ces deux kinases partagent au moins une fonction essentielle (Goehring et al., 2003). Dans le but d'identifier des cibles des PAKs, un

crible de létalité synthétique a été réalisé chez *S. cerevisiae* (Goehring et al., 2003). Ce crible a permis d'identifier plusieurs groupes de complémentation dénommés *NCS* pour « needs *CLA4* to survive ». Le clonage de *NCS6* a révélé son identité avec un gène non caractérisé *YGL211w*. Des analyses de séquences révèlent que *NCS6* code une protéine très apparentée à *F29C4.6* de *C. elegans*, protéine étudiée au laboratoire.

L'interaction génétique entre *NCS6* et le « pathway » PAK constitue le point de départ de notre travail. Dans les paragraphes qui suivent, nous allons décrire les relations existant entre les PAK kinases et la régulation du cycle cellulaire chez notre organisme modèle, la levure *S. pombe*.

F. LE CYCLE CELLULAIRE MITOTIQUE CHEZ *S. POMBE*

Comme on peut le voir sur la Figure 5 la levure *S. pombe* possède un cycle de vie haploïde mais peut, en cas de carence en azote, entamer un processus sexuel (conjugaison) qui est en général directement suivi par la méiose. Si la carence est levée, le zygote peut entrer en croissance végétative et le cycle est alors diploïde.

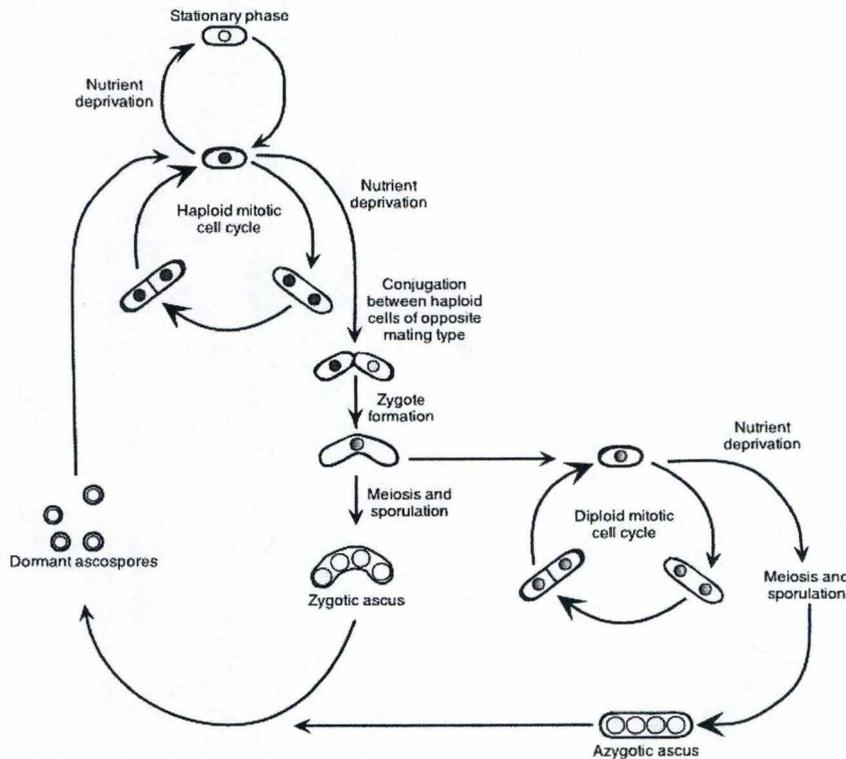


Figure 5 - Cycles haploïde et diploïde chez *S. pombe*.

Le cycle cellulaire est typiquement eucaryotique avec une séparation temporelle nette entre répliation (S) et ségrégation (M). La phase G1 est particulièrement courte et la presque totalité de l'augmentation de masse cellulaire a lieu en G2.

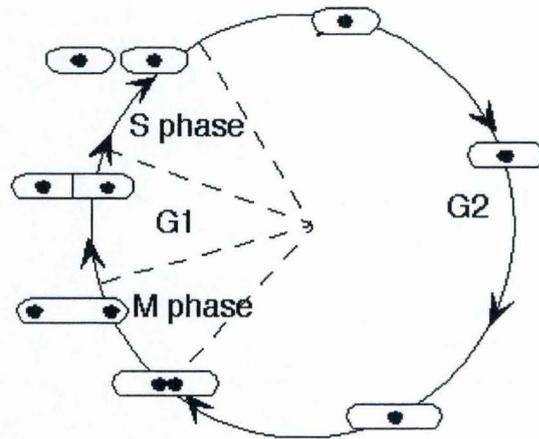


Figure 6 - Cycle cellulaire de *S. pombe* (d'après le site internet « PombeNet at the Forsburg Lab » (<http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/index.html>))

Les phases G1, S et G2 constituent l'interphase tandis que la phase M correspond à la mitose ou ségrégation des chromosomes. A la fin de la mitose, la cytokinèse sépare les deux cellules-filles.

Comme chez tous les eucaryotes, la régulation du passage d'une phase du cycle cellulaire à l'autre est contrôlée par des complexes protéiques composés d'une protéine-kinase dépendante des cyclines (cdk, pour *cyclin dependent kinase*) et de sa cycline associée. Ces kinases sont des enzymes qui catalysent le transfert du groupement phosphate γ de l'ATP sur le groupe hydroxyle d'un résidu sérine ou thréonine du substrat protéique (*sérine/thréonine kinases*). La phosphorylation de cibles spécifiques permet le passage en réplication ou en mitose.

S. pombe possède une Cdk essentielle pour le cycle nommée Cdc2. Elle interagit avec au moins 4 cyclines : Cig2, Cdc13, Cig1 et Puc1 (Fisher and Nurse, 1995). Le complexe Cdc2-Cdc13 joue un rôle décisif pour l'entrée en mitose : l'activation brutale de Cdc2-Cdc13 par déphosphorylation de la tyrosine 15 (voir plus loin) de Cdc2 est le détonateur d'une cascade qui contrôle la mitose ; ses substrats sont peu caractérisés.

1. LA REGULATION DU COMPLEXE Cdc2-Cdc13

Le complexe Cdc2-Cdc13 est principalement régulé par phosphorylations activatrice et inhibitrice. Nous nous limiterons ici à décrire la régulation de la phosphorylation inhibitrice de la tyrosine 15 de Cdc2.

A) Wee1 ET Cdc25 : KINASE ET PHOSPHATASE DE LA TYROSINE 15 DE Cdc2

Des études génétiques pionnières chez *S. pombe* ont démontré les rôles antagonistes de Wee1 et Cdc25 dans l'activation de Cdc2-Cdc13 (Russell and Nurse, 1987b). Ensuite, une analyse

biochimique a montré que Wee1 inhibait l'activité de Cdc2 en phosphorylant la tyrosine 15 localisée dans la poche liant l'ATP. Cdc25 fonctionne comme phosphatase du même résidu et donc comme activateur de Cdc2 (Russell and Nurse, 1987b), (Lundgren et al., 1991) et (Millar et al., 1992).

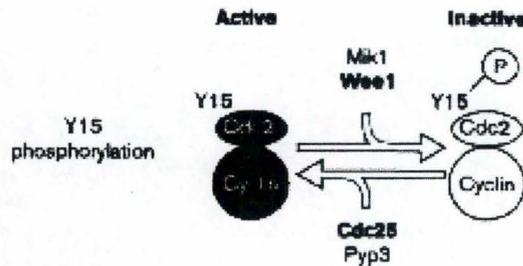


Figure 7 - Antagonisme de fonction entre la phosphatase Cdc25 (Pyp3) et la kinase Wee1 (Mik1)
(Lew and Kornbluth, 1996)

L'antagonisme entre *wee1* et *cdc25* se traduit par des relations génétiques entre mutants de ces gènes. La délétion de *wee1* supprime le phénotype létal des allèles thermosensibles de *cdc25* (*cdc25-22*) (Russell and Nurse, 1986), et la surexpression de *cdc25* en absence de *wee1* entraîne une catastrophe mitotique, c'est-à-dire une entrée précoce massive en mitose alors que la réplication n'est pas terminée. Au niveau phénotypique, l'inactivation de *wee1* donne des cellules plus petites car Cdc2 est activé « trop tôt » en G2, et celle de *cdc25* donne des cellules hyper-allongées qui continuent à croître sans entrer en mitose. Ces phénotypes correspondent à ce que l'on attend d'après les analyses génétique et biochimique.

B) Cdr1 ET Cdr2 INHIBENT Wee1 PAR PHOSPHORYLATION

Les changements nutritionnels sont capables d'influencer le déroulement du cycle pour permettre aux cellules d'adapter leur taux de croissance. On remarque, en effet, que les cellules qui poussent dans un milieu riche se divisent avec une taille cellulaire supérieure aux cellules croissant dans un milieu pauvre (Fantes and Nurse, 1977). Young et Fantes, (Young and Fantes, 1987) isolèrent des mutants (*cdr*) incapables de s'adapter à une carence en azote dans le milieu.

La disruption de *cdr1* retarde la mitose et permet aux cellules de passer plus de temps en G2 avant d'entrer en division menant à un phénotype de cellules allongées. Le gène *cdr1* code une sérine/thréonine kinase qui inhibe Wee1 par phosphorylation ; également identifié comme un suppresseur multi-copie du phénotype thermosensible de *cdc25-22* (Russell and Nurse, 1987a) le gène fut pour cette raison aussi nommé *nim1* (*new inducer of mitosis*).

Un second groupe de complémentation du crible de Young et Fantes (Young and Fantes, 1987) a été caractérisé. Il s'agit de *cdr2* qui code également une sérine/thréonine kinase, homologue à Cdr1, qui inhibe l'activité de Wee1 par phosphorylation (Kano and Russell, 1998).

Ni *cdr1* ni *cdr2* ne sont des gènes essentiels mais la délétion des deux crée un phénotype de cellules allongées, typique d'un défaut dans le contrôle de l'entrée en mitose. La surproduction de *cdr1* mime la délétion de *wee1* et la surproduction de *cdr2* génère des cellules branchées avec plusieurs septa (Breeding et al., 1998), ce qui suggère un rôle supplémentaire pour Cdr2 dans la cytokinèse. Ce rôle est indépendant de *wee1* car le phénotype de surexpression de *cdr2* est identique en l'absence de *wee1*.

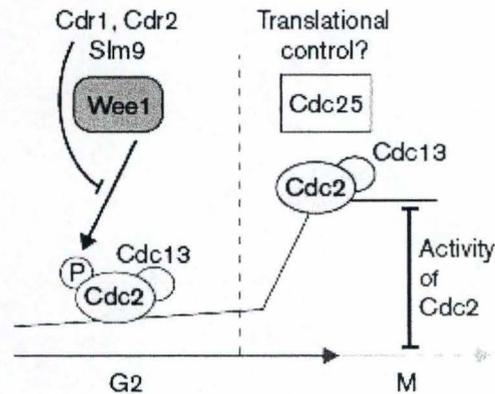


Figure 8 – Régulation de *Wee1* par *Cdr1* et *Cdr2* et intégration dans le contrôle de l'entrée en mitose chez *S. pombe* (Moser and Russell, 2000)

Dans le paragraphe suivant, nous intégrons le rôle des PAKs dans les modules de contrôle de l'entrée en mitose que nous venons de décrire.

C) LE RÔLE DES PAKS DANS LE CONTRÔLE DE Cdc2-Cdc13

Nous avons brièvement décrit au point E les fonctions cellulaires des PAKs Ste20 et Cla4 chez *S. cerevisiae*. Deux protéines apparentées à Ste20 et Cla4 existent chez *S. pombe* : Shk1 et Shk2. Au contraire de *S. cerevisiae* qui semble répartir une fonction essentielle sur les deux PAKs, chez *S. pombe*, Shk1 est essentielle pour la viabilité (Marcus et al., 1995) et Shk2 est largement redondante avec Shk1 et la délétion du gène *shk2* ne donne aucun phénotype (Yang et al., 1998). Comme pour les PAKs de *S. cerevisiae*, Shk1 est un effecteur critique de Cdc42 pour la localisation de l'actine et la polarité cellulaire (Qyang et al., 2002). Deux protéines, Skb1 et Skb5, sont des activateurs directs de Shk1 (Yang et al., 1999). Skb1 fonctionne comme inhibiteur de la mitose en activant Wee1 via Shk1 (Gilbreth et al., 1998). La PAK kinase Shk1 est donc directement impliquée dans le contrôle mitotique chez *S. pombe*. Par ailleurs, des données obtenues avec les homologues de ces protéines chez *S. cerevisiae* (non montrées sur la Figure 9) suggèrent un lien direct entre Skb1-Shk1 et Cdr1-Cdr2.

Un réseau d'interactions génétique et physique existe entre les différents composants que nous avons présentés sous forme modulaire: Cdc2-Cdc13, Wee1-Cdc25, Cdr1-Cdr2 et Shk1-Skb1-Skb5. Les relations entre ces modules sont encore mal comprises et différents cribles, dont le crible *NCS* chez *S. cerevisiae* (point E), ont visé à découvrir de nouveaux régulateurs de l'entrée en mitose. Le gène *NCS6*, objet de ce travail, en fait partie.

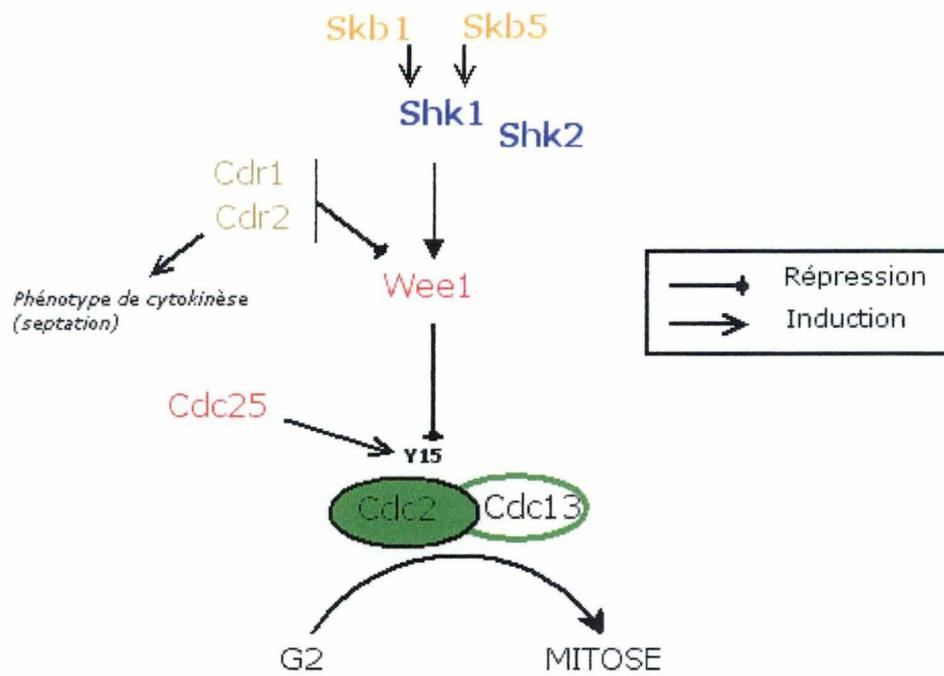


Figure 9 – Réseau avéré et simplifié des protéines entrant en jeu dans la régulation de l'entrée en mitose chez *S. pombe*.

Résultats

RESULTATS	- 16 -
A. Recherche de partenaires physiques de Ncs6	- 16 -
1. TAP-Tagging de Ncs6	- 16 -
2. Co-immunoprécipitation de Ncs6 et Ncs2	- 17 -
3. Alignements Ncs6 et Ncs2	- 19 -
B. Surexpression de ncs6 et ncs2	- 20 -
1. Construction des simples mutants	- 20 -
a) Amplification d'un fragment linéaire à partir d'un plasmide	- 20 -
b) Intégration dans le génome de la levure	- 21 -
2. Croisement et double mutant	- 22 -
c) Types d'asques	- 22 -
d) Sélection des spores doubles mutantes	- 23 -
3. Analyse des souches de surexpression	- 24 -
C. Délétion de ncs6 et ncs2	- 25 -
1. Phénotype macroscopique et croissance	- 25 -
2. Phénotype de croissance en milieu liquide	- 27 -
3. Phénotype microscopique	- 28 -
D. Analyse de mutants coléaux avec ncs6::kanR	- 29 -
E. Crible de létalité synthétique avec le délétant ncs6	- 31 -
F. Crible de suppresseurs du phénotype ts de ncs6-ts	- 32 -
1. Construction des <i>ncs6-ts</i>	- 32 -
2. Transformation de la banque génomique	- 32 -
3. Elimination des suppresseurs encodant <i>ncs6</i>	- 33 -
4. Résultats du crible de suppression de <i>ncs6-ts</i>	- 33 -
a) Inserts mitochondriaux	- 34 -
b) Autres Séquences obtenues	- 34 -
G. Etude in silico de Ncs6	- 35 -

RESULTATS

A. RECHERCHE DE PARTENAIRES PHYSIQUES DE *Ncs6*

L'identification de partenaires physiques d'une protéine permet le plus souvent de poser une hypothèse sur son rôle dans la cellule. La purification par affinité, couplée à la spectrométrie, est une méthode rapide et puissante pour identifier les différents composants d'un complexe protéique. Avant le début de ce travail, la méthode TAP (Tandem Affinity Purification, voir ci-dessous) a été appliquée à la protéine *Ncs6* chez *S. pombe* et nous commencerons par en présenter les résultats.

1. TAP-TAGGING DE *Ncs6*

Le « TAP-tag » est un domaine d'environ 20 kDa qui est fusionné le plus souvent en C-terminal à la protéine d'intérêt. Il est composé des éléments suivants:

- deux domaines de liaison aux IgG provenant de la protéine A de *Staphylococcus aureus*,
- un site de clivage spécifique de la TEV protéase contenant les acides aminés Glu-X-X-Tyr-X-Gln/Ser,
- le CBP (calmodulin binding peptide), un peptide présentant une affinité forte pour la calmoduline.

