

Université de Montréal

Caractérisation du complexe Lre1p/Gsp1p chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

par

Karine Lainesse

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)
en microbiologie et immunologie

Décembre, 2003



©, Karine Lainesse, 2003

W

4

USE

2004

V.085

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Caractérisation du complexe Lre1p/Gsp1p chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

présenté par :
Karine Lainesse

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Marc Drolet
(président-rapporteur)

Dr. Pierre Belhumeur
(directeur de recherche)

Dr. Guy Lemay
(membre du jury)

Mémoire accepté le :

Résumé

Gsp1p est une petite protéine G nucléaire chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* hautement conservée chez les eucaryotes (83 % d'homologie à la protéine humaine RAN). Bien que son rôle dans le transport nucléocytoplasmique des macromolécules est bien défini, des données génétiques et biochimiques récentes associent Gsp1p à d'autres fonctions cellulaires à caractériser. Lors de la recherche de partenaires potentiels de Gsp1p par la technique de la librairie d'épitopes phagiques, nous avons identifié la séquence SPLRPSL retrouvée dans la protéine Lre1p (acides aminés 205-211). Le produit du gène *LRE1* est fort peu caractérisé. Nous avons montré que plusieurs phénotypes semblent impliquer cette protéine dans la voie de l'AMPC, tel que la levée du silencing transcriptionnel télomérique en plus de la sensibilité au glucose et à la caféine. Or, des études génétiques convaincantes ont démontrées que Lre1p pourrait exercer tous ces effets via des cibles partagées (et des effecteurs en aval) de la voie AMPc/PKA. Nous avons montré que Lre1p est majoritairement nucléaire, en plus d'être associée à la chromatine, et minoritairement mitochondriale via une fusion Lre1p-protA fonctionnelle localisée dans ces compartiments. De plus, des essais de transcription-traduction et de co-immunoprécipitation ont révélé que Gsp1p et Lre1p interagissent ensemble, autant *in vitro* qu'*in vivo*. L'identification des gènes *IMP2* et *RRP6* en tant que partenaires génétiques de *LRE1* lors d'un criblage de létalité synthétique systématique ont permis d'associer, au produit de ce gène, des fonctions mitochondriale et exosomale à caractériser. L'identification des partenaires protéiques de Lre1p devrait nous permettre de mieux comprendre la fonction de cette protéine et la signification biologique de son interaction avec Gsp1p.

Mots clés : protéine G, voie AMPc/PKA, fonction exosomale, fonction mitochondriale

Summary

Gsp1p is a nuclear-located small GTP-binding protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* which is highly conserved among eukaryotic cells (83 % identical to its human homolog RAN). Although its implication in the nucleocytoplasmic trafficking of macromolecules has been demonstrated, new genetic and biochemical data associate Gsp1p to other cellular functions to characterize. The search for potential partners of Gsp1p by *Phage Display Screening* allowed us to identify the SPLRPSL sequence found in Lre1p (amino acids 205-211). The function of the gene *LRE1* is not well known. While we showed that various phenotypes seemed to involve this protein in the cAMP pathway like the lost of telomeric transcriptional silencing in addition to caffeine and carbon-source sensitivity, convincing genetic studies showed however that Lre1p may exert all these effects through shared targets (and downstream effectors) of the cAMP/PKA pathway. We showed that Lre1p is mostly nuclear, in addition to be chromatin-associated, but also found in the mitochondria by locating a functional Lre1p-protA fusion in those compartments. Moreover, transcription-translation and co-immunoprecipitation experiments revealed that Gsp1p and Lre1p interact together both *in vitro* and *in vivo*. The identification of the genes *IMP2* and *RRP6* by *Systematic Genetic Analysis* as genetic partners of *LRE1* allowed its association to mitochondrial and exosomal functions to characterize. The identification of the protein partners of Lre1p should enable us to better understand its function and the biological significance of its interaction with Gsp1p.

Key words : G protein, cAMP/PKA pathway, exosomal function, mitochondrial function

Table des matières

Résumé	iii
Summary	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations utilisées dans le texte	x
Remerciements	xiii
CONTEXTE THÉORIQUE	1
1. La petite protéine Gsp1p	2
1.1. Caractéristiques de Gsp1p	2
1.2. Cycle GDP/GTP de Gsp1p/Ran	5
1.3. Rôles cellulaires de Gsp1p/Ran	9
1.3.1. Généralités	9
1.3.2. Transport nucléocytoplasmique	10
1.3.3. Maturation des ARN ribosomiaux	17
1.3.4. Régulation du cycle cellulaire	18
1.3.5. Régulation du réseau des microtubules	21
1.3.6. Biogenèse et organisation nucléaire	23
1.4. Rationalisation du projet de recherche	26
2. La protéine Lre1p	27
2.1. Caractéristiques de Lre1p	27
2.2. Rôles cellulaires de Lre1p	27
2.2.1. Généralités	27
2.2.2. Maintien et assemblage de la paroi cellulaire	28
2.2.3. Contrôle de cibles affectées par la protéine kinase dépendante de l'AMPc	31
2.2.4. Inhibiteur de la kinase Cbk1p	36
3. Problématique et objectifs de travail	37

MÉTHODE	39
1. Milieux de culture, plasmides et souches utilisées	40
2. Clonages	40
3. Obtention de mutants <i>lre1Δ</i> par la méthode de remplacement de gène	46
4. Transformation bactérienne	48
5. Transformation de levures	49
6. Production d'anticorps anti-Lre1p	49
7. Immunobuvardage	50
8. Essais d'interaction <i>in vitro</i>	50
8.1. Production et purification de GST et GST-Gsp1p	50
8.2. Réactions de transcription-traduction <i>in vitro</i>	51
8.3. Essais d'interaction <i>in vitro</i>	52
9. Essais d'interaction <i>in vivo</i> par co-immunoprécipitation	52
10. Localisation cellulaire de Lre1p-ProtA par fractionnement subcellulaire	53
10.1. Fractionnement subcellulaire	53
10.2. Purification des mitochondries	54
10.3. Purification des noyaux	55
10.4. Analyse des différentes fractions	55
11. Purification de chromatine	56
12. Étude des phénotypes associés aux mutants <i>lre1Δ</i>	57
12.1. Sensibilité à différentes sources de carbone	57
12.2. Sensibilité à la caféine	58
12.3. Essais de silencing transcriptionnel	58
13. Purification de complexes protéiques par chromatographie d'affinité	59
13.1. Construction de la souche W303 <i>LRE1-TAP</i>	59
13.2. Purification des complexes protéiques	60
14. Étude des phénotypes associés à la délétion du gène <i>LRE1</i> chez des souches <i>rho⁰</i>	62
14.1. Obtention des mutants <i>rho⁰</i>	62
14.2. Sensibilité au glucose	62
14.3. Sensibilité au peroxyde d'hydrogène	62

RÉSULTATS	64
1. Les protéines Lre1p et Gsp1p interagissent ensemble <i>in vitro</i>	65
2. Les protéines Lre1p et Gsp1p interagissent <i>in vivo</i>	67
3. La localisation cellulaire de la protéine de fusion Lre1p-ProtA est majoritairement nucléaire et une sous-population de celle-ci est associée à la chromatine	69
4. Des phénotypes communs à ceux observés chez des mutants de la voie PKA sont associés à la délétion de <i>LRE1</i>	75
5. La purification par affinité en tandem pour identifier les partenaires protéiques de Lre1p	80
6. Une fonction mitochondriale pourrait être associée à Lre1p	84
DISCUSSION	91
CONCLUSION ET EXPÉRIENCES FUTURES	100
RÉFÉRENCES	104

Liste des tableaux

Tableau I : Multiples rôles de Gsp1p/Ran : ses effecteurs et ses cibles	11
Tableau II : Récepteurs spécifiques aux séquences signal nucléocytoplasmiques retrouvées dans leur substrat de transport	16
Tableau III: Milieux de culture utilisés	41
Tableau IV: Plasmides utilisés	42
Tableau V : Souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilisées	44

Liste des figures

Figure 1 : Séquences consensus et structure des petites protéines G de la famille Ran	4
Figure 2 : Régulation du cycle GDP/GTP de Gsp1p	6
Figure 3 : Voie de transduction de signal de la protéine kinase dépendante de l'AMPc	32
Figure 4 : Essai d'interaction <i>in vitro</i> entre Lre1p* et GST-Gsp1p	66
Figure 5 : Essai d'interaction <i>in vivo</i> entre Lre1p et HA-Gsp1p	68
Figure 6 : Localisation cellulaire de Lre1p-ProtA par fractionnement subcellulaire	70
Figure 7 : Caractérisation de la liaison de Lre1p-ProtA à la chromatine par essai de purification de chromatine	74
Figure 8 : Effet de la mutation <i>lre1Δ</i> sur la sensibilité au glucose	76
Figure 9 : Effet de la mutation <i>lre1Δ</i> sur la sensibilité à la caféine	78
Figure 10: Effet de la mutation <i>lre1Δ</i> sur le silencing transcriptionnel télomérique	79
Figure 11: Identification de partenaires protéiques de Lre1p-TAP par purification par affinité en tandem	82
Figure 12: Effet de la mutation <i>lre1Δ</i> , dans un contexte génétique <i>rho⁰</i> , sur la sensibilité au glucose	87
Figure 13: Effet de la mutation <i>lre1Δ</i> , dans un contexte génétique <i>rho⁰</i> , sur la sensibilité au peroxyde d'hydrogène	89

Liste des abréviations utilisées dans le texte

ADN: Acide désoxyribonucléique
ADNmt: ADN mitochondrial
AMP: Adénosine 5'-monophosphate
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ARN, ARNs : Acide ribonucléique
ARNm: ARN messenger
ARNr : ARN ribosomal
ARNt : ARN de transfert
ATP : Adénosine 5'-triphosphate
CBP : « Calmodulin Binding Protein » ou peptide de liaison à la calmoduline
CEN : Origine de réplication centromérique
dATP: Désoxyadénosine 5'-triphosphate
dCTP: Désoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP: Désoxyguanosine 5'-triphosphate
dNTP: Désoxynucléoside 5'-triphosphate
D.O. : Densité optique
dTTP: Désoxythymidine 5'-triphosphate
GDP : Guanosine 5'-diphosphate
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
GST : Gluthatione-S-transférase
GTP : Guanosine 5'-triphosphate
GTPase : Protéine hydrolysant le GTP en GDP et Pi
GTPasique : Activité associée aux protéines hydrolysant le GTP en GDP et Pi
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HA : Héماغglutinine HA
HOG: « High osmolarity glycerol response »
IgG : Immunoglobuline G
kb : Kilobases

kDa : Kilodaltons

MAP: Protéine kinase activée par les mitogènes

MDa : Mégadaltons

MMS: Méthylméthane sulfonate

MPF : Facteur promoteur de la mitose

NES : Signal d'export nucléaire

NLS : Signal de localisation nucléaire

NPC, NPCs : Complexe du pore nucléaire

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PEG : Polyéthylène glycol

Pi : Phosphate inorganique

PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc

PKC : Protéine kinase C

SDS-PAGE : « SDS-polyacrylamide gel electrophoresis »

TAP : « Tandem Affinity Purification » ou purification par affinité en tandem

TEV : « Tobacco Etch Virus » ou virus de la mosaïque du tabac

UTR : « Untranslated region » ou région non-traduite

La vérité ne nécessite
aucune explication,
seulement de la
réflexion.
Jamie Sams

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier le Dr. Pierre Belhumeur pour m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi que pour ses conseils judicieux qui ont été très formatifs tout au long de ma maîtrise.

Je désire également remercier Martin Clément et Kathleen Couillard qui, par leurs efforts, ont donné naissance à ce projet. Leur expérience et leur dévouement m'ont été très profitables et je leur en suis extrêmement reconnaissante. Je souhaite aussi remercier Guillaume Lesage du laboratoire du Dr. Howard Bussey pour nous avoir transmis les résultats de l'essai de létalité synthétique avec *LRE1*.

Je tiens à remercier mes autres collègues de laboratoire, Philippe D. Tarte, Sébastien Croisetière et Mylène Lavoie, pour tout le soutien moral et technique qu'ils m'ont apportée.

Je remercie tout spécialement mon fiancé, Maxime, de même que mes parents, Carole et Daniel, ainsi que mes frères, Patrick et David, pour leur disponibilité et leur support. Leurs encouragements m'ont aidée à surmonter les périodes plus difficiles et à me réjouir de mes réussites.

Enfin, je désire souligner le support financier qui m'a été attribué lors de mes études graduées par le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, la Fondation du Docteur Georges Phénix ainsi que le Département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal.

CONTEXTE THÉORIQUE

1. La petite protéine Gsp1p

1.1. Caractéristiques de Gsp1p

Les gènes *GSP1* et *GSP2* de *Saccharomyces cerevisiae* ont été identifiés en 1993 par deux équipes de recherche dans le but de mieux comprendre le contrôle de la voie *PRP20/MTR1/SRM1*. À cette époque, les recherches semblaient démontrer que cette voie était impliquée dans le maintien de l'organisation nucléaire ainsi qu'au niveau du contrôle du métabolisme et de l'export des ARNm. Ils ont tout d'abord été isolés lors d'un criblage de gènes provenant d'une librairie génomique de *S. cerevisiae* qui, lorsque exprimés en copies multiples, suppriment le phénotype létal associé au mutant thermosensible *prp20-1* (Belhumeur *et al.*, 1993). Presque simultanément, deux séquences génétiques homologues au gène *SP11*, l'homologue de *GSP1* chez *Schizosaccharomyces pombe*, ont été identifiés par PCR génomique de *S. cerevisiae* à l'aide d'amorces dégénérées (Kadowaki *et al.*, 1993). Ils ont nommé ces deux gènes différents *CNR1* et *CNR2* (Conserved Nuclear Ras homologs 1 and 2). Puisque, temporellement, la publication des gènes *GSP1* et *GSP2* a précédé celle décrivant *CNR1* et *CNR2*, cette première dénomination a été retenue dans la littérature.

L'analyse de la séquence de ces deux gènes a permis de montrer qu'ils codent pour des polypeptides de 219 et 220 acides aminés dont les poids moléculaires calculés sont de 24 974 et 24 794 Daltons respectivement. Ces deux protéines possèdent 97,7 % d'identité et leurs séquences nucléotidiques présentent 83,3 % d'homologie. Cependant, plusieurs caractéristiques permettent de distinguer ces deux produits de gènes. Tout d'abord, le gène *GSP1* est essentiel et situé sur le chromosome XII tandis que le chromosome XV renferme la séquence du gène *GSP2* qui code pour un produit qui n'est pas essentiel. De plus, les niveaux d'expression du gène *GSP2* sont dix fois moins élevés que ceux de *GSP1* et dépendent de la source de carbone utilisée. En plus, ils sont inductibles par le MMS (Jelinsky & Samson, 1999). Cependant, *GSP2* peut compléter un mutant *gsp1Δ* lorsqu'il est

surexprimé (Belhumeur *et al.*, 1993). La présence de deux versions de cette protéine pourrait permettre à cette espèce de s'adapter à différentes conditions environnementales grâce à la régulation de ces gènes (Garcia-Ranea & Valencia, 1998).

Bien que le génome de la levure *S. cerevisiae* code pour deux homologues de ce gène, celui des plantes supérieures semble renfermer plus que deux copies alors que les mammifères n'en possèdent qu'une seule version (Merkle *et al.*, 1994). Cette redondance serait la conséquence d'un mécanisme évolutif de duplication des chromosomes XII et XV chez la levure (Wolfe & Shields, 1997). Même s'il y a divergence en ce qui concerne le nombre de copies de ce gène par génome chez ces organismes eucaryotes, son produit demeure hautement conservé (Figure 1A). Effectivement, la protéine Gsp1p partage 88 % d'identité avec son homologue humain Ran (Ras-like nuclear G protein) (Bischoff & Ponstingl, 1991b; Belhumeur *et al.*, 1993). Le maintien de cette information génétique ainsi que le haut degré de similarité chez différentes espèces éloignées suggèrent que cette protéine doit intervenir dans des mécanismes cellulaires hautement conservés chez les eucaryotes.

La protéine Gsp1p fait partie de la famille des petites protéines pouvant lier le GTP (protéines G). Les petites protéines G ont une structure bien particulière (Figure 1B). Elles renferment généralement cinq séquences consensus responsables du métabolisme du nucléotide guanine, soit l'interaction spécifique avec le GTP ou le GDP et l'activité GTPase. Cette dernière est nécessaire à l'hydrolyse du GTP lié à la protéine en GDP et Pi. Le changement de conformation provoqué lors de l'acquisition d'un autre état de liaison au nucléotide guanine se produit au niveau des boucles switch I et switch II de la protéine, deux régions très flexibles entourant le phosphate γ du GTP (Milburn *et al.*, 1990; Vetter *et al.*, 1999a; Vetter *et al.*, 1999b). De plus, les petites protéines G possèdent une région nécessaire à l'interaction avec leurs protéines effectrices en plus de séquences à leur extrémité COOH affectées par des modifications post-traductionnelles lipidiques requises pour leur ancrage à des

membranes cellulaires (Bourne *et al.*, 1991; Takai *et al.*, 1992; Valencia *et al.*, 1991). Il est important de noter que la protéine Gsp1p ne possède pas ce domaine C-terminal, ce qui implique qu'elle est présente sous forme soluble dans la cellule (Belhumeur *et al.*, 1993). Cependant, elle renferme, à cette position, la séquence DEDDDL, très bien conservée chez la famille Ran et impliquée dans la stabilité de la protéine en conformation liée en GDP (Scheffzek *et al.*, 1995, Vetter *et al.*, 1999b). De plus, elle semble permettre l'interaction de Ran-GTP avec ses effecteurs renfermant un domaine de liaison à Ran (Richards *et al.*, 1995).

1.2. Cycle GDP/GTP de Gsp1p/Ran

Les petites protéines G ayant la capacité d'acquérir deux conformations interchangeables, elles jouent un rôle d'interrupteur moléculaire. En effet, suite à la réception d'un signal, ces protéines deviennent actives en adoptant un état de liaison en GTP à partir de leur conformation inactive liée en GDP. Ce changement de forme induit par cette activation permet de rendre la région effectrice des protéines G accessible à l'interaction avec leurs effecteurs (Bourne *et al.*, 1990; Hall, 1990; Takai *et al.*, 1992). Cette conversion cyclique des deux états de Gsp1p/Ran est très lente, car cette dernière lie les nucléotides guanines très fortement et possède un faible pouvoir intrinsèque d'hydrolyse du GTP. Le facteur d'échange de nucléotide guanine Prp20p, et son homologue humain RCC1, stimulent donc la dissociation du GDP lié à Gsp1p/Ran par un facteur de 10^5 (Bischoff & Ponstingl, 1991a; Klebe *et al.*, 1995). En ce qui concerne l'activité GTPase de cette dernière, elle peut être augmentée de plus de 10^5 fois via une stimulation par la protéine activatrice de la GTPase Rna1p, ou son homologue humain RanGAP1 (Gideon *et al.*, 1992; Becker *et al.*, 1995; Klebe *et al.*, 1995; Bischoff *et al.*, 1995a). Ces deux activités prenant place dans deux compartiments différents, Prp20p/RCC1 étant associée aux histones H2A et H2B de la chromatine (Ohtsubo *et al.*, 1989; Frasch, 1991, Seki *et al.*, 1996; Nemergut *et al.*, 2001) et Rna1p/RanGAP1 étant localisée dans le cytoplasme et à la face cytoplasmique des pores nucléaires en association avec Nup358p/RanBP2 (Matunis

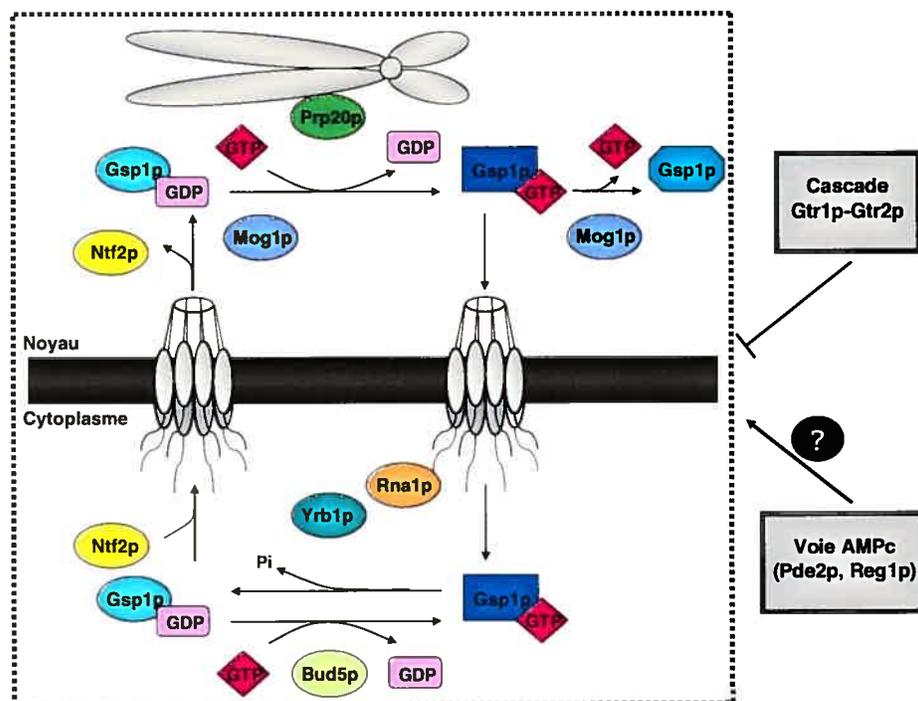


Figure 2 – Régulation du cycle GDP/GTP de Gsp1p. L'hydrolyse de GTP prend place dans le cytoplasme, stimulée par Rna1p, alors que l'échange de nucléotide guanine peut avoir lieu dans les deux compartiments, catalysée par Prp20p dans le noyau et Bud5p dans le cytoplasme. Les protéines Yrb1p et Mog1p co-activent ces réactions respectives. La protéine Ntf2p est nécessaire au recyclage de Gsp1p-GDP dans le noyau, endroit où elle est principalement localisée, et agit à titre d'inhibiteur de la dissociation du nucléotide guanine. La cascade Gtr1p-Gtr2p régule négativement ce cycle. L'effet de la voie AMPc sur celle-ci n'est pas encore bien connu (modifié de Künzler & Hurt, 2001).

et al., 1996; Mahajan *et al.*, 1997; Haberland *et al.*, 1997; Matunis *et al.*, 1998), Gsp1p/Ran doit osciller entre le noyau et le cytoplasme afin d'effectuer un cycle GDP/GTP complet (Figure 2). Cette localisation différentielle de Gsp1p en fonction de l'emplacement de ses régulateurs a été démontrée chez les mutants *mal-1* et *prp20-1*. En effet, il y a une accumulation de la protéine G dans le noyau chez le premier alors que cette localisation nucléaire est inhibée chez le second (Stochaj *et al.*, 2000). La distribution différente de ces régulateurs permet donc l'établissement d'un gradient de Gsp1p-GTP dans la cellule. Effectivement, elle suggère que Gsp1p/Ran soit retrouvée principalement liée en GTP au niveau du noyau et en conformation liée en GDP dans le cytoplasme. Il est important de souligner que la

protéine Gsp1p/Ran est très abondante et majoritairement nucléaire (Bischoff & Ponstingl, 1991b, Belhumeur *et al.*, 1993).

En plus de Prp20p/RCC1 et Rna1p/RanGAP, d'autres travaux ont permis d'isoler de nouveaux régulateurs du cycle GTP/GDP de Gsp1p/Ran (Figure 2). Tout d'abord, Yrb1p/RanBP1 a été identifiée comme protéine accessoire dans ce cycle en permettant la co-activation de l'activité GTPasique de Gsp1p/Ran via Rna1p/RanGAP. Effectivement, elle augmente de dix fois la vitesse d'hydrolyse de GTP accélérée par Rna1p/RanGAP sans toutefois posséder une activité de stimulation de la GTPase (Bischoff *et al.*, 1995b). Il semble que son homologue humain, RanBP1, empêcherait l'extrémité terminale de Ran d'inhiber l'interaction avec RanGAP1 (Seewald *et al.*, 2002). En vue de recommencer un nouveau cycle de liaison et hydrolyse de GTP et de régénérer le gradient de Gsp1p/Ran-GTP, Gsp1p/Ran doit être recyclée au noyau. C'est la protéine Ntf2p qui joue le rôle de récepteur pour l'import de Gsp1p/Ran-GDP au noyau. Le modèle actuel stipule que via une interaction avec des nucléoporines au niveau de leur motif répété phénylalanine-glycine (XFXFG) et en se complexant à Gsp1p/Ran-GDP, Ntf2p cible cette dernière au niveau du pore nucléaire à travers lequel elle dirige son transport au noyau (Clarkson *et al.*, 1996; Paschal *et al.*, 1996; Percipalle *et al.*, 1997). À destination, lorsque l'échange de nucléotide guanine est catalysé, Ntf2p est relâchée et retourne au cytoplasme d'où elle pourra engendrer un nouveau cycle de recyclage (Quimby *et al.*, 2000). Puisque Prp20p/RCC1 et Ntf2p ne peuvent interagir simultanément avec Gsp1p/Ran-GDP au niveau du noyau et que cette dernière doit s'être dissociée pour permettre l'échange de nucléotide guanine, Ntf2p jouerait aussi le rôle d'inhibiteur de la dissociation de nucléotide guanine (Yamada *et al.*, 1998). C'est la protéine Mog1p qui semble être requise pour libérer Gsp1p/Ran-GDP de cette emprise. De plus, elle est impliquée dans l'échange de nucléotide guanine, puisqu'elle peut interagir avec cette dernière peu importe son état de liaison (Stewart & Baker, 2000). Un rôle de facteur de relâche de nucléotide guanine lui a donc été attribué et permet de réguler la concentration nucléaire de Gsp1p/Ran-GTP (Oki & Nishimoto, 2000; Steggerda & Paschal, 2000; Marfatia *et al.*, 2001). La protéine

Nup60p joue aussi le rôle d'inhibiteur de la dissociation de nucléotide guanine au niveau du pore nucléaire en liant directement Prp20p pour en moduler son activité (Denning *et al.*, 2001). Il a été démontré que RCC1 peut être associée au complexe du pore nucléaire (Fontoura *et al.*, 2000) et les expériences de Denning et collaborateurs (2001) suggèrent que Prp20p peut y être recrutée en interagissant avec les nucléoporines Nup2p et Nup60p.

De récentes preuves scientifiques semblent démontrer qu'un cycle GDP/GTP complet peut être effectué par Gsp1p dans le cytoplasme. En effet, la protéine Bud5p, facteur d'échange pour la petite protéine G Rsr1p impliquée dans le mécanisme de sélection du site de bourgeonnement (Chant *et al.*, 1991; Bender, 1993), semble aussi catalyser l'échange de nucléotide guanine par Gsp1p. De fait, le gène encodant pour cette protéine a été repêché lors d'un criblage pour des supresseurs multicopies de l'allèle thermosensible *prp20-1* dans le but d'identifier de nouveaux régulateurs de l'activité de Gsp1p. Puisque Bud5p est une protéine cytoplasmique et qu'une interaction physique avec Gsp1p a été démontrée, ceci suggère que cette dernière peut osciller entre ses deux états de liaison au nucléotide guanine dans ce compartiment (Clément *et al.*, 2001).

D'autres régulateurs du cycle GDP/GTP de Gsp1p/Ran ont été identifiés, mais requièrent des travaux plus poussés afin de clarifier leur rôle. Tel est le cas de la cascade Gtr1p/Gtr2p qui semble interagir avec ce cycle. Gtr1p est une petite protéine G impliquée dans le système d'assimilation de phosphate inorganique (Bun-Ya *et al.*, 1992; Yompakdee *et al.*, 1996), alors que la GTPase Gtr2p est un effecteur de Gtr1p (Nakashima *et al.*, 1999). Gtr1p semble réguler négativement le cycle Gsp1p/Ran via Gtr2p. Effectivement, le mutant thermosensible *gtr1-11* supprime des défauts retrouvés chez les régulateurs Prp20p et Rna1p et une délétion partielle de *GTR1* supprime les phénotypes associés au mutant *rcc1* (Nakashima *et al.*, 1996). De plus, Gtr1p forme un complexe avec Gtr2p et l'inactivation du gène *GTR2* abolit l'effet inhibiteur du mutant *gtr1-Q65L*, bloqué dans une conformation liée en GTP, sur la croissance du mutant thermosensible *prp20-1*. Cependant, puisque l'inactivation du

gène *GTR1* ne réussit pas à supprimer la mutation *prp20-1*, il est probable que l'effet inhibiteur de Gtr2p sur le cycle GDP/GTP de Gsp1p/Ran soit activé par d'autres facteurs inconnus jusqu'à maintenant (Nakashima *et al.*, 1999). Les homologues humains de Gtr1p et Gtr2p sont respectivement RagA et RagB ainsi que RagC et RagD (Hirose *et al.*, 1998; Sekiguchi *et al.*, 2001). De plus, certains éléments de preuves semblent montrer que la voie AMPc pourrait réguler le cycle Gsp1p/Ran. En effet, il a été démontré que la surexpression du gène *PDE2*, codant pour la phosphodiesterase de haute affinité pour l'AMPc régulant l'activité de la protéine kinase A (PKA), peut supprimer complètement l'effet de quelques allèles thermosensibles de *gsp1* ainsi que celui attribué au mutant *rna1-1* (Oki & Nishimoto, 1998). Il faut ajouter que ce dernier mutant peut aussi être supprimé par une mutation dans le gène *REG1* encodant pour un répresseur des gènes réprimés par le glucose (Tung *et al.*, 1992; Tu & Carlson, 1995; Tung & Hopper, 1995).

1.3. Rôles cellulaires de Gsp1p/Ran

1.3.1. Généralités

Une caractéristique importante des cellules eucaryotes est la compartimentation de leur ADN génomique dans un noyau entouré d'une membrane. La séparation entre le matériel génétique et la machinerie traductionnelle cytoplasmique permet un contrôle étroit de l'expression génique, mais demande une forte dépense énergétique. Cette dernière est essentielle afin d'assurer le transport actif bidirectionnel des macromolécules entre ces deux compartiments, que ce soit pour permettre l'export des différents ARNs synthétisés dans le noyau vers le cytoplasme ou l'import de protéines synthétisées dans le cytoplasme, telles que des facteurs de transcription et des protéines ribosomales, vers le noyau (Görlich & Mattaj, 1996). Les travaux menés sur ce processus ont permis l'identification de la GTPase Gsp1p/Ran comme composante essentielle du transport nucléocytoplasmique des macromolécules. Bien que ce rôle soit le mieux documenté jusqu'à présent, Gsp1p/Ran est aussi impliquée

dans une variété de processus cellulaires, tels que la maturation des ARNr, la régulation du cycle cellulaire, l'assemblage du réseau des microtubules ainsi que la biogenèse et l'organisation nucléaire (Azuma & Dasso, 2000). Les connaissances actuelles à propos des fonctions de cette petite protéine G seront abordées dans cet ouvrage et sont résumées au tableau I.

1.3.2. Transport nucléocytoplasmique.

L'enveloppe nucléaire est formée de deux membranes concentriques qui sont en continuité avec le réticulum endoplasmique. La communication spatiale entre le cytoplasme et le noyau est assurée par les pores nucléaires. Ces derniers sont des canaux aqueux formés de protéines et insérés dans l'enveloppe nucléaire. Leur architecture a été hautement conservée au cours de l'évolution. Chez la levure *S. cerevisiae*, le complexe du pore nucléaire est composé d'environ 40 protéines différentes, appelées nucléoporines, et possède une masse moléculaire estimée à 60 MDa (Yang *et al.*, 1998). En ce qui concerne celui des vertébrés, il renferme de 50 à 100 différentes nucléoporines et sa masse moléculaire se situe autour de 125 MDa (Stoffler *et al.*, 1999). Les nucléoporines, arrangées selon une symétrie octogonale, forment un complexe à l'endroit où les membranes nucléaires internes et externes fusionnent (Fahrenkrog *et al.*, 2000). Chaque complexe du pore nucléaire (NPC) est positionné entre un anneau nucléaire et un anneau cytoplasmique. À ce dernier sont attachées huit fibrilles tandis qu'une structure en forme de panier est fixée à l'anneau nucléaire (Davis, 1995; Fabre & Hurt, 1997). Ceci génère donc une asymétrie de part et d'autre de l'enveloppe nucléaire.

Les canaux formés par les pores nucléaires ont un diamètre d'environ 9 nm et permettent la diffusion passive des ions, métabolites et petites protéines dont le poids moléculaire ne dépasse pas 40 à 60 kDa. Toutefois, les macromolécules de plus de 40 à 60 kDa sont activement et sélectivement transportées à travers ces structures et doivent renfermer un signal approprié (Davis, 1995; Nigg, 1997). Effectivement, des séquences d'acides aminés nécessaires à la localisation nucléaire des protéines ainsi

Tableau I - Multiples rôles de Gsp1p/Ran : ses effecteurs et ses cibles

Processus cellulaire	Rôles de Gsp1p/Ran	Effecteurs	Cibles
Transport nucléocytoplasmique	Chargement et déchargement des cargos à partir des complexes de transport	Importines α et β ; Protéines de liaison à Ran-GTP reliées à l'importine β	Plusieurs protéines nucléaires; Protéines oscillant entre le noyau et le cytoplasme
Maturation des ARNr	Assemblage et dissociation de l'exosome	Inconnus	Dis3p/Rrp4p
Régulation du cycle cellulaire	Maintien des points de contrôle régulant l'entrée en mitose	Inconnus	Inconnus
Assemblage du réseau des microtubules	Régulation positive de la polymérisation de tubuline; Régulation des protéines motrices des microtubules	Importines α et β	TPX2 et Eg5; NuMA; RanBPM
Biogenèse et organisation nucléaire	Assemblage des pores nucléaires dans l'enveloppe nucléaire intacte; Fusion de vésicules membranaires pour former l'enveloppe nucléaire	Importine β	Vésicules membranaires renfermant des NPCs

Inspiré et modifié de Azuma & Dasso (2000) et Dasso (2001).

qu'à l'export de macromolécules ont été identifiées (Dingwall *et al.*, 1982; Kalderon *et al.*, 1984). Jusqu'à maintenant, les mécanismes moléculaires de l'import des protéines nucléaires présentant un signal de localisation nucléaire (NLS) classique et de l'export de macromolécules renfermant un signal d'export nucléaire (NES) riche en leucine sont les mieux documentés.

Cette caractérisation du rôle de Gsp1p/Ran dans le transport nucléocytoplasmique des macromolécules a débuté par des expériences *in vitro* utilisant un système de cellules mammifères perméabilisées grâce à la digitonine. Ce système a permis de démontrer l'existence d'un mécanisme actif responsable de l'accumulation de protéines dans le noyau (Adam *et al.*, 1990) et d'identifier Ran, les importines α et β , ainsi que Ntf2p comme facteurs solubles participant à l'import nucléaire des macromolécules. Par la suite, il a été montré que Gsp1p/Ran est un facteur essentiel à l'import nucléaire de protéines renfermant un NLS et que la destruction du gradient nucléocytoplasmique de Gsp1p inhibe ce processus (Moore & Blobel, 1993; Stochaj *et al.*, 2000). En effet, les mutants conditionnels *gsp1-1* et *gsp1-2* ainsi qu'une banque de 25 mutants *gsp1* thermosensibles possèdent un défaut de transport en accumulant des protéines renfermant un NLS dans leur cytoplasme et des ARNm dans leur noyau (Wong *et al.*, 1997; Oki *et al.*, 1998). Ces défauts d'export des ARNm ont aussi été observés chez les mutants *prp20* et *rna1-1* (Izaurralde & Mattaj, 1995). De plus, l'inhibition de ce processus lors d'expériences *in vitro* utilisant des analogues de GTP non hydrolysables suggèrent que l'hydrolyse de GTP par Gsp1p/Ran est essentielle pour le transport des macromolécules (Melchior *et al.*, 1993; Schlenstedt *et al.*, 1995a).

