

ELYSE LAVOIE

**ÉTUDE DE LA FONCTION CELLULAIRE DE *SYP1*
CHEZ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Biologie
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2006

Résumé

L'organisation du cytosquelette d'actine chez *Saccharomyces cerevisiae* nécessite plusieurs protéines dont la profiline, impliquée dans la polymérisation des filaments d'actine. Les cellules *pfy1Δ* présentent un phénotype anormal; les granules corticaux sont dépolarisés et il y a absence de câbles d'actine visibles. Le gène *SYP1* a été identifié en tant que suppresseur de la souche *pfy1Δ*. Nous avons étudié *SYP1* dans le but de lui attribuer une fonction cellulaire. La surexpression de *SYP1* dans les souches *bni1Δ*, *cdc10Δ*, *chs5Δ*, *end3Δ* et *sla2Δ* provoque un retard important de la croissance tandis qu'elle corrige le défaut de bourgeonnement de la souche *arf3Δ* ainsi que le défaut d'endocytose des souches *ede1Δ*, *sla1Δ* et *sac6Δ*. La localisation cellulaire dans des souches mutantes révèle que Syp1p est délocalisée dans les souches *bni1Δ*, *cdc10Δ*, *cdc12-6*, *chs1Δ* et *cla4Δ*. Ces résultats nous permettent de conclure que Syp1p joue un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine ainsi que dans l'endocytose.

Avant-Propos

Avant tout, je tiens à remercier sincèrement mon directeur de recherche, le Dr Dominick Pallotta, de m'avoir permis de réaliser ce projet de maîtrise. Je lui suis également très reconnaissante pour son soutien scientifique et financier et sa présence tout au long de ces deux années. Ce fût une expérience fort enrichissante tant sur la plan professionnel que sur le plan personnel. Merci!

Je tiens également à remercier mes anciennes collègues de travail, Ewa Zakrzewska et Marjorie Perron, qui étaient toujours disponibles pour répondre à mes nombreuses questions ou tout simplement pour discuter un peu... Elles m'ont également appris beaucoup de choses, plus particulièrement sur la levure évidemment! Votre départ vers d'autres projets a fait un grand vide dans le laboratoire mais sachez que vous avez laissé de très beaux souvenirs! Je remercie tout spécialement Alexandra Lambert, une amie et une collègue de travail avec qui il est toujours très plaisant de discuter... et d'aller aux démonstrations des compagnies pour les échantillons gratuits, les stylos qui font de la lumière et tous les trucs étranges qu'on peut rapporter en plus des nombreux prix qu'on peut y gagner! Merci pour tes nombreux conseils et pour ton aide si précieuse dans la préparation de mes présentations ainsi que dans la rédaction de ce manuscrit. Un merci tout spécial à Manon Valcourt et Déborah Huygues pour leur participation au projet de la localisation cellulaire.

Enfin, je ne peux passer sous silence la présence dans ma vie d'Alexandre Chaussé-Paradis. Merci de m'avoir soutenue et encouragée, particulièrement durant les deux dernières années. Merci de ta patience, pour m'avoir supporté pendant mes nombreuses périodes de stress avant mes présentations, examens et tous ces autres (nombreux) moments que je jugeais stressant... Merci d'être là tout simplement.

On ne fait jamais attention à ce qui a été fait ; on ne voit que ce qui reste à faire.

Marie Curie

Table des matières

Table des matières	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations.....	x
Chapitre 1 INTRODUCTION	1
1.1 Introduction générale.....	2
1.2 Le cytosquelette d'actine chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
1.2.1 L'actine	2
1.2.2 L'organisation du cytosquelette d'actine et le cycle cellulaire de <i>S. cerevisiae</i>	4
1.2.2.1 La conjugaison	4
1.2.3 La polymérisation de l'actine.....	6
1.2.3.1 La nucléation par le complexe Arp2/3.....	6
1.2.3.2 La nucléation par les formines	9
1.2.4 Les protéines de liaison à l'actine	11
1.2.4.1 La profiline.....	11
1.2.4.1.1 Le phénotype associé à la délétion de la profiline	13
1.2.4.2 La cofiline	13
1.2.4.3 Les protéines de coiffe.....	15
1.2.4.4 La twinfiline.....	15
1.2.4.5 La fimbrine	15
1.3 La signalisation du cytosquelette d'actine	16
1.3.1 La régulation des GTPases.....	16
1.3.2 La sélection du site de bourgeonnement.....	16
1.3.3 La croissance polarisée.....	18
1.3.3.1 La famille des Rho-GTPases.....	19
1.3.3.1.1 Cdc42p – Régulateur central de la polarité cellulaire	19
1.3.3.1.2 Les protéines Rho1p et Rho2p	19
1.3.3.1.3 Les protéines Rho3p et Rho4p	20
1.3.3.1.4 La protéine Rho5p	21
1.4 La division cellulaire.....	21
1.4.1 Formation de la cicatrice de bourgeonnement.....	24
1.5 L'endocytose	25
1.5.1 Isolation des mutants <i>end</i>	25
1.5.1.1 Les mutants <i>end</i> : des régulateurs ou composants du cytosquelette d'actine.....	26
1.5.2 Le rôle du cytosquelette d'actine dans l'endocytose	26
1.5.2.1 La voie de signalisation de Tor2p-Rho1p et l'endocytose	27
1.5.2.2 Modèle de l'implication de l'actine dans l'endocytose.....	28
1.6 Étude de la régulation du cytosquelette d'actine.....	31
1.6.1 Le gène <i>SYP1</i>	32
1.7 Origine et Objectifs du projet	35
Chapitre 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	36
2.1 Souche bactérienne et conditions de croissance	37
2.1.1 Souche bactérienne.....	37
2.1.2 Conditions de croissance	37
2.2 Souches de levure et conditions de croissance.....	37