Le principe de la purification TAP est d'utiliser à la suite deux peptides non apparentés permettant une liaison d'affinité sur leur support spécifique : des billes de sépharose couplées aux IgG pour la protéine A et des billes de sépharose couplées à la calmoduline pour le CBP. Cette combinaison permet d'atteindre un excellent niveau de pureté du produit d'éluion.

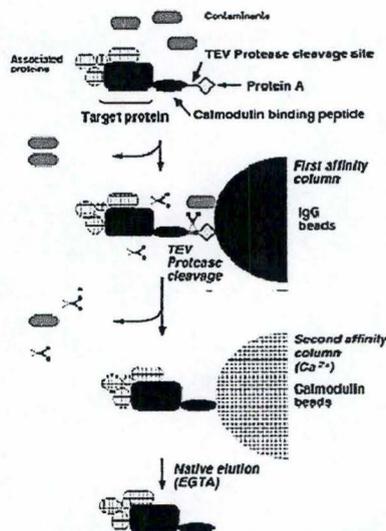


Figure 10 - Méthode du TAP-tagging (d'après Rigaut G. et al., 1999)

Le TAP-tag est introduit par recombinaison homologue d'un fragment PCR amplifié par des amorces spécifiques du locus *nsc6*. L'intégration dans le génome permet au tag d'être couplé traductionnellement à la protéine Ncs6 exprimée depuis le locus et le promoteur endogènes. La première étape de la « tandem affinity purification » est la lyse des cellules et le passage des lysats obtenus sur une colonne contenant des billes liées à des IgG ; les domaines de liaison aux IgG de la protéine A permettant une forte rétention de la protéine d'intérêt (et de ses partenaires potentiels) sur la colonne. Des lavages permettent d'éliminer les liaisons aspécifiques. L'éluion est assurée par clivage d'un site spécifique de la TEV protéase. Les fractions d'éluion passent ensuite sur une seconde colonne contenant des billes de calmoduline. En présence de Ca^{2+} , la CBP va lier la calmoduline. L'EGTA est utilisé pour l'éluion du produit final grâce à son action de chélateur du Ca^{2+} (Figure 10).

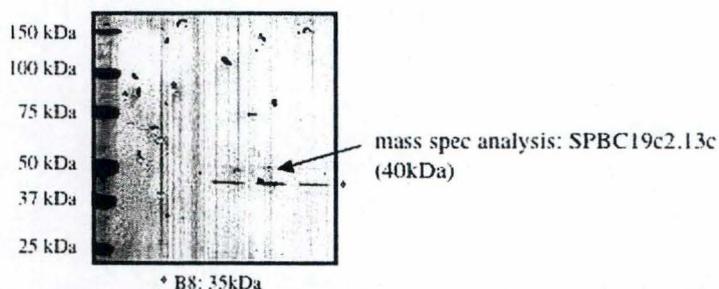


Figure 11 - Migration en Nu-PAGE et coloration à l'argent des 5 fractions d'éluion après purification de *Ncs6*. La bande correspondant à la protéine *Ncs6* (ici nommée B8) est marquée par un astérisque. Une seconde bande est marquée par une flèche et correspond à la protéine SPBC19c2.13c

L'ensemble des fractions d'éluion est alors séparé sur un gel dénaturant en gradient de type Nu-PAGE puis coloré à l'argent (Figure 11). Deux bandes visibles ont été isolées et identifiées par spectrométrie de masse comme étant *Ncs6* et SPBC19c2.13c

Une recherche d'homologie par BLAST a montré que SPBC19c2.13c était homologue à la protéine *Ncs2* de *S. cerevisiae* et nous la nommerons *Ncs2* chez *S. pombe* par la suite.

2. CO-IMMUNOPRECIPITATION DE *Ncs6* ET *Ncs2*

Bien que les gènes *NCS6* et *NCS2* aient été isolés lors du même criblage de co-létalité avec *CLA4* chez *S. cerevisiae* (voir introduction), aucune donnée d'interaction physique n'a été rapportée. Nous avons confirmé la présence d'un complexe *Ncs6-Ncs2* chez *S. pombe* par co-immunoprécipitation.

La technique de co-immunoprécipitation consiste en la précipitation d'une protéine taggée par des anticorps spécifiques de cette étiquette, anticorps couplés à des billes d'agarose. On peut ensuite détecter la co-précipitation d'une autre protéine par western blot. Le cas échéant, celle-ci est aussi fusionnée à un autre tag.

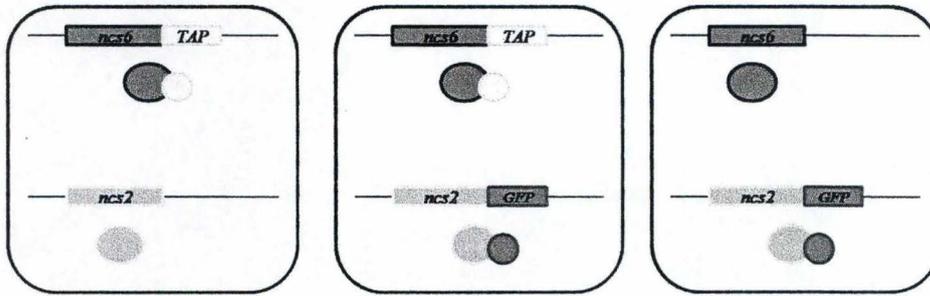


Figure 12 – Souches utilisées dans l'expérience de co-immunoprécipitation. Deux souches expriment une seule protéine taggée (Ncs6-TAP ou Ncs2-GFP) et la troisième exprime les deux protéines. Toutes les protéines sont exprimées depuis le locus et le promoteur endogènes.

Pour cette expérience, nous avons utilisé trois souches exprimant soit Ncs6 fusionnée au tag TAP (Ncs6-TAP), soit la protéine Ncs2 en fusion avec la GFP (Ncs2-GFP), soit une souche exprimant les deux protéines taggées.

Ces trois souches ont été cultivées à 32°C en culture liquide et environ 200×10^6 cellules ont été récoltées et lysées.

La co-immunoprécipitation a consisté en la précipitation de Ncs6-TAP par incubation avec des billes IgG-agarose. Après lavages, les protéines fixées aux billes ont été séparées sur SDS-PAGE. Un western-blot a permis de révéler ensuite la présence de Ncs6-TAP et de Ncs2-GFP (Figure 13)

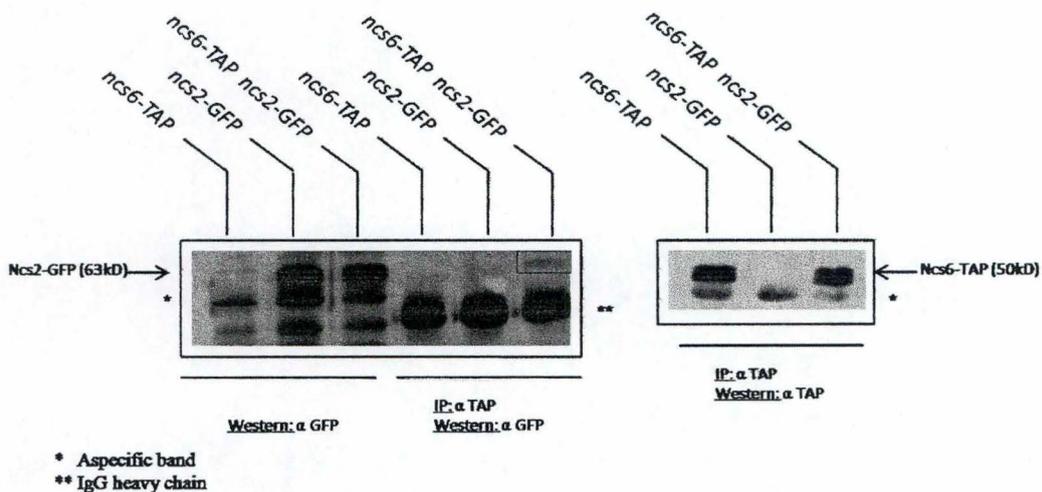


Figure 13 – Résultats de la co-immunoprécipitation.

Une détection sur les extraits solubles a confirmé que les trois souches utilisées exprimaient la protéine ou la combinaison attendue. La détection de Ncs6-TAP et Ncs2-GFP après précipitation de Ncs6-TAP établit que Ncs2-GFP est spécifiquement co-précipitée par Ncs6-TAP et qu'elle ne présente pas de liaison aspécifique sur les billes d'agarose. En conclusion, cette expérience confirme la présence d'un complexe soluble Ncs6- Ncs2 chez *S. pombe*.

B. SUREXPRESSON DE *Ncs6* ET *Ncs2*

Traditionnellement, l'analyse génétique passe par l'obtention de mutants de surexpression et de délétion. La modification drastique du niveau d'expression d'une protéine se traduisant par un phénotype qui permettra d'inférer la fonction perturbée. Dans un premier temps, nous avons généré des mutants de surexpression de *ncs6*, *ncs2* ou leur combinaison.

1. CONSTRUCTION DES SIMPLES MUTANTS

Pour ce faire, nous avons construit *de novo* des souches où *ncs6* et *ncs2* sont sous le contrôle du promoteur *nmt41*, un promoteur réprimé par la présence de thiamine.

Dans ce chapitre, nous détaillons la méthode générale de « gene targeting » chez *S. pombe* qui permet d'intégrer un fragment (à la résolution du nucléotide) à « virtuellement » n'importe quelle région du génome. Nous prendrons comme exemple la construction de la souche contenant *ncs6-TAP* sous le contrôle du promoteur *Pnmt41*. Les mêmes étapes ont été réalisées en parallèle pour *ncs2-3HA*.

La construction de la souche implique la sélection de l'intégration d'un fragment d'ADN grâce à un marqueur conférant le plus souvent la résistance à un antibiotique.

A) AMPLIFICATION D'UN FRAGMENT LINEAIRE A PARTIR D'UN PLASMIDE

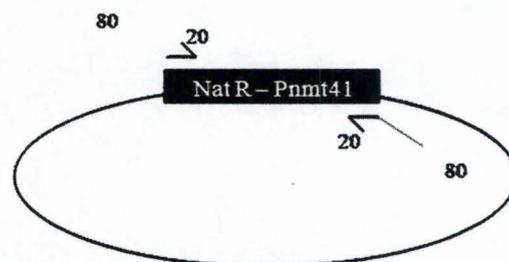


Figure 14 – Génération d'un fragment d'intégration bordé par des régions d'homologie avec le locus ciblé. Dans ce cas, le promoteur *nmt41* et le marqueur *NatR* conférant la résistance à la nouséothricine

La première étape (cfr Figure 14) consiste à amplifier un fragment linéaire contenant des séquences d'homologie avec la région du génome ciblée : le promoteur du gène *ncs6*. Pour ce faire, un plasmide contenant le promoteur *nmt41* précédé du marqueur de résistance à la nouséothricine (nommé dorénavant *natR*) est utilisé comme « template » pour une PCR. Un fragment linéaire de 2,5kb, contenant *natR* et *Pnmt41*, a été amplifié par PCR avec des amorces contenant une vingtaine de nucléotides complémentaires du fragment à amplifier et 80 nucléotides complémentaires de la région ciblée dans le génome. Cette amplification est réalisée avec la Taq « expand » (Roche) pour éviter d'introduire des mutations. Le fragment amplifié est purifié et séparé sur un gel d'agarose 1% pour l'authentifier (cfr Figure 15).

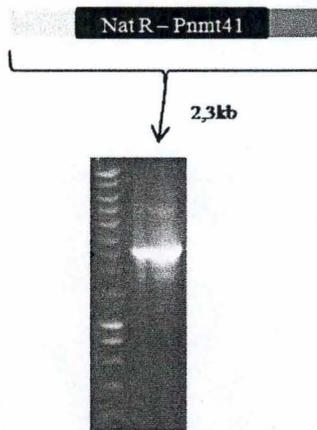


Figure 15 – Electrophorèse sur gel d'agarose 1% du fragment PCR généré

B) INTEGRATION DANS LE GENOME DE LA LEVURE

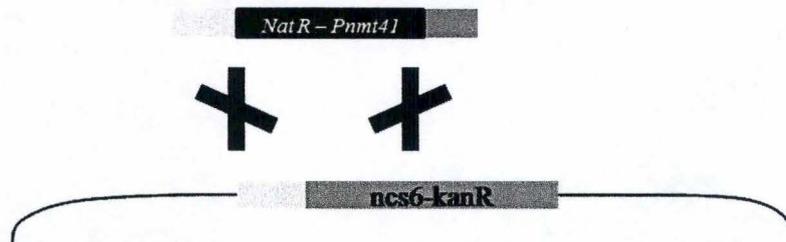


Figure 16 – Intégration du fragment PCR par recombinaison homologue après transformation

Après transformation dans la souche *ncs6-TAP* du fragment linéaire amplifié, les extrémités recombinogènes vont cibler son intégration en amont du gène *ncs6* et la résistance à la nourséothricine permettra de sélectionner les intégrants (Figure 16). Il en résulte le remplacement du promoteur endogène de *ncs6* par le *nmt41*.

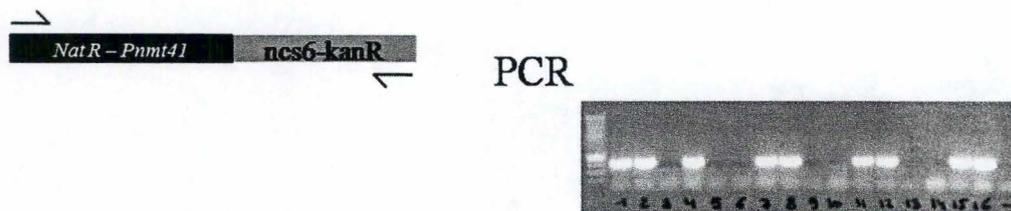


Figure 17 – Vérification par PCR de l'intégration au locus du fragment transformé.

Comme les clones qui poussent sur milieu sélectif n'ont pas toujours intégré le fragment au locus ciblé, une étape de vérification par PCR diagnostique utilisant une amorce « forward » dans *natR* et une amorce « reverse » en aval de la région de recombinaison est nécessaire (Figure 17). Elle est réalisée sur levure entière. Elle montre que 57% des clones testés ont le génotype recherché, à savoir *natR-Pnmt41-ncs6-TAP-kanR*. La même stratégie a été utilisée pour générer la souche *natR-Pnmt41-ncs2-3HA-kanR*.

2. CROISEMENT ET DOUBLE MUTANT

Une fois les deux mutants de surexpression obtenus, un croisement permet de générer le double mutant.

On doit s'assurer de choisir deux souches de « mating type » opposés soit *nmt41-ncs6-TAP li-* et *nmt41-ncs2-3HA li+*. Le croisement est réalisé en mélangeant les souches sur du milieu « Malt Extract » pauvre en azote. Ceci engendre une situation de carence propice à la formation d'un diploïde et à la méiose. Le mélange est gardé 2 jours à 25°C. Les cellules de « mating type » opposé, sous l'effet des phéromones de « mating » vont modifier leur morphologie pour fusionner et former un zygote. Si les conditions de carence sont maintenues, le zygote entame d'emblée la méiose (on parle de sporulation) et on voit apparaître, quelques heures plus tard, des asques contenant les 4 produits haploïdes. Ces 4 spores sécrètent un cocktail d'enzymes qui va digérer la paroi de l'asque et les libérer. La présence de l'asque maintient donc, pour un temps, les 4 produits de méiose ensemble, ce qui permet l'analyse de tétrades individuelles par micro-dissection. Les 4 spores disséquées forment 4 colonies et la ségrégation des marqueurs générée par recombinaison intra et inter-chromosomique pendant la méiose peut être analysée directement en répliquant les colonies sur des milieux adéquates supplémentés d'antibiotiques, permettant la sélection des spores portant la résistance à l'antibiotique, marqueur du « tag » associé au gène.

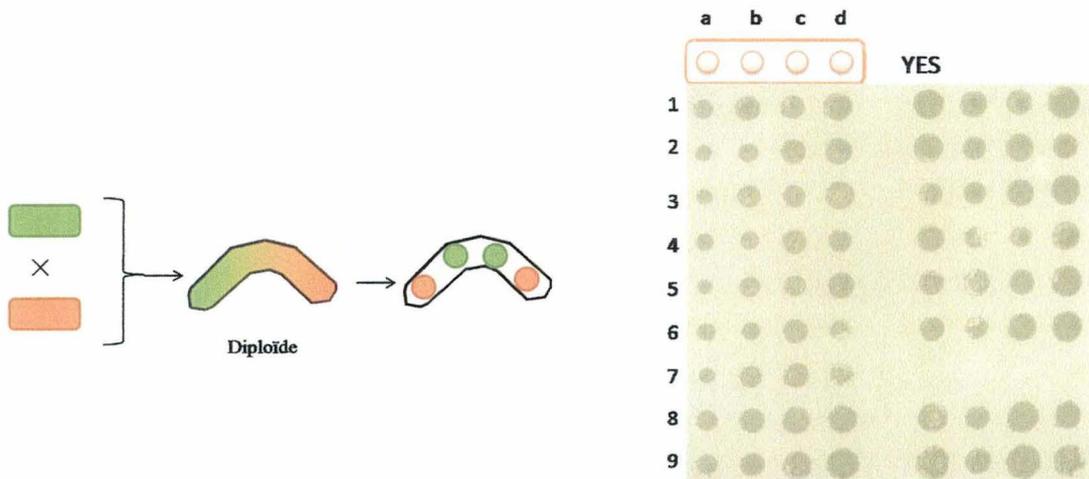


Figure 18 - Dissection de tétrades du croisement *nmt41-ncs6-TAP x nmt41-ncs2-3HA*. A gauche, représentation schématique du croisement de deux souches, du zygote puis de l'asque résultant du croisement. A droite, photo de la boîte de dissection, chaque ligne représente les 4 spores (a, b, c et d) disséquées d'une même tétrade.