Ensuite, les équipes de recherche ont voulu caractériser les mécanismes régissant la translocation des substrats de transport de part et d'autre du NPC. La protéine Nup60p a été identifiée comme site d'ancrage pour l'hétérodimère formé du cargo d'import et des importines α et β ainsi que comme site d'assemblage et de départ des complexes d'export permettant le recyclage de l'importine β liée à Gsp1p-GTP au

cytoplasme (Denning *et al.*, 2001). De plus, il a été démontré que le cargo doit s'être dissocié du complexe d'import avant que le récepteur d'export Cse1p spécifique à la régénération des niveaux cytoplasmiques d'importine α puisse s'y lier (Solsbacher *et al.*, 1998). En ce qui concerne le recyclage de Gsp1p au noyau à la suite d'un cycle d'export, il semble que la protéine Ntf2p joue un rôle important dans ce processus. Effectivement, une destruction du gradient nucléocytoplasmique de Gsp1p a été observée chez les mutants thermosensibles *ntf2-1* et *ntf2-2* à température restrictive (Stochaj *et al.*, 2000). En plus, la surexpression de Ntf2p supprimant le phénotype thermosensible des mutants *gsp1-1* et *gsp1-2* ainsi que Gsp1p ayant été isolée comme suppresseur multicopies d'un mutant *ntf2 Δ* sont des preuves *in vivo* du lien fonctionnel entre ces deux protéines (Wong *et al.*, 1997; Paschal *et al.*, 1997). Finalement, les travaux de Gao et collaborateurs (2003) suggèrent que les nucléoporines interviendraient aussi dans ce mécanisme de recyclage. En effet, ils ont montré que des souches portant une délétion au niveau de certains gènes encodant pour ces dernières ne peuvent concentrer Gsp1p dans leur noyau, car la localisation de Ntf2p au NPC est altérée.

Voici donc le modèle de transport nucléocytoplasmique classique, émergeant de ces études ainsi que celles menées chez d'autres organismes eucaryotes. L'import nucléaire d'un cargo renfermant un NLS classique est initié dans le cytoplasme par la formation d'un complexe hétérodimérique ciblant ce dernier au pore nucléaire. Les importines α et β sont les deux facteurs essentiels impliqués dans ce complexe et jouent le rôle de récepteurs de transport. Premièrement, l'importine α reconnaît et se lie fortement au NLS du cargo au niveau de ses motifs Armadillo répétés, une région hydrophobique retrouvée dans ce récepteur (Cortes *et al.*, 1994; Peifer *et al.*, 1994; Yano *et al.*, 1994; Weis *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 2003). Elle agit à titre d'adaptateur entre la protéine ciblée au noyau et l'importine β qui s'associe ensuite au complexe en interagissant avec des résidus basiques hautement conservés à l'extrémité N-terminale de l'importine α (Görlich *et al.*, 1996a; Weis *et al.*, 1996). C'est ce dernier partenaire qui est responsable de l'interaction du complexe d'import avec le NPC, car

il peut interagir avec les domaines répétés GLFG et FXFG retrouvés chez plusieurs nucléoporines (Hurt, 1996; Lounsbury *et al.*, 1996). Cette étape de ciblage au pore nucléaire permet la translocation vers le noyau selon deux modèles proposés. Le premier modèle stipule que le complexe d'import se déplace dans le pore nucléaire par diffusion aléatoire jusqu'à ce qu'un mécanisme irréversible oblige le substrat à entrer dans le noyau (Görlich & Mattaj, 1996; Koepp & Silver, 1996). Le second modèle propose que le substrat d'import traverse le NPC en suivant un gradient d'affinité entraînant une série d'associations et de dissociations aux nucléoporines grâce à des cycles répétés d'hydrolyse de GTP (Rexach & Blobel, 1995; Solsbacher *et al.*, 2000). Une fois à destination, le cargo est libéré suite à un changement de conformation de l'importine β provoqué par la liaison de Gsp1p/Ran-GTP au niveau du domaine de liaison à Ran situé à son extrémité N-terminale (Görlich *et al.*, 1996b). C'est complexée à Gsp1p/Ran-GTP que l'importine β retourne au cytoplasme alors que l'importine α y est recyclée en formant un complexe trimérique avec le récepteur d'export CAS (Cse1p chez *S. cerevisiae*), une molécule semblable à l'importine β , et Gsp1p/Ran-GTP (Kutay *et al.*, 1997). L'hydrolyse de GTP catalysée au niveau du cytoplasme permet la dissociation des importines de leurs complexes respectifs et les rend aptes à recommencer un autre cycle d'import.

L'export des protéines et ARNs de toutes sortes est aussi enclenché par la reconnaissance d'un signal peptidique, ce qui explique pourquoi la majorité des ARNs sont transportés sous forme de ribonucléoprotéines (Izaurralde & Mattaj, 1995). Par analogie avec l'import nucléaire, le cargo destiné au cytoplasme et renfermant un NES riche en leucine requiert un récepteur pour guider son export. Les exportines sont les molécules remplissant cette fonction et la plus connue se nomme CRM1 (Fornerod *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997; Stade *et al.*, 1997). Contrairement aux importines, l'exportine se lie au cargo en coopération avec Gsp1p/Ran-GTP dans le noyau. Ce complexe trimérique est par la suite transloqué vers le cytoplasme par le NPC grâce à l'interaction de l'exportine avec ce dernier. À destination, l'hydrolyse de GTP par Gsp1p/Ran permet la dissociation du complexe

d'export en diminuant l'affinité entre l'exportine et le cargo. L'exportine libérée est ensuite retournée au noyau afin de lier et exporter de nouveaux cargos.

Gsp1p/Ran étant une protéine majoritairement nucléaire et sa forme liée en GTP étant constamment exportée du noyau sous forme de complexes avec des importines et exportines, elle doit absolument y être recyclée afin de permettre la continuité des cycles de transport. Tout comme les cargos se déplaçant à travers les pores nucléaires, elle requiert un récepteur de transport, soit la protéine Ntf2p très bien conservée chez les eucaryotes (Ribbeck *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998a). Cette dernière lie spécifiquement la forme GDP de Gsp1p/Ran dans le cytoplasme ainsi que les nucléoporines renfermant des séquences FXFG répétées, ce qui permet l'import du complexe (Paschal & Gerace, 1995; Clarkson *et al.*, 1996; Nehrbass & Blobel, 1996; Paschal *et al.*, 1996).

Outre l'import des protéines renfermant un NLS classique et l'export des macromolécules présentant un NES riche en leucine, Gsp1p/Ran est aussi impliquée dans l'import de plusieurs protéines liant l'ARN ainsi que de protéines ribosomales et dans l'export des ARNt et d'autres protéines portant un NES non-classique. Cependant, les facteurs d'import et export sont différents, car ils sont spécifiques aux signaux retrouvés dans ces macromolécules à être déplacées. Ils sont présentés au tableau II. Les mécanismes de transport semblent tout de même être semblables à ceux expliqués précédemment, car ces récepteurs sont de la famille de l'importine β .

En bref, les travaux menés sur ce processus cellulaire ont permis d'identifier la GTPase Gsp1p/Ran comme composante essentielle du transport nucléocytoplasmique des macromolécules. La distribution différente des deux états de liaison au nucléotide guanine de Gsp1p/Ran selon l'emplacement de ses régulateurs et le fait que les importines et exportines n'interagissent pas de la même façon avec leurs cargos selon que cette protéine G est liée en GTP lui permettent de définir l'identité des compartiments cellulaires en plus de déterminer la polarité du transport. Ces

Tableau II - Récepteurs spécifiques aux séquences signal nucléocytoplasmiques retrouvées dans leur substrat de transport

Substrat	Séquence signal	Récepteur	Références
Protéines nucléaires	NLS classique	Dimère importines α/β	Se référer au texte
Protéines liant l'ARNm (Nab2p et Nab4p)	NLS riche en arginine/glycine	Importine Kap104p/Transportine	Aitchison <i>et al.</i> , 1996
Protéines ribosomales	NLS ribosomal L25	Importines Pse1p et Yrb4p/Kap123p	Rout <i>et al.</i> , 1997; Schlenstedt <i>et al.</i> , 1997
Protéine Np13p liant l'ARNm	Boîte RGG + Petite extrémité C-terminale non répétée	Importine Mtr10p	Pemberton <i>et al.</i> , 1997; Senger <i>et al.</i> , 1998
Protéines cytoplasmiques et ribonucléoprotéines	NES riche en leucine	Exportine Xpo1p/Crm1p	Stade <i>et al.</i> , 1997; Neville <i>et al.</i> , 1997
Importine α	NES riche en résidus acides	Exportine Cse1p/CAS	Solsbacher <i>et al.</i> , 1998; Künzler & Hurt, 1998; Hood & Silver, 1998; Herold <i>et al.</i> , 1998
ARNt	Inconnue	Exportine Los1p/Exportine t	Hellmuth <i>et al.</i> , 1998
Protéines phosphorylées	Deux résidus riches en leucine chevauchant des résidus sérines	Exportine Msn5p	Kauffman <i>et al.</i> , 1998; DeVit & Johnston, 1999

constatations impliquent que l'hydrolyse de GTP soit une consommation d'énergie indirectement liée à la translocation à travers le NPC lors de ce processus (Mattaj & Englmeier, 1998).

1.3.3. Maturation des ARN ribosomaux.

L'exosome joue un rôle majeur dans la maturation de l'extrémité 3' de divers ARNs ainsi que dans leur dégradation (Jacobs Anderson & Parker, 1998; van Hoof & Parker, 1999). C'est un complexe ribonucléase multienzymatique présent autant dans le noyau que le cytoplasme, composé de 11 sous-unités chez *S. cerevisiae* et conservé chez les eucaryotes supérieurs (Mitchell *et al.*, 1997; Allmang *et al.*, 1999). Lors d'un criblage deux-hybrides utilisant Ran comme appât, la protéine Dis3p/Rrp4p a été identifiée comme pouvant interagir physiquement avec cette dernière, peu importe son état de liaison au nucléotide guanine (Noguchi *et al.*, 1996). Elle a été caractérisée comme étant une des sous-unités de l'exosome possédant une activité exoribonucléase 3'→5' (Mitchell *et al.*, 1997). Il a été démontré que l'interaction de Dis3p/Rrp4p avec le complexe formé par Ran et RCC1 stimule l'activité de relâche de nucléotide guanine *in vitro* et qu'elle ne possède aucun lien fonctionnel avec le transport nucléocytoplasmique des macromolécules (Noguchi *et al.*, 1996).

D'autres protéines impliquées dans le cycle GDP/GTP de Gsp1p/Ran semblent participer au métabolisme des ARNs. En effet, le mutant thermosensible *rna1-1* présente un défaut de synthèse d'ARN (Hutchison *et al.*, 1969), d'épissage des ARNt et de maturation des ARNr (Hopper *et al.*, 1978). Quant au mutant *prp20-1*, il montre une déficience d'épissage des ARNm (Aebi *et al.*, 1990). Le groupe de Suzuki et collaborateurs (2001) a donc isolé 12 mutants *dis3* thermosensibles synthétisant des ARNr portant des extensions 3' de longueur variable afin de mieux caractériser le lien fonctionnel entre l'exosome et le cycle GTPasique de Gsp1p/Ran. Pour ce faire, ils ont comparé l'activité exosomale de cette série de mutants à celle de la banque de mutants *gsp1* thermosensibles isolée par Oki *et al.* (1998). Ils ont montré que ces deux collections de mutants présentent les mêmes défauts au niveau

des étapes précoces de maturation de l'extrémité 3' des ARNr 5,8S effectuées par l'exosome nucléaire.

Avant la publication de ces résultats, les équipes de recherche croyaient que les déficiences au niveau de la maturation des ARNs observées chez les mutants impliqués dans le cycle GDT/GTP de Gsp1p/Ran étaient une conséquence indirecte des défauts de transport associés à ces derniers (Görllich & Kutay, 1999; Nakielny & Dreyfuss, 1999). Effectivement, puisque les ribonucléoprotéines nucléaires et nucléolaires sont impliquées dans le métabolisme des ARNs régulé par l'exosome nucléaire, elles requièrent que les mécanismes d'import et export soient fonctionnels (Vegvar & Dahlberg, 1990; Cheng et al., 1995; Lafontaine & Tollervey, 1995; Maxwell & Fournir, 1995; Yu *et al.*, 1999). Cependant, l'étude du groupe de Suzuki et collaborateurs (2001) fournit des preuves que Gsp1p régule la maturation des ARNr via Dis3p/Rrp4p indépendamment de son rôle dans le transport nucléocytoplasmique des macromolécules. En effet, contrairement aux mutants présentant un défaut de transport, ceux des banques de mutants *dis3* et *gsp1* n'accumulent pas d'ARN pré-messagers. De plus, l'extrémité 5' des ARNr 5,8S est modifiée correctement chez ces derniers alors que des nucléases, hélicases, ribonucléoprotéines et facteurs d'assemblage de ribosome doivent être importés dans le noyau pour permettre cette maturation (Allmang *et al.*, 2000). Le modèle proposé est que Gsp1p/Ran régulerait l'assemblage et la dissociation de l'exosome via Dis3p/Rrp4p.

1.3.4. Régulation du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est composé d'une série d'événements ordonnés dont la finalité est la duplication et la ségrégation de toutes les composantes cellulaires afin de permettre la division d'une cellule en deux cellules filles. La progression de ce processus est régulée spatialement et temporellement par différents points de contrôle dans le but d'assurer que la poursuite du cycle ne soit pas enclenchée avant que l'étape en cours ne soit complétée. Cette coordination est essentielle à la viabilité des

descendants de la cellule en division et est effectuée par des complexes de cyclines et kinases cycline-dépendantes localisées autant dans le noyau que dans le cytoplasme (Hartwell & Weinert, 1989; Dunphy, 1994; Karlsson *et al.*, 1999).

Afin de mieux comprendre les mécanismes régissant ce processus, Nishimoto et collaborateurs (1978a,1982) ont isolé des mutants de prolifération cellulaire thermosensibles à partir de la lignée de cellules de foie de bébés hamsters BHK21. Un de ceux-ci, nommé tsBN2, porte une mutation ponctuelle dans le gène *RCC1* (Uchida *et al.*, 1990). À température restrictive, ces cellules entrent prématurément en mitose à partir de la phase S. Il en résulte une condensation précoce des chromosomes engendrée par l'échec du maintien du point de contrôle responsable de l'arrêt en interphase en réponse à la synthèse incomplète d'ADN (Nishimoto *et al.*, 1978b; Nishitani *et al.*, 1991). Il a donc été proposé que *RCC1*, sur la chromatine, surveillerait la progression de la réplication de l'ADN afin de la coupler avec l'initiation de la mitose. Le facteur promoteur de la mitose (MPF) étant responsable de la condensation des chromosomes lorsqu'il est activé par la phosphatase *Cdc25c*, Nishimoto (2000) a suggéré que la régulation négative de MPF est déficiente chez le mutant tsBN2. En effet, il a été montré que *Cdc25c*, normalement localisée dans le cytoplasme, entre dans le noyau chez ces cellules à température restrictive (Seki *et al.*, 1992). L'hypothèse que *RCC1* inhiberait la synthèse de l'activateur de MPF a été étudiée afin d'établir un lien entre ceux-ci et la condensation des chromosomes (Nishijima *et al.*, 1997; Karlsson *et al.*, 1999). Cependant les hypothèses actuelles sont que la perte de l'activité de *RCC1* détruirait la compartimentation cellulaire en dissipant le gradient de Ran-GTP déterminant l'orientation du transport nucléocytoplasmique, ce qui permettrait à MPF d'interagir avec ses activateurs (Nishimoto, 2000).

Dans le même ordre d'idées, Ran et *RCC1* coupleraient les événements nucléaires avec le contrôle de la croissance cellulaire. Effectivement, il a été démontré que les fonctions régulées par ceux-ci ont lieu seulement chez les cellules en division. L'équipe de Coutavas et collaborateurs (1993) a même suggéré que RanBP1, le co-

activateur de l'activité GTPase de Ran, serait un intermédiaire dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire par cette dernière et RCC1. En effet, la surexpression de celle-ci affecte le déroulement de différentes étapes du cycle cellulaire (Battistoni *et al.*, 1997). De plus, ses niveaux sont régulés par ce processus en augmentant de la phase S à la phase M pour atteindre un pic durant la métaphase et diminuer abruptement à la fin de la télophase (Guarguaglini *et al.*, 2000). Il a aussi été montré que le taux d'import nucléaire est plus élevé chez les cellules en prolifération comparativement à celles dont la croissance est arrêtée (Feldherr & Akin, 1993). Donc, il serait possible que la machinerie de transport nucléaire soit régulée par le cycle cellulaire via une voie ciblant Ran et RCC1 (Yoneda, 1997).

Cependant, des expériences menées sur des extraits d'œuf de *Xenopus* fournissent des preuves que le rôle de Ran dans le maintien du point de contrôle de réplication de l'ADN est indépendant du transport nucléocytoplasmique. Effectivement, dans des extraits cyclant entre la phase S et M et dépourvus de noyaux auxquels Ran stabilisée en conformation liée en GDP a été ajoutée, un blocage d'entrée en mitose a été observé (Kornbluth *et al.*, 1994). Même si le rôle de Ran dans la progression du cycle cellulaire a clairement été montré chez les eucaryotes supérieurs, il en est tout autrement chez la levure. Hayashi et collaborateurs (1996) ont donc recherché des suppresseurs du mutant *srm1-1* présentant des phénotypes spécifiques au cycle cellulaire. Un des suppresseurs isolés est le mutant *ded1-21*, un gène encodant normalement une ARN hélicase ATP-dépendante et appartenant à la famille DEAD-box. Il est connu que des membres de cette dernière sont impliqués à plusieurs niveaux dans le cycle cellulaire et dans le métabolisme des ARNm (Maekawa *et al.*, 1994; Lazaris-Karatzas *et al.*, 1990), des processus dans lesquels RCC1 semble aussi intervenir. De plus, le mutant *dis3-54* a été identifié comme présentant un défaut mitotique chez *S. pombe* et une létalité synthétique avec des mutants chez qui la ségrégation des chromosomes est affectée (Kinoshita *et al.*, 1991). Puisqu'il a été démontré que son homologue chez *S. cerevisiae* interagit avec Gsp1p et augmente l'activité d'échange de nucléotide guanine de Prp20p, il a été suggéré que le cycle

GDP/GTP de Gsp1p soit impliqué dans une cascade de phosphatases comprenant Dis3p et régulant la progression du cycle cellulaire (Noguchi *et al.*, 1996).

1.3.5. Régulation du réseau des microtubules.

Chez les eucaryotes supérieurs, le transport nucléocytoplasmique des macromolécules est très actif durant l'interphase. Cependant, l'entrée en mitose entraîne la destruction de la membrane nucléaire, ce qui inactive ce processus. Puisque le réseau des microtubules se dissocie à cette étape du cycle cellulaire, les centrosomes dupliqués servent de site de nucléation des nouveaux microtubules pour synthétiser un fuseau mitotique. Celui-ci permettra aux chromosomes dupliqués de s'aligner à l'équateur de la cellule en division et de migrer vers des pôles opposés avant qu'une nouvelle membrane nucléaire ne soit formée (Takai *et al.*, 2001).

Plusieurs expériences ont suggéré que la stabilisation des chromosomes par les microtubules requiert la production d'une enzyme associée à la chromatine et distribuée par diffusion en un gradient inversement proportionnel à la distance du chromosome (Andersen, 1999). Ce phénomène a été nommé effet de distance. Il a été proposé que Ran-GTP soit ce facteur, car une fraction significative de RCC1 demeure liée à la chromatine lors de la mitose et son activité est essentielle à la formation du fuseau mitotique (Carazo-Salas *et al.*, 1999; Kahana & Cleveland, 1999; Kalab *et al.*, 1999). Il a été montré que l'hydrolyse de GTP par Ran est requise, mais pas essentielle, pour l'élongation des microtubules. En effet, l'utilisation d'analogues non hydrolysables de GTP permet la croissance des microtubules, mais ces derniers sont plus courts que ceux obtenus lorsque l'hydrolyse de GTP est possible (Nishimoto, 2000). Ran semble donc réguler la dynamique de transition entre le rétrécissement et l'élongation des microtubules. Cependant, la polymérisation des microtubules à partir de sous-unités de tubuline purifiées ne peut pas être stimulée par le seul ajout de Ran-GTP. Effectivement, elle requiert des protéines motrices, appelées dynéines, et d'autres facteurs associés au centrosome, tels que les protéines NuMA et TPX2 (Ohba *et al.*, 1999; Wilde & Zheng, 1999). De plus, l'isolement de

RanBPM, une protéine centrosomale, comme partenaire deux-hybrides de Ran-GTP et la démonstration que la hausse des niveaux de cette dernière entraîne la formation de centres d'organisation des microtubules ont permis d'associer Ran aux activités de nucléation des microtubules centrosomaux (Nakamura *et al.*, 1998).

Dans le but de mieux comprendre le rôle de Ran dans l'assemblage du fuseau mitotique, Gruss et collaborateurs (2001) ont émis comme hypothèse que les récepteurs de transport seraient de bons candidats effecteurs dans ce processus. Le modèle accepté jusqu'à maintenant est le suivant. Les protéines TPX2 et NuMA, connues comme pouvant stimuler la nucléation des microtubules, ont la capacité de lier les importines α et β . Lorsque complexées à cet hétérodimère, elles sont incapables d'exercer leur fonction. Alors, durant l'interphase, ces protéines motrices sont séquestrées dans le noyau, ce qui assure qu'elles ne seront pas actives sur les microtubules cytoplasmiques à ce moment inapproprié. Lorsque la membrane nucléaire est détruite au début de la mitose, il y a augmentation de l'activité de TPX2 et NuMA à proximité des chromosomes, car la concentration élevée de Ran-GTP dissocie le complexe inhibiteur. Ces deux protéines sont donc des cibles régulées par Ran lors de ce processus (Gruss *et al.*, 2001; Wiese *et al.*, 2001; Nachury *et al.*, 2001). De plus, il a été montré que lorsque TPX2 est active, elle régule le ciblage de la kinase Aurora A au fuseau mitotique où, par phosphorylation, elle active à son tour la protéine motrice de microtubules Eg5. Cette dernière semble donc être une cible indirecte de Ran (Kufer *et al.*, 2002). Donc, la fonction de Ran dans la formation du réseau de microtubules ressemble à son rôle dans le transport nucléocytoplasmique des macromolécules. Cependant, des expériences menées sur des extraits d'œuf de *Xenopus* ont démontré que Ran-GTP peut réguler l'assemblage du fuseau mitotique et que ce rôle est clairement distinct de sa fonction dans le transport. En effet, les conditions expérimentales utilisées ne permettaient pas l'assemblage de l'enveloppe nucléaire (Sazer & Dasso, 2000).

Le mécanisme par lequel Ran régule le fuseau mitotique chez la levure est nécessairement différent de celui proposé chez les métazoaires, car son noyau demeure intact tout au long du cycle cellulaire. Par contre, il existe des preuves scientifiques impliquant Ran dans la régulation des microtubules chez *S. cerevisiae*. Effectivement, la surexpression de *PRP20* supprime l'effet toxique chez certains mutants de la tubuline α dont la croissance est arrêtée à cause d'un excès de microtubules nucléaires et cytoplasmiques (Kirkpatrick & Solomon, 1994). De plus, la surexpression de *GSP1* ou *YRB1* augmente la sensibilité au benomyl, une drogue anti-microtubulaire, en plus de diminuer les taux de disjonction des chromosomes mitotiques (Ouspenski *et al.*, 1995). D'autant plus que le mutant *yrb1-21* devient binucléé à température restrictive, car il est incapable d'orienter adéquatement son fuseau mitotique au niveau du bourgeon. Il a été montré que, dans ces conditions, le transport nucléocytoplasmique des macromolécules n'est pas perturbé (Ouspenski, 1998). La découverte récente d'un facteur d'échange de nucléotide guanine cytoplasmique pour Gsp1p, Bud5p, est un autre élément de preuve appuyant l'implication directe de Gsp1p dans l'organisation et la structure des microtubules (Clément *et al.*, 2001).

1.3.6. Biogenèse et organisation nucléaire.

La double membrane nucléaire distingue un compartiment subcellulaire à l'intérieur duquel la réplication, réparation et transcription en ARN de l'ADN génomique se déroulent de manière spatialement isolée du cytoplasme. Chez certains organismes eucaryotes, la répartition des chromosomes dupliqués dans deux cellules filles lors de la mitose, dite ouverte, requiert la disparition de la membrane nucléaire et la dissociation des NPCs (Burke & Ellenberg, 2002). Leurs composantes sont alors redistribuées dans la cellule. Cependant, elles doivent être re-ciblées au niveau des chromosomes décondensés dans le but de former une nouvelle enveloppe nucléaire à la fin de ce processus cellulaire (Dasso, 2002). Ran, de par sa localisation cellulaire spécifique à son état de liaison au nucléotide guanine, sert de marqueur de

la position des chromosomes. Cette petite protéine G est donc essentielle à l'assemblage de l'enveloppe nucléaire au bon endroit à la fin de la mitose en plus d'être impliquée dans le maintien de l'ADN génomique à travers le cycle cellulaire et la propagation de celui-ci (Kuersten *et al.*, 2001).

Ce sont des études menées sur les cellules tsBN2 qui ont permis de faire un lien entre la voie de la GTPase Ran et l'assemblage nucléaire. Lorsque celles-ci sont incubées à température restrictive au cours de leur phase S ou G2, elles sont incapables d'assembler adéquatement leur noyau en fin de mitose. Ceci engendre donc la formation de micronoyaux autour de leurs chromosomes fragmentés et condensés, mais l'enveloppe nucléaire semble de morphologie normale (Nishitani *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1997). Des expériences menées sur des membranes extraites d'œuf de *Xenopus* suggèrent plutôt un rôle direct de Ran dans les étapes précoces de biogenèse du noyau. Elles leur ont permis d'observer la capacité d'assemblage d'une enveloppe nucléaire renfermant des pores nucléaires autour de billes recouvertes de Ran, RCC1 ou d'importine β . Il a été montré que les billes recouvertes de Ran peuvent synthétiser une structure semblable à l'enveloppe nucléaire et que l'échange de nucléotide guanine par RCC1 en plus de l'hydrolyse de GTP stimulée par RanGAP1 sont requis (Hetzer *et al.*, 2000). Puisque les billes recouvertes de RCC1 sont incapables d'assembler une telle structure et que Ran-GTP peut lier directement les histones H3 et H4 indépendamment de son interaction avec RCC1 (Bilbao-Cortes *et al.*, 2002), il a été suggéré que Ran-GTP liée de cette façon à la chromatine post-mitotique est nécessaire et suffisante pour recruter la membrane nucléaire. Cependant, ces essais ont aussi montré que l'importine β est requise dans ce processus et que ses capacités d'interagir avec les nucléoporines et Ran-GTP sont essentielles, alors que son affinité pour l'importine α ne l'est pas. Il a donc été proposé que l'importine β permet l'assemblage de l'enveloppe nucléaire via la mobilisation des composantes du NPC plutôt qu'en interagissant avec des protéines cargos dépendantes de l'importine α . Conséquemment, le rôle principal de Ran-GTP

pourrait être le recrutement des composantes du NPC via l'importine β (Zhang & Clarke, 2000, 2001; Zhang *et al.*, 2002).

Le modèle proposé par Dasso (2002) est le suivant. La production localisée de Ran-GTP stimulée par RCC1 permet sa liaison à la chromatine. Suite à cette association indépendante de RCC1, Ran-GTP y recrute des vésicules membranaires renfermant des composantes du NPC en interagissant avec l'importine β . Ensuite, l'hydrolyse de GTP stimulée par RanGAP1 entraîne la fusion des vésicules pour former les membranes nucléaires internes et externes. Ce modèle est distinct du rôle de Ran dans le transport nucléaire, car il n'implique pas la liaison à des protéines cargos. Il repose plutôt sur l'affinité de l'importine β pour les nucléoporines. De plus, la morphologie anormale des noyaux obtenus chez les cellules tsBN2 semble reliée plus intimement à des défauts de régulation du cycle cellulaire ou d'assemblage du réseau des microtubules qu'au transport nucléocytoplasmique des macromolécules (Azuma & Dasso, 2000).

Chez les eucaryotes où l'enveloppe nucléaire reste intacte lors de la mitose, dite fermée, tout assemblage de pore nucléaire requiert une insertion dans une double membrane préexistante et a déjà été montrée par des essais *in vitro* chez *Xenopus* (Macaulay & Forbes, 1996). Le groupe de Ryan et collaborateurs (2003) a présenté la première preuve scientifique que le cycle GDP/GTP de Ran est nécessaire dans ce mécanisme chez *S. cerevisiae* en identifiant les gènes *GSP1*, *RNA1*, *PRP20* et *NTF2* comme étant responsables des perturbations au niveau de la membrane nucléaire et de l'accumulation de vésicules membranaires renfermant des nucléoporines lorsqu'ils sont mutés. De plus, ce cycle semble aussi impliqué dans la croissance et le maintien de l'enveloppe nucléaire. En effet, la mutation *pim1-d1*, l'homologue de *PRP20* chez *S. pombe*, provoque une fragmentation de l'enveloppe nucléaire après la mitose, même si celle-ci demeure intacte normalement à travers le cycle cellulaire. Cependant, il est impossible de conclure que Ran influence directement l'intégrité de

l'enveloppe nucléaire, car la morphologie des chromosomes est aussi affectée chez ce mutant (Demeter *et al.*, 1995).

1.4. Rationalisation du projet de recherche

Cette première section du contexte théorique a permis de mettre en évidence que le cycle GDP/GTP de Ran affecte plusieurs processus cellulaires chez les eucaryotes. Quelques-unes de ses cibles intervenant dans ces mécanismes sont connues, mais d'autres restent à découvrir. Cependant, plusieurs éléments de preuves accordent un rôle direct de Ran, indépendant de sa fonction dans le transport nucléocytoplasmique des macromolécules, dans plusieurs de ces voies cellulaires.

Dans l'optique où Gsp1p pourrait être impliquée dans d'autres processus que ceux identifiés précédemment, nous avons tenté d'isoler de nouveaux partenaires protéiques de cette petite protéine G ne leur étant pas reliés. Nous avons choisi la technique de la librairie d'épitopes phagiques (Scott & Smith, 1990), car le groupe de Noguchi et collaborateurs (1996) a déjà eu recours à celle du deux-hybrides et nous ne voulions pas reproduire leurs résultats. Parmi les peptides isolés, la séquence SPHQPSL a été repêchée à deux reprises (Clément & Belhumeur, résultats non publiés). Après comparaison de cette séquence peptidique à une banque de données renfermant celles de tous les cadres de lecture ouverts de *S. cerevisiae*, la protéine Lre1p a été identifiée comme partenaire protéique potentiel de Gsp1p. En effet, elle renferme ce peptide aux positions 205 à 211, dont deux acides aminés sont différents. De fait, l'histidine et la glutamine sont remplacées respectivement par la leucine et l'arginine chez Lre1p. Les connaissances actuelles sur cette protéine seront donc abordées dans la section suivante.

2. La protéine Lre1p

2.1. Caractéristiques de Lre1p

En 1997, le groupe de Lai et collaborateurs a effectué un criblage dans le but d'identifier des gènes qui, lorsque exprimés en copies multiples, entraînent une résistance à la laminarinase, un enzyme dégradant spécifiquement les liens β -1-3-glucanes de la paroi cellulaire. Suite à la comparaison d'une des séquences nucléotidiques isolées avec la base de données GenBank, le gène *LRE1* (Laminarinase resistance), situé sur le chromosome III de *S. cerevisiae*, a été associé à cette résistance. Celui-ci code pour une protéine hydrophile neutre de 583 acides aminés non essentielle. Une recherche d'homologues du gène *LRE1* chez les eucaryotes à l'aide de bases de données a permis d'identifier le gène *HLR1* (Homologue of Lre1p), présent sur le chromosome IV de *S. cerevisiae*. De plus, l'homologie semble limitée à ceux-ci. Le produit du gène *HLR1* est une protéine de 423 acides aminés dont les 286 acides aminés de sa portion N-terminale partagent 34 % d'identité avec ceux de la protéine Lre1p. Il a même été montré à deux reprises que ce sont des homologues fonctionnels (Alonso-Monge *et al.*, 2001; Versele & Thevelein, 2001).

2.2. Rôles cellulaires de Lre1p

2.2.1. Généralités.

Jusqu'à présent, le produit du gène *LRE1* est très peu caractérisé. Il pourrait même être classé dans la catégorie des gènes orphelins regroupant tous ceux dont la fonction est inconnue et qui ne présentent aucune homologie *in silico* (Oliver *et al.*, 1992). Dans le but d'associer une fonction à plusieurs de ces gènes orphelins, une

série de tests phénotypiques a été menée sur différentes souches portant une délétion dans un de ces gènes (Bianchi *et al.*, 1999). Grâce à cette approche, il a été suggéré que Lre1p pourrait être impliquée dans des voies cellulaires contrôlées par une balance entre la phosphorylation et la déphosphorylation de protéines spécifiques. En effet, le mutant *lre1Δ* présente une sensibilité à différents inhibiteurs de kinases et phosphatases. Cependant, puisqu'un lien entre Lre1p et la paroi cellulaire a été montré, il serait possible que la sensibilité observée soit causée par une augmentation de la perméabilité aux composés à l'étude chez le mutant *lre1Δ*, dont la paroi cellulaire pourrait être altérée.

Fort heureusement, le gène *LREL* a été isolé dans quelques criblages récents. Ceux-ci ont permis d'associer Lre1p à des fonctions de maintien et assemblage de la paroi cellulaire, de contrôle de cibles affectées par la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) ainsi que d'inhibition de la kinase Cbk1p. Les efforts de caractérisation de cette protéine dans ces processus cellulaires seront abordés plus en détails dans cette section.

2.2.2. Maintien et assemblage de la paroi cellulaire.

La paroi cellulaire est une structure extrêmement rigide recouvrant la membrane plasmique et responsable de la morphologie des cellules fongiques (Cabib *et al.*, 1988). Son intégrité est vitale, car elle apporte une protection contre le choc osmotique et plusieurs autres agents physiques. De plus, elle constitue une barrière de perméabilité sélective et offre un support pour des enzymes impliqués notamment dans sa biosynthèse. De surcroît, elle permet la reconnaissance entre cellules et leur adhésion (Stratford, 1994). Chez *S. cerevisiae*, elle est composée de chitine (0,6 à 2,7 %), de phosphomannoprotéines (20 à 23 %) ainsi que de polymères β -1-3-glucanes et β -1-6-glucanes (48 à 60 %) (Fleet, 1985) et présente une structure stratifiée. La couche interne renferme principalement des complexes formés de β -1-3-glucanes et de chitine alors que la couche externe est composée de phosphomannoprotéines. Une

couche intermédiaire de β -1-6-glucanes joint les composantes des couches internes et externes (Lipke & Ovalle, 1998).

Le polymère β -1-3-glucane est le principal responsable de la rigidité associée à cet organelle et est produit par la β -1-3-glucane synthase. Cet enzyme est composé de deux sous-unités. Sa sous-unité catalytique est une protéine membranaire produite à partir des gènes *FKS1* et *FKS2* (Mazur *et al.*, 1995) alors que sa sous-unité régulatrice est la petite protéine G Rho1p (Qadota *et al.*, 1996). Lorsque cette dernière acquiert sa conformation liée en GTP, elle active la protéine kinase C, Pkc1p. Celle-ci stimule une cascade MAP kinase qui régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire (Nonaka *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1996). Il a aussi été suggéré que Rho1p soit impliquée dans l'organisation du cytosquelette à l'extrémité du bourgeon de la cellule via l'activation de cette voie (Helliwell *et al.*, 1998).

Dans le but d'identifier des gènes impliqués dans le maintien de la structure de la paroi cellulaire, le groupe de Lai et collaborateurs (1997) a effectué un criblage de suppresseurs multicopies protégeant les glucanes de la digestion par la laminarinase. Un des plasmides 2μ isolés porte un insert d'environ 5,5 kb renfermant trois cadres de lecture ouverts correspondants aux gènes *APAI*, *LRE1* et *PBN1*. Ils ont montré que la résistance à cette β -1-3-glucanase est possible par la seule surexpression de *LRE1* et qu'elle est dose dépendante. Cependant, ces conditions n'entraînent pas de changements notables dans la structure de la paroi cellulaire ou dans l'activité de la β -1-3-glucane synthase. Ces effets sont observés lorsque *LRE1* et *PBN1* sont surexprimés simultanément. Le produit de ce dernier est impliqué dans la maturation de Prb1p, une protéase hydrolase vacuolaire B (Naik & Jones, 1998). De plus, la délétion du gène *LRE1* n'augmente pas la sensibilité à la laminarinase. Le rôle de Lre1p et Pbn1p dans le maintien de la paroi cellulaire reste encore à déterminer.

