

Université de Montréal

**Création de mutants *cdc5* en vue de l'identification des substrats de PLK/Cdc5 lors  
de la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN**

par

Amani Daoud

Programme de Biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention de grade de maîtrise (M.Sc.)  
en Biologie moléculaire

Février 2016

© Amani Daoud

## Résumé

Les kinases de la famille Polo (PLK) jouent un rôle majeur durant le cycle cellulaire, notamment en promouvant des processus essentiels tels que l'entrée en phase M et la sortie du cycle cellulaire. Elles sont également impliquées dans plusieurs cancers et ont un fort pouvoir tumorigène. Notre laboratoire a récemment montré que Cdc5 (la kinase PLK chez *Saccharomyces cerevisiae*) est également nécessaire pour l'adaptation aux dommages à l'ADN, et que la cible critique de Cdc5 au cours de ce processus pourrait être une cible peu conventionnelle localisée aux centrosomes de levures. Dans le but d'identifier ce substrat, une analyse intégrale du phosphoprotéome de PLK/Cdc5 par spectrométrie de masse devra être réalisée. Pour ce faire, un allèle *CDC5* sensible à la température, c'est-à-dire une version mutante qui devient inactive à température élevée, devra être utilisée. Cet allèle devra être thermosensible à 30°C, afin de s'assurer qu'il sera le seul à être inactivé à cette température et que, par conséquent, seuls les substrats de Cdc5 seront identifiés. À cet effet, nous avons généré deux allèles *cdc5* thermosensibles à 30°C : *cdc5-17* et *cdc5-18*, puis analysé leur cycle cellulaire à 32°C. Les résultats de cette analyse ont montré que l'exposition des cellules à 32°C résulte en leur blocage en fin de mitose sous la forme bourgeonnée, témoignant d'un défaut dans la promotion de la sortie de la mitose. Ce défaut est causé par la mutation du gène *CDC5* dont la protéine favorise la sortie de la mitose via deux voies : la voie du MEN (*Mitotic Exit Network*) et la voie du FEAR (*Cdc Fourteen Early Anaphase Release*). *cdc5-17* et *cdc5-18* représentent des outils biologiques précieux qui permettront de mieux analyser le phosphoprotéome de PLK/Cdc5 et de mener à l'identification des cibles de Cdc5 lors de la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN. Étant donné que l'adaptation aux dommages à l'ADN causés par des chimiothérapies représente l'un des facteurs permettant la prolifération des tumeurs cancéreuses, cette découverte serait un grand pas dans la lutte contre le cancer.

**Mots clés :** division cellulaire, cancer, kinase polo, PLK, mitose, stabilité du génome.

## Abstract

Polo-like kinases (PLK) play a crucial role during the cell cycle, especially in promoting essential processes such as M phase entry and mitotic exit. They are also involved in many cancers and are highly tumorigenic. Recently, our laboratory showed that Cdc5 (*i.e.*, the Polo-kinase of *Saccharomyces cerevisiae*) was required for the adaptation response to DNA damage, and that the target of Cdc5 during this process would localize to the yeast centrosomes and might be a less conventional substrate. In order to identify it, an *in vivo* analysis of the whole phosphoproteome of PLK/Cdc5 by mass spectrometry has to be done. Accordingly, a thermosensitive allele of *CDC5*, *i.e.* a mutant version that can be inactivated at high temperature, has to be used. This allele has to be thermosensitive at 30°C, in order to make sure that only *cdc5* will be inactivated and that only its substrates will be identified. For this purpose, we created two *cdc5* alleles that were thermosensitive at 30°C: *cdc5-17* and *cdc5-18*, and then we analyzed their cell cycle at 32°C. The results of this analysis showed that cells exposure to 32°C resulted in their arrest at the end of the cell cycle as large-budded cells, which points towards a defect in the promotion of mitosis exit. This defect is due to the mutation of *CDC5* whose protein allows the exit from mitosis via two pathways: the MEN pathway (*Mitotic Exit Network*) and the FEAR pathway (*Cdc Fourteen Early Anaphase Release*). *cdc5-17* and *cdc5-18* represent precious biological tools that will allow us to analyze PLK/Cdc5 phosphoproteome and to identify Cdc5 targets during the adaptation response to DNA damage. Since the adaptation to DNA damage caused by chemotherapeutic agents is considered one of the factors promoting cancer tumors proliferation, this discovery will be a huge step in the fight against cancer.

**Key words :** cell division, cancer, Polo-kinase, PLK, mitosis, genome stability.

## Tables des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Tables des matières.....	iii
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles et des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xvi
Introduction.....	1
I.    Aperçu du cycle cellulaire chez les eucaryotes.....	1
II.   Les kinases de la famille Polo (PLK) : des régulateurs aux multiples facettes.....	2
1.   Découverte des PLK.....	2
2.   PLK : structure, évolution et conservation.....	2
3.   Régulation spatiotemporelle de l'activité des PLK.....	6
3.1.  Régulation temporelle de la kinase Polo.....	6
3.1.1.  Régulation de l'expression de <i>PLK</i> .....	6
3.1.2.  Régulation de la phosphorylation de PLK.....	6
3.1.3.  Régulation de la dégradation de PLK.....	7
3.2.  Régulation spatiale de la kinase Polo.....	7
4.   Rôles de PLK1 et de Cdc5 en mitose.....	8
4.1.  Promotion de l'entrée en mitose.....	8
4.2.  Importance des PLK dans la régulation des centres d'organisation des microtubules (MTOC).....	10
4.3.  Implication de PLK dans la ségrégation des deux chromatides sœurs ...	11
4.4.  Régulation de la condensation des chromosomes et protection de l'intégrité génomique.....	14

4.5.	Promotion de la sortie du cycle cellulaire .....	15
4.6.	Promotion de la cytotcinèse .....	19
5.	Rôles de PLK lors d'un dommage à l'ADN.....	19
5.1.	PLK1 est impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN et promeut la transition G2/M après complétion de la réparation.....	20
5.2.	PLK est essentielle pour la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN 21	
5.2.1.	Le PBD de Cdc5 localise a kinase aux SPB pour promouvoir son interaction avec son substrat lors de la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN 22	
III.	Objectif du projet de recherche .....	22
IV.	Hypothèse de recherche .....	23
V.	Approche expérimentale .....	24
	Matériel et méthodes.....	25
I.	Souches de levure .....	25
II.	Conditions de culture cellulaire et conservation des souches.....	25
1.	Conditions de culture cellulaire.....	25
2.	Conservation des souches.....	25
III.	Recettes des milieux de culture et des solutions utilisées .....	26
IV.	Criblage des souches de la collection.....	26
V.	Génération des mutants et criblage génétique .....	27
1.	Génération des mutants .....	27
1.1.	Extraction de l'ADN génomique de levure .....	27
1.2.	PCR mutagène dirigée .....	27
1.3.	Transformation de levure : méthode du LiAc/ <i>salmon sperm</i> -DNA/PEG... 28	
2.	Criblage génétique.....	29

2.1.	Séquençage .....	31
2.2.	Rétrocroisement .....	31
2.2.1.	Croisement des souches et sélection des diploïdes.....	32
2.2.2.	Sporulation.....	33
2.2.3.	Dissection .....	33
2.3.	Test de complémentation de l'allèle <i>cdc5</i> avec l'allèle sauvage <i>CDC5</i> .....	35
VI.	Caractérisation du cycle cellulaire .....	36
1.	Synchronisation cellulaire : blocage au facteur $\alpha$ .....	36
2.	Microscopie à contraste interférentiel (DIC) .....	37
3.	Immunofluorescence (IF).....	37
4.	Cytométrie en flux.....	38
	Résultats.....	39
1.	Création de <i>cdc5-17</i> et <i>cdc5-18</i> , deux allèles thermosensibles à 30°C.....	41
2.	Blocage des cellules de <i>cdc5-17</i> et <i>cdc5-18</i> en fin de mitose en tant que cellules bourgeonnées avec un gros bourgeon .....	45
3.	Arrêt cellulaire uniforme en fin de mitose (en anaphase).....	46
	Discussion.....	51
1.	La mutation du résidu 170 et de ses résidus adjacents résulte en un phénotype de thermosensibilité à une température de 30°C.....	52
2.	Identification de <i>cdc5-17</i> , un mutant de l'IDL, et de <i>cdc5-18</i> un mutant du domaine kinase comme étant thermosensibles à 30°C.....	53
3.	<i>cdc5-17</i> et <i>cdc5-18</i> restent actifs sur le plan métabolique après exposition à température non-permissive .....	56
4.	Les différences entre <i>cdc5-17</i> et <i>cdc5-18</i> concernant la grosseur de leurs cellules et l'homogénéité de leurs populations peuvent être dues à la localisation de leurs mutations .....	56

5. Le blocage des cellules de <i>cdc5-17</i> et de <i>cdc5-18</i> en anaphase à température non-permissive est dû à un défaut dans la promotion de la sortie de la mitose.....	57
6. Importance de l'étude des kinases de la famille Polo et impact de la création des allèles <i>cdc5-17</i> et de <i>cdc5-18</i> sur l'avancement de la science .....	58
Conclusion et perspectives.....	60
Bibliographie.....	xvii
Annexe .....	xxxiii

## Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique et structure quaternaire de PLK1 .....	3
Figure 2. Les différents domaines des PLK chez l'Homme .....	4
Figure 3. Les membres de la famille PLK chez les différents organismes.....	5
Figure 4. PLK1 promeut l'entrée en mitose chez les mammifères.....	9
Figure 5. Cdc5 promeut l'entrée en mitose chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . .....	9
Figure 6. PLK permet la séparation des deux chromatides sœurs.....	13
Figure 7. Cdc5 promeut la séparation des deux chromatides sœurs.....	14
Figure 8. Cdc5 régule la voie de sortie du cycle cellulaire (MEN) chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	18
Figure 9. Représentation schématique de la technique de la quintuple dilution en série.	26
Figure 10. Représentation schématique du processus de criblage génétique pour l'identification de clones thermosensibles .....	30
Figure 11. Représentation schématique d'une plaque de dissection.....	34
Figure 12. Identification de <i>cdc5-L170P</i> comme étant un allèle thermosensible à 32°C.	40
Figure 13. Identification de <i>cdc5-17</i> et <i>cdc5-18</i> comme étant des allèles <i>CDC5</i> thermosensibles à 30°C.....	41
Figure 14. Confirmation du phénotype de thermosensibilité de <i>cdc5-17</i> et de <i>cdc5-18</i> après chaque rétrocroisement avec la souche sauvage .....	43
Figure 15. Test de complémentation de <i>cdc5-17</i> et <i>cdc5-18</i> avec l'allèle <i>CDC5</i> .....	44
Figure 16. Analyse du cycle cellulaire de <i>cdc5-17</i> .....	47
Figure 17. Analyse du cycle cellulaire de <i>cdc5-18</i> .....	49
Figure 18. Schéma explicatif de la façon dont <i>cdc5-17</i> a été généré.....	54

## Liste des sigles et des abréviations

<b>Sigle ou abréviation</b>	<b>Signification</b>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNg	ADN génomique
APC	Complexe de promotion de l'anaphase ( <i>Anaphase-promoting complex</i> )
ATM	Protéine d'ataxie télangiectasie mutée ( <i>ataxia telangiectasia mutated</i> )
ATR	Protéine reliée à l'ataxie télangiectasie et Rad3 ( <i>ataxia telangiectasia and Rad3- related protein</i> )
BORA	Protéine Aurora Borealis (activateur de la kinase Aurora A)
Bm1	Homologue de Barren 1 ( <i>Barren homolog 1</i> )
BSA	Albumine de sérum bovin ( <i>Bovine serum albumine</i> )
BUB1	Bourgeonnement non-inhibé par Benzimidazole 1 ( <i>Budding Uninhibited by Benzimidazole 1</i> )
Bub2	Bourgeonnement non-inhibé par Benzimidazole 2 ( <i>Budding Uninhibited by Benzimidazole 2</i> )
CAP-D3	Protéine associée aux chromosomes D3 ( <i>Chromosome-associated protein D3</i> )
Cdc5	Cycle de la division cellulaire 5 ( <i>Cell division cycle 5</i> )
Cdc14	Cycle de la division cellulaire 14 ( <i>Cell division cycle 14</i> )

Cdc15	Cycle de la division cellulaire 15 ( <i>Cell division cycle 15</i> )
Cdc20	Cycle de la division cellulaire 20 ( <i>Cell division cycle 20</i> )
Cdc28	Cycle de la division cellulaire 28 ( <i>Cell division cycle 28</i> )
CDE	Élément dépendant du cycle cellulaire ( <i>Cell cycle-dependent element</i> )
Cdh1	Homologue de Cdc20 1 ( <i>Cdc20 homolog 1</i> )
CDK1	Kinase cycline-dépendante 1 ( <i>Cyclin-dependent kinase 1</i> )
CHK2	Kinase du checkpoint 2 ( <i>Checkpoint kinase 2</i> )
CHR	Région homologue de gènes du cycle cellulaire ( <i>Cell cycle genes homology region</i> )
Clb2	Cycline B 2 ( <i>Cyclin B</i> )
C-terminale	Carboxy-terminale
D-box	Boîte de destruction ( <i>destruction-box</i> )
DIC	Microscopie à contraste interférentiel ( <i>Differential interference contrast microscopy</i> )
DMSO	Diméthylsulfoxyde ( <i>Dimethyl sulfoxide</i> )
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate ( <i>Deoxynucleoside triphosphate</i> )
D.O. <sub>600 nm</sub>	Densité optique à 600 nm
ECT2	Transformant de cellules épithéliales 2 ( <i>Epithelial cell transforming 2</i> )
EDTA	Éthylène diamine tétraacétique ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )

Esp1	Séparase ( <i>Extra spindle pole bodies 1</i> )
Emi1	Inhibiteur du début de la mitose 1 ( <i>Early mitotic inhibitor 1</i> )
FEAR	Libération en début de l'anaphase de Cdc14 ( <i>Cdc Fourteen Early Anaphase Release</i> )
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine ( <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )
FKH-TF	Facteur de transcription « <i>Forkhead</i> » ( <i>Forkhead transcription factor</i> )
Fob1	Protéine de blocage de la fourche de réplication 1 ( <i>Fork blocking less 1</i> )
GAP	Protéine activatrice de l'activité d'hydrolyse du GTP ( <i>GTPase activating protein</i> )
GEF	Facteur de l'échange de la guanine ( <i>Guanine nucleotide exchange-factor</i> )
GTP	Guanosine triphosphate
HCl	Chlorure d'hydrogène ( <i>Hydrogen chloride</i> )
IDL	Liaison inter-domaines ( <i>Inter-domain linker</i> )
IF	Immunofluorescence
INCENP	Protéine de l'intérieur du centromère ( <i>Centromere inner protein</i> )
KPO <sub>4</sub>	Phosphate de potassium ( <i>Potassium phosphate</i> )
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Phosphate de dipotassium ( <i>Potassium phosphate dibasic</i> )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphate de monopotassium ( <i>Monopotassium phosphate</i> )

LC/MS-MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse ( <i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i> )
LiAc	Acétate de lithium ( <i>lithium acetate</i> )
Lte1	Protéine essentielle à basse température ( <i>Low Temperature Essential</i> )
MEN	Voie de la sortie de la mitose ( <i>Mitotic Exit Network</i> )
Mih1	Homologue de l'inducteur de mitose 1 ( <i>Mitosis inducer homolog 1</i> )
MTOC	Centre d'organisation de microtubules ( <i>Microtubule-organizing center</i> )
MKLP2	Protéine de la famille des kinésines mitotiques 2 ( <i>Mitotic kinesin-like protein 2</i> )
MYT1	Facteur de transcription de la myéline 1 ( <i>Myelin transcription factor 1</i> )
NaCl	Chlorure de sodium ( <i>Sodium chloride</i> )
NaN <sub>3</sub>	Azoture de sodium ( <i>Sodium azide</i> )
Net1	Facteur d'établissement du silençage nucléolaire et régulateur de la télophase ( <i>Nucleolar silencing establishing factor and telophase regulator</i> )
N-terminale	Terminaison amine ( <i>amino-terminus</i> )
p21	Protéine 21 ( <i>protein 21</i> )
p53	Protéine 53 ( <i>protein 53</i> )
P53BP1	Protéine se liant à p53 1 ( <i>p53-binding protein 1</i> )
PAK1	Kinase activée par la protéine p21 1 ( <i>p21 protein-activated kinase 1</i> )
PB	Boîte Polo ( <i>Polo-box</i> )

PBD	Domaine boîte Polo ( <i>Polo-box domain</i> )
PBS	Tampon phosphate salin ( <i>Phosphate buffer saline</i> )
PCM	Matériel péricentriolaire ( <i>Pericentriolar material</i> )
PCNT	Péricentrine ( <i>Pericentrin</i> )
Pds1	Dissociation précoce des chromatides sœurs ( <i>Precocious dissociation of sisters</i> )
PEG	Polyéthylène glycol
Phase S	Phase de Synthèse ( <i>Phase of Synthesis</i> )
Phase M	Phase de la Mitose ( <i>Phase of Mitosis</i> )
PLK	Kinase de la famille Polo ( <i>Polo-like kinase</i> )
PP2A	Protéine phosphatase 2
PRC1	Protéine régulatrice de la cytotcinèse 1 ( <i>Protein regulator of cytokinesis 1</i> )
RAD51	Homologue de la protéine de réparation de l'ADN RAD51 1 ( <i>DNA Repair Protein Rad51 Homolog 1</i> )
Rb	Protéine du Rétinoblastome ( <i>Retinoblastoma protein</i> )
RhoA	Famille des gènes homologues de Ras, membre A ( <i>Ras homolog gene family, member A</i> )
SA2	Antigène stromal 2 ( <i>Stromal antigen 2</i> )
SAC	Point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique ( <i>Spindle assembly checkpoint</i> )
SCC1	Cohésion des chromatides sœurs 1 ( <i>Sister chromatids cohesion 1</i> )

SC-HIS	Milieu de culture complet synthétique sans histidine ( <i>Synthetic complete media without histidine</i> )
SC-TRP	Milieu de culture complet synthétique sans tryptophane ( <i>Synthetic complete media without tryptophane</i> )
SDS	Dodécylsulfate de sodium ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
Sic1	Sous-unité inhibitrice de la protéine kinase dépendante des cyclines 1 ( <i>Subunit inhibitor of cyclin-dependent protein kinase 1</i> )
Slk19	Kar3p Synthétique létale 19 ( <i>Synthetic lethal Kar3p 19</i> )
SPB	Centrosomes de levure ( <i>Spindle pole bodies</i> )
Spc72	Composante du pôle du fuseau 72 ( <i>Spindle pole component 72</i> )
SPO-plate	Plaque de sporulation ( <i>Sporulation plate</i> )
sssDNA	ADN simple-brin de sperme de saumon ( <i>Salmon sperm single-stranded DNA</i> )
Swe1	WEE1 de <i>Saccharomyces</i> ( <i>Saccharomyces WEE1</i> )
Swi5	Déficient en commutation 5 ( <i>Switching deficient 5</i> )
Tem1	Terminaison de la phase M ( <i>Termination of M phase</i> )
T-loop	Boucle-T
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
Tub4p	Protéine de la Tubuline 4 ( <i>Tubulin protein 4</i> )

URA	Uracile ( <i>Uracil</i> )
YEP	Extrait de levure, peptone ( <i>Yeast extract, peptone</i> )
YEPD	Extrait de levure, peptone, dextrose ( <i>Yeast extract, peptone, dextrose</i> )
Ycg1	Protéine associée aux chromosomes de levure G 1 ( <i>Yeast cap G 1</i> )
Ycs4	Sous-unité de la condensine de la levure 4 ( <i>Yeast condensin subunit 4</i> )
$\beta$ TrCP	Protéine $\beta$ -transductrice contenant des répétitions ( <i><math>\beta</math>-transducing repeat-containing protein</i> )
$\gamma$ -TuRC	Complexe de l'anneau de la tubuline- $\gamma$ ( <i><math>\gamma</math>-Tubulin Ring Complex</i> )

En la mémoire de mon père,  
mon modèle, mon idole et mon exemple dans la vie,  
pour son soutien inconditionnel...  
Son amour incommensurable...  
Ses continuels encouragements,  
et sa foi totale en moi.  
Que mon travail te fasse honneur, Père !  
Tel est mon souhait.

## Remerciements

Je tiens, avant tout, à remercier mon superviseur, Dr Damien D'Amours, de m'avoir confié un projet d'une telle envergure, et de m'avoir offert son assistance et son soutien tout au long de mes deux années d'étude. Je tiens également à exprimer tout mon amour et toute ma gratitude envers ma famille, pour m'avoir épaulée durant les moments difficiles et m'avoir soutenue jusqu'au bout, sans relâche. Leurs précieux conseils ainsi que leurs perpétuels encouragements ont été la source dont je puisais mes forces pour continuer d'avancer et ne jamais baisser les bras, peu importe les épreuves et les difficultés qui se trouvaient sur mon chemin. Je voudrais aussi remercier mes collègues de m'avoir guidée, du mieux qu'ils pouvaient, durant mes expériences de laboratoire et la planification de mon approche expérimentale. Je leur en suis très reconnaissante. Finalement, je remercie chaleureusement mes amis à l'Institut de recherche en immunologie et en oncologie (IRIC), pour leur soutien moral et leur précieuse aide durant la période qui a précédé et celle qui a suivi le décès de mon père. J'ai été extrêmement honorée de faire partie de la communauté de l'IRIC, un institut de recherche hors pair regroupant les meilleurs experts dans le domaine de la recherche sur le cancer. J'espère que j'ai pu, par mon projet, contribuer à l'avancement des connaissances en ajoutant mon propre petit caillou sur le très long et sinueux chemin menant à la victoire contre le cancer.

## **Introduction**

### **I. Aperçu du cycle cellulaire chez les eucaryotes**

Le cycle cellulaire est une série d'événements coordonnés qui permettent à la cellule mère de se diviser en deux cellules filles parfaitement identiques. Il est divisé en deux phases majeures : l'interphase et la mitose <sup>1</sup>. L'interphase est elle-même divisée en : G1 (Espace 1), caractérisée par une augmentation de l'activité métabolique de la cellule et de la croissance cellulaire, suivie de la phase S (Synthèse) durant laquelle le matériel génétique de la cellule est répliqué, puis finalement par la phase G2 (Espace 2) où la cellule continue à croître et à synthétiser toutes les protéines dont elle a besoin pour la division cellulaire <sup>2, 3</sup>. La mitose, également appelée phase M, est caractérisée par la séparation égale du matériel génétique de la cellule mère entre ces deux cellules filles, donnant ainsi naissance à deux cellules parfaitement identiques d'un point de vue génétique <sup>2</sup>.

Compte tenu de l'importance majeure du cycle cellulaire, il doit être finement contrôlé afin d'assurer le bon déroulement de la séquence d'événements. Les cyclines CDK ont été identifiées comme étant les principaux régulateurs du cycle cellulaire chez les eucaryotes. Pourtant, les recherches ont montré que les cyclines-CDK n'étaient pas seules à contrôler tous les événements du cycle cellulaire, et que le contrôle de la division était en réalité le fruit d'une étroite collaboration entre kinases et phosphatases <sup>4</sup>. Parmi ces collaborateurs figurent des régulateurs majeurs du cycle cellulaire : les kinases de la famille Polo (PLK) <sup>5</sup>.

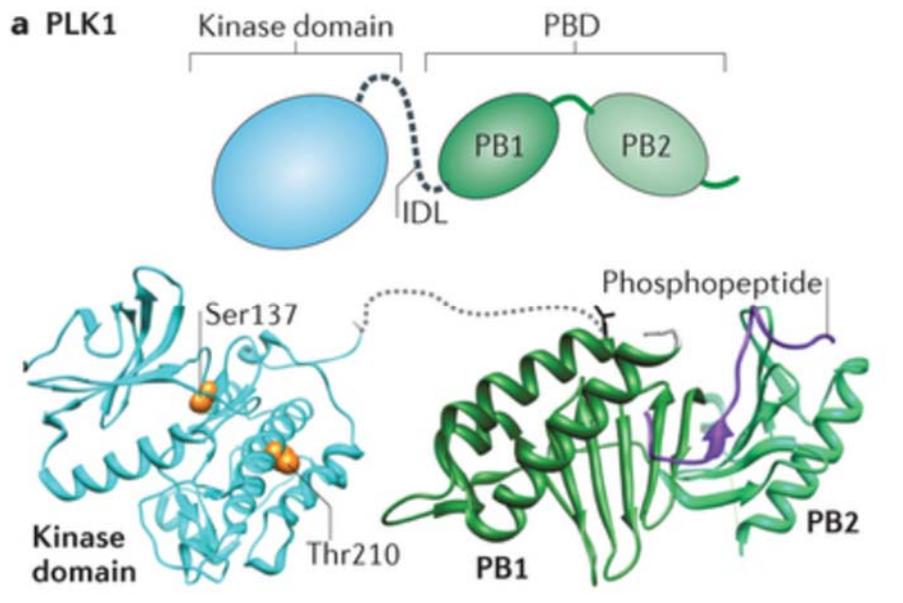
## II. Les kinases de la famille Polo (PLK) : des régulateurs aux multiples facettes

### 1. Découverte des PLK

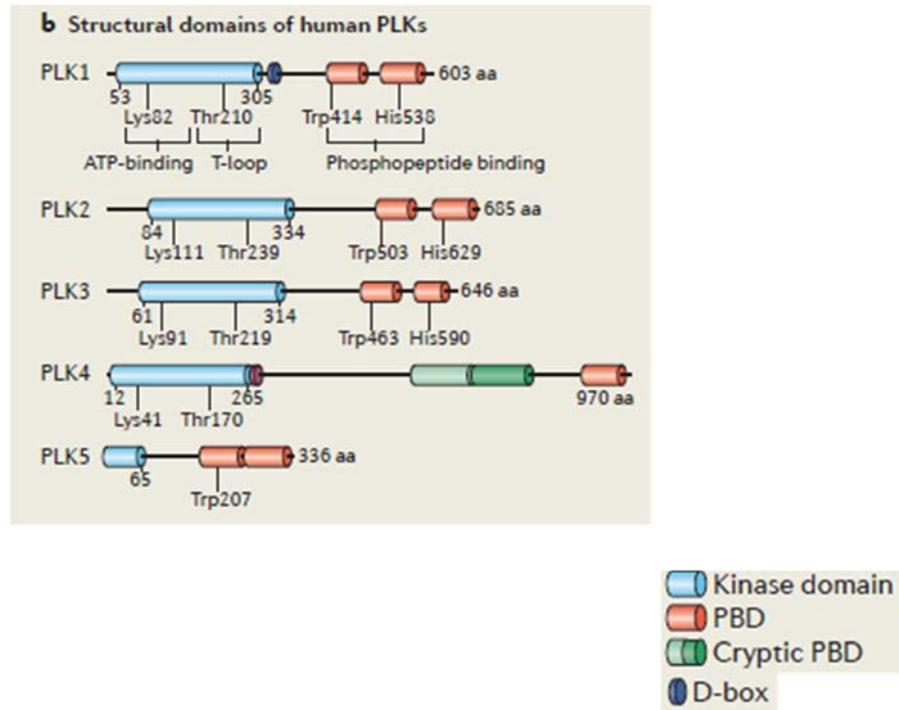
Il y a de cela vingt-sept ans, des expériences de criblage génétique réalisées chez la drosophile ont montré que la mutation du gène *polo* résultait en des fuseaux mitotiques anormaux <sup>6</sup>. Plus tard, d'autres études ont montré que le gène *polo* codait pour une kinase essentielle pour la régulation de la division cellulaire aussi bien en mitose qu'en méiose. Des études subséquentes ont montré que la kinase Polo était hautement conservée de la levure jusqu'à l'être humain <sup>7</sup>. Cinq kinases Polo ont été identifiées chez *Homo sapiens*: PLK1-5 <sup>8</sup>. Chez *Drosophila melanogaster*, les recherches ont montré l'existence de deux kinases Polo : Polo et PLK4. Les deux levures *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*, quant à elles, ont chacune une seule PLK : Plo1 et Cdc5 respectivement <sup>9,10</sup>.