C) TYPES D'ASQUES

Les loci *nmt41-ncs6-TAP* et *nmt41-ncs2-3HA* sont localisés sur le chromosome II. Les quatre spores produites par la méiose peuvent être de différents types en fonction du nombre de crossing-over ayant eu lieu pendant la méiose. Ces 4 spores formeront alors différents types d'asques : ditype parental, non parental ou tétratype.

En l'absence de crossing over, *nmt41-ncs6-TAP* restera lié à *ncs2* et *nmt41-ncs2-3HA* à *ncs6*. En conséquence, les spores produites seront identiques aux souches parentales et on parlera de ditype parental. Si un crossing-over se produit entre les loci concernés, l'asque contiendra

deux spores recombinantes, c'est à dire correspondant à des combinaisons inédites, on parle de tétratype. Si un double crossing-over entre les 4 brins de l'ADN a lieu, on parle de ditype non parental car les quatre spores sont recombinantes. Ces possibilités sont détaillées dans le tableau suivant :

Nombre de crossing-over	Milieu sélectif Kan / Nat	Schéma	Génotype des spores :
0	Ditype parental 		<i>nmt41-ncs6-TAP</i> <i>ncs2</i>
			<i>nmt41-ncs6-TAP</i> <i>ncs2</i>
			<i>ncs6</i> <i>nmt41-ncs2-3HA</i>
			<i>ncs6</i> <i>nmt41-ncs2-3HA</i>
1	Tétratype 		<i>nmt41-ncs6-TAP</i> <i>nmt41-ncs2-3HA</i>
			<i>ncs6</i> <i>ncs2</i>
			<i>nmt41-ncs6-TAP</i> <i>ncs2</i>
			<i>ncs6</i> <i>nmt41-ncs2-3HA</i>
2	Ditype parental 		<i>nmt41-ncs6-TAP</i> <i>ncs2</i>
			<i>nmt41-ncs6-TAP</i> <i>ncs2</i>
			<i>ncs6</i> <i>nmt41-ncs2-3HA</i>
			<i>ncs6</i> <i>nmt41-ncs2-3HA</i>
	Tétratype 		<i>nmt41-ncs6-TAP</i> <i>nmt41-ncs2-3HA</i>
			<i>ncs6</i> <i>ncs2</i>
			<i>nmt41-ncs6-TAP</i> <i>ncs2</i>
			<i>ncs6</i> <i>nmt41-ncs2-3HA</i>
	Ditype non-parental 		<i>nmt41-ncs6-TAP</i> <i>nmt41-ncs2-3HA</i>
			<i>ncs6</i> <i>ncs2</i>
			<i>nmt41-ncs6-TAP</i> <i>nmt41-ncs2-3HA</i>
			<i>ncs6</i> <i>ncs2</i>

Tableau 2 – Image des différents types d'asques et de leur génotype en fonction du nombre de crossing-over.

D) SELECTION DES SPORES DOUBLES MUTANTES

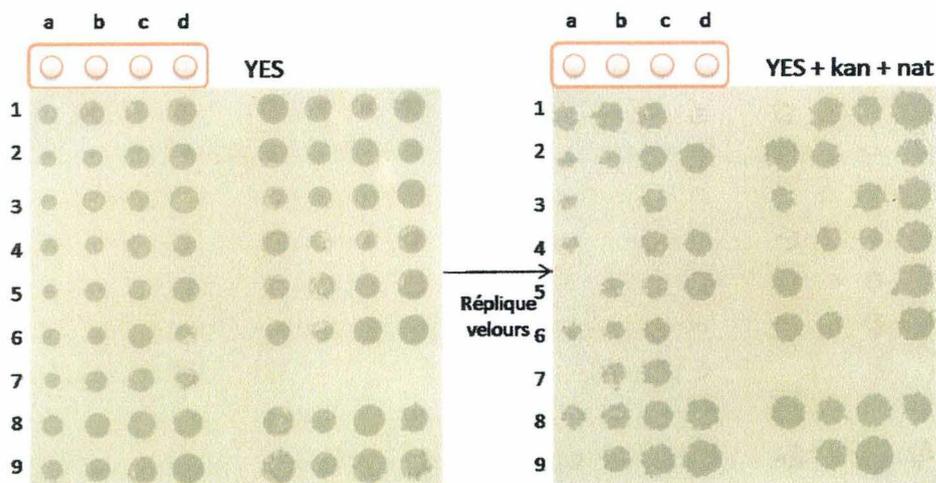


Figure 19 – Réplique sur milieu sélectif de la dissection du croisement *nmt41-ncs6-TAP* x *nmt41-ncs2-3HA*. A gauche, boîte de dissection sur milieu riche, à droite réplique velours sur milieu sélectif.

La sélection se fait sur milieu sélectif contenant de la kanamycine (Kan) et de la nouséothricine (Nat) pour permettre de sélectionner les spores contenant *nmt41* (et par conséquent *natR*) ainsi que celles contenant *ncs6-TAP* ou *ncs2-3HA* (et donc *kanR*). Notons que la double sélection n'est pas indispensable dans ce cas puisque les spores qui possèdent *nmt41* contiennent forcément *ncs2-3HA* ou *ncs6-TAP*, puisque la probabilité qu'un crossing-over ait eu lieu entre le promoteur et la phase de lecture est infime.

Après réplique sur milieu sélectif, on peut identifier le type de tétrade. Les ditypes parentaux sont les plus intéressants car ils identifient directement les spores double-recombinantes qui nous intéressent.

3. ANALYSE DES SOUCHES DE SUREXPRESSIION

Nous avons testé les niveaux d'expression des mutants de surexpression par western blot anti-TAP puis anti-HA. Les souches ont été cultivées en milieu minimum liquide à 32°C en présence de 5µg/mL de thiamine puis la culture a été divisée en deux pour être cultivée en absence (induction du promoteur *nmt41*) ou en présence (répression du promoteur *nmt41*) de thiamine. Après 2, 4, 6 puis 20 heures de culture et de dilution, les protéines totales ont été préparées et séparées en SDS-PAGE 10%. Après transfert sur une membrane de PVDF, les protéines Ncs6 et Ncs2 « taggées » respectivement par TAP et 3HA ont été détectées par les anticorps *ad hoc*.

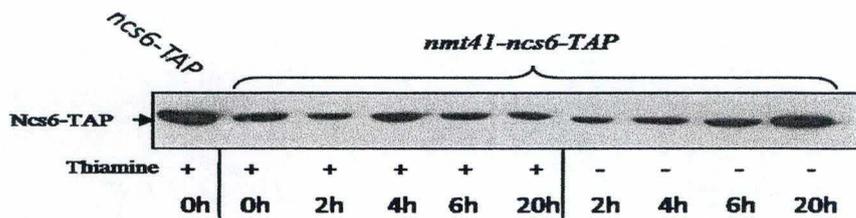


Figure 20 – Niveau d'expression de *Ncs6-TAP* exprimée sous le contrôle du promoteur *nmt41* en présence ou absence de thiamine.

La Figure 20 montre qu'en absence de thiamine, une induction de l'expression est obtenue après 20 heures alors que le niveau d'expression en présence de thiamine reste constant. Cependant, une comparaison avec la souche contrôle exprimant *ncs6-TAP* sous le contrôle de son propre promoteur montre qu'en conditions d'induction du *nmt41*, le niveau d'expression n'est pas supérieur.

Il a donc été impossible d'étudier le phénotype de surexpression de *Ncs6*. Ce résultat nous renseigne indirectement sur la force du promoteur endogène de *ncs6*. Le promoteur *nmt41* donne des niveaux d'expression plus élevés que le niveau moyen des promoteurs de *S. pombe*. On peut donc conclure que le gène *ncs6* est naturellement exprimé à un niveau élevé.

Une expérience identique a été réalisée avec la souche *nmt41-Ncs2-3HA*.

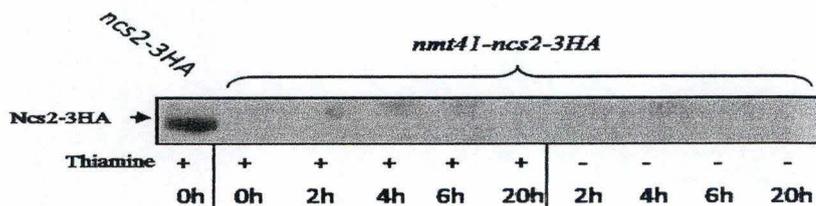


Figure 21 – Niveau d'expression de *Ncs2-3HA* exprimée sous le contrôle du promoteur *nmt41* en présence ou absence de thiamine.

La Figure 21 montre des résultats inattendus car la protéine *Ncs2-3HA* n'est plus détectée dans la souche où *ncs2-3HA* est sous le contrôle de *nmt41*. Le séquençage de la zone promotrice

nmt41 suivie du début de *ncs2* ne montre aucune mutation. La souche restreinte sur milieu contenant de la kanamycine pousse, ce qui confirme la présence de la cassette *KanR*. Une PCR a été réalisée avec une amorce « forward » dans le promoteur *nmt41* et une amorce « reverse » dans *kanR*.

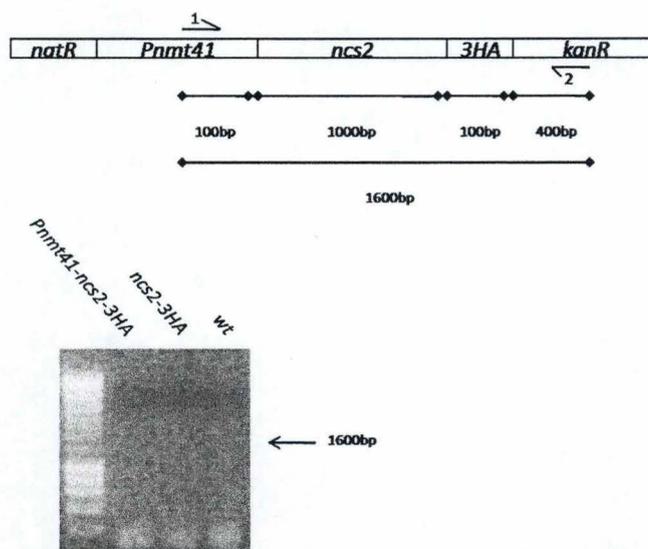


Figure 22 – PCR réalisée sur la souche *nmt41-ncs2-3HA* pour vérifier qu'elle est bien « taggée » par le 3HA.

Cette PCR (Figure 22) n'amplifie pas de bande à la taille attendue (1600 paires de bases). Deux contrôles négatifs ont été réalisés. Ce résultat, en corrélation avec le résultat du western blot (Figure 21), n'est pas en accord avec le génotype de la souche. Ceci nous impose de nouveaux contrôles qui n'ont pu être réalisés dans le cadre de ce travail. En conséquence, l'étude de la surexpression de *ncs2* fera l'objet d'études ultérieures.

C. DELETION DE *ncs6* ET *ncs2*

Comme indiqué plus haut, la délétion d'un gène permet d'établir son caractère essentiel et, dans le cas où il ne le serait pas, d'observer un phénotype lié à l'absence de la protéine. Les souches délétées pour *ncs6* et *ncs2* et le double mutant *ncs6-ncs2* étaient disponibles au laboratoire (données non montrées) et nous avons réalisé une analyse macroscopique (observation de la croissance à différentes températures) et microscopique (observation de la morphologie, du noyau et du septum).

1. PHENOTYPE MACROSCOPIQUE ET CROISSANCE

Des dilutions sériées d'un facteur 10 ont été réalisées à partir d'une culture sur milieu solide fraîche et déposées en gouttes sur milieu solide incubé pendant deux jours. Quatre conditions de croissance ont été testées : trois températures couvrant le champ dans lequel *S. pombe* a un temps de division optimal, et la croissance en présence d'hydroxyurée, un inhibiteur de la réplication qui permet de mettre en évidence des problèmes liés au cycle de division cellulaire.

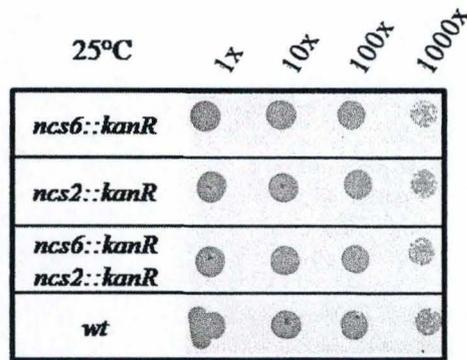


Figure 23 – Dilutions sériées pour tester la croissance à 25°C

25°C : Le temps de génération, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que le nombre de cellules double est de 3h à cette température. On n'observe pas de différence significative avec la souche contrôle.

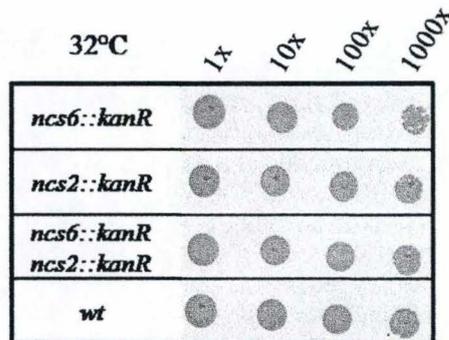


Figure 24 - Dilutions sériées pour tester la croissance à 32°C

32°C : Le temps de génération est de 2 h 10 min à cette température, c'est la température de référence pour *S. pombe*. On n'observe pas de différence significative avec la souche contrôle.

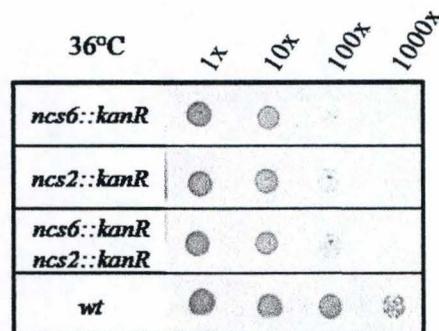


Figure 25 - Dilutions sériées pour tester la croissance à 36°C

36°C : Le temps de génération est de 2 h à cette température, c'est la température limite permettant une croissance normale. On observe que les simples mutants et le double mutant présentent un phénotype thermosensible et sont incapables de former des colonies à cette

température. Le double mutant ne présente pas un phénotype aggravé par rapport aux simples mutants, ce qui corrobore l'hypothèse de la présence de Ncs6 et Ncs2 dans le même complexe protéique.

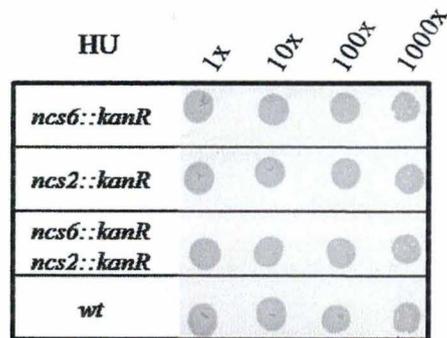


Figure 26 - Dilutions sériées pour tester la croissance à 32°C en présence d'hydroxyurée

L'hydroxyurée est un anti-néoplasique puissant qui inactive la ribonucléoside réductase en formant un radical libre qui se lie dans son site actif. Dès lors, la synthèse des déoxynucléotides est bloquée et, par là même, la synthèse de l'ADN. A la concentration testée, la croissance est possible pour les souches sauvages mais des mutants dans le cycle cellulaire et les « checkpoints » associés sont, dans la majorité des cas, sensibles à la drogue. On n'observe pas de différence significative entre les souches mutées et la souche contrôle.

2. PHENOTYPE DE CROISSANCE EN MILIEU LIQUIDE

Les dilutions sériées ayant montré un phénotype thermosensible autant chez les simples que chez le double mutant de délétion à 36°C, nous avons réalisé des courbes de croissance en milieu liquide.

Une culture a été inoculée et l'augmentation de densité optique de la culture, qui reflète la croissance, a été mesurée toutes les heures. La calibration du spectromètre utilisé permet de traduire les valeurs de DO en nombre de cellules par ml. Cette expérience confirme le phénotype thermosensible qui résulte de l'absence de *ncs6* ou *ncs2*.

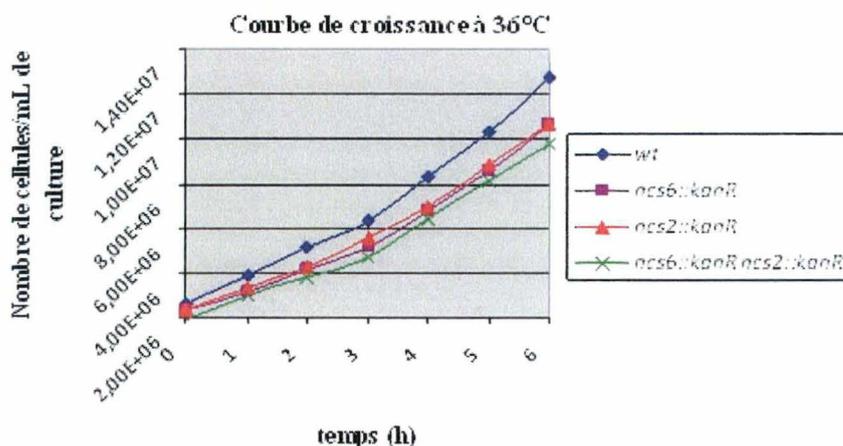


Figure 27 - Courbes de croissance à 36°C des simples et du double mutant de délétion comparés à une souche sauvage. Suivi de ces souches pendant 6 heures, mesure de la DO à 600 nm et conversion en nombre de cellules par mL.

3. PHENOTYPE MICROSCOPIQUE

Le phénotype thermosensible des mutants de délétion indique qu'à haute température, les cellules sont incapables de pousser. Pour investiguer la morphologie cellulaire ainsi que celle du noyau et du septum, des colorations au DAPI et au calcofluor (fixant respectivement l'ADN et le septum), marqueurs classiques chez *S. pombe*, ont été réalisées et observées sous fluorescence.