Dans le but d'isoler des facteurs impliqués dans la synthèse de β -1-3-glucane, un mutant thermosensible *fks1-1154 fks2 Δ* , dont la β -1-3-glucane synthase est défectueuse à température restrictive, a été utilisé. La protéine Lre1p présente en plusieurs copies chez ce mutant renverse l'inhibition de croissance observée en agissant positivement sur la synthèse de β -1-3-glucane. Puisque la surexpression de *LRE1* supprime aussi les défauts de phosphorylation de la MAP kinase Mpk1p chez le mutant *rho1-2* soumis à un choc thermique, Lre1p semble également agir positivement sur la cascade MAP kinase activée par Pkc1p. Il a donc été proposé que Lre1p soit une composante d'une voie régulant la synthèse de β -1-3-glucane via l'activation de Rho1p et intervenant en amont de Fks1p et Pkc1p (Sekiya-Kawasaki *et al.*, 2002).

Les réponses enclenchées suite à l'exposition à certains stress environnementaux permettent à la cellule de s'adapter à ces nouvelles conditions en plus de réparer les molécules qui ont été endommagées. Chez *S. cerevisiae*, la voie HOG est induite spécifiquement par des pressions osmotiques élevées alors que la voie PKC régule la réponse aux conditions hypotoniques (Hohmann, 2002). Les scientifiques ont émis l'hypothèse que les cellules levuriformes pourraient remodeler leur paroi cellulaire en réponse aux stress osmotiques. Une recherche de suppresseurs qui, lorsque exprimés en copies multiples, suppriment l'osmosensibilité associée à des mutants affectant ces deux voies a été effectuée. Le gène *LRE1* a été identifié lors de ce criblage et il a été montré que sa surexpression entraînait aussi une résistance de ces mutants à des enzymes dégradant la paroi cellulaire (Alonso-Monge *et al.*, 2001).

LRE1 semble aussi interagir génétiquement avec la voie de polarisation vésiculaire. Effectivement, il a été isolé comme suppresseur multicopies de la thermosensibilité associée au mutant *mrs6-2*. Il a été montré que celui-ci est incapable de cibler les vésicules de sécrétion à des sites spécifiques dans la cellule à température restrictive. Ceci entraîne, entre autre, la formation d'une paroi cellulaire altérée (Bialek-Wyrzykowska *et al.*, 2000). Il a donc été proposé que Lre1p pourrait

réguler le transport vésiculaire vectoriel visant à amener les composantes de la paroi cellulaire au bon site dans la cellule afin de les incorporer dans cette structure (Alonso-Monge *et al.*, 2001).

Même si les travaux cités précédemment fournissent des preuves génétiques reliant Lre1p à une fonction de biogenèse et de maintien de la paroi cellulaire, aucun modèle précis impliquant cette protéine dans ces processus n'a été défini jusqu'à maintenant.

2.2.3. Contrôle de cibles affectées par la protéine kinase dépendante de l'AMPc .

La voie de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) régule plusieurs processus cellulaires en réponse à la disponibilité d'une source de carbone fermentescible chez *S. cerevisiae*. Cette voie de signalisation a été largement étudiée ces dernières années. Ceci a permis de caractériser les mécanismes l'activant ainsi que bon nombre d'intermédiaires intervenant dans la transduction de signal et dans la régulation de ses cibles cellulaires. Le modèle émergeant de ces travaux sera abordé dans cet ouvrage et est présenté à la figure 3.

Seulement deux stimuli ont été identifiés comme activateurs de la voie PKA *in vivo*, soit une source de carbone fermentescible, tel le glucose, et l'acidification intracellulaire. L'induction de cette cascade de signalisation par le glucose requiert un système composé d'un récepteur, la protéine G Gpr1p, couplé à la protéine G Gpa2p qui est aussi régulée négativement par Rgs2p (Kraakman *et al.*, 1999). Dans ce système, Gpr1p agit à titre de senseur des niveaux extracellulaires de glucose et catalyse l'échange de nucléotide guanine sur Gpa2p lorsqu'elle est activée par cette source de carbone fermentescible (Rolland *et al.*, 2000). En ce qui concerne Rgs2p, elle accélère l'hydrolyse de GTP par la protéine Gpa2p (Versele *et al.*, 1999) et inhibe la transduction de signal en poussant cette dernière à adopter une conformation inactive. Effectivement, seule Gpa2p liée en GTP est capable de stimuler l'adénylate cyclase. Celle-ci se compose des protéines Cdc35p et Cyr1p en plus d'être associée à

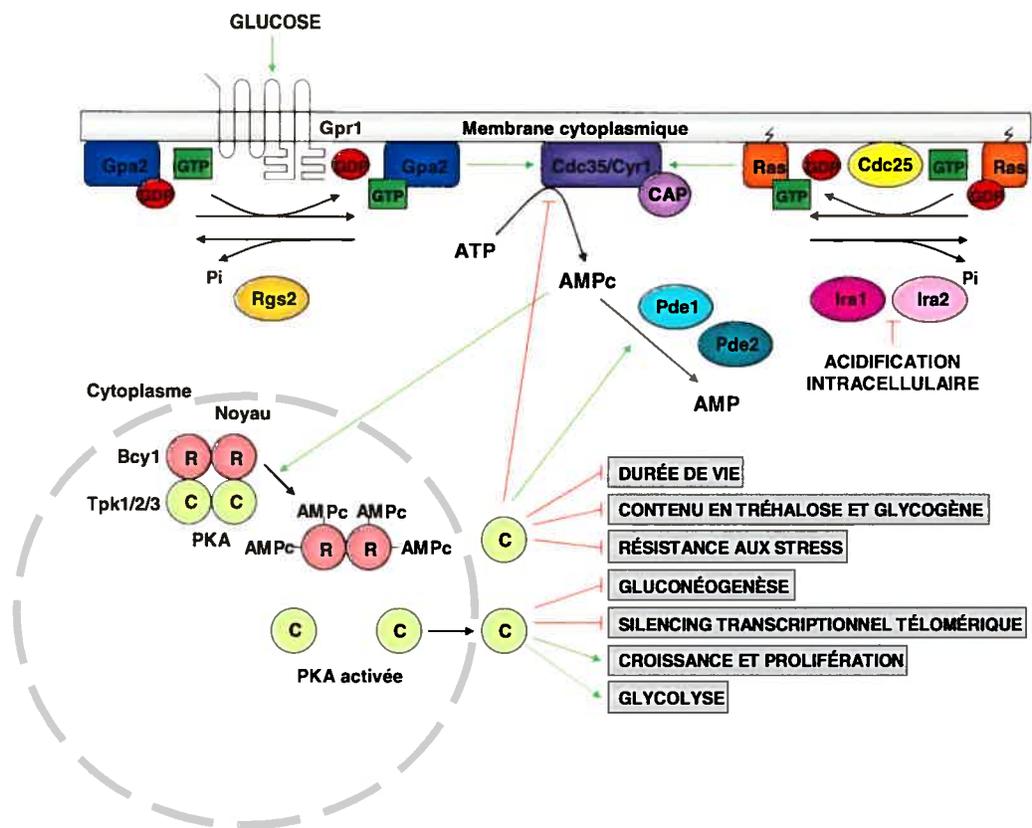


Figure 3 – Voie de transduction de signal de la protéine kinase dépendante de l'AMPc. Le récepteur Gpr1p est un senseur du glucose extracellulaire. Il provoque la synthèse d'AMPc par l'adénylate cyclase via la protéine Gpa2p qui peut retrouver sa conformation inactive suite à la stimulation de son activité GTPase par Rgs2p. L'acidification intracellulaire entraîne aussi la production du second messager en inhibant la fonction d'hydrolyse de GTP des protéines Ras induite par Ira1p et Ira2p. L'AMPc permet l'activation de la PKA qui à son tour régule plusieurs processus cellulaires en déclenchant des cascades de phosphorylation. Elle exerce également une rétroaction négative sur sa propre activité en inhibant la synthèse d'AMPc et en stimulant les phosphodiésterases Pde1p et Pde2p à convertir celui-ci en AMP (Inspiré de Thevelein & de Winde, 1999).

la protéine CAP, impliquée dans la régulation de cet enzyme. L'adénylate cyclase est responsable de la conversion d'ATP en AMPc qui agit à titre de second messager (Thevelein & de Winde, 1999). En effet, l'AMPc sert de signal activateur pour la PKA, la composante centrale de cette voie. Cette dernière est constituée de deux sous-unités catalytiques, synthétisées à partir des gènes *TPK1*, *TPK2* et *TPK3* (Toda *et al.*, 1987b), qui sont associées à une sous-unité régulatrice formée d'un homodimère de la protéine Bcy1p (Toda *et al.*, 1987a). Cette conformation inactive de la PKA est localisée dans le noyau. La liaison de deux molécules d'AMPc à chacune des sous-unités régulatrices entraîne l'activation de la PKA en provoquant la dissociation des sous-unités catalytiques. Ces dernières s'accumulent ensuite très rapidement dans le cytoplasme où, en activant des cascades de phosphorylation, elles contrôlent plusieurs processus métaboliques (Griffioen *et al.*, 2000). De fait, elles influencent négativement l'accumulation de tréhalose et glycogène, la résistance aux stress et la gluconéogenèse alors que la glycolyse ainsi que la croissance et la prolifération sont régulées à la hausse (Thevelein & de Winde, 1999). De plus, il a été montré que la stimulation de la voie PKA agit de manière négative sur la durée de vie et le silencing transcriptionnel télomérique (Lin *et al.*, 2000).

Tous ces effets peuvent aussi être enclenchés par les niveaux d'acidité intracellulaire. La fonction présumée de ce contrôle de la voie PKA pourrait être le maintien de niveaux acceptables d'ATP et d'un pH adéquat en présence d'une source de carbone fermentescible restreinte. En effet, sous cette condition, il a été montré que les niveaux d'ATP intracellulaires chutent drastiquement, ce qui entraîne une baisse du pH. Afin de régénérer l'ATP, la cellule puise dans ses réserves de tréhalose et glycogène en activant la voie PKA (Colombo *et al.*, 1998; Thevelein & de Winde, 1999). Concrètement, le rôle de l'acidification intracellulaire est de stimuler l'adoption d'une conformation liée en GTP des protéines Ras1p et Ras2p en inhibant l'activation de leur GTPase induite par Ira1p et Ira2p (Rolland *et al.*, 2000). De plus, les taux cellulaires de la forme active de ces protéine G augmentent rapidement, car leur facteur d'échange de nucléotide guanine Cdc25p est aussi un activateur de cette voie et sa fonction n'est pas influencée par l'acidité cellulaire (Thevelein, 1994).

Dans cette conformation, les protéines Ras1p et Ras2p agissent positivement sur la synthèse d'AMPC par l'adénylate cyclase, ce qui déclenche la cascade de transduction de signal.

La voie PKA peut être régulée négativement en faisant diminuer les niveaux intracellulaires de son second messager. Les phosphodiesterases de haute et faible affinité pour l'AMPC, respectivement Pde1p et Pde2p, sont responsables de l'hydrolyse de ce nucléotide cyclique en AMP (Sass *et al.*, 1986; Nikawa *et al.*, 1987). Cependant, la concentration d'AMPC cellulaire ne semble pas affectée chez les souches où les gènes codant pour les phosphodiesterases ont été délétés. Par contre, elle augmente chez celles dont ces délétions sont combinées à une mutation dans les gènes RAS. Il a donc été proposé que les phosphodiesterases pourraient être activées par phosphorylation via les sous-unités catalytiques de la PKA (Ma *et al.*, 1999). Ces dernières exercent aussi une très forte rétroaction négative sur la synthèse d'AMPC. Cependant, les mécanismes en jeu ne sont pas bien connus (Thevelein, 1994).

Le gène *LRE1* a été isolé lors d'un criblage pour des suppresseurs multicopies de la perte de résistance à la chaleur induite par le glucose chez le mutant *hsp104Δ hck2Δ tps1Δ*, une souche déficiente dans la synthèse de tréhalose et dans l'expression de la protéine heat shock Hsp104p (Versele & Thevelein, 2001). Puisque les autres gènes identifiés codent pour des protéines régulant négativement la voie PKA, les phénotypes associés à la surexpression et la délétion de *LRE1* ont été comparés à ceux caractérisant des mutants de la voie stimulée par l'AMPC. Selon les résultats de ces travaux, *Lre1p* semble exercer une activité antagoniste à celle de la PKA dans cette cascade de transduction de signal. Effectivement, sa présence en plusieurs copies dans la cellule ou son absence totale entraînent des phénotypes, concernant la résistance à la chaleur et les niveaux de tréhalose, semblables à ceux obtenus chez des souches dont l'activité PKA est réduite. Cependant, des analyses épistatiques démontrent que ces effets sont indépendants de l'AMPC et de la PKA. De plus, la

kinase Yak1p, contrôlant une voie parallèle antagoniste à celle de la PKA (Garrett *et al.*, 1991) et la kinase Sch9p, responsable des effets induits par le glucose et l'azote sur des cibles partagées avec celles de cette voie (Toda *et al.*, 1988; Crauwels *et al.*, 1997), ne sont pas nécessaires à la fonction de Lre1p. En plus, Lre1p ne semble pas agir en aval de la PKA sur la kinase Rim15p, régulée négativement par phosphorylation et requise pour l'accumulation de réserves de tréhalose dans des conditions de carence nutritionnelle (Reinders *et al.*, 1998), ainsi que sur les facteurs de transcription Msn2p et Msn4p, impliqués dans la réponse à divers stress et modulés négativement par la PKA via un mécanisme de séquestration dans le cytoplasme (Görner *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998b). En bref, ces travaux semblent démontrer que Lre1p agit sur la perte de résistance à la chaleur induite par le glucose de manière indépendante de la voie stimulée par l'AMPc (Versele & Thevelein, 2001).

Des preuves scientifiques récentes semblent associer une faible activité PKA au processus de maintien de la paroi cellulaire. Effectivement, le gène *PDE2* a été identifié comme suppresseur multicopies de la dépendance au sorbitol d'un mutant *srb1-1* hypersensible au choc hypotonique (Stateva *et al.*, 1991; Tomlin *et al.*, 2000). Ce dernier a été caractérisé comme présentant des altérations au niveau de la paroi cellulaire, notamment dans son contenu en glucanes et phosphomannoprotéines (Maerkisch *et al.*, 1983; Blagoeva *et al.*, 1991). De plus, quelques phénotypes associés au mutant *pde2* semblent liés à des défauts au niveau de l'intégrité de cette structure. En effet, il est très sensible au choc hypotonique provoquant la lyse des cellules et sa porosité cellulaire est augmentée, car il peut être transformé avec de l'ADN sans aucun recours à des ions lithium (Tomlin *et al.*, 2000). En plus, la sensibilité du mutant *lre1Δ* à la caféine (Bianchi *et al.*, 1999), un composé inhibiteur des phosphodiésterases de l'AMPc et du GMPc, pourrait fournir un élément de preuve supplémentaire supportant l'interaction génétique entre ces deux voies cellulaires. Cependant, des travaux supplémentaires sont requis afin de mieux comprendre le rôle de Lre1p dans ces processus.

2.2.4. Inhibiteur de la kinase Cbk1p.

Le gène *CBK1* code pour une kinase non essentielle bien conservée chez les eucaryotes supérieurs et similaire à la kinase de la dystrophie myotonique humaine NDR1 (Nasr *et al.*, 1996). Les phénotypes associés au mutant *cbk1Δ* chez la souche W303 sont la conversion du patron de bourgeonnement bipolaire à aléatoire, une morphologie cellulaire ronde plutôt qu'ellipsoïdale et la formation de larges agrégats de cellules (Racki *et al.*, 2000). Puisque Cbk1p régule la transcription du gène *CTS1*, dont le produit est une endochitinase, via l'activation du facteur de transcription Ace2p par phosphorylation (McBride *et al.*, 1999; O'Conallain *et al.*, 1999), il a été proposé que ce dernier phénotype observé soit causé par une déficience au niveau de la séparation des cellules chez ce mutant. En effet, l'anneau de chitine formé à la base du bourgeon lors du cycle cellulaire doit être digéré afin de permettre la dissociation des cellules mère et fille à la fin de la division et requiert l'activité de Cts1p. Même si la transcription du gène *CBK1* n'est pas régulée par le cycle cellulaire, sa localisation en est dépendante et essentielle à l'activation du facteur de transcription Ace2p qui lui est sujet à une telle régulation. Cependant, Cbk1p semble contrôler la morphogenèse cellulaire et le patron de bourgeonnement indépendamment de son effet sur l'expression de l'endochitinase (Racki *et al.*, 2000).

Un criblage deux-hybrides a été effectué afin d'identifier des substrats de la kinase Cbk1p et le gène *LRE1* a été isolé lors de cet essai (Racki *et al.*, 2000). La signification fonctionnelle de cette interaction a donc été étudiée plus en détails (Versele & Thevelein, 2001). Premièrement, il a été démontré que la surexpression de *LRE1* réprime la transcription du gène *CTS1*, ce qui entraîne un phénotype d'agrégation cellulaire, alors que l'effet contraire est observé chez un mutant *lre1Δ*. De plus, ce gène demeure réprimé chez un mutant *cbk1Δ lre1Δ* et aucun effet de répression additionnel n'est obtenu en surexprimant *LRE1* chez le mutant *cbk1Δ*. Il a aussi été montré que la surexpression de *LRE1* chez la souche W303 provoque un changement du patron de bourgeonnement de bipolaire à aléatoire et de morphologie

cellulaire ellipsoïdale à ronde. Ces analyses épistatiques semblent donc démontrer que Lre1p affecte la séparation des cellules et le patron de bourgeonnement en inhibant directement l'activité de Cbk1p.

Une forte accumulation de tréhalose ainsi qu'une augmentation de la résistance à la chaleur ont aussi été observées chez le mutant *cbk1Δ* et ne sont pas affectées par la surexpression ou la délétion du gène *LRE1*. Cependant, aucun effet sur les niveaux de tréhalose n'a été obtenu chez le mutant *ace2Δ*, alors que cette mutation confère une résistance accrue à la chaleur. En plus, la surexpression de *LRE1* chez cette souche permet d'amplifier ces phénotypes (Versele & Thevelein, 2001). Il a été suggéré que la hausse des réserves de tréhalose et de résistance à chaleur sont aussi le résultat de l'effet inhibiteur de Lre1p sur Cbk1p et qu'ils sont indépendants du facteur de transcription Ace2p. De plus, la PKA n'exerçant aucun contrôle sur l'expression du gène *CTS1*, il semble que Lre1p et Cbk1p ne fonctionnent pas en aval de la cascade de signalisation déclenchée par cette kinase. Un modèle présentant une nouvelle voie de régulation de certaines cibles affectées par la PKA a été proposé. Il stipule qu'en condition de carence nutritionnelle ou d'inhibition de croissance, Lre1p exercerait une fonction inhibitrice sur Cbk1p. Conséquemment, ceci entraînerait l'accumulation de molécules impliquées dans la protection contre divers stress, la hausse des réserves de tréhalose et la biogenèse d'une paroi cellulaire plus robuste permettant une élévation du seuil de résistance à la chaleur.

3. Problématique et objectifs de travail

Tel que mentionné dans la première section du contexte théorique, nous avons déjà identifié Lre1p en tant que partenaire protéique potentiel de la petite protéine G Gsp1p grâce à la technique de la librairie d'épitopes phagiques (Clément & Belhumeur, résultats non publiés). La fonction associée au gène *LRE1* n'étant pas

bien définie et cette interaction génétique avec la voie *PRP20/GSP1* étant jusqu'à présent insoupçonnée, ce travail a pour but de caractériser la protéine issue du gène *LRE1* et son interaction avec Gsp1p.

Cette étude comporte donc deux volets. Le premier consiste à confirmer l'interaction présumée entre les protéines Lre1p et Gsp1p, autant *in vitro* qu'*in vivo*. En ce qui concerne le second volet, il vise à préciser le(s) rôle(s) cellulaire(s) de Lre1p en déterminant sa localisation subcellulaire, les phénotypes associés à sa délétion ainsi que ses partenaires protéiques et génétiques. De plus, ceci nous permettra de spécifier la signification biologique de l'interaction entre ces deux protéines. En bref, les résultats présentés dans cet ouvrage pourraient associer Gsp1p à d'autres fonctions cellulaires à caractériser.

MÉTHODE

1. Milieux de culture, plasmides et souches utilisées

Les milieux de culture ont été préparés selon les recettes décrites au tableau III. Lorsqu'ils étaient utilisés sous forme de gélose, 2 % d'agar était ajouté. De plus, 100 µg/mL d'ampicilline ont été ajoutés au 2YT, 300 µg/mL de généticine (Gibco BRL) ou 100 µg/mL de nouséothricine (WERNER BioAgents) ont été ajoutés au YPDA, 1 µg/mL d'antimycine A (Sigma) a été ajouté au YPDA ou au YP(G/E) et 25 µg/mL de bromure d'éthidium ont été ajoutés au YNB-Leu/Met/Ura/His glucose ou au YNB-Ura/Lys/Ade/Trp/His/Leu glucose selon les besoins. Dans le cas des milieux renfermant de la nouséothricine, de l'acide glutamique (0,1 %) a été ajouté lors de leur préparation. Les plasmides utilisés sont listés au tableau IV. La souche *Escherichia coli* DH10B (*F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara,leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL nupG* (Gibco BRL)) a servi d'hôte lors des constructions plasmidiques décrites dans les sections 2 et 3 alors que les protéines de fusion GST ont été produites par la souche *E. coli* BL21 (*F dcm ompT hsdS(r_Bm_B) gal*). En ce qui concerne les souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées dans cette étude, elles sont décrites au tableau V.

2. Clonages

Les méthodes standards décrites par Sambrook *et al.* (1989) ont été suivies lors des manipulations de l'ADN recombinant, à moins d'avis contraire.

Le plasmide *LRE1/pBluescript* a été construit en insérant un fragment de 2,5 kb, obtenu suite à la digestion de l'ADN d'un clone génomique renfermant le gène *LRE1* par l'enzyme de restriction EcoRV, entre les sites Ecl136II et EcoRV du vecteur pBluescript.

Tableau III – Milieux de culture utilisés

Milieu	Composantes
CATU glucose et CAT glucose	0,67 % Yeast Nitrogen Base (sans acides aminés); 0,5 % casamino acids; 0,008 % adénine; 0,002 % tryptophane; 2 % glucose; +/- 0,0025 % uracile
CAU glucose	0,67 % Yeast Nitrogen Base (sans acides aminés); 0,5 % casamino acids; 0,008 % adénine; 0,0025 % uracile; 2 % glucose
YNB glucose, drop-out sans leucine	0,67 % Yeast Nitrogen Base (sans acides aminés); 0,11 % Complete Supplement Mixture (minus adenine-histidine-leucine-lysine-tryptophane-uracile) (Bio101); 0,008 % adénine; 0,002 % tryptophane; 0,002 % histidine; 0,003 % lysine; 0,0025 % uracile; 2 % glucose
YNB-Leu/Ura/His/Met glucose	0,67 % Yeast Nitrogen Base (sans acides aminés); 0,003 % leucine; 0,0025 % uracile; 0,002 % histidine; 2 % glucose; 0,002 % méthionine
YNB-Leu/Ura/His/Trp glucose	0,67 % Yeast Nitrogen Base (sans acides aminés); 0,003 % leucine; 0,0025 % uracile; 0,002 % histidine; 0,002 % tryptophane; 2 % glucose
YNB-Ura/Lys/Ade/Trp/His/Leu glucose	0,67 % Yeast Nitrogen Base (sans acides aminés); 0,0025 % uracile; 0,003 % lysine; 0,008 % adénine; 0,002 % tryptophane; 0,002 % histidine; 0,003 % leucine; 2 % glucose
YNB-Ura/His lactate/glucose	0,67 % Yeast Nitrogen Base (sans acides aminés); 0,0025 % uracile; 0,002 % histidine; 2 % Na-lactate; 0,05 % glucose
YPDA et YPD	1 % yeast extract; 2 % peptone; 2 % glucose; +/- 0,008 % adénine
YP(Gal)A	1 % yeast extract; 2 % peptone; 2 % galactose; 0,008 % adénine
YP(G/E)A et YP(G/E)	1 % yeast extract; 2 % peptone; 3 % glycérol; 3 % ethanol; +/- 0,008 % adénine
2YT	1 % yeast extract; 1,6 % tryptone; 1 mM NaOH; 85,5 mM NaCl

Tableau IV – Plasmides utilisés

Nom du plasmide	Caractéristiques
pBluescript	Promoteurs T3 et T7, Amp ^R (Stratagene)
pBS1479	Cadre de lecture ouvert de l'étiquette TAP (CBP, site de clivage de la TEV, Protéine A), Amp ^R , <i>TRP1</i> de <i>K. lactis</i> (Puig <i>et al.</i> , 2001)
pDP6	Amp ^R , <i>LYS2</i> (Fleig <i>et al.</i> , 1986)
pGEX-4T2	Cadre de lecture ouvert de la GST, P _{lac} , Amp ^R , lac I ^q (Amersham Pharmacia)
pGEX-4T3	Cadre de lecture ouvert de la GST, P _{lac} , Amp ^R , lac I ^q (Amersham Pharmacia)
pMCS5	Promoteur T7, Amp ^R (Hoheisel, 1994)
pRS316	Amp ^R , CEN, <i>URA3</i> (Sikorski & Hieter, 1989)
pT7Blue2	Promoteur T7, 5'UTR de la globine de <i>Xenopus</i> , Amp ^R (Novagen)
YEp352	Amp ^R , 2 μ , <i>URA3</i> (Hill <i>et al.</i> , 1986)
<i>GSP1</i> /pGEX-3X	Cadre de lecture ouvert de <i>GSP1</i> cloné en aval de celui de la GST, P _{lac} , Amp ^R , lac I ^q (Belhumeur <i>et al.</i> , 1993)
<i>HA-GSP1</i> /pRS316	<i>GSP1</i> sous son propre promoteur dans lequel un épitope HA a été inséré en N-terminal de la région codante, dans le plasmide pRS316 (Stochaj <i>et al.</i> , 1998)
<i>KANMx4</i> /pFA6	Module <i>HIS3Mx6</i> de <i>S. pombe</i> sous le contrôle du promoteur <i>TEF</i> de <i>A. gossypii</i> , cassette <i>KANMx4</i> , GFP de <i>A. victoria</i> fusionné au terminateur <i>ADHI</i> de <i>S. cerevisiae</i> (Wach <i>et al.</i> , 1997)
<i>LRE1</i> /pBluescript	Fragment de 2500 pb de <i>LRE1</i> génomique digéré par EcoRV dans pBluescript coupé <i>Ecl136II</i> /EcoRV
<i>Ire1</i> :: <i>KANMx4</i> /pBluescript	Fragment de 1500 pb de <i>KANMx4</i> /pFA6 coupé <i>SmaI</i> / <i>Ecl136II</i> dans <i>LRE1</i> /pBluescript coupé <i>BsmI</i> / <i>Tth111I</i>

Tableau IV – Plasmides utilisés (suite)

Nom du plasmide	Caractéristiques
<i>lre1::LYS2/pBluescript</i>	Fragment de 4800 pb du vecteur pDP6 coupé HindIII dans <i>LRE1/pBluescript</i> coupé EcoRI/NdeI
<i>LRE1</i> ₍₁₁₋₂₄₂₎ /pGEX-4T2	Fragment de 750 pb, codant pour les 242 premiers acides aminés de <i>Lre1p</i> , du plasmide <i>LRE1/pMCS5</i> coupé HpaI/EcoRI dans pGEX-4T2 coupé SmaI
<i>LRE1</i> ₍₁₁₃₈₋₅₈₃₎ /pGEX-4T2	Fragment de 1600 pb, codant pour les 445 derniers acides aminés de <i>Lre1p</i> , du plasmide <i>LRE1/pMCS5</i> coupé StuI/XhoI dans pGEX-4T2 coupé SmaI/XhoI
<i>LRE1</i> ₍₂₃₇₋₅₈₃₎ /pGEX-4T3	Fragment de 1300 pb, codant pour les 346 derniers acides aminés de <i>Lre1p</i> , du plasmide <i>LRE1/pMCS5</i> coupé EcoRI/XhoI dans pGEX-4T3 coupé EcoRI/XhoI
<i>LRE1/pMCS5</i>	Fragment de 1900 pb du plasmide <i>LRE1/pBluescript</i> coupé NheI/EcoRV dans pMCS5 coupé NheI/EclI36II
<i>LRE1/pT7Blue2</i>	PCR sur <i>LRE1/YEp352</i> avec les amorces P28 et P29 puis digéré EclI36II/EcoRV dans pT7Blue2 coupé SmaI
<i>LRE1/YEp352</i>	Fragment de 2500 pb de <i>LRE1</i> génomique digéré par EcoRV dans YEp352 coupé SmaI
P _{NOPI} -ProtA	Cadre de lecture ouvert de la protéine A, sous le contrôle de P _{NOPI} , CEN, <i>LEU2</i> (Lau <i>et al.</i> , 2000)
ProtA- <i>LRE1/pNOPPATA1L</i>	PCR sur <i>LRE1/YEp352</i> avec les amorces P29 et P205 puis digéré Sall dans P _{NOPI} -ProtA coupé Sall

Tableau V – Souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées

Souche	Génotype
BY4741	<i>MATa leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 his3Δ1</i> (Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
BY4741 <i>ire1Δ</i>	<i>MATa leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 his3Δ1 ire1::KANMx4</i> (Research Genetics)
cIABYS86	<i>MATα leu2 ura3Δ2 his3 pral prb2 prc1 cps</i> (H. Bussey, Université McGill)
PSY962	<i>MATα ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63 gsp1::HIS3 gsp2::HIS3</i> (plasmide <i>GSP1/Yep24</i>) (P. Silver, Harvard Medical School)
PSY962 <i>ire1Δ</i>	<i>MATα ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63 gsp1::HIS3 gsp2::HIS3 ire1::KANMx4</i> (plasmide <i>GSP1/Yep24</i>) (Cette étude)
SEY6210	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ901 suc2Δ9</i> (H. Bussey, Université McGill)
SEY6210 <i>ire1Δ</i>	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ901 suc2Δ9 ire1::LYS2</i> (Cette étude)
UCC3505	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 ppr::HIS3 adh4::URA3-TEL DIA5-1</i> (Singer & Gottschling, 1994)
UCC3505 <i>ire1Δ</i>	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 ppr::HIS3 adh4::URA3-TEL DIA5-1 ire1::KANMx4</i> (Cette étude)
W303	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i> (Thomas & Rothstein, 1989)
W303 <i>ire1Δ</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ire1::KANMx4</i> (Cette étude)
W303 <i>LRE1-TAP</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 LRE1-TAP</i> (Cette étude)
YPH499	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3Δ200 leu2Δ1</i> (Sikorski & Hieter, 1989)
YPH499 <i>ire1Δ</i>	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 ire1::KANMx4</i> (Cette étude)

Le plasmide *LRE1/pMCS5* a été généré à l'aide d'un fragment de 1,9 kb obtenu suite à la digestion du plasmide *LRE1/pBluescript* via les enzymes de restriction *NheI* et *EcoRV*. Celui-ci a été inséré entre les sites *NheI* et *Ecl136II* du vecteur *pMCS5*.

Pour ce qui est des constructions issues de l'insertion de *LRE1* dans les vecteurs *pGEX-4T2* et *pGEX-4T3*, trois différents clonages ont été effectués avec des versions tronquées de ce gène. Le plasmide *LRE1_[1-242]/pGEX-4T2* a été obtenu en digérant le plasmide *LRE1/pMCS5* avec *HpaI* et *EcoRI*, ce qui a généré un fragment de 750 pb correspondant aux nucléotides codant pour les 242 premiers acides aminés de la protéine *Lre1p*. Par la suite, ce fragment a été inséré dans le site *SmaI* du vecteur *pGEX-4T2*. En ce qui concerne le plasmide *LRE1_[138-583]/pGEX-4T2*, un fragment de 1,6 kb, codant pour les 445 derniers acides aminés de la protéine *Lre1p*, obtenu suite à la digestion du plasmide *LRE1/pMCS5* à l'aide des enzymes de restriction *StuI* et *XhoI*, a été inséré entre les sites *SmaI* et *XhoI* du vecteur *pGEX-4T2*. Finalement, le plasmide *LRE1_[237-583]/pGEX-4T3* a été construit suite à l'obtention d'un fragment de 1,3 kb, codant pour les 346 derniers acides aminés de la protéine *Lre1p*, grâce à la digestion du plasmide *LRE1/pMCS5* par *EcoRI* et *XhoI*. Ce fragment a été inséré entre les sites *EcoRI* et *XhoI* du vecteur *pGEX-4T3*.

Le plasmide *LRE1/YEp352* a été construit en insérant un fragment de 2,5 kb, obtenu suite à la digestion de l'ADN d'un clone génomique renfermant le gène *LRE1* par l'enzyme de restriction *EcoRV*, dans le site *SmaI* du vecteur *YEp352*.

Le plasmide *LRE1/pT7Blue2* a été obtenu par le clonage suivant. Premièrement, le gène *LRE1* a été amplifié à partir du plasmide *LRE1/YEp352* à l'aide des amorces P28 (G AAG AGC TCC AAT ACG CAT ACT CAA CAT; site de restriction *Ecl136II* en gras) et P29 (CAA GAT ATC TAA GGT TAC GAT TCA CC; site de restriction *EcoRV* en gras). Les réactions de PCR ont été effectuées en présence de dNTP (0,4 mM de chacun des dNTP suivants : dATP, dCTP, dGTP et dTTP), de DMSO (10 %), de tampon Vent (10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM

Tris-HCl, 2 mM MgSO₄, 0,1 % Triton X-100), de MgCl₂ (2mM) et d'ADN polymérase Vent (2U) (NEB). Après 4 minutes d'incubation à 94°C, le cycle suivant a été suivi : 1 minute à 94°C, 1 minute à 50°C et 2,5 minutes à 72°C, pendant 30 cycles. Les fragments de PCR obtenus ont été digérés par les enzymes de restriction Ecl136II et EcoRV et purifiés suite à une migration sur un gel d'agarose 0,6 % et une extraction de l'ADN du gel à l'aide du kit SEPHAGLASTM BandPrep (Amersham Pharmacia). Ce fragment a été inséré dans le site SmaI du vecteur pT7Blue2 (Novagen), tel que fourni par le fabricant.

Pour ce qui est du plasmide ProtA-*LRE1*/pNOPPATA1L, il a été construit de la façon suivante. Tout d'abord, le gène *LRE1* a été amplifié à partir du plasmide *LRE1*/YEp352 à l'aide des amorces P29 (CAA **GAT ATC TAA GGT TAC GAT TCA CC**; site de restriction EcoRV en gras) et P205 (T **AGG AGT CGA CCC AAT ACG CAT ACT CAA CAT GTG**; site de restriction SalI en gras). Les réactions de PCR ont été effectuées en présence de dNTP (0,4 mM de chacun des dNTP suivants : dATP, dCTP, dGTP et dTTP), de DMSO (10 %), de tampon Vent (10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄, 0,1 % Triton X-100), de MgCl₂ (2mM) et d'ADN polymérase Vent (2U) (NEB). Après 3 minutes d'incubation à 94°C, le cycle suivant a été suivi : 30 secondes à 94°C, 1 minute à 45°C et 1 minute à 72°C, pendant 25 cycles suivi d'une incubation finale de 2 minutes à 72°C. Les fragments de PCR obtenus ont été digérés par SalI et purifiés suite à une migration sur un gel d'agarose 0,6 % et une extraction de l'ADN du gel à l'aide du kit SEPHAGLASTM BandPrep (Amersham Pharmacia). Ce produit de digestion a été inséré dans le site SalI du vecteur P_{NOP1}-ProtA.