### 2. PLK : structure, évolution et conservation

Les PLK sont caractérisées par la présence d'un domaine sérine/thréonine kinase dans leur partie N-terminale relié par une séquence de liaison inter-domaines (*Inter-domain linker*, abrégé en « IDL ») à un domaine boîte Polo (PBD) dans la partie C-terminale de la protéine <sup>11</sup>. Le domaine PBD de la majorité des PLK, incluant PLK1 et Cdc5, est constitué de deux boîtes Polo qui forment une poche capable de lier des motifs phosphorylés situés sur ses protéines cibles <sup>12, 13</sup> (**Figure 1**). PLK2 et PLK3 ont des domaines catalytiques similaires à ceux de PLK1 et possèdent également deux boîtes Polo dans leurs PBD respectifs <sup>14, 15</sup> (**Figure 2**). En revanche, la séquence du domaine catalytique de PLK4 diverge de celles des autres PLK et le PBD de PLK4 n'a qu'une seule boîte Polo <sup>16, 17</sup> (**Figure 2**). En ce qui concerne PLK5, c'est une kinase inactive qui n'a pas certains résidus essentiels à la reconnaissance de substrats dans sa boîte Polo <sup>8</sup>.

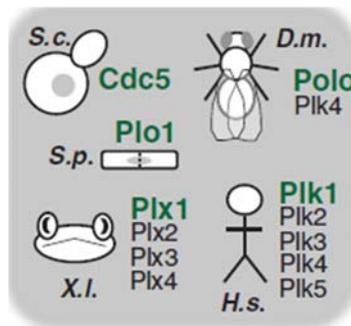


**Figure 1. Représentation schématique et structure quaternaire de PLK1** (reproduit de Zitouni, S., et al. 2014). La majorité des PLK ont des structures similaires à celle de PLK1, avec un domaine kinase en N-terminal et un domaine PBD en C-terminal, reliés par un lien inter-domaine (IDL). Chez PLK1, les résidus Ser137 et Thr210 (représentés en orange) sont conservés et sont importants pour l'activité kinase de la protéine. La poche formée par les deux boîtes Polo (PB1 et PB2) reconnaît les peptides phosphorylés sur leurs sérines et thréonines (représentés en violet) et dont la séquence consensus est Ser-[pSer/pThr]-[Pro/X], permettant ainsi la régulation de l'interaction de la kinase avec ses substrats et celle de sa localisation.



**Figure 2. Les différents domaines des PLK chez l'Homme** (reproduit de Zitouni, S., et al. 2014). PLK1, PLK2 et PLK3 partagent une architecture similaire avec un domaine kinase en N-terminal et un domaine PBD formé de deux boîtes Polo en C-terminal. PLK4 possède un domaine catalytique avec une séquence divergente de celles des autres PLK, un PBD cryptique qui lui est spécifique et un PBD composé d'une seule boîte Polo. PLK5 est une pseudo-kinase qui n'a pas certains résidus essentiels dans son PBD et qui sont essentiels pour la reconnaissance des substrats. Notez bien que la boîte de destruction (D-box) se trouvant entre les domaines kinases et PBD chez PLK1 est essentielle pour sa dégradation, mais qui n'est pas conservée dans PLK2, PLK3 et PLK5. PLK4 est dégradée grâce à l'autophosphorylation d'un domaine SBD (*SCF Slimb-binding domain*).

Les études qui ont porté sur l'évolution des PLK ont révélé que PLK1 était le membre ancestral des PLK et que les PLK2-5 étaient issues d'évènements de duplication<sup>16</sup>. Il se trouve également que tous les organismes ayant des PLK en possèdent une qui est hautement exprimée durant le cycle cellulaire et qui accomplit plusieurs fonctions essentielles pour le bon déroulement de la division de la cellule mère<sup>5, 18</sup>, notamment celles de l'assemblage du fuseau mitotique et de la cytokinèse<sup>18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25</sup>. Ces PLK sont PLK1 chez les mammifères, Polo chez *Drosophila melanogaster*, Plx1 chez *Xenopus laevis*, Plo1 chez *Schizosaccharomyces pombe* et Cdc5 chez *Saccharomyces cerevisiae*<sup>5</sup> (**Figure 3**). En ce qui concerne les autres PLK, le nombre de tâches que leur a léguées l'évolution semble limité à quelques fonctions : PLK4 et PLK2 (chez l'être humain) sont toutes deux impliquées dans la duplication des centrioles<sup>26, 27, 28</sup>, PLK3 est nécessaire pour la réplication de l'ADN<sup>29</sup> et PLK5 est essentielle lors du développement chez les mammifères<sup>30</sup>.



**Figure 3. Les membres de la famille PLK chez les différents organismes** (reproduit d'Archambault, V. et al. 2015). *Saccharomyces cerevisiae* (S.c.), *Drosophila melanogaster* (D. m.), *Schizosaccharomyces pombe* (S. p.), *Xenopus laevis* (X. L.) et *Homo sapiens* (H. s.). Les orthologues de PLK1 sont représentés en vert.

Notez que, dans ce qui suit, les aspects et les fonctions qui seront abordés concerneront exclusivement PLK1 et ses orthologues (Polo et Cdc5), et que l'appellation PLK fera désormais allusion à ce groupe de kinases.

### 3. Régulation spatiotemporelle de l'activité des PLK

L'activité des PLK est finement régulée tout au long du cycle cellulaire. La régulation spatiale de PLK est assurée par ses interactions avec ses substrats, ce qui permet de la localiser au bon endroit; alors que la régulation temporelle inclut la régulation de son expression, de sa phosphorylation et de sa dégradation <sup>5</sup>.

#### 3.1. Régulation temporelle de la kinase Polo

##### 3.1.1. Régulation de l'expression de *PLK*

Le niveau d'expression de *PLK* est sous le contrôle de plusieurs activateurs et répresseurs qui agissent durant différentes phases du cycle cellulaire. En G1, l'expression de *PLK1* est réprimée par la liaison de p53 et/ou p21 à CDE/CHR (*cell-cycle-dependent element/cell cycle gene homology region*) <sup>31</sup>, un élément se trouvant dans le promoteur du gène *PLK1* <sup>32</sup>. La protéine Rb participe également à la répression de *PLK1* indépendamment de l'élément CDE/CHR <sup>32, 33</sup>. En G2, la transcription de *PLK* est activée par des facteurs de transcription appelés FKH-TF (*Forkhead transcription factors*) autant chez les mammifères <sup>34, 35</sup> que chez les levures <sup>36, 37</sup>. L'expression de *PLK* est la plus élevée lors de la transition G2/M <sup>31</sup>.

##### 3.1.2. Régulation de la phosphorylation de PLK

Avant l'entrée en mitose, *PLK1* est activée par la phosphorylation du résidu Thr210 dans sa boucle T (T-loop) par Aurora A en présence de son cofacteur BORA <sup>38</sup>. Ce résidu semble important pour l'activation de la kinase, d'où sa conservation chez les autres PLK. Par contre, l'activation de PLK par la voie BORA-dépendante ne paraît pas être un processus conservé étant donné qu'aucun homologue de BORA n'a été identifié chez *Saccharomyces cerevisiae* <sup>5</sup>.

Il se trouve également que PLK peut être phosphorylée sur d'autres résidus par d'autres kinases : par exemple, la phosphorylation de *PLK1* par PAK1 sur son résidu Ser49 au moment de la transition métaphase-anaphase <sup>39</sup>. Ces résidus ne sont pas conservés entre les organismes possédant les PLK, ce qui veut peut-être dire que leurs rôles sont plus reliés à l'organisme dans lequel PLK se trouve <sup>5</sup>.

### 3.1.3. Régulation de la dégradation de PLK

PLK1 et Cdc5 sont connues pour être ciblées par le complexe de promotion de l'anaphase (APC) activé par Cdh1 (*Cdc20 homologue 1*), afin qu'elles soient ubiquitinées, puis dégradées par le protéasome en fin de mitose <sup>40</sup>. Cette dégradation est essentielle pour permettre à la cellule de continuer à cycliser : en effet, la dégradation de PLK favorise l'inactivation de Cdc14, une protéine phosphatase qui inhibe l'activité de CDK1-Cycline B en dégradant la cycline B, ce qui promeut la sortie de mitose, et ce, afin de permettre la réactivation de CDK1 dans le prochain cycle <sup>41,42</sup>.

### 3.2. Régulation spatiale de la kinase Polo

PLK1 doit se trouver à différents endroits dépendamment de la phase du cycle cellulaire. Par exemple, durant l'interphase, PLK1 doit se localiser au cytoplasme, aux microtubules et aux centrosomes; en mitose, elle doit se trouver, en plus des endroits mentionnés précédemment, sur les kinétochores, alors qu'en cytokinèse, elle doit l'être sur le fuseau mitotique central <sup>4</sup>. Cdc5, la PLK de Chez *S. cerevisiae*, est localisée en permanence dans les SPB (*spindle pole bodies*), l'équivalent des centrosomes chez les mammifères, et est retrouvée dans la région de la nuque du bourgeon (*mother bud neck region*) durant la cytokinèse <sup>5</sup>.

La localisation de la kinase à ces différents endroits semble dépendre de son domaine PBD qui a la capacité de se lier aux résidus sérine/thréonine phosphorylés dans la séquence consensus Ser-[pSer/pThr]-[Pro/X] présente sur ses protéines cibles, puis de les localiser aux bons endroits <sup>5</sup>. Ces résidus peuvent être préalablement phosphorylés par CDK1, tels que ceux de la protéine INCENP <sup>43</sup>, ou bien phosphorylés par PLK elle-même comme ceux de PRC1 <sup>44</sup>.

#### 4. Rôles de PLK1 et de Cdc5 en mitose

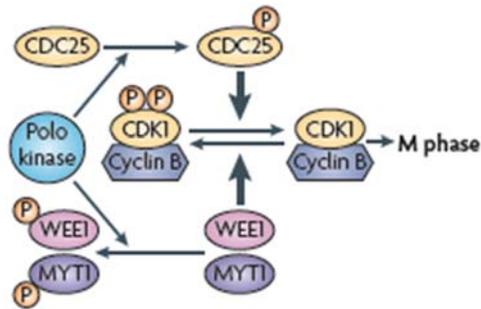
Les études qui s'étaient intéressées aux PLK ont permis de révéler un éventail de différentes fonctions tout aussi importantes les unes que les autres. La comparaison des différents rôles joués par PLK1 et ses orthologues dans la division cellulaire ont montré qu'ils étaient tous conservés et que, bien que les voies moléculaires puissent différer légèrement entre les organismes, la résultante des effecteurs des PLK est habituellement similaire <sup>5</sup>. Ci-dessous seront abordés les rôles majeurs des PLK durant le cycle cellulaire.

##### 4.1. Promotion de l'entrée en mitose

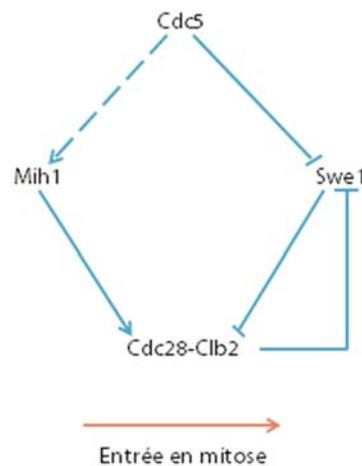
L'entrée dans le cycle cellulaire est sous le contrôle de la kinase cycline-dépendante 1 (CDK1)-Cycline B, dont l'activité se trouve elle-même régulée par un réseau complexe de protéines. En G2, WEE1 et MYT1 inactive CDK1-Cycline B en la phosphorylant sur ses résidus Thr14 et Tyr15, alors que la phosphatase CDC25 essaye de l'activer en déphosphorylant les mêmes résidus <sup>45</sup> (**Figure 4**). Lorsque PLK1 est activée, elle inhibe l'activité de WEE1 et de MYT1 tout en activant celle de CDC25, afin de promouvoir l'activation de CDK1-Cycline B et, ainsi, l'entrée dans la phase M. PLK1 active davantage CDK1-Cycline B en phosphorylant la Cycline B et en ciblant WEE1 pour qu'il soit dégradé par  $\beta$ TrCP <sup>4,5</sup>.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc28-Clb2 (l'homologue de CDK1-Cycline B chez la levure bourgeonnante) est phosphorylée par Swe1 (l'orthologue de WEE1) sur sa Tyr 19 et est, ainsi, inactivée <sup>46, 47</sup>. L'activité de Swe1 est antagonisée par Mih1, l'orthologue de CDC25 <sup>48, 49</sup>. Afin de promouvoir l'entrée en mitose, Cdc5 inhibe l'activité de Swe1 et le phosphoryle pour qu'il soit ubiquitiné puis dégradé par le protéasome 26 S <sup>50, 51</sup>. Un mutant Swe1 dont les résidus censés être phosphorylés par Cdc5 sont manquants voit sa protéine *Swe1* devenir stable, et connaît un délai d'entrée dans la phase M, ce qui montre encore une fois l'importance de Cdc5 pour passer le point de contrôle G2/M <sup>52</sup>. En revanche, il n'est pas connu de la littérature si Cdc5 active Wih1 ou pas <sup>47</sup>. La voie de régulation de Cdc28-Clb2 en G2 est schématisée dans la **Figure 5**.

a Entry into M phase



**Figure 4. PLK1 promeut l'entrée en mitose chez les mammifères** (reproduit d'Archambault et al., 2009). PLK1 active CDC25 et inhibe WEE1 et MYT1 pour permettre à CDK1-Cycline B de favoriser l'entrée dans la phase M.



**Figure 5. Cdc5 promeut l'entrée en mitose chez *Saccharomyces cerevisiae*** (figure adaptée de la figure 3 dans « Lee, K.S. et al. (2005) »).

Cdc5 joue un rôle important dans la promotion de l'entrée en mitose . Pour assurer l'activation de Cdc28-Clb2 et ainsi la progression dans le cycle cellulaire, Cdc5 inhibe Swe1. La flèche hachurée indique que les étapes biochimiques de cette voie nécessitent une investigation plus approfondie.

#### 4.2. Importance des PLK dans la régulation des centres d'organisation des microtubules (MTOC)

Les centres d'organisation des microtubules (MTOC) sont des structures qui assurent la nucléation et l'organisation des microtubules <sup>53</sup>. Les cellules animales et les cellules de levure bourgeonnante ont toutes les deux des MTOC, bien que leurs structures respectives puissent différer entre elles. Les MTOC chez les cellules animales sont les centrosomes. Les centrosomes sont localisés dans les pôles des fuseaux mitotiques, et chaque centrosome est constitué d'une paire de centrioles, des structures cylindriques formées de microtubules, entourés d'un nuage de matériel protéique appelé PCM (*Pericentriolar Material*) qui est à l'origine de la nucléation des microtubules <sup>53, 54</sup>. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les SPB (*spindle pole bodies*) qui se trouvent aux pôles des fuseaux mitotiques sont les équivalents des centrosomes dans les cellules animales. Pourtant, contrairement aux centrosomes, les SPB ne sont pas formés de centrioles, mais plutôt de plaques de molécules qui sont associées à l'enveloppe nucléaire <sup>55, 56</sup>. La duplication et l'assemblage des SPB et des centrioles, dans les centrosomes, se produit durant la phase S <sup>56, 57</sup>. Lors de la transition G2/M, PLK participe activement à la maturation des centrosomes et des SPB, un processus impliquant l'augmentation du recrutement des microtubules <sup>58</sup>. Chez l'être humain, PLK1 participe au recrutement du complexe  $\gamma$ -tubuline en forme d'anneau («  *$\gamma$ -Tubulin ring complex* », habituellement abrégé en «  $\gamma$ -TuRC ») qui est primordial pour la nucléation des microtubules à partir des centrosomes <sup>59</sup>. De plus, PLK1 participe à la régulation et au contrôle de la nucléation des microtubules ainsi qu'à la réorganisation de la PCM en facilitant le recrutement de plusieurs protéines clés <sup>5</sup>. Parmi ces protéines se trouvent la péricentrine (PCNT), une protéine qui assure la maturation des centrosomes en recrutant ses protéines cibles à la PCM <sup>60, 61, 62</sup>; NLP (*Ninein-like protein*), un régulateur principal de la nucléation en interphase, qui est phosphorylé par PLK1 afin de ne pas être transporté aux centrosomes, ce qui permet éventuellement le recrutement de d'autres protéines impliquées dans la réorganisation de l'architecture des centrosomes <sup>63, 64</sup>; et Kizuna, une protéine qui assure la robustesse de la structure centrosomale, et qui est phosphorylée par PLK1 afin de stabiliser la PCM <sup>65</sup>. PLK1 participe également à la localisation d'Aurora A, une protéine

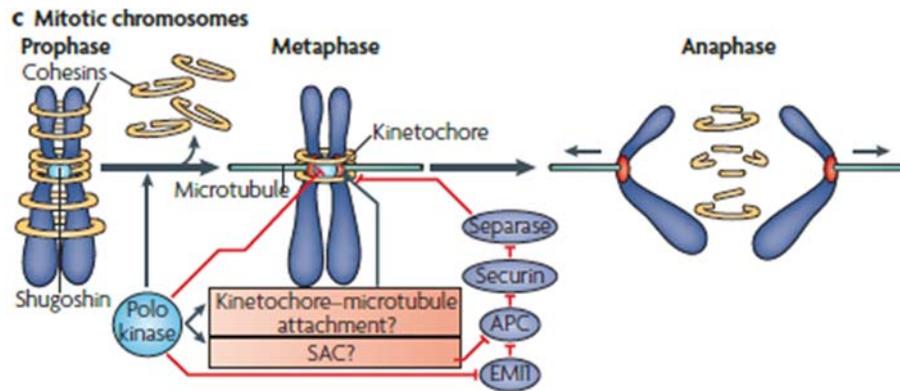
connue pour son implication dans la maturation centrosomale, aux centrosomes assurant ainsi sa fonction <sup>66</sup>.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les recherches ont montré que Cdc5 phosphorylait Spc72, une composante du complexe Tub4p ( $\gamma$ -tubuline) qui est importante notamment pour la formation et la stabilisation des microtubules <sup>67</sup>, et ce, afin d'assurer l'ancrage de  $\gamma$ -TuRC aux SPB de même que l'orientation et le positionnement des microtubules <sup>68</sup>.

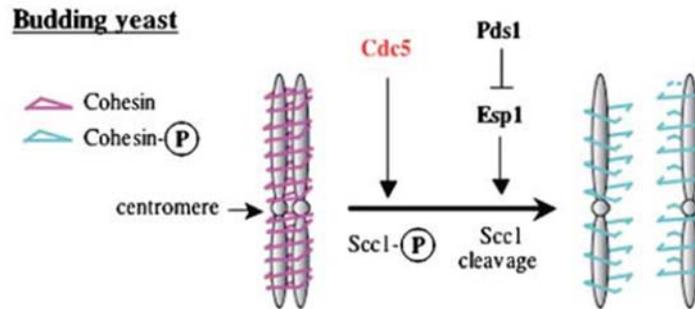
#### 4.3. Implication de PLK dans la ségrégation des deux chromatides sœurs

L'objectif ultime de la cellule lors de la mitose est de léguer une copie identique du génome à chacune de ses cellules filles. Pour ce faire, les chromatides sœurs qui forment chacun des chromosomes de la cellule mère doivent être séparées et réparties de façon égale entre les deux cellules filles. La séparation des deux chromatides sœurs est le résultat du clivage d'une protéine appelée cohésine <sup>69</sup> qui, comme son nom l'indique, maintient la cohésion entre les deux chromatides jusqu'au moment de leur séparation. Les études ont montré que PLK était impliquée dans la phosphorylation de la cohésine afin de favoriser son clivage et permettre donc la séparation des deux chromatides sœurs que ce soit chez *Homo sapiens* ou chez *Saccharomyces cerevisiae* <sup>70, 71</sup>. Chez les vertébrés, PLK1 phosphoryle SA2, une sous-unité de la cohésine, pour promouvoir sa dissociation des bras des chromosomes en prophase <sup>72, 73</sup> (**Figure 6**). Jusqu'au moment de la transition métaphase/anaphase, la cohésine entourant les centromères demeure protégée du clivage, et ce, grâce à l'action d'une famille de protéines connue sous le nom de « Shugoshin ». En collaborant avec la phosphatase PP2A qui antagonise probablement PLK1 en l'empêchant de cibler la cohésine pour la dégradation, Shugoshin permet de conserver la cohésion des deux chromatides sœurs jusqu'à la transition métaphase/anaphase <sup>74, 75</sup>. À ce moment-là, PLK1 phosphoryle SCC1, la sous-unité de la cohésine qui maintient les deux chromatides sœurs ensemble au niveau des centromères, et la cible pour qu'elle soit clivée par la séparase, une fois libérée de la sécurine qui la séquestre <sup>76</sup>. Le clivage de SCC1 par la séparase permet la séparation des deux chromatides sœurs. Essentiellement, la même chose se passe lors de la transition métaphase/anaphase chez *Saccharomyces cerevisiae* : Cdc5 phosphoryle Scc1 permettant ainsi sa dégradation par la séparase Esp1 <sup>71</sup> (**Figure 7**).

La séparation des chromatides sœurs nécessite l'attachement des microtubules aux kinétochores, des complexes protéiques qui s'assemblent aux centromères lors de la division et qui régulent la séparation des deux chromatides sœurs<sup>77</sup>. Le bon attachement des kinétochores aux microtubules est assuré par PLK1 qui phosphoryle BUBR1, un régulateur de la séparation des deux chromatides sœurs, permettant ainsi de stabiliser l'attachement des kinétochores aux microtubules<sup>78</sup>. PLK1 semble aussi être liée au point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (*Spindle assembly checkpoint*, abrégé en « SAC ») puisqu'elle paraît interagir avec certaines protéines impliquées dans ce processus, comme BUB1<sup>79</sup>. Par contre, PLK1 n'est pas essentielle pour le SAC<sup>80</sup>. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc5 semble être importante pour l'adaptation au SAC et dans la sortie du cycle cellulaire<sup>81</sup>.



**Figure 6. PLK permet la séparation des deux chromatides sœurs** (reproduit d'Archambault et al., 2009). PLK1 favorise la dissociation de la cohésine entourant les bras des chromosomes, en prophase. Shugoshin protège la cohésine centromérique jusqu'à la transition anaphase/métaphase, où PLK1 va stimuler la séparation des deux chromatides sœurs en permettant la dégradation d'EMI1, un inhibiteur de l'APC. La dégradation d'EMI1 permet l'activation du complexe de promotion de l'anaphase qui dégrade la sécurine et permet la libération de la séparase. La cohésine, préalablement phosphorylée par PLK1, est alors clivée par la séparase et les chromatides sœurs se séparent. PLK1 est aussi impliquée dans l'attachement des microtubules aux kinétochores et sa fonction semble aussi être liée au point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique (SAC), chez les cellules animales.



**Figure 7. Cdc5 promeut la séparation des deux chromatides sœurs** (Lee et al., 2005).

Lors de la transition métaphase/anaphase, la sous-unité de la cohésine (Scc1) est phosphorylée par Cdc5 afin d'être ciblée pour dégradation. Cdc5 permet la destruction de Pds1 (sécurine) par l'APC/Cdc20 (non illustré), ce qui permet la libération de la séparase et le clivage de la cohésine. Une fois Scc1 dégradée, les deux chromatides sœurs se séparent.

#### 4.4. Régulation de la condensation des chromosomes et protection de l'intégrité génomique

La condensation des chromosomes représente la compaction des longues fibres de la chromatine en des structures plus courtes et plus épaisses appelées chromosomes<sup>82</sup>. La condensation est un processus essentiel pour assurer une ségrégation fidèle des chromatides sœurs, ce qui constitue l'objectif ultime de la division cellulaire. En effet, empaqueter l'ADN lors du processus de la condensation permet de bien conserver l'information génétique et assure une bonne ségrégation des chromosomes entre les deux cellules filles<sup>83, 84</sup>. Les recherches qui s'étaient penchées sur l'identification des principaux facteurs impliqués dans la condensation des chromosomes avaient identifié la condensine, un complexe protéique pentamérique, comme étant le principal régulateur de ce phénomène chez les eucaryotes<sup>85</sup>. Étant donné l'importance de la condensine dans la promotion de la condensation des chromosomes lors de la mitose, il ne serait pas étonnant que son activité soit sous le contrôle de nombreux régulateurs. La kinase Polo

représente l'un des principaux régulateurs de la condensine et de la condensation des chromosomes. En effet, il est maintenant connu dans la littérature que Plk1 profite de la phosphorylation de la sous-unité CAP-D3 de la condensine II par CDK1 pour s'y lier, ce qui lui permet d'hyperphosphoryler la condensine II. Cette hyperphosphorylation facilite l'assemblage des chromosomes et permet leur condensation en prophase <sup>86</sup>. Par ailleurs, une étude de notre laboratoire a montré que Cdc5 stimulait l'activité de la condensine lors de l'élongation des fuseaux mitotiques, vers la fin de la mitose, en phosphorylant ses sous-unités Brn1, Ycg1 et Ycs4 <sup>87</sup>. Cette phosphorylation permet l'hyperactivation de la condensine en fin de mitose, probablement pour compenser la diminution de l'activité de CDK1 à cette phase-ci du cycle cellulaire et pour assurer le maintien de la condensation des chromosomes jusqu'à la séparation des deux cellules filles <sup>87, 88, 89</sup>.

En dehors de son interaction avec la condensine, la kinase Polo favorise le maintien de l'intégrité génomique de la cellule en participant également à la régulation de la morphologie du noyau, du moins chez *Saccharomyces cerevisiae*. Que ce soit chez des cellules pouvant cycliser ou en arrêt cellulaire, Cdc5 régule l'expansion de l'enveloppe nucléaire en s'assurant de restreindre son site à la région qui est proche du nucléole <sup>90, 91</sup>. En procédant ainsi, soit en confinant la région de l'expansion à une partie de l'enveloppe nucléaire qui est distincte de la région du noyau où se trouvent les chromosomes, Cdc5 permet la protection du matériel génétique et de l'intégrité génomique de la cellule tout en veillant à la bonne régulation de la morphologie du noyau <sup>91</sup>. Selon l'étude qui a rapporté ces observations, cette fonction de Cdc5 serait indépendante des autres rôles qu'elle joue durant la mitose <sup>91</sup>.

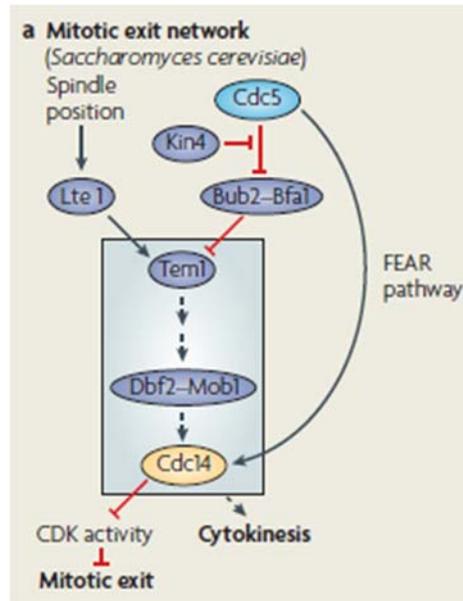
#### 4.5.Promotion de la sortie du cycle cellulaire

La sortie du cycle cellulaire est un phénomène qui nécessite l'inactivation de CDK1-Cycline B, accomplie par la dégradation de la Cycline B par le complexe de la promotion de l'anaphase (APC) <sup>92, 93</sup>. Les études ont montré que PLK1 était impliquée dans l'activation de l'APC en favorisant la dégradation de son inhibiteur EMI1 (*Early mitotic inhibitor 1*) <sup>94</sup>. PLK1 phosphoryle EMI1 pour qu'il soit ubiquitiné, puis dégradé par le protéasome <sup>95, 96</sup>. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il n'y a pas d'inhibiteur de l'APC que Cdc5 pourrait phosphoryler et cibler pour qu'il soit dégradé afin de promouvoir la sortie

du cycle cellulaire<sup>5,47</sup>. En revanche, il existe deux voies qui, en coopérant, promeuvent la sortie de la mitose : ces voies sont nommées *FEAR* (*Cdc Fourteen Early Anaphase Release*) et *MEN* (*Mitotic Exit Network*)<sup>97, 98</sup>. La phosphatase Cdc14 qui antagonise l'activité de CDK1-Cycline B de plusieurs manières constitue l'effecteur clé de ces deux voies, et la kinase Cdc5 représente leur principal activateur<sup>99,100</sup> (**Figure 8**). Au début de l'anaphase, Cdc5 favorise la libération d'une petite fraction de la phosphatase Cdc14, jusqu'alors séquestrée dans le nucléole, en activant la voie *FEAR*<sup>97</sup>.