Si l'on observe la Figure 28, on remarque que la délétion de *ncs6* et *ncs2* entraîne une présence en plus grand nombre de cellules allongées par rapport au sauvage et ce autant à 32°C qu'à 36°C; de même la présence anormale de septa mal positionnés ou dédoublés a été observée (données non montrées).

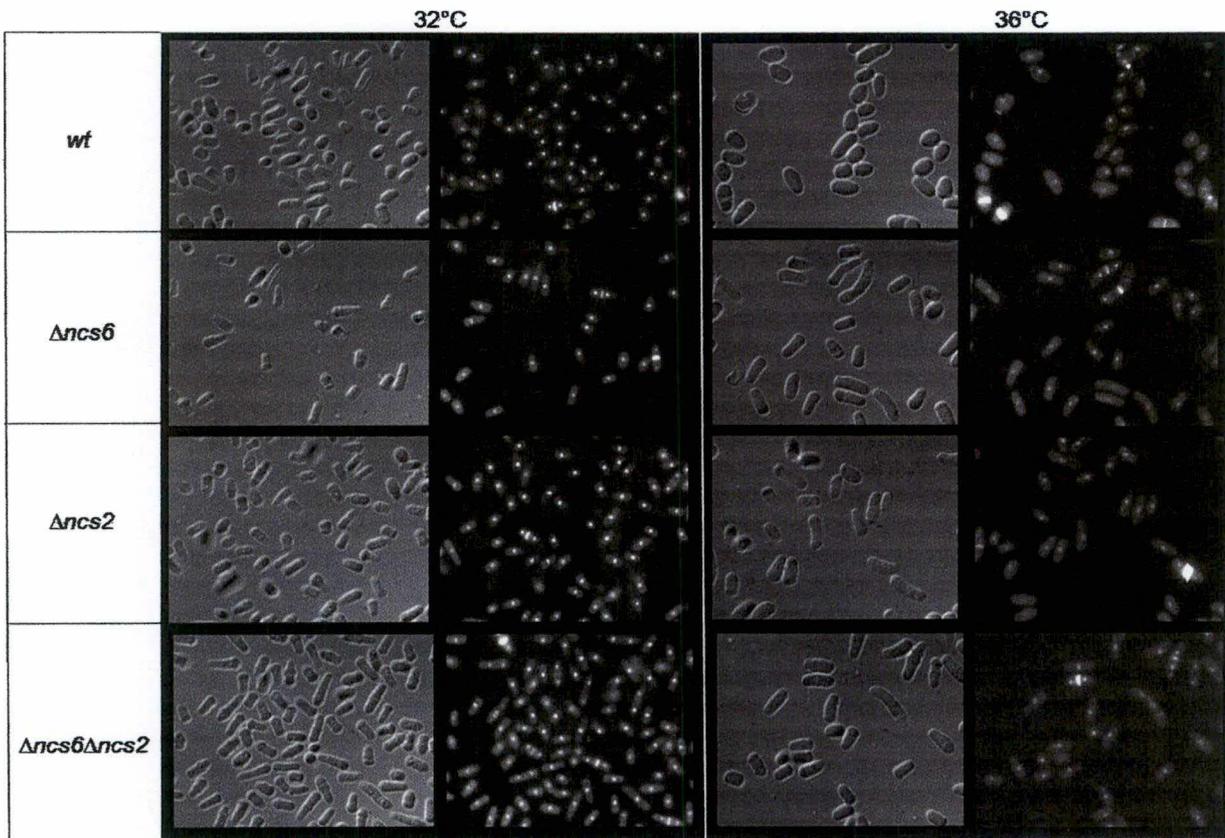


Figure 28 - Microscopie à fluorescence pour la souche sauvage, les deux mutants de délétion de *ncs6* et *ncs2* ainsi que le double mutant de délétion. Photos prises après 17h à 32°C ou 36°C, culture en milieu solide, fixation à l'éthanol 70% puis coloration des cellules fixées au calcofluor et DAPI.

D. ANALYSE DE MUTANTS COLETAUX AVEC *ncs6::kanR*

Comme décrit dans l'introduction, les gènes *NCS6* et *NCS2* ont été identifiés indépendamment chez *S. cerevisiae* dans un crible recherchant des mutations co-létales avec la délétion de *CLA4*. Nous avons tenté de reconstituer ces interactions génétiques chez *S. pombe* et combinant la délétion de *ncs6* avec des mutations dans le « pathway » homologue décrit par ailleurs (cfr introduction, paragraphe F.c) - Le rôle des PAKs dans le contrôle de Cdc2-Cdc13).

Chez *S. pombe*, deux kinases sont apparentées à *Cla4*, il s'agit de *Shk1* et *Shk2*. Le gène *shk1* est essentiel tandis que la délétion de *shk2* ne donne aucun phénotype. Cela laisse supposer que c'est *Shk1* qui joue le rôle principal. Nous avons croisé la souche *ncs6::kanR* avec une souche contenant un allèle thermosensible de *shk1* appelé *orb2-34* dont la température restrictive est de 36°C, et avec une souche *shk2::kanR* délétée pour *shk2*. Les doubles mutants étaient indistincts du délétant *ncs6* et aucune interaction génétique n'a pu être mise en évidence entre *ncs6* et *shk1* ou *shk2*. Nous concluons que l'interaction génétique entre *NCS6* et *CLA4* n'est pas conservée chez *S. pombe*. Nous avons également testé la combinaison du délétant *ncs6* et des mutants *cdc2* (*cdc2-33*), *cdr1* (*cdr1::kanR*), *skb1* (*skb1::kanR*) et *skb5* (*skb5::kanR*) mais dans chaque cas le phénotype de *ncs6::kanR* est resté inchangé.

Deux gènes présents dans le même réseau génétique ont montré une interaction avec *ncs6*. Il s'agit de *cdr2* et *cdc25*.

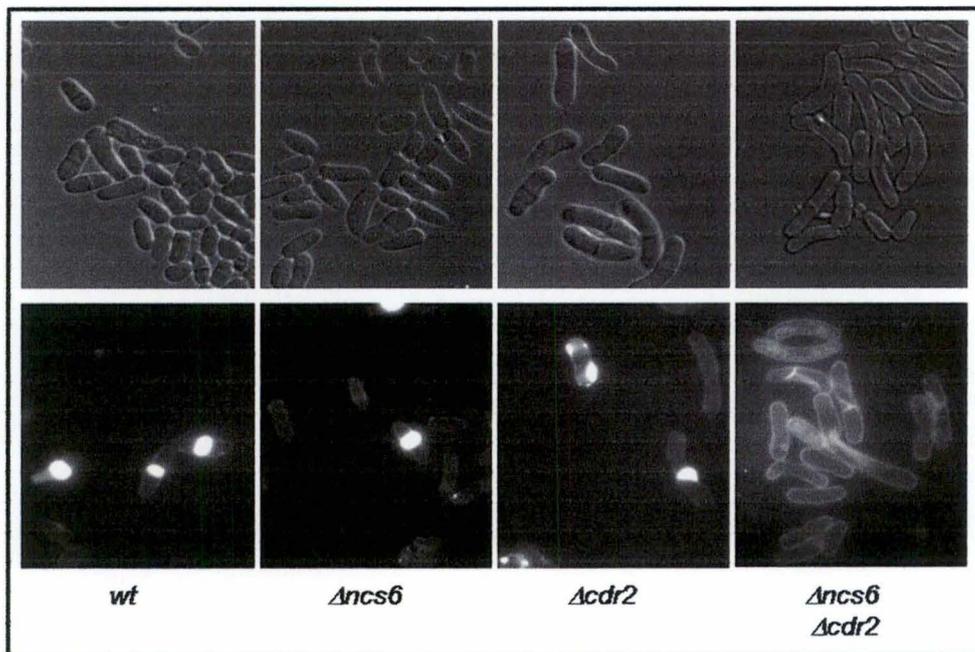


Figure 29 - Microscopie à fluorescence pour la souche sauvage, les deux mutants de délétion de *ncs6* et *cdr2* ainsi que le double mutant de délétion. Photos prises après 15h à 36°C, culture en milieu solide, fixation à l'éthanol 70% puis coloration des cellules fixées au calcofluor.

La kinase *Cdr2* réprime l'entrée en mitose en régulant positivement *Wee1*, l'inhibiteur principal de la transition G2-M. Une différence de croissance est observée en dilution sériée entre les simples mutants *ncs6::kanR*, *cdr2::ura4* et le double mutant (donnée non montrée), et celui-ci présente des altérations morphologiques inédites par rapport aux simples mutants

(cfr Figure 29). A 36°C, les cellules ont un septum aberrant et souvent longitudinal qui n'est pas observé dans les simples mutants. Un lien génétique existe donc entre *cdr2* et *ncs6*.

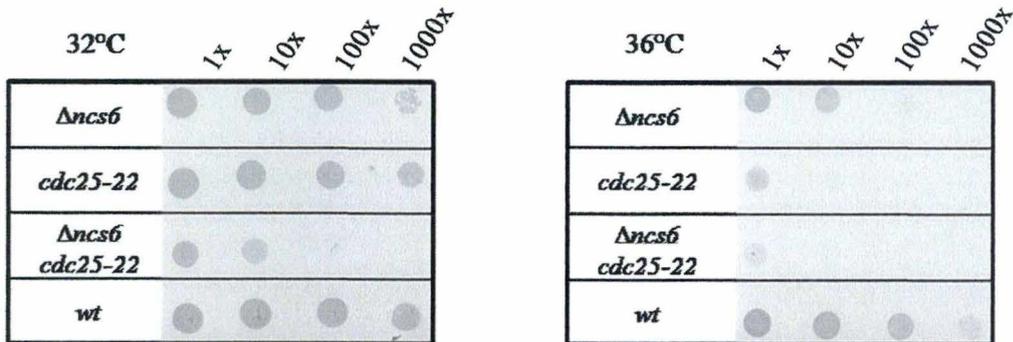


Figure 30 - Gouttes en dilutions sériees du délétant *ncs6*, de la souche portant l'allèle *cdc25-22* et du double mutant comparées à la croissance d'une souche sauvage dans les mêmes conditions.

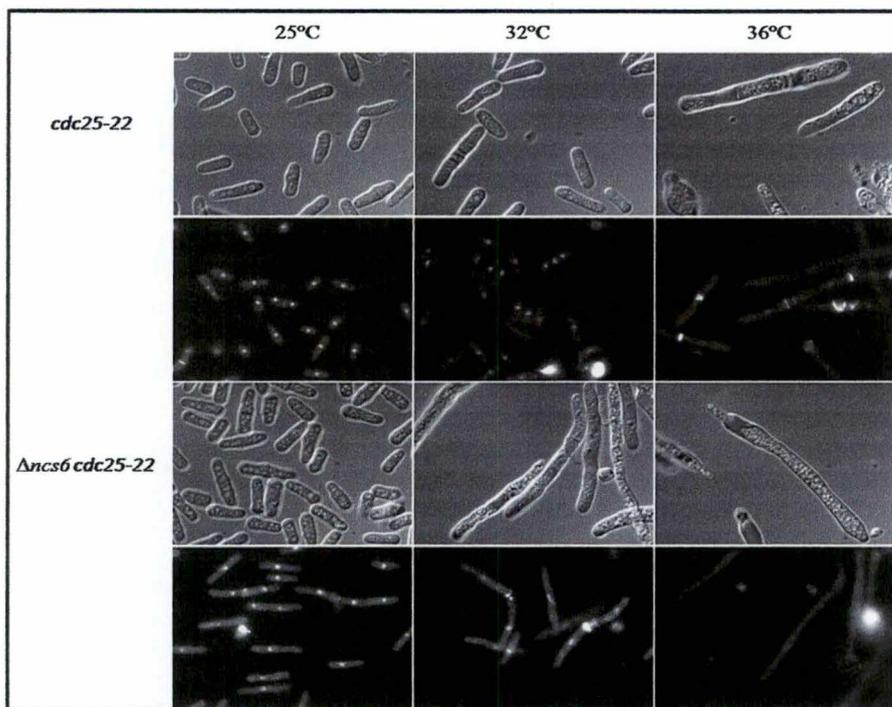


Figure 31 - Microscopie DIC et coloration au calcofluor et DAPI, après fixation, de la souche *cdc25-22* et du double mutant *Δncs6 cdc25-22*. Abaissement de la température restrictive à 32°C pour ce qui est du double mutant.

Cdc25 est la protéine antagoniste de Wee1 et est l'activateur principal de l'entrée en mitose. La combinaison de l'allèle ts de *cdc25* (*cdc25-22*) et de la délétion de *ncs6* a un effet marqué sur la croissance à 32°C alors que les simples mutants ne sont pas affectés (Figure 31). Au niveau morphologique, la mutation ts *cdc25-22* entraîne un phénotype allongé (dit « cdc »). La combinaison de *cdc25-22* avec la délétion de *ncs6* abaisse la température restrictive de *cdc25-22* et le phénotype apparaît à 32°C dans le double mutant. Comme pour *cdr2*, un lien génétique existe donc entre *cdc25* et *ncs6*. Ces expériences ont permis de relier génétiquement *ncs6* à deux régulateurs de la transition G2-M. Aucune interaction génétique avec les PAK kinase Shk1 et Shk2 ou leurs régulateurs n'a pu être mise en évidence. Ces résultats nous ont conduit à mettre sur pied un crible de létalité synthétique pour chercher, sans a priori, de nouvelles interactions génétiques et étoffer le réseau incluant *ncs6*.

E. CRIBLE DE LETALITE SYNTHETIQUE AVEC LE DELETANT *ncs6*

L'identification de deux interactions de co-létalité avec le délétant *ncs6* dans les croisements présentés ci-dessus nous a conduit à définir un crible synthétique létal pour élargir les expériences pilotes.

Notre stratégie est d'éteindre le plus complètement possible l'expression *ncs6* en utilisant un promoteur « switch off ». Le principe même des cribles de co-létalité - cribles où la souche intéressante est justement celle qui ne pousse pas - nécessite qu'il existe une condition où la protéine d'intérêt est exprimée et où la souche ne verra pas sa croissance affectée (Figure 32).

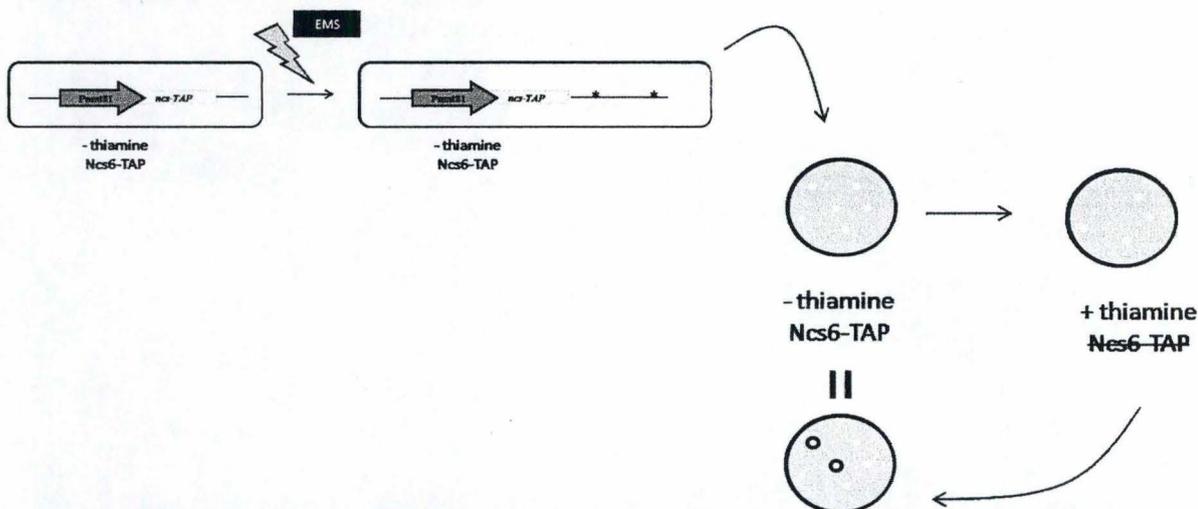


Figure 32 - Stratégie du crible de co-létalité avec *Pnmt81-ncs6-TAP*. La souche contenant *ncs6-TAP* sous le contrôle du promoteur *nmt81* est mutagénisée via l'EMS et l'on compare la survie des colonies en conditions d'induction ou d'extinction du promoteur *nmt81* par la thiamine.

Comme présenté en Figure 32, une mutagénèse aléatoire est réalisée et les cellules sont étalées sur milieu sans thiamine (pour permettre l'expression de *ncs6*), puis répliquées sur milieu contenant de la thiamine, pour réprimer le promoteur *nmt81* et dépléter la protéine Ncs6. Les clones qui sont spécifiquement incapables de pousser en présence de thiamine contiennent une mutation dans un gène essentiel en l'absence de *ncs6*. La discrimination est plus aisée grâce à l'utilisation de Phloxine B, un colorant vital qui s'accumule dans les cellules mortes et leur confère une vive coloration rouge.

Une souche *nmt81-ncs6-TAP* (où *ncs6* est sous le contrôle du promoteur *Pnmt81* répressible à la thiamine) a été construite de la même manière que pour les souches de surexpression et testée par western blot pour vérifier la déplétion de Ncs6 en présence de thiamine.

La Figure 33 montre que, même après 6h de croissance en présence de thiamine, le taux de protéine Ncs6-TAP, bien que réduit, est toujours relativement élevé. Il est improbable que cette diminution suffise à mimer la délétion de *ncs6*. Le cycle cellulaire étant d'un peu plus de deux heures, augmenter encore le temps de déplétion n'est pas souhaitable. En conclusion, la demi-vie de Ncs6 ne permet pas de réaliser un crible de co-létalité dans les conditions optimales. Le crible n'a donc pas été réalisé.