3. Obtention de mutants *lre1Δ* par la méthode de remplacement de gène

L'allèle *lre1::KANMx4* a été construit par clonage d'un fragment SmaI/Ecl136II de 1,5 kb, renfermant la cassette de résistance à la généticine (*KANMx4*) issue du plasmide *KANMx4*/pFA6, entre les sites de restriction BsmI et

Tth111I flanquant le gène *LRE1* déjà présent sur le vecteur pBluescript. Ensuite, le plasmide obtenu (*lre1::KANMx4/pBluescript*) a été digéré par les enzymes de restriction Bsu36I et XhoI pour obtenir un fragment de 2,5 kb comprenant l'allèle *lre1::KANMx4* utilisé pour transformer les souches PSY962, UCC3505, W303 et YPH499 étalées sur une gélose YPDA additionnée de généticine. En ce qui concerne l'allèle *lre1::LYS2*, il a été construit par clonage d'un fragment obtenu suite à la digestion du vecteur pDP6, renfermant le marqueur de sélection *LYS2*, par l'enzyme de restriction HindIII entre les sites EcoRI et NdeI du plasmide *LRE1/pBluescript*. Par la suite, le plasmide obtenu (*lre1::LYS2/pBluescript*) a été digéré par les enzymes Bsu36I et XhoI dans le but d'obtenir un fragment comprenant l'allèle *lre1::LYS2* utilisé pour transformer la souche SEY6210 étalée sur une gélose YNB-Leu/Ura/His/Trp glucose. La transformation a été effectuée tel que décrit à la section 4, à l'exception du fait que les cellules ayant reçu l'allèle *lre1::KANMx4* ont été incubées 4 heures à 30°C en guise de délai d'expression avant d'être étalées sur le milieu sélectif. Afin de s'assurer que les allèles *lre1::KANMx4* générés *in vitro* se sont intégrés au bon endroit dans le génome des souches recombinantes, leur ADN génomique a été extrait en ajoutant un faible inoculum à 100 µL de tampon d'extraction (50 mM NaCl; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,5 % Triton X-100; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0), l'équivalent de 0,1 g de billes de verre (diamètre de 0,5 mm), 25 µL de phénol et 25 µL de chloroforme. Après avoir vortexé vigoureusement pendant 4 minutes, les extraits ont été centrifugés 5 minutes à vitesse maximale. Un volume de 10 µL du surnageant a été mélangé à 90 µL d'eau et un PCR a été effectué sur 2 µL de cette suspension d'ADN génomique en utilisant les amorces P199 (CTC CAC AGG TTA TTG TGG TAT G) et P171 (TGA TTT TGA TGA CGA GCG TAA T). Les réactifs utilisés pour le PCR sont du tampon de PCR-colonie (12,5 mM Tris-HCl, pH 8,5; 56 mM KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de chacun des dNTP (dATP, dGTP, dCTP et dTTP), 10 pmol de chacune des amorces et 2 unités d'ADN polymérase Taq (Roche). L'amplification des fragments d'ADN a été effectuée selon le programme suivant : 4 minutes à 94°C suivie de 35 cycles de 1 minute à 94°C, 1 minute à 50°C et 2 minutes à 72°C suivis d'une incubation finale de 10 minutes à

72°C. Les échantillons de PCR ont été migrés sur un gel d'agarose 0,6 % coloré au bromure d'éthidium.

4. Transformation bactérienne

Préalablement à la transformation, les cellules bactériennes ont été rendues compétentes à la réception d'un plasmide selon un protocole modifié de Hanahan (1983). Des colonies isolées à partir d'une culture pure ont été obtenues après une incubation de 16 heures à 37°C sur gélose 2YT. Quinze de ces colonies ont par la suite été repiquées dans 20 mL de 2YT. À l'obtention d'une D.O._{550nm} de 0,28, soit après environ 2 heures d'incubation à 37°C avec agitation, 10 mL de cette préculture ont été transférés dans 200 mL de 2YT. Le tout a été incubé à 37°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une D.O._{550nm}. Ensuite, les bactéries ont été refroidies sur glace et le 200 mL de culture a été réparti dans quatre tubes de 50 mL. Suite à une centrifugation de 10 minutes à 480g à 4°C, chaque culot a été resuspendu dans 20 mL de tampon Tfb I (30 mM CH₃COOK; 100 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 15 % glycérol; pH 5,8 ajusté avec l'acide acétique; stérilisé par filtration) et gardé sur glace pendant 5 minutes. Après une seconde centrifugation de 10 minutes à 480g, chacun des culots a été resuspendu dans 2 mL de tampon Tfb II (10 mM PIPES; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 15 % glycérol; pH 6,5 ajusté avec du KOH; stérilisé par filtration) et placé sur glace pour 15 minutes. Finalement, les cellules rendues compétentes ont été distribuées en fractions de 100 µL dans des tubes à congélation et congelées immédiatement dans l'azote liquide. Elles ont été entreposées à -80°C jusqu'à leur utilisation. Lors de la transformation, 100 µL de cellules compétentes ont été décongelées sur glace et un volume maximal de 10 µL d'ADN plasmidique leur a été ajouté. Après avoir gardé ce mélange sur glace pour une période de 10 minutes, les bactéries ont subi un choc thermique de 90 secondes à 42°C. Suite à un refroidissement des cellules de 2 minutes sur glace, 400 µL de 2YT ont été ajoutés à l'ampoule qui a été incubée à 37°C pendant 60 minutes pour permettre un délai d'expression. Enfin, les cellules transformées ont été étalées sur une gélose 2YT renfermant de l'ampicilline et le tout a été incubé 16 heures à 37°C.

5. Transformation de levures

La méthode utilisée pour rendre les cellules de *S. cerevisiae* aptes à recevoir de l'ADN plasmidique est celle faisant intervenir l'acétate de lithium comme agent augmentant la perméabilité de la paroi cellulaire, développée par Ito *et al.* (1983) et Gietz *et al.* (1992). Brièvement, des colonies isolées à partir d'une culture pure ont été obtenues après une incubation de 16 heures à 30°C sur gélose YPDA. Ensuite, 5 mL de YPDA ont été inoculés avec une de ces colonies et incubés 16 heures à 30°C dans une roue. Au matin, cette préculture a été diluée dans 50 mL de YPDA et réincubée pour 3 à 5 heures à 30°C avec agitation. Les cellules ont été récoltées par centrifugation, lavées dans 20 mL d'eau stérile et transférées dans un tube Eppendorf. Par la suite, elles ont été suspendues dans l'équivalent d'un volume de cellules de LiAc 100 mM et incubées à 25°C pendant 15 minutes. Ensuite, 50 µL de ces cellules ont été ajoutées à 351 µL d'un mélange composé de 240 µL de PEG (50%, w/v), 36 µL de LiAc 1,0 M, 65 µL d'eau stérile, 5 µL d'ADN de sperme de saumon (10 mg/mL) bouilli 5 minutes et renfermant 5 µL de l'ADN plasmidique d'intérêt. Après une incubation de 30 minutes à 25°C, les cellules ont subi un choc thermique de 20 minutes à 42°C et ont été récupérées par centrifugation. Le culot a été resuspendu dans 500 µL d'eau stérile et 100 µL de cette suspension ont été étalés sur un milieu de sélection solide approprié qui, par la suite, a été incubé à 30°C pendant environ 3 jours.

6. Production d'anticorps anti-Lre1p

Afin d'obtenir des anticorps dirigés contre la protéine Lre1p, un mélange de trois protéines de fusion GST-Lre1p tronquées produites à partir des plasmides *LRE1*_[1-242]/pGEX-4T2, *LRE1*_[138-583]/pGEX-4T2 et *LRE1*_[237-583]/pGEX-4T3 a été utilisé, car celle-ci n'est pas très stable et le but était de générer des anticorps polyclonaux. Tout d'abord, 40 µg de ce mélange ont été injectés à des lapins. Trois semaines plus tard, une seconde injection de 60 µg a été effectuée. Finalement, à la septième semaine de la première injection, 60 µg des protéines de fusion GST-Lre1p ont été administrés et le sérum des lapins a été recueilli à la douzième semaine.

7. Immunobuvardage

Les échantillons protéiques à analyser ont été séparés sur un gel de SDS-polyacrylamide, de 8 à 12 % selon le cas, dans un tampon d'électrophorèse (25 mM Tris; 200 mM glycine; 0,1% SDS) à 200 volts. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose de type Protran (Schleicher & Schuell) dans un appareil Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad), rempli de tampon de transfert froid (25 mM Tris; 200 mM glycine; 20 % méthanol; 0,05 % SDS), soumis à 100 volts pendant 1 heure. Suite à un rinçage de la membrane dans 10 mL de TBS-Tween (10 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20), elle a été incubée avec agitation légère dans 20 mL de TBS-Tween-Lait (TBS-Tween; 5% lait déshydraté) pendant 1 heure. Ensuite, 10 mL de TBS-Tween-Lait renfermant l'anticorps primaire, à la concentration appropriée et dirigé contre la protéine à détecter, ont été ajoutés à la membrane. Après une heure d'incubation avec agitation légère, la membrane a été rincée deux fois avec du TBS-Tween et lavée trois fois avec cette solution pendant 5 minutes sous agitation légère. Par la suite, la membrane a été submergée pendant 30 minutes avec agitation légère dans 10 mL de TBS-Tween-Lait contenant l'anticorps secondaire, couplé à la peroxydase, à une concentration appropriée, puis rincée et lavée tel que mentionné précédemment. La révélation a été effectuée avec le « Lumi-Light Western blotting substrate » (Roche) ou le « Super Signal® West Pico Kit » (Pierce) en suivant les directives du fabricant et en utilisant les films « Super RX » (Fuji Medical X-Ray Film).

8. Essais d'interaction *in vitro*

8.1. Production et purification de GST et GST-Gsp1p

Deux cultures ont été obtenues en inoculant 10 mL de 2YT-ampicilline par *E. coli* BL21 portant soit le vecteur pGEX-4T2 ou le plasmide *GSP1/pGEX-3X* et en les incubant à 37°C avec agitation toute une nuit. Au matin, ces précultures ont été diluées à une D.O._{600nm} de 0,1 dans 250 mL de 2YT-ampicilline et incubées à 30°C avec agitation jusqu'à une D.O._{600nm} de 0,7. Par la suite, la production de GST et de la protéine de fusion GST-Gsp1p a été induite par l'ajout d'IPTG, à une concentration

finale de 100 mM, suivie d'une incubation de deux heures à 37°C sous agitation. Enfin, les cellules ont été recueillies par centrifugation pour être congelées et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation. Lors de la purification de GST et de GST-Gsp1p, les culots congelés ont été resuspendus dans 12,5 mL de tampon de lyse (40 mM HEPES-NaOH, pH 7,5; 150 mM NaCl; 2,5 mM MgCl₂; 10 % glycérol; 0,25% Tween 20; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF) (Noguchi *et al.*, 1996) auquel du GTP a été ajouté à une concentration finale de 1 mM. Ensuite, les cellules ont été lysées à l'aide des ultrasons (6 à 8 chocs de 30 secondes avec un appareil Vibra-Cell™ (Sonics & Materials Inc.) séparés par des pauses de 30 secondes sur glace) et incubées avec agitation pendant 30 minutes à 4°C suite à l'ajout de Triton X-100, à une concentration finale de 1 %. Les débris cellulaires ont été séparés par une centrifugation à 4°C de 10 minutes à 9000g. Par la suite, 200 µL d'une suspension à 50 % de billes Glutathione Sepharose™ 4B (Amersham Pharmacia Biotech AB) ont été ajoutés au surnageant recueilli et le tout a été incubé sous agitation pendant 30 minutes à 4°C. Après avoir lavé les billes trois fois avec 1 mL de tampon de lyse, la quantité de protéines purifiées a été estimée par SDS-PAGE (12 % acrylamide) suivie d'une coloration au bleu de Coomassie. Afin de rendre les concentrations des protéines GST et GST-Gsp1p équivalentes, des billes Glutathione Sepharose™ 4B ont été ajoutées à la préparation de protéines GST.

8.2. Réactions de transcription-traduction *in vitro*

L'ADN utilisé pour les réactions de transcription-traduction *in vitro* a été préalablement purifié à l'aide du « Quantum Prep Plasmid Miniprep » (Bio-Rad) selon les directives du fabricant et à partir de cultures bactériennes renfermant le plasmide *LRE1/pT7Blue2*. La quantité d'ADN purifié a été évaluée par migration des échantillons en parallèle avec des quantités connues d'ADN sur un gel d'agarose 0,6 % coloré au bromure d'éthidium. Par la suite, il a été utilisé pour la transcription-traduction *in vitro* en présence de méthionine ³⁵S à l'aide du « kit Single Tube Protein® System 3 » (Novagen) en suivant les directives du fabricant. La quantité et la qualité des protéines ainsi obtenues ont été évaluées par autoradiographie suivant la migration des échantillons sur un gel SDS-polyacrylamide de 10 % qui a, par la suite,

été fixé dans une solution de méthanol (50 %) et d'acide acétique (10 %) pendant 15 minutes et séché grâce à un mécanisme de pompe à vide pendant 1 heure. Les signaux radioactifs ont ensuite été détectés via l'exposition du gel à un film « BioMax MS » (Kodak) en présence d'un écran intensificateur « BioMax TranScreen-LE » (Kodak) pendant 4 heures.

8.3. Essais d'interaction *in vitro*

La réaction d'interaction a été amorcée suite à l'ajout des protéines obtenues par transcription-traduction *in vitro* aux protéines GST ou GST-Gsp1p liées aux billes de Glutathione SepharoseTM 4B en présence de tampon d'interaction (20 mM HEPES-NaOH, pH 7,5; 120 mM NaCl; 20 mM MgCl₂; 0,05 % Tween 20; 0,5 % albumine de sérum bovin; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF), correspondant au tampon A décrit par Noguchi *et al.* (1996). Le tout a été incubé avec agitation pendant une heure à 4°C et le mélange a été centrifugé une minute à 800g. Les billes ont ensuite été lavées cinq fois avec 1 mL de tampon d'interaction et les échantillons ont été migrés sur un gel SDS-polyacrylamide de 10 %. Par la suite, le gel a été fixé dans une solution de méthanol (50 %) et d'acide acétique (10 %) pendant 45 minutes et séché grâce à un mécanisme de pompe à vide pendant deux heures. Les signaux radioactifs ont été détectés suite à l'exposition du gel à un film « BioMax MS » (Kodak) en présence d'un écran intensificateur « BioMax TranScreen-LE » (Kodak).

9. Essais d'interaction *in vivo* par co-immunoprécipitation

Les souches BY4741 sauvage ou *ire1Δ* renfermant le plasmide *HA-GSP1/pRS316* ont été utilisées lors de cet essai. Une préculture de ces cellules dans 5 mL de CAT glucose a été obtenue après 16 heures d'incubation à 30°C. Elle a ensuite été diluée dans 50 mL de ce même milieu et les cellules ont été cultivées pour 3 à 5 heures à 30°C avec agitation. Elles ont été récoltées par centrifugation et lavées deux fois avec 25 mL de tampon TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 200 mM NaCl). Le culot a été resuspendu dans 400 µL de tampon de lyse (50 mM HEPES-KOH, pH 7,5;

200 mM NaCl; 1 mM EDTA, pH 8,0; 10 % glycérol; 0,5 % NP-40; 1 mM PMSF; 2X d'inhibiteur de protéases CompleteTM EDTA-free (Roche)) et l'équivalent de 500 μ L de billes de verre (diamètre de 0,5 mm) a été ajouté. La lyse a été effectuée à l'aide d'un agitateur de type Mixer 5432 (Eppendorf) pour une période de 40 minutes à 4°C. Le lysat a été récupéré en perçant le fond de l'eppendorf, en le superposant à un nouvel eppendorf et en centrifugeant 30 secondes à 15 000g. Le lysat transféré a ensuite été centrifugé à 15 000g pendant 15 minutes à 4°C. La quantité de protéines présente dans cet extrait total a été estimée par la technique de Bradford grâce au produit « Protein Assay » (Bio-Rad), ce qui a permis de déterminer que 19,1 mg de protéines seraient utilisées pour l'essai d'interaction. Après avoir ajusté le volume de cet échantillon protéique à 400 μ L avec du tampon de lyse, l'anticorps anti-Lre1p B2 a été ajouté (1:100) et le tout a été incubé dans une roue à 4°C pendant 3 heures. Par la suite, 20 μ L d'une suspension à 50 % de résine Protéine A SepharoseTM CL-4B (Amersham Pharmacia) ont été ajoutés à la réaction de liaison et l'incubation a été poursuivie dans les mêmes conditions pour une heure. La résine a ensuite été recueillie par centrifugation et lavée 3 fois avec 1 mL de tampon de lyse. Les protéines accrochées à la résine ont été récupérées suite à l'ajout de 35 μ L de tampon de chargement (6 % SDS; 20 % glycérol; 0,6 % bleu de bromophénol) et en plaçant les échantillons à 100°C pendant 5 minutes. Des quantités égales de ces échantillons ont été analysées par immunobuvardage suite à leur migration sur un gel de SDS-polyacrylamide de 12 % (Voir la section 7). L'anticorps anti-HA (BabCO, 1:10 000) suivi d'un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Roche, 1:20 000) ont été utilisés pour détecter la présence de la protéine de fusion Gsp1p-HA dans les échantillons.

10. Localisation cellulaire de Lre1p-ProtA par fractionnement subcellulaire

10.1. Fractionnement subcellulaire

La méthode utilisée pour le fractionnement subcellulaire a été inspirée de Vongsamphanh *et al.* (2001). Brièvement, une culture de 2 L, dans du YNB-Ura/His lactate/glucose, d'une D.O._{600nm} de 0,7 de la souche cIABYS86 portant le plasmide ProtA-LRE1/pNOPPATA1L a été obtenue après incubation avec agitation à 30°C.

Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 4080g pendant 10 minutes et lavées deux fois avec de l'eau. Les culots cellulaires ont été congelés immédiatement à l'azote liquide et entreposés à -80°C jusqu'à utilisation. Lors du fractionnement subcellulaire, les cellules ont été resuspendues dans un tampon Tris-DTT (100 mM Tris- SO_4 , pH 9,3; 10 mM DTT; 1 mM PMSF; 2X d'inhibiteur de protéases CompleteTM EDTA-free (Roche)) à raison de 0,3 g/mL pour ensuite être incubées avec légère agitation à 30°C pendant 10 minutes. Les cellules ont été récoltées par une centrifugation à 3000g de 5 minutes et lavées avec du tampon B (1,2 M Sorbitol; 20 mM KPO_4 , pH 7,4; 1 mM PMSF; 2 mM benzamidine). Elles ont été resuspendues dans ce tampon à raison de 0,1 g/mL et de la zymolyase 20T a été ajoutée à une concentration de 2,5 mg/g de culot cellulaire. Le tout a été incubé pendant 90 minutes dans un bain à 30°C en agitant légèrement jusqu'à digestion complète de la paroi, vérifiée par microscopie. Les sphéroplastés ont été récupérés par une centrifugation de 5 minutes à 3000g et lavés trois fois dans du tampon B à raison de 10 mL/g. À partir de cette étape, toutes les manipulations ont été effectuées à 4°C . Les sphéroplastés ont été resuspendus dans du tampon MIB (0,6 M mannitol; 20mM HEPES-KOH, pH 7,4; 1 mM PMSF; 2 mM benzamidine) à une concentration de 2 mL/g et lysés à l'homogénéisateur avec 30 coups de piston (verre et Téflon). L'efficacité de la lyse a été vérifiée par microscopie avant de passer à l'étape suivante. L'homogénat a été dilué deux fois dans du tampon MIB et une fraction de ce lysat total a été recueillie pour fins d'analyses. Le reste du lysat a été centrifugé à 3000g pendant 5 minutes. Ceci permet de séparer grossièrement les noyaux, retrouvés dans le culot, des mitochondries et de l'extrait cytoplasmique qui demeurent dans le surnageant. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et centrifugé à 12 000g pendant 10 minutes. Cette étape permet d'isoler grossièrement les mitochondries qui se retrouvent dans le culot. Le surnageant a été gardé et représente la fraction cytoplasmique analysée.

10.2. Purification des mitochondries

L'extrait brut de mitochondries a été dilué dans 200 μL de tampon MIB et déposé sur un gradient continu de 5 à 25 % de Nycodenz (Sigma) préalablement

préparé dans un tube SW 41 Ti Ultra-Clear™ (Beckman Coulter) avec du tampon B selon la méthode de Glick & Pon (1995). Le tout a été centrifugé à 107 000g pendant 90 minutes à 2°C dans un rotor SW 41 Ti. Les mitochondries forment une ligne beige pâle dans le gradient à l'endroit où la concentration de Nycodenz est de 16 %. La fraction mitochondriale a été recueillie en perçant le côté du tube à l'aide de l'aiguille d'une seringue pour être ensuite diluée cinq fois dans du tampon MIB. Après une centrifugation de 10 minutes à 12 000g, le culot a été resuspendu dans 200 µL de tampon d'extraction (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM NaCl; 5 % glycérol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 2X d'inhibiteur de protéases Complete™ EDTA-free (Roche)).

10.3. Purification des noyaux

L'extrait brut de noyaux a été lavé trois fois dans du tampon MIB en centrifugeant chaque fois à 3000g pendant 5 minutes. Le culot a été resuspendu dans 5 mL de ce même tampon et déposé sur un gradient discontinu de Ficoll 400 (Pharmacia) 30 à 50 % préalablement préparé dans un tube SW 28 Ultra-Clear™ (Beckman Coulter) selon la méthode de Dove *et al.* (1998). Le tout a été centrifugé à 58 000g pendant 60 minutes à 2°C dans un rotor SW 28. Les noyaux forment une bande diffuse dans le gradient au niveau de la couche de Ficoll 40 %. Un volume de 8 mL de cette couche a été recueilli à l'aide d'une seringue de 10 mL. Le tout a bien été mélangé et une fraction de 500 µL de cet extrait a été centrifugée 30 minutes à 12 000g. Le culot de noyaux a été resuspendu dans 500 µL de tampon TE-SDS (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,1 % SDS).

10.4. Analyse des différentes fractions

Les différents échantillons ont été dilués et mélangés à du tampon de chargement (3 % β-mercaptoéthanol; 3 % SDS; 10 % glycérol; 0,3 % bleu de bromophénol) en respectant les rapports cellulaires qu'ils représentent. Des quantités égales de chacun de ces échantillons ont ensuite été analysées par immunobuvardage suite à leur migration sur un gel de SDS-polyacrylamide de 10 % en parallèle avec

ces mêmes échantillons non équilibrés (Voir la section 7). La protéine de fusion Lre1p-ProtA a été détectée grâce à un anti-IgG de chèvre produit chez le lapin et couplé à la peroxydase (Sigma, 1:8000) suivi d'un anti-IgG de lapin aussi couplé à la peroxydase (Roche, 1:10 000). Quant aux protéines Cit1p et Yrb1p, elles ont été détectées respectivement par les anticorps primaires anti-Cit1p (obtenu de T. D. Fox, Ithaca, New York, 1:1000) et anti-Yrb1p (obtenu de A. Corbett, Atlanta, Georgie, 1:20 000) produits chez le lapin, suivis d'un anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Roche, 1:10 000). Finalement, pour détecter la protéine Nop1p, un anti-Nop1p produit chez la souris (obtenu de J. P. Aris, Gainesville, Floride, 1:10 000) suivi d'un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Roche, 1:5000) ont été utilisés.

11. Purification de chromatine

La méthode utilisée pour la purification de chromatine de *S. cerevisiae* est inspirée et modifiée de Donovan *et al.* (1997) et Liang & Stillman (1997). Brièvement, la souche cIABYS86 portant le vecteur P_{NOPI}-ProtA ou le plasmide ProtA-LRE1/pNOPATA1L a été cultivée dans 5 mL de milieu YNB-glucose, drop-out sans leucine via une incubation de 16 heures sous agitation à 30°C. Au matin, cette préculture a été diluée à une D.O._{600nm} de 0,25 dans 20 mL de ce même milieu et réincubée à 30°C jusqu'à l'atteinte d'une D.O._{600nm} de 0,5 à 1. L'équivalent de 10 D.O. de cellules ont été récoltées suite à une centrifugation d'une minute à 15 000g et resuspendues à une concentration de 10 D.O. dans du tampon PD (0,1 M PIPES-KOH, pH 9,4; 10 mM DTT) pour être ensuite placées sur glace pendant 10 minutes. Les cellules ont été centrifugées de nouveau à 15 000g pendant 1 minute et resuspendues dans du tampon sorbitol (1 % yeast extract; 2 % peptone; 0,2 % glucose; 50 mM KPO₄, pH 7,5; 0,6 M sorbitol; 10 mM DTT) pour atteindre une concentration cellulaire de 30 D.O.. Afin d'obtenir des sphéroplastes, de la zymolyase 100T a été ajoutée à une concentration finale de 0,2 mg/mL et le tout a été incubé à 30°C pendant 15 minutes. Ceux-ci ont ensuite été recueillis via une centrifugation de 3 minutes à 1000g et lavés avec 1mL tampon de lyse (0,4 M sorbitol; 150 mM KAc; 2 mM MgAc; 20 mM PIPES-KOH, pH 6,8; 1 mM PMSF; 2X

d'inhibiteur de protéases Complete™ EDTA-free (Roche)). Les sphéroplastes ont alors été resuspendus dans ce tampon à une concentration de 80 D.O. et du Triton X-100 a été ajouté à une concentration finale de 0,25 %. Le tout a été incubé sur glace pendant 5 minutes en agitant doucement afin de permettre la lyse des sphéroplastes. Un échantillon de 25 µL de ce lysat cellulaire a été gardé pour fins d'analyses. Le reste du lysat a été centrifugé à 15 800g pendant 15 minutes à 4°C et le surnageant a été recueilli en tant qu'échantillon représentant la fraction des protéines totales ne liant pas la chromatine. Le culot de chromatine a été lavé dans 1 mL de tampon de lyse auquel 0,25 % de Triton X-100 a été ajouté. Ce dernier a été gardé en guise d'échantillon renfermant la fraction des protéines totales liant la chromatine. Les trois différents échantillons ont été mélangés à du tampon de chargement (3 % β-mercaptoéthanol; 3 % SDS; 10 % glycérol; 0,3 % bleu de bromophénol) en respectant les rapports cellulaires qu'ils représentent. Des quantités égales de chacun de ces échantillons ont ensuite été analysées par immunobuvardage suite à leur migration sur un gel de SDS-polyacrylamide de 8 % (Voir la section 7). La protéine Lre1p-ProtA a été détectée grâce à l'utilisation d'un anti-IgG de chèvre produit chez le lapin et couplé à la peroxydase (Sigma, 1:4000) suivi d'un anti-IgG de lapin aussi couplé à la peroxydase (Roche, 1:10 000). En ce qui concerne les protéines Lys20p et Lys21p, elles ont été détectées par un anti-Lys20p/21p produit chez la souris (obtenu de J. P. Aris, Gainesville, Floride, 1:20 000) suivi d'un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Roche, 1:5000). Finalement, les anticorps utilisés pour détecter Yrb1p sont un anti-Yrb1p produit chez le lapin (obtenu de A. Corbett, Atlanta, Georgie, 1:20 000) suivi d'un anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Roche, 1:10 000).

12. Étude des phénotypes associés aux mutants *lre1Δ*

12.1. Sensibilité à différentes sources de carbone

Les souches SEY6210, BY4741, PSY962 et UCC3503, sauvage ou *lre1Δ*, ont été inoculées dans 5 mL de YPDA et incubées pendant 16 heures à 30°C avec agitation. Elles ont par la suite été diluées pour obtenir une suspension cellulaire

équivalente à une D.O._{600nm} de 1 dans 1 mL de YPDA. À partir de cet échantillon, des dilutions 1:100, 1:1000 et 1:10 000 ont été préparées dans ce même milieu. Finalement, 3 µL de chacune de ces suspensions cellulaires ont été déposées sous forme de gouttes sur géloses YPDA, YP(Gal)A et YP(G/E)A. Les pétris ont été incubés à 30°C pendant 24 heures.

12.2. Sensibilité à la caféine

Les souches SEY6210 et BY4741, sauvage ou *lre1Δ*, ont été inoculées dans 5 mL de YPDA et incubées pendant 16 heures à 30°C avec agitation. Elles ont par la suite été diluées pour obtenir une suspension cellulaire équivalente à une D.O._{600nm} de 1 dans 1 mL de YPDA. À partir de cet échantillon, des dilutions 1:100, 1:1000 et 1:10 000 ont été préparées dans ce même milieu. Finalement, 3 µL de chacune de ces suspensions cellulaires ont été déposées sous forme de gouttes sur gélose YPDA renfermant différentes concentrations de caféine (Sigma), soit de 0,00 %, 0,35 %, 0,40 %, 0,45 % et 0,50 %. Les pétris ont été incubés à 30°C jusqu'à 5 jours.

12.3. Essais de silencing transcriptionnel

Les souches UCC3505 et UCC3505 *lre1Δ*, avec le gène rapporteur *URA3* inséré près du télomère du chromosome VII-L, ont été inoculées dans 5 mL de YPDA et incubées pendant 16 heures à 30°C avec agitation. Elles ont par la suite été diluées pour obtenir une suspension cellulaire équivalente à une D.O._{600nm} de 1 dans 1 mL de YPDA. À partir de cet échantillon, des dilutions 1:100, 1:1000 et 1:10 000 ont été préparées dans ce même milieu. Finalement, 3 µL de chacune de ces suspensions cellulaires ont été déposées sous forme de gouttes sur géloses CATU glucose et CAT glucose. De plus, 3 µL d'une suspension cellulaire équivalente à une D.O._{600nm} de 1 de ces deux souches, avec le gène rapporteur *ADE2* inséré près du télomère du chromosome V-R, ont été déposés sous forme de gouttes sur une gélose YPD. Les pétris ont été incubés à 30°C jusqu'à 5 jours.

13. Purification de complexes protéiques par chromatographie d'affinité

13.1. Construction de la souche W303 *LRE1-TAP*

La méthode utilisée pour construire la souche W303 *LRE1-TAP* est tirée de Puig *et al.* (2001). Brièvement, un fragment de PCR renfermant la cassette TAP suivie du gène de biosynthèse du tryptophane de la levure *Kluyveromyces lactis* (*TRP1*) flanquée de 50 nucléotides renfermant le codon STOP en aval du gène *LRE1* et des 50 nucléotides précédents le codon STOP de ce gène a été généré à l'aide des amorces P263 (GGA AAA GAA AAT CCA AAT TAG GAC TCT TTA GAC ATA TTT TTT CAA GGA AGT CCA TGG AAA AGA GAA G) et P264 (TAA GGT TAC GAT TCA CCT TTT TAT TAC TTA TTA TTA ATA TTG TTG TAT TAT ACG ACT CAC TAT AGG G) à partir du plasmide pBS1479 (Figure 11A). La souche W303 a ensuite été transformée avec ce produit de PCR et les transformants ont été étalés sur une gélose CAU glucose (Voir section 5). L'intégration de la cassette TAP en C-terminal du gène *LRE1* dans le génome de cette souche a été vérifiée par un PCR sur l'ADN génomique (Voir section 3) des transformants obtenus à l'aide des amorces P267 (GTA AGA TCT CAT AGA ACG C) et P268 (GAG GGG TTA TTA CGA GAG). Afin de vérifier l'expression de la protéine de fusion Lre1p-TAP, un extrait total de protéines a été préparé à partir d'un culot de cellules d'une culture d'une D.O._{600nm} de 1,8 dans 25 mL de YPDA, inoculés avec la souche W303 *LRE1-TAP*, incubée à 30°C. Après avoir lavé les cellules avec du PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 5,4 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4), le culot a été resuspendu dans 600 µL de tampon RIPA froid (150 mM NaCl; 1 % NP-40; 0,5 % DOC; 0,1 % SDS; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 2X d'inhibiteur de protéases CompleteTM EDTA-free (Roche)) et l'équivalent de 500 µL de billes de verre froides (diamètre de 0,5 mm) a été ajouté. Après avoir vortexé vigoureusement pendant 2 minutes, le lysat a été centrifugé à 10 000g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant a été recueilli et mélangé à du tampon de chargement (3 % β-mercaptoéthanol; 3 % SDS; 10 % glycérol; 0,3 % bleu de bromophénol). Le lysat protéique a ensuite été analysés par immunobuvardage suite à la migration d'un échantillon sur un gel de SDS-polyacrylamide de 8 % (Voir la section 7). La protéine

de fusion Lre1p-TAP a été détectée grâce à l'utilisation d'un anti-IgG de chèvre couplé à la peroxydase produit chez le lapin (Sigma, 1:4000) suivi d'un anti-IgG de lapin aussi couplé à la peroxydase (Roche, 1:10 000). Afin de vérifier la fonctionnalité de la protéine de fusion Lre1p-TAP, les souches W303, sauvage, *LRE1-TAP* ou *lre1Δ*, ont été inoculées dans 5 mL de YPDA et incubées pendant 16 heures à 30°C avec agitation. Elles ont par la suite été diluées pour obtenir une suspension cellulaire équivalente à une D.O._{600nm} de 1 dans 1 mL de YPDA. À partir de cet échantillon, des dilutions 1:100, 1:1000 et 1:10 000 ont été préparées dans ce même milieu. Finalement, 3 µL de chacune de ces suspensions cellulaires ont été déposées sous forme de gouttes sur une gélose YPDA. Les pétris ont été incubés à 30°C pendant 24 heures.

13.2. Purification des complexes protéiques

La méthode utilisée pour la purification des complexes protéiques est modifiée de Puig *et al.* (2001) et de Krogan *et al.*, (2002). Brièvement, 3L de culture d'une D.O._{600nm} de 1,5 de 3 L des souches W303 sauvage ou *LRE1-TAP* dans du YPDA ont été obtenus après incubation avec agitation à 30°C. Les cellules ont été recueillies par centrifugation à 13 200g de 5 minutes à 4°C. Le culot a été lavé avec 500 mL d'eau froide, transféré dans un tube en polypropylène de 50 mL (Sarstedt) et congelé immédiatement à l'azote liquide. Il a été entreposé à -80°C jusqu'à utilisation. Lors de la lyse cellulaire, le tube a été ouvert à coups de marteau et les morceaux de culots congelés ont été versés dans un moulin à café (modèle 203-70, Krups) avec cinq morceaux de glace sèche. Le tout a été broyé jusqu'à environ 30 secondes après avoir entendu le dernier morceau se concasser. La poudre de lysat a été recueillie dans un bécher en verre de 100 mL et a été décongelée sur glace. Par la suite, 10 mL de tampon de lyse (250 mM KCl; 100 mM HEPES-KOH, pH 7,9; 1 mM EDTA; 2,5 mM DTT; 1 mM PMSF; 2X d'inhibiteur de protéases CompleteTM EDTA-free (Roche)) ont été ajoutés au lysat cellulaire et le tout a été transféré dans un tube en polyallomère 70.1 Ti (Beckman Coulter). Après une centrifugation de 2 heures à 106 000g et 4°C avec le rotor 70.1 Ti, le surnageant a été recueilli

doucement en évitant la phase supérieure lipidique et dialysé (membrane Spectra/Por[®], MWCO : 1000; Spectrum Laboratories, Inc.) pendant 3 heures à 4°C contre le tampon IPP (10 mM Tris-HCl, pH 7,9; 10 mM β -mercaptoéthanol; 2 mM CaCl₂; 0,1 % Triton X-100; 100 mM NaCl; 20 % glycérol; 1 mM PMSF; 2 mM benzamidine). Le dialysat a été congelé immédiatement à l'azote liquide pour être entreposé à -80°C jusqu'à utilisation. Lors de la purification par affinité, le dialysat a été décongelé rapidement et centrifugé à 106 000g dans un rotor 70.1 Ti pendant 30 minutes à 4°C. La quantité de protéines présente dans le surnageant a été estimée par la technique de Bradford grâce au produit « Protein Assay » (Bio-Rad) et un échantillon a été prélevé pour fins d'analyses. Ceci a permis de déterminer que 165 mg de protéines seraient ajoutées à 200 μ L de billes de calmoduline (Pharmacia) équilibrées avec le tampon IPP dans une colonne Poly-Prep (Bio-Rad). Le tout a été incubé 3 heures dans une roue à 4°C et les billes de calmoduline ont ensuite été lavées une fois avec 1 mL de tampon IPP et 6 fois avec 1 mL de tampon de lavage (10mM Tris-HCl, pH 7,9; 10 mM β -mercaptoéthanol; 0,1 mM CaCl₂; 0,1 % Triton X-100; 100 mM NaCl; 1 mM PMSF; 2X d'inhibiteur de protéases Complete[™] EDTA-free (Roche)). Par la suite, les billes de calmoduline ont été éluées cinq fois avec 100 μ L de tampon d'éluion (10 mM Tris-HCl, pH 7,9; 10 mM β -mercaptoéthanol; 3 mM EGTA, pH8,0; 0,1 % Triton X-100; 100 mM NaCl; 1 mM PMSF; 2X d'inhibiteur de protéases Complete[™] EDTA-free (Roche)) et les protéine éluées ont été précipitées à l'acétone. Du tampon de chargement (3 % β -mercaptoéthanol; 3 % SDS; 10 % glycérol; 0,3 % bleu de bromophénol) a été ajouté aux échantillons qui ont ensuite été analysés par immunobuvardage suite à leur migration sur un gel de polyacrylamide 8 % (Voir section 7). Les protéines Lrelp-TAP et Gsp1p ont été détectées respectivement grâce un anti-IgG de chèvre produit chez le lapin et couplé à la peroxydase (Sigma, 1:4000) ou un anti-Gsp1p produit chez le lapin (Belhumeur *et al.*, 1993, 1:1000) suivis d'un anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Roche, 1:10 000).