La voie du *FEAR* est composée de la séparase Esp1 et de la protéine Slk19 qui s'y associe<sup>97, 101</sup>, de Spo12 et son paralogue Bns1<sup>97</sup>, de Cdc5<sup>97, 102</sup>, de la sécurine Pds1, de Fob1 qui se localise au nucléole<sup>103</sup>, et de la phosphatase PP2A associée à Cdc55<sup>104, 105</sup>. Alors que Pds1, Fob1 et PP2A-Cdc55 inhibent la libération de Cdc14 par la voie du *FEAR*, les autres protéines mentionnées précédemment la favorisent<sup>106</sup>. Cdc14 se trouve séquestrée dans le nucléole par Net1/Cfi1, de G1 jusqu'en métaphase<sup>107</sup>. Lors de la transition métaphase/anaphase, le complexe APC/C<sup>Cdc20</sup> ubiquitine la sécurine et favorise sa dégradation par le protéasome, ce qui permet la libération de la séparase Esp1<sup>108, 109, 110, 92</sup>. Au début de l'anaphase, Cdc5 phosphoryle Net1/Cfi1 afin de l'inhiber et de permettre la libération de Cdc14<sup>111, 112</sup>. Esp1 associée à Slk19 favorise la libération de Cdc14 en : (1) se liant à PP2A-Cdc55 et en l'empêchant de déphosphoryler Net1/Cfi1<sup>105</sup>; (2) en activant Spo12 qui se lie à Fob1, un inhibiteur du *FEAR*, et déstabilise son association avec Net1/Cfi1<sup>103, 113, 114</sup>. La fraction de Cdc14 qui est libérée par la voie du *FEAR* est impliquée dans plusieurs fonctions, notamment dans la ségrégation de l'ADN ribosomal dans les nucléoles<sup>115, 116</sup>, dans la régulation de la dynamique des fuseaux mitotiques en anaphase<sup>117, 118</sup>, dans le positionnement du noyau<sup>119</sup>, et dans la promotion du *MEN*<sup>97, 113</sup>. Ces fonctions sont toutes aussi importantes les unes que les autres pour garantir la bonne progression de la cellule en anaphase et pour assurer sa viabilité<sup>115</sup>. Cette fraction de Cdc14 ne suffit peut-être pas pour provoquer la sortie de la mitose, néanmoins, elle promeut le *MEN* en recrutant Cdc15, l'une de ses composantes, aux SPB où elle se permet de le déphosphoryler et de l'activer<sup>120</sup>. Cdc15 activé va, via la voie du *MEN*, promouvoir la libération de plus de Cdc14. En amont de la cascade du *MEN* se trouve une GTPase du nom de Tem1<sup>121</sup>. Elle se localise dans les SPB et l'activité d'hydrolyse de son GTP est accélérée par le complexe Bub2-Bfa1 GAP (*GTPase*

*activating protein*) afin de la maintenir inactive <sup>121, 122</sup>. De plus, Lte1, la GEF (*Guanine nucleotide-exchange factor*) de Tem1, phosphorylée par CDK1, se trouve localisée dans le cortex de la nuque du bourgeon de la cellule mère depuis l'interphase, afin d'être spatialement loin de Tem1<sup>122</sup>. En anaphase, lorsque le fuseau mitotique se positionne au centre de la nuque du bourgeon, Cdc14 va favoriser la dissociation de Lte1 du cortex et lui permettre de participer à l'activation de Tem1 <sup>98, 123</sup>. Cdc5 va également favoriser l'activation de Tem1 en inhibant Bub2-Bfa1 <sup>98, 124</sup>. Une fois activée, Tem1 enclenche la cascade du MEN et mène à la libération de plus de Cdc14. Cdc14 active alors le complexe APC/Cdh1 afin de permettre la dégradation de Clb (équivalent des Cyclines B chez la levure bourgeonnante) <sup>110</sup>; elle active Sic1, un inhibiteur de Cdc28 (équivalent de CDK1) et favorise l'entrée au noyau de Swi5, un facteur de transcription important pour l'expression de Sic1 <sup>47, 125</sup>. Lorsque les cellules sortent de la mitose, Cdc14 déphosphoryle alors le complexe Bub2-Bfa1 pour le libérer de l'inhibition que lui a imposée Cdc5 et lui permettre d'inhiber Tem1. En agissant ainsi, Cdc14 s'assure, par la même occasion, de l'inactivation du MEN jusqu'au prochain cycle <sup>126</sup>.



**Figure 8. Cdc5 régule la voie de sortie du cycle cellulaire (MEN) chez *Saccharomyces cerevisiae*** (reproduit d'Archambault et al, 2009).

Tem1 est la protéine qui se trouve le plus en amont de la cascade du MEN. Tem1 est une GTPase activé par Lte1, mais jusqu'à l'arrivée de l'anaphase, Lte1 est localisée dans le cortex du bourgeon de la cellule mère afin d'empêcher l'enclenchement du processus de sortie de mitose. En même temps, Tem1 est inhibée par Bub2-Bfa1, et Kin4 rend Bfa1 insensible à la phosphorylation par Cdc5, ce qui maintient Bub2-Bfa1 actif. Au début de l'anaphase, Cdc5 promeut la libération d'une petite fraction de Cdc14 jusqu'ici séquestrée dans le nucléole via la voie du FEAR. Cdc14 va promouvoir l'activation du MEN en activant une de ses composantes (Cdc15, non illustré sur la figure) qui va permettre la libération de plus de Cdc14. En anaphase, le fuseau mitotique se positionne au centre de la nuque du bourgeon, Cdc14 va permettre la dissociation de Lte1 du cortex lui donnant ainsi la chance d'activer Tem1. Cdc5 favorise la voie du MEN en phosphorylant Bub2-Bfa1 ce qui les inhibe. La cascade du MEN mène à la libération de plus de Cdc14 qui, de plusieurs façons, va favoriser la sortie du cycle.

#### 4.6.Promotion de la cytokinèse

PLK joue également un rôle très important dans la promotion de la cytokinèse. Bien que les événements moléculaires puissent différer entre les organismes, le rôle de PLK dans ce processus demeure l'un des plus conservés<sup>80</sup>. Les études ont montré que PLK1 profitait de ses interactions avec PRC1<sup>127, 128</sup>, un facteur régulateur de la cytokinèse, et avec MKLP2 (*Mitotic kinesin-like protein 2*)<sup>129</sup> afin de se localiser au fuseau mitotique central. RhoA, une GTPase activatrice de l'anneau d'actomyosine dans la promotion de la cytokinèse, nécessite la présence d'ECT2, une Rho-GEF, essentielle pour son activation. PLK1 favorise le recrutement d'ECT2 en phosphorylant la sous-unité CYK4 du fuseau mitotique central, ce qui permet ensuite d'activer RhoA et favoriser la cytokinèse<sup>22, 23, 24</sup>. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc5 favorise également la cytokinèse en activant directement la Rho-GEF qui se charge de l'activation de Rho1 (l'orthologue de RhoA)<sup>130</sup>.

#### 5. Rôles de PLK lors d'un dommage à l'ADN

Tout au long de sa vie, la cellule est exposée à des pressions exogènes ou endogènes qui peuvent endommager son ADN ou y causer des lésions. Afin de faire face à ce type de menaces, la cellule a développé une sorte de mécanisme de contrôle impliquant des points d'arrêt du cycle cellulaire qui préviennent la progression de la cellule dans le cycle avant que les dommages dans l'ADN ne soient parfaitement réparés<sup>131, 132</sup>. Le point de contrôle G2/M est important, notamment dans la réparation des cassures d'ADN double-brin (*DNA double-strand breaks*) parce que le fait que le matériel génétique ait été dupliqué en G2 offre à la cellule la possibilité d'utiliser l'autre chromatide comme modèle pour réparer la cassure et d'utiliser la recombinaison homologue comme mécanisme de réparation<sup>133</sup>. Lorsqu'un dommage à l'ADN se produit en G2, le point de contrôle G2/M est activé et la progression dans le cycle cellulaire est interrompue. Vu que PLK1 est un important régulateur de l'entrée en mitose, elle va être inactivée afin d'assurer l'arrêt cellulaire en G2<sup>134</sup>. Dans ce cas, Cdc14B active le complexe APC/C<sup>CDH1</sup> qui va ubiquitiner PLK1 et la cibler pour qu'elle soit dégradée<sup>135, 136</sup>. La

dégradation de PLK1 favorise l'activation de WEE1, un inhibiteur de CDK, afin de promouvoir l'arrêt cellulaire. Le maintien de l'arrêt cellulaire en G2 est assuré via l'activation de la phosphatase CDC25C qui normalement active la kinase CDK1<sup>135, 136</sup>. L'activation de CDC25C est rendue possible grâce à l'action de CHK1 ou de CHK2 qui sont des effecteurs des voies de signalisation initiées par ATM et d'ATR respectivement en réponse à un dommage à l'ADN<sup>135, 136</sup>. Notez qu'ATR est activée par les cassures d'ADN simple brin, alors qu'ATM l'est pour les cassures d'ADN double-brin<sup>137</sup>.

#### 5.1. PLK1 est impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN et promeut la transition G2/M après complétion de la réparation

Durant la réparation des dommages, PLK1 participe à la réparation en phosphorylant Rad51, une protéine importante pour la recombinaison homologue, ce qui permet son accumulation dans les sites de la lésion<sup>138</sup>. Plk1 est également essentielle pour réintégrer le cycle cellulaire après la réparation des dommages à l'ADN. Elle inactive le point de contrôle G2/M en phosphorylant Claspin, une protéine essentielle pour l'activation de CHK1 et pour la régulation du point de contrôle G2/M, ce qui permet de la cibler pour qu'elle soit dégradée<sup>139, 140, 141</sup>. La dégradation de Claspin permet l'inactivation de CHK1 et d'ATR. PLK1 phosphoryle aussi p53BP1 (*p53-binding protein*), une protéine importante pour la réparation des cassures d'ADN double-brin, permettant ainsi la dissociation de 53BP1 de l'ADN et l'inactivation de CHK2<sup>142</sup>. PLK1 favorise également l'entrée dans la phase M en activant CDC25 et en inhibant WEE1, ce qui permet l'activation de CDK1 et facilite la transition G2/M<sup>135, 142</sup>.

La décision de reprendre le cycle cellulaire dépend en partie du résultat de réparation du dommage à l'ADN : « Le dommage a-t-il été réparé avec succès ? », ou « Est-il irréparable? ». C'est souvent la réponse à ces questions qui détermine la réponse cellulaire : dans le cas, à titre d'exemple, où l'ADN a été parfaitement réparé, la cellule va décider de reprendre le cycle cellulaire; dans d'autres, où l'ADN ne peut pas être réparé, la cellule pourra opter pour l'apoptose<sup>143, 144</sup>. Pourtant, la décision de la cellule peut être plus compliquée que l'idée voulant qu'un dommage réparé équivaille à une reprise du cycle cellulaire, et qu'un dommage non-réparé équivaille à une entrée en apoptose. Il arrive que la cellule, bien qu'elle puisse porter un ADN irréparable, réintègre

le cycle cellulaire dans un processus appelé « adaptation »<sup>145</sup>. L'adaptation aux dommages persistants à l'ADN a été décrite pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae*<sup>146</sup>. L'étude avait montré que les cellules qui pouvaient s'adapter aux dommages étaient capables de subir plusieurs divisions cellulaires malgré la présence de lésions sévères et irréparables. L'adaptation peut être avantageuse pour les cellules de levure, puisqu'elle promet leur survie sous des conditions qui auraient pu entraîner leur mort<sup>147</sup>. En revanche, chez les cellules de mammifères, le processus d'adaptation aux dommages à l'ADN constitue une sérieuse menace contre l'intégrité génomique, vu le potentiel tumorigène que possède ce type de cellules<sup>145</sup>. Les études qui se sont penchées sur le phénomène d'adaptation n'ont pas encore élucidé tous ses mystères ou révélé toutes les voies moléculaires qui y sont impliquées. Par contre, elles ont identifié les PLK comme étant les principaux régulateurs de ce processus chez les eucaryotes<sup>144, 148-150</sup>.

## 5.2. PLK est essentielle pour la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN

Plusieurs études réalisées sur des cellules humaines, des cellules de levure et des extraits de cellules de grenouille ont révélé que les PLK étaient les principaux régulateurs de la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN chez les eucaryotes<sup>145, 146, 148-151</sup>. Elles ont en effet montré qu'une mutation dans Cdc5, par exemple, ou une sous-régulation de PLK1 abrogeaient la réponse d'adaptation chez la levure et chez la cellule humaine, respectivement<sup>145, 146, 152</sup>. De l'autre côté, elles ont montré qu'une surexpression de PLK forçait les cellules à s'adapter aux dommages à l'ADN plus rapidement que le feraient des cellules contrôles, ce qui a confirmé, encore une fois, l'importance de cette kinase dans ce processus<sup>153</sup>. Pourtant, le rôle exact de PLK dans la promotion de l'adaptation aux dommages à l'ADN, de même que son mécanisme d'action et l'identité de son substrat sont inconnus. Dans une percée scientifique sans précédent, notre laboratoire a identifié le domaine PBD comme étant le médiateur de la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN en localisant la kinase aux SPB chez *Saccharomyces cerevisiae*<sup>154</sup>.

5.2.1. Le PBD de Cdc5 localise a kinase aux SPB pour promouvoir son interaction avec son substrat lors de la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN

Des résultats de notre laboratoire de recherche ont montré que le domaine PBD de Cdc5 était absolument essentiel pour la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN <sup>154</sup>. En effet, ils ont montré que *cdc5-16*, un mutant PBD, était totalement incapable de s'adapter à des dommages persistants dans l'ADN (dommages sous la forme de télomères dysfonctionnels), alors que les cellules sauvages présentes sous les mêmes conditions pouvaient très bien s'y adapter <sup>154</sup>. De plus, *cdc5-16* démontrait une grande sensibilité aux dommages à l'ADN et une instabilité génomique accrue. Puisque notre laboratoire a déjà montré que le PBD était important pour enrichir Cdc5 aux SPB, il a été suggéré que le défaut d'adaptation observé chez *cdc5-16* était peut-être dû à un échec de la localisation de Cdc5 aux SPB, l'endroit où se trouverait le substrat potentiel de Cdc5 <sup>154</sup>. La relocalisation de *cdc5-16* aux SPB a non seulement permis aux cellules de s'adapter aux dommages à l'ADN, mais a également secouru le phénotype de résistance diminuée aux dommages à l'ADN et d'instabilité génomique sévère <sup>154</sup>. Ces résultats suggèrent que le substrat de Cdc5 durant la réponse d'adaptation se trouve dans les SPB, et qu'il se peut que ce soit une cible peu conventionnelle.

### III. Objectif du projet de recherche

Notre objectif ultime consiste en l'identification des substrats de Cdc5 lors de la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN chez *Saccharomyces cerevisiae*. Pour ce faire, nous avons prévu de soumettre des préparations de SPB purifiés à des réactions de phosphorylation *in vitro* en utilisant la kinase Cdc5 purifiée, puis d'identifier par spectrométrie de masse quantitative « *LC-MS/MS* » les protéines dont les niveaux de phosphorylation auraient augmenté à la suite du traitement. Ces protéines auraient été considérées comme des cibles potentielles de la kinase Cdc5 lors de la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN. Pourtant, le substrat de la PLK/Cdc5 pourrait également être une cible non-conventionnelle qui se localiserait transitoirement aux SPB lors de la réponse d'adaptation sans nécessairement s'y trouver dans des conditions normales. De plus, une protéine cible phosphorylée *in vitro* ne l'est pas forcément *in vivo*.

Afin de mener à bien la réalisation de notre objectif tout en prenant en considérations les possibilités mentionnées précédemment, nous avons décidé de caractériser le phosphoprotéome de Cdc5 dans son intégralité *in vivo*, et ce, par *LC-MS/MS*. À cette occasion, un allèle de *cdc5* sensible à la température, c'est-à-dire une version mutante qui devient inactive à température élevée, devra être utilisé comme contrôle lors de l'analyse phosphoprotéomique. L'utilisation d'allèle thermosensible est nécessaire parce que Cdc5 est une protéine essentielle à la survie cellulaire et que la délétion de son gène tue les cellules. Utiliser un allèle du gène *CDC5* qui est thermosensible à une température de 37°C ou à une température qui l'avoisine serait désavantageux pour notre projet, étant donné que 37°C est la température à laquelle un choc thermique se produit chez la levure et que cette condition entraînera une modification de la régulation de plusieurs protéines et pas seulement de Cdc5<sup>155</sup>. Il en découle donc que l'utilisation d'un allèle *cdc5* sensible à 37°C ne permettra pas de faire la distinction entre le phosphoprotéome associé à la perte d'activité Cdc5 et celui causé par le choc thermique. Afin d'éviter ce problème, un allèle *cdc5* sensible à une température plus basse, soit 30°C, est nécessaire pour s'assurer que seuls les substrats de *cdc5* seront identifiés lors de l'analyse phosphoprotéomique. L'objectif spécifique de mon projet a été donc de créer un mutant *cdc5* thermosensible à une température de 30°C.

#### **IV. Hypothèse de recherche**

Étant donné que PLK/Cdc5 est impliquée dans de nombreux processus du cycle cellulaire, notamment dans celui promouvant la sortie de la mitose (MEN), nous nous attendons à ce que les mutants *cdc5* créés subissent un arrêt cellulaire uniforme en fin de mitose sous la forme bourgeonnée.

## **V. Approche expérimentale**

### **1. Identification d'allèles du gène *CDC5* qui sont thermosensibles à une température de 30°C**

La première étape de notre approche expérimentale consistait en l'identification d'un allèle du gène *CDC5* qui est thermosensible à une température de 30°C en commençant par un criblage des mutants *cdc5* déjà présents dans la collection. Dans le cas où cette opération n'aurait pas abouti à l'identification de l'allèle désiré, notre alternative était de générer de nouveaux mutants *cdc5* sensibles à la température par PCR mutagène dirigée.

### **2. Analyse du cycle cellulaire des mutants *cdc5* identifiés**

Lors de cette étape, la cinétique de la progression dans le cycle cellulaire de chacun des mutants identifiés a été analysée. La morphologie cellulaire des mutants ainsi que la morphologie des fuseaux mitotiques ont été déterminés par microscopie, alors que contenu en ADN des cellules a été déterminée par cytométrie en flux.

## **Matériel et méthodes**

### **I. Souches de levure**

Toutes les souches de levure utilisées dans la présente étude sont dérivées de la souche W303 et sont donc isogéniques, c'est-à-dire qu'elles partagent le même patrimoine génétique. Une liste descriptive des souches utilisées lors de ce projet peut être consultée dans les **Tableaux 1 et 2 de l'annexe**.

### **II. Conditions de culture cellulaire et conservation des souches**

#### 1. Conditions de culture cellulaire

Des conditions standard de culture ont été utilisées<sup>156</sup>. Toutes les souches de levure utilisées ont été cultivées dans du milieu de culture liquide riche (YEPD) à 23°C dans des incubateurs à température contrôlée de type INFORS HT, à moins qu'il ne soit mentionné autrement. Les recettes employées pour préparer les milieux de culture ont été tirées du protocole « *yeast media* » de notre laboratoire<sup>157</sup>.

#### 2. Conservation des souches

Les souches de levure sont conservées à -80°C dans du glycérol, afin de protéger l'intégrité de leurs génotypes et d'éviter l'apparition de mutations. Dans le cas où une souche doit être utilisée, une sous-culture à partir de la souche gardée à -80°C est faite sur du milieu solide riche (YEPD), à moins d'une indication contraire. La sous-culture est alors entreposée à 23°C dans des incubateurs à température contrôlée de type Binder KB115 pendant 48-72 heures. Une fois que les levures ont assez poussé, elles sont conservées à 4°C où elles peuvent être utilisées à des fins expérimentales pour la durée maximale de trois semaines. Avant que la durée maximale d'entreposage ne s'écoule, les sous-cultures doivent être refaites à partir de celles entreposées à 4°C afin d'être utilisées ultérieurement.

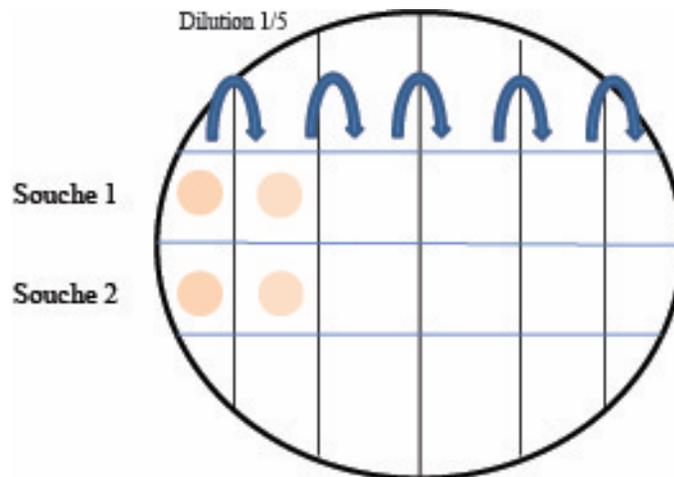
Les détails concernant les conditions de conservation des souches sont expliqués dans le protocole « *Growing yeast: Basics* » de notre laboratoire<sup>158</sup>.

### III. Recettes des milieux de culture et des solutions utilisées

Les recettes des milieux de culture et des diverses solutions utilisées lors de ce projet ont été répertoriées dans les **Tableaux 3 et 4 de l'annexe**. Le **Tableau 3** contient une liste des recettes des milieux de culture et des composés qui en font partie alors que le **Tableau 4** résume la composition des solutions utilisées.

### IV. Criblage des souches de la collection

Le criblage des souches de la collection était basé sur la détermination de leurs niveaux de croissance à 23°C, 30°C, 32°C et à 37°C par quintuple dilution en série. Brièvement, les cellules provenant de chaque souche ont été cultivées jusqu'à atteindre le début de la phase exponentielle de croissance, c'est-à-dire une D.O.<sub>600 nm</sub> entre 0,4 et 0,6. Elles ont ensuite été toutes diluées à une D.O.<sub>600 nm</sub> de 0,3; puis une quintuple dilution en série a été réalisée sur chacune d'entre elles sur du milieu de culture riche solide (YEPD) (**Figure 9**). Sur chaque plaque de YEPD figurent deux souches contrôles : la souche sauvage comme contrôle négatif de la thermosensibilité, et *cdc13-1* comme contrôle positif.



**Figure 9.** Représentation schématique de la technique de la quintuple dilution en série.

## V. Génération des mutants et criblage génétique

### 1. Génération des mutants

#### 1.1.Extraction de l'ADN génomique de levure

L'ADN génomique des souches d'intérêt a été extrait en vue d'y introduire des mutations qui serviront à créer un allèle *CDC5* thermosensible à 30°C. Les étapes d'extraction ont été suivies comme décrit dans le protocole "*Yeast transformation*" de notre laboratoire <sup>159</sup>. Lors de l'extraction de l'ADN, les cellules des souches cibles ont été suspendues dans 0,5 ml de tampon TE puis centrifugées pendant 30 secondes à 13200 rotations/minute. Une fois le surnageant éliminé, le culot de cellules a été resuspendu dans 0,2 ml de tampon de lyse cellulaire puis transféré dans un tube de 1,5 ml contenant 0,2 ml de phénol-chloroforme et 0,3 g de billes en verre. Les tubes ont été ensuite mis sur un agitateur de type VXR Basic Vibrax<sup>®</sup> à 2000 rotations/minute pendant 4 minutes pour enclencher la lyse des cellules. Une fois le processus terminé, les tubes ont été centrifugés à 13000 rotations/minute à 4°C pendant 5 minutes afin de séparer l'ADN du reste de la solution qui contient les protéines et les débris cellulaires. L'ADN se trouvant dans la phase aqueuse supérieure a été récupéré puis resuspendu dans 1 ml d'éthanol froid (4°C). Le mélange a été ensuite centrifugé pendant 5 minutes à 13000 rotations/minute. Après élimination du surnageant, l'ADN qui se trouvait dans le culot a été laissé sécher pendant 10 minutes avant d'être dissous dans 0,05 ml d'eau bi-distillée stérile.

#### 1.2.PCR mutagène dirigée

Différentes combinaisons de mutations ont été introduites dans l'ADN génomique des souches cibles par amplification PCR à faible fidélité de la séquence codante du gène *CDC5* fusionné à la cassette de sélection *ADHI-terminator-HIS3MX6* <sup>160</sup>. Lors de la PCR, deux amorces ont été utilisées : une amorce contenant les mutations ponctuelles que l'on désirait introduire et une autre amorce pour amplifier la cassette de sélection. Les produits PCR porteurs de mutations ont été utilisés pour transformer la souche sauvage et lui permettre d'introduire le gène *cdc5* muté dans son génome. Les détails concernant les amorces et la liste des combinaisons d'amorces utilisées ont été répertoriés dans les

**Tableaux 5 et 6 de l'annexe**, respectivement. Les réactions PCR ont été réalisées dans un thermocycleur de type BIO-RAD DNA Engine® en utilisant l'enzyme TaKaRa Ex Taq™ et le programme suivant :

1= 94.0 °C pour 2 minutes; 2= 94.0 °C pour 30 secondes; 3= 54.0 °C pour 30 secondes; 4= 72.0 °C pour 4 minutes; 5= Goto 2, 29 fois; 6= 72.0 °C pour 10 minutes; 7= 8.0 °C pour toujours; 8= Fin.

**Composition de chaque réaction PCR :**

0,075 ml H<sub>2</sub>O

0,01 ml Tampon Ex Taq

0,008 ml dNTPs

0,002 ml amorce #1

0,002 ml amorce #2

0,001 ml Ex Taq

0,002 ml ADNg

Après amplification, les produits PCR ont été purifiés en utilisant la trousse de purification QIAquick de QIAGEN® et en suivant le protocole du fabricant.