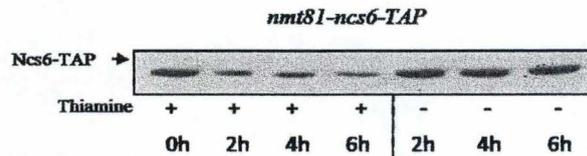


Figure 33 - Vérification de l'extinction de *nmt81-ncs6-TAP* en présence de thiamine (5µg/mL) pendant 2, 4 et 6h. Contrôles en absence de thiamine.

F. CRIBLE DE SUPPRESSEURS DU PHENOTYPE TS DE *ncs6-ts*

Nous avons entrepris un crible de suppression multi-copie du phénotype thermosensible de la délétion de *ncs6*. Le principe du crible est que le dosage génique d'un partenaire, ou d'un substrat peut compenser une mutation. L'exemple le plus simple est qu'un partenaire protéique dont on augmente le niveau d'expression peut « supprimer » un défaut chez son interacteur. Nous avons transformé une banque génomique dans la souche délétée pour *ncs6* et sélectionné les clones capables de pousser à 36°C. Nous avons réalisé la même transformation dans un mutant ponctuel de *ncs6*, également *ts*, disponible au laboratoire (données non montrées). Dans ce cas, la protéine, bien qu'inactive à 36°C, est présente et le crible permettra potentiellement d'isoler des supresseurs différents par rapport à ceux identifiés dans le cas du délétant.

1. CONSTRUCTION DES *ncs6-ts*

Une banque d'allèles *ts* de *ncs6* a été construite au laboratoire. Brièvement, ces allèles ont été générés par PCR mutagène en altérant le ratio des 4 désoxyribonucléotides. Le « pool » a été transformé en levure et les clones sont criblés pour vérifier l'intégration au locus et le caractère *ts*. Enfin, les mutants ont été ré-amplifiés et séquencés pour découvrir quelle mutation a été introduite. Nous avons utilisé le mutant *ncs6-21*, ci-après nommé *ncs6-ts*.

2. TRANSFORMATION DE LA BANQUE GENOMIQUE

Les souches thermosensible et délétante montrent souvent une efficacité de transformation inférieure à celle d'une souche Wild Type. L'efficacité testée d'environ 500 transformants par µg d'ADN nous a amené à réaliser 4 transformations de 5µg d'ADN. Ceci a permis de cribler environ 10000 clones ; ce qui correspond à une double couverture de la banque. Les cellules ont été incubées 2 jours à température permissive sur milieu sélectif EMM – uracile (car la banque possède le marqueur de sélection *ura4* qui restaure la croissance sur milieu dépourvu d'uracile), puis répliquées à 36°C. A cette température, ne pousseront que les cellules contenant un plasmide portant un gène supresseur du phénotype thermosensible. Après 3 jours à 36°C, 21 transformants présentaient une croissance nette pour la souche *ncs6-ts*, et 65 pour la souche *ncs6::kanR* et. Ces transformants ont été restriés à 36°C pour confirmer la stabilité du phénotype.

L'ADN plasmidique a été préparé et transformé par électroporation dans la souche *DH10B* de *E. coli*. Le mélange de transformation a été étalé sur milieu sélectif LB contenant de l'ampicilline pour sélectionner les colonies portant le plasmide. Enfin, l'ADN des transformants a été récupéré par miniprep et séquencé afin d'identifier le fragment d'ADN génomique porté par le plasmide.

3. ELIMINATION DES SUPPRESSEURS CODANT *ncs6*

Dans ce crible de supresseurs multicopies, l'insert porté par le plasmide risque d'être le plus souvent *ncs6* lui-même. Pour éliminer ces supresseurs une PCR amplifiant toute la séquence codante de *ncs6* a été réalisée. Sur 61 clones confirmés dans le crible du délétant *ncs6::kanR*, 12 ont montré une bande nette. Certains candidats présentent une bande de taille attendue (1kb) mais relativement faible et n'ont pas été éliminés.

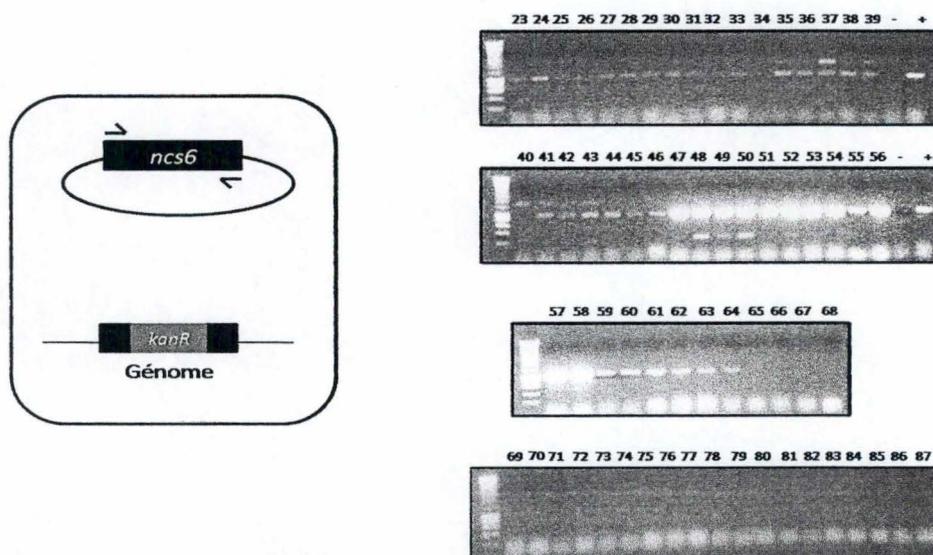


Figure 34 - Electrophorèse sur gel d'agarose 1% de produits de réactions PCR (pour les candidats 23 à 87) visant à amplifier *ncs6* s'il est présent dans la souche.

4. RESULTATS DU CRIBLE DE SUPPRESSION DE *ncs6-ts*

En utilisant des « primers » bordant l'insert génomique, deux réactions de séquençage ont permis de localiser celui-ci dans le génome de *S. pombe*.

Sur un premier lot de 19 plasmides séquencés, 15 portent un insert contenant des fragments du génome mitochondrial. Le génome mitochondrial est inclus dans la banque et sans doute enrichi puisque il est présent en plusieurs copies (de 50 à 100 chez *S. cerevisiae*).

A) INSERTS MITOCHONDRIAUX

Le génome mitochondrial de *S. pombe* a une taille d'environ 19kb et code 25 ARNts, les petit et grand ARN du ribosome (*rnl* et *rns*), la partie ARN de la ARNaseP mitochondriale (*rnpB*), la protéine de la petite sous-unité du ribosome mitochondrial (*rps3*), les trois sous-unités de la cytochrome oxydase C (*cox 1, 2 et 3*), les sous-unités 6, 8 et 9 de l'ATP-synthase (*atp 6, 8 et 9*) et l'apocytchrome B (*cob*).

Les inserts suppresseurs contiennent différentes régions du génome mitochondrial et le fragment minimal commun est d'un peu plus d'1kb. Il ne contient pas d'ORF complète. Cependant, plusieurs ARNt sont partagés par tous les inserts suppresseurs, ce qui suggère qu'ils pourraient être responsables de la suppression.

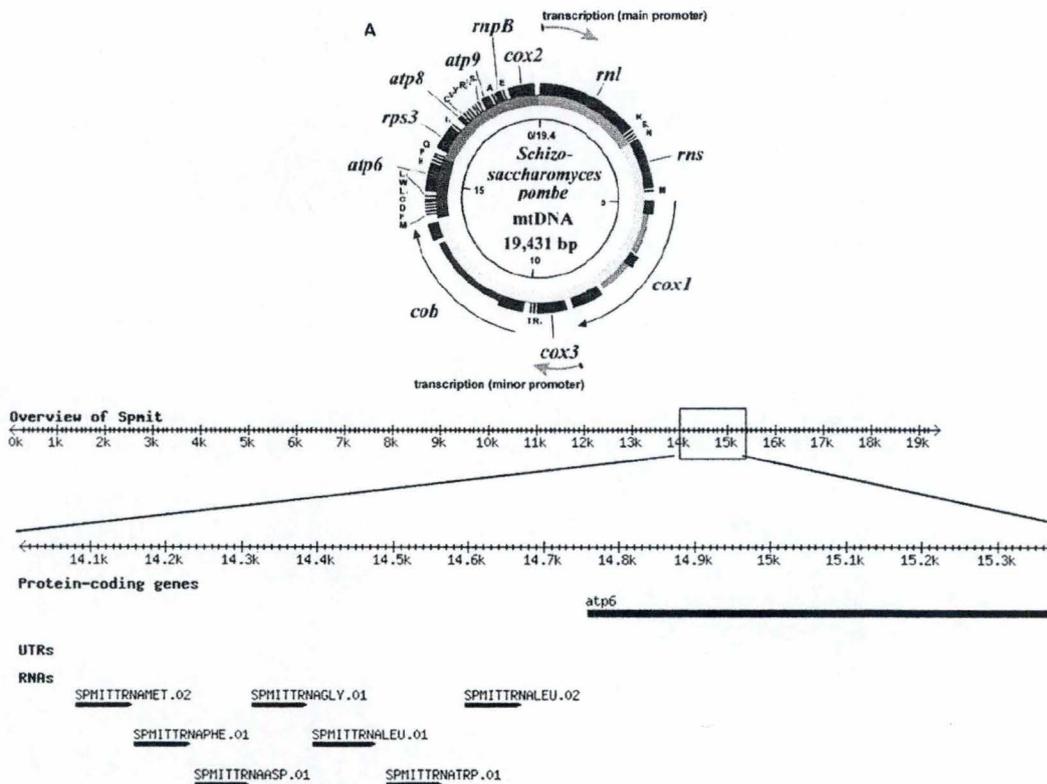


Figure 35 – En haut, représentation du génome mitochondrial de *S. pombe* (d'après (Bullerwell et al., 2003)). En bas, représentation des zones codantes de la zone minimale supprimant le phénotype (d'après Genome Browser, GeneDB).

B) AUTRES SEQUENCES OBTENUES

Un plasmide contient une copie complète de l'ADNr. Deux plasmides contiennent un insert identique couvrant une région du chromosome II entre les locus SPBC961.01 codant *Pi035* (fonction prédite palmitoyltransférase) et SPBC17A3.08 codant *TatD* (aussi appelée *Pi038*). Entre ces deux gènes, se trouvent 2 autres gènes codant une ubiquitin-protein ligase E3 (fonction prédite) et une lipoate-protein ligase A (fonction prédite). Enfin, un dernier insert correspond à une région du chromosome II et contient un fragment de l'ORF SPBC36.02c codant un transporteur de la spermidine. Ces inserts n'ont pas fait l'objet de plus d'investigation lors de notre travail.

G. ETUDE IN SILICO DE Ncs6

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction, Ncs6 est une protéine très conservée. Le tableau suivant le confirme en présentant les résultats d'un BLAST contre une banque non redondante de séquences protéiques. Ces protéines, le locus qui les code et l'espèce d'origine sont listés dans le tableau ci-dessous :

Espèce	Locus :	Taille protéine :	Expected value :
Schizosaccharomyces pombe	SPBC2G5.03	335 aa	0
Arabidopsis thaliana	AT2G44270	355 aa	4x10 ⁻¹³²
Xenopus tropicalis	MGC107918	341 aa	7x10 ⁻¹²⁸
Saccharomyces cerevisiae	YGL211W	359 aa	4x10 ⁻¹²⁷
Danio rerio	zgc:55395	343 aa	4x10 ⁻¹²⁶
Drosophila melanogaster	CG8078	343 aa	3x10 ⁻¹¹⁹
Caenorhabditis elegans	F29C4.6	373 aa	4x10 ⁻¹⁰⁶
Homo sapiens	ATPBD3	348 aa	4x10 ⁻⁸⁵

Nous avons cherché si des séquences apparentées existaient chez les organismes procaryotes. La séquence de TtuA de *Thermus thermophilus* présente un score intéressant qui nous a conduit à l'aligner avec les orthologues eucaryotes de Ncs6.

XtB8	-----MPVNCSSCEERRAVLRPRKPGHSLCKDCFFHAFEEEEIHHTIVS	43
DrB8	-----MPVQCSNCEQKRAVLKRPKTGHSLKDCFFWAFEEEEIHQTITS	43
DmB8	-----MHIICKSCGNRAALKRPKTGDALCKECCFFAAFEAEIHHTISS	43
AtB8	-----MEAKNKKAVASRLCCLCNLRRPVLRPKTLQQICRECFYEVFEEEEIHQVIVQ	52
ScNcs6	MSFTAPSDPVNKPTKVKVSQLCCELCHSRKALIRRPKNLSKLCCKCCFLVFETEIHNTIVA	60
SpB8	-----MSNKLQQLCNERPALVRPKTGQKICKECFYVVFETEIHNVIE	44
CeB8	-----MEKRRGPPCCQSGSGCSNPAKIRKAKDGAQLCGPCFSRNFEDDVHEAIVN	50
HsB8	-----MPAPPKASCHAARAALRRPLSGQALCGACFCAAFEAEVLTVLA	44
TtuA	-----MVCKVCGQKAQVEMRSR--GLALCKREHYLDWVFKETERAIRR	40
	. : * : * : ..	
XlB8	AKLFNPGKEKVGIGASGGKDSVLAHVLKVLNERYAYGLDLILVSVDEGISGYRDDSLETV	103
DrB8	AGLFNRGETVAIGASGGKDSVLAHVMKLLNERYDYGLKLLLSVDEGITGYRDDSLETV	103
DmB8	SNLFRRGEKVAVAASGGKDSVLAHVLKLLNERHNYGLELVLLSIDEGITGYRDDSLETV	103
AtB8	NRLFKSGERVAIGASGGKDSVLAHVLSELNRRHNYGLDLFLLSIDEGITGYRDDSLETV	112
ScNcs6	NNLFQRGEKVAVAVGASGGKDSVLAHMLKLLNDRYDYGIEIVLLSIDEGIGYRDDSLETV	120
SpB8	NKLFVRGERVIGIGASGGKDSVLAHVMKLLNERYDYGLELYLISVDEGIRGYRDDSLETV	104
CeB8	NKLFKRGERVAIGASGGKDSVLAHVMKLLNDRHNYGLDLQLLSIDEGIKGYRDDSLETV	110
HsB8	GRLLPPGAVVAVGASGGKDSVLAHVRRLALPR--LGISLQLVAVDEGIGGYRDAALAAV	102
TtuA	HRMLLPGERVLVAVSGGKDSLALWDVLSR-----LGYQAVGLHIELGIGEYSKRSLEVT	94
	: : * * : ..***** * : * . : : * * * . : * ..	
XlB8	KRNQQQYELPLKIVSYQELYG--WTMDQIVKQVG----LKNNTFCGVFRRQALDRGAMML	158
DrB8	KRNQQQYELPLKIVSYEELYG--WTMDAIVKQVG----LKNNTFCGVFRRQALDRGAMML	158
DmB8	KQNRDDYQMPKILSYEELYG--WTMDRIVAQIG----RSNNTFCGVFRRQALDRGAKLL	158
AtB8	KRNEVQYGLPLKIVSYKDLYG--WTMDEIVKMIG----LKNNTFCGVFRRQALDRGAALL	167
ScNcs6	KRNQQQYGLPLEIFSFKDLVD--WTMDEIVSVAG----IRNSTYCGVFRRQSLDRGAACL	175
SpB8	KRNQQQYGLPMKIVSYADLYDGWTMDNVVARIG----TKNNTYCGVFRRQALDRRAALS	160
CeB8	EKNRVEYGLPLTILSYRDLYG--WTMDDIVAKIG----KKNNTFCGVFRRQALDRGAFKI	165
HsB8	RQAVRWELPLTVVAYEDLFGGWTMDAVARSTAGSGRSRSCCTFCGVLRRRALEEGARRV	162
TtuA	QAFARERGLELLVVDLKEAYG--FGVPELARLSG----RVAQCSACGLSKRYIINQVAVEE	148
	. : : : . : : : : : . * : * * : * : : *	
XlB8	GVNKICTGHNADDIAETVLMNVLGRDIARLRRTSITGSEG--AIPRCKPLKYAYEKEI	216
DrB8	NVDKICTGHNADDVAETVLMNVLGRDIARLRRTAISTSSSEGDAIPRCKPLKYAYEKEI	218
DmB8	GVDSIATGHNADDIAETVLMNVLGRDITARLRRTSIRTGGGED--TIPRVKPLKYSYEKEI	217
AtB8	KVEKLVGTGHNADDIAETVLLNLLGRDIARLSRRTSITGSEG--PIPRCKPFKYTYEKEI	225
ScNcs6	GISHVVTGHNADDMAETVLMNVLGRDVARLEKSTAITQSSGS--PIKRKSPFKYSYQKEI	234
SpB8	DIHHLVTGHNADDIAETILMNLGRDVARLPRSTEITQSDSS--PTRKSKPFKYSEKEI	219
CeB8	GATKLVGTGHNADDMAETLLMNLGRDIARLERCTNIVTGEED--LPRAKPLKYCFERDI	223
HsB8	GATHIVGTGHNADDMAETVLMNVLGRDAGRLARGGGLGSPGEGG--ALPRCRPLQFASQKEV	221
TtuA	GFRVVATGHNLDDEAAVLFGNLLNPQEETLSRQGPVLPKPKG--LAARVKPFYRFSEREV	206
	: * * * * * : : * . : * : : . * : * : : : :	