14. Étude des phénotypes associés à la délétion du gène *LRE1* chez des souches *rho*⁰

14.1. Obtention des mutants *rho*⁰

Afin de générer des mutants *rho*⁰ à partir des souches BY4741 et YPH499 sauvages et *lre1Δ*, 5 mL de milieu YNB-Leu/Ura/His/Met glucose renfermant du bromure d'éthidium ou 5 mL de milieu YNB-Ura/Lys/Ade/Trp/His/Leu glucose contenant du bromure d'éthidium ont été respectivement inoculées à l'aide d'un faible inoculum de ces souches. À l'obtention d'une D.O._{600nm} de 1 à 1,5 suite à une incubation à 30°C avec agitation, les cultures ont été diluées à une D.O._{600nm} de 0,1 dans leur milieu respectif décrit précédemment et le tout a été incubé à 30°C jusqu'à l'obtention d'une D.O._{600nm} de 1 à 1,5. Par la suite, 20 μL et 100 μL de ces cultures ont été striés sur gélose YPD de manière à obtenir des colonies isolées suite à une incubation de 3 jours à 30°C. Le caractère *rho*⁰ des souches obtenues a été vérifié par striation sur une gélose YP(G/E) incubée à 30°C.

14.2. Sensibilité au glucose

Les souches BY4741 et YPH499 sauvages ou *lre1Δ*, *rho*⁰ ou non, ont été inoculées dans 5 mL de YPD et incubées pendant 16 heures à 30°C avec agitation. Elles ont par la suite été diluées pour obtenir une suspension cellulaire équivalente à une D.O._{600nm} de 1 dans 1 mL de YPD. À partir de cet échantillon, des dilutions 1:100, 1:1000 et 1:10 000 ont été préparées dans ce même milieu. Finalement, 3 μL de chacune de ces suspensions cellulaires ont été déposées sous forme de gouttes sur géloses YPD et YP(G/E). Les pétris ont été incubés à 30°C pendant 3 jours.

14.3. Sensibilité au peroxyde d'hydrogène

Les souches BY4741 et YPH499 sauvages ou *lre1Δ* ont été inoculées dans 5 mL de YPDA et incubées pendant 16 heures à 30°C avec agitation. Elles ont par la suite été diluées pour obtenir une suspension cellulaire équivalente à une D.O._{600nm} de 1 dans 1 mL de YPDA. À partir de cet échantillon, des dilutions 1:100, 1:1000 et 1:10 000 ont été préparées dans ce même milieu. Finalement, 3 μL de chacune de ces

suspensions cellulaires ont été déposées sous forme de gouttes sur géloses YPDA, additionnées ou non d'antimycine A, renfermant différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (Fisher Scientific), soit de 0,0 mM, 4,0 mM, 4,5 mM, 5,0 mM et 5,5 mM. Les pétris ont été incubés à 30°C pendant 6 jours.

RÉSULTATS

1. Les protéines Lre1p et Gsp1p interagissent ensemble *in vitro*

Un criblage pour des partenaires protéiques potentiels de Gsp1p par la technique de la librairie d'épitopes phagiques a été effectué. La séquence peptidique SPHQPSL, similaire à la région comprise entre les acides aminés 205 à 211 de la protéine Lre1p, a été repêchée à deux reprises. Afin de confirmer l'interaction physique directe entre ces deux protéines, nous avons eu recours à la technique de transcription-traduction *in vitro*. Dans un premier temps, les protéines GST et GST-Gsp1p ont été produites en bactérie et purifiées par affinité sur une colonne de billes de Glutathione SepharoseTM 4B en vue d'effectuer des essais de liaison *in vitro*. Simultanément, une version radioactive de la protéine Lre1p, nommée Lre1p*, a été obtenue. Ceci a été possible grâce à la transcription du gène *LRE1* à partir du plasmide *LRE1/pT7Blue2* par l'ARN polymérase du phage T7 et la traduction de ce transcrit à l'aide d'un lysat de réticulocytes de lapin en présence de méthionine ³⁵S. Il est important de souligner que la présence de l'UTR de la globine de *Xenopus* sur le transcrit du gène *LRE1* augmente le taux de traduction du message, ce qui permet d'obtenir une plus grande quantité de protéines (Kozak, 1989). La production de cette protéine radioactive facilite ensuite sa détection par autoradiographie. Tel que constaté par SDS-PAGE, la production et purification des protéines GST et GST-Gsp1p sont efficaces et leurs poids moléculaires apparents sont de 25 kDa et 55 kDa respectivement (Figure 4A). En ce qui concerne Lre1p* produite *in vitro*, nous observons, suite à un SDS-PAGE et une autoradiographie, une bande majeure d'un poids moléculaire apparent d'environ 75 kDa (Figure 4B). Celui-ci est un peu plus élevé que le poids théorique attendu de 65 kDa pour Lre1p. Cependant, une différence entre les poids moléculaires calculé et apparent est très fréquente. Elle peut s'expliquer par la charge de la protéine ainsi que des structures secondaires non résolues par les conditions d'électrophorèse utilisées. Une forte bande protéique apparaît aussi aux environs de 65 kDa et un groupe de bandes sont détectées aux environs de 43 kDa. Elles semblent vraisemblablement correspondre à des produits de dégradation de Lre1p* qui serait très instable. Finalement, la protéine Lre1p* a été mélangée avec la protéine de fusion GST-Gsp1p purifiée et, à titre de contrôle, avec la protéine GST purifiée. Tel que montré à la figure 4C, Lre1p* interagit

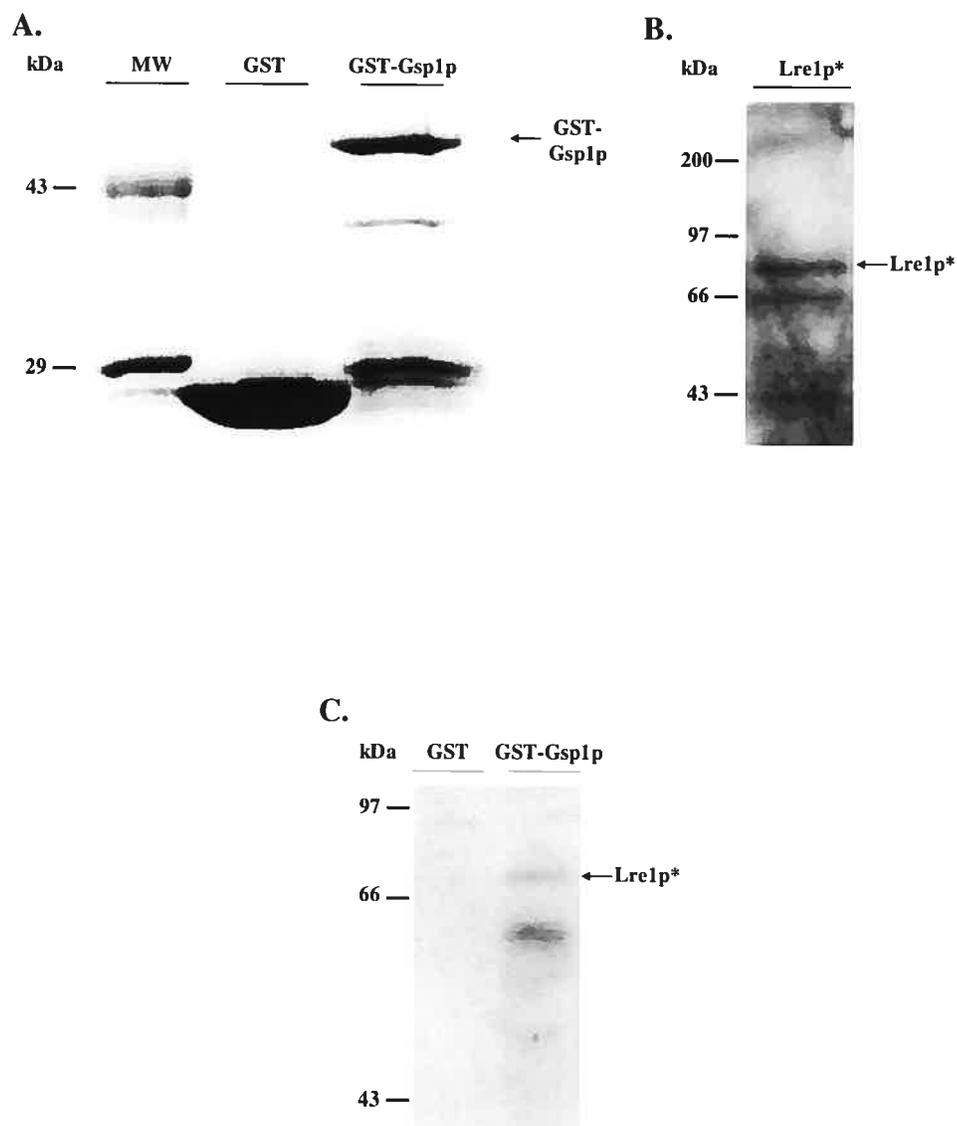


Figure 4 – Essai d’interaction *in vitro* entre Lre1p* et GST-Gsp1p.

A) Visualisation de la purification des protéines GST et GST-Gsp1p sur une colonne de Glutathione Sepharose™ 4B par SDS-PAGE suivi d’une coloration au bleu de Coomassie. B) Visualisation de la version radioactive de la protéine Lre1p obtenue suite à la réaction de transcription-traduction *in vitro* à partir du plasmide *LRE1/pT7Blue2* par autoradiographie. C) La protéine Lre1p* a été incubée avec les protéines GST ou GST-Gsp1p et des billes de Glutathione Sepharose™ 4B. Le matériel retenu sur les billes a été analysé par SDS-PAGE suivi d’une autoradiographie.

physiquement *in vitro* avec la protéine de fusion GST-Gsp1p (Figure 4C, puits GST-Gsp1p) et cette interaction est spécifique à la portion Gsp1p de la protéine de fusion. En effet, Lre1p* n'est pas co-purifiée avec la GST (Figure 4C, puits GST).

2. Les protéines Lre1p et Gsp1p interagissent *in vivo*

Les résultats décrits précédemment appuient l'interaction physique présumée entre les protéines Gsp1p et Lre1p découverte grâce à la technique de la librairie d'épitopes phagiques. Cependant, cette dernière méthode ainsi que la technique de transcription-traduction *in vitro* ne font pas intervenir les protéines à l'étude sous leur forme de repliement tridimensionnelle ni au cœur des complexes protéiques dans lesquels elles sont retrouvées chez *S. cerevisiae*. En effet, la technique de la librairie d'épitopes phagiques permet d'isoler de courts peptides exposés à la surface de bactériophages filamenteux et pouvant interagir avec une protéine d'intérêt fixée sur un support solide (Scott & Smith, 1990). Cependant, même si un peptide semble interagir très fortement avec la protéine à l'étude, il ne faut pas exclure la possibilité qu'il soit inaccessible sur la protéine qui le renferme dans des conditions *in vivo*. En ce qui concerne la technique de transcription-traduction *in vitro*, la protéine GST-Gsp1p, produite chez *E. coli*, n'a pas subi les mêmes modifications post-traductionnelles que si elle avait été produite par *S. cerevisiae* sous des conditions *in vivo*. De telles modifications étant importantes pour que la protéine adopte sa conformation tridimensionnelle, il pourrait être possible que la protéine Lre1p* interagisse avec la version bactérienne de GST-Gsp1p, mais pas avec sa version levuriforme. Dans le but de vérifier si l'interaction physique entre Lre1p et Gsp1p démontrée *in vitro* est réelle *in vivo*, nous avons eu recours à la technique de co-immunoprécipitation. La stratégie que nous avons adoptée consiste à immunoprécipiter les complexes protéiques renfermant Lre1p, à l'aide d'un anticorps dirigé contre cette protéine, à partir d'un lysat protéique de la souche BY4741 de *S. cerevisiae*. Par la suite, les complexes sont récupérés en effectuant une purification par affinité. La protéine A ayant la propriété de lier spécifiquement et très fortement la portion constante de la chaîne lourde des immunoglobulines (Goudswaard *et al.*,

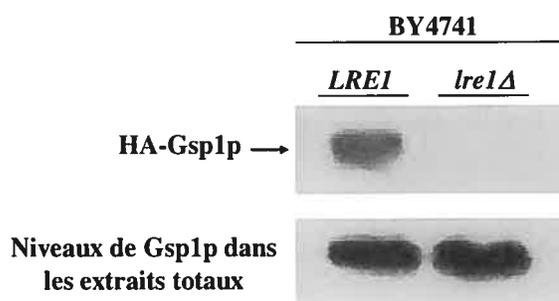


Figure 5 – Essai d'interaction *in vivo* entre Lre1p et HA-Gsp1p.

Les cellules de la souche BY4741, *LRE1* ou *lre1Δ*, ont été transformées avec le plasmide *HA-GSPI/pRS316* et incubées jusqu'à l'obtention d'une D.O._{600nm} de 0,5 à 1,0. Les cellules ont été lysées à l'aide de billes de verre et le lysat a été centrifugé à 15 000g. L'anticorps anti-Lre1p B2 a été ajouté au surnageant et le tout a été incubé en présence de billes Protéine A Sepharose™ CL-4B. Les billes ont été lavées et resuspendues dans du tampon de chargement. Les extraits totaux et le matériel co-immunoprécipité ont été analysés par immunobuvardage grâce à un anti-HA suivi d'un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase.

1978), la résine Protéine A Sepharose™ CL-4B est tout à fait appropriée et permet de lier les complexes protéiques ciblés sur un support solide. Nous avons aussi utilisé une souche portant une délétion au niveau du gène *LRE1* en guise de contrôle négatif afin de s'assurer que la co-immunoprécipitation de la protéine Gsp1p est spécifique à la présence de Lre1p dans les extraits protéiques. De plus, en vue de faciliter la détection de Gsp1p dans les extraits immunoprécipités, nous avons transformé les souches à l'étude avec le plasmide *HA-GSPI/pRS316*. Le gène *GSPI* étant sous le contrôle de son propre promoteur sur ce plasmide centromérique, ceci permet l'expression de la protéine de fusion à des niveaux physiologiques respectant les conditions *in vivo*. Un épitope HA étant fusionné en N-terminal de la protéine Gsp1p, l'utilisation d'un anticorps anti-HA lors de l'immunobuvardage permet la détection de la protéine de fusion dans les échantillons. Tel que présenté à la figure 5, la protéine de fusion HA-Gsp1p est co-immunoprécipitée seulement en présence de Lre1p dans les extraits protéiques. Puisque les niveaux d'expression de la protéine de fusion HA-Gsp1p sont les mêmes chez les souches BY4741 *LRE1* et *lre1Δ* utilisées, il semble que Lre1p et Gsp1p interagissent aussi *in vivo*.

3. La localisation cellulaire de la protéine de fusion Lre1p-ProtA est majoritairement nucléaire et une sous-population de celle-ci est associée à la chromatine

Les essais de co-immunoprécipitation suggèrent que Lre1p et Gsp1p font partie d'un même complexe protéique chez *S. cerevisiae*. Nous avons donc cru nécessaire de vérifier la localisation cellulaire de la protéine Lre1p afin de découvrir dans quel compartiment a lieu cette interaction avec Gsp1p. Pour ce faire, nous avons eu recours à une technique de fractionnement subcellulaire permettant l'isolement d'un extrait cytoplasmique et la purification subséquente de mitochondries et de noyaux. Nous avons ensuite analysé les extraits subcellulaires recueillis par immunobuvardage en contrôlant la fraction cytoplasmique avec un anti-Yrb1p, dirigé contre une protéine retrouvée majoritairement dans ce compartiment (Schlenstedt *et al.*, 1995b), la fraction mitochondriale avec un anti-Cit1p, spécifique pour une protéine mitochondriale (Suissa *et al.*, 1984), et la fraction nucléaire avec un anti-Nop1p, détectant une protéine nucléolaire (Schimmang *et al.*, 1989). La méthode de fractionnement utilisée privilégie une lyse cellulaire mécanique très douce à l'aide d'un homogénéisateur, en présence de mannitol, de manière à ce que les noyaux et mitochondries demeurent intacts. Une paroi cellulaire intègre chez la levure rendant ce type de lyse impossible, nous avons procédé préalablement à sa digestion à l'aide de la zymolyase afin d'obtenir des sphéroplastes qui eux sont très sensibles aux pressions engendrées par les coups de piston. Un échantillon de cet extrait total a servi de contrôle positif lors de l'analyse des différents extraits du fractionnement de manière à s'assurer que la méthode de lyse utilisée n'entraîne pas trop de dégradation protéique (Figure 6A, puits extrait total). Une première centrifugation de l'homogénat d'une durée de 5 minutes à 3000g a permis de séparer grossièrement les noyaux, sphéroplastes non lysés et débris cellulaires, retrouvés dans le culot, de l'extrait cytoplasmique renfermant les autres organites et correspondant au surnageant. Quant à la centrifugation du surnageant à 12 000g pendant 10 minutes, elle a été nécessaire afin de recueillir les mitochondries, lysosomes et peroxyosomes dans le culot et de récolter le surnageant à titre de fraction cytoplasmique (de Duve, 1975; Howell *et al.*, 1989). L'analyse de cette dernière par

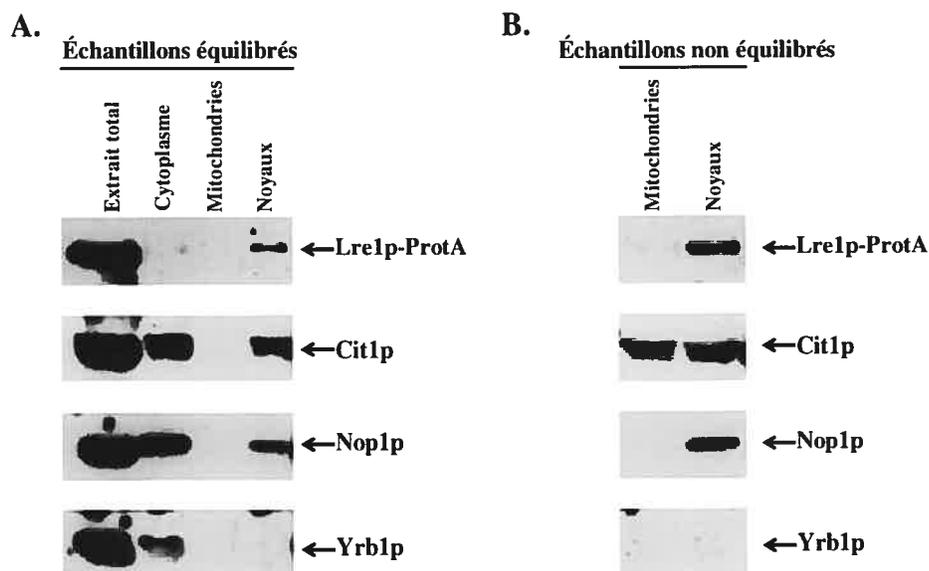


Figure 6 – Localisation cellulaire de Lre1p-ProtA par fractionnement subcellulaire. A) Les cellules de la souche *cIABYS86* ont été transformées par le plasmide *ProtA-LRE1/pNOPPATA1L* et cultivées jusqu'à l'obtention d'une D.O._{600nm} de 0,6. La paroi cellulaire a été digérée à la zymolyase 20T et les sphéroplastes ont été brisés tout en maintenant les mitochondries et les noyaux intacts dans une solution de mannitol. Le lysat a été centrifugé afin d'isoler des mitochondries et des noyaux bruts qui ont été déposés respectivement sur un gradient continu de 5 à 25 % de Nycodenz et un gradient discontinu de Ficoll 400 de 30 à 50 %. Ceux-ci ont par la suite été centrifugés à 107 000g pendant 90 minutes et à 58 000g pendant 60 minutes respectivement. Les fractions recueillies ont été équilibrées selon les rapports cellulaires qu'elles représentent pour ensuite être analysées par immunobuvardage. B) Immunobuvardage sur les fractions mitochondriales et nucléaires recueillies sans qu'elles aient été préalablement diluées. Panneau supérieur : anti-IgG de chèvre couplé à la peroxydase suivi d'un anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase; Deuxième panneau : anti-Cit1p (contrôle mitochondrial) suivi d'un anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase; Troisième panneau : anti-Nop1p (contrôle nucléaire) suivi d'un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase; Dernier panneau : anti-Yrb1p (contrôle cytoplasmique) suivi d'un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase.

immunobuvardage nous indique qu'une étape supplémentaire de purification serait nécessaire afin d'obtenir un extrait cytoplasmique exempt de mitochondries et de noyaux (Figure 6A, puits cytoplasme).

Le fractionnement de l'extrait brut de mitochondries dans un gradient continu de 5 à 25 % de Nycodenz nous a permis de recueillir les mitochondries purifiées isolées sous forme d'une bande à une concentration de 16 % de Nycodenz. Puisque les cellules fractionnées ont été préalablement cultivées dans du lactate, cette bande est facilement repérable, car les mitochondries ont acquis une coloration beige et leur densité sous ces conditions est bien établie (Glick & Pon, 1995). L'analyse de la fraction mitochondriale par immunobuvardage à l'aide des anticorps anti-Cit1p, anti-Nop1p et anti-Yrb1p témoigne de la pureté de cet échantillon mitochondrial récupéré. En effet, cette méthode nous a permis d'isoler ces organelles, comme le démontre la détection de la protéine Cit1p, et il ne semble pas y avoir de contamination par des protéines cytoplasmiques ou nucléaires (Figure 6B, puits mitochondries). Puisque la protéine Cit1p n'était pas détectable dans l'extrait de mitochondries équilibré selon les rapports cellulaires qu'il représente (Figure 6A, puits mitochondries), nous avons cru bon d'analyser l'échantillon prélevé sans le diluer. C'est ce dernier qui confirme l'efficacité de la méthode de purification employée. Les problèmes de détection de Cit1p dans l'échantillon mitochondrial pourraient être causés par une dilution trop prononcée de ce dernier lors de son équilibration, ce qui ferait en sorte que la quantité de Cit1p analysée par immunobuvardage se situe sous le seuil de détection de la méthode de révélation utilisée. En ce qui concerne l'extrait brut de noyau, il a été fractionné à l'aide d'un gradient discontinu de Ficoll 30 à 50 %. Les noyaux purifiés, formant une bande blanche diffuse dans le gradient au niveau de la couche de Ficoll 40 %, ont été recueillis et analysés. Puisqu'il est connu que les souches protéases déficientes donnent un bon rendement de noyaux hautement purifiés par cette méthode, nous avons utilisé la souche cIABYS86 à cette fin (Dove *et al.*, 1998). La détection de la protéine Nop1p dans l'extrait prélevé montre que cette technique de purification est efficace. Cependant, l'échantillon semble contaminé par des protéines mitochondriales, car la protéine Cit1p y est présente (Figure 6A et 6B, puits noyaux).

Cette contamination pourrait être due à des densités voisines de ces organelles non résolues sous les conditions de séparation isopycnique utilisées ou à la possibilité que la protéine Cit1p soit une protéine qui s'échappe facilement de la mitochondrie. Puisque la protéine Yrb1p n'y est pas détectée, nous excluons l'hypothèse que nous avons recueillis des sphéroplastés intacts dans cet extrait.

L'anticorps contre Lre1p que nous avons produits en lapin ne fonctionnant pas en immunobuvardage (non présenté), nous avons construit le plasmide ProtA-*LRE1*/pNOPPATA1L capable de synthétiser la protéine de fusion Lre1p-ProtA. L'avantage conféré par cette protéine de fusion est que nous pouvons nous servir de n'importe quel anticorps pour la détecter, car, tel que mentionné précédemment, la protéine A a la propriété de lier spécifiquement et très fortement la portion constante de la chaîne lourde des immunoglobulines. Nous avons poussé cet atout encore plus loin en utilisant des anticorps primaire et secondaire couplés à la peroxydase, ce qui permet d'amplifier le signal lors de la détection. De plus, cette protéine de fusion étant sous le contrôle du promoteur constitutif *NOPI* (Hellmuth *et al.*, 1998), les niveaux d'expression du gène *LRE1* sont augmentés par rapport à ce que nous avons pu observer lorsqu'il est sous le contrôle de son propre promoteur (non présenté), ce qui accroît encore plus nos chances d'obtenir un signal raisonnable. Tel qu'illustré aux panneaux supérieurs de la figure 6, la protéine Lre1p-ProtA est majoritairement retrouvée dans la fraction nucléaire et très faiblement dans l'extrait mitochondrial non équilibré. Cependant, il nous est impossible de quantifier cette localisation différentielle à cause des difficultés rencontrées avec l'analyse des échantillons équilibrés expliquées ci-haut. Toutefois, nous croyons que le signal détecté pour la protéine Lre1p-ProtA dans la fraction mitochondriale témoigne de la présence de celle-ci dans ce compartiment, car l'échantillon mitochondrial ne semble pas contaminé par des protéines nucléaires. Ces résultats semblent donc indiquer que Lre1p est une protéine nucléaire dont une très faible sous-population pourrait être localisée dans la mitochondrie. De plus, cette localisation nucléaire de Lre1p appuie les résultats d'interaction *in vivo* avec Gsp1p aussi présente dans ce compartiment.

Puisqu'il est connu que Gsp1p peut s'associer à la chromatine nucléaire, soit par liaison directe aux histones H3 et H4 ou via son interaction avec Prp20p (Bilbao-Cortes *et al.*, 2002), nous avons voulu pousser la localisation de Lre1p un peu plus loin en vérifiant si elle peut être co-purifiée avec la chromatine. Nous avons employé une méthode permettant la purification partielle de la chromatine suite à la lyse de sphéroplastes, dans un tampon renfermant du sorbitol, provoquée par un détergent non ionique, le Triton X-100. La chromatine demeurant insoluble dans ces conditions alors que la vaste majorité des protéines sont solubilisées, il est ensuite possible de la récupérer par centrifugation. Il a déjà été montré que la presque totalité de l'ADN cellulaire est récoltée dans cette fraction et que moins de 5 % des protéines cellulaires totales y sont présentes (Donovan *et al.*, 1997). Donc, préalablement à l'analyse par immunobuvardage de nos différentes fractions recueillies, nous avons estimé la quantité de protéines comprises dans chaque extrait grâce à un SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie. Le gel coloré présenté à la figure 7A montre que notre purification de chromatine semble avoir bien fonctionné, puisqu'elle renferme une très faible proportion de protéines comparativement à l'extrait total. Afin de s'en assurer complètement, nous avons contrôlé les différentes fractions en les analysant par immunobuvardage à l'aide d'un anti-Yrb1p, dirigé contre une protéine majoritairement cytoplasmique (Schlenstedt *et al.*, 1995b), et d'un anti-Lys20p/Lys21p, détectant des protéines nucléaires non associées à la chromatine (Chen *et al.*, 1997; J. P. Aris, communication personnelle). La présence de ces protéines étant décelée uniquement dans l'extrait total et l'extrait non chromatine (Figure 7B, deuxième et troisième panneaux), ce résultat confirme la réussite de notre purification. Une fois de plus, nous avons utilisé la protéine de fusion Lre1p-ProtA afin de localiser Lre1p dans ces extraits cellulaires pour les raisons expliquées précédemment. Comme il est montré au premier panneau de la figure 7B, une sous-population de Lre1p-ProtA est retrouvée associée à la chromatine dans la cellule. De plus, cette association à la chromatine est spécifique à la portion Lre1p de la protéine de fusion, car la protéine A seule n'est pas co-purifiée avec la chromatine (Figure 7B, quatrième panneau).

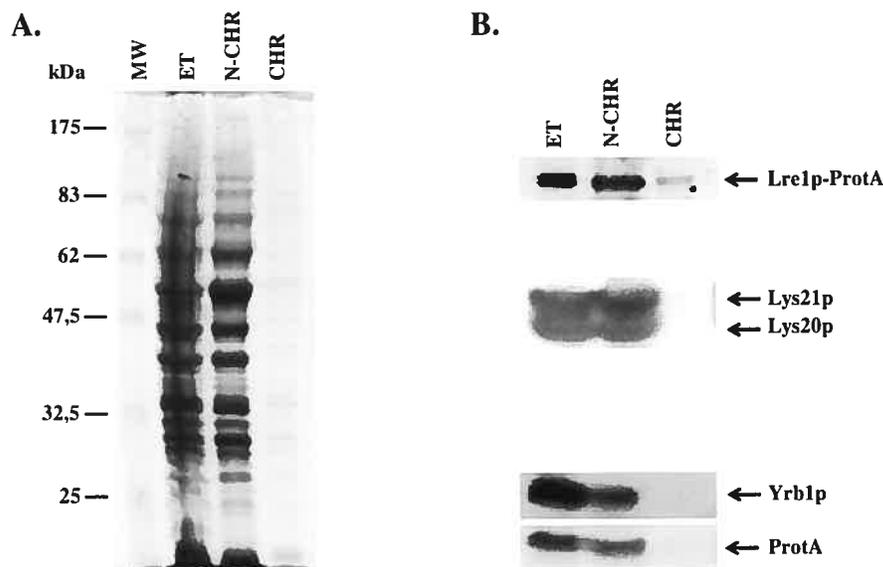


Figure 7 – Caractérisation de la liaison de Lre1p-ProtA à la chromatine par essai de purification de chromatine. A) Les cellules de la souche cIABYS86 ont été transformées avec le vecteur P_{NOPI} -ProtA ou le plasmide ProtA-*LRE1*//pNOPPATA1L et cultivées jusqu'à l'obtention d'une $D.O._{600nm}$ de 0,5 à 1,0. La paroi cellulaire a été digérée à la zymolyase 100T et les sphéroplastes ont été lysés par ajout de Triton X-100 (1 %), la chromatine demeurant insoluble dans ces conditions. Une première fraction correspondant à l'extrait total a été recueillie. Les cellules lysées ont été centrifugées à 15 800g et le surnageant correspondant à la fraction non chromatine a été prélevé. Le culot correspondant à la chromatine a été lavé avec du Triton X-100 (0,25 %) et resuspendu dans du tampon de chargement. Les fractions recueillies ont été analysées par SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie. MW : marqueur moléculaire, ET : extrait total, N-CHR : fraction non chromatine, CHR : fraction chromatine. **B)** Immunobuvardage sur les différents échantillons recueillis lors de la purification de chromatine. Premier et quatrième panneaux : anti-IgG de chèvre couplé à la peroxydase suivi d'un anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase; Deuxième panneau : anti-Lys20p/Lys21p (contrôle nucléaire, non associées à la chromatine) suivi d'un anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase; Troisième panneau : anti-Yrb1p (contrôle cytoplasmique) suivi d'un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase. ET : extrait total, N-CHR : fraction non chromatine, CHR : fraction chromatine.

4. Des phénotypes communs à ceux observés chez des mutants de la voie PKA sont associés à la délétion de *LRE1*

Les essais de co-immunoprécipitation de Lre1p et Gsp1p suggèrent que ces deux protéines sont partenaires dans un même complexe protéique chez *S. cerevisiae* et appuient la possibilité d'une interaction directe entre elles démontrée par l'essai de transcription-traduction *in vitro*. En ce qui concerne les résultats de localisation subcellulaire, ils proposent qu'elles se rencontrent dans le noyau et qu'il est fort probable qu'elles soient simultanément associées à la chromatine. À la lumière de ces preuves scientifiques, nous avons voulu éclaircir la signification biologique de cette interaction. Pour ce faire, nous avons tenté de caractériser plus en détails le produit du gène *LRE1* en étudiant les phénotypes associés à sa délétion. À cet effet, nous avons cru intéressant de générer des mutants *lre1Δ* dans différentes souches de *S. cerevisiae* présentant toutes un bagage génétique différent afin de sélectionner les souches plus sensibles ou moins affectées par l'absence du produit de ce gène. Nous avons eu recours à une stratégie de remplacement de gène fréquemment utilisée dans les travaux de caractérisation de gènes chez la levure afin d'obtenir ces mutants. Cette méthode consiste à synthétiser un allèle mutant, en remplaçant la portion codante du gène d'intérêt par une cassette de résistance à un antifongique ou par un marqueur génétique permettant la complémentation d'une auxotrophie. Par la suite, en transformant une souche avec cet allèle flanqué des 40 nucléotides en amont et aval du gène d'intérêt, son intégration est ciblée dans le génome au niveau du locus de celui-ci par recombinaison homologue (Rothstein, 1991).

Des travaux antérieurs ayant montré que les mutants *lre1Δ* partagent certains phénotypes avec ceux affectés au niveau de la voie PKA (Bianchi *et al.*, 1999; Tomlin *et al.*, 2000; Versele & Thevelein, 2001), nous avons voulu orienter nos études phénotypiques dans cette direction. Généralement, ces essais consistent à déposer, sous forme de goutte, des dilutions en série des souches à l'étude sur un pétri renfermant le composé responsable du phénotype à caractériser. Celui-ci est ensuite déterminé en comparant la croissance des souches à l'étude pour une même dilution.

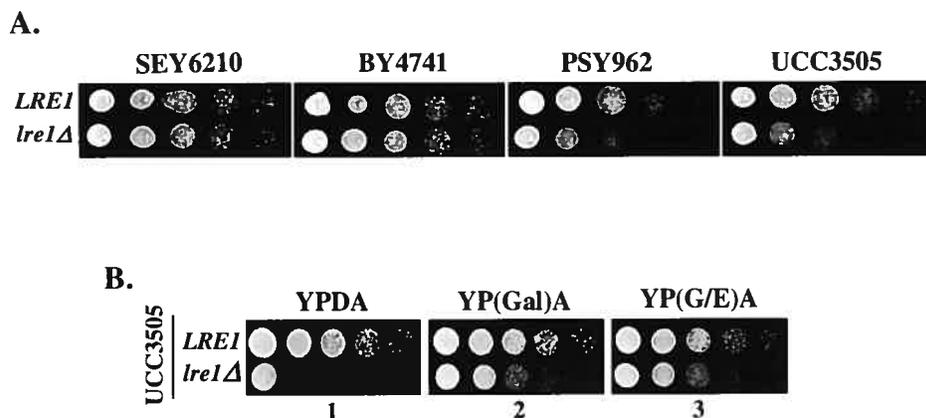


Figure 8 – Effet de la mutation *lre1Δ* sur la sensibilité au glucose. A) Des dilutions en série (1:10) de différentes souches de *S. cerevisiae*, *LRE1* ou *lre1Δ*, ont été déposées sous forme de goutte sur des pétris renfermant du glucose comme source de carbone. B) Des dilutions en série (1:10) de la souche UCC3505, *LRE1* ou *lre1Δ*, ont été déposées sous forme de goutte sur des pétris renfermant du glucose, du galactose ou un mélange de glycérol et éthanol comme source de carbone.