1.3. Transformation de levure : méthode du LiAc/*salmon sperm*-DNA/PEG

Le processus de transformation implique l'acquisition d'un ADN étranger et son intégration dans le génome de la levure hôte par recombinaison homologe. Les produits PCR de l'étape précédente, c'est-à-dire les allèles *CDC5* mutés, fusionnés à la cassette *ADHI-terminator-HIS3MX6*, ont été utilisés afin de transformer la levure de type sauvage et créer ainsi des souches mutantes. Pour ce faire, la souche sauvage a été inoculée dans 5 ml de YEPD et cultivée la nuit précédant l'expérience. Le jour de l'expérience, la densité optique (D.O.) à 600 nm a été mesurée avec un spectrophotomètre de type, puis une sous-culture à une D.O.<sub>600 nm</sub> de 0,225 et à un

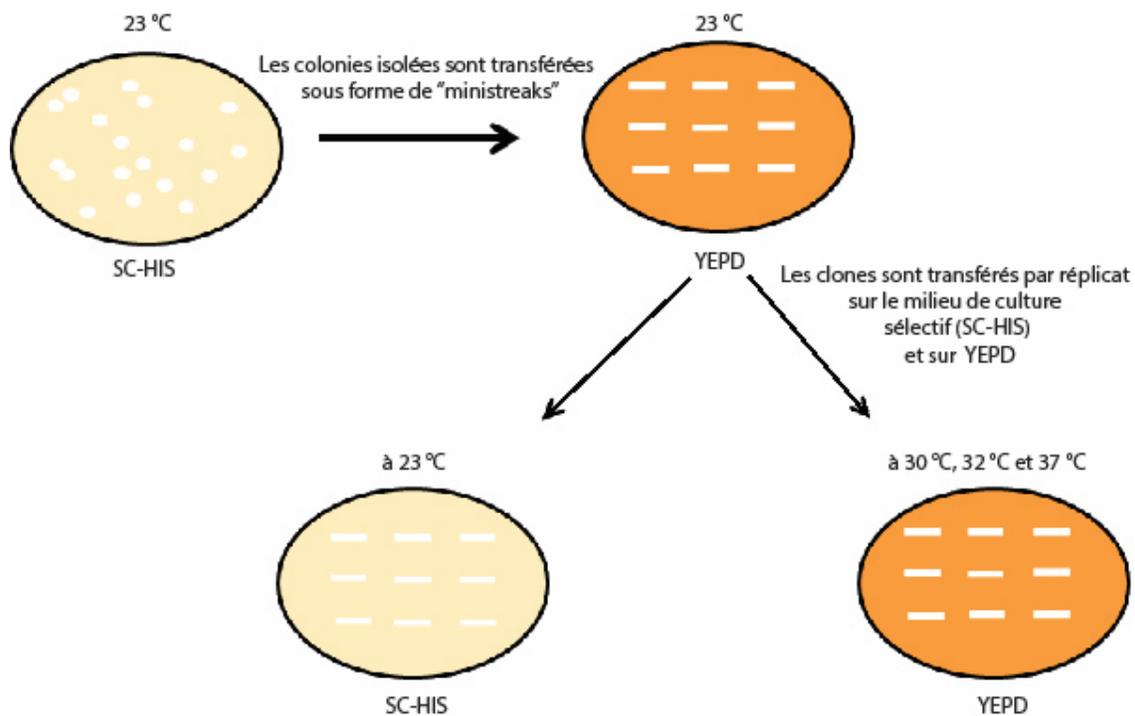
volume final de 50 ml a été préparée. Lorsque la D.O.<sub>600 nm</sub> de la sous-culture a atteint une valeur entre 0,4 et 0,7 (c'est-à-dire, en début de la phase de croissance exponentielle des levures), les cellules ont été récoltées par centrifugation à 3000 rotations/minute pendant 5 minutes. Une fois le surnageant éliminé par décantation, les cellules ont été resuspendues dans 50 ml d'eau bi-distillée stérile puis centrifugées encore à 3000 rotations/minute pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, les cellules ont été resuspendues dans 1 ml de 0,1 M LiAc puis centrifugées pendant 2 minutes à 3000 rotations/minute. Le culot a été ensuite resuspendu dans 0,4 ml de 0,1 M LiAc puis réparti de sorte qu'il y ait un échantillon de 0,075 ml pour chaque réaction de transformation. Chaque échantillon a été centrifugé à 3000 rotations/minute pendant 2 min. Une fois le surnageant éliminé, 0,240 ml de 50%PEG, 0,036 ml de 1M LiAc, 0,01 ml de sssDNA (*Salmon sperm single-stranded DNA*) à 10 mg/ml et 0,074 ml de produit PCR ont été ajoutés, dans l'ordre, au culot de chaque échantillon. Le tout a été ensuite mélangé, incubé à 30°C pendant 30 minutes puis soumis à un choc thermique à 42°C pendant 15 minutes. Ensuite, les cellules ont été centrifugées pendant 2 minutes à 3000 rotations/minutes, resuspendues dans 0,060 ml d'eau bi-distillée stérile puis étalées sur du milieu de culture solide déficient en histidine (SC-HIS) pour que seules les cellules ayant été transformées avec succès en intégrant la cassette de sélection (*ADHI-terminator-HIS3MX6*) puissent pousser.

Les étapes de la transformation et les recettes des solutions utilisées ont été réalisées selon le protocole de transformation du laboratoire <sup>159</sup>.

## 2. Criblage génétique

Environ 48-72 heures suivant la transformation de la souche sauvage avec les différents produits PCR, des colonies sont apparues sur les plaques SC-HIS. Plusieurs colonies isolées ont, dès lors, été transférées sur des plaques YEPD sous la forme de petits bâtonnets de même qu'un contrôle positif pour la thermosensibilité (*cdc13-1*), et les plaques ont été mises dans des incubateurs à 23°C. 24 heures plus tard, les clones de chaque plaque ont été transférés par réplique au velours sur une plaque de milieu sélectif (SC-HIS) entreposée à 23°C, et sur 3 plaques de milieu de culture riche (YEPD) entreposées à 30°C, à 32°C et à 37°C (**Figure 10**). Le niveau de croissance des clones a

été déterminé 24 heures suivant la réplique au velours pour les plaques à 30°C, 32°C et à 37°C, et 48 heures après pour la plaque de milieu sélectif. Le but de cette procédure était de vérifier si les clones sélectionnés étaient positifs pour le marqueur *HIS3MX6*, c'est-à-dire s'ils avaient effectivement intégré la cassette de sélection, ce qui leur aurait permis de pousser sur un milieu déficient en histidine; et s'ils étaient sensibles à 30°C, 32°C et 37°C. Les clones qui avaient réussi à croître sur le milieu SC-HIS tout en étant thermosensibles à 30°C et à 32°C ont été retenus.



**Figure 10.** Représentation schématique du processus de criblage génétique pour l'identification de clones thermosensibles.

Afin de mieux caractériser le phénotype de thermosensibilité des souches retenues, leurs niveaux de croissance ont été déterminés à 23°C, 30°C, 32°C et à 37°C, en présence de deux souches contrôles : la souche sauvage comme contrôle négatif de la thermosensibilité, et *cdc13-1* comme contrôle positif. Une fois que la thermosensibilité des souches testées a été confirmée, chacune d'entre elles a été purifiée par étalement de colonies isolées où une seule colonie a été utilisée pour générer la souche finale qui a été conservée à -80 °C. Cette procédure de purification permet de garantir l'homogénéité d'une souche, étant donné que chacune de ses cellules provient de la même colonie isolée.

### 2.1.Séquençage

Le locus *CDC5* de chacune des souches thermosensibles identifiées a été séquencé dans son intégralité. L'ADN génomique extrait a été amplifié par PCR, puis purifié par ExoSAP-IT® où il a été incubé dans le thermocycleur pendant 15 minutes à 30°C, puis à 15 minutes encore à 80°C. La liste des amorces utilisées pour l'amplification PCR du locus *CDC5* et pour le séquençage se trouve dans le **Tableau 7 de l'annexe**. Le séquençage a été réalisé à la plateforme de génomique de l'Institut de recherche en immunologie et en oncologie (IRIC) de l'Université de Montréal et les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel SEQUENCHER® (*Genes Codes Corporation*).

### 2.2.Rétrocroisement

Lors du criblage génétique qui a suivi la génération des mutants, les clones ayant intégré la cassette de sélection *HIS3MX6* tout en étant thermosensibles ont été sélectionnés. Ceci montrait juste que les clones sélectionnés possédaient les deux caractéristiques désirées, mais ne voulait pas forcément dire que les deux étaient liées, ou que les cellules étaient devenues thermosensibles à cause des mutations introduites dans le gène *CDC5* fusionné à la cassette de sélection. Pour savoir s'il y avait un lien entre le marqueur de sélection et le phénotype de thermosensibilité observé, un rétrocroisement de chaque clone retenu avec la souche sauvage a été réalisé.

Le rétrocroisement est une technique en génétique qui consiste en le croisement d'une souche porteuse d'un gène d'intérêt conjugué à un marqueur de sélection avec une

souche parentale ou une souche qui lui est isogénique <sup>161</sup>. Le but de cette manipulation est d'homogénéiser le fond génétique entre les deux souches et de créer deux souches parfaitement isogéniques, excepté pour le gène d'intérêt, grâce au phénomène de recombinaison. À travers les rétrocroisements, seuls les descendants porteurs du gène d'intérêt seront sélectionnés à l'aide du marqueur de sélection. Le rétrocroisement est utile lors du criblage génétique car il permet, en plus de sélectionner facilement les clones porteurs du gène d'intérêt grâce à la présence du marqueur de sélection, de vérifier si un phénotype précis est lié au gène d'intérêt en regardant si le marqueur de sélection coségrège avec le phénotype observé.

Suivant le même principe, les souches mutantes thermosensibles précédemment identifiées ont été rétrocroisées trois fois avec la souche sauvage afin de : (1) homogénéiser leur patrimoine génétique avec celui de la souche sauvage grâce au phénomène de la recombinaison; (2) vérifier si le phénotype de thermosensibilité observé est lié au marqueur de sélection *HIS3MX6* ou à une autre mutation dans le génome. Si le phénotype est lié au marqueur, il ne devrait pas être perdu après rétrocroisement, vu que la probabilité qu'il y ait recombinaison entre deux gènes très proches génétiquement l'un de l'autre est très faible. Par contre, si après rétrocroisement, le phénotype est perdu, cela veut dire que la mutation qui en était responsable n'était pas liée au marqueur et qu'elle était plutôt ailleurs dans le génome (mutation perdue par recombinaison). À travers les rétrocroisements, les descendants porteurs du gène *cdc5* ont été sélectionnés grâce au marqueur *HIS3MX6*, et la co-ségrégation du phénotype de thermosensibilité avec le marqueur de sélection a été vérifiée.

Le processus de rétrocroisement suivi lors de cette étude a été tiré du protocole intitulé « *Yeast mating, sporulation and dissection* » <sup>162</sup> de notre laboratoire, et peut être résumé en les étapes suivantes :

### 2.2.1. Croisement des souches et sélection des diploïdes

Des cellules provenant d'une culture de l'une des souches *cdc5* d'intérêt ont été mélangées à des cellules de type sauvage sur du milieu de culture solide riche (YEPD), et le tout a été incubé à 23°C approximativement 6 à 12 heures de temps. La souche mutante d'intérêt et la souche de type sauvage utilisée pour le rétrocroisement possèdent

deux types sexuels différents (*MATa* et *MAT $\alpha$* , respectivement), ce qui leur permet de conjuguer et de former des diploïdes. Environ 8 heures suivant l'incubation, un étalement de colonies isolées a été réalisé sur du milieu de culture solide déficient en histidine (SC-HIS) et le tout a été incubé à température non-permissive (37°C). Ce processus de double-sélection a permis la croissance et la sélection exclusives des diploïdes formés à partir d'une cellule de type sauvage, qui peut croître à 37°C, contrairement à la cellule *cdc5* qui est thermosensible, et d'une cellule provenant de la souche mutante *cdc5* qui peut croître sur du milieu déficient en histidine grâce à la présence du marqueur de sélection *HIS3MX6*, absent de la souche sauvage.

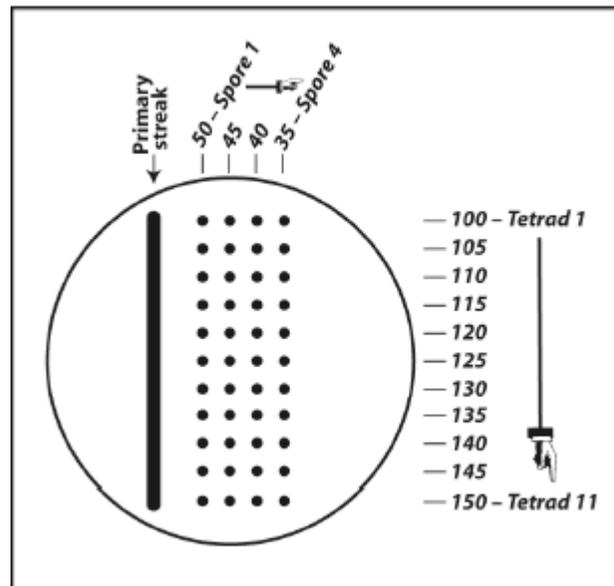
### 2.2.2. Sporulation

Lorsque les diploïdes se trouvent dans un milieu de culture pauvre en nutriments, ils sporulent et forment des asques contenant quatre spores haploïdes issus de la méiose (tétrades). Les diploïdes isolés à l'étape précédente ont été étalés sur du milieu de culture de sporulation (SPO) sous la forme de petits rectangles et incubés à température de la pièce pendant 3 jours. Une fois la durée de temps écoulée, l'état de sporulation des cellules a été vérifié par microscope optique : les petits rectangles ayant le plus de tétrades, considérés comme ayant le mieux sporulé, ont été sélectionnés pour l'étape suivante.

### 2.2.3. Dissection

Afin de pouvoir disséquer les tétrades, les parois des asques doivent être partiellement digérées à l'aide d'une enzyme appelée « *zymolyase* ». À cet effet, les cellules en provenance du petit rectangle sélectionné ont été resuspendues dans 0,025 ml de solution de *zymolyase* diluée (*zymolyase* à 0,01 g/ml diluée 10X dans 1,1 M de sorbitol), et leurs parois cellulaires ont été digérées à température de la pièce pendant 10 minutes. Une fois le temps de la digestion écoulé, un volume de 0,8 ml d'eau bi-distillée stérile a été ajouté aux cellules afin d'arrêter la réaction de digestion. Une goutte de 0,025 ml de solution de tétrades digérées a été ajoutée sur une plaque YEPD de façon à former une ligne horizontale (**Figure 11**), et la dissection a été réalisée sous microscope optique. Notez que les quatre spores de chaque ligne appartiennent à la même tétrade. Après la

dissection, les plaques ont été incubées à 23°C jusqu'à apparition des spores (environ trois jours plus tard).



**Figure 11.** Représentation schématique d'une plaque de dissection (reproduit du protocole de dissection du laboratoire) <sup>157</sup>.

Les spores ont été transférées sur des plaques YEPD sous la forme de petits bâtonnets, et les plaques ont été incubées à 23°C. 24 heures plus tard, les clones de chaque plaque ont été transférés par réplique au velours sur une plaque de milieu sélectif (SC-HIS) entreposée à 23°C, et sur 3 plaques de milieu de culture riche (YEPD) entreposées à 30°C, à 32°C et à 37°C. Les clones de chaque plaque ont également été transférés par réplique au velours sur deux plaques de milieu de culture pauvre en nutriments où l'un des deux types sexuels de la levure (*MAT a* ou *MAT α*) a été étalé, et le tout a été incubé à 23°C. L'idée derrière cette manipulation est qu'en condition de manque de nutriments, seuls les clones de type sexuel opposé à celui de la souche étalée sur la plaque pourront s'y conjuguer, former des diploïdes et donc survivre. Le niveau de croissance des clones a été déterminé 24 heures suivant la réplique au velours pour les plaques à 30°C, 32°C et à 37°C, et 48 heures après pour la plaque de milieu sélectif et les

plaques de sélection du type sexuel. La co-ségrégation du phénotype de thermosensibilité avec le marqueur de sélection *HIS3MX6* a été confirmée, c'est-à-dire que les clones *cdc5* porteurs du marqueur de sélection étaient aussi thermosensibles. Pour chaque souche rétrocroisée, deux clones de types sexuels différents, mais appartenant à la même tétrade, ont été conservés. Le clone *MATa* de chaque souche a été rétrocroisé avec la souche sauvage de type *Mata* deux fois de plus. Veuillez noter que, pour la suite des expériences, c'est le clone *MATa* qui a été utilisé.

### 2.3. Test de complémentation de l'allèle *cdc5* avec l'allèle sauvage *CDC5*

En génétique, la complémentation fait référence au fait qu'un gène introduit dans un organisme puisse compenser pour l'inactivation d'un autre et résulter en un sauvetage phénotypique. Le but du test de complémentation de *cdc5* chez la souche mutante avec l'allèle de type sauvage était de vérifier si le phénotype de thermosensibilité observé était dû à la mutation présente dans le gène *cdc5*, ou bien à une mutation dans un gène qui est proche physiquement de *CDC5* au point de co-ségréger son marqueur *HIS*. Pour ce faire, 0,005 ml de plasmide *YCplac22-CDC5::T<sub>ADHI</sub>::HIS3MX6* marqué par le marqueur de sélection tryptophane (TRP) ont servi à transformer chacune des souches mutantes, et 0,025 ml de cellules transformées ont été pris directement suivant le choc thermique, puis étalées sur du milieu de culture solide déficient en tryptophane (SC-TRP) pour que seules les cellules ayant été transformées avec succès en intégrant le plasmide puissent pousser. Une fois les colonies apparues, une colonie a été sélectionnée pour chaque souche transformée, et une purification par étalement de colonies isolées a été réalisée à partir de cette colonie à 23°C, tout en maintenant la pression de sélection (SC-TRP). Une fois les colonies isolées apparues, une seule colonie a été utilisée pour générer la souche finale complémentée. Pour vérifier si la complémentation de l'allèle mutant *cdc5* avec l'allèle sauvage a réussi, une quintuple dilution en série a été réalisée sur du milieu de culture solide déficient en tryptophane (SC-TRP) en présence d'un contrôle (la souche mutante transformée avec un plasmide vide), et les plaques ont été incubées à 23°C, 30°C et 37°C. Le résultat du test de complémentation a été déterminé 24 heures suivant l'expérience.

## VI. Caractérisation du cycle cellulaire

### 1. Synchronisation cellulaire : blocage au facteur $\alpha$

Le facteur  $\alpha$  est une phéromone libérée par les levures *MAT $\alpha$*  lorsqu'elles s'apprêtent à fusionner avec les cellules de type *MAT $\alpha$* . Lorsque le facteur  $\alpha$  se lie aux récepteurs qui lui sont spécifiques sur la surface des cellules *MAT $\alpha$* , il inhibe l'activité de Cdc28-Cln dans ces dernières, causant ainsi leur arrêt cellulaire en G1 avec une morphologie distincte caractérisée par une projection cytoplasmique appelée « *shmoo* »<sup>163</sup>. Dans le contexte de cette étude, le facteur  $\alpha$  a été utilisé pour induire la synchronisation en G1 des cellules utilisées pour l'analyse du cycle cellulaire. Lors de cette expérience, une sous-culture cellulaire de 50 ml à une D.O.<sub>600 nm</sub> de 0,225 a été préparée à partir d'une culture inoculée la veille de l'expérience. Lorsque la D.O.<sub>600 nm</sub> a atteint 0,3, la première dose de facteur  $\alpha$  (0,05 ml de la solution stock à 1000 X) a été ajoutée à la sous-culture, toujours en incubation. Une heure plus tard, la même dose lui a été rajoutée pour une autre heure d'incubation. Finalement, la 3<sup>e</sup> dose (la moitié des doses précédentes) a été ajoutée et la sous-culture a été incubée pendant 30 minutes supplémentaires. Une fois la demi-heure écoulée, la synchronisation des cellules a été vérifiée à l'aide du microscope optique et le pourcentage de cellules ayant formé un « *shmoo* » a été compté pour déterminer l'efficacité du blocage. Les cellules ont été ensuite filtrées avec des filtres de 0,45  $\mu$ m, lavées pour éliminer le facteur  $\alpha$ , puis libérées dans 50 ml de YEPD préchauffé à 32°C. Les cellules ont été dès lors incubées à 32°C dans un incubateur bain-marie, pendant 150 minutes. Des échantillons de 4 ml (1ml pour la microscopie à contraste interférentiel, 1,5 ml pour l'imagerie en fluorescence et 1,5 ml pour l'analyse de cytométrie en flux) ont été prélevés de la culture à intervalles réguliers de 15 minutes tout au long de la période d'incubation. Les échantillons recueillis ont été centrifugés pendant 1 minute à 13000 rotations/minute; puis les échantillons destinés à être utilisés en microscopie et cytométrie ont été resuspendus dans 1 ml d'éthanol à 70% alors que les échantillons de l'imagerie en fluorescence ont été fixés par resuspension dans 1ml de solution de fixation, pendant 30 minutes.

Les étapes du blocage des cellules à l'aide du facteur  $\alpha$  ont été suivies telles qu'elles ont été décrites dans le protocole « *Release from  $\alpha$ -factor arrest at non-permissive temperature* » de notre laboratoire <sup>164</sup>.

## 2. Microscopie à contraste interférentiel (DIC)

La microscopie à contraste interférentiel a été utilisée pour déterminer la morphologie des cellules de chaque échantillon prélevé. Pour ce faire, les cellules ont été d'abord lavées 3 fois dans 0,5 ml de 0,1 M KPO<sub>4</sub> pH 6,4. Ensuite, elles ont été resuspendues dans 0,3 ml de 0,1 M KPO<sub>4</sub> pH 6,4, brièvement soniquées puis visualisées sous le microscope.

## 3. Immunofluorescence (IF)

Le but de cette manipulation était de déterminer la morphologie du fuseau mitotique des cellules de chaque échantillon prélevé. Tel que décrit dans notre protocole « *Yeast immunofluorescence* » <sup>165</sup>, les cellules de chaque échantillon ont été lavées 3 fois dans 1 ml de 0,1 M KPO<sub>4</sub> pH 6,4 et une fois dans 1 ml d'IF sorbitol. Elles ont ensuite été resuspendues dans 0,225 ml de solution de digestion et incubées à 30°C pendant 30 minutes sur une roue rotatrice. Une fois la digestion terminée, les cellules ont été récoltées par centrifugation (3000 rotations/minute pendant 2 minutes), lavées dans 1 ml d'IF sorbitol puis resuspendues dans 0,9 ml d'IF sorbitol. 0,005 ml du mélange de suspension ont été transférés à chaque puits d'une lame de microscope à 15 puits (*15-well capacity Multi-test slide, MP Biomedicals*) préalablement tapissée de 0,1% polylysine. Après élimination des cellules qui ne s'étaient pas adhérees aux puits à l'aide de l'aspirateur, les lames ont été plongées dans du méthanol à -20°C pendant 3 minutes, puis dans de l'acétone à -20°C pendant 10 secondes. Les lames ont été ensuite entreposées dans des chambres humides (boîtes de pétri humides recouvertes avec de l'aluminium), et un volume de 0,005 ml d'anticorps primaire ( $\alpha$ -tubuline, Gene Tex, Inc., dilution 1:250 dans du PBS-BSA) a été ajouté dans chaque puits. Suite à une incubation de 2 heures à température de la pièce, chaque puits a été lavé 5 fois avec 0,010 ml de PBS-BSA, après quoi 0,005 ml d'anticorps secondaire ( $\alpha$ -Rat FITC, dilution 1:96 dans du PBS-BSA) ont été ajoutés dans chaque puits. Après 2 heures d'incubation à température de la pièce, les puits ont été lavés comme décrit précédemment, puis 0,001 ml de DAPI-Mount ont été

ajoutés dans chaque puits. Les lames ont été couvertes par des lamelles, puis scellées avec du vernis. Une fois le vernis sec, les lames ont été visualisées au microscope.

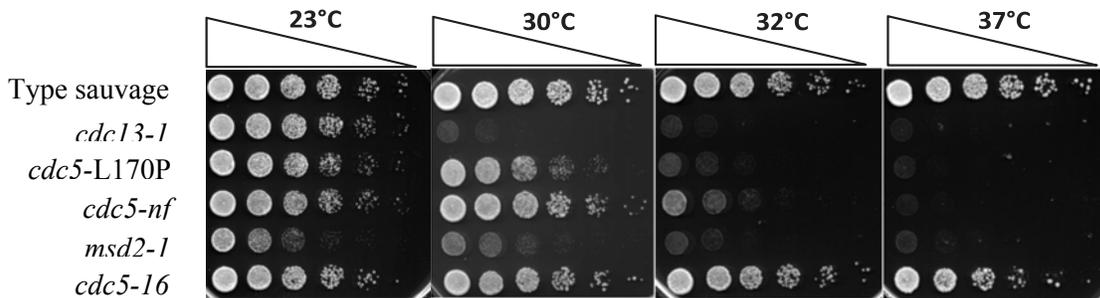
#### 4. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux a été utilisée pour quantifier le contenu d'ADN des cellules de chaque échantillon. La procédure employée est telle que décrite <sup>166</sup>, avec quelques modifications. Brièvement, les culots de cellules ont été lavés dans du 50 mM Tris-HCl à pH 7,5, brièvement soniqués, puis incubés pendant 3 heures à 42°C dans 0,2 ml de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) et 0,02 ml de RNase A (Sigma). Une fois la durée d'incubation écoulée, les culots ont été incubés à 50°C dans 0,2 ml de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) et 0,02 ml de protéinase K (Sigma). Les cellules ont été ensuite resuspendues dans 0,1 ml de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) et conservées à 4°C. Tout juste avant l'analyse de cytométrie en flux, l'ADN génomique des cellules a été marqué à l'aide de 1µM Sytox Green (Molecular Probes). La quantification du contenu d'ADN a été réalisée en utilisant le cytomètre et le logiciel FACSDiva (BD Biosciences). Les données brutes ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star, Inc.).

## Résultats

Afin de pouvoir identifier le substrat de Cdc5 lors de la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN, il était important de procéder à une analyse du phosphoprotéome de Cdc5 *in vivo*. L'analyse du phosphoprotéome nécessitait l'utilisation d'un allèle *CDC5* thermosensible à une température de 30 °C, afin d'éviter les problèmes de phosphorylation non-spécifiques qu'il y aurait eu si des mutants thermosensibles à 37 °C auraient été utilisés à la place <sup>155</sup>. Il fallait donc identifier/générer un allèle *CDC5* thermosensible à une température de 30 °C, puis caractériser son cycle cellulaire.

La première étape a été d'identifier un tel allèle parmi les souches de la collection. La quintuple dilution en série réalisée avec les mutants *cdc5* de la collection à 23°C, 30°C, 32°C et à 37°C avait montré que la souche *msd2-1 (cdc5-2)* était thermosensible à une température de 30°C (**Figure 12**). Par contre, cette souche avait un défaut de croissance à 23°C, ce qui aurait été problématique si elle avait eu à être utilisée lors des prochaines étapes. Néanmoins, l'expérience avait permis d'identifier un allèle du gène *CDC5* thermosensible à une température de 32°C : l'allèle *cdc5-L170P* (**Figure 12**). Cet allèle a été utilisé, de même que d'autres allèles du gène *CDC5*, afin de générer de nouveaux mutants *cdc5* thermosensibles à une température de 30°C. En utilisant l'allèle *cdc5-L170P* comme souche matrice, notre hypothèse était que la mutation des résidus adjacents à la mutation du résidu 170, c'est-à-dire la mutation des résidus 169, 171 et 172, résulterait en l'aggravation du phénotype de thermosensibilité de la souche à 30°C. L'utilisation des autres souches *cdc5* mutantes avait pour but d'introduire des mutations dans leurs résidus 170, car notre hypothèse était que ce résidu était un résidu important du domaine kinase. De ce fait, sa mutation jumelée à d'autres mutations initialement portées les souches matrices devrait résulter en un phénotype de thermosensibilité à 30°C.



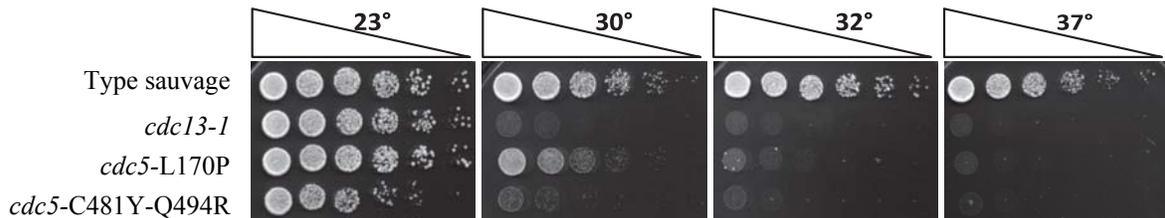
**Figure 12. Identification de *cdc5-L170P* comme étant un allèle thermosensible à 32°C.** Le niveau de croissance de chacun de ces mutants *CDC5* à température permissive (23°C) et à températures restrictives (30°C, 32°C et 37°C) a été déterminé par une quintuple dilution en série « drop-test » sur YEPD, en comparaison avec celui des deux contrôles: la souche sauvage (contrôle négatif de la thermosensibilité) et *cdc13-1* (contrôle positif de la thermosensibilité).