XlB8	VLYAYFKKLDYFSTECIYSPNAYRGHARAFKLDLEAIRPSSIMDIIH-SGENLSVKED==	273
DrB8	VLYAYFKKLDYFSTECIYSPNAYRGHARAFKLDLESVRPSAIDVIH-SGETLSVKEG--	275
DmB8	VMYAHYKKLVYFSTECVFAPNAYRGHARAFKLDLEKVRPSVIMDIIY-SGEQLRFKDT--	274
AtB8	VMYAYFKKLDYFSTECIYSPNAYRGFAREFLKDLERIRPRAILDIIK-SGEQFRIAT--	282
ScNcs6	VLYAHYMKLDYFSTECTYAPEAFRGTAREYMKNLEAVRPSCIIDIQ-SGENLALKAKKS	293
SpB8	VLYAHYKKLDYFSTECTYSPFAFRGTARAMIKQLENIRPSSILDIIY-SGESMQLASSVQ	278
CeB8	VMYARTNQLEYFYTECIYAPNAYRGYARKYVRDLEKVHPRAILDLIR-SGEKVSVKKE--	280
HsB8	VLYAHFRRLDYFSEECVYAPEAFRGHARDLLKRLEAARPSAVLDLVH-SAERLALAPA--	278
TtuA	LSYTLRLGIRYLHEECPNAKGAKSLLYKEALNLVERSMPGAKLRFLDGFLEKIRPRLDVG	266
	: * : * : * : * : : * * : : *	
XlB8	-----VRMPVQGTCTRCGYISSQSLCKACVLEGLNRGLPKLGIGKHHKL---HHKLLS	324
DrB8	-----VKMPVQGTCSRCGYISSQALCKSCVLEGLNRGLPKLGIGKHHRL---HGKILA	326
DmB8	-----VKKPERGTCTRCGFVSSQPKKACVLEGLNRGLPKLGIGKSKG---ERMIAK	325
AtB8	-----TKMPEQGTCTRCGYISSQKWCACVLEGLNRGLPKMGI GRPRGVNGDHNKETK	336
ScNcs6	NAGKRVVVFVDGNRCARC GYLSSNNICACMLLEGLEKSRAQVAIENDTSA-----	344
SpB8	EQ-----LPQQTCTERC GFTSSNRICACMLLEGLNKGTGLGLGSDRKT-----	323
CeB8	-----VEMPTLKI CERC GYMTSQKLCACLLIEGLNTGNTDLGVRKSKS----KQVTV	330
HsB8	-----ARPPRPGACSRCGALASRALCQACALLDGLNRGRPRLAIGKRRGLDEEATPGT	332
TtuA	-----EEVALRE CERC GYPTTGAVCAFCRMWDVYRRAKRKLPEEVS-----	310
	* * * * : : * * : : :	
XlB8	Q-EPLSE-----QEERKLKAVDF-	341
DrB8	Q-EPLTE-----QEERKLKAVDF-	343
DmB8	QNQELAL-----RERANLVKNDF-	343
AtB8	KPGSVAKS-----IESKQCGSLDF-	355
ScNcs6	==DGAAL-----KLRAL EKLSF-	359
SpB8	--KKLQS-----QIPACAE----	335
CeB8	EADELNKEGGCGSGGGGGCGCAGAEDAENEETRQRLKDLQF-	373
HsB8	PGDPARP-----PASKAVPTF---	348
TtuA	-----FRPRVKPLRAG	321

D'après des données publiées (Shigi et al., 2006), TtuA est une thiolase d'ARNt qui permet la modification de la ribothimidine en 2-thioribothimidine (échange d'un oxygène par un soufre). Cette protéine a été isolée dans une fraction de lysat cellulaire sur base de sa capacité à lier des ARNt^{lle}. Des analyses *in silico* de TtuA ont montré qu'elle appartenait à la famille des thiolases d'ARNt du type « TtcA » (dont le membre fondateur, TtcA, est l'enzyme responsable de la biosynthèse de la 2-thiocitidine). Cette famille d'enzymes possède un motif « P-loop » (Ser-Gly-Gl-Xaa-Asp-(Ser/Thr)) et un à cinq motifs CXXC. Ces deux types de motifs sont présents chez tous les orthologues de Ncs6.

Le motif « P-loop » lie spécifiquement l'ATP pour former un intermédiaire adénylate. Ce type de motif se retrouve dans différentes APTase capables de lier des ARNt.

La présence d'un motif « P-loop » chez Ncs6 et sa parenté avec TtuA suggère que Ncs6 pourrait également être une thiolase d'ARNt. Le fait que la majorité des inserts suppresseurs identifiés (voir point F) contient des ARNt appuie cette possibilité qui est en cours d'investigation au laboratoire.

Discussions & Perspectives

DISCUSSIONS	- 37 -
A. Rôle possible du complexe Ncs6-Ncs2 dans l'entrée en mitose:	- 37 -
1. Relation entre Ncs6 et Cdc25	- 37 -
2. Relation entre Ncs6 et Cdr2	- 38 -
B. Autres rôles possible du complexe Ncs6-Ncs2:	- 39 -
1. rôle de Ncs2p dans la thiolation des ARNt chez <i>S. cerevisiae</i>	- 39 -
2. Role de Ncs2/Ncs6 dans la thiolation des ARNt chez <i>S. POMBE</i>	- 39 -
CONCLUSION	- 40 -
PERSPECTIVES	- 41 -
A. Co-immunoprécipitation entre Ncs6 et ARNt	- 41 -
B. Liquid Chromatography / Mass Spectrosopy (LC/MS)	- 41 -
C. Gel APM	- 42 -

DISCUSSIONS

Une première conclusion importante à tirer des résultats de ce mémoire est que, chez *S. pombe*, les protéines Ncs6 et Ncs2 forment un complexe. Dès lors, nous parlerons de la fonction du complexe Ncs6-Ncs2. Cette conclusion repose sur l'interaction physique détectée entre les deux protéines et sur le phénotype identique découlant de la délétion des gènes *ncs6* et *ncs2*, le phénotype du double délétant étant identique à celui des simples.

A. ROLE POSSIBLE DU COMPLEXE Ncs6-Ncs2 DANS L'ENTREE EN MITOSE:

Sur base des données disponibles chez *S. cerevisiae*, nous avons commencé par essayer de placer le complexe Ncs6-Ncs2 dans le réseau connu de contrôle d'entrée en mitose. Une dizaine de doubles mutants de délétion avec des régulateurs mitotiques ont été réalisés dans ce but et deux ont permis d'établir une interaction génétique. Ces deux gènes d'intérêt sont *cdc25*, codant la phosphatase activatrice de *cdc2* permettant l'entrée en mitose et *cdr2*, codant une protéine kinase inhibitrice de Wee1.

Le phénotype de cellules délétées pour *ncs6* ou *ncs2* (cellules légèrement allongées notamment) suggère que Ncs6-Ncs2 joue, de manière indirecte, un rôle d'activation de l'entrée en mitose. En effet, en son absence, l'entrée en mitose est retardée. Cette activation est probablement de type indirect puisqu'aucune interaction ni génétique ni physique entre *ncs6* et *cdc2* n'a été mise en évidence. La relation génétique de co-létalité entre *ncs6* et *cdc25* qui code également un activateur de Cdc2 est en droite ligne avec cette hypothèse.

1. RELATION ENTRE Ncs6 ET Cdc25

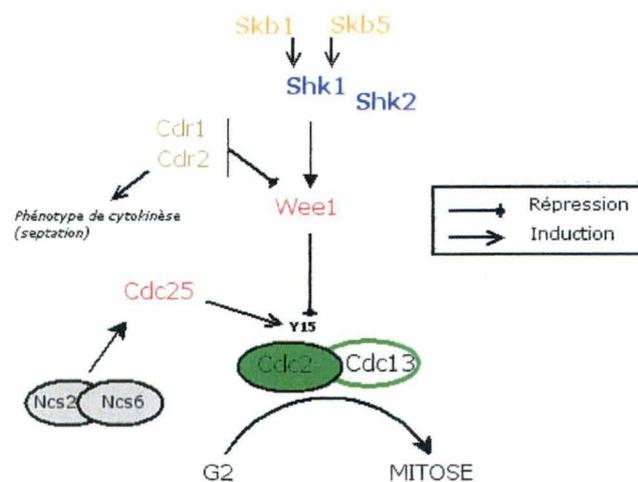


Figure 36 – Réseau simplifié des protéines entrant en jeu dans la régulation de l'entrée en mitose chez *S. pombe*, d'après la littérature. Lien possible entre le complexe Ncs2/Ncs6 et Cdc25 déterminée d'après les expériences de ce mémoire.

Sur base de la relation génétique établie entre *ncs6* et *cdc25*, on peut spéculer que le complexe Ncs6-Ncs2 joue un rôle activateur indirect sur la protéine Cdc25. Nous avons montré que la

délétion de *ncs6* diminuait significativement la température restrictive de l'allèle *ts cdc25-22*. Nous n'avons aucune donnée d'interaction directe entre Ncs6-Ncs2 et Cdc25. Aucun motif typique des protéines kinase ou phosphatase n'est présent dans la séquence de Ncs6 ou Ncs2. Le motif « P-loop » associé à une fonction prédite d'ATPase est présent dans les thiolases d'ARNt. Cette analyse rend peu plausible une action directe de Ncs6-Ncs2 sur Cdc25.

2. RELATION ENTRE Ncs6 ET Cdr2

Une autre relation génétique a été établie entre *ncs6* et *cdr2*. Le phénotype du double mutant est évident au niveau de la localisation du septum. En effet, les mutants de délétion de *ncs6* et de *cdr2* n'ont pas de phénotype particulier en ce qui concerne la localisation du septum à cela près que le délétant *cdr2* présente un taux plus élevé de cellules multi-septées à haute température. Par contre, lorsque l'on étudie la souche délétée pour les deux gènes, on remarque un fort taux de cellules comportant soit un septum longitudinal parfois dédoublé.

Il est connu dans la littérature (Breeding et al., 1998) que la protéine Cdr2 fonctionne comme inhibiteur de Wee1 et possède un rôle lors de la cytokinèse indépendamment de Wee1. Nous n'avons pas mis en évidence de relation génétique entre *ncs6* et *wee1* et il est donc possible que la relation génétique entre *cdr2* et *ncs6* implique le second rôle de Cdr2 en cytokinèse. Aucune donnée à ce stade ne peut nous permettre de trancher cette alternative.

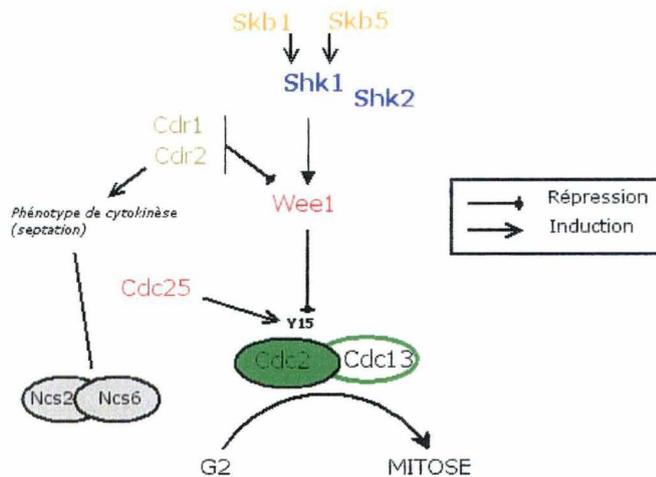


Figure 37 - Réseau simplifié des protéines entrant en jeu dans la régulation de l'entrée en mitose chez *S. pombe* d'après la littérature. Lien possible entre le complexe *Ncs2/Ncs6* et *Cdr2* au niveau du phénotype de septation d'après les résultats de ce mémoire.

B. AUTRES ROLES POSSIBLE DU COMPLEXE *Ncs6-Ncs2*:

1. ROLE DE *Ncs2p* DANS LA THIOLATION DES ARNt CHEZ *S. CEREVISIAE*

Une publication récente (Esberg et al., 2006) rapporte que la *Ncs2p*, chez *S. cerevisiae*, peut jouer un rôle dans la thiolation des ARNt. Les auteurs montrent que, dans la souche de *S. cerevisiae* délétée pour *NCS2*, la thiolation des uridines en position « wobble » (la position wobble sur l'anticodon s'apparie avec la troisième base du codon) est absente. Comme c'est le cas pour de nombreuses modifications d'ARNt, la thiolation de la position « wobble » est importante pour l'appariement correct du codon et de l'anticodon et donc pour le décodage de l'information génétique. La thiolation de la base « wobble » est présente sur deux ARNt : l'ARNt lysine portant l'anticodon UUU (Lys^{UUU}) et l'ARNt glutamine portant l'anticodon UUG (Gln^{UUG}).

L'interaction physique entre *Ncs6* et *Ncs2*, et la parenté entre *Ncs6* et la thiolase d'ARNt bactérienne *TtuA* que nous avons montrées lors de ce travail apportent un éclairage neuf sur les données rapportées ci-dessus obtenues avec *NCS2* chez *S. cerevisiae* (Esberg et al., 2006). Elles suggèrent que *Ncs6-Ncs2* est la thiolase d'ARNt chez les eucaryotes. La présence universelle de la thiolation de la base wobble sur les ARNt Lys^{UUU} et Gln^{UUG} est également en accord avec la conservation marquée de *Ncs6* chez les eucaryotes.

2. ROLE DE *Ncs2/Ncs6* DANS LA THIOLATION DES ARNt CHEZ *S. POMBE*

Le crible suppresseur multi-copie du phénotype thermosensible de *ncs6::kanR* a identifié des fragments du génome mitochondrial riches en ARNt comme suppresseur. Nous avons montré que la plus petite partie commune à ces fragments qui garde la capacité de suppression contient une ORF tronquée. Ce fragment minimum contient aussi une petite dizaine de séquences d'ADN codant des ARNt et nous remarquons que dans chaque insert d'ADN mitochondrial supprimant le phénotype thermosensible du délétant ou du ts de *ncs6*, soit l'ARNt Gln^{UUG}, soit celui de la Lys^{UUU} est présent. Notre hypothèse de travail est en conséquence que la surexpression de ces deux ARNt peut compenser l'absence de thiolation. Un phénomène similaire a été décrit chez *S. cerevisiae* (Esberg et al., 2006).

CONCLUSION

L'hypothèse « Wobble » émise en 1966 par Francis Crick (Crick, 1966) propose que la dégénérescence du code permet que l'appariement entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt ne soit exacte que pour les 2 premières positions du codon. La troisième position peut subir le « wobble » et des reconnaissances non-standard entre bases en troisième position du codon et première position de l'anticodon peuvent avoir lieu. Ceci permet à un seul ARNt de reconnaître plusieurs codons codant un acide-aminé identique.

L'uridine en position « wobble » de l'anticodon était supposée ne reconnaître que les bases adénine (A) et guanine (G) en troisième position du codon d'après les règles wobble émises par Crick, mais une version révisée de la théorie admet que l'uridine possède une grande flexibilité conformationnelle qui lui permet de reconnaître autant les bases A et G que U et C. Dès lors, pour permettre une reconnaissance spécifique des bases A et G par l'uridine « wobble », des modifications post-transcriptionnelles comme la thiolation sont nécessaires.

La modification de la base « wobble » joue un rôle important dans la modulation de la reconnaissance entre codon et anticodon le plus souvent en restreignant les capacités de décodage propres aux ARNt. Dans les ARNt pour le glutamate (Glu), la glutamine (Gln) et la lysine (Lys), l'uridine en position « wobble » est modifiée par thiolation de manière conservée chez tous les organismes. Cette modification a pour but de restreindre les capacités de décodage des ARNt. Les ARNt possédant la modification s²U (thiolation en position 2 sur l'uridine) sont capables de décoder les codons se terminant en purine (R = A ou G) uniquement. De plus, il semblerait que la thiolation de cette base permette, chez *E. coli*, une meilleure liaison au ribosome (Ashraf et al., 1999) et que la modification s²U des ARNt^{Glu} soit nécessaire pour la reconnaissance de l'ARNt par la glutaminyl-tRNA synthétase (Sylvers et al., 1993).

Notre hypothèse que Ncs6-Ncs2, chez *S. pombe*, est la thiolase de l'uridine « wobble » des ARNt Gln^{UUG} et Lys^{UUU} implique que la délétion de *ncs6* ou *ncs2* entraîne une perte de la modification de l'uridine et donc de la reconnaissance spécifique codon-anticodon. Cette perte de spécificité aura donc un effet mutagène traductionnel mis en évidence par le phénotype observé dans les souches délétées.

Il est également possible que les interactions génétiques décrites avec *cdc25* et *cdr2* soient une conséquence de l'absence de modification des ARNt. Des expériences supplémentaires sont requises pour explorer cette possibilité.

PERSPECTIVES

Dans les paragraphes suivants, nous dérivons en guise de perspectives quelques expériences qui devraient permettre d'établir si Ncs6-Ncs2 est une thiolase d'ARNt *in vivo*. Trois techniques parmi d'autres envisageables ont été choisies. Il s'agit de la co-immunoprécipitation entre protéines et ARNt, de la technique LC/MS couplant la chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse et de la migration en gel APM.

A. CO-IMMUNOPRECIPITATION ENTRE Ncs6 ET ARNt

Lors des expériences de TAP-tagging et de co-immunoprécipitation de ce mémoire, nous ne nous sommes intéressés qu'aux protéines précipitant avec Ncs6. Il serait intéressant de réaliser une immunoprécipitation de la protéine Ncs6 taggée pour révéler la présence d'ARNt dans la fraction co-précipitée. La présence des ARNt d'intérêt dans cette fraction est révélée par ajout, après migration sur gel d'acrylamide, d'une sonde radioactive.