Dans un premier temps, sachant qu'une activité PKA élevée peut être toxique pour la cellule (Oliver *et al.*, 2002), que cette dernière est activée entre autre par le glucose et qu'une fonction antagoniste à celle de la PKA a déjà été associée à Lre1p (Versele & Thevelein, 2001), nous avons tenu à étudier le comportement des différents mutants *lre1Δ* selon la source de carbone utilisée pour supporter leur croissance. Tel que montré à la figure 8A, les souches sauvages SEY6210, BY4741, PSY962 et UCC3505, ainsi que les mutants *lre1Δ* chez ces deux premières souches, n'ont aucune difficulté à croître en présence de glucose. Cependant, un défaut de croissance est observé chez les mutants *lre1Δ* des souches PSY962 et UCC3505, ce qui suggère que le glucose a un effet négatif sur la croissance de ces mutants. Afin de vérifier que le retard de croissance associé à ces derniers est spécifique au glucose, nous avons fait l'investigation d'une toxicité associée à d'autres sources de carbone ne semblant pas induire l'activité PKA, soit le galactose et un mélange de glycérol et éthanol. À cet effet, nous nous sommes concentrés sur le mutant *lre1Δ* de la souche UCC3505. Encore une fois, nous observons, à la figure 8B, que la souche *LRE1*

pousse très bien, peu importe la source de carbone utilisée. Pour ce qui est du mutant *lre1Δ*, un très faible délai de croissance est associé à la croissance sur galactose ou sur un mélange de glycérol et éthanol (Figure 8B, panneaux 2 et 3) alors qu'un délai plus significatif est obtenu lors de la croissance en présence de glucose (Figure 8B, panneau 1). Il semble donc qu'une bonne proportion du défaut de croissance associé au mutant *lre1Δ* de la souche UCC3505 est spécifique au glucose.

Les résultats de sensibilité au glucose des différents mutants *lre1Δ* générés étant étonnants vu un comportement divergent de quelques souches en présence de cette source de carbone, nous avons cru intéressant de reprendre l'essai de sensibilité à la caféine de Bianchi *et al.* (1999). La caféine est un analogue de la xanthine qui entraîne un délai de la progression du cycle cellulaire et une entrée prématurée en mitose, interfère avec les voies de recombinaison et de réparation de l'ADN en plus d'être un inhibiteur des phosphodiésterases, responsables de la conversion de l'AMPc en AMP (Benko *et al.*, 1997; Arudchandran *et al.*, 2000). Il exerce donc un effet agoniste sur la voie PKA. Lors de cet essai, il avait été montré que le mutant *lre1Δ* étudié était sensible à la caféine. Nous avons donc voulu vérifier le phénotype des mutants *lre1Δ* des deux souches qui ne semblent pas sensibles au glucose, soit les souches SEY6210 et BY4741, afin de pouvoir établir un lien entre ceux-ci et la voie PKA. Puisque des éléments de preuves accordent à Lre1p une fonction antagoniste à celle de la voie PKA, l'effet de la caféine sur les mutants *lre1Δ* devrait augmenter la toxicité associée à une voie PKA hyperactive. C'est ce que nous observons à la figure 9. De fait, pour les deux souches à l'étude, l'effet de la caféine est beaucoup moins senti chez la souche *LRE1* que chez le mutant *lre1Δ* (souche SEY6210 : panneau 2; souche BY4741 : panneau 3). Encore une fois, nous remarquons une différence des niveaux de toxicité entre les souches. Effectivement, une concentration de 0,35 % de caféine est suffisante pour observer une hausse du taux de mortalité associée à la délétion du gène *LRE1* chez la souche SEY6210 (Figure 9, panneau 2) alors qu'une concentration d'au moins 0,45 % est requise pour observer le même résultat chez BY4741 (Figure 9, panneau 4). Les résultats de sensibilité au

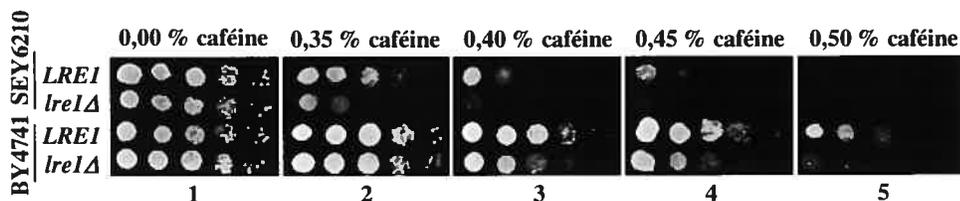


Figure 9 – Effet de la mutation *lre1Δ* sur la sensibilité à la caféine.

Des dilutions en série (1:10) des souches SEY6210 et BY4741, *LRE1* ou *lre1Δ*, ont été déposées sous forme de goutte sur des pétris renfermant différentes concentrations de caféine.

glucose et à la caféine suggèrent un lien entre *LRE1* et la voie PKA chez *S. cerevisiae* qui semble plus subtil chez certaines souches. Ce phénomène peut être expliqué par un effet supplémentaire relié au contexte génétique des différentes souches à l'étude.

Des preuves suggérant un lien entre *LRE1* et la voie PKA étant maintenant établies, nous nous sommes intéressés à déterminer à quel niveau *Lre1p* est impliquée dans cette cascade de signalisation. Les études épistatiques menées par Versele & Thevelein (2001) démontrent que *Lre1p* n'altère pas les composantes régulant les niveaux d'AMPc ou d'activité PKA et qu'elle semble exercer ses fonctions indépendamment de la voie de transduction de signal PKA/AMPc. Cependant, nous croyons qu'il serait possible qu'elle agisse en aval de celle-ci sur d'autres cibles de cette voie. En effet, ces travaux ayant été focalisés sur l'effet de la délétion ou surexpression de *LRE1* sur la résistance à la chaleur et les niveaux de tréhalose, ils montrent seulement que le rôle de *Lre1p* dans ces deux processus ne prend pas place au sein de la voie PKA et qu'elle agit donc sur certaines cibles communes à cette dernière. Nous avons donc décidé d'étudier l'effet de la délétion de *LRE1* sur le silencing transcriptionnel télomérique, un processus par lequel un gène situé à proximité du télomère est réprimé transcriptionnellement à cause de la structure

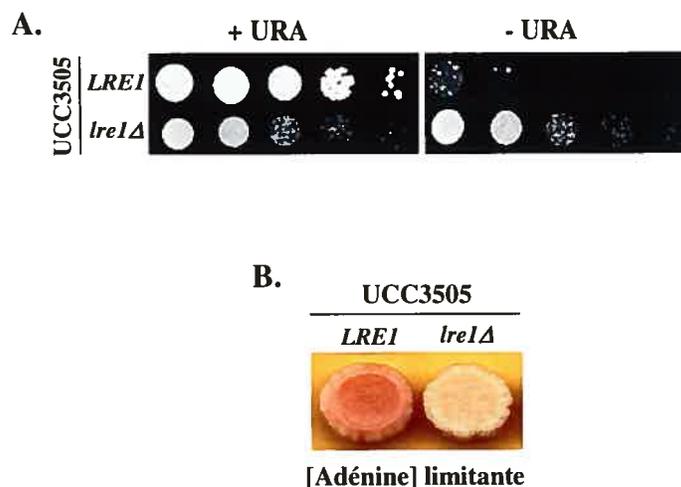


Figure 10 – Effet de la mutation *ire1Δ* sur le silencing transcriptionnel télomérique. **A)** Des dilutions en série (1:10) de la souche UCC3505, *LRE1* ou *ire1Δ*, ont été déposées sous forme de goutte sur des pétris renfermant ou non de l'uracile. **B)** Des dilutions en série (1:10) de la souche UCC3505, *LRE1* ou *ire1Δ*, ont été déposées sous forme de goutte sur des pétris renfermant une concentration limitante d'adénine.

fermée de la chromatine. Ce phénomène est inhibé par la PKA activée. À cet effet, nous avons utilisé la souche UCC3505 construite dans le but d'identifier des gènes importants pour les fonctions télomériques (Singer & Gottschling, 1994). Celle-ci a été modifiée de sorte à avoir deux marqueurs génétiques localisés à proximité de deux loci télomériques différents, soit *ADE2* adjacent au télomère du bras droit du chromosome V et *URA3* contigu au télomère du bras gauche du chromosome VII. Cette souche arbore aussi une délétion au niveau du gène *PPR1* codant pour un trans-activateur du gène *URA3*, ce qui entraîne une répression transcriptionnelle plus étroite de ce gène rapporteur. Sous des conditions propices au silencing transcriptionnel télomérique, cette souche est auxotrophe pour l'uracile et les colonies qui poussent en présence d'une faible quantité d'adénine ont une teinte rouge. Ceci est dû au fait que la voie de biosynthèse de ce nucléotide est bloquée à l'intermédiaire catalysé par le produit du gène *ADE2* qui confère une teinte rouge aux cellules (Roman, 1956). Nous avons donc généré un mutant *ire1Δ* chez cette souche afin de déterminer l'effet de la délétion de *LRE1* sur le silencing transcriptionnel télomérique. Tel que présenté à la figure 10A, le mutant *ire1Δ* pousse beaucoup mieux que la souche *LRE1* en

absence d'uracile alors que les deux souches semblent bien pousser en présence d'uracile. Ce résultat suggère que l'absence de *LRE1* provoque une levée du silencing transcriptionnel télomérique. De plus, la figure 10B appuie cette preuve, car en présence d'une faible quantité d'adénine, les cellules de la souche *LRE1* adoptent une teinte rouge (phénotype Ade⁻) alors que celles du mutant *lre1Δ* demeurent blanches (phénotype Ade⁺). Cet essai confirme donc que l'action de Lre1p dans la cellule est antagoniste à celle de la PKA. De plus, il nous a permis d'identifier une nouvelle cible contrôlée par Lre1p et partagée avec la PKA.

5. La purification par affinité en tandem pour identifier les partenaires protéiques de Lre1p

Puisque plusieurs nouvelles preuves scientifiques tendent à associer Lre1p à une fonction antagoniste à celle de la voie PKA, mais que le rôle de cette protéine sur les cibles communes à cette voie n'est pas encore caractérisé, nous avons voulu identifier les partenaires protéiques de Lre1p. Ceci pourrait nous aider à déterminer si Lre1p agit en aval de la PKA ou dans une voie parallèle à celle contrôlée par cette kinase. De plus, il nous serait peut-être possible d'établir un lien potentiel entre Gsp1p et la voie PKA. Pour ce faire, nous avons eu recours à la méthode de purification par affinité en tandem (TAP; Rigaut *et al.*, 1999; Puig *et al.*, 2001). Cette technique permet la purification de protéines exprimées à des niveaux physiologiques et au cœur des complexes protéiques dans lesquels elles sont retrouvées dans la cellule en ayant recours à deux purifications par affinité successives. Tout d'abord, elle consiste à forcer l'introduction d'une étiquette TAP (peptide de liaison à la calmoduline, site de clivage de la protéase TEV et protéine A) en fusion avec le locus du gène d'intérêt de manière à ce que la protéine de fusion soit exprimée à des niveaux physiologiques. À partir du plasmide pBS1479, nous avons généré un fragment de PCR composé de (1) 50 nucléotides en amont du codon stop de *LRE1*, (2) la cassette TAP suivie du gène de biosynthèse du tryptophane de la levure *Kluyveromyces lactis* (*klTRP1*) et (3) de 50 nucléotides en aval du codon de

terminaison de *LRE1*. En transformant la souche W303 avec ce produit de PCR, l'intégration de l'étiquette TAP dans le génome de celle-ci par recombinaison homologue devrait être ciblée en C-terminal du locus du gène *LRE1* (voir figure 11A). Il est impossible que cette insertion génomique se fasse au niveau du locus *TRP1*, car la séquence du gène *klTRP1* de *K. lactis* présente sur le fragment de PCR n'est pas assez homologue à celle du gène *TRP1* de *S. cerevisiae* pour qu'il puisse y avoir recombinaison au niveau de ce site. Suite à l'obtention de notre souche W303 *LRE1-TAP*, nous avons, dans un premier temps, vérifié l'expression et la fonctionnalité de la protéine de fusion Lre1p-TAP. Tel que présenté à la figure 11B, la protéine de fusion Lre1p-TAP est détectée dans un extrait total de protéines de la souche W303 *LRE1-TAP* et semble posséder un poids moléculaire apparent de 100 kDa. Le poids moléculaire calculé pour cette protéine de fusion est de 85,4 kDa. En ce qui concerne l'étude de sa fonctionnalité, nous nous sommes basés sur le test de sensibilité au glucose utilisé précédemment pour associer des phénotypes à l'absence du produit du gène *LRE1* chez la levure. Tel que montré à la figure 11C, le comportement de la souche W303 *LRE1-TAP* en présence de glucose est identique à celui de la souche sauvage. En effet, aucune sensibilité à cette source de carbone n'est observée, alors que c'est le cas pour le mutant *lre1Δ*. Ces résultats démontrent que la fusion génomique entre le gène *LRE1* et l'étiquette TAP ne nuit pas à l'expression ni à la fonction de la protéine Lre1p, ce qui nous permet de passer à la purification des complexes protéiques.

Afin d'obtenir rapidement un lysat cellulaire à partir d'un culot issu d'une culture de 3L d'une D.O._{600nm} de 1,5, nous avons procédé à une lyse mécanique du culot congelé à l'aide d'un moulin à café (Krogan *et al.*, 2002). Les avantages reliés à cette procédure de lyse sont la rapidité, l'efficacité, mais surtout la simplicité du montage utilisé. De plus, tel que présenté à la figure 11E, cette méthode d'extraction en plus des conditions utilisées n'entraînent pas de dégradation de la protéine de fusion (puits extrait total dialysé). La protéine Lre1p-TAP et ses partenaires associés ont été purifiés à partir de ce lysat total via deux purifications par affinité successives.

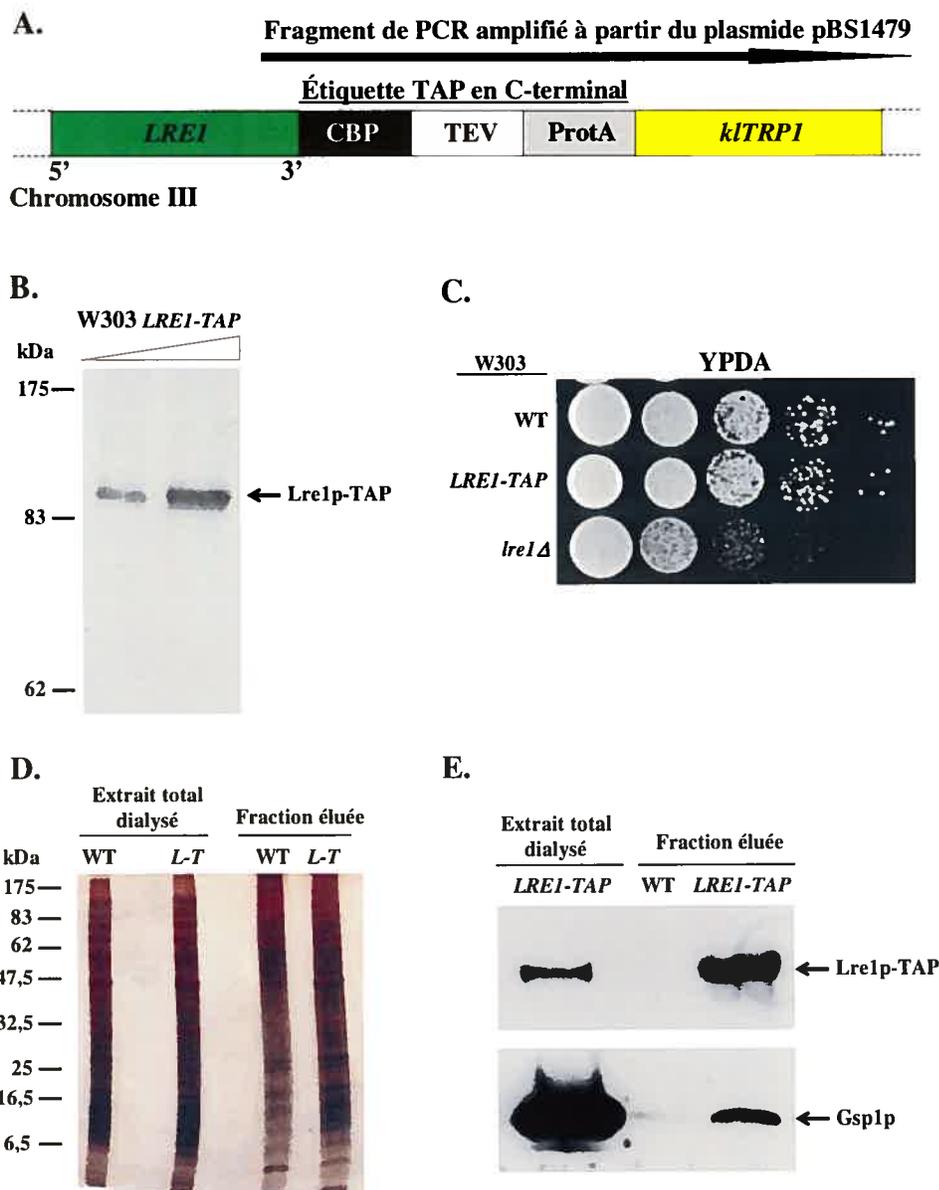


Figure 11 – Identification de partenaires protéiques de Lre1p-TAP par purification par affinité en tandem. A) Fusion de l'étiquette TAP en 3' du gène *LREI* par intégration ciblée dans le génome de la souche W303. B) Vérification de l'expression de la fusion génomique *LREI-TAP* suite à l'analyse d'un extrait total de protéines de la souche W303 *LREI-TAP* par immunobuvardage avec un anti-IgG de chèvre couplé à la peroxydase suivi d'un anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase. C) Vérification de la fonctionnalité de la protéine de fusion Lre1p-TAP à l'aide de dilutions en série (1:10) de la souche W303, sauvage, *LREI-TAP* ou *lre1Δ*, déposées sous forme de goutte sur un pétri renfermant du glucose. D) Les cellules de la souche W303, sauvage ou *LREI-TAP*, ont été cultivées jusqu'à une D.O._{600nm} de 1,5. Les culots congelés ont été lysés au moulin à café et le lysat a été centrifugé à 106 000g. Le surnageant a été dialysé et centrifugé à 106 000g pour ensuite être incubé avec des billes de calmoduline en présence de 2 mM de CaCl₂. Les billes de calmoduline ont été éluées par ajout de 3 mM d'EGTA et les fractions recueillies ont été analysées par SDS-PAGE suivi d'une coloration au nitrate d'argent. WT : souche W303 sauvage, L-T : souche W303 *LREI-TAP*. E) Immunobuvardage sur les différents échantillons recueillis lors de la purification par affinité. Panneau supérieur : anti-IgG de chèvre couplé à la peroxydase suivi d'un anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase; Panneau inférieur : anti-Gsp1p suivi d'un anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase.

La première résine utilisée est composée de billes IgG sépharose. Elle permet la rétention des complexes renfermant la protéine étiquetée via la forte affinité du segment protéine A de l'étiquette TAP pour la portion constante des anticorps. L'élution en condition native des complexes accrochés à la résine est possible par clivage de l'étiquette par la protéase TEV du virus de la mosaïque du tabac. En effet, un site de clivage spécifique à cette protéase est situé entre la protéine A et le peptide de liaison à la calmoduline. L'échantillon élué recueilli est ensuite mélangé à des billes de calmoduline. Les complexes protéiques comprenant la protéine de fusion y sont retenues en présence de CaCl_2 grâce à des interactions hydrophobes entre la résine et le peptide de liaison à la calmoduline de l'étiquette TAP. L'élution en condition native des complexes accrochés aux billes est possible suite à l'ajout d'EGTA, un chélateur du calcium nécessaire à cette interaction hydrophobe. Après avoir analysé les différentes fractions éluées de cette dernière résine par coloration au nitrate d'argent d'un gel de gradient de polyacrylamide 4 à 20 %, nous avons observé que nous ne récupérons pas beaucoup de protéines comparativement à ce que nous attendions (non présenté). De plus, nous avons conclu que notre protéine de fusion Lre1p-TAP ne s'accroche pas efficacement aux billes IgG sépharose. Effectivement, un immunobuvardage dirigé contre la portion protéine A de celle-ci nous a permis de constater qu'elle se retrouve majoritairement dans la fraction des protéines de l'extrait total n'interagissant pas avec les billes (non présenté). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la portion protéine A de la protéine de fusion Lre1p-ProtA soit masquée par la conformation tridimensionnelle de cette dernière en condition physiologique. Heureusement, la purification par affinité à l'aide des billes de calmoduline étant efficace, nous avons tenté d'identifier des partenaires protéiques de Lre1p en n'ayant recours qu'à celle-ci. Cependant, comme en témoigne la figure 11D, cette seule étape de purification n'est pas suffisante. En effet, beaucoup de protéines semblent s'accrocher à la calmoduline des billes dans les conditions utilisées sans qu'une interaction spécifique avec la protéine de fusion à l'étude soit nécessaire. De fait, en comparant l'extrait total dialysé et la fraction éluée issus de la souche W303 *LRE1-TAP*, il ne semble pas y avoir un enrichissement notable de certaines protéines après purification des complexes protéiques (Figure 11D, puits *L-T*). La même conclusion

peut être tirée par comparaison des échantillons de la souche codant pour la protéine Lre1p non étiquetée avec celle produisant la protéine de fusion Lre1p-TAP (Figure 11D, puits WT et *L-T* de la fraction éluée). De plus, la calmoduline étant une protéine régulant une variété de processus cellulaires chez les eucaryotes, plusieurs de ses cibles peuvent être récupérées lors de cette étape de purification (Cyert, 2001).

L'immunobuvardage est une technique permettant la détection de protéines spécifiques à partir d'un mélange protéique. De plus, certains partenaires physiques potentiels de Lre1p ayant été identifiés à l'aide de la technique du deux-hybrides, tels que Nup84p, Sua7p, Cbk1p et Bmh2p (Racki *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Mayordomo & Sanz, 2002), nous avons tenté de confirmer ces résultats. Même si nous avons en notre possession des anticorps dirigés contre les protéines Nup84p et Sua7p, nous avons été incapables de trouver les conditions expérimentales permettant leur détection dans un extrait total de protéines (non présenté). Nous avons tout de même réussi à détecter Gsp1p dans la fraction éluée de la souche W303 *LRE1-TAP*, ce qui corrobore l'interaction *in vivo* entre ces deux protéines suggérée par l'essai de co-immunoprécipitation (Figure 11E, deuxième panneau). Encore une fois, la purification de Gsp1p est spécifique à la présence de Lre1p dans l'extrait protéique. Effectivement, cette protéine est détectée seulement dans l'échantillon élué renfermant la protéine de fusion Lre1p-TAP dont le peptide de liaison à la calmoduline de l'étiquette est nécessaire à l'étape de purification par affinité (Figure 11E, puits fraction éluée).

6. Une fonction mitochondriale pourrait être associée à Lre1p

L'identification de partenaires protéiques de Lre1p par purification par affinité en tandem n'ayant pas fourni les résultats escomptés, nous avons décidé d'utiliser une autre approche afin d'associer des fonctions à cette protéine. En effet, sur une base de collaboration, Guillaume Lesage du laboratoire de Howard Bussey (Université McGill) a effectué un criblage de létalité synthétique systématique avec *LRE1* (Tong *et al.*, 2001). Brièvement, cet essai consiste à obtenir une souche haploïde renfermant

une délétion au niveau de deux gènes différents. Il est important de noter que les souches haploïdes arborant une seule de ces mutations sont viables, car le présent criblage est limité aux gènes non essentiels. Un phénotype de létalité synthétique est associé aux mutants dont la croissance est affectée négativement par la combinaison des deux délétions. Il est alors possible d'établir une relation fonctionnelle entre le gène d'intérêt et l'autre gène muté, car ce phénotype suggère que les produits de ceux-ci participent dans une même voie biochimique ou dans deux voies biochimiques parallèles et redondantes. Trois gènes ont été identifiés par cette approche (H. Bussey, communication personnelle). Le premier est le gène *FYV5*, dont le produit n'a pas encore été caractérisé. Le second est le gène *IMP2* codant pour une sous-unité de la protéase de la membrane interne de la mitochondrie requise pour la translocation des protéines vers l'espace intermembranaire de cet organelle (Nunnari *et al.*, 1993). Le troisième est le gène *RRP6* encodant pour une composante de l'exosome nucléaire impliquée dans la maturation des ARNr (Briggs *et al.*, 1998).

Les essais de létalité synthétique proposent un lien génétique entre *LRE1* et *IMP2*, un gène codant pour la sous-unité d'une protéase de la membrane mitochondriale interne. De plus, une sous-population de la protéine Lre1p pourrait possiblement être retrouvée dans la mitochondrie selon nos résultats de fractionnement subcellulaire. Nous avons donc voulu faire l'investigation de cette relation potentielle entre Lre1p et une fonction mitochondriale. Pour ce faire, nous avons cru bon d'étudier le comportement d'un mutant *lre1Δ* chez une souche *rho⁰*, dépourvue d'ADN mitochondrial (ADNmt) et, conséquemment, de fonctions mitochondriales. Le génome mitochondrial de *S. cerevisiae* comporte 85 kb. Il code pour 24 ARNt, 2 ARNr et 13 polypeptides retrouvés dans les sous-unités I, II et III de la cytochrome c oxydase ainsi que dans l'ATP synthase. Donc, les produits issus des gènes mitochondriaux sont impliqués dans la chaîne de transport des électrons (Groth *et al.*, 2000). Afin d'obtenir des souches *rho⁰*, nous avons procédé à un traitement au bromure d'éthidium, un agent mutagène puissant, qui induit la perte d'ADNmt (Fox *et al.*, 1991). Nous avons choisi de faire subir ce traitement aux souches BY4741 et

YPH499 *LRE1* et *lre1Δ* (*rho*⁺), car le phénotype des mutants *lre1Δ* en ce qui concerne la sensibilité au glucose et à la caféine sont divergents dans ces deux contextes génétiques. En effet, le mutant BY4741 *lre1Δ* est celui qui montre la sensibilité la moins prononcée au glucose et à la caféine contrairement au mutant YPH499 *lre1Δ* (Figure 8A et 8B). Il est important de souligner que YPH499 est la souche parentale de UCC3505 (Singer & Gottschling, 1994). Avant de procéder à tout essai, nous avons confirmé le caractère *rho*⁰ de nos souches selon leur capacité à croître en présence d'une source de carbone fermentescible, comme le glucose, et non fermentescible, tel un mélange de glycérol et éthanol. Le génome mitochondrial code pour des gènes dont les produits sont impliqués dans la chaîne de transport des électrons. Celle-ci joue un rôle important dans la production d'énergie chez les organismes aérobies (Mandavilli *et al.*, 2002). Alors, les mutations au niveau du génome mitochondrial empêchent la cellule de se procurer de l'énergie via un métabolisme respiratoire. Par conséquent, les souches *rho*⁰ ne peuvent croître qu'en présence d'une source de carbone fermentescible (Fox *et al.*, 1991). Les résultats présentés à la figure 12 démontrent bien que nos souches traitées au bromure d'éthidium arborent le caractère *rho*⁰, car elles sont incapables de pousser en présence de glycérol et éthanol (panneaux 2 et 4) alors que le glucose peut supporter leur croissance (panneaux 1 et 3). Nous avons ensuite voulu déterminer si l'effet du glucose sur nos mutants *lre1Δ* est le même dans un contexte génétique *rho*⁺ et *rho*⁰. Tel que montré au panneau 1 de la figure 12, la mutation *lre1Δ* engendre un retard de croissance sur glucose en absence de l'expression du génome mitochondrial (*lre1Δ rho*⁰) chez la souche BY4741 comparativement à ce que nous observons pour le mutant *lre1Δ* chez la même souche renfermant de l'ADNmt (*lre1Δ rho*⁺). Cependant, ce retard de croissance est aussi observé pour la souche *LRE1 rho*⁰. Donc ce phénotype n'est pas spécifique à l'absence du produit du gène *LRE1*. Aucun effet du glucose sur la croissance n'est observé pour la souche YPH499, *LRE1* ou *lre1Δ*, portant un génotype mitochondrial *rho*⁰ comparativement à leurs souches *rho*⁺ respectives (Figure 12, panneau 3). Il semble donc que le contexte génétique de celle-ci lui confère naturellement un phénotype mitochondrial. Il serait possible que

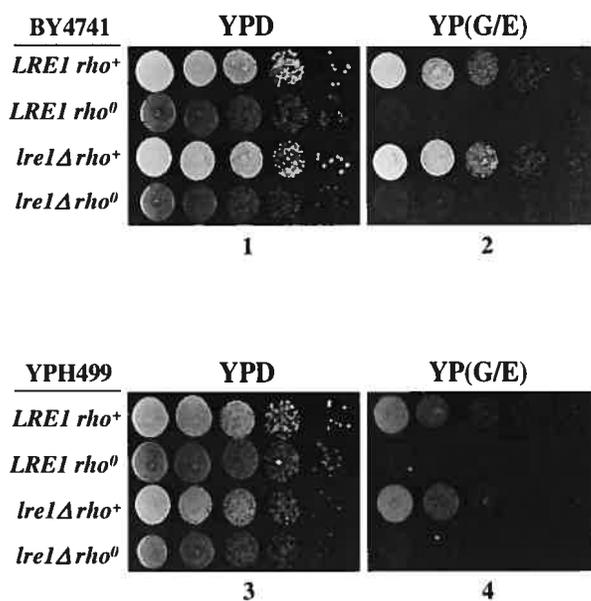


Figure 12 – Effet de la mutation *lre1Δ*, dans un contexte génétique *rho*⁰, sur la sensibilité au glucose. Des dilutions en série (1:10) des souches BY4741 et YPH499 *LRE1* ou *lre1Δ*, traitées ou non au bromure d'éthidium, ont été déposées sous forme de goutte sur des pétris renfermant du glucose ou un mélange de glycérol et éthanol comme source de carbone.

la souche YPH499 porte des lésions limitées au niveau de son génome mitochondrial affectant une des fonctions mitochondriales, mais lui permettant tout de même de pousser sur une source de carbone non fermentescible (Figure 12, panneau 4). De telles souches ont été identifiées *mit*⁻, mais sont aussi nommées *rho*⁺, car leurs mitochondries demeurent fonctionnelles (Fox *et al.*, 1991). Étonnamment, l'effet du glucose sur le mutant *lre1Δ rho*⁺ de la souche YPH499 n'est pas aussi senti que celui observé aux figures 8A et 8B. Cette différence dans nos résultats peut s'expliquer par le fait que les photos montrées au panneau 1 de la figure 8 ont été prises après 24 heures d'incubation alors que celles présentées au panneau 3 de la figure 12 ont été prises après 48 heures d'incubation. En effet, nous avons remarqué que le phénotype de sensibilité au glucose observé s'estompe après 72 heures d'incubation (non présenté). Donc, nos résultats ne font ressortir aucun effet notable de l'absence de fonctions mitochondriales sur la sensibilité au glucose des mutants *lre1Δ* étudiés.

Afin d'associer une fonction mitochondriale au produit du gène *LRE1*, nous avons décidé d'utiliser une autre approche. Il est connu que des mitochondries fonctionnelles sont requises pour permettre la résistance aux stress oxydatifs. Or, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produit par le métabolisme respiratoire et l'oxydation des nutriments afin d'en soutirer de l'énergie, est un des produits toxiques dérivés de l'oxygène associé à ce type de stress (Grant *et al.*, 1997). Nous avons donc voulu déterminer si l'effet du peroxyde d'hydrogène est le même chez les mutants *lre1Δ* en présence et en absence d'expression du génome mitochondrial. Pour ce faire, nous avons étudié le phénotype des souches BY4741 et YPH499, *LRE1* et *lre1Δ*, en présence de ce composé. Dans le but de mimer des conditions générant un caractère *rho*⁰ chez nos souches, nous avons ajouté à nos milieux de l'antimycine A, un inhibiteur spécifique de la chaîne de transport des électrons mitochondriale agissant au niveau du complexe III. Des travaux utilisant la technologie des biopuces d'ADN de *S. cerevisiae* ont montré que le traitement des cellules *rho*⁺ avec cet inhibiteur induit un patron d'expression génique très semblable à celui observé pour les mutants *rho*⁰ (Epstein *et al.*, 2001). Encore une fois, nous nous sommes assurés que le traitement à l'antimycine A confère un phénotype *rho*⁰ à nos souches en vérifiant leur incapacité de croissance en présence d'une source de carbone non fermentescible. Comme en témoignent les résultats présentés à la figure 13, les souches incubées en présence de cet inhibiteur sont incapables de pousser en présence d'un mélange de glycérol et éthanol (panneaux 5 et 5'), alors que le glucose supporte très bien leur croissance (panneaux 1 et 1'). En ce qui a trait au traitement au peroxyde d'hydrogène, l'effet de ce produit toxique est un peu plus senti chez le mutant *lre1Δ* que chez la souche *LRE1* (panneau 4). En plus, la sensibilité est amplifiée dans un contexte génétique mimant l'absence de fonction mitochondriale (panneau 4'). Cependant, nous remarquons encore une différence des niveaux de toxicité entre les souches BY4741 et YPH499. En effet, une concentration de 5,5 mM de H_2O_2 ne semble pas perturber la croissance des souches BY4741 *rho*⁺ (panneau 4), alors qu'une hausse du taux de mortalité est visible chez les souches YPH499 *rho*⁺ à partir d'une concentration de 5,0 mM de H_2O_2 (panneau 3). Pour ce qui est des souches

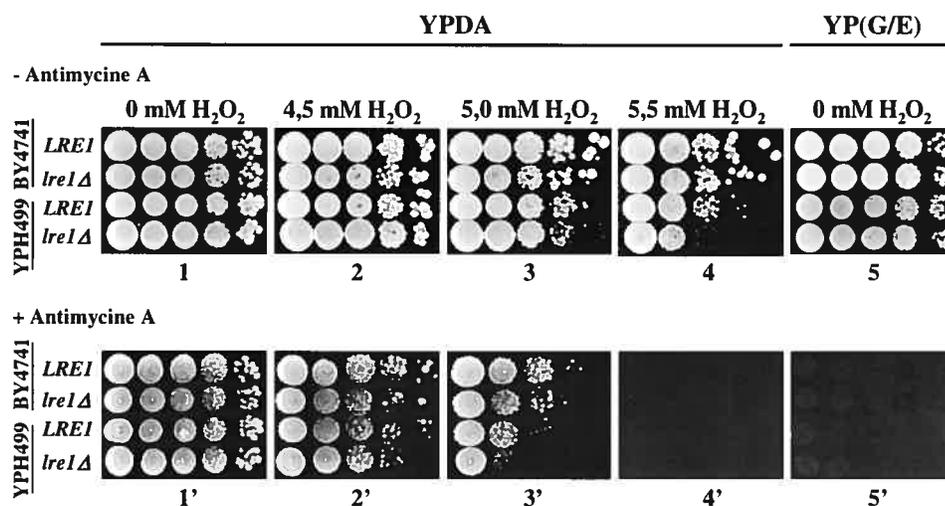


Figure 13 – Effet de la mutation *lre1Δ*, dans un contexte génétique *rho*⁰, sur la sensibilité au peroxyde d'hydrogène. Des dilutions en série (1:10) des souches BY4741 et YPH499 *LRE1* ou *lre1Δ*, ont été déposées sous forme de goutte sur des pétris YPDA, additionnés ou non d'antimycine A et renfermant différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène. Ces mêmes dilutions ont été déposées sur un pétri renfermant un mélange de glycérol et éthanol comme source de carbone, additionné ou non d'antimycine A. Des photos ont été prises après 6 jours d'incubation à 30°C.

*rho*⁰, l'effet du peroxyde d'hydrogène commence à être senti à 5,0 mM de H₂O₂ pour BY4741, le mutant *lre1Δ* étant légèrement plus sensible à ce composé que la souche *LRE1* (panneau 3'). Dans le contexte génétique de la souche YPH499, une concentration de 4,5 mM de H₂O₂ est suffisante pour entraîner un effet semblable (panneau 2'). Il est important de souligner que le phénotype observé n'est pas dû à la sensibilité au glucose associée au mutant *lre1Δ*, car les cellules ont pu rattraper leur retard de croissance durant les 6 jours d'incubation. Nous avons même remarqué qu'une incubation prolongée ne nous permet pas d'obtenir plus de colonies (non présenté). Donc, l'effet observé est vraiment une létalité associée à la toxicité du peroxyde d'hydrogène. En somme, l'effet du peroxyde d'hydrogène est sensiblement le même pour les mutants *lre1Δ* en présence et en absence de mitochondries fonctionnelles comparativement aux souches sauvages respectives. Par conséquent, l'absence du produit du gène *LRE1* augmente la sensibilité au peroxyde d'hydrogène même dans un contexte génétique *rho*⁰. Les résultats de cette étude épistatique

suggèrent que Lrelp n'agit pas directement dans le processus de la résistance aux stress oxydatifs lors de sa fonction mitochondriale potentielle.