Le criblage génétique qui a suivi la création de nouveaux mutants *cdc5* a révélé que la plupart des clones obtenus à partir des différentes PCR ne pouvaient être utilisés pour la suite du projet étant donné qu'ils n'étaient pas du tout thermosensibles ou qu'ils l'étaient à des températures plus élevées que 30°C. Les processus de génération de mutants et de criblage génétique ont été répétés à maintes reprises et ont montré qu'aucun clone obtenu à partir des réactions PCR réalisées sur l'ADN génomique extrait des souches autres que la souche *cdc5-L170P* n'était thermosensible, ou ne l'était à 30°C. Par contre, les PCR qui ont utilisé l'ADN génomique de *cdc5-L170P* ou de souches obtenues à partir de la mutation des résidus adjacents du résidu 170 chez *cdc5-L170P* comme matrice ont permis la création de quelques souches qui étaient thermosensibles à une température de 30°C, dont les souches *cdc5-17* et *cdc5-18*.

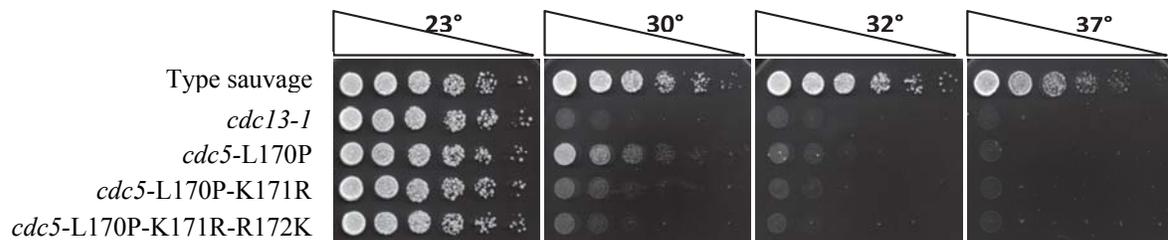
## 1. Création de *cdc5-17* et *cdc5-18*, deux allèles thermosensibles à 30°C

Les processus de génération des mutants et de criblage génétique ont permis l'identification de deux souches qui étaient extrêmement thermosensibles à 30°C : les souches *cdc5-C481Y-Q494R* et *cdc5-L170P-K171R-R172K*, nommées *cdc5-17* et *cdc5-18* respectivement (**Figure 13**). Le mutant *cdc5-17* provient de la PCR mutagène réalisée avec l'amorce portant la mutation L170P et K171M sur l'ADN génomique de la souche *cdc5-L170P*, alors que le clone *cdc5-18* est issu de la PCR mutagène réalisée en utilisant l'amorce portant les mutations L170P, K171R et R172K sur l'ADN génomique de la souche *cdc5-L170P-K171R* qui a été obtenue en mutant le résidu 171 de *cdc5-L170P*.

A)



B)

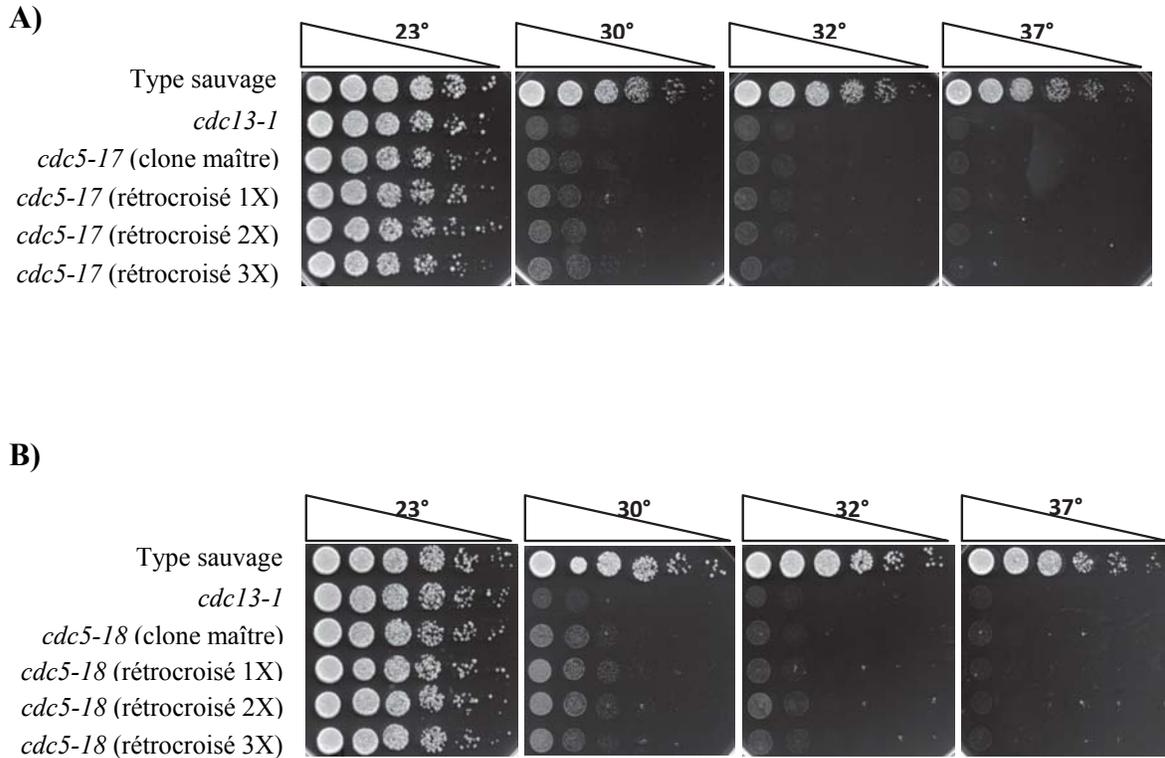


**Figure 13.** Identification de *cdc5-17* et *cdc5-18* comme étant des allèles *CDC5* thermosensibles à 30°C. (La légende de la figure suit à la page suivante).

Le phénotype de thermosensibilité de chacun des deux allèles à température permissive (23°C) et à températures élevées (30°C, 32 °C et 37°C) a été déterminé par quintuple dilution en série sur YEPD, en comparaison avec celui de la souche sauvage (contrôle négatif de la thermosensibilité), de la souche *cdc13-1* (un contrôle positif de la thermosensibilité) et de(s) la souche(s) ayant servi de matrice pour obtenir le mutant actuel.

- A) Phénotype de thermosensibilité de *cdc5-17* en comparaison avec celui des deux contrôles et de *cdc5-L170P*, la souche originelle qui a été mutée pour obtenir le mutant actuel.
- B) Phénotype de thermosensibilité de *cdc5-18* comparativement à celui des deux contrôles et de *cdc5-L170P-K171R*, la souche qui a servi à créer le mutant actuel, et de *cdc5-L170P* la souche mère de *cdc5-L170P-K171R*.

Par ailleurs, les résultats ont montré que, tout au long du processus de sélection et de rétrocroisement avec la souche sauvage, les mutants *cdc5-17* et *cdc5-18* ont tous les deux montré une co-ségrégation du phénotype de thermosensibilité avec le marqueur –HIS (résultat non-illustré). La **Figure 14** à la page suivante montre le maintien du phénotype de thermosensibilité à travers les rétrocroisements de *cdc5-17* et *cdc5-18* avec la souche sauvage (**onglet A et onglet B, respectivement**).

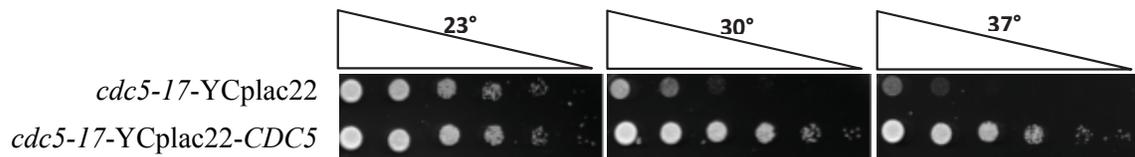


**Figure 14. Confirmation du phénotype de thermosensibilité de *cdc5-17* et de *cdc5-18* après chaque rétrocroisement avec la souche sauvage.** Le phénotype de thermosensibilité a été déterminé par quintuple dilution en série sur YEPD à 23°C, 30°C, 32°C et à 37°C, en comparaison avec celui des souches contrôles : le type sauvage (contrôle négatif de la thermosensibilité) et *cdc13-1* (contrôle positif de la thermosensibilité), ainsi qu'avec celui du clone maître (souche originelle).

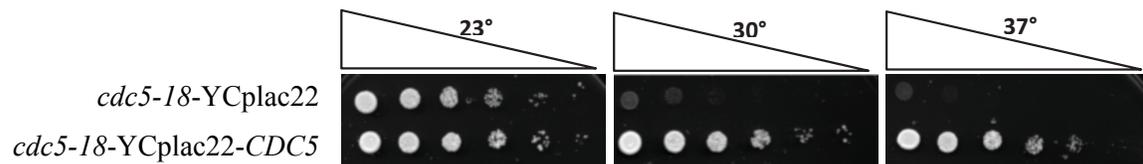
- A) Quintuple dilution en série des trois clones issus des 3 rétrocroisements du mutant *cdc5-17* avec la souche sauvage, en présence des deux contrôles et du clone maître (*cdc5-17* originel).
- B) Quintuple dilution en série des trois clones issus des 3 rétrocroisements du mutant *cdc5-18* avec le type sauvage, en présence des deux contrôles et du clone maître (*cdc5-18* originel).

Le test de complémentation de chacun des allèles créés avec l'allèle *CDC5* a montré un sauvetage du phénotype de thermosensibilité à 30°C et à 37°C (**Figure 15**).

A)



B)



**Figure 15. Test de complémentation de *cdc5-17* et *cdc5-18* avec l'allèle *CDC5*.** Quintuple dilution en série réalisée sur SC-TRP (milieu de culture déficient en tryptophane) des souches mutantes *cdc5-17* et *cdc5-18* transformées avec le plasmide *YCplac22-CDC5*, en présence des contrôles *cdc5-17-YCplac22* et *cdc5-18-YCplac22* contenant tous les deux un plasmide vide.

- A) Complémentation de l'allèle *cdc5-17* avec l'allèle *CDC5* et sauvetage phénotypique.
- B) Complémentation de l'allèle *cdc5-18* avec l'allèle *CDC5* et sauvetage phénotypique.

L'étape suivante du projet a été d'analyser le cycle cellulaire de *cdc5-17* et celui de *cdc5-18* à 32°C afin de caractériser la progression du cycle cellulaire de chacun de ces deux mutants à la température mentionnée précédemment, c.à.d. à la température à laquelle les deux allèles *cdc5* créés seraient inactivés. Les échantillons récupérés ont été soumis à une analyse de la morphologie cellulaire par microscopie à contraste interférentiel (DIC), de la morphologie des fuseaux mitotiques par immunofluorescence (IF) et du contenu d'ADN des cellules par cytométrie en flux. Les analyses entreprises ont mené aux observations suivantes :

## **2. Blocage des cellules de *cdc5-17* et *cdc5-18* en fin de mitose en tant que cellules bourgeonnées avec un gros bourgeon**

Les résultats de l'analyse des cellules par microscopie à contraste interférentiel (DIC) des deux mutants a montré que les cellules de *cdc5-17* et de *cdc5-18* restaient bloquées sous la forme bourgeonnée, tout comme les cellules de *cdc14-3* qui sont connues pour rester ainsi en fin du cycle cellulaire, et contrairement aux cellules sauvages qui continuent à cycler, c.à.d. qui terminent le 1er cycle cellulaire puis entament un second qu'elles complètent aussi durant le temps de l'analyse) (**Onglet A, Figure 16 et Onglet A, Figure 17 pour *cdc5-17* et *cdc5-18* respectivement**).

Les résultats ont également permis de voir que les cellules bourgeonnées de *cdc5-17* étaient beaucoup plus grosses que celles du type sauvage et avaient un gros bourgeon. De plus, les morphologies adoptées par les cellules bourgeonnées de *cdc5-17* étaient différentes au sein de la même population, ce qui a donné naissance à une population non-homogène. **L'onglet B de la Figure 16** représente un aperçu des différentes morphologies bourgeonnées observées chez *cdc5-17* en fin de mitose, en comparant la taille de ces cellules avec des cellules bourgeonnées du type sauvage.

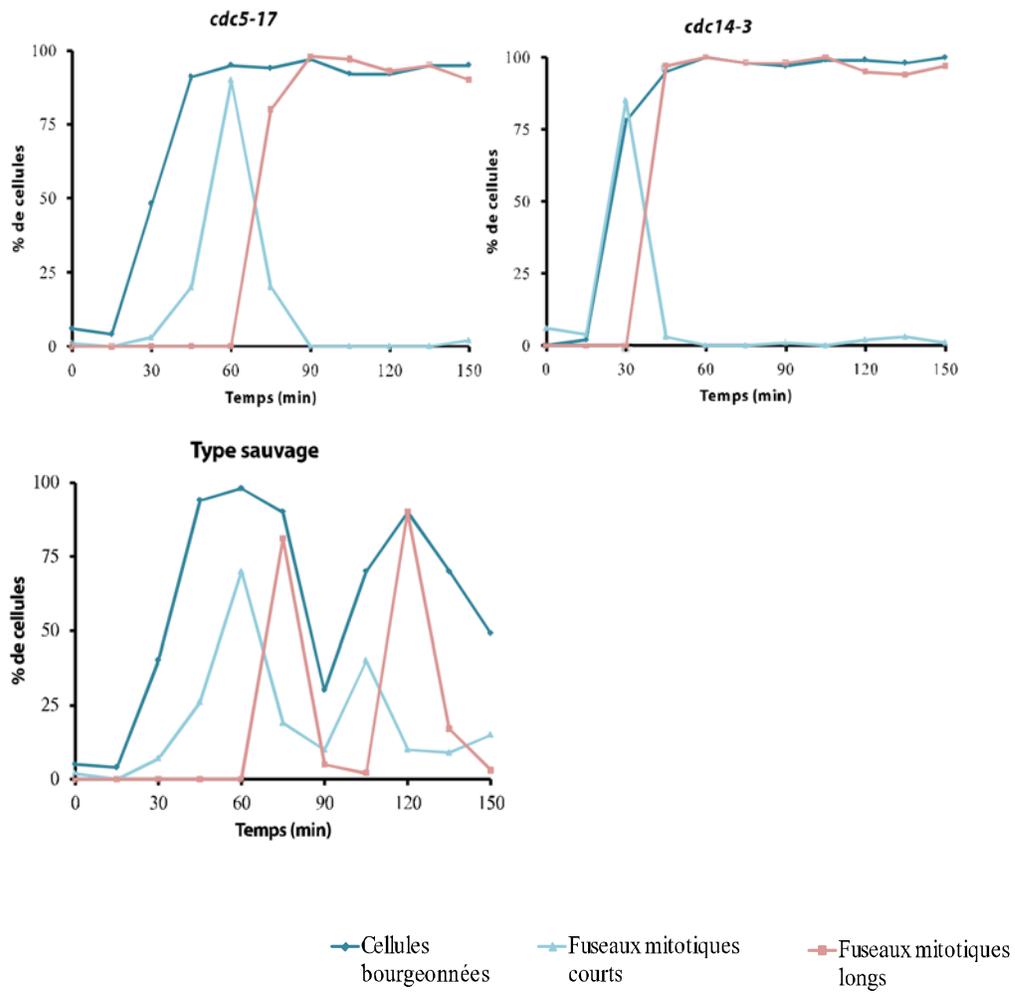
En ce qui concerne *cdc5-18*, les résultats de DIC ont montré que ses cellules restaient également bloquées sous la forme de grosses cellules bourgeonnées avec un gros bourgeon. Les cellules de *cdc5-18* étaient plus grosses que celles du type sauvage, mais elles l'étaient moins que celles de *cdc5-17*. De plus, la population de cellules de *cdc5-18* était beaucoup plus homogène que celle de *cdc5-17* (**Onglet B de la Figure 17**).

### 3. Arrêt cellulaire uniforme en fin de mitose (en anaphase)

La phase du cycle cellulaire à laquelle les cellules s'arrêtent a été déterminée à l'aide des résultats d'IF (en regardant la forme des microtubules et la ségrégation de l'ADN) et confirmée par les résultats de la cytométrie en flux (en quantifiant l'ADN dans les cellules). La quantification des types de microtubules (courts ou longs) observés tout au long de l'analyse du cycle cellulaire a permis de voir que les cellules de *cdc5-17* et de *cdc5-18* restaient bloquées avec des microtubules longs, tout comme *cdc14-3* (**Onglet A de la Figure 16 et Onglet A de la Figure 17, pour *cdc5-17* et *cdc5-18* respectivement**). L'onglet C dans les Figures 16 et 17 illustre le résultat de l'onglet A dans les mêmes figures, en montrant des cellules avec des microtubules longs et deux masses d'ADN séparées ou en train de se séparer, ce qui est typique de ce qui aurait été observé en fin de mitose (anaphase). Les résultats obtenus pour les deux mutants étaient similaires à ceux de *cdc14-3* qui est connu pour rester bloqué en fin de mitose avec des microtubules longs.

Les résultats de la cytométrie en flux ont confirmé que les cellules des deux mutants étaient bien restées bloquées en fin de mitose en montrant que la quantité d'ADN dans ces cellules était  $2n$ . Ces résultats sont semblables à ceux obtenus pour le contrôle *cdc14-3* (**Onglet D de la Figure 16 et Onglet D de la Figure 17 pour *cdc5-17* et *cdc5-18* respectivement**).

A)



B)

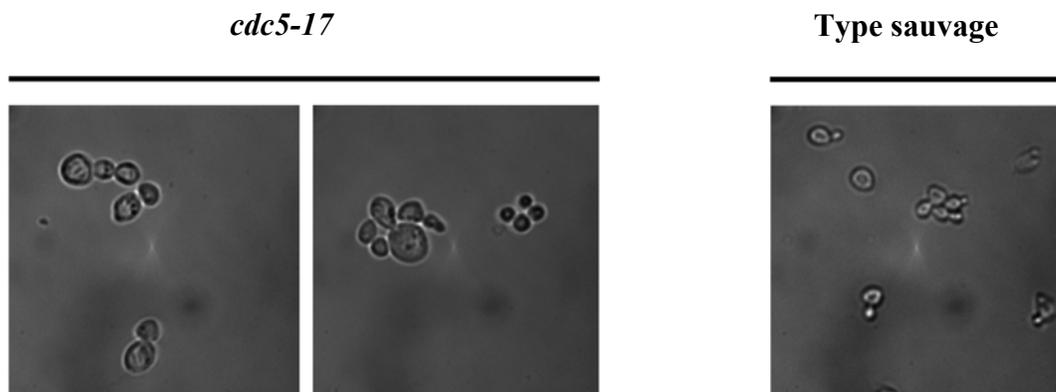
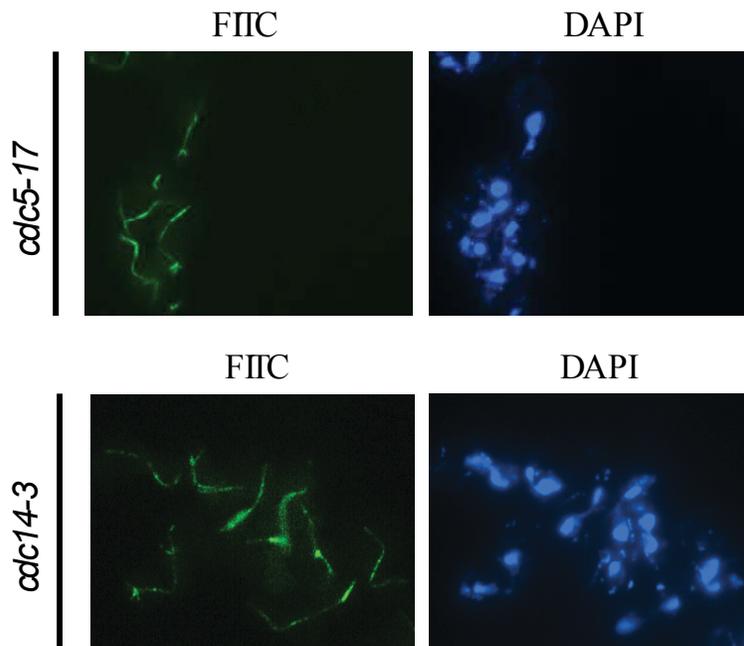
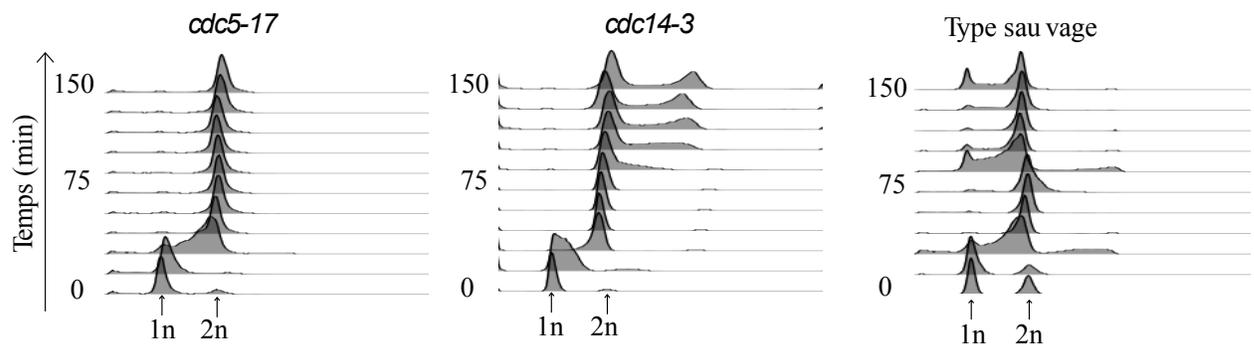


Figure 16. Analyse du cycle cellulaire de *cdc5-17*. (Les onglets C et D ainsi que la légende de la figure suivent).

C)

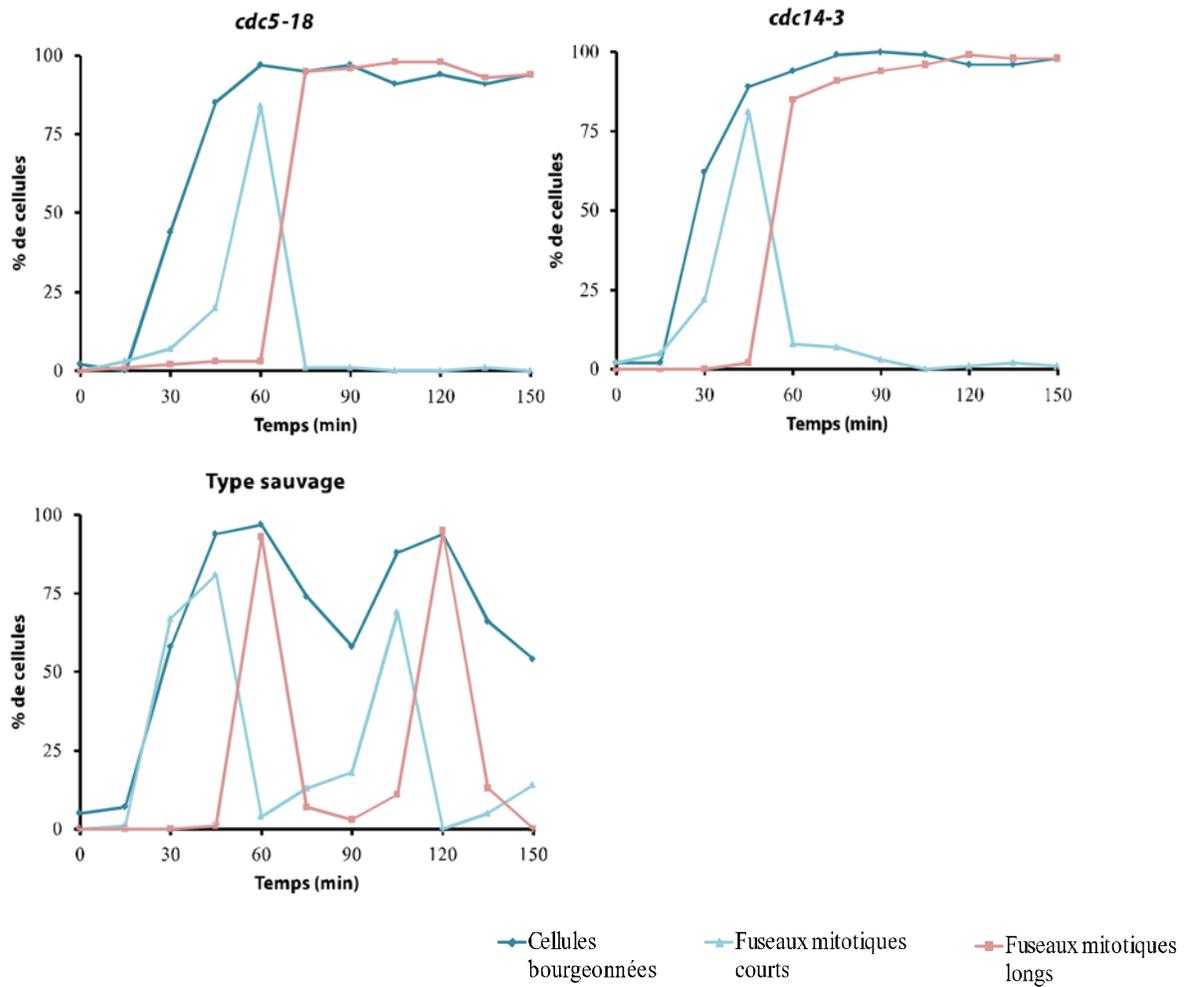


D)



**Figure 16. Analyse du cycle cellulaire de *cdc5-17*.** La progression dans le cycle cellulaire a été déterminée pour *cdc5-17* et les deux souches contrôles (*cdc14-3* et le type sauvage) après synchronisation des cellules en G1 en utilisant le facteur  $\alpha$ , et la libération des cellules dans du YEPD à 32°C. Les échantillons de chacune des souches ont été recueillis à intervalles réguliers de 15 minutes pour (A) évaluer le pourcentage des cellules bourgeonnées (indice de bourgeonnement) et la longueur des microtubules, (B) déterminer la morphologie terminale des cellules, (C) déterminer la morphologie des fuseaux mitotiques, et (D) quantifier l'ADN des cellules.