B. LIQUID CHROMATOGRAPHY / MASS SPECTROSCOPY (LC/MS)

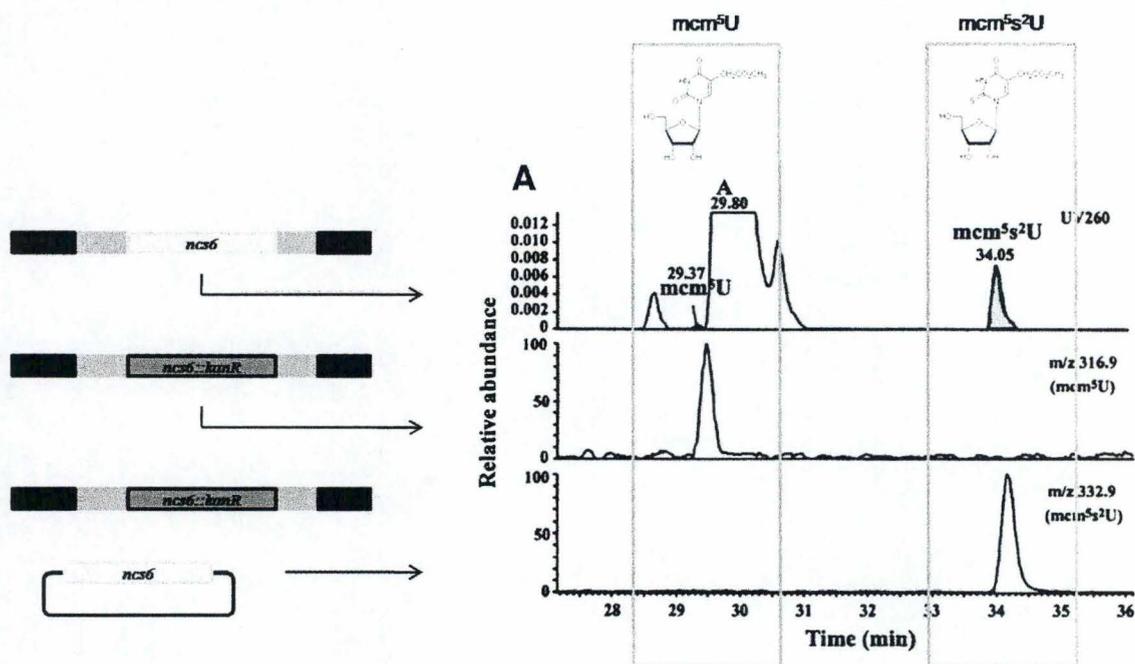


Figure 38 – Résultats prédits de l'HPLC suivie de la spectroscopie de masse réalisés sur une préparation d'ARNt si Ncs6 est bien de la thiolation des ARNt. Etude par LC/MS de trois souches : type sauvage, délétée pour ncs6 et le délétant complété par un plasmide portant ncs6.

La présence de la modification s^2U peut être analysée par HPLC-MS sur un lysat d'ARNt. L'absence de thiolation engendrera une différence de rétention lors de l'HPLC, et la différence de masse pourra être détectée par spectrométrie de masse.

Pour cela, il faut purifier les ARNt cytoplasmiques des ces différentes souches, les digérer à l'endo-ribonucléase et les passer sur colonne HPLC. Cette technique permet de séparer les différents nucléotides en fonction de leur affinité pour la phase solide ou liquide. Ensuite, les fractions d'éluion sont étudiées en spectrométrie de masse pour permettre d'identifier les différents nucléotides. Enfin, une étude des spectres des différentes souches permet de mettre en évidence une perte de la base mcm^5s^2U et une augmentation de l'intermédiaire mcm^5U (Note : *mcm5* réfère à une autre modification présente sur les uridines thiolées).

C. GEL APM

Il est également possible de purifier les ARNt de cellules en culture et de les séparer sur un gel d'acrylamide modifié de type APM (acryloyl-amino-phenyl-mercure-chloride). L'APM est un composé mercuré à haute affinité pour le soufre. Les ARNt thiolés sont retardés grâce à l'affinité entre le groupement thiol et le gel contenant l'APM.

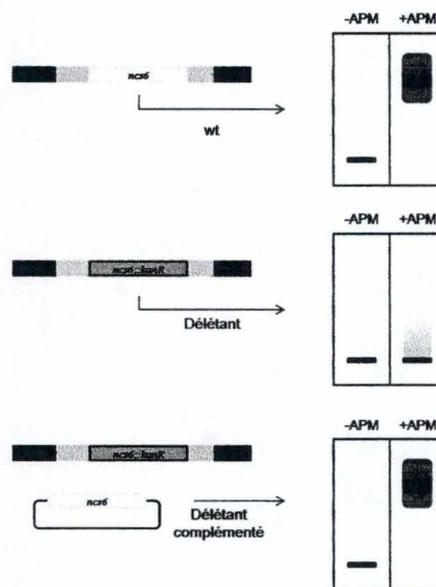


Figure 39 – Résultats de la migration en gel APM de fractions d'ARNt révélés par une sonde radioactive spécifique de certains types d'ARNt. Migration pour les trois souches d'intérêt : la sauvage, le délétant ainsi que le délétant complémenté par un plasmide.

Ensuite, grâce à une sonde spécifique d'ARNt marqué au P^{32} il est possible de révéler la position des ARNt d'intérêt dans le gel. En comparant des extraits d'ARNt dans la souche sauvage et les mutants, il serait possible de déceler une différence due à l'absence de thiolation de ces ARNt.

Matériel & Méthodes

MATERIEL ET METHODES	- 43 -
A. Souches utilisées	- 43 -
B. Extraction protéique	- 44 -
1. Préparation de protéines totales	- 44 -
2. Co-Immunoprécipitation	- 44 -
a) Etape 1 : Lavage des cellules	- 44 -
b) Etape 2: Lyse des cellules et extraction des protéines solubles	- 44 -
c) Etape 4 : IP sur billes d'Agarose-IGg	- 44 -
d) Etape 5 : Lavages	- 45 -
3. Gel SDS-PAGE	- 45 -
a) Migration en gel d'acrylamide	- 45 -
b) Blotting 1/2 dry	- 46 -
c) Immunodétection	- 46 -
C. Coloration DAPI et Calcofluor	- 47 -
1. Préparer la solution stock de DAPI	- 47 -
2. Préparer la solution stock de CALCOfluor	- 47 -
3. Fixer les cellules #1	- 47 -
4. Fixer les cellules #2	- 48 -
5. Réhydrater les cellules	- 48 -
6. Coloration	- 48 -
D. PCR et électrophorèse sur gel d'agarose	- 48 -
1. PCR « gene targeting »	- 48 -
2. PCR sur colonie	- 49 -
3. QIAquik PCR purification Kit Protocole	- 50 -
E. Transformation de levures	- 50 -
F. Extraction d'ADN total	- 50 -
G. Génétique	- 51 -
1. Random spore analysis	- 51 -
2. Dissection de tétrades	- 51 -
H. Protocoles relatifs à E. coli	- 51 -
1. Préparation de cellules électrocompétentes et transformation par électroporation	- 51 -
2. Minipréparation d'ADN plasmidique	- 52 -
3. Création et caractéristiques de la banque d'ADN génomique	- 52 -

MATERIEL ET METHODES

A. SOUCHES UTILISEES

wt h+	ade2-16	ura4-D18	leu1-32	
wt h-	ade2-16	ura4-D18	leu1-32	
<u>Pour la co-IP:</u>				
<i>ncs6-TAP-kanR</i>	nd	nd	nd	
<i>ncs2-GFP-kanR</i>	ade2-16	ura4-D18	leu1-32	
<u><i>ncs6</i>, <i>ncs2</i> et la création du double mutant de délétion :</u>				
<i>ncs2::kanR</i>	nd	ura4-D18	leu1-32	
<i>ncs6::kanR</i>	nd	ura4-D18	leu1-32	
<i>ncs6::kanR ncs2::kanR</i>	nd	ura4-D18	leu1-32	
<u>Pour l'étude des autres doubles mutants :</u>				
<i>skb1::kanR</i>	ade2-16	ura4-D18	leu1-32	
<i>ncs6::kanR skb1::kanR</i>	nd	ura4-D18	leu1-32	
<i>shk2::kanR</i>	ade2-16	ura4-D18	leu1-32	
<i>ncs6::kanR shk2::kanR</i>	nd	ura4-D18	leu1-32	
<i>skb5::kanR</i>	ade2-16	ura4-D18	leu1-32	
<i>ncs6::kanR skb5::kanR</i>	nd	ura4-D18	leu1-32	
<i>cdr2::kanR</i>	ade+	ura4-D18	///	
<i>ncs6::kanR cdr2::kanR</i>	nd	ura4-D18	leu1-32	
<i>orb2-34</i>	ade2-16	///	leu1-32	25°C
<i>ncs6::kanR orb2-34</i>	nd	ura4-D18	leu1-32	25°C
<i>cdc2-33</i>	ade+	///	leu1-32	25°C
<i>ncs6::kanR cdc2-33</i>	nd	ura4-D18	leu1-32	25°C
<i>cdc25-22</i>	ade2-16	///	leu1-32	25°C
<i>ncs6::kanR cdc25-22</i>	nd	ura4-D18	leu1-32	25°C
<u>Pour le crible de synthétiques létaux :</u>				
<i>natR-nmt81-ncs6-TAP-kanR</i>	nd	nd	nd	
<u>Pour l'étude du phénotype de surexpression et le double mutant :</u>				
<i>ncs2-3HA-kanR</i>	ade2-16	ura4-D18	leu1-32	
<i>ncs6-TAP-kanR</i>	nd	nd	nd	
<i>natR-nmt1-ncs2-3HA-kanR</i>	ade2-16	ura4-D18	leu1-32	
<i>natR-nmt1-ncs6-TAP-kanR</i>	nd	nd	nd	
<i>natR-nmt1-ncs2-3HA-kanR natR-nmt1-ncs6-TAP-kanR</i>	nd	nd	nd	
<u>Pour les mutants ponctuels thermosensibles de B8 :</u>				
<i>ncs6-natR</i>	ade2-16	ura4-D18	leu1-32	
<i>ncs6-ts27-natR</i>	nd	ura4-D18	leu1-32	25°C
<i>ncs6-ts32-natR</i>	nd	ura4-D18	leu1-32	25°C
<u>Pour la localisation cellulaire de B2 et B8 :</u>				
<i>ncs6-GFP</i>	ade2-16	ura4-D18	leu1-32	
<i>ncs2-GFP</i>	ade2-16	ura4-D18	leu1-32	

B. EXTRACTION PROTEIQUE

1. PREPARATION DE PROTEINES TOTALES

Le but de cette extraction est de récupérer les protéines totales, c'est à dire à la fois celles situées dans le cytoplasme et en membrane. L'extraction de protéines totales est réalisée selon le protocole de Matsuo et al. (Matsuo et al., 2006).

2. CO-IMMUNOPRECIPITATION

Pour la co-immunoprécipitation, une extraction non dénaturante des protéines solubles est réalisée afin de pouvoir précipiter, à l'aide d'anticorps spécifiques, des complexes protéiques.

A) ETAPE 1 : LAVAGE DES CELLULES

- Récolter et centrifuger environ 2×10^8 cellules pendant 5 minutes à 4000 rpm à 4°C,
- Laver le culot dans 1mL de tampon NP40 + PI (inhibiteur de protéases) froid,
- Centrifuger 10 secondes à 14000 rpm.

B) ETAPE 2: LYSE DES CELLULES ET EXTRACTION DES PROTEINES SOLUBLES

- Ajouter 200µL de NP40 + inhibiteur de protéases (Roche) au culot de cellules, resuspendre,
- Ajouter l'équivalent de 1,5mL de billes de verre à l'ensemble culot+tampon dans un eppendorf à capuchon vissé,
- FastPrep vitesse 5,5 pendant 20 secondes (4x),
- A l'aide d'une aiguille, trouser l'eppendorf à capuchon vissé et le placer sur un nouvel eppendorf puis centrifuger 4 minutes à 5000 rpm,
- Récupérer la partie liquide de l'Eppendorf du dessous,
- Mettre à niveau tous les tubes à 500µL avec du tampon NP40+PI,
- Centrifuger 10 minutes à 14000 rpm et à 4°C,
- Récupérer le surnageant contenant les protéines solubles.

C) ETAPE 4 : IP SUR BILLES D'AGAROSE-IGg

- Garder le surnageant (= les protéines solubles)
- Préparer les billes d'agarose (gardées à 4°C)
- Laver 200µL de billes stock (pour 3 tubes) dans IPP150, centrifuger 30 secondes à 1600rpm
- Resuspendre les billes dans le même volume de tampon (500µL de billes et 500µL de tampon dans Eppendorf)
- Ajouter 1/10 de billes (50µL) dans le volume total de protéines (500µL)
- Mélanger sur une roue pendant 2h

D) ETAPE 5 : LAVAGES

3x :

- Laver les billes dans 1mL d'IPP150,
- Centrifuger 30 secondes à 2000 rpm et à 4°C,

1x :

- Resuspendre les billes dans du tampon dénaturant « protein sample buffer » concentré 2x (25µL de tampon et 25µL de culot),
- Passage au bloc chauffant 5 minutes,
- Conserver à -20°C.

Tampon IPP150:

Tris-Hcl pH8 10mM;
NaCl 150mM;
Np-40 0,1%;
H₂O

HB buffer :

25 mM MOPS pH 7,2 ;
60 mM β glycérophosphate ;
15mM p-nitrophénylphosphate ;
15mM MgCl₂ ;
15mM EGTA ;
1mM DTT ;
0,1 mM sodium vanadate ;
1% triton X-100

NP40 buffer :

Na₂HPO₄ 6mM;
NaH₂PO₄ 4mM;
NP40 1%;
NaCl 150mM;
EDTA 2mM;
NaF 50mM
H₂O

3. GEL SDS-PAGE

A) MIGRATION EN GEL D'ACRYLAMIDE

- (1) MONTER LE DISPOSITIF
- (2) COULER LES GELS

	Running gel	Stacking gel
<i>Eau</i>	8,2 mL	3 mL
<i>Acryl/ bis 30% (à 4°C)</i>	6,6 mL	670 µL
<i>Tris 0,5M pH 8,8 = RUNNING BUFFER</i>	5 mL	/
<i>Tris 0,5M pH 6,8 = STACKING BUFFER</i>	/	1,25 mL
<i>APS 10% (à 4°C)</i>	200 µL	75 µL
<i>TEMED</i>	10 µL	5 µL
<i>V total :</i>	20 mL	5 mL

(3) CHARGER LES GELS ET LE TAMPON

- Remplir le réservoir du bas de 2 cm de running buffer (48mM TrisHCl, 39mM glycine, 0,037% SDS, 20% éthanol),
- Charger 15 µL de marqueur de taille (BIORAD) et 10 µL des échantillons,

- Monter la cuve supérieure et son caoutchouc,
- Remplir les cuves inférieures et supérieures de tampon SDS-PAGE running buffer,
- Faire migrer les protéines avec les paramètres 44mA, 300V, 100W, pendant 1h30.

B) BLOTTING 1/2 DRY

- Activer la membrane de PVDF au méthanol
- Humidifier les papiers Watman dans du Towbin buffer (25mM TrisHCl, 192mM glycine, 20% méthanol, 0,1% SDS, H₂O, pH entre 8,2 et 8,4)
- Passer la membrane PVDF du méthanol vers le tampon Towbin buffer
- Faire le montage dans l'appareil de transfert,
- Poser la membrane PVDF sur le gel sans faire de bulles,
- Faire le montage de bas en haut : watman sec/watman humide/watman humide/gel/membrane PVDF/watman humide/watman humide/watman sec,
- Fermer l'appareil de transfert,
- Transférer avec les paramètres 13V, 300 mA, pendant 45 minutes à 1h.

C) IMMUNODETECTION

BLOQUER LA MEMBRANE

- Dissoudre 2,5 g de lait en poudre dans 50 mL de PBS (phosphate buffered saline) + Tween 10%,
- Laisser sur le plateau agitant pendant 1h,

INCUBATION AVEC LES ANTICORPS PRIMAIRES

- Eliminer le lait et n'en garder que 10mL,
- Ajouter 10 µL d'anticorps pour 10 mL de lait (dilution 1/1000),
- Laisser sur le plateau agitant pendant 1h.

LAVAGES (3X)

- Remplir à moitié la boîte avec du PBS + Tween 10%
- Laisser sur le plateau agitant pendant 15 minutes.

INCUBATION AVEC LES ANTICORPS SECONDAIRES

- Eliminer le PBS+Tween et en remettre 10mL frais,
- Ajouter 5 µL d'anticorps pour 10 mL de lait (dilution 1/2000),
- Laisser sur le plateau agitant pendant 1h,

LAVAGES

- Remplir à moitié la boîte avec du PBS + Tween 10%,
- Laisser sur le plateau agitant pendant 15 minutes, 2 fois,
- Remplir à moitié la boîte de PBS seul,
- Laisser sur le plateau agitant pendant 15 minutes, 1 fois.

REVELATION

- Mélanger un volume égal de chaque réactif du kit Western Chemiluminescence Reagent Plus de Perkin Elmer TM (Cat. No. NEL 104)
- Déposer le mélange à la pipette de manière régulière sur toute la membrane,
- Incuber 1 minute à température ambiante,

Se préparer à l'exposition :

- Placer la membrane sur un papier épais et disposer du papier film tout autour,
- Aller en chambre noire (signal lumineux stable pendant 20 minutes),

Dans le noir :

- Exposer le film durant des temps croissants (7, 15, 30 secondes puis 1, 2 et 4 minutes),
- Développer le film.

C. COLORATION DAPI ET CALCOFLUOR

1. PREPARER LA SOLUTION STOCK DE DAPI

- Préparer une solution concentrée 1000x (1mg de DAPI dans 1 mL d'eau)
- Aliquoter par 50µL, conserver à -20°C
- Préparer la solution 1x de travail :
 - 1µL de solution 1000x
 - 500µL de glycérol
 - 500µL de Tris pH8 0,1M

2. PREPARER LA SOLUTION STOCK DE CALCOFLUOR

- Préparer une solution concentrée 20x (1mg de Calcofluor (4°C) dans 1mL d'eau)
- Aliquoter par 50µL, conserver à -20°C
- Préparer la solution 1x de travail :
 - 50µL de Calcofluor 20x
 - 500µL de glycérol
 - 450µL de tris pH8 0,1M

3. FIXER LES CELLULES #1

- Prende 1mL de cellules d'une DO 0,4 (soit $4,4 \times 10^6$ cellules),
- Centrifuger 10 secondes à 13000rpm,
- Laver dans 1mL d'eau,
- Centrifuger 15 secondes à 13000rpm,
- Resuspendre dans 1mL d'Ethanol 70%,
- Vortexer,
- Stocker à 4°C.