DISCUSSION

Le cycle GDP/GTP de Gsp1p/Ran affecte plusieurs processus cellulaires chez les eucaryotes. Des preuves scientifiques récentes accordent un rôle direct de cette petite protéine G, indépendamment de sa fonction dans le transport nucléocytoplasmique des macromolécules, dans ces voies cellulaires. Bien que quelques-unes de ses cibles intervenant dans ces mécanismes sont connues, d'autres restent encore à découvrir. Dans cet ordre d'idées, la protéine Lre1p a été identifiée comme partenaire protéique potentiel de la petite protéine G Gsp1p grâce à la technique de la librairie d'épitopes phagiques. La fonction associée au gène *LRE1* n'étant pas bien définie et cette interaction génétique avec la voie *PRP20/GSP1* étant jusqu'à présent insoupçonnée, nous avons tenté de caractériser la protéine issue de ce gène ainsi que son interaction avec Gsp1p.

Dans ce travail, nous avons démontré que les protéines Lre1p et Gsp1p interagissent ensemble, autant *in vitro* qu'*in vivo*. Nous avons aussi montré que Lre1p est une protéine localisée majoritairement dans le noyau, dont une sous-population est associée à la chromatine, et très minoritairement dans la mitochondrie. De plus, nos résultats indiquent que les mutants *lre1Δ* partagent certains phénotypes observés chez des mutants de la voie PKA, tels que la sensibilité au glucose, la sensibilité à la caféine et la levée du silencing transcriptionnel télomérique. Bien que nos efforts d'identification des partenaires protéiques de Lre1p par purification par affinité en tandem n'ont pas connu le succès escompté, nous avons confirmé la présence simultanée des protéines Lre1p et Gsp1p dans un même complexe protéique chez *S. cerevisiae*. Les essais de létalité synthétique ont permis d'associer, au produit du gène *LRE1*, des fonctions mitochondriales et exosomales à caractériser.

Tel que mentionné précédemment, le travail à l'origine de cet ouvrage a été l'isolement, à deux reprises, du peptide SPHQPSL lors d'un criblage pour des partenaires potentiels de Gsp1p via la technique de la librairie d'épitopes phagiques. Bien que ce peptide soit très similaire à la région comprise entre les acides aminés 205 à 211 de la protéine Lre1p (SPLRPSL), il contient deux acides aminés différents.

Malgré cette différence, nous avons cru que cette interaction pouvait être possible entre ces deux protéines. Il était donc primordial, dans un premier temps, de confirmer le résultat de ce criblage par un essai de liaison impliquant le mélange de la protéine Gsp1p purifiée, préalablement produite en bactérie, avec la protéine Lre1p transcrite et traduite *in vitro*. Les résultats de cet essai s'avèrent positifs et proposent une interaction physique directe entre ces deux protéines. Cependant, notre démarche expérimentale ne permet pas d'affirmer que le peptide isolé par la technique de la librairie d'épitopes phagiques est responsable de cette interaction. Afin de s'en assurer, il aurait fallu reprendre cet essai en produisant par transcription-traduction *in vitro* différentes versions tronquées de la protéine Lre1p de façon à identifier la portion de cette dernière permettant l'interaction avec Gsp1p.

Bien que cet essai de liaison nous ait permis de confirmer l'interaction physique entre ces deux protéines, cette méthode peut aussi générer des faux positifs. En effet, puisque le produit du gène *LRE1* est peu caractérisé, il est possible que Lre1p et Gsp1p ne soient pas localisées dans le même compartiment cellulaire. De plus, les conditions biochimiques utilisées lors de cet essai *in vitro* sont très différentes des conditions physiologiques chez *S. cerevisiae*. Donc, la possibilité que ce site d'interaction ne soit pas accessible sur la protéine Lre1p lorsqu'elle adopte sa conformation tridimensionnelle est à envisager. En plus, les protéines interagissant ensemble *in vivo* peuvent le faire de façon directe ou indirecte, soit en se retrouvant au cœur d'un complexe protéique composé de différentes protéines. Selon ce dernier ordre d'idées, rien n'exclut que certains partenaires des protéines Gsp1p et Lre1p pourraient soit entrer en compétition pour les peptides nécessaires à cette interaction physique, soit les masquer en interagissant au niveau d'un site à proximité de ceux-ci.

Ces constatations nous ont poussés à effectuer des essais d'interaction *in vivo*. Nous avons eu recours à une méthode nous permettant d'immunoprécipiter les complexes renfermant la protéine Lre1p à partir d'un lysat cellulaire et de vérifier, dans un deuxième temps, si la protéine Gsp1p y est co-purifiée. Bien que cet essai ne nous permet pas d'affirmer que Lre1p et Gsp1p interagissent directement *in vivo*, nos

résultats suggèrent que ces deux protéines sont partenaires au sein d'un même complexe protéique chez *S. cerevisiae*. De plus, cette interaction *in vivo* semble assez stable. En effet, le délai d'incubation de 4 heures lors de l'essai d'interaction pourrait être suffisant pour que les interactions protéines-protéines faibles soient perdues. Cependant, ceci ne semble pas le cas entre Lre1p et Gsp1p, puisque nous avons obtenu un résultat positif dans ces conditions. Inversement, ce délai d'incubation pourrait aussi encourager la formation de complexes après la lyse cellulaire entre des protéines qui ne sont pas issues d'un même compartiment cellulaire. Afin de remédier à cette situation, nous avons utilisé des conditions de lyse et d'immunoprécipitation très stringentes pour que seules les interactions spécifiques soient maintenues. En plus, nous nous sommes intéressés à la localisation cellulaire de Lre1p.

Afin de déterminer dans quel compartiment les protéines Gsp1p et Lre1p se rencontrent et de pouvoir appuyer leur appartenance à un même complexe protéique, nous avons localisé Lre1p en analysant différentes fractions subcellulaires obtenues suite à un fractionnement. Cette stratégie nous a permis d'affirmer que cette protéine est majoritairement nucléaire, bien qu'une sous-population semble être mitochondriale. Cependant, il nous a été impossible de quantifier cette localisation différentielle. Or, celle-ci est prédite par le logiciel bioinformatique « PSORT II » (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>). Les modèles de probabilité utilisés par ce dernier permettent de prédire les sites de localisation cellulaire à partir des caractéristiques de la structure primaire des protéines. Ceux-ci estiment que la population totale de Lre1p devrait être répartie de la façon suivante dans la cellule : 60,9 % nucléaire, 26,1 % mitochondriale, 8,7 % cytoplasmique et 4,3 % au niveau du réticulum endoplasmique (Horton & Nakai, 1997). En ce qui concerne la structure primaire de la protéine Lre1p, elle renferme trois séquences de localisation nucléaire classiques, similaires à celui de l'antigène grand T du virus SV40. Celles-ci sont composées de quatre à cinq acides aminés basiques, soit l'histidine (H), la lysine (K) ou l'arginine (R) (Hicks & Raikhel, 1995). Effectivement, les séquences RHRR, RRRR, RRKRK sont retrouvées respectivement aux positions 29, 367 et 566 de la

protéine Lre1p. Il suffit qu'une de ces trois séquences soit exposée à la surface de cette protéine lorsqu'elle adopte sa conformation tridimensionnelle pour que sa localisation soit ciblée au noyau. En plus, la structure primaire de la protéine Lre1p renferme une séquence consensus à la position 31, soit le motif RRS/LA, annonçant la présence d'un site de clivage à proximité d'un peptide signal mitochondrial (Gavel & von Heijne, 1990). Ces séquences de localisation cellulaires potentielles appuient nos résultats de fractionnement subcellulaire. De plus, la localisation nucléaire de Lre1p corrobore les résultats d'interaction *in vivo* avec Gsp1p aussi présente dans ce compartiment.

Afin de pousser la localisation cellulaire de Lre1p un peu plus loin, nous avons procédé à un essai de purification de chromatine. Celui-ci a démontré qu'une sous-population de cette protéine y est associée. La chromatine est un complexe d'ADN, d'histones et de protéines non-histones retrouvé uniquement dans le noyau des cellules eucaryotes. Donc, ce résultat confirme la localisation nucléaire de Lre1p et appuie l'interaction avec Gsp1p dans ce compartiment. La protéine Gsp1p peut aussi s'associer à la chromatine nucléaire, soit par liaison directe aux histones H3 et H4 ou via son interaction avec Prp20p (Bilbao-Cortes *et al.*, 2002). Par conséquent, il serait possible que Gsp1p soit responsable de l'association de Lre1p à la chromatine vu le fait que ces deux protéines sont retrouvées dans un même complexe protéique dans la cellule. Cependant, nos essais ne permettent pas d'exclure la possibilité que la liaison de Lre1p à la chromatine soit indépendante de cette interaction avec Gsp1p.

Le lien le plus évident pouvant être proposé entre Lre1p et Gsp1p est la voie PKA. En effet, des études épistatiques suggèrent que cette voie pourrait réguler le cycle GDP/GTP de Gsp1p (Oki & Nishimoto, 1998) alors qu'il a été montré que Lre1p exerce une fonction antagoniste à celle de la PKA (Versele & Thevelein, 2001). Nous avons donc voulu caractériser plus en détails le rôle du produit du gène *LRE1* dans cette cascade de signalisation en tentant d'associer des phénotypes observés chez des mutants de la voie PKA à des mutants *lre1Δ*. De fait, nous avons

observé une sensibilité au glucose et à la caféine chez les souches portant une délétion au niveau de ce gène. Cependant, l'étendue de ces effets est très variable selon le contexte génétique de la souche utilisée. Il est important de souligner que ces observations sont très fréquentes en génétique des levures. Nous avons aussi voulu déterminer si Lre1p pouvait agir sur des cibles contrôlées par la voie PKA, autres que la sensibilité aux stress et les niveaux de tréhalose. Sachant que Lre1p peut s'associer à la chromatine, nous nous sommes interrogés sur la possibilité que la délétion de *LRE1* ait un effet négatif sur le maintien du silencing transcriptionnel télomérique. Nos résultats sont fidèles au rôle antagoniste à celui de la PKA associé à Lre1p. De plus, ils proposent que Lre1p serait impliquée au niveau du maintien d'une structure fermée de la chromatine. Cette protéine semble donc agir sur plusieurs processus cellulaires contrôlés par la voie PKA, tels que la résistance à la chaleur, les niveaux de tréhalose et le silencing transcriptionnel télomérique. Ces éléments de preuves pourraient suggérer que c'est un régulateur négatif de cette voie. Par contre, il a déjà été montré que Lre1p n'altère pas les composantes régulant les niveaux d'AMPc ou d'activité PKA et qu'elle semble exercer ses fonctions indépendamment de la voie de transduction de signal PKA/AMPc (Versele & Thevelein, 2001). Afin de mieux comprendre cette fonction de Lre1p, nous avons pensé qu'en identifiant ses partenaires protéiques nous serions en mesure de déterminer si elle agit directement ou parallèlement à la voie PKA.

Dû à des problèmes techniques, il nous a été impossible d'identifier les partenaires protéiques de Lre1p par la méthode de purification par affinité en tandem (TAP). En effet, nous avons remarqué que la portion protéine A de notre étiquette TAP fusionnée à la protéine Lre1p pourrait ne pas être accessible lorsque la protéine de fusion adopte sa conformation tridimensionnelle dans des conditions physiologiques. Donc, notre purification par affinité a été limitée à une seule étape. En conséquence, nos échantillons recueillis comportent beaucoup trop de protéines non spécifiques au complexe renfermant la protéine de fusion pour que celui-ci soit caractérisé. Fort heureusement, nous avons pu confirmer l'interaction *in vivo* entre

Lre1p et Gsp1p au sein d'un même complexe protéique. Ainsi, nous avons décidé d'utiliser une autre approche afin d'identifier les fonctions cellulaires de Lre1p.

Des essais de létalité synthétique effectués par Guillaume Lesage du laboratoire de Howard Bussey (Université McGill) ont permis d'établir un lien génétique entre les gènes *LRE1* et *IMP2* ainsi que *LRE1* et *RRP6*. Le produit du gène *RRP6* est une composante de l'exosome nucléaire et possède une activité 3' → 5' exonucléase (Briggs *et al.*, 1998; Burkard & Butler, 2000). En plus d'être un intermédiaire dans la voie de maturation des ARNr, il est aussi impliqué dans la dégradation des précurseurs d'ARNm aberrants (Das *et al.*, 2003). En ce qui concerne le produit du gène *IMP2*, il correspond à une des trois sous-unités composant la protéase I de la membrane mitochondriale interne (Schneider *et al.*, 1991; Schneider *et al.*, 1994; Jan *et al.*, 2000). Celle-ci est responsable du clivage des peptides signaux portés par les protéines destinées à la membrane mitochondriale interne ou à l'espace intermembranaire de cet organelle (Pratje & Guiard, 1986). Un des substrats spécifiques de Imp2p est le cytochrome c₁, une sous-unité du complexe III de la chaîne de transport des électrons (Jan *et al.*, 2000). Les résultats de ce criblage suggèrent que Lre1p pourrait être associée à des fonctions exosomales et mitochondriales à caractériser.

Dans cet ordre d'idées, nous avons voulu établir un lien entre la protéine Lre1p et une fonction mitochondriale. Cependant, nos essais phénotypiques ne nous ont pas permis de faire cette association en ce qui concerne la sensibilité au glucose observée chez les mutants *lre1Δ* et la sensibilité aux stress oxydatifs caractéristique des souches *rho⁰*. Sachant que la mitochondrie est responsable de plusieurs processus variés, tels que la respiration, la phosphorylation oxydative, le métabolisme des acides gras et l'homéostasie du fer (Luo *et al.*, 2003), ceci nous indique que d'autres efforts de caractérisation du rôle mitochondrial de Lre1p sont à prévoir.

Les résultats de cet ouvrage fournissent la première preuve d'une interaction *in vivo* entre les protéines Gsp1p et Lre1p. Par contre, ils ne nous permettent pas d'associer une nouvelle fonction précise à cette petite protéine G. Cependant, les phénotypes associés à la mutation *lre1Δ* et les partenaires génétiques de *LRE1* proposés par l'essai de létalité synthétique systématique inspirent quelques hypothèses à ce sujet. Premièrement, nous avons remarqué que les mutants *lre1Δ* partagent plusieurs phénotypes avec ceux affectés au niveau de la voie PKA. Il est bien connu que cette voie contrôlée par l'AMPc peut être activée, entre autre, par les niveaux de glucose extracellulaire. Cependant, cette source de carbone fermentescible contrôle aussi la voie de répression par le glucose (Thevelein, 1994). En présence d'une quantité suffisante d'un sucre fermentescible, l'effet majeur engendré par celle-ci est l'inhibition complète de la synthèse des enzymes respiratoires. Ces derniers sont impliqués dans le cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons au niveau de la mitochondrie. Or, une faible sous-population de Lre1p semble localisée dans ce compartiment et l'identification de *IMP2* en tant que partenaire génétique de *LRE1* suggère qu'une fonction mitochondriale pourrait être associée au produit de ce dernier. Ces preuves nous amènent à supposer que Lre1p pourrait être impliquée dans ces deux voies distinctes régulées par le glucose, soit la voie PKA et la voie de répression par le glucose. Des éléments de preuves supplémentaires semblent montrer que cette première cascade de signalisation pourrait aussi réguler le cycle GDT/GTP de Gsp1p (Tung *et al.*, 1992; Tu & Carlson, 1995; Tung & Hopper, 1995; Oki & Nishimoto, 1998). De plus, nous avons montré que Lre1p agit sur plusieurs cibles communes à celles de la PKA. Il serait donc intéressant de vérifier si, de par son interaction *in vivo* avec Gsp1p, Lre1p pourrait être responsable de la régulation du cycle GTPasique de cette petite protéine G par la voie PKA.

Le gène *RRP6* a aussi été identifié comme partenaire génétique de Lre1p. Ceci suggère que Lre1p pourrait avoir une fonction exosomale à caractériser. Or, une telle fonction a déjà été associée à Gsp1p (Noguchi *et al.*, 1996). De fait, un criblage

deux-hybrides utilisant Ran comme appât a proposé une interaction physique avec une composante de l'exosome, la protéine Dis3p/Rrp4p. Ces travaux ont même permis d'avancer que Gsp1p/Ran régulerait l'assemblage et la dissociation de l'exosome via Dis3p/Rrp4p de manière indépendante à son rôle dans le transport nucléocytoplasmique des macromolécules. Reste à savoir si la protéine Lre1p, de par sa présence au cœur d'un complexe protéique renfermant Gsp1p, est également impliquée dans ce processus.

CONCLUSION ET EXPÉRIENCES FUTURES

Les résultats présentés dans cet ouvrage fournissent la première preuve scientifique que Lre1p et Gsp1p sont retrouvées dans un même complexe protéique chez *S. cerevisiae*. Par contre, nous n'avons pas décrit entièrement ce complexe et la signification biologique de cette interaction reste à déterminer. Cependant, tel que mentionné dans la section précédente, nos efforts de caractérisation du produit du gène *LRE1* inspirent quelques hypothèses à ce sujet. Celles-ci pourraient orienter les recherches futures dans ce domaine.

Dans un premier temps, nous avons remarqué que les phénotypes associés à la mutation *lre1Δ*, en ce qui concerne la sensibilité au glucose, à la caféine et au peroxyde d'hydrogène, sont très variables selon le contexte génétique de la souche arborant cette mutation. En fait, nous aurions pu tirer profit de cette observation en effectuant un criblage pour des partenaires génétiques de *LRE1*, en supposant que le génome des souches moins affectées par la délétion de ce gène code pour des suppresseurs de cette mutation. Brièvement, il aurait été possible d'obtenir une souche diploïde en croisant les mutants haploïdes BY4741 *lre1Δ* et YPH499 *lre1Δ*, dont les phénotypes sont les plus divergents. Ensuite, nous aurions pu déterminer le phénotype dominant de ce mutant dans ce contexte génétique. Si celui-ci s'apparente au phénotype observé chez la souche BY4741 *lre1Δ*, il aurait été possible de construire une banque génomique à partir de celle-ci. Par la suite, nous aurions pu transformer le mutant YPH499 *lre1Δ* avec cette banque afin d'isoler des gènes complétant la mutation associée à la délétion de *LRE1*. Nous croyons qu'il serait aussi intéressant d'avoir recours à la technologie des biopuces à ADN afin d'étudier l'impact de la présence ou non du produit du gène *LRE1* sur l'expression du génome de souches dont les phénotypes sont divergents. Cet essai pourrait même nous permettre de mieux comprendre les fonctions exosomale, mitochondriale et antagoniste à la voie PKA associées à Lre1p.

Même si ce travail suggère que Lre1p est associée à de telles fonctions, le lien entre ces rôles potentiels et l'interaction de cette protéine avec Gsp1p est à définir.

Nous croyons que l'identification des partenaires physiques de Lre1p nous permettrait de répondre à quelques-unes de nos interrogations à ce sujet. Notre tentative de purification des complexes protéiques renfermant Lre1p par la méthode de purification par affinité en tandem à l'aide de l'étiquette TAP n'a pas bien fonctionné. Tout porte à croire que la portion protéine A de cette étiquette fusionnée en C-terminal de la protéine Lre1p serait masquée par la conformation tridimensionnelle de celle-ci en conditions physiologiques. Dans le but de remédier à cette situation, il pourrait être intéressant de générer une autre version de cette protéine de fusion afin que l'étiquette TAP soit placée en N-terminal de Lre1p. Cette étiquette renfermerait les mêmes éléments que celle que nous avons utilisée dans cet ouvrage. Cependant, ils seraient placés dans un ordre inverse de manière à ce que la portion protéine A, clivée suite à la première purification par affinité, soit localisée à l'extrémité N-terminale de la protéine de fusion. Reste à espérer que cette stratégie n'affectera pas l'expression du gène *LRE1* à partir de son propre promoteur (Puig *et al.*, 2001).

Puisque nous nous intéressons plus spécifiquement à la signification biologique du complexe renfermant simultanément Lre1p et Gsp1p, il serait tout à fait approprié de tenter d'isoler seulement les complexes dans lesquels elles sont retrouvées. Ceci est possible grâce à une modification de la méthode de purification par affinité en tandem présentée dans ce travail. En effet, la protéine A et le site de clivage de la protéase TEV pourraient être fusionnés à la protéine Lre1p alors que le peptide de liaison à la calmoduline serait fusionné à Gsp1p ou vice-versa. En ce qui concerne le protocole de purification par affinité en tandem, il reste le même. Cette stratégie, nommée « Split Tag », a été très utile lors de la caractérisation des petites particules ribonucléoprotéiques nucléaires U1 et U2 (Caspary *et al.*, 1999; Puig *et al.*, 2001). Si ces deux alternatives de la purification par affinité en tandem de type TAP permettent de purifier efficacement les complexes protéiques renfermant Lre1p et Gsp1p, il serait ensuite très facile de déterminer la nature de certaines des protéines co-purifiées par spectrométrie de masse. Ce type d'analyse a déjà été effectué lors de

l'identification de l'interaction entre Gsp1p et Pdr6p, une protéine de la famille des importines β (Lau *et al.*, 2000).

Nous croyons que les expériences proposées dans cette section nous permettront de mieux comprendre la fonction de la protéine Lre1p et la signification biologique de son interaction avec Gsp1p. Ces dernières, combinées aux résultats présentés dans cette étude, pourraient avoir des implications tant au niveau de l'identification de nouveaux rôles de Gsp1p que de la compréhension de la fonction du complexe renfermant cette petite protéine G et Lre1p chez *S. cerevisiae*.

RÉFÉRENCES

- Adam, S. A., Sterne Marr, R., & Gerace, L. (1990). Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *The Journal of Cell Biology*, *111*, 807-816.
- Aebi, M., Clark, M. W., Vijayraghavan, U., & Abelson, J. (1990). A yeast mutant, *PRP20*, altered in mRNA metabolism and maintenance of the nuclear structure, is defective in a gene homologous to the human gene *RCC1* which is involved in the control of chromosome condensation. *Molecular and General Genetics*, *224*, 72-80.
- Aitchison, J. D., Blobel, G., & Rout, M. P. (1996). Kap104p: a karyopherin involved in the nuclear transport of messenger RNA binding proteins. *Science*, *274*, 624-627.
- Allmang, C., Mitchell, P., Petfalski, E., & Tollervey, D. (2000). Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic Acids Research*, *28*, 1684-1691.
- Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., & Mitchell, P. (1999). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3'→5' exonucleases. *Genes & Development*, *13*, 2148-2158.
- Alonso-Monge, R., Real, E., Wojda, I., Bebelman, J. P., Mager, W. H., & Siderius, M. (2001). Hyperosmotic stress response and regulation of cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae* share common functional aspects. *Molecular Microbiology*, *41*, 717-730.
- Andersen, S. S. (1999). Balanced regulation of microtubule dynamics during the cell cycle: a contemporary point of view. *Bioessays*, *21*, 53-60.
- Arudchandran, A., Cerritelli, S., Narimatsu, S., Itaya, M., Shin, D. Y., Shimada, Y., *et al.* (2000). The absence of ribonuclease H1 or H2 alters the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to hydroxyurea, caffeine and ethyl methansulphonate: implications for roles of RNases H in DNA replication and repair. *Genes to Cells*, *5*, 789-802.
- Azuma, Y., & Dasso, M. (2000). The role of Ran in nuclear function. *Current Opinion in Cell Biology*, *12*, 302-307.
- Battistoni, A., Guarguaglini, G., Degrassi, F., Pittoggi, C., Palena, A., DiMatteo, G., *et al.* (1997). Deregulated expression of the RanBP1 gene alters cell cycle progression in murine fibroblasts. *Journal of Cell Science*, *110*, 2345-2357.

- Becker, J., Melchior, F., Gerke, V., Bischoff, F. R., Ponstingl, H., & Wittinghofer, A. (1995). RNA1 encodes a GTPase-activating protein specific for Gsp1p, the Ran/TC4 homologue of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*, 11860-11865.
- Belhumeur, P., Lee, A., Tam, R., DiPaolo, T., Fortin, N., & Clark, M. W. (1993). GSP1 and GSP2, genetic suppressors of the prp20-1 mutant in *Saccharomyces cerevisiae*: GTP-binding proteins involved in the maintenance of nuclear organization. *Molecular and Cellular Biology*, *13*, 2152-2161.
- Bender, A. (1993). Genetic evidence for the roles of the bud-site-selection genes *BUD5* and *BUD2* in control of the Rsr1p (Bud1p) GTPase in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *90*, 9926-9929.
- Benko, Z., Miklos, I., Carr, A. M., & Sipiczki, M. (1997). Caffeine-resistance in *S. pombe*: mutations in three novel *caf* genes increase caffeine tolerance and affect radiation sensitivity, fertility, and cell cycle. *Current Genetics*, *31*, 481-487.
- Bialek-Wyrzykowska, U., Bauer, B. E., Wagner, W., Kohlwein, S. D., Schweyen, R. J., & Ragnini, A. (2000). Low levels of Ypt protein prenylation cause vesicle polarization defects and thermosensitive growth that can be suppressed by genes involved in cell wall maintenance. *Molecular Microbiology*, *35*, 1295-1311.
- Bianchi, M. M., Sartori, G., Vandenbol, M., Kaniak, A., Uccelletti, D., Mazzoni, C., *et al.* (1999). How to bring orphan genes into functional families. *Yeast*, *15*, 513-526.
- Bilbao-Cortes, D., Hetzer, M., Laengst, G., Becker, P. B., & Mattaj, I. W. (2002). Ran binds to chromatin by two distinct mechanisms. *Current Biology*, *12*, 1151-1156.
- Bischoff, F. R., Krebber, H., Kempf, T., Hermes, I., & Ponstingl, H. (1995a). Human RanGTPase-activating protein RanGAP1 is a homologue of yeast Rna1p involved in mRNA processing and transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *92*, 1749-1753.
- Bischoff, F. R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W., & Ponstingl, H. (1995b). Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO Journal*, *14*, 705-715.
- Bischoff, F. R., & Ponstingl, H. (1991a). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by mitotic regulator RCC1. *Nature*, *354*, 80-82.

- Bischoff, F. R., & Ponstingl, H. (1991b). Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *88*, 10830-10834.
- Blagoeva, J., Stoev, G., & Venkov, P. (1991). Glucan structure in a fragile mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *7*, 455-461.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., & McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, *348*, 125-132.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., & McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily : conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, *348*, 117-127.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., *et al.* (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, *14*, 115-132.
- Briggs, M. W., Burkard, K. T., & Butler, J. S. (1998). Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*, 13255-13263.
- Bun-Ya, M., Harashima, S., & Oshima, Y. (1992). Putative GTP-binding protein, Gtr1, associated with the function of the Pho84 inorganic phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *12*, 2958-2966.
- Burkard, K. T., & Butler, J. S. (2000). A nuclear 3'-5' exonuclease involved in mRNA degradation interacts with Poly(A) polymerase and the hnRNA protein Npl3p. *Molecular and Cellular Biology*, *20*, 604-616.
- Burke, B., & Ellenberg, J. (2002). Remodelling the walls of the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *3*, 487-497.
- Cabib, E., Bowers, B., Sburlati, A., & Silverman, S. J. (1988). Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. *Microbiological Sciences*, *5*, 370-375.
- Carazo-Salas, R. E., Guarguaglini, G., Gruss, O. J., Segref, A., Karsenti, E., & Mattaj, I. W. (1999). Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature*, *400*, 178-181.
- Caspary, F., Shevchenko, A., Wilm, M., & Séraphin, B. (1999). Partial purification of the yeast U2 snRNP reveals a novel yeast pre-mRNA splicing factor required for pre-spliceosome assembly. *The EMBO Journal*, *18*, 3463-3474.

- Chant, J., Corrado, K., Pringle, J. R., & Herskowitz, I. (1991). Yeast *BUD5*, encoding a putative GDP-GTP exchange factor, is necessary for bud site selection and interacts with bud formation gene *BEM1*. *Cell*, *65*, 1213-1224.
- Chen, S., Brockenbrough, J. S., Dove, J. E., & Aris, J. P. (1997). Homocitrate synthase is located in the nucleus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*, 10839-10846.
- Cheng, Y., Dahlberg, J. E., & Lund, E. (1995). Diverse effects of the guanine nucleotide exchange factor RCC1 on RNA transport. *Science*, *267*, 1807-1810.
- Clarkson W. D., Kent, H. M., & Stewart, M. (1996). Separate binding sites on nuclear transport factor 2 (NTF2) for GDP-Ran and the phenylalanine-rich repeat regions of nucleoporins p62 and Nsp1p. *Journal of Molecular Biology*, *263*, 517-524.
- Clément, M., Lavallée, F., Barbès-Morin, G., de Repentigny, L., & Belhumeur, P. (2001). Overexpression of Bud5p can suppress mutations in the Gsp1p guanine nucleotide exchange factor Prp20p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*, *266*, 20-27.
- Colombo, S., Ma, P., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., *et al.* (1998). Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, *17*, 3326-3341.
- Cortes, P., Ye, Z., & Baltimore, D. (1994). RAG-1 interacts with the repeated amino acid motif of the human homologue of the yeast protein SRP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *91*, 7633-7637.
- Coutavas, E., Ren, M., Oppenheim, J. D., D'Eustachio, P., & Rush, M. G. (1993). Characterization of proteins that interact with the cell-cycle regulatory protein Ran/TC4. *Nature*, *366*, 585-587.
- Crauwels, M., Donaton, M. C., Pernambuco, M. B., Winderickx, J., de Winde, J. H., & Thevelein, J. M. (1997). The Sch9 protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* controls cAPK activity and is required for nitrogen activation of the fermentable-growth-medium-induced (FGM) pathway. *Microbiology*, *143*, 2627-2637.
- Cyert, M. S. (2001). Genetic analysis of calmodulin and its targets in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*, *35*, 647-672.
- Das, B., Butler, J. S., & Sherman, F. (2003). Degradation of normal mRNA in the nucleus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *23*, 5502-5515.

- Dasso, M. (2001). Running on Ran: nuclear transport and the mitotic spindle. *Cell*, 104, 321-324.
- Dasso, M. (2002). The Ran GTPase: Theme and variations. *Current Biology*, 12, R502-R508.
- Davis, L. I. (1995). The nuclear pore complex. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 865-896.
- de Duve, C. (1975). Exploring cells with a centrifuge. *Science*, 189, 186-194.
- Demeter, J., Morphew, M., & Sazer, S. (1995). A mutation in the RCC1-related protein pim1 results in nuclear envelope fragmentation in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92, 1436-1440.
- Denning, D., Mykytka, B., Allen, N. P. C., Huang, L., Burlingame, A., & Rexach, M. (2001). The nucleoporin Nup60p functions as a Gsp1p-GTP-sensitive tether for Nup2p at the nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology*, 154, 937-950.
- DeVit, M. J., & Johnston, M. (1999). The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose receptor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Biology*, 9, 1231-1241.
- Dingwall, C., Sharnick, S. V., & Laskey, R. A. (1982). A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell*, 30, 449-458.
- Donovan, S., Harwood, J., Drury, L. S., & Diffley, J. F. (1997). Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, 5611-5616.
- Dove, J. E., Brockenbrough, J. S., & Aris, J. P. (1998). Isolation of nuclei and nucleoli from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Cell Biology*, 53, 33-46.
- Dunphy, W. G. (1994). The decision to enter mitosis. *Trends in Cell Biology*, 4, 202-207.
- Epstein, C. B., Waddle, J. A., Hale IV, W., Davé, V., Thornton, J., Macatee, T. L., et al. (2001). Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Molecular Biology of the Cell*, 12, 297-308.
- Fabre, E., & Hurt, E. (1997). Yeast genetics to dissect the nuclear pore complex and nucleocytoplasmic trafficking. *Annual Review of Genetics*, 31, 277-313.

- Fahrenkrog, B., Aris, J. P., Hurt, E. C., Pante, N., & Aebi, U. (2000). Comparative spatial localization of protein-A-tagged and synthetic yeast nuclear pore complex proteins by immunogold electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, *129*, 295-305.
- Feldherr, C. M., & Akin, D. (1993). Regulation of nuclear transport in proliferating and quiescent cells. *Experimental Cell Research*, *205*, 179-186.
- Fleet, G. H. (1985). Composition and structure of yeast cell walls. Dans M. R. McGinnis (Éd.), *Current Topics in Medical Mycology* (Vol. 1), (pp.24-56). New York : Springer-Verlag.
- Fleig, U. N., Pridmore, R. D., & Philippsen, P. (1986). Construction of *LYS2* cartridges for use in genetic manipulations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, *46*, 237-245.
- Fontoura, B. M., Blobel, G., & Yaseen, N. R. (2000). The nucleoporin Nup98 is a site for GDP/GTP exchange on ran and termination of karyopherin beta 2-mediated nuclear import. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*, 31289-31296.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., & Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, *90*, 1051-1060.
- Fox, T. D., Folley, L. S., Mulero, J. J., McMullin, T. W., Thorsness, P. E., Hedin, L. O., *et al.* (1991). Analysis and manipulation of yeast mitochondrial genes. *Methods in Enzymology*, *194*, 149-165.
- Frasch, M. (1991). The maternally expressed *Drosophila* gene encoding the chromatin-binding protein BJI is a homologue of the vertebrate gene regulator of chromosome condensation, RCC1. *EMBO Journal*, *10*, 1225-1236.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., *et al.* (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*, *390*, 308-311.
- Gao, H., Sumanaweera, N., Bailer, S. M., & Stochaj, U. (2003). Nuclear accumulation of the small GTPase Gsp1p depends on nucleoporins Nup133p, Rat2p/Nup120p, Nup85p, Nic96p, and the acetyl-CoA carboxylase Acc1p. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*, 25331-25340.
- Garcia-Ranea, J. A., & Valencia, A. (1998). Distribution and functional diversification of the ras superfamily in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, *434*, 219-225.

- Garrett, S., Menold, M. M., & Broach, J. R. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* *YAK1* gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*, *11*, 4045-4052.
- Gavel, Y., & von Heijne, G. (1990). Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Protein Engineering*, *4*, 33-37.
- Gideon, P., John, J., Frech, M., Lautwein, A., Clark, R., Scheffler, J. E., *et al.* (1992). Mutational and kinetic analysis of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Molecular and Cellular Biology*, *12*, 2050-2056.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., & Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research*, *20*, 1425.
- Gilchrist, D., Mykytka, B., & Rexach, M. (2002). Accelerating the rate of disassembly of karyopherin/cargo complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*, 18161-18172.
- Glick, B. S., & Pon, L. A. (1995). Isolation of highly purified mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology*, *260*, 213-223.
- Görlich, D., Henklein, O., Laskey, R. A., & Hartmann, E. (1996a). A 41 amino acid motif in importin- α confers binding to importin- β and hence transit into the nucleus. *EMBO Journal*, *15*, 1810-1817.
- Görlich, D., & Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *15*, 607-660.
- Görlich, D., & Mattaj, I. W. (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science*, *271*, 1513-1518.
- Görlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U., & Bischoff, E. R. (1996b). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO Journal*, *15*, 5584-5594.
- Görner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., *et al.* (1998). Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes & Development*, *12*, 586-597.
- Goudswaard, J., van der Donk, J. A., Noordzij, A., van Dam, R. H., & Vaerman, J. P. (1978). Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. *Scandinavian Journal of Immunology*, *8*, 21-28.