A)



B)

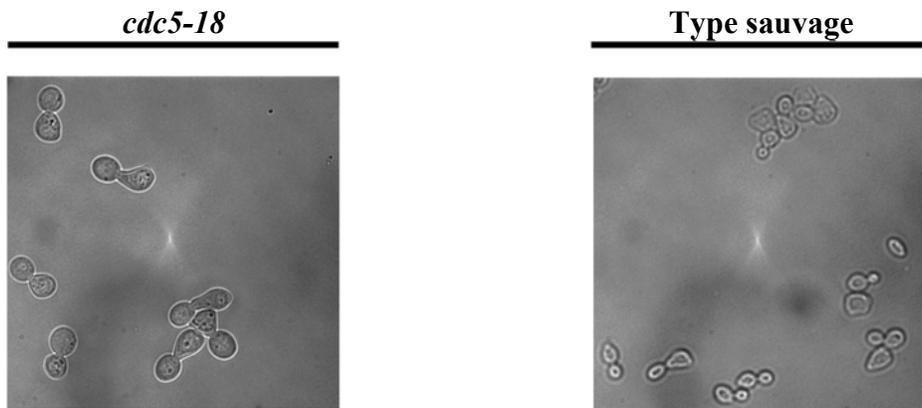
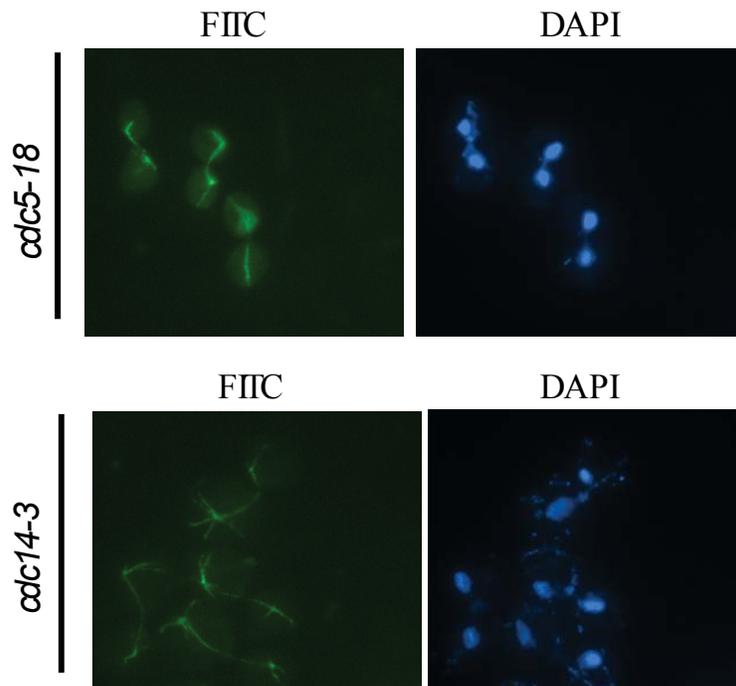
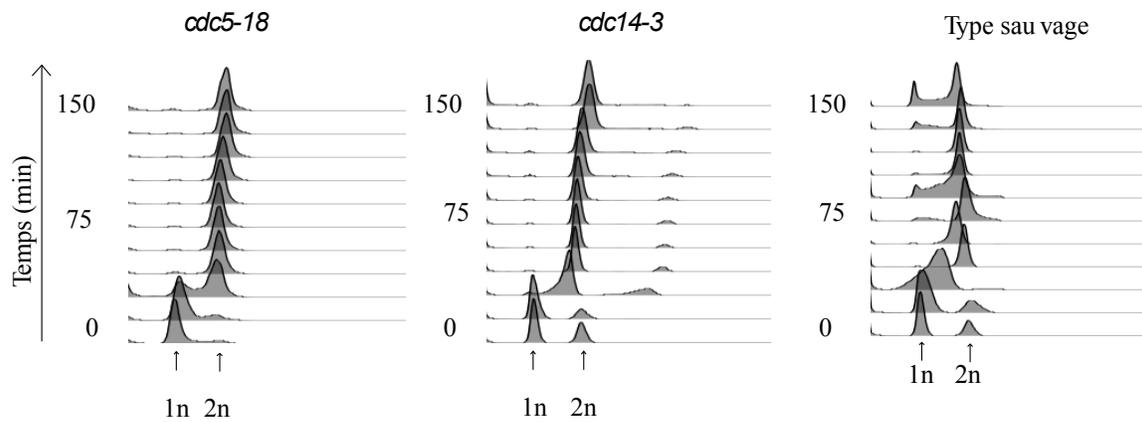


Figure 17. Analyse du cycle cellulaire de *cdc5-18*. (Les onglets C et D et la légende suivent)

C)



D)



**Figure 17. Analyse du cycle cellulaire de *cdc5-18*.** La progression dans le cycle cellulaire a été déterminée pour *cdc5-18* et les deux souches contrôles (*cdc14-3* et le type sauvage) après synchronisation des cellules en G1 en utilisant le facteur  $\alpha$ , et la libération des cellules dans du YEPD à 32°C. Les échantillons de chacune des souches ont été recueillis à intervalles réguliers de 15 minutes pour (A) évaluer le pourcentage des cellules bourgeonnées (indice de bourgeonnement) et la longueur des microtubules, (B) déterminer la morphologie terminale des cellules (C) déterminer la morphologie des fuseaux mitotiques, et (D) quantifier l'ADN des cellules.

## Discussion

Les kinases de la famille Polo (PLK) orchestrent tout un éventail d'événements du cycle cellulaire allant de l'entrée en mitose jusqu'à la cytokinèse <sup>133</sup>. Récemment, notre laboratoire a montré que PLK/Cdc5 (la kinase PLK chez *Saccharomyces cerevisiae*) promouvait, via son domaine Polo-box (PBD), la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN. Il a également montré que le substrat de Cdc5 lors de cette réponse était localisé dans les centrosomes de levure appelés SPB <sup>154</sup>. Dans le but d'identifier ce substrat, une analyse du phosphoprotéome intégral de Cdc5 *in vivo* devait être réalisée en utilisant un allèle *CDC5* thermosensible à 30°C.

En vue d'identifier un allèle *CDC5* thermosensible à une température de 30°C, nous avons commencé par regarder si un tel allèle n'existait pas déjà dans notre collection. Pour ce faire, des mutants *cdc5* ont été soumis à une quintuple dilution en série afin de déterminer le niveau de croissance des souches à 23°C, 30°C, 32°C et à 37°C. Le résultat de l'expérience a montré que la souche *msd2-1 (cdc5-2)* était thermosensible à une température de 30°C (**Figure 12**), mais qu'elle présentait un défaut de croissance à température permissive, soit à 23°C, ce qui rendait son utilisation lors de notre projet impossible. Ceci dit, bien qu'aucun autre allèle *cdc5* thermosensible à 30°C n'ait été identifié, cette expérience a désigné l'allèle *cdc5-L170P* comme étant un allèle thermosensible à une température de 32°C. Nous avons donc pensé que le résidu 170 serait un résidu important, vu que sa mutation avait conféré à la souche qui la portait, la souche *cdc5-L170P*, un défaut de croissance à température non-permissive. Notre hypothèse était donc que la mutation du résidu 170 dans des souches ayant d'autres mutations dont quelques-unes qui leur conféraient déjà un phénotype de thermosensibilité à haute température, ou bien la mutation des résidus 169, 171 et 172 qui sont adjacents au résidu 170 dans la souche *cdc5-L170P* déstabiliseraient encore plus la structure de la protéine dans la zone de la mutation initiale et résulteraient en la création de mutants thermosensibles à 30°C. L'étape suivante du projet a été donc de générer des mutants *cdc5* thermosensibles à 30°C par PCR mutagène dirigée en utilisant l'ADN génomique en provenance de la souche *cdc5-L170P* et de d'autres mutants *cdc5*.

## 1. La mutation du résidu 170 et de ses résidus adjacents résulte en un phénotype de thermosensibilité à une température de 30°C

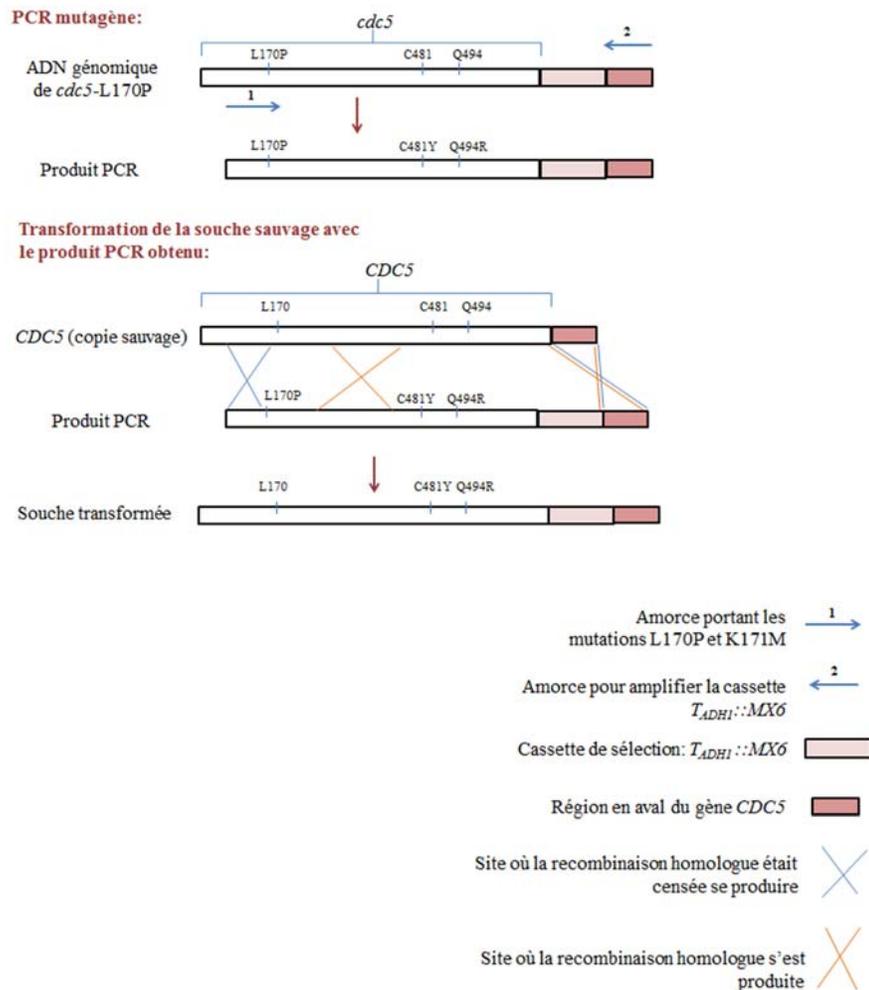
Les résultats du criblage génétique qui a suivi la génération des mutants avaient montré que les clones issus de la mutation du résidu 170 dans les souches portant initialement d'autres mutations dans leur gène *CDC5* n'étaient pas thermosensibles, ou ne l'étaient pas à une température de 30°C; alors que les clones issus de la mutation des résidus adjacents du résidu 170 dans la souche *cdc5-L170P* (comme *cdc5-L170P-K171R*) ou dans d'autres souches elles-mêmes créées à partir de la souche *cdc5-L170P* (comme *cdc5-L170P-K171R-R172K* créée à partir de *cdc5-L170P-K171R*) étaient bien thermosensibles à 30°C. Une des raisons pour lesquelles la mutation du résidu 170 des autres mutants *cdc5* n'ait pas donné de clones thermosensibles pourrait être que les mutations préalablement présentes dans leurs gènes *cdc5* respectifs auraient pu jouer le rôle d'un suppresseur et abolir ainsi le phénotype de thermosensibilité qui aurait dû apparaître avec la mutation du résidu 170 (suppression intragénique). D'un autre côté, une mutation introduite ailleurs dans le génome aurait également pu jouer le rôle du suppresseur et faire en sorte que la souche créée ne soit pas thermosensible (suppression intergénique). Dans le cas des clones issus de la mutation du résidu 170 dans des souches portant initialement d'autres mutations dans le gène *cdc5*, qui avaient montré un phénotype de thermosensibilité à température élevée mais pas à 30°C, la cause pourrait être expliquée par le fait que la mutation du résidu 170 à elle-seule, bien qu'elle puisse affecter la croissance cellulaire et causer un phénotype de thermosensibilité à température non-permissive telle que 32°C, n'est pas suffisante pour induire un changement notable de la structure de la protéine, affecter considérablement son activité et résulter en un phénotype de thermosensibilité à 30°C. Cette explication est d'autant plus appuyée par le fait que la souche *cdc5-L170P* est devenue thermosensible à 30°C seulement après la mutation des résidus adjacents du résidu 170, c'est-à-dire des résidus 171 et 172, tel qu'observé sur la **Figure 13** dans la section des résultats, où on voit que les souches *cdc5-L170P-K171R* et *cdc5-L170P-K171R-R172K* sont nettement plus thermosensibles à 30°C que la souche initiale. Ceci montre donc que le phénotype de thermosensibilité observé à 30°C est dû à la mutation des résidus adjacents au résidu 170. Cette mutation a

perturbé la structure de la protéine dans la région de la mutation initiale et a résulté en une aggravation du phénotype de thermosensibilité de la souche matrice. Notre observation confirme, en conséquence, notre hypothèse de départ en ce qui concerne l'étape de la PCR mutagène dirigée, qui était que la mutation des résidus adjacents du résidu 170 aggraverait le phénotype de thermosensibilité observé chez la souche *cdc5-L170P* et résulterait en un phénotype de sensibilité à une température de 30°C.

## **2. Identification de *cdc5-17*, un mutant de l'IDL, et de *cdc5-18* un mutant du domaine kinase comme étant thermosensibles à 30°C**

Parmi les mutants *cdc5* thermosensibles à 30°C obtenus suite à la procédure de criblage génétique, deux clones ont été identifiés comme étant très sensibles à cette température: *cdc5-C481Y-Q494R* et *cdc5-L170P-K171R-R172K*, appelés *cdc5-17* et *cdc5-18*, respectivement (**Onglet A et Onglet B de la Figure 13 pour *cdc5-17* et pour *cdc5-18*, respectivement**). Le clone *cdc5-18*, un mutant du domaine kinase, a été obtenu par PCR mutagène en utilisant l'amorce portant les mutations L170P, K171R et R172K sur l'ADN génomique provenant de la souche *cdc5-L170P-K171R*. Le mutant *cdc5-17*, un mutant du domaine IDL, provient quant à lui de la PCR mutagène réalisée avec l'amorce portant les mutations L170P et K171M sur l'ADN génomique de la souche *cdc5-L170P*. Pourtant, les mutations qu'il porte sont différentes de celles censées être introduites dans l'ADN génomique de *cdc5-L170P*, et il n'a plus la mutation L170P. L'explication de ce résultat réside dans la compréhension de ce qui s'est produit lors des deux étapes majeures de la génération des mutants, c'est-à-dire lors de la PCR mutagène et de la transformation du produit PCR obtenu dans la souche sauvage. La **Figure 18** de la page suivante schématise ce qui s'est produit lors de ces deux étapes. En effet, c'est lors de la PCR mutagène dirigée réalisée sur l'ADN génomique de *cdc5-L170P* avec l'amorce contenant les mutations L170P et K171M que les mutations C481Y et Q494R ont dû apparaître à cause d'une erreur de la polymérase Ex Taq. Le produit PCR alors obtenu contenait les mutations L170P-K171M(?) -C481Y-Q494R (le point d'interrogation réfère au fait que l'on ne sait pas si la mutation K171M a été introduite ou pas dans le produit PCR étant donné qu'il n'a pas été séquencé). Lors de la transformation du produit PCR obtenu dans la souche sauvage, ce dernier s'est inséré par recombinaison

homologue en aval du résidu 170 (ou du résidu 171, si la mutation K171M était réellement présente dans le produit PCR), ce qui a fait que ni la mutation du résidu 170 ni celle du résidu 171 ne figure dans la séquence de la souche nouvellement créée, alors que les mutations C481Y et Q494R y ont été introduites. Les résultats de la quintuple dilution en série de *cdc5-17* ainsi que *cdc5-18* (**Onglet A et Onglet B, de la Figure 13, respectivement**) montrent bien que les deux souches sont très sensibles à une température de 30°C. De plus, ils montrent bien la sévérité de leur phénotype de thermosensibilité à 30 °C, comparativement à celui de *cdc5-L170P*.



**Figure 18. Schéma explicatif de la façon dont *cdc5-17* a été généré.** (La légende de la figure suit à la page suivante).

Les mutations C481Y et Q494R, des mutations du domaine IDL, ont été introduites dans l'ADN génomique de *cdc5-L170P* à cause d'une erreur de la polymérase Ex Taq. Le produit PCR obtenu a été utilisé pour transformer la souche sauvage. Le processus de transformation est basé sur la recombinaison entre deux régions homologues présentes dans la souche transformée et dans la séquence que l'on veut intégrer. Dans ce cas-ci, la recombinaison ne s'est pas produite comme ce à quoi on s'attendait, c'est-à-dire entre la région en amont du résidu 170 et la région en aval de la cassette de sélection (flèches bleues), mais plutôt entre la région en aval du résidu 170 et la région en aval de la cassette de sélection (flèches oranges), ce qui a fait que la mutation du résidu 170 ne figure pas dans la séquence de la souche nouvellement créée, alors que les mutations C481Y et Q494R y ont été introduites.

Les résultats de rétrocroisement de chacune des souches mutantes avec le type sauvage ont montré une co-ségrégation du phénotype de thermosensibilité avec le marqueur de sélection *-HIS3MX6*, ce qui prouve que la mutation à l'origine de ce phénotype est liée au marqueur de sélection et, donc, au gène *CDC5* (résultats non-illustrés). La quintuple dilution en série des trois rétrocroisements des mutants *cdc5-17* et *cdc5-18* avec le type sauvage (**Onglet A et Onglet B, de la Figure 14, respectivement**) montrent le maintien du phénotype de thermosensibilité à travers les rétrocroisements, appuyant encore plus le fait selon lequel la cause du phénotype est liée au marqueur *-HIS3MX6*. Pourtant, ce résultat ne prouve pas que la mutation responsable du phénotype de thermosensibilité soit présente dans le gène *CDC5*; la mutation peut très bien se trouver dans un gène qui est tellement proche de *CDC5* au point de co-ségréger avec lui. La quintuple dilution du test de complémentation des deux allèles *cdc5-17* et *cdc5-18* (**Onglet A et Onglet B, de la Figure 15, respectivement**) avec l'allèle sauvage *CDC5* a montré un sauvetage phénotypique dans les deux cas, prouvant ainsi pour de bon que les mutations présentes chez *cdc5-17* et *cdc5-18* sont bien responsables du phénotype de thermosensibilité observé.

### **3. *cdc5-17* et *cdc5-18* restent actifs sur le plan métabolique après exposition à température non-permissive**

Les résultats d'analyse du cycle cellulaire à 32°C des deux mutants ont montré que les cellules de *cdc5-17* et *cdc5-18* restaient bloquées en fin de mitose en tant que cellules bourgeonnées dotées d'une taille supérieure à celle d'une cellule du type sauvage et possédant un gros bourgeon (**Onglets A et B de la Figure 16 et Onglets A et B de la Figure 17, pour *cdc5-17* et *cdc5-18*, respectivement**). L'explication de cette observation a déjà été fournie par une étude de *Johnston et al.* (1977) dans laquelle des mutants *cdc* exposés à des températures non-permissives subissaient un arrêt de la division cellulaire tout en continuant à être actifs sur le plan métabolique et à croître jusqu'à atteindre le double de la taille qu'ils auraient atteinte à température permissive<sup>167</sup>. La présence de grosses cellules bourgeonnées a, par ailleurs, été observée par notre laboratoire chez le mutant *cdc5-16*, un mutant du domaine boîte Polo, lors de son exposition à température restrictive<sup>154, 168</sup>. Ceci dit, les observations que nous avons faites par microscopie pourraient être ultérieurement vérifiées en quantifiant cette différence de taille.

### **4. Les différences entre *cdc5-17* et *cdc5-18* concernant la grosseur de leurs cellules et l'homogénéité de leurs populations peuvent être dues à la localisation de leurs mutations**

Les mutants *cdc5-17* et *cdc5-18* créés lors de ce projet, bien qu'ils aient tous les deux exhibé une taille cellulaire plus grande que celle des cellules de levure sauvage, avaient quand même présenté des différences quant à la grosseur de leurs cellules et à l'homogénéité de leurs populations. En effet, alors que la population de *cdc5-18* comprenait des cellules uniformes caractérisées par leur grosseur anormale qui dépassait celle des cellules sauvages, celle de *cdc5-17* était hétérogène en comptant diverses morphologies cellulaires et une grosseur qui allait au-delà de celle des cellules sauvages et même de celles de *cdc5-18* (**Onglet B de la Figure 16 et Onglet B de la Figure 17, pour *cdc5-17* et *cdc5-18*, respectivement**). L'explication de ce phénomène est probablement liée à la localisation des mutations de chacun des deux mutants : les

mutations de *cdc5-18* se trouvent dans le domaine kinase, alors que celles de *cdc5-17* se trouvent dans l'IDL qui relie le domaine kinase au domaine boîte Polo (PBD), dans une région très proche du PBD. De par sa position, l'IDL est capable d'influencer l'activité du domaine kinase et/ou du PBD, de même que l'interaction des deux domaines ensemble <sup>18</sup>. Il serait donc possible que la présence de mutations dans l'IDL puisse affecter l'activité des deux domaines ou de leur interaction ensemble résultant ainsi en une diversité morphologique. Les mutations portées par *cdc5-17* (C481Y et Q494R) ont le potentiel, de par les changements drastiques qu'elles peuvent introduire dans la structure du domaine IDL, d'affecter la structure totale de la protéine, ce qui peut avoir des répercussions négatives sur l'activité des domaines kinase et PBD, ainsi que sur leur interaction ensemble. Par ailleurs, le fait que les mutations de *cdc5-17* soient localisées dans une région proche du domaine PBD pourrait également être responsable de la grosseur de ces cellules qui dépasse celle des cellules sauvages et des cellules de *cdc5-18*. En effet, il se trouve que *cdc5-16*, un mutant du domaine PBD, ait déjà montré une sorte de gigantisme cellulaire sans précédent lors de son exposition à température restrictive <sup>154</sup>. La raison pour laquelle les mutants PBD semblent être plus enclins à continuer à croître, alors qu'ils subissent un arrêt de la prolifération cellulaire demeure inconnue. Une investigation plus approfondie serait nécessaire pour comprendre ce phénomène.

### **5. Le blocage des cellules de *cdc5-17* et de *cdc5-18* en anaphase à température non-permissive est dû à un défaut dans la promotion de la sortie de la mitose**

Les résultats d'analyse du cycle cellulaire ont également montré que les cellules bourgeonnées qui persistaient le long du cycle cellulaire étaient en fait en fin de mitose (en anaphase), à en juger par la présence de microtubules longs et de quantité d'ADN en  $2n$  (**Onglets C et D de la Figure 16 et Onglets C et D de la Figure 17, pour *cdc5-17* et *cdc5-18*, respectivement**), confirmant ainsi notre hypothèse de départ. Ces résultats sont semblables à ceux du contrôle *cdc14-3*. Cdc14 est une protéine phosphatase jouant un rôle primordial dans la promotion de la sortie de mitose. En début d'anaphase, une fraction de Cdc14 est libérée par la voie du FEAR où elle prend part à de nombreux processus tout aussi importants les uns que les autres <sup>99</sup>. En effet, cette fraction de Cdc14

est non seulement impliquée dans la ségrégation de l'ADN ribosomal des nucléoles <sup>115</sup>, <sup>116</sup>, dans la régulation de la dynamique des fuseaux mitotiques en anaphase <sup>117, 118</sup>, et dans le positionnement du noyau <sup>119</sup>, mais aussi dans la promotion de la sortie de la mitose à la fin du cycle cellulaire <sup>97, 113</sup>. Cdc14 favorise la voie du MEN *en* activant Cdc15 <sup>120</sup>, l'une de ses composantes, ce qui permet de libérer, à partir des nucléoles, encore plus de Cdc14. Cdc14 libérée par la voie du MEN se charge alors de l'inactivation de Cdc28-Clb2 (l'équivalent de CDK1-cycline B chez l'Homme) en promouvant la dégradation de Clb2 par l'APC/C<sup>Cdh1</sup> <sup>110</sup>; en activant Sic1, un inhibiteur de Cdc28-Clb2; et en favorisant l'entrée au noyau de Swi5, un facteur de transcription important pour l'expression de l'inhibiteur Sic1 <sup>47, 125</sup>. *Visintin et al* avaient déjà montré que, chez le mutant *cdc14-3*, ces processus sont compromis et la cellule reste bloquée en anaphase, vu qu'elle ne peut pas dégrader Clb2 <sup>169</sup>. Cdc5 est un important régulateur du MEN où il promeut, en inactivant Bub2/Bfa1, l'activation de Tem1, la composante la plus en amont de la cascade du MEN, ce qui mène ensuite à la libération de Cdc14 <sup>98, 124</sup>. Il se trouve également que Cdc5 soit responsable de la libération de la petite fraction de Cdc14 au début de l'anaphase via la voie du FEAR, ce qui permet l'activation de la voie du MEN <sup>112</sup>. De par ses fonctions, la kinase Cdc5 semble être le principal orchestrateur de la sortie de la mitose. Le fait que la libération et l'activité de Cdc14 nécessitent l'activité de Cdc5 fait en sorte que la mutation de Cdc5 dans *cdc5-17* et dans *cdc5-18* ne permette pas l'activation de Cdc14, ce qui résulte en les mêmes défauts que ceux observés chez le mutant *cdc14-3*, c'est-à-dire un défaut du MEN et un blocage en fin de mitose. En d'autres mots, le blocage des cellules de *cdc5-17* et de *cdc5-18* en anaphase est dû à la mutation de Cdc5 qui a empêché la libération de Cdc14 et qui a résulté en l'arrêt cellulaire que nous avons observé.

## **6. Importance de l'étude des kinases de la famille Polo et impact de la création des allèles *cdc5-17* et de *cdc5-18* sur l'avancement de la science**

L'implication des kinase Polo dans le développement des tumeurs cancéreuses est indéniable <sup>170</sup>. De nombreuses études ont montré que Plk1 était surexprimée dans plusieurs types de cancers, notamment dans les gliomes <sup>171</sup>, le cancer de la tête et du cou <sup>172</sup>, le cancer du sein <sup>173</sup>, le cancer de l'ovaire <sup>174, 175</sup>, le cancer colorectal <sup>176</sup> et le cancer

de la thyroïde <sup>177</sup>. L'étude de PLK1 et de ses orthologues tels que Cdc5, qu'elle soit axée sur la compréhension de la structure de la protéine ou sur sa fonction, permettrait de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les PLK promeuvent le cancer ou favorisent sa propagation. L'un des mécanismes par lesquels PLK promeut la progression accélérée du cancer est l'adaptation aux dommages à l'ADN causés par les chimiothérapies. Comprendre comment PLK/Cdc5, spécifiquement son domaine PBD, favorise l'adaptation aux dommages à l'ADN et identifier ses substrats lors de cette réponse constitue l'objectif principal de notre projet. Cette identification pourrait apporter de précieux renseignements quant à la manière par laquelle PLK/Cdc5 favorise l'adaptation aux dommages à l'ADN et pourrait, potentiellement, servir à créer des agents chimiothérapeutiques qui puissent convenablement cibler PLK.

Les deux mutants créés, *cdc5-17* et *cdc5-18*, représentent deux outils qui seront indéniablement bénéfiques pour la science, non seulement dans le cadre de la poursuite de l'objectif ultime de notre projet de recherche, mais aussi pour d'autres projets futurs de notre laboratoire ou pour d'autres projets qui serviront la science, en général. Le mutant *cdc5-18* sera le meilleur outil pour l'identification des substrats de Cdc5 lors de la réponse d'adaptation, étant donné le caractère homogène de sa population de cellules, et le fait que ses mutations touchent le domaine kinase puisque nous voulions justement identifier les substrats phosphorylés par Cdc5. En ce qui concerne le mutant *cdc5-17*, il sera éventuellement plus intéressant à utiliser lors de l'étude du rôle de la liaison inter-domaine (IDL) dans la régulation de l'activité kinase, par exemple; ou bien dans la régulation du PBD. Récemment, la co-crystallisation des domaines kinase et boîte-Polo (PBD) de la PLK du poisson zèbre, en utilisant la protéine Map205 de la drosophile comme stabilisateur du complexe, a non seulement montré comment les deux domaines étaient positionnés l'un par rapport à l'autre, mais a aussi révélé que ces deux domaines se régulaient l'un l'autre par allostérie <sup>178</sup>. La structure de l'IDL est peut-être un peu moins conservée entre les organismes que celle des domaines kinases et boîte Polo, mais le fait que l'IDL soit localisé entre ces deux domaines et que ces derniers interagissent ensemble pourrait avoir un lien dans la régulation de leurs activités et pourrait impliquer une participation de l'IDL dans leur interaction <sup>18</sup>. Le mutant *cdc5-17* pourrait être utile lors de l'étude du rôle de l'IDL dans l'interaction des domaines kinases et PBD.

## Conclusion et perspectives

Les kinases de la famille PLK jouent un rôle majeur durant le cycle cellulaire, notamment en promouvant des processus essentiels tels que l'entrée en phase M, l'orientation des centrosomes et la sortie du cycle cellulaire<sup>133</sup>. En étudiant Cdc5, la PLK de *Saccharomyces cerevisiae*, notre laboratoire a montré que son domaine PBD promouvait la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN, et ce, en permettant la localisation de la kinase aux centrosomes de levure, l'endroit où serait localisé son substrat potentiel durant cette réponse<sup>154</sup>.

L'identification du substrat de Cdc5 nécessitait une analyse du phosphoprotéome intégral de la kinase *in vivo* en utilisant deux allèles *CDC5* thermosensibles à 30°C. Dans le présent projet, nous avons réussi à en créer : *cdc5-17* et *cdc5-18*. Les mutants portant ces deux allèles ont été soumis à une analyse du cycle cellulaire qui a montré que les cellules des deux mutants restaient bloquées en fin de mitose (en anaphase) sous la forme bourgeonnée, témoignant ainsi d'un défaut dans la sortie du cycle cellulaire. Ce défaut est causé par la mutation du gène *CDC5* dont la protéine promeut la sortie de la mitose via deux voies : la voie du FEAR et la voie du MEN<sup>98, 112, 124</sup>. En affectant ces deux voies, la mutation de *CDC5* abroge la libération, à partir des nucléoles, de Cdc14, la protéine responsable de la sortie de la mitose, ce qui résulte en un blocage en anaphase<sup>169</sup>.