4. FIXER LES CELLULES #2

- Centrifuger 10 secondes à 13000rpm,
- Resuspendre dans 5 μ L d'eau,
- Etaler ces 5 μ L sur lame,
- Poser sur bloc chauffant à 70°C pour que l'eau s'évapore,
- Déposer 3 à 5 μ L de solution colorante sur les cellules,
- Observer au microscope à fluorescence.

5. REHYDRATER LES CELLULES

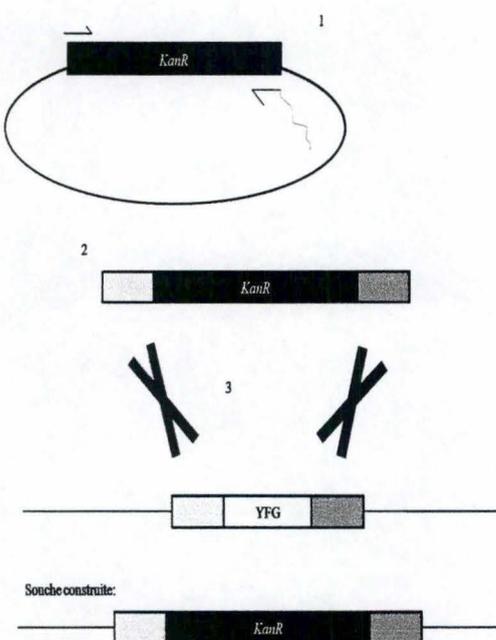
- Prendre 300 μ L de l'ependorf,
- Centrifuger 30 secondes à 13000rpm,
- Eliminer le surnageant,
- Réhydrater les cellules avec 1mL de PBS,
- Centrifuger 10 secondes à 13000rpm.

6. COLORATION

- Ajouter 3 à 20 μ L de colorant (Dapi ou Calcofluor) en fonction de la taille du culot,
- Etaler entre lame et lamelle,
- Observer au microscope à fluorescence.

D. PCR ET ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

1. PCR « GENE TARGETING »



Le but de la PCR « gene targeting » est de créer un morceau d'ADN linéaire dont les extrémités sont recombinogènes en vue d'une transformation et d'une intégration dans le génome de la levure.

Etape 1 : Amplification d'un fragment linéaire à partir d'un plasmide grâce à des amorces spécifiques à ce plasmide et allongées de 70 nucléotides homologues à une séquence d'intérêt dans le génome où la recombinaison doit se produire.

Etape 2 : Transformation du fragment linéaire dans la souche d'intérêt.

Etape 3 : Recombinaison homologue entre les fragments d'homologie du fragment linéaire et du génome de la levure.

- Master mix 4x100 μ L:

DNA	1,5 μ L	miniprep Quiagen = le Plasmide
Tampon pol 10x	40 μ L	15mM de MgCl ₂ final
dNTP (4x5=20mM)	20 μ L	1mM final
Primer 1: 100 μ M	3,2 μ L	0,8 μ M final
Primer 2: 100 μ M	3,2 μ L	0,8 μ M final
Expand Polymérase	4 μ L	
Eau	328 μ L	

- Diviser les 400 μ L dans 4 tubes PCR

- Lancer le programme « PCR EXPAND » :
 - 1) 2 minutes à 94°C pour la déshybridation des brins d'ADN,
 - 2) 30 secondes à 94°C,
 - 3) 1 minute à 50°C pour l'annealing des primers,
 - 4) 2 minutes à 68°C pour l'élongation,
 - 5) Recommencer 8 fois les étapes 2 à 4,
 - 6) 30 secondes à 94°C,
 - 7) 1 minute à 58°C,
 - 8) 3 minutes à 68°C,
 - 9) Recommencer 34 fois les étapes 6 à 8,
 - 10) 10 minutes à 68°C.

2. PCR SUR COLONIE

Le but de la PCR sur colonie est de vérifier, via des amorces spécifiques, que le fragment s'est intégré au bon endroit du génome. Cette PCR se fait directement sur des levures fraîches venant d'une culture solide et n'ayant subi aucun traitement préalable.

- Mix pour 100 μ L :

Levures	l'équivalent d'une pointe de tips	
Tampon pour polymérase (5x)	20 μ L	15mM de MgCl ₂ final
dNTP (4x5=20mM)	5 μ L	1mM final
Primer 1: 100 μ M	0,7 μ L	0,7 μ M final
Primer 2: 100 μ M	0,7 μ L	0,7 μ M final
Eau	73 μ L	

- Lancer le programme PCR Colony :
 - 1) 10 minutes à 100°C
 - 2) 4 minutes à 94°C, ajouter 0,5 μ L de GoTaqPol dans chaque tube PCR,
 - 3) 45 secondes à 94°C,
 - 4) 30 secondes à T_m-3°C pour l'annealing des primers,
 - 5) 2 minutes à 72°C pour l'élongation des nouveaux brins par la Taq polymérase,
 - 6) Recommencer 34 fois les étapes 2 à 5
 - 7) 10 minutes à 72°C.

3. QIAQUIK PCR PURIFICATION KIT PROTOCOLE

Le but de la purification d'ADN post-PCR (de 100bp à 10kb) est d'obtenir un fragment pur via des centrifugations sur colonnes, cette purification se fait grâce au kit Quiagen « PCR purification kit » (Cat. No. 28106).

E. TRANSFORMATION DE LEVURES

- Décongeler et dénaturer ADN carrier (ADN de sperme de saumon) 5 minutes dans bloc chauffant à 100°C,
- Inoculer une culture cellulaire liquide à DO 0,5 (5,5 x 10⁶ cellules/mL),
- Prendre 10⁸ cellules de la culture,
- Centrifuger 5 minutes à 4000 rpm,
- Enlever le surnageant, laver le culot dans 20mL d'eau stérile,
- Centrifuger 2 à 4 minutes à 4000 rpm,
- Eliminer le surnageant, récupérer le culot dans 1mL d'eau stérile,
- Faire un quick spin,
- Eliminer le surnageant, resuspendre le culot pour un volume final de 100µL dans du LiAc-TE (0,1M LiAc, 500mM EDTA, 1M TrisHCl)
- Ajouter 2µL d'ADN carrier bouilli
- Ajouter 15µL d'ADN post-PCR (notre fragment d'intérêt à transformer), mélanger doucement,
- Incuber 10 minutes à température ambiante,
- Ajouter 260µL de solution LiAC-TE-PEG 40%, mélanger doucement,
- Incuber 30 minutes à 32°C ,
- Ajouter 43µL de DMSO, mélanger doucement,
- Choc thermique à 42°C pendant 5 minutes,
- Centrifuger à 3000 rpm pendant 1 minute
- Resuspendre le culot dans 300µL d'eau stérile
- Séparer et ensemercer 100µL dans chaque boîte,
- Etaler sur les boîtes à l'aide de billes de verre,
- Le lendemain, répliquer sur milieu sélectif.

F. EXTRACTION D'ADN TOTAL

- Inoculer une préculture de 5mL et laisser croître overnight,
- Centrifuger 1,5 mL de cette culture 5 secondes à 14000 rpm,
- Eliminer le surnageant, rompre le culot en vortexant,
- Resuspendre le culot dans
 - o 200 µL de breaking buffer (2% triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM tris Cl pH8, 1 mM EDTA),
 - o 200 µL de bille de verre,
 - o 200 µL de mélange phénol/chlorophorm/ isoamyl alcool,
- Vortexer 2 minutes à haute vitesse ou 6x20 secondes de Fastprep, vitesse 5,5,
- Centrifuger 5 minutes à 14000 rpm.

G. GENETIQUE

1. RANDOM SPORE ANALYSIS

- Faire un croisement sur milieu « Malt Extract », le laisser incuber à 25°C pendant 2 à 3 jours,
- Prendre l'équivalent d'une anse de cellules et les resuspendre dans 1mL d'eau stérile,
- Ajouter 2µL d'hélicase (*Helix pomatia* juice) pour digérer la paroi des tétrades et tuer les cellules végétatives alors que les spores sont résistantes,
- Incuber à 29°C pendant 6h ou à 25°C overnight,
- Diluer 1000x le mélange et étaler 100µL sur milieu riche ou sélectif.

2. DISSECTION DE TETRADES

- Faire un croisement, le laisser incuber à 25°C pendant 2 à 3 jours,
- A l'aide du micromanipulateur, isoler et disséquer une dizaine de tétrades issues du croisement,
- Incuber jusqu'à ce que chacune des spores forme une colonie.

H. PROTOCOLES RELATIFS A E. COLI

1. PREPARATION DE CELLULES ELECTROCOMPETENTES ET TRANSFORMATION PAR ELECTROPORATION

- Inoculer 5mL de LB, laisser croître overnight,
- Diluer cette préculture dans 500 mL de LB, laisser croître jusqu'à une DO de 0,5 à 0,6 (6x10 cellules),
- Glacer les cellules pendant 10 à 15 minutes,
- Centrifuger 20 minutes à 5000 rpm à 2°C,
- Resuspendre le culot dans 5 mL d'eau glacée, laver 2x dans 500 mL d'eau glacée,
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans le liquide restant,
- Placer le culot resuspendu dans un récipient froid,
- Centrifuger 10 minutes à 5000rpm et 2°C,
- Estimer le culot (environ 500µL si on est parti de 500 mL de culture au départ),
- Ajouter un volume égal au culot d'eau glacée pour resuspendre,
- Aliquoter par 50 à 300 µL dans des eppendorfs glacés.
- Régler l'appareil d'électroporation sur 2,5 kV, 25 µF et 200 à 400 Ohm,
- Ajouter 1µL d'ADN à transformer aux cellules compétentes,
- Transférer le mélange dans une cuvette glacée,
- Sécher l'extérieur, et électroporer,
- Retirer la cuvette et ajouter 1 mL de milieu SOC,
- Transférer dans un eppendorf stérile,
- Incuber 30 à 60 minutes à 36°C sous agitation,
- Etaler sur des boîtes de milieu sélectif.

Efficienc e théorique : 10^9 transformants par µg d'ADN

2. MINIPREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE

Le but d'une minipréparation d'ADN sur *E. coli* est de récolter le plasmide précédemment transformé. Ce plasmide est amplifié par *E. coli* et récolté par minipréparation sur colonne grâce au kit « Nucleospin plasmid » de « Macherey-Nager » (Cat No. 740 588 250).

3. CREATION ET CARACTERISTIQUES DE LA BANQUE D'ADN GENOMIQUE

Lors de la construction de la banque, les auteurs (Barbet et al., 1992) sont partis de plasmides de type pUC18 et pUC19 dans lesquels ont été ajoutés un marqueur de sélection URA4 et un site de réplication en levure *ars1* pour former respectivement les plasmides pUR18 et pUR19. Dans ces plasmides on a introduits des fragments génomiques d'une taille moyenne de 3,5kb (de 2,5 à 10kb) obtenus par digestion partielle de génomes par l'enzyme de restriction *Sau3A*. La restriction partielle et non totale permet une digestion différente de plusieurs génomes et donc la représentation dans la banque de l'ensemble des gènes par plusieurs fragments se chevauchant. De cette manière furent construits 22.000 clones comportant des plasmides pURSP1.

On sait, d'après les caractéristiques de cette banque que l'on doit obtenir 5000 cellules transformantes. Les transformants sont des cellules ayant reçu le plasmide et exprimant correctement ce qu'il porte, d'où la capacité de pousser sur milieu sans uracile. Des tests préliminaires de transformation de la banque dans une souche sauvage ont produit un chiffre proche des 3500 transformants par μg d'ADN de banque transformé. Dès lors, pour avoir une bonne couverture du génome de *S. pombe* (comportant 14.000 kb), il faut réaliser 3 à 4 transformations. En effet, en une transformation d' $1\mu\text{g}$ de banque, on obtient 3500 transformants portant des plasmides contenant des inserts de taille moyenne de 3,5kb. Dès lors, en 1 transformation on couvre 12.250 kb et en 3 transformations, on couvre facilement 36.000 kb c'est-à-dire presque trois fois complètes le génome.

BIBLIOGRAPHIE

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.
- Ashraf, S.S., Sochacka, E., Cain, R., Guenther, R., Malkiewicz, A. and Agris, P.F. (1999) Single atom modification (O \rightarrow S) of tRNA confers ribosome binding. *Rna*, **5**, 188-194.
- Barbet, N., Muriel, W.J. and Carr, A.M. (1992) Versatile shuttle vectors and genomic libraries for use with *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene*, **114**, 59-66.
- Bokoch, G.M. (2003) Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem*, **72**, 743-781.
- Breeding, C.S., Hudson, J., Balasubramanian, M.K., Hemmingsen, S.M., Young, P.G. and Gould, K.L. (1998) The *cdr2(+)* gene encodes a regulator of G2/M progression and cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, **9**, 3399-3415.
- Bullerwell, C.E., Leigh, J., Forget, L. and Lang, B.F. (2003) A comparison of three fission yeast mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res*, **31**, 759-768.
- Crick, F.H. (1966) Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J Mol Biol*, **19**, 548-555.
- Esberg, A., Huang, B., Johansson, M.J. and Bystrom, A.S. (2006) Elevated levels of two tRNA species bypass the requirement for elongator complex in transcription and exocytosis. *Mol Cell*, **24**, 139-148.
- Fantes, P. and Nurse, P. (1977) Control of cell size at division in fission yeast by a growth-modulated size control over nuclear division. *Exp Cell Res*, **107**, 377-386.
- Fisher, D. and Nurse, P. (1995) Cyclins of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Semin Cell Biol*, **6**, 73-78.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Luca-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.Y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W. and Johnston, M. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, **418**, 387-391.
- Gilbreth, M., Yang, P., Bartholomeusz, G., Pimental, R.A., Kansra, S., Gadiraju, R. and Marcus, S. (1998) Negative regulation of mitosis in fission yeast by the *shk1*

- interacting protein skb1 and its human homolog, Skb1Hs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14781-14786.
- Goehring, A.S., Mitchell, D.A., Tong, A.H., Keniry, M.E., Boone, C. and Sprague, G.F., Jr. (2003) Synthetic lethal analysis implicates Ste20p, a p21-activated protein kinase, in polarisome activation. *Mol Biol Cell*, **14**, 1501-1516.
- Hedges, S.B. (2002) The origin and evolution of model organisms. *Nat Rev Genet*, **3**, 838-849.
- Kanoh, J. and Russell, P. (1998) The protein kinase Cdr2, related to Nim1/Cdr1 mitotic inducer, regulates the onset of mitosis in fission yeast. *Mol Biol Cell*, **9**, 3321-3334.
- Lew, D.J. and Kornbluth, S. (1996) Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 795-804.
- Lindner. (1983) *Wochenschrift für Brauerei* Vol. 10, pp. 1298-1300.
- Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M. and Beach, D. (1991) mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell*, **64**, 1111-1122.
- Marcus, S., Polverino, A., Chang, E., Robbins, D., Cobb, M.H. and Wigler, M.H. (1995) Shk1, a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* Ste20 and mammalian p65PAK protein kinases, is a component of a Ras/Cdc42 signaling module in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6180-6184.
- Matsuo, Y., Asakawa, K., Toda, T. and Katayama, S. (2006) A rapid method for protein extraction from fission yeast. *Biosci Biotechnol Biochem*, **70**, 1992-1994.
- Maundrell, K. (1990) nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem*, **265**, 10857-10864.
- Millar, J.B., Lenaers, G. and Russell, P. (1992) Pyp3 PTPase acts as a mitotic inducer in fission yeast. *Embo J*, **11**, 4933-4941.
- Miller, P.J. and Johnson, D.I. (1994) Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **14**, 1075-1083.
- Moser, B.A. and Russell, P. (2000) Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 631-636.
- Parmley. (2007) How do synonymous mutations affect fitness? *BioEssays*, **29**, 515-519.
- Pothof, J., van Haften, G., Thijssen, K., Kamath, R.S., Fraser, A.G., Ahringer, J., Plasterk, R.H. and Tijsterman, M. (2003) Identification of genes that protect the *C. elegans* genome against mutations by genome-wide RNAi. *Genes Dev*, **17**, 443-448.
- Qyang, Y., Yang, P., Du, H., Lai, H., Kim, H. and Marcus, S. (2002) The p21-activated kinase, Shk1, is required for proper regulation of microtubule dynamics in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol*, **44**, 325-334.
- 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. (1987a) The mitotic inducer *nim1+* functions in a regulatory network of protein kinase homologs controlling the initiation of mitosis. *Cell*, **49**, 569-576.
- Russell, P. and Nurse, P. (1987b) Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*, **49**, 559-567.
- Shigi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T. and Watanabe, K. (2006) Identification of two tRNA thiolation genes required for cell growth at extremely high temperatures. *J Biol Chem*, **281**, 14296-14306.
- Sylvers, L.A., Rogers, K.C., Shimizu, M., Ohtsuka, E. and Soll, D. (1993) A 2-thiouridine derivative in tRNA^{Glu} is a positive determinant for aminoacylation by Escherichia coli glutamyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, **32**, 3836-3841.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-4680.
- Yang, P., Kansra, S., Pimental, R.A., Gilbreth, M. and Marcus, S. (1998) Cloning and characterization of *shk2*, a gene encoding a novel p21-activated protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem*, **273**, 18481-18489.
- Yang, P., Pimental, R., Lai, H. and Marcus, S. (1999) Direct activation of the fission yeast PAK Shk1 by the novel SH3 domain protein, Skb5. *J Biol Chem*, **274**, 36052-36057.
- Young, P.G. and Fantes, P.A. (1987) Schizosaccharomyces pombe mutants affected in their division response to starvation. *J Cell Sci*, **88 (Pt 3)**, 295-304.