- Grant, C. M., MacIver, F. H., & Dawes, I. W. (1997). Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, *410*, 219-222.
- Griffioen, G., Anghileri, P., Imre, E., Baroni, M. D., & Ruis, H. (2000). Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*, 1449-1456.
- Groth, C., Peterson, R. F., & Piskur, J. (2000). Diversity in organization and the origin of gene orders in the mitochondrial DNA molecules of the genus *Saccharomyces*. *Molecular Biology and Evolution*, *17*, 1833-1841.
- Gruss, O. J., Carazo-Salas, R. E., Schatz, C. A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., *et al.* (2001). Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell*, *104*, 83-93.
- Guarguaglini, G., Renzi, L., D'Ottavio, F., Di Fiore, B., Casenghi, M., Cundari, E., *et al.* (2000). Regulated Ran-binding protein 1 activity is required for organization and function of the mitotic spindle in mammalian cells in vivo. *Cell Growth & Differentiation*, *11*, 455-465.
- Haberland, J., Becker, J., & Gerke, V. (1997). The acidic C-terminal domain of rna1p is required for the binding of RanGTP and for RanGAP activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*, 24717-24726.
- Hall, A. (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science*, *249*, 635-640.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, *166*, 557-580.
- Hartwell, L. H., & Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, *246*, 629-634.
- Hayashi, N., Seino, H., Irie, K., Watanabe, M., Clark, K. L., Matsumoto, K., *et al.* (1996). Genetic interaction of *DED1* encoding a putative ATP-dependent RNA helicase with *SRM1* encoding a mammalian RCC1 homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*, *253*, 149-156.
- Helliwell, S. B., Schmidt, A., Ohya, Y., & Hall, M. N. (1998). The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Current Biology*, *8*, 1211-1214.

- Hellmuth, K., Lau, D. M., Bischoff, F. R., Künzler, M., Hurt, E., & Simos, G. (1998). Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Molecular and Cellular Biology*, *18*, 634-6386.
- Herold, A., Truant, R., Wiegand, H., & Cullen, B. R. (1998). Determination of the functional domain organization of the importin alpha nuclear import factor. *The Journal of Cell Biology*, *143*, 309-318.
- Hetzer, M., Bilbao-Cortes, D., Walther, T. C., Gruss, O. J., & Mattaj, I. W. (2000). GTP hydrolysis by Ran is required for nuclear envelope assembly. *Molecular Cell*, *5*, 1013-1024.
- Hicks, G. R., & Raikhel, N. V. (1995). Protein import into the nucleus: an integrated view. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *11*, 155-188.
- Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J., & Tzagoloff, A. (1986). Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast*, *2*, 163-167.
- Hirose, E., Nakashima, N., Sekiguchi, T., & Nishimoto, T. (1998). RagA is a functional homologue of *S. cerevisiae* Gtr1p involved in the Ran/Gsp1-GTPase pathway. *Journal of Cell Science*, *111*, 11-21.
- Hoheisel, J. D. (1994). Creation of a rare cutter multiple cloning site. *Biotechniques*, *17*, 456-460.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic adaptation in yeast: control of the yeast osmolyte system. *International Review of Cytology*, *215*, 149-187.
- Hood, J. K., & Silver, P. A. (1998). Cse1p is required for export of Srp1p/importin- α from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*, 35142-35146.
- Hopper, A. K., Banks, F., & Evangelidis, V. (1978). A yeast mutant which accumulates precursor tRNAs. *Cell*, *14*, 211-219.
- Horton, P., & Nakai, K. (1997). Better prediction of protein cellular localization sites with the *k* nearest neighbors classifier. *Intelligent Systems for Molecular Biology*, *5*, 147-152.
- Howell, K. E., Devaney, E., & Gruenberg, J. (1989). Subcellular fractionation of tissue culture cells. *Trends in Biochemical Sciences*, *14*, 44-47.
- Huang, S., Mayeda, A., Krainer, A. R., & Spector, D. L. (1997). RCC1 and nuclear organization. *Molecular Biology of the Cell*, *8*, 1143-1157.

- Hurt, E. C. (1996). Importins/karyopherins meet nucleoporins. *Cell*, *84*, 509-515.
- Hurt, E., Hannus, S., Schmelzl, B., Lau, D., Tollervey, D., & Simos, G. (1999). A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in Ran-cycle and nucleoporin mutants. *The Journal of Cell Biology*, *144*, 389-401.
- Hutchison, H. T., Hartwell, L. H., & McLaughlin, C. S. (1969). Temperature-sensitive yeast mutant defective in ribonucleic acid production. *The Journal of Bacteriology*, *99*, 807-814.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., & Kimura, K. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *The Journal of Bacteriology*, *153*, 163-168.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., & Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *98*, 4569-4574.
- Izaurrealde, E., & Mattaj, I. W. (1995). RNA export. *Cell*, *81*, 153-159.
- Jacobs Anderson, J. S., & Parker, R. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO Journal*, *17*, 1497-1506.
- Jan, P. S., Esser, K., Pratje, E., & Michaelis, G. (2000). Som1, a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2. *Molecular and General Genetics*, *263*, 483-491.
- Jelinsky, S. A., & Samson, L. D. (1999). Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *96*, 1486-1491.
- Kadowaki, T., Goldfarb, D., Spitz, L. M., Tartakoff, A. M., & Ohno, M. (1993). Regulation of RNA processing and transport by a nuclear guanine nucleotide release protein and members of the Ras superfamily. *The EMBO Journal*, *12*, 2929-2937.
- Kahana, J. A., & Cleveland, D. W. (1999). Beyond nuclear transport: Ran-GTP as a determinant of spindle assembly. *The Journal of Cell Biology*, *146*, 1205-1210.
- Kalab, P., Pu, R. T., & Dasso, M. (1999). The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Current Biology*, *9*, 481-484.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., & Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, *39*, 499-509.

- Kamada, Y., Qadota, H., Python, C. P., Anraku, Y., Ohya, Y., & Levin, D. E. (1996). Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 9193-9196.
- Karlsson, C., Katich, S., Hagting, A., Hoffmann, I. & Pines, J. (1999). Cdc25B and cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis. *The Journal of Cell Biology*, 146, 573-583.
- Kauffman, A., Rank, N. M., O'Neill, E. M., I Iuang, L. S., & O'Shea, E. K. (1998). The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature*, 396, 482-486.
- Kinoshita, N., Goebel, M., & Yanagida, M. (1991). The fission yeast *dis3⁺* gene encodes a 110-kDa essential protein implicated in mitotic control. *Molecular and Cellular Biology*, 11, 5839-5847.
- Kirkpatrick, D., & Solomon, F. (1994). Overexpression of yeast homologs of the mammalian checkpoint gene RCC1 suppresses the class of alpha-tubulin mutations that arrest with excess microtubules. *Genetics*, 137, 381-392.
- Klebe, C., Bischoff, F. R., Ponstingl, H., & Wittinghofer, A. (1995). Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1. *Biochemistry*, 34, 639-647.
- Koepp, D. M., & Silver, P. A. (1996). A GTPase controlling nuclear trafficking: running the right way or walking RANDOMly. *Cell*, 87, 1-4.
- Kornbluth, S., Dasso, M., & Newport, J. (1994). Evidence for a dual role for TC4 protein in regulating nuclear structure and cell cycle progression. *The Journal of Cell Biology*, 125, 705-719.
- Kozak, M. (1989). Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Molecular and Cellular Biology*, 9, 5073-5080.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A. W., Donaton, M. C., Van Dijck, P., *et al.* (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Molecular Microbiology*, 32, 1002-1012.
- Krogan, N. J., Kim, M., Ahn, S. H., Zhong, G., Kobor, M. S., Cagney, G., *et al.* (2002). RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 6979-6992.

- Kuersten, S., Ohno, M., & Mattaj, I. W. (2001). Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends in Cell Biology*, *11*, 497-503.
- Kufer, T. A., Sillje, H. H., Korner, R., Gruss, O. J., Meraldi, P., & Nigg, E. A. (2002). Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *The Journal of Cell Biology*, *158*, 617-623.
- Künzler, M., & Hurt, E. C. (1998). Cse1p functions as the nuclear export receptor for importin alpha in yeast. *FEBS Letters*, *433*, 185-190.
- Künzler, M., & Hurt, E. C. (2001). Targeting of Ran: variation on a common theme?. *Journal of Cell Science*, *114*, 3233-3241.
- Kutay, U., Bischoff, E. R., Kostka, S., Kraft, R., & Görlich, D. (1997). Export of importin α from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell*, *90*, 1061-1071.
- Lafontaine, D., & Tollervey, D. (1995). Trans-acting factors in yeast pre-rRNA and pre-snoRNA processing. *Biochemistry and Cell Biology*, *73*, 803-812.
- Lai, M. H., Silverman, S. J., Gaughran, J. P., & Kirsch, D. R. (1997). Multiple copies of *PBS2*, *MHP1* or *LRE1* produce glucanase resistance and other cell wall effects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *13*, 199-213.
- Lau, D., Kunzler, M., Braunwarth, A., Hellmuth, K., Podtelejnikov, A., Mann, M., *et al.* (2000). Purification of protein A-tagged yeast ran reveals association with a novel karyopherin beta family member, Pdr6p. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*, 467-471.
- Lazaris-Karatzas, A., Montine, K. S., & Sonenberg, N. (1990). Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature*, *345*, 544-547.
- Lee, A., Tam, R., Belhumeur, P., DiPaolo, T., & Clark, M. W. (1993). Prp20, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the regulator of chromosome condensation, RCC1, interacts with double-stranded DNA through a multi-component complex containing GTP-binding proteins. *Journal of Cell Science*, *106*, 287-298.
- Lee, D. C. Y., & Aitchison, J. D. (1999). Kap104p-mediated nuclear import : Nuclear localization signals in mRNA-binding proteins and the role of Ran and RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*, 29031-29037.

- Leung, S. W., Harreman, M. T., Hodel, M. R., Hodel, A. E., & Corbett, A. H. (2003). Dissection of the karyopherin α nuclear localisation signal (NLS)-binding groove. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 41947-41953.
- Liang, C., & Stillman, B. (1997). Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants. *Genes & Development*, 11, 3375-3386.
- Lin, S. J., Defossez, P. A., & Guarente, L. (2000). Requirement of NAD and *SIR2* for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 289, 2126-2128.
- Lipke, P. N., & Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*, 180, 3735-3740.
- Lounsbury, K. M., Richards, S. A., Perlungher, R. R., & Macara, I. G. (1996). Ran binding domains promote the interaction of Ran with p97/beta-karyopherin, linking the docking and translocation steps of nuclear import. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 2357-2360.
- Luo, W., Chen, X., Fang, H., & Green, N. (2003). Factors governing nonoverlapping substrate specificity by mitochondrial inner membrane peptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 4943-4948.
- Ma, P., Wera, S., Van Dijck, P., & Thevelein, J. M. (1999). The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signalling. *Molecular Biology of the Cell*, 10, 91-104.
- Macaulay, C., & Forbes, D. J. (1996). Assembly of the nuclear pore: biochemically distinct steps revealed with NEM, GTP-gamma-S, and BAPTA. *The Journal of Cell Biology*, 132, 5-20.
- Maekawa, H., Nakagawa, T., Uno, Y., Kitamura, K., & Shimoda, C. (1994). The *ste13⁺* gene encoding a putative RNA helicase is essential for nitrogen starvation-induced G1 arrest and initiation of sexual development in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and General Genetics*, 244, 456-464.
- Maerkisch, U., Reuter, G., Stateva, L., & Venkov, P. (1983). Mannan structure analysis of the fragile *Saccharomyces cerevisiae* mutant VY1160. *International Journal of Biochemistry*, 15, 1373-1377.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., & Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, 88, 97-107.

- Mandavilli, B. S., Santos, J. H., & Van Houten, B. (2002). Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutation Research*, *509*, 127-151.
- Marfatia, K. A., Harreman, M. T., Fanara, P., Vertino, P. M., & Corbett, A. H. (2001). Identification and characterization of the human *MOG1* gene. *Gene*, *266*, 45-56.
- Matozaki, T., Nakanishi, H., & Takai, Y. (2000). Small G-protein networks : Their crosstalk and signal cascades. *Cellular Signalling*, *12*, 515-524.
- Mattaj, I. W., & Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annual Review of Biochemistry*, *67*, 265-306.
- Matunis, M. J., Coutavas, E., & Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran GTPase-activating protein between cytosol and nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology*, *135*, 1457-1470.
- Matunis, M. J., Wu, J., & Blobel, G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology*, *140*, 499-509.
- Maxwell, E. S., & Fournir, M. J. (1995). The small nucleolar RNAs. *Annual Review of Biochemistry*, *35*, 897-934.
- Mayordomo, I., & Sanz, P. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 protein Bmh2 is required for regulation of the phosphorylation status of Fin1, a novel intermediate filament protein. *Biochemical Journal*, *365(Pt1)*, 51-56.
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B., *et al.* (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Molecular and Cellular Biology*, *15*, 5671-5681.
- McBride, H. J., Yu, Y., & Stillman, D. J. (1999). Distinct regions of the Swi5 and Ace2 transcription factors are required for specific gene activation. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*, 21029-21036.
- Melchior, F., Paschal, B., Evans, J., & Gerace, L. (1993). Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolysable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *The Journal of Cell Biology*, *123*, 1649-1659.

- Merkle, T., Haizel, T., Harter, K., Dallmann, G., & Nagy, F. (1994). Phenotype of the fission yeast cell cycle regulatory mutant *pim1-46* is suppressed by a tobacco cDNA encoding a small, Ran-like GTP-binding protein. *The Plant Journal*, *6*, 555-565.
- Milburn, M. V., Tong, L., deVos A. M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., *et al.* (1990). Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science*, *247*, 939-954.
- Mitchell, P., Petfalsky, E., Shevchenko, A., Mann, M., & Tollervey, D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell*, *91*, 457-466.
- Moore, M. S., & Blobel, G. (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, *365*, 661-663.
- Murphy, G. A., Moore, M. S., Drivas, G., Pérez de la Ossa, P., Villamarin, A., D'Eustachio, P., *et al.* (1997). A T42A Ran mutation : Differential interactions with effectors and regulators, and defect in nuclear protein import. *Molecular Biology of the Cell*, *8*, 2591-2604.
- Nachury, M. V., Maresca, T. J., Salmon, W. C., Waterman-Storer, C. M., Heald, R., & Weis, K. (2001). Importin β is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell*, *104*, 95-106.
- Naik, R. R., & Jones, E. W. (1998). The *PBN1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* : an essential gene that is required for the post-translational processing of the protease B precursor. *Genetics*, *149*, 1277-1292.
- Nakamura, M., Masuda, H., Horii, J., Kuma, K., Yokoyama, N., Ohba, T., *et al.* (1998). When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *The Journal of Cell Biology*, *143*, 1041-1052.
- Nakashima, N., Hayashi, N., Noguchi, E., & Nishimoto, T. (1996). Putative GTPase Gtr1p genetically interacts with the RanGTPase cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, *109*, 2311-2318.
- Nakashima, N., Noguchi, E., & Nishimoto, T. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* putative G protein, Gtr1p, which forms complexes with itself and a novel protein designated as Gtr2p, negatively regulates the Ran/Gsp1p G protein cycle through Gtr2p. *Genetics*, *152*, 853-867.

- Nakielny, S., & Dreyfuss, G. (1999). Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell*, *99*, 677-690.
- Nasr, F., Bécam, A. M., & Herbert, C. J. (1996). The sequence of 36.8 kb from the left arm of chromosome XIV reveals 24 complete open reading frames: 18 correspond to new genes, one of which encodes a protein similar to the human myotonic dystrophy kinase. *Yeast*, *12*, 169-175.
- Nehrbass, U., & Blobel, G. (1996). Role of the nuclear transport factor p10 in nuclear import. *Science*, *272*, 120-122.
- Nemergut, M. E., Mizzen, C. A., Stukenberg, T., Allis, C. D., & Macara, I. G. (2001). Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science*, *292*, 1540-1543.
- Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L. I., & Rosbash, M. (1997). The importin- β family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Current Biology*, *7*, 767-775.
- Nigg, E. A. (1997). Nucleocytoplasmic transport : signals, mechanisms and regulation. *Nature*, *386*, 779-787.
- Nikawa, J., Sass, P., & Wigler, M. (1987). Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *7*, 3629-3636.
- Nishijima, H., Nishitani, H. Seki, T., & Nishimoto, T. (1997). A dual-specificity phosphatase Cdc25B is an unstable protein and triggers p34^{cdc2}/cyclin B activation in hamster BHK21 cells arrested with hydroxyurea. *The Journal of Cell Biology*, *138*, 1105-1116.
- Nishimoto, T. (2000). Upstream and downstream of Ran GTPase. *Journal of Biological Chemistry*, *381*, 397-405.
- Nishimoto, T., & Basilico, C. (1978a). Analysis of a method for selecting temperature-sensitive mutants of BHK cells. *Somatic Cell Genetics*, *4*, 323-340.
- Nishimoto, T., Eilen, E., & Basilico, C. (1978b). Premature chromosome condensation in a ts DNA-mutant of BHK cells. *Cell*, *15*, 475-483.
- Nishimoto, T., Sekiguchi, T., Kai, R., Yamashita, K., Takahashi, T., & Sekiguchi, M. (1982). Large-scale selection and analysis of temperature-sensitive mutants for cell reproduction from BHK cells. *Somatic Cell Genetics*, *8*, 811-824.

- Nishitani, H., Ohtsubo, M., Yamashita, K., Iida, H., Pines, J., Yasuda, H., *et al.* (1991). Loss of RCC1, a nuclear DNA-binding protein, uncouples the completion of DNA replication from the activation of cdc2 protein kinase and mitosis. *EMBO Journal*, *10*, 1555-1564.
- Noguchi, E., Hayashi, N., Azuma, Y., Seki, T., Nakamura, M., Nakashima, N., *et al.* (1996). Dis3, implicated in mitotic control, binds directly to Ran and enhances the GEF activity of RCC1. *EMBO Journal*, *15*, 5595-5605.
- Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., *et al.* (1995). A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, *14*, 5931-5938.
- Nunnari, J., Fox, T. D., & Walter, P. (1993). A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science*, *262*, 1997-2004.
- O'Conallain, C., Doolin, M. T., Taggart, C., Thornton, F., & Butler, G. (1999). Regulated nuclear localisation of the yeast transcription factor Ace2p controls expression of chitinase (*CTS1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*, *262*, 275-282.
- Ohba, T., Nakamura, M., Nishitani H., & Nishimoto, T. (1999). Self-organization of microtubule asters induced in *Xenopus* egg extracts by GTP-bound Ran. *Science*, *284*, 1356-1358.
- Ohtsubo, M., Okazaki, H., & Nishimoto, T. (1989). The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation, locates in the nucleus and binds DNA. *The Journal of Cell Biology*, *109*, 1389-1397.
- Oki, M., & Nishimoto, T. (1998). A protein required for nuclear-protein import, Mog1p, directly interacts with GTP-Gsp1p, the *Saccharomyces cerevisiae* Ran homologue. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *95*, 15388-15399.
- Oki, M., & Nishimoto, T. (2000). Yrb1p interaction with the Gsp1p C terminus blocks Mog1p stimulation of GTP release from Gsp1p. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*, 32894-32900.
- Oki, M., Noguchi, E., Hayashi, N., & Nishimoto, T. (1998). Nuclear protein import, but not mRNA export, is defective in all *Saccharomyces cerevisiae* mutants that produce temperature-sensitive forms of the Ran GTPase homologue Gsp1p. *Molecular and General Genetics*, *257*, 624-634.

- Oliver, B. G., Panepinto, J. C., Askew, D. S., & Rhodes, J. C. (2002). cAMP alteration of growth rate of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* is carbon-source dependent. *Microbiology*, *148*, 2627-2633.
- Oliver, S. G., van der Aart, Q. J., Agostoni-Carbone, M. L., Aigle, M., Alberghina, L., Alexandraki, D., *et al.* (1992). The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature*, *357*, 38-46.
- Ouspenski, I. I. (1998). A RanBP1 mutation which does not visibly affect nuclear import may reveal additional functions of the ran GTPase system. *Experimental Cell Research*, *244*, 171-183.
- Ouspenski, I. I., Mueller, U. W., Matynia, A., Sazer, S., Elledge, S. J., & Brinkley, B. R. (1995). Ran-binding protein-1 is an essential component of the Ran/RCC1 molecular switch system in budding yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*, 1975-1978.
- Paschal, B. M., Delphin, C., & Gerace, L. (1996). Nucleotide-specific interaction of Ran/TC4 with nuclear transport factors NTF2 and p97. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *93*, 7679-7683.
- Paschal, B. M., Fritze, C., Guan, T., & Gerace, L. (1997). High levels of the GTPase Ran/TC4 relieve the requirement for nuclear protein transport factor 2. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*, 21534-21539.
- Paschal, B. M., & Gerace, L. (1995). Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore protein p62. *The Journal of Cell Biology*, *129*, 925-937.
- Peifer, M., Berg, S., & Reynolds, A. B. (1994). A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell*, *76*, 789-791.
- Pemberton, L. F., Rosenblum, J.S., & Blobel, G. (1997). A distinct and parallel pathway for the nuclear import of an mRNA-binding protein. *The Journal of Cell Biology*, *139*, 1645-1653.
- Percipalle, P., Clarkson, W. D., Kent, H. M., Rhodes, D., & Stewart, M. (1997). Molecular interactions between the importin alpha/beta heterodimer and proteins involved in vertebrate nuclear protein import. *Journal of Molecular Biology*, *266*, 722-732.
- Pratje, E., & Guiard, B. (1986). One nuclear gene controls the removal of transient pre-sequences from two yeast proteins: one encoded by the nuclear the other by the mitochondrial genome. *The EMBO Journal*, *5*, 1313-1317.

- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., *et al.* (2001). The tandem affinity purification (TAP) method : a general procedure of protein complex purification. *Methods*, *24*, 218-229.
- Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., *et al.* (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science*, *12*, 279-281.
- Quimby, B. B., Lamitina, T., L'Hernault, S. W., & Corbett, A. H. (2000). The mechanism of Ran import into the nucleus by nuclear transport factor 2. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*, 28575-28582.
- Quimby, B. B., & Dasso, M. (2003). The small GTPase Ran: interpreting the signs. *Current Opinion in Cell Biology*, *15*, 338-344.
- Racki, W. J., Bécam, A. M., Nasr, F., & Herbert, C. J. (2000). Cbk1p, a protein similar to the human myotonic dystrophy kinase, is essential for normal morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, *19*, 4524-4532.
- Reinders, A., Burckert, N., Boller, T., Wiemken, A., & De Virgilio, C. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes & Development*, *12*, 2943-2955.
- Rexach, M., & Blobel, G. (1995). Protein import into the nucleus: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell*, *83*, 683-692.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M., & Görlich, D. (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran. *The EMBO Journal*, *17*, 6587-6598.
- Richards, S. A., Lounsbury, K. M., & Macara, I. G. (1995). The C terminus of the nuclear RAN/TC4 GTPase stabilizes the GDP-bound state and mediates interactions with RCC1, RAN-GAP, and HTF9A/RANBP1. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*, 14405-14411.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., & Séraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology*, *17*, 1030-1032.
- Rolland, F., De Winde, J. H., Lemaire, K., Boles, E., Thevelein, J. M., & Winderickx, J. (2000). Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Molecular Microbiology*, *38*, 348-358.

- Roman, H. (1956). Studies of gene mutation in *Saccharomyces*. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 21, 175-185.
- Rothstein, R. (1991). Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods in Enzymology*, 194, 281-301.
- Rout, M. P., Blobel, G., & Aitchison, J. D. (1997). A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell*, 89, 715-725.
- Ryan, K. J., McCaffery, J. M., & Wentz, S. R. (2003). The Ran GTPase cycle is required for yeast nuclear pore complex assembly. *The Journal of Cell Biology*, 160, 1041-1053.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^e éd.). New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sass, P., Field, J., Nikawa, J., Toda, T., & Wigler, M. (1986). Cloning and characterization of the high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 83, 9303-9307.
- Sazer, S., & Dasso, M. (2000). The Ran decathlon: multiple roles of Ran. *Journal of Cell Science*, 113, 1111-1118.
- Scheffzek, K., Klebe, C., Fritz-Wolf, K., Kabsch, W., & Wittinghofer, A. (1995). Crystal structure of the nuclear Ras-related protein Ran in its GDP-bound form. *Nature*, 374, 378-381.
- Schimmang, T., Tollervey, D., Kern, H., Frank, R., & Hurt, E. C. (1989). A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *The EMBO Journal*, 8, 4015-4024.
- Schlenstedt, G., Saavedra, C., Loeb, J. D., Cole, C. N., & Silver, P. A. (1995a). The GTP-bound form of the yeast Ran/TC4 homologue blocks nuclear protein import and appearance of poly(A)⁺ RNA in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92, 225-229.
- Schlenstedt, G., Smirnova, E., Deane, R., Solsbacher, J., Kutay, U., Görlich, D., et al. (1997). Yrb4p, a yeast Ran-GTP-binding protein involved in import of ribosomal protein L25 into the nucleus. *The EMBO Journal*, 16, 6237-6249.
- Schlenstedt, G., Wong, D. H., Koepf, D. M., & Silver, P. A. (1995b). Mutants in a yeast Ran binding protein are defective in nuclear transport. *The EMBO Journal*, 14, 5367-5378.

- Schneider, A., Behrens, M., Scherer, P., Pratje, E., Michaelis, G., & Schatz, G. (1991). Inner membrane protease I, an enzyme mediating intramitochondrial protein sorting in yeast. *The EMBO Journal*, *10*, 247-254.
- Schneider, A., Oppliger, W., & Jenö, P. (1994). Purified inner membrane protease I of yeast mitochondria is a heterodimer. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*, 8635-8638.
- Scott, J. K., & Smith, G. P. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, *249*, 386-390.
- Seewald, M. J., Körner, C., Wittinghofer, A., & Vetter, I. R. (2002). RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature*, *415*, 662-666.
- Seki, T., Hayashi, N., & Nishimoto, T. (1996). RCC1 in the Ran pathway. *The Journal of Biochemistry*, *120*, 207-214.
- Seki, T., Yamashita, K., Nishitani, H., Takagi, T., Russell, P., & Nishimoto, T. (1992). Chromosome condensation caused by loss of RCC1 function requires the cdc25C protein that is located in the cytoplasm. *Molecular Biology of the Cell*, *3*, 1373-1388.
- Sekiguchi, T., Hirose, E., Nakashima, N., Ii, M., & Nishimoto, T. (2001). Novel G proteins, RagC and RagD, interact with GTP-binding proteins, RagA and RagB. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*, 7246-7257.
- Sekiya-Kawasaki, M., Abe, M., Saka, A., Watanabe, D., Kono, K., Minemura-Asakawa, M. *et al.* (2002). Dissection of upstream regulatory components of the Rho1p effector, 1,3- β -glucan synthase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *162*, 663-676.
- Senger, B., Simos, G., Bischoff, F. R., Podtelejnikov, A., Mann, M., & Hurt, E. C. (1998). Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA binding protein Npl3p. *The EMBO Journal*, *17*, 2196-2207.
- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *122*, 19-27.
- Singer, M. S., & Gottschling, D. E. (1994). *TLC1*: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science*, *266*, 404-409.
- Smith, A., Brownawell, A., & Macara, I. G. (1998a). Nuclear import of ran is mediated by the transport factor NTF2. *Current Biology*, *8*, 1403-1406.

- Smith, A., Ward, M. P., & Garrett, S. (1998b). Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *The EMBO Journal*, *17*, 3556-3564.
- Solsbacher, J., Maurer, P., Bischoff, F. R., & Schlenstedt, G. (1998). Cse1p is involved in export of yeast importin α from the nucleus. *Molecular and Cellular Biology*, *18*, 6805-6815.
- Solsbacher, J., Maurer, P., Vogel, F., & Schlenstedt, G. (2000). Nup2p, a yeast nucleoporin, functions in bidirectional transport of importin α . *Molecular and Cellular Biology*, *20*, 8468-8479.
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C., & Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell*, *90*, 1041-1050.
- Stateva, L. I., Oliver, S. G., Trueman, L. J., & Venkov, P. V. (1991). Cloning and characterisation of a gene which determines osmotic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *11*, 4235-4243.
- Steggerda, S. M., & Paschal, B. M. (2000). The mammalian Mog1p protein is a guanine nucleotide release factor for Ran. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*, 23175-23180.
- Stewart, M., & Baker, R. P. (2000). 1.9 Å resolution crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* Ran-binding protein Mog1p. *Journal of Molecular Biology*, *299*, 213-223.
- Stochaj, U., Hejazi, M., & Belhumeur, P. (1998). The small GTPase Gsp1p binds to the repeat domain of the nucleoporin Nsp1p. *Biochemical Journal*, *330(Pt1)*, 421-427.
- Stochaj, U., Rassadi, R., & Chiu, J. (2000). Stress-mediated inhibition of the classical nuclear protein import pathway and nuclear accumulation of the small GTPase Gsp1p. *The FASEB Journal*, *14*, 2130-2132.
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B., & Aebi, U. (1999). The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, *11*, 391-401.
- Stratford, M. (1994). Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. *Yeast*, *10*, 1741-1752.
- Suissa, M., Suda, K., & Schatz, G. (1984). Isolation of the nuclear yeast genes for citrate synthase and fifteen other mitochondrial proteins by a new screening method. *The EMBO Journal*, *3*, 1773-1781.

- Suzuki, N., Noguchi, E., Nakashima, N., Oki, M., Ohba, T., Tartakoff, A., *et al.* (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* small GTPase, Gsp1p/Ran, is involved in 3' processing of 7S-to-5.8S rRNA and in degradation of the excised 5'-A0 fragment of 35S pre-rRNA, both of which are carried out by the exosome. *Genetics*, *158*, 613-625.
- Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A., & Kawata, M. (1992). Small GTP-binding proteins. *International Review of Cytology*, *133*, 187-230.
- Takai, Y., Sasaki, T., & Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews*, *81*, 153-208.
- Thevelein, J. M. (1994). Signal transduction in yeast. *Yeast*, *10*, 1753-1790.
- Thevelein, J. M., & de Winde, J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, *33*, 904-918.
- Thomas, B. J., & Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, *56*, 619-630.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., & Wigler, M. (1988). *SCH9*, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein distinct from, but functionally and structurally related to, cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits. *Genes & Development*, *2*, 517-527.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J. D., McMullen, B., *et al.* (1987a). Cloning and characterization of *BCY1*, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *7*, 1371-1377.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., & Wigler, M. (1987b). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell*, *50*, 277-287.
- Tomlin, G. C., Hamilton, G. E., Gardner, D. C., Walmsley, R. M., Stateva, L. I., & Oliver, S. G. (2000). Suppression of sorbitol dependence in a strain bearing a mutation in the *SRB1/PSA1/VIG9* gene encoding GDP-mannose pyrophosphorylase by *PDE2* overexpression suggests a role for the Ras/cAMP signal-transduction pathway in the control of yeast cell wall biogenesis. *Microbiology*, *146*, 2133-2146.
- Tong, A. H., Evangelista, M., Parsons, A. B., Xu, H., Bader, G. D., Page, N., *et al.* (2001). Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science*, *294*, 2364-2368.

- Tu, J., & Carlson, M. (1995). *REG1* binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, *14*, 5939-5946.
- Tung, K. S., & Hopper, A. K. (1995). The glucose repression and Ras-cAMP signal transduction pathways of *Saccharomyces cerevisiae* each affect RNA processing and the synthesis of a reporter protein. *Molecular and General Genetics*, *247*, 48-54.
- Tung, K. S., Norbeck, L. L., Nolan, S. L., Atkinson, N. S., & Hopper, A. K. (1992). *SRN1*, a yeast gene involved in RNA processing, is identical to *HEX2/REG1*, a negative regulator in glucose repression. *Molecular and Cellular Biology*, *12*, 2673-2680.
- Uchida, S., Sekiguchi, T., Nishitani, H., Miyauchi, K., Ohtsubo, M., & Nishimoto, T. (1990). Premature chromosome condensation is induced by a point mutation in the hamster RCC1 gene. *Molecular and Cellular Biology*, *10*, 577-584.
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A., & Sander, C. (1991). The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry*, *30*, 4637-4648.
- van Hoof, A., & Parker, R. (1999). The exosome: a proteasome for RNA. *Cell*, *99*, 347-350.
- Vegvar, H. E. N., & Dahlberg, J. (1990). Nucleocytoplasmic transport and processing of small nuclear RNA precursors. *Molecular and Cellular Biology*, *10*, 3365-3375.
- Versele, M., de Winde, J. H., & Thevelein, J. M. (1999). A novel regulator of G protein signalling in yeast, Rgs2, downregulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2. *The EMBO Journal*, *18*, 5577-5591.
- Versele, M., & Thevelein, J. M. (2001). Lre1 affects chitinase expression, trehalose accumulation and heat resistance through inhibition of the Cbk1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, *41*, 1311-1326.
- Vetter, I. R., Arndt, A., Kutay, U., Görlich, D., & Wittinghofer, A. (1999a). Structural view of the Ran-importin β interaction at 2.3 Å resolution. *Cell*, *97*, 635-646.
- Vetter, I. R., Nowak, C., Nishimoto, T., Kuhlmann, J., & Wittinghofer, A. (1999b). Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport. *Nature*, *398*, 39-46.

- Vongsamphanh, R., Fortier, P. K., & Ramotar, D. (2001). Pir1p mediates translocation of the yeast Apn1p endonuclease into the mitochondria to maintain genomic stability. *Molecular and Cellular Biology*, *21*, 1647-1655.
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C., & Philippsen, P. (1997). Heterologous *HIS3* marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *13*, 1065-1075.
- Waldemar, J. R., Bécam, A. M., Nasr, F., & Herbert, C. J. (2000). Cbk1p, a protein similar to the human myotonic dystrophy kinase, is essential for normal morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, *19*, 4524-4532.
- Weis, K., Ryder, U., & Lamond, A. I. (1996). The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import. *The EMBO Journal*, *15*, 1818-1825.
- Wiese, C., Wilde, A., Moore, M. S., Adam, S. A., Merdes, A., & Zheng, Y. (2001). Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science*, *291*, 653-656.
- Wilde, A., & Zheng, Y. (1999). Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science*, *284*, 1359-1362.
- Wolfe, K. H., & Shields, D. C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, *387*, 708-713.
- Wong, D. H., Corbett, A. H., Kent, H. M., Stewart, M., & Silver, P. A. (1997). Interaction between the small GTPase Ran/Gsp1p and Ntf2p is required for nuclear transport. *Molecular and Cellular Biology*, *17*, 3755-3767.
- Yamada, M., Tachibana, T., Imamoto, N., & Yoneda, Y. (1998). Nuclear transport factor p10/NTF2 functions as a Ran-GDP dissociation inhibitor (Ran-GDI). *Current Biology*, *8*, 1339-1342.
- Yang, Q., Rout, M. P., & Akey, C. W. (1998). Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex – functional and evolutionary implications. *Molecular Cell*, *1*, 223-234.
- Yano, R., Oakes, M. L., Tabb, M. M., & Nomura, M. (1994). Yeast Srp1p has homology to armadillo/plakoglobin/ β -catenin and participates in apparently multiple nuclear functions including the maintenance of the nucleolar structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *91*, 688.

- Yompakdee, C., Bun-Ya, M., Shikata, K., Ogawa, N., Harashima, S., & Oshima, Y. (1996). A putative new membrane protein, Pho86p, in the inorganic phosphate uptake system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, *171*, 41-47.
- Yoneda, Y. (1997). How proteins are transported from cytoplasm to the nucleus. *The Journal of Biochemistry*, *121*, 811-817.
- Yu, Y. T., Scharl, E. C., Smith, C. M., & Steitz, J. A. (1999). The growing world of small nuclear ribonucleoproteins. Dans R. F. Gesteland, T. R. Cech, & J. F. Atkins (Éds), *The RNA World*, (2^e éd.) (pp. 487-524). New York, Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Zhang, C., & Clarke, P. R. (2000). Chromatin-independent nuclear envelope assembly induced by Ran GTPase in *Xenopus* egg extracts. *Science*, *288*, 1429-1432.
- Zhang, C., & Clarke, P. R. (2001). Roles of Ran-GTP and Ran-GDP in precursor vesicle recruitment and fusion during nuclear envelope assembly in a human cell-free system. *Current Biology*, *11*, 208-212.
- Zhang, C., Hutchins, J. R., Muhlhauser, P., Kutay, U., & Clarke, P. R. (2002). Role of importin-beta in the control of nuclear envelope assembly by Ran. *Current Biology*, *12*, 498-502.