Étant donné que le mutant *cdc5-18* possède une population de cellules plus homogène que celle du mutant *cdc5-17*, c'est le mutant *cdc5-18* qui sera utilisé ultérieurement lors de l'analyse phosphoprotéomique en vue de l'identification des substrats de PLK/Cdc5 lors de la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN.

Maintenant qu'un mutant *CDC5* thermosensible à 30 °C a été créé, nous pouvons procéder à la poursuite de l'objectif de notre projet. À court terme, nous prévoyons procéder à l'analyse phosphoprotéomique *in vivo* de Cdc5, en utilisant le mutant portant l'allèle *cdc5-18* comme contrôle négatif. Cette analyse nous permettra d'identifier tous les substrats de Cdc5 par *LC/MS-MS*, y compris les cibles de Cdc5 qui se localiseraient aux SPB même transitoirement et celles qui sont les moins conventionnelles. D'un autre côté, nous pouvons également procéder avec notre plan de départ et essayer d'identifier

les substrats de Cdc5 en soumettant des préparations de SPB à des réactions de phosphorylation *in vitro* en utilisant la kinase Cdc5 purifiée. Précisément, une spectrométrie de masse quantitative pourra être utilisée afin de comparer les niveaux de phosphorylation des protéines des SPB après des réactions de phosphorylation effectuées en présence ou en absence de Cdc5. Les protéines ayant une augmentation de la phosphorylation à la suite du traitement en présence de Cdc5 seront considérées comme des substrats potentiels de Cdc5 dans le processus d'adaptation.

À moyen terme, nous validerons le rôle des candidats identifiés en utilisant un essai standard de formation de colonies chez des cellules vivantes. De façon spécifique, la délétion de gènes sera utilisée pour inactiver les effecteurs potentiels de Cdc5 dans les cellules portant la mutation *cdc13-1*, c'est-à-dire des cellules qui ont un dommage à l'ADN au niveau des télomères et qui sont en arrêt de cycle cellulaire suite à l'activation d'un point de contrôle. L'adaptation aux dommages dans l'ADN dans des cellules normales implique la formation de microcolonies qui peuvent être visualisées et quantifiées à l'aide d'un microscope optique. Puisque Cdc5 est essentiel à la réponse d'adaptation aux dommages dans l'ADN<sup>145-153</sup>, enlever ses effecteurs devrait résulter en une réponse d'adaptation défectueuse. Finalement, les résidus phosphorylés par Cdc5 dans ses effecteurs seront enlevés afin de valider que ces événements de phosphorylation spécifiques sont bel et bien responsables de la réponse d'adaptation aux dommages dans l'ADN.

À long terme, nous essayerons de déterminer le rôle du PBD de PLK1 lors de la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN chez les cellules humaines. Pour ce faire, un essai standard de formation de colonies sera réalisé chez des cellules portant des mutations dans le domaine PBD, qui sont analogues à celles de *cdc5-16*. L'essai comportera l'exposition de ces cellules à des radiations afin d'induire des cassures double-brin dans leur ADN et engendrer, par conséquent, l'activation du point de contrôle G2/M et un arrêt cellulaire en G2. L'adaptation aux dommages à l'ADN sera visualisée à l'aide du microscope optique grâce à l'apparition des chromosomes condensés marqués par les phosphohistones H1 et H3 qui sont spécifiques à la mitose, de même que de celle des foyers de  $\gamma$ -H2AX qui marquent la présence de dommages à

l'ADN<sup>150, 179</sup>. Par ailleurs, nous prévoyons déterminer si les homologues humains des effecteurs de Cdc5 lors de la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN sont également impliqués dans ce processus chez les cellules humaines. La contribution de ces effecteurs à la réponse d'adaptation sera mesurée en sous-régulant leur niveau d'expression dans des cellules humaines exposées à des radiations afin d'induire un arrêt en G2/M. Dans le cas où ces effecteurs, en d'autres mots, les homologues humains des effecteurs de Cdc5, sont réellement impliqués dans la réponse d'adaptation aux dommages à l'ADN, leur sous-régulation devrait résulter en un défaut du processus d'adaptation chez les cellules humaines.

Finalement, il serait judicieux de penser que les deux mutants créés, *cdc5-17* et *cdc5-18* pourraient apporter une éventuelle contribution à la Science, qui s'étendrait bien au-delà de la réalisation de notre projet de recherche. L'utilisation des deux allèles *cdc5* pourrait s'avérer pertinente notamment lors d'études ayant pour objectif l'identification des substrats de Cdc5 dans d'autres processus durant le cycle cellulaire, ou bien dans d'autres études visant à créer des inhibiteurs de PLK.

## Bibliographie

- <sup>1</sup>. Flemming, W. *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*). F.C.W. Vogel, Leipzig, Germany (1882).
- <sup>2</sup>. Howard and Pelc. *Nuclear incorporation of P32 as demonstrated by autoradiographs*. *Exptl. Cell Res* 51: 2: 178 (1951).
- <sup>3</sup>. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Eukaryotic Cell Cycle. Disponible à partir de : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>
- <sup>4</sup>. Zitouni, S., Nabais, C., Jana, SC., Guerrero, A., Bettencourt-Dias, M. *Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions and regulation*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 433–452 (2014).
- <sup>5</sup>. Archambault V, Glover, D. M. *Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 265–275 (2009).
- <sup>6</sup>. Sunkel, C. E. & Glover, D. M. *polo, a mitotic mutant of Drosophila displaying abnormal spindle poles*. *J. Cell Sci.* **89**, 25–38 (1988).
- <sup>7</sup>. Llamazares, S. et al. *polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in Drosophila*. *Genes Dev.* **5**, 2153–2165 (1991).
- <sup>8</sup>. de Carcer, G. Manning, G., & Malumbres, M. *From Plk1 to Plk5: functional evolution of polo-like kinases*. *Cell Cycle* **10**, 2255–2262 (2011).
- <sup>9</sup>. Kitada, K., Johnson, A. L., Johnston, L. H., and Sugino, A. A multicopy suppressor gene of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cell cycle mutant gene *dbf4* encodes a protein kinase and is identified as *CDC5*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4445–4457 (1993).
- <sup>10</sup>. Ohkura, H., Hagan, I. M., and Glover, D. M. The conserved *Schizosaccharomyces pombe* kinase *plp1*, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev.* **9**, 1059–1073 (1995).
- <sup>11</sup>. Lowery, D. M., Lim, D. & Yaffe, M. B. *Structure and function of Polo-like kinases*. *Oncogene* **24**, 248–259 (2005).

- <sup>12</sup>. Elia, A. E., Cantley, L. C. & Yaffe, M. B. *Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. Science* **299**, 1228–1231 (2003).
- <sup>13</sup>. Cheng, K. Y., Lowe, E. D., Sinclair, J., Nigg, E. A. & Johnson, L. N. *The crystal structure of the human polo-like kinase-1 polo box domain and its phospho-peptide complex. EMBO J.* **22**, 5757–5768 (2003).
- <sup>14</sup>. Park, J. E. et al. *Polo-box domain: a versatile mediator of polo-like kinase function. Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 1957–1970 (2010).
- <sup>15</sup>. Jana, S. C., Bazan, J. F. & Bettencourt-Dias, M. *Polo boxes come out of the crypt: a new view of PLK function and evolution. Structure* **20**, 1801–1804 (2012).
- <sup>16</sup>. Carvalho-Santos, Z. et al. *Stepwise evolution of the centriole-assembly pathway. J. Cell Sci.* **123**, 1414–1426 (2010).
- <sup>17</sup>. Sillibourne, J. E. & Bornens, M. *Polo-like kinase 4: the odd one out of the family. Cell Div.* **5**, 25 (2010).
- <sup>18</sup>. Archambault, V., Lépine, G. et Kachaner, D. *Understanding the Polo Kinase machine. Oncogene* **34**, 4799–4807 (2015).
- <sup>19</sup>. Golsteyn, R.M., Mundt, K.E., Fry, A.M., Nigg, E.A. *Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. J. Cell Biol.* **129**, 1617–1628 (1995).
- <sup>20</sup>. Sumara, I., Gimenez-Abian, J.F., Gerlich, D., Hirota, T., Kraft, C., de la Torre, C. et al. *Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. Curr. Biol.* **14**, 1712–1722 (2004)
- <sup>21</sup>. Neef, R., Gruneberg, U., Kopajtich, R., Li, X., Nigg, E.A., Sillje, H. et al. *Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. Nat. Cell Biol.* **9**, 436–444 (2007).
- <sup>22</sup>. Burkard, M.E., Randall, C.L., Larochele, S., Zhang, C., Shokat, K.M., Fisher, R.P. et al. *Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 4383–4388 (2007).

23. Brennan, IM., Peters, U., Kapoor, TM., Straight, AF. *Polo-like kinase controls vertebrate spindle elongation and cytokinesis. PLoS One* **2**, e409 (2007).
24. Petronczki, M., Glotzer, M., Kraut, N., Peters, JM. *Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. Dev. Cell* **12**, 713–725 (2007).
25. Santamaria, A., Neef, R., Eberspacher, U., Eis, K., Husemann, M., Mumberg, D. et al. Use of the novel Plk1 inhibitor ZK-thiazolidinone to elucidate functions of Plk1 in early and late stages of mitosis. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4024–4036 (2007).
26. Bettencourt-Dias, M., Rodrigues-Martins, A., Carpenter, L., Riparbelli, M., Lehmann, L., Gatt, MK. et al. *SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. Curr. Biol.* **15**, 2199–2207 (2005).
27. Habedanck, R., Stierhof, YD., Wilkinson, CJ., Nigg, EA. *The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. Nat. Cell Biol.* **7**, 1140–1146 (2005).
28. Warnke, S., Kemmler, S., Hames, RS., Tsai, HL., Hoffmann-Rohrer, U., Fry, AM. et al. *Polo-like kinase-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. Curr. Biol.* **14**, 1200–1207 (2004).
29. Myer, DL., Bahassi, el M., Stambrook, PJ. *The Plk3-Cdc25 circuit. Oncogene* **24**, 299–305.
30. Andrysiak, Z., Bernstein, WZ., Deng, L., Myer, DL., Li, YQ., Tischfield, JA. et al. *The novel mouse Polo-like kinase 5 responds to DNA damage and localizes in the nucleolus. Nucleic Acids Res.* **38**, 2931–2943 (2010).
31. Uchiumi, T., Longo, D. L. & Ferris, D. K. *Cell cycle regulation of the human polo-like kinase (PLK) promoter. J. Biol. Chem.* **272**, 9166–9174 (1997).
32. Martin, B. T. & Strebhardt, K. *Polo-like kinase 1: target and regulator of transcriptional control. Cell Cycle* **5**, 2881–2885 (2006).
33. Gunawardena, R. W. et al. *Hierarchical requirement of SWI/SNF in retinoblastoma tumor suppressor-mediated repression of Plk1. J. Biol. Chem.* **279**, 29278–29285 (2004).

- <sup>34</sup>. Alvarez, B., Martinez, A. C., Burgering, B. M. & Carrera, A. C. *Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals. Nature* **413**, 744–747 (2001).
- <sup>35</sup>. Laoukili, J. *et al.* *FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. Nature Cell Biol.* **7**, 126–136 (2005).
- <sup>36</sup>. Zhu, G. *et al.* *Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. Nature* **406**, 90–94 (2000).
- <sup>37</sup>. Buck, V. *et al.* *Fkh2p and Sep1p regulate mitotic gene transcription in fission yeast. J. Cell Sci.* **117**, 5623–5632 (2004).
- <sup>38</sup>. Jang, Y. J., Ma, S., Terada, Y. & Erikson, R. L. *Phosphorylation of threonine 210 and the role of serine 137 in the regulation of mammalian polo-like kinase. J. Biol. Chem.* **277**, 44115–44120 (2002).
- <sup>39</sup>. van de Weerdt, B. C. *et al.* *Uncoupling anaphase promoting complex/cyclosome activity from spindle assembly checkpoint control by deregulating polo-like kinase 1. Mol. Cell. Biol.* **25**, 2031–2044 (2005).
- <sup>40</sup>. Ferris, D. K., Maloid, S. C. & Li, C. C. *Ubiquitination and proteasome mediated degradation of polo-like kinase. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252**, 340–344 (1998).
- <sup>41</sup>. Charles, J. F. *et al.* *The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in S. cerevisiae. Curr. Biol.* **8**, 497–507 (1998).
- <sup>42</sup>. Visintin, C. *et al.* *APC/C–Cdh1-mediated degradation of the Polo kinase Cdc5 promotes the return of Cdc14 into the nucleolus. Genes Dev.* **22**, 79–90 (2008).
- <sup>43</sup>. Goto, H. *et al.* *Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase–anaphase transition. Nature Cell Biol.* **8**, 180–187 (2006).
- <sup>44</sup>. Hu, C. K., Ozlu, N., Coughlin, M., Steen, J. J. & Mitchison, T. J. *Plk1 negatively regulates PRCl to prevent premature midzone formation before cytokinesis. Mol. Biol. Cell* **23**, 2702–2711 (2012).
- <sup>45</sup>. Lee, M. S., Ogg, S., Xu, M., Parker, LL., Donoghue, DJ., Maller, JL and Piwnicka-Worms, H. *cdc25+ encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34cdc2. Mol. Biol. Cell* **3(1)**, 73–84 (1992).

46. Booher, R. N., Deshaies, R. J., Kirschner, M. W. *Properties of Saccharomyces cerevisiae wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. EMBO J* **12(9)**, 3417–26 (1993).
47. Lee, K. S., Park, J. E., Asano, S. and Park C.J. *Yeast polo-like kinases: functionally conserved multitask mitotic regulators. Oncogene* **24**, 217–229 (2005).
48. Russell, P., Moreno, S., Reed, S.I. *Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts. Cell* **57(2)**, 295–303 (1989).
49. Sia, R. A., Herald, H. A., Lew D. J. *Cdc28 tyrosine phosphorylation and the morphogenesis checkpoint in budding yeast. Mol. Biol. Cell* **7(11)**, 1657–66 (1996).
50. Bartholomew, C. R., Woo, S. H., Chung, Y. S., Jones, C., Hardy, C. F. *Cdc5 interacts with the Wee1 kinase in budding yeast. Mol. Cell Biol.* **21(15)**, 4979–4959 (2001).
51. McMillan, J. N., Theesfeld, C. L., Harrison, J. C., Bardes, E. S. and Lew, D. J. *Determinants of Swe1p Degradation in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Biol. Cell.* **13(10)**, 3560–3575 (2002).
52. Sakchaisri, K., Asano, S., Yu, L. R., Schulewitz, M. J., Park, C. J., Park, J. E., Cho, Y. W., Veenstra, T. D., Thorner, J. and Lee, K. S. *Coupling morphogenesis to mitotic entry. Proc. Natl. Sci. USA* **101(12)**, 4124–4129 (2004).
53. Bornens, M. *Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 25–34 (2002).
54. Arquint, C., Gabryjonczyk, A. M., Nigg, E. A. *Centrosomes as signalling centres. Philos. Trans. R Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **369(1650)**, 20130464 (2014).
55. Francis, S. E., Davis, T. N. *The spindle pole body of Saccharomyces cerevisiae: Architecture and assembly of the core components. Centrosome in Cell Replication and Early Development. Current Topics in Developmental Biology* **49**, 1–489 (1999). Edited by Robert E. Palazzo and Gerald P. Schatten.

- <sup>56</sup>. Jaspersen, S. L., Winey, M. *The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function. Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **20**,1–28 (2004).
- <sup>57</sup>. Nigg, E. A. & Stearns, T. *The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. Nature Cell Biology* **13**, 1154–1160 (2011).
- <sup>58</sup>. Lane, H. A., Nigg, E. A. *Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. J. Cell Biol.* **135**, 1701–1713 (1996).
- <sup>59</sup>. do Carmo Avides, M., Tavares, A. & Glover, D. M. *Polo kinase and Asp are needed to promote the mitotic organizing activity of centrosomes. Nature Cell Biol.* **3**, 421–424 (2001).
- <sup>60</sup>. Haren, L., Stearns, T. & Luders, J. *Plk1-dependent recruitment of  $\gamma$ -tubulin complexes to mitotic centrosomes involves multiple PCM components. PLoS ONE* **4**, e5976 (2009).
- <sup>61</sup>. Santamaria, A. *et al.* *The Plk1-dependent phosphoproteome of the early mitotic spindle. Mol. Cell. Proteomics* **10**, M110.004457 (2010).
- <sup>62</sup>. Lee, K. & Rhee, K. *PLK1 phosphorylation of pericentrin initiates centrosome maturation at the onset of mitosis. J. Cell Biol.* **195**, 1093–1101 (2011).
- <sup>63</sup>. Casenghi, M. *et al.* *Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. Dev. Cell* **5**, 113–125 (2003).
- <sup>64</sup>. Casenghi, M., Barr, F. A. & Nigg, E. A. *Phosphorylation of Nlp by Plk1 negatively regulates its dynein– dynactin-dependent targeting to the centrosome. J. Cell Sci.* **118**, 5101–5108 (2005).
- <sup>65</sup>. Oshimori, N., Ohsugi, M. & Yamamoto, T. *The Plk1 target Kizuna stabilizes mitotic centrosomes to ensure spindle bipolarity. Nature Cell Biol.* **8**, 1095–1101(2006).
- <sup>66</sup>. De Luca, M., Lavia, P. & Guarguaglini, G. *A functional interplay between Aurora-A, Plk1 and TPX2 at spindle poles: Plk1 controls centrosomal localization of Aurora-A and TPX2 spindle association. Cell Cycle* **5**, 296–303 (2006).
- <sup>67</sup>. Spc72/YAL047C. *Saccharomyces Genome Database (SGD)*. Lien consulté : <http://www.yeastgenome.org/locus/S0000000045/overview> , le 05 décembre 2015.

- <sup>68</sup>. Snead, J. L. *et al.* A coupled chemical-genetic and bioinformatic approach to Polo-like kinase pathway exploration. *Chem. Biol.* **14**, 1261–1272 (2007).
- <sup>69</sup>. Losada, A. Cohesin regulation: fashionable ways to wear a ring. *Chromosoma* **116**, 321–329 (2007).
- <sup>70</sup>. Hornig, N. C. & Uhlmann, F. Preferential cleavage of chromatin-bound cohesion after targeted phosphorylation by Polo-like kinase. *EMBO J.* **23**, 3144–3153 (2004).
- <sup>71</sup>. Alexandru, G., Uhlmann, F., Mechtler, K., Poupart, M.A., Nasmyth, K. Phosphorylation of the cohesin subunit *Sccl* by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell* **105(4)**, 459–72 (2001).
- <sup>72</sup>. Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P.T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E.A., Peters, J.M. The dissociation of cohesion from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol. Cell* **9(3)**, 515–25 (2002).
- <sup>73</sup>. Hauf, S. *et al.* Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol.* **3**, e69 (2005).
- <sup>74</sup>. Kitajima, T. S. *et al.* Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* **441**, 46–52 (2006).
- <sup>75</sup>. Tang, Z. *et al.* PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Dev. Cell* **10**, 575–585 (2006).
- <sup>76</sup>. Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A., Peters, J. M. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* **103**, 399–410 (2000).
- <sup>77</sup>. Etemad, B., Kujit, T. E. F. and Kops, G. J. P. L. Kinetochores-microtubule attachment is sufficient to satisfy the human assembly checkpoint. *Nat. Commun.* **6**: 8987 (2015).
- <sup>78</sup>. Elowe, S., Hummer, S., Uldschmid, A., Li, X. & Nigg, E. A. Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions. *Genes Dev.* **21**, 2205–2219 (2007).
- <sup>79</sup>. Qi, W., Tang, Z. & Yu, H. Phosphorylation- and polo-box-dependent binding of Plk1 to Bub1 is required for the kinetochore localization of Plk1. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3705–3716 (2006).

- <sup>80</sup>. Petronczki, M., Lenart, P. & Peters, J. M. *Polo on the rise-from mitotic entry to cytokinesis with Plk1*. *Dev. Cell* **14**, 646–659 (2008).
- <sup>81</sup>. Rossio, V., Galati, E., Ferrari, M., Pellicioli, A., Sutani, T., Shirahige, K., Lucchini, G., Piatti, S. *The RSC chromatin-remodeling complex influences mitotic exit and adaptation to the spindle assembly checkpoint by controlling the Cdc14 phosphatase*. *J. Cell Biol.* **191(5)**, 981–997 (2010).
- <sup>82</sup>. Paweletz, N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 72–75 (2001).
- <sup>83</sup>. Strunnikov, A. V., Hogan, E., and Koshland, D. *SMC2, a Saccharomyces cerevisiae gene essential for chromosome segregation and condensation, defines a subgroup within the SMC family*. *Genes Dev.* **9**, 587–599 (1995).
- <sup>84</sup>. Hirano, T. *Chromosome cohesion, condensation, and separation*. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 115–44 (2000).
- <sup>85</sup>. Hirano, T. *Condensins: organizing and segregating the genome*. *Curr. Biol.* **15**, R265–R275 (2005).
- <sup>86</sup>. Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Hirota, T. *The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II*. *Genes & Development* **25(8)**, 863–874 (2011).
- <sup>87</sup>. St-Pierre, J., Douziech, M., Bazile, F., Pascariu, M., Bonneil, E., Sauvé, V., Ratsima, H., D’Amours, D. *Polo Kinase Regulates Mitotic Chromosome Condensation by Hyperactivation of Condensin DNA Supercoiling Activity*. *Mol. Cell.* **34(4)**, 416–26 (2009).
- <sup>88</sup>. Baumer, M., Braus, G. H., and Irniger, S. *Two different modes of cyclin clb2 proteolysis during mitosis in Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **468**, 142–148 (2000).
- <sup>89</sup>. Yeong, F. M., Lim, H. H., Padmashree, C. G., and Surana, U. *Exit from mitosis in budding yeast: biphasic inactivation of the Cdc28-Clb2 mitotic kinase and the role of Cdc20*. *Mol. Cell* **5**, 501–511 (2000).

- <sup>90</sup>. Witkin, K. L., Chong, Y., Shao, S., Webster, M. T., Lahiri, S., Walters, A. D., Lee, B., Koh, J. L. Y., Prinz, W. A., Andrews, B. J. et al. *The budding yeast nuclear envelope adjacent to the nucleolus serves as a membrane sink during mitotic delay*. *Curr. Biol.* **22**, 1128–1133 (2012).
- <sup>91</sup>. Walters, A. D., May, C. K., Dauster, E. S., Cinquin, B. P., Smith, E. A., Robellet, X., D'Amours, D., Larabell, C. A. and Cohen-Fix, O. *The yeast polo kinase, Cdc5, regulates the shape of the mitotic nucleus*. *Curr. Biol.* **24(23)**, 2861–2867 (2014).
- <sup>92</sup>. Peters, J. M. *The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 644–656 (2006).
- <sup>93</sup>. Vázquez-Novelle, M. D., Sansregret, L., Dick, A. E., Smith, C. A., McAinsh, A. D., Gerlich, D. W., Petronczki, M. *Cdk1 inactivation terminates mitotic checkpoint surveillance and stabilizes kinetochore attachments in anaphase*. *Curr. Biol.* **24(6)**, 638–45 (2014).
- <sup>94</sup>. Eckerdt, F. & Strebhardt, K. *Polo-like kinase 1: target and regulator of anaphase-promoting complex/ cyclosome-dependent proteolysis*. *Cancer Res.* **66**, 6895–6898 (2006).
- <sup>95</sup>. Moshe, Y., Boulaire, J., Pagano, M. & Hershko, A. *Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 7937–7942 (2004).
- <sup>96</sup>. Hansen, D. V., Loktev, A. V., Ban, K. H. & Jackson, P. K. *Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCF  $\beta$ TrCP-dependent destruction of the APC inhibitor Emi1*. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5623–5634 (2004).
- <sup>97</sup>. Stegmeier, F., Visintin, R. and Amon, A. *Separase, Polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase*. *Cell* **108**, 207–220 (2002).
- <sup>98</sup>. Jensen, S., Johnston, L. H. *Complexity of mitotic exit*. *Cell cycle* **1(5)**, 300–3 (2002).
- <sup>99</sup>. Visintin, R., Craig, K., Hwang, E. S., Prinz, S., Tyers, M., Amon, A. *The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation*. *Mol. Cell* **2(6)**, 709–18 (1998).

- <sup>100</sup>. Liang, F., Jin, F., Liu, H., Wang, Y. *The molecular function of the yeast polo-like kinase Cdc5 in Cdc14 release during early anaphase. Mol. Biol. Cell* **20**(16), 3671–9 (2009).
- <sup>101</sup>. Sullivan, M., Uhlmann, F. *A non-proteolytic function of separase links the onset of anaphase to mitotic exit. Nat. Cell. Biol.* **5**, 249–254 (2003).
- <sup>102</sup>. Visintin, R., Stegmeier, F., and Amon, A. *The role of the polo kinase Cdc5 in controlling Cdc14 localization. Mol. Biol. Cell* **14**, 4486–4498 (2003).
- <sup>103</sup>. Stegmeier, F., Huang, J., Rahal, R., Zmolik, J., Moazed, D., and Amon, A. *The replication fork block protein Fob1 functions as a negative regulator of the FEAR network. Curr. Biol.* **14**, 467–480 (2004).
- <sup>104</sup>. Yellman, C.M., Burke, D.J. *The role of Cdc55 in the spindle checkpoint is through regulation of mitotic exit in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Biol. Cell* **17**, 658–666 (2006).
- <sup>105</sup>. Queralt, E., Lehane, C., Novak, B., Uhlmann, F. *Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. Cell* **125**, 719–732 (2006).
- <sup>106</sup>. D’Amours, D. and Amon, A. *At the interface between signaling and executing anaphase-Cdc14 and the FEAR network. Genes & Dev.* **18**, 2581–2595 (2004).
- <sup>107</sup>. Visintin, R., Hwang, E. S. and Amon, A. *Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. Nature* **398**, 818–823 (1999).
- <sup>108</sup>. Cohen-Fix, O., Peters, J.M., Kirschner, M.W., Koshland, D. *Anaphase initiation in Saccharomyces cerevisiae is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. Genes Dev.* **10**, 3081–3093 (1996).
- <sup>109</sup>. Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., Nasmyth, K. *An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. Cell* **93**, 1067–1076 (1998).

- <sup>110</sup>. Visintin, R., Prinz, S., Amon, A. *CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. Science* **278**, 460–463 (1997).
- <sup>111</sup>. Shou, W., Azzam, R., Chen, S. L., Huddleston, M. J., Baskerville, C., Charbonneau, H., Annan, R. S., Carr, S. A., Deshaies, R. J. *Cdc5 influences phosphorylation of Net1 and disassembly of the RENT complex. BMC Mol. Biol.* **3**, 3 (2002).
- <sup>112</sup>. Yoshida, S., Toh-e, A. *Budding yeast Cdc5 phosphorylates Net1 and assists Cdc14 release from the nucleolus. Biochem. Biophys. Res. Commun* **294**, 687–91 (2002).
- <sup>113</sup>. Stegmeier, F., Amon, A. *Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. Annu. Rev. Genet.* **38**, 203–232 (2004).
- <sup>114</sup>. Rahal, R. and Amon, A. *The polo-like kinase Cdc5 interacts with FEAR network components and Cdc14. Cell Cycle* **7**(20), 3262–3272 (2008).
- <sup>115</sup>. D’Amours, D., Stegmeier, F., Amon, A. *Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesion-independent chromosome linkages at repeated DNA. Cell* **117**, 455–469 (2004).
- <sup>116</sup>. Sullivan, M., Higuchi, T., Katis, V. L., Uhlmann, F. *Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesin-independent cohesion during budding yeast anaphase. Cell* **117**, 471–482 (2004).
- <sup>117</sup>. Higuchi, T., Uhlmann, F. *Stabilization of microtubule dynamics at anaphase onset promotes chromosome segregation. Nature* **433**, 171–176 (2005).
- <sup>118</sup>. Bouck, D. C., Bloom, K. S. *The kinetochore protein Ndc10p is required for spindle stability and cytokinesis in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 5408–5413 (2005).
- <sup>119</sup>. Ross, K. E, Cohen-Fix, O. *A role for the FEAR pathway in nuclear positioning during anaphase. Dev. Cell* **6**, 729–735 (2004).
- <sup>120</sup>. Jaspersen, S. L., Morgan, D. O. *Cdc14 activates Cdc15 to promote mitotic exit in budding yeast. Curr. Biol.* **10**(10), 615-8 (2000).

- <sup>121</sup>. Geymonat, M., Spanos, A., Walker, P. A., Johnston, L. H., Sedgwick, S. G. *In vitro* regulation of budding yeast *Bfa1/Bub2* GAP activity by *Cdc5*. *J. Biol. Chem.* **278**(17), 14591–4 (2002).
- <sup>122</sup>. Bardin, A. J., Visintin, R., Amon, A. *A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus.* *Cell.* **102**(1), 21–31 (2000).
- <sup>123</sup>. Pereira, G., Höfken, T., Grindlay, J., Manson, C., Schiebel, E. *The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit.* *Mol Cell.* **6**(1), 1–10 (2000).
- <sup>124</sup>. Kim, J., Luo, G., Bahk, Y. Y., Song, K. *Cdc5-dependent asymmetric localization of bfa1 fine-tunes timely mitotic exit.* *PLoS Genet.* **8**(1), e1002450 (2012).
- <sup>125</sup>. Knapp, D., Bhoite, L., Stillman, D.J., Nasmyth, K. *The transcription factor Swi5 regulates expression of the cyclin kinase inhibitor p40SIC1.* *Mol. Cell Biol.* **16**(10), 5701–7 (1996).
- <sup>126</sup>. Pereira, G., Manson, C., Grindlay, J., Schiebel, E. *Regulation of the Bfa1p-Bub2p complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase Cdc14p.* *J Cell Biol.* **157**(3), 367–79 (2002).
- <sup>127</sup>. Neef, R. *et al.* *Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1.* *Nature Cell Biol.* **9**, 436–444 (2007).
- <sup>128</sup>. D’Avino, P. P. *et al.* *Recruitment of Polo kinase to the spindle midzone during cytokinesis requires the Feo/Klp3A complex.* *PLoS ONE* **2**, e572 (2007).
- <sup>129</sup>. Neef, R. *et al.* *Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis.* *J. Cell Biol.* **162**, 863–75 (2003).
- <sup>130</sup>. Yoshida, S. *et al.* *Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis.* *Science* **313**, 108–111 (2006).
- <sup>131</sup>. Kastan, M. B., Bartek, J. *Cell-cycle checkpoints and cancer.* *Nature* **432**, 316–323 (2004).
- <sup>132</sup>. Harper, J. W., Elledge, S. J. *The DNA damage response: ten years after.* *Mol. Cell* **28**, 739–745 (2007).
- <sup>133</sup>. Van Vugt, M. A., and Medema, R. H. *Getting in and out with Polo-like kinase 1.* *Oncogene* **24**, 2844–2859 (2005).

- <sup>134</sup>. Smits, V. A., Klompaker, R., Arnaud, L., Rijksen, G., Nigg, E. A., Medema, R. H. *Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. Nat. Cell Biol.* **2(9)**, 672–6 (2000).
- <sup>135</sup>. De Wulf, P., Visintin, R. *Cdc14B and APC/C tackle DNA damage. Cell.* **134(2)**, 210–2 (2008).
- <sup>136</sup>. Bassermann, F., Frescas, D., Guardavaccaro, D., Busino, L., Peschiaroli, A., Pagano, M. *The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. Cell.* **134(2)**, 256–67 (2008).
- <sup>137</sup>. Smith, J., Tho, L. M., Xu, N., Gillespie, D. A. *The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. Adv. Cancer Res.* **108**, 73–112 (2010).
- <sup>138</sup>. Yata, K. *et al.* *Plk1 and CK2 act in concert to regulate Rad51 during DNA double strand break repair. Mol. Cell* **45**, 371–383 (2012).
- <sup>139</sup>. Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., and Lukas, J. *Destruction of Claspin by SCF<sup>βTrCP</sup> restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. Mol. Cell* **23**, 307–318 (2006).
- <sup>140</sup>. Peschiaroli, A., Dorrello, N., Guardavaccaro, D., Venere, M., Halazonetis, T., Sherman, N., and Pagano, M. *SCF<sup>βTrCP</sup>-mediated degradation of Claspin regulates recovery from the DNA replication checkpoint response. Mol. Cell* **23**, 319–329 (2006).
- <sup>141</sup>. Mamely, I., van Vugt, M., Smits, V., Semple, J., Lemmens, B., Perrakis, A., Medema, R., and Freire, R. *Polo-like kinase-1 controls proteasomedependent degradation of Claspin during checkpoint recovery. Curr. Biol.* **16**, 1950–1955 (2006).
- <sup>142</sup>. Bruinsma, W., Raaijmakers, J. A. & Medema, R. H. *Switching Polo-like kinase-1 on and off in time and space. Trends Biochem. Sci.* **37**, 534–542 (2012).
- <sup>143</sup>. Harper, J. W., and Elledge, S. J. *The DNA damage response: ten years after. Mol. Cell* **28**, 739–745 (2007).
- <sup>144</sup>. Bartek, J., and Lukas, J. *DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 238–245 (2007).
- <sup>145</sup>. Syljuasen, R. G. *Checkpoint adaptation in human cells. Oncogene* **26**, 5833–5839 (2007).

- <sup>146</sup>. Toczyski, D. P., Galgoczy, D. J., and Hartwell, L. H. *CDC5 and CK11 control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. Cell* **90**, 1097–1106 (1997).
- <sup>147</sup>. Clemenson, C., and Marsolier-Kergoat, M. C. *DNA damage checkpoint inactivation: adaptation and recovery. DNA repair (Amst)* **8**, 1101–1109 (2009).
- <sup>148</sup>. Galgoczy, D. J., and Toczyski, D. P. *Checkpoint adaptation precedes spontaneous and damage-induced genomic instability in yeast. Mol. Cell Biol.* **21**, 1710–1718 (2001).
- <sup>149</sup>. Yoo, H. Y., Kumagai, A., Shevchenko, A., and Dunphy, W. G. *Adaptation of a DNA replication checkpoint response depends upon inactivation of Claspin by the Polo-like kinase. Cell* **117**, 575–588 (2004).
- <sup>150</sup>. Syljuåsen, R. G., Jensen, S., Bartek, J., Lukas, J. *Adaptation to the ionizing radiation-induced G2 checkpoint occurs in human cells and depends on checkpoint kinase 1 and Polo-like kinase 1 kinases. Cancer Res.* **66**, 10253–10257 (2006).
- <sup>151</sup>. Bahassi el, M. *Polo-like kinases and DNA damage checkpoint: beyond the traditional mitotic functions. Exp. Biol. Med.* **236**, 648–657 (2011).
- <sup>152</sup>. Serrano, D., D’Amours, D. *When genome integrity and cell cycle decisions collide: roles of polo-kinases in cellular adaptation to DNA damage. Syst. Synth. Biol.* **8**, 195–203 (2014).
- <sup>153</sup>. Donnianni, R. A., Ferrari, M., Lazzaro, F., Clerici, M., Tamilselvan Nachimuthu, B., Plevani, P., Muzi-Falconi, M. and Pelliccioli, A. *Elevated levels of the polo kinase Cdc5 override the Mec1/ATR checkpoint in budding yeast by acting at different steps of the signalling pathway. PLoS Genet.* **6**, e1000763 (2010).
- <sup>154</sup>. Ratsima, H., Serrano, D., Pascariu, M., D’Amours, D. *Centrosome-Dependent Bypass of the DNA Damage Checkpoint by the Polo Kinase Cdc5. Cell Rep.* **14**, 1–13 (2016).
- <sup>155</sup>. Castella-Roca, L., García-Martínez, J., Moreno, J., Herrero, E., Bellí, G., Pérez-Ortín, J. E. *Heat shock response in yeast involves changes in both transcription rates and mRNA stabilities. PLoS One* **6(2)**:e17272. doi: 10.1371/journal.pone.0017272 (2011).
- <sup>156</sup>. Guthrie C. and Fink G. R. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Academic Press)*, Vol **194**, pp 3e933. (1991).
- <sup>157</sup>. D’Amours, D. *Yeast media Protocol* (2007).
- <sup>158</sup>. D’Amours, D. *Growing yeast: Basics. Culture Protocol* (2006).
- <sup>159</sup>. D’Amours, D. *Yeast transformation Protocol* (2006).

- <sup>160</sup>. Longtine, M. S., et al. *Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953e961 (1998).
- <sup>161</sup>. Hospital, F. *Selection in backcross programmes*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **360(1459)**, 1503–1511 (2005).
- <sup>162</sup>. D'Amours, D. *Yeast mating, sporulation and dissection Protocol* (2007).
- <sup>163</sup>. *Cell synchrony. FGFRS: protocol*. Much of the information comes from: *Cell cycle checkpoint controls* by Howard B. Lieberman (2004). Lien consulté le 16 Février 2016. [http://fg.cns.utexas.edu/fg/protocol\\_cell\\_synchrony.html](http://fg.cns.utexas.edu/fg/protocol_cell_synchrony.html)
- <sup>164</sup>. D'Amours, D. *Release from  $\alpha$ -factor arrest at non-permissive temperature Protocol* (2009).
- <sup>165</sup>. D'Amours, D. *Yeast immunofluorescence protocol* (2007).
- <sup>166</sup>. D'Amours, D., Jackson S. P. *The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation*. *Genes Dev.* **15**, 2238e2249 (2001).
- <sup>167</sup>. Johnston, G. C., Pringle, J. R. and Hartwell, L. H. *Coordination of growth with cell division in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell Res.* **105**, 79–98 (1977).
- <sup>168</sup>. Ratsima, H., Ladouceur, A. M., Pascariu, M., Sauvé, V., Salloum, Z., Maddox, P. S., and D'Amours, D. *Independent modulation of the kinase and polo-box activities of Cdc5 protein unravels unique roles in the maintenance of genome stability*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **108**, E914–923 (2011).
- <sup>169</sup>. Visintin, R., Craig, K., Hwang, E. S., Prinz, S., Tyers, M. and Amon, A. *The Phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation*. *Molecular Cell*, **Vol. 2**, 709–718 (1998).
- <sup>170</sup>. Takai, N., Hamanaka, R., Yoshimatsu, J. and Miyakawa, I. *Polo-like kinases (Plks) and cancer*. *Oncogene* **24**, 287–291 (2005).
- <sup>171</sup>. Dietzmann, K., Kirches, E., von Bossanyi, Jachau, K., Mawrin, C. *Increased human polo-like kinase-1 expression in gliomas*. *J. Neurooncol.* **53(1)**, 1–11 (2001).
- <sup>172</sup>. Knecht, R., Elez, R., Oechler, M., Solbach, C., von Ilberg, C., Strebhardt, K. *Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck*. *Cancer Res.* **59(12)**, 2794–7 (1999).

- <sup>173</sup>. Wolf, G., Hildenbrand, R., Schwar, C., Grobholz, R., Kaufmann, M., Stutte, H. J., Strebhardt, K., Bleyl, U. *Polo-like kinase: a novel marker of proliferation: correlation with estrogen-receptor expression in human breast cancer. Pathol. Res. Pract.* **196(11)**, 753–9 (2000).
- <sup>174</sup>. Takai, N., Miyazaki, T., Fujisawa, K., Nasu, K., Hamanaka, R., Miyakawa, I. *Expression of polo-like kinase in ovarian cancer is associated with histological grade and clinical stage. Cancer Lett.* **164(1)**, 41–9 (2001).
- <sup>175</sup>. Weichert, W., Denkert, C., Schmidt, M., Gekeler, V., Wolf, G., Köbel, M., Dietel, M., Hauptmann, S. *Polo-like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma. Br. J. Cancer.* **90(4)**, 815–21 (2004).
- <sup>176</sup>. Takahashi, T., Sano, B., Nagata, T., Kato, H., Sugiyama, Y., Kunieda, K., Kimura, M., Okano, Y. & Saji, S. *Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. Cancer Sci.* **94**, 148–152 (2003).
- <sup>177</sup>. Ito, Y., Miyoshi, E., Sasaki, N., Kakudo, K., Yoshida, H., Tomoda, C., Uruno, T., Takamura, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Matsuzuka, F., Matsuura, N., Kuma, K. & Miyauchi, A. *Polo-like kinase 1 overexpression is an early event in the progression of papillary carcinoma. Br. J. Cancer* **90**, 414–418 (2004).
- <sup>178</sup>. Xum J., Shen, C., Wang, T., Quan, J. *Structural basis for the inhibition of Polo-like kinase I. Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1047–1053 (2013).
- <sup>179</sup>. Burstein, D. E., Oami, S., Dembitzer, F. Chu, C., Cernaianu, G., Leytin, A., Misilim, E., Jammula, S. R., Strauchen, J., and Kohtz, D. S. *Monoclonal antibody specific for histone H1 phosphorylated by cyclin-dependent kinases: a novel immunohistochemical probe for proliferation and neoplasia. Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **15**, 507–711 (2002).

## Annexe

**Tableau 1. Liste des souches mentionnées dans les figures.**

Figure	Nom de la souche	Génotype
Figure 9	D4107	<i>MATa CDC5</i>
	D42	<i>MATa cdc13-1</i>
	D773	<i>MATa cdc5-L170P::Tadh1::HIS3MX6</i>
	D4285	<i>MATa cdc5-nf:NATMX6</i>
	D29	<i>MATa msd2-1::URA3</i>
	D1465	<i>MATa cdc5-16</i>
Figure 13	D4107	<i>MATa CDC5</i>
	D42	<i>MATa cdc13-1</i>
	D773	<i>MATa cdc5-L170P::Tadh1::HIS3MX6</i>
	D4589	<i>MATa cdc5-C481Y-Q494R::Tadh1::HIS3MX6</i> Également appelé: <i>cdc5-17::Tadh1::HIS3MX6</i>
	D4558	<i>MATa cdc5-L170P-K171R::Tadh1::HIS3MX6</i>
	D4587	<i>MATa cdc5-L170P-K171R-R172K::Tadh1::HIS3MX6</i> Également appelé: <i>cdc5-18::Tadh1::HIS3MX6</i>
Figure 14	D4107	<i>MATa CDC5</i>
	D42	<i>MATa cdc13-1</i>
	D4589	<i>MATa cdc5-17::Tadh1::HIS3MX6</i>
	D4772	<i>MATa cdc5-17::Tadh1::HIS3MX6</i> (rétrocroisé 1X)
	D4820	<i>MATa cdc5-17::Tadh1::HIS3MX6</i> (rétrocroisé 2X)
	D4891	<i>MATa cdc5-17::Tadh1::HIS3MX6</i> (rétrocroisé 3X)

**Tableau 1. (Suite)**

<b>Figure</b>	<b>Nom de la souche</b>	<b>Génotype</b>
	D4587	<i>MATa cdc5-18::Tadh1::HIS3MX6</i>
	D4948	<i>MATa cdc5-18::Tadh1::HIS3MX6</i> (rétrocroisé 1X)
	D5004	<i>MATa cdc5-18::Tadh1::HIS3MX6</i> (rétrocroisé 2X)
	D5070	<i>MATa cdc5-18::Tadh1::HIS3MX6</i> (rétrocroisé 3X)
Figure 15	Souches non-conservées dans la collection	<i>MATa cdc5-17::Tadh1::HIS3MX6-YCplac22</i> <i>MATa cdc5-17::Tadh1::HIS3MX6-YCplac22-CDC5</i> <i>MATa cdc5-18::Tadh1::HIS3MX6-YCplac22</i> <i>MATa cdc5-18::Tadh1::HIS3MX6-YCplac22-CDC5</i>
Figure 16	D4107	<i>MATa CDC5</i>
	D4891	<i>MATa cdc5-17::Tadh1::HIS3MX6</i>
	D46	<i>MATa cdc14-3</i>
Figure 17	D4107	<i>MATa CDC5</i>
	D5070	<i>MATa cdc5-18::Tadh1::HIS3MX6</i>
	D46	<i>MATa cdc14-3</i>

**Tableau 2. Liste des souches utilisées lors de l'étape de génération de nouveaux mutants *cdc5*.**

<b>Nom de la souche</b>	<b>Génotype</b>
D773	<i>MATa cdc5-L170P::Tadh1::HIS3MX6</i>
D777	<i>MATa cdc5-99::Tadh1::HIS3MX6</i>
D1224	<i>MATa cdc5-77::HIS3MX6</i>
D1640	<i>MATa cdc5-85::HIS3MX6</i>
D4558	<i>MATa cdc5-L170P-K171R::Tadh1::HIS3MX6</i>

**Tableau 3. Recettes et composition des milieux de culture et des produits utilisés dans leur préparation.**

<b>Milieu de culture/solution</b>	<b>Volume final</b>	<b>Composition</b>
1,05% YEP	1000 ml	22,2 g de Difco Bacto Yeast Extract, 44,4 g de Difco Bacto Peptone et 1L d'eau bi-distillée. Le tout doit être stérilisé (autoclavé pendant 35 min à 121°C).
2,22 X SC-Leu-His	1000 ml	14,9 g de Difco Bacto Yeast Nitrogen base sans AA (mais avec du sulfate d'ammonium) et 4,44 g de poudre de chaque acide aminé (à l'exception de l'histidine et de la leucine). Le tout doit être stérilisé (autoclavé pendant 35 min à 121°C).
2,22 X SC-TRP-URA	1000 ml	14,9 g de Difco Bacto Yeast Nitrogen base sans AA (mais avec du sulfate d'ammonium) et 4,44 g de poudre de chaque acide aminé (à l'exception du tryptophane et de l'uracile). Le tout doit être stérilisé (autoclavé pendant 35 min à 121°C).
4% agar	250 ml	10 g d'agar, 250 ml d'eau bi-distillée. Le tout doit être stérilisé (autoclavé pendant 35 min à 121°C).
SC-HIS solide	-	4% d'agar fondu, 25 ml de glucose, 5 ml de 100% adénine, 225 ml de 2,22 X SC-Leu-His et 8,33 ml de 60% Leucine.
SC-TRP liquide	500 ml	25 ml de glucose, 5 ml de 100% adénine, 225 ml de 2,22 X SC-TRP-URA, 5 ml de 100% Uracile et 240 ml d'eau bi-distillée stérile
SC-TRP solide	-	25 ml de glucose, 5 ml de 100% adénine, 225 ml de 2,22 X SC-TRP-URA, 5 ml de 100% Uracile et 4% d'agar

**Tableau 3. (Suite)**

<b>Milieu de culture/solution</b>	<b>Volume final</b>	<b>Composition</b>
SPO (milieu solide)	-	<p><u>Solution 1 [pour 2500 ml] :</u> 30 g d'acétate de potassium, 60 g de Difco Bacto agar et 2500 ml d'eau bi-distillée.</p> <p><u>Solution 2 [pour 500 ml] :</u> 1,5 g de supplément d'acides aminés en poudre (AA- URA- TRP), 7,5 ml de 100 X URA, 7,5 ml de 100 X TRP et 500 ml d'eau bi-distillée.</p> <p>Les deux solutions doivent être stérilisées (autoclavées pendant 40 min à 121°C). Les deux solutions doivent être mélangées + 4% d'agar fondu.</p>
YEPD liquide	500 ml	25 ml de 40% glucose, 5 ml de 100% adénine et 475 ml de 1,05% YEP.
YEPD solide	-	4% d'agar fondu, 25 ml de 40% glucose, 5 ml de 100% adénine et 225 ml de 2,22% YEP

**Tableau 4. Recettes et compositions des solutions utilisées.**

<b>Section</b>	<b>Solution</b>	<b>Composition</b>
Extraction de l'ADN génomique	Tampon TE [Pour 250 ml]	2,5 ml de 1M Tris-HCl à pH 8,0 [10 mM], 0,5 ml de 0,5 M EDTA [1mM] et 247 ml d'eau bi-distillée.
	Tampon de lyse [pour 100 ml]	1mL de 1M Tris-HCl à pH 8,0 [10 mM], 0,2 ml de 0,5 M EDTA [1mM], 2ml de 5M NaCl [100 mM], 10 mL de 20% Triton X-100 [2%], 5ml de 20% SDS [1%] et 81,8 ml d'eau bi-distillée.

**Tableau 4. (Suite)**

<b>Section</b>	<b>Solution</b>	<b>Composition</b>
Transformation de levure	1M LiAc [pour 200 ml]	20,4 g d'acétate de Lithium dihydrate et 180 ml d'eau bi-distillée. Le tout doit être stérilisé par filtration.
	50% PEG [pour 100 ml]	50 g de Polyéthylène glycol et 60 ml d'eau bi-distillée. Le tout doit être stérilisé par filtration.
Synchronisation cellulaire	Solution de fixation [pour 10 ml]	9 ml de 0,1M KPO <sub>4</sub> pH6,4 et 1 ml de 37% formaldéhyde.
Microscopie à contraste interférentiel	0,1 M KPO <sub>4</sub> pH6,4 [pour 1000 ml]	27,8 ml de 1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 72,2 ml de 1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> et 900 ml d'eau bi-distillée.
Immunofluorescence	IF sorbitol [pour 1000 ml]	17,7 g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhydre, 7,0 g d'acide citrique anhydre, 218,64 g de sorbitol et 1000 ml d'eau bi-distillée. Le tout doit être stérilisé par filtration.
	PBS-BSA [pour 150 ml]	6 ml de 1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (40 mM final), 1,5 ml de 1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (10 mM final), 4,5 ml de 5M NaCl (150 mM final), 1,5 ml 1,5 M NaN <sub>3</sub> (15 mM final), 1,5 g de BSA (Frac. V) (1% final) et 136,5 ml d'eau bi-distillée. Le tout doit être stérilisé.
	Solution de digestion [pour 0,225 ml]	0,203 ml d'IF sorbitol (en solution), 0,02 ml de Glusulase (Perkin Elmer®) et 0,002 ml de 0,01 g/ml zymolyase 100 T.

**Tableau 4. (Suite)**

<b>Section</b>	<b>Solution</b>	<b>Composition</b>
Immunofluorescence	0,1% de polylysine [pour 100 ml]	0,1 g de Poly-lysine et 100 ml d'eau bi-distillée. Le tout doit être stérilisé par filtration.
Cytométrie en flux	RNase A à 0,1 g/ml	RNase A dans 10 mM de Tris pH7,5 et 10 mM MgCl <sub>2</sub> . Bouillie pendant 10 minutes.
	Sytox Green nucleic acid stain	5mM de la solution dans du DMSO.

**Tableau 5. Liste des amorces utilisées lors de la PCR mutagène dirigée.**

<b>Amorce</b>	<b>Séquence [5' à 3']</b>	<b>But de son utilisation</b>
241 (CDC5-L2)	GAAAGATGTTTGTTTCATTTC GTACC	amplifier la cassette de sélection <i>CDC5:Tadh1::MX6</i>
2583 (CDC5-U77)	ATATCTTATTGGAGATATGC CCCAACGGTTCATTgATGGA ATTACcAAAAAGAAGAAAA G	Créer la mutation L170P dans le locus <i>CDC5</i> endogène et introduire une mutation silencieuse à L166 pour enlever un site de restriction naturel pour AseI (TTA→TTG)
2584 (CDC5-U78)	ATATCTTATTGGAGATATGC CCCAACGGTTCATTAATGGA ATTACc <b>Agg</b> AGAAGAAAAAG	Créer la mutation L170P dans le locus <i>CDC5</i> endogène et la mutation K171R
2585 (CDC5-U79)	ATATCTTATTGGAGATATGC CCCAACGGTTCATTAATGGA ATT <b>TcCct</b> AAAGAAGAAAAAG	Créer la mutation L170P dans le locus <i>CDC5</i> endogène et la mutation L169F
2603 (CDC5-U80)	ATATCTTATTGGAGATATGC CCCAACGGTTCATTAATGGA ATTAC <b>Ctc</b> AAAGAAGAAAAAG	Créer la mutation L170P dans le locus <i>CDC5</i> endogène et la mutation K171Q
2604 (CDC5-U81)	ATATCTTATTGGAGATATGC CCCAACGGTTCATTAATGGA ATTAC <b>CctAtg</b> AGAAGAAAAAG	Créer la mutation L170P dans le locus <i>CDC5</i> endogène et la mutation K171M
2605 (CDC5-82)	ATATCTTATTGGAGATATGC CCCAACGGTTCATTAATGGA ATTAC <b>Cctg</b> AAAGAAGAAAAAG	Créer la mutation L170P dans le locus <i>CDC5</i> endogène et la mutation K171E
2606 (CDC5-U83)	ATATCTTATTGGAGATATGC CCCAACGGTTCATTAATGGA ATTAC <b>CctAggAa</b> AAGAAAAAGT TT	Créer la mutation L170P dans le locus <i>CDC5</i> endogène et les mutations K171R et R172K.
2607 (CDC5-U84)	ATATCTTATTGGAGATATGC CCCAACGGTTCATTAATGGA <b>AggAcCctAgg</b> AGAAGAAAAAG	Créer la mutation L169G dans le locus <i>CDC5</i> endogène et les mutations L170P et K171R.
2608 (CDC5-U85)	ATATCTTATTGGAGATATGC CCCAACGGTTCATTAATGGA ATT <b>AggtAgg</b> AGAAGAAAAAG	Créer la mutation L170G dans le locus <i>CDC5</i> endogène et la mutation K171R.

**Tableau 6. Combinaison des amorces utilisées lors de la PCR mutagène dirigée et les ADN génomiques mutés.**

Combinaison d'amorces	ADN génomique utilisé
2583 + 241	<i>cdc5-99</i> <i>cdc5-77</i> <i>cdc5-85</i>
2584 + 241	<i>cdc5-L170P</i>
2585 + 241	<i>cdc5-L170P</i>
2603 + 241	<i>cdc5-L170P</i>
2604 + 241	<i>cdc5-L170P</i>
2605 + 241	<i>cdc5-L170P</i>
2606 + 241	<i>cdc5-L170P-K171R</i>
2607 + 241	<i>cdc5-L170P-K171R</i>
2608 + 241	<i>cdc5-L170P-K171R</i>

**Tableau 7. Liste des amorces utilisées pour le séquençage du locus du gène *CDC5***

Amorce	Séquence	But de son utilisation
336 ( <i>CDC5</i> -U20)	AGAACGAATAAATATCTCGAGGACC	Amorce de séquençage du locus <i>CDC5</i> . Elle se lie à environ 500 pb en amont de l'ORF (l'origine de répllication)
337 ( <i>CDC5</i> -U21)	GAAAGAACAGAGTAAGATCAAGTCG	Amorce de séquençage du locus <i>CDC5</i> . Elle se lie à environ 25 pb en amont de l'ORF
338 ( <i>CDC5</i> -U22)	TCTATATCTTATTGGAGATATGCCC	Amorce de séquençage du locus <i>CDC5</i> . Elle se lie à environ 25 pb du début de l'ORF
339 ( <i>CDC5</i> -U23)	GACTGAAATTATGGATTATGTATGG	Amorce de séquençage du locus <i>CDC5</i> . Elle se lie à environ 1000 pb du début de l'ORF
340 ( <i>CDC5</i> -U24)	TGAATGGCATTGTAGAAGCAGAAGC	Amorce de séquençage du locus <i>CDC5</i> . Elle se lie à environ 1500 pb du début de l'ORF
341 ( <i>CDC5</i> -U25)	CTTAGTTGAAGTACTAAAATATGGC	Amorce de séquençage du locus <i>CDC5</i> . Elle se lie à environ 2000 pb du début de l'ORF
664 ( <i>CDC5</i> -U46)	GAGGGAATCGTACGAGGACGCCAGC	Amorce qui amplifie l'ORF du locus <i>CDC5</i>
665 ( <i>CDC5</i> -L10)	CTCAGGAAGCGACAGGTTATCATCC	Amorce qui amplifie l'ORF du locus <i>CDC5</i>