2.2.1	Souches de levure.....	37
2.2.2	Conditions de croissance	41
2.3	Constructions plasmidiques	42
2.4	Manipulation de l'ADN recombinant	42
2.4.1	Digestion par des enzymes de restriction.....	42
2.4.2	Ligature de fragments d'ADN	43
2.4.3	Électrophorèse sur gel d'agarose	43
2.4.4	Extraction d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose.....	44
2.5	Transformation bactérienne et extraction de l'ADN plasmidique.....	44
2.5.1	Préparation des cellules compétentes	44
2.5.2	Transformation bactérienne.....	45
2.5.3	Extraction de l'ADN plasmidique.....	45
2.5.3.1	Méthode au CTAB	45
2.5.3.2	Méthode utilisant la trousse de la compagnie QIAGEN.....	46
2.6	Transformation de levures et isolation de l'ADN génomique.....	46
2.6.1	Transformation de <i>S. cerevisiae</i> par la méthode LIAC	46
2.6.2	Isolation de l'ADN génomique de <i>S. cerevisiae</i>	46
2.7	Sporulation et dissection des tétrades.....	47
2.7.1	Création de doubles mutants et sporulation des souches diploïdes	47
2.7.1.1	Création des doubles mutants.....	47
2.7.1.2	Sporulation des souches diploïdes.....	48
2.7.2	Dissection des tétrades.....	48
2.7.2.1	Digestion de la paroi cellulaire de l'asque.....	48
2.7.2.2	Microdissection des ascospores.....	49
2.7.2.3	Sélection des doubles mutants sur milieu sélectif	49
2.7.3	Vérification des délétions par PCR	49
2.8	Test de conjugaison.....	50
2.9	Détermination du génotype	51
2.10	Test de croissance.....	51
2.11	Coloration et microscopie.....	52
2.11.1	Coloration de l'actine filamenteuse (actine-F).....	52
2.11.2	Coloration des cicatrices de bourgeonnement (chitine)	52
2.11.3	Essai d'endocytose par l'internalisation du Lucifer Yellow.....	53
2.11.4	Observation en contraste interférentiel (Nomarski)	54
2.11.5	Observation de la GFP (Green fluorescent protein)	54
Chapitre 3	RÉSULTATS.....	55
3.1	La surexpression de <i>SYP1</i>	56
3.1.1	La surexpression de <i>SYP1</i> corrige le phénotype associé à la délétion du gène de la profiline.....	56
3.1.1.1	<i>SYP1</i> agit par la voie de signalisation de <i>RHO2</i> pour repolariser le cytosquelette d'actine.....	59
3.1.1.2	La formation de câbles d'actine par la surexpression de <i>SYP1</i> requiert la présence des formines Bni1p et Bnr1p.....	59
3.1.1.3	La surexpression de <i>SYP1</i> et le cytosquelette d'actine dans les souches mutantes 60	
3.1.2	La surexpression de <i>SYP1</i> corrige le bourgeonnement aléatoire de <i>arf3Δ</i>	61

3.1.3	La surexpression de <i>SYP1</i> corrige le défaut d'endocytose de <i>ede1Δ</i> , <i>sac6Δ</i> et de <i>sla1Δ</i>	64
3.1.3.1	Correction du défaut d'endocytose dans la souche <i>pfy1Δ</i>	66
3.2	Localisation cellulaire de Syp1p	68
3.2.1	Localisation cellulaire de Syp1p dans les souches mutantes	68
3.2.1.1	Délocalisation de la protéine Syp1p dans les mutants <i>bni1Δ</i> , <i>chs1Δ</i> , <i>cdc10Δ</i> , <i>cla4Δ</i> et <i>cdc12-6</i>	69
3.3	Interaction génétique	71
3.3.1	Phénotype de la souche <i>syp1Δ</i>	72
3.3.2	Interaction génétique entre <i>SYP1</i> et <i>ARF3</i>	72
3.3.2.1	Phénotype de la souche <i>arf3Δ</i>	73
3.3.2.2	Caractérisation du double mutant <i>syp1Δ arf3Δ</i>	73
3.3.3	Interaction génétique entre <i>SYP1</i> et <i>BNI1</i>	73
3.3.3.1	Phénotype de la souche <i>bni1Δ</i>	73
3.3.3.2	Caractérisation du double mutant <i>syp1Δ bni1Δ</i>	74
3.3.4	Interaction génétique entre <i>SYP1</i> et <i>CHS1</i>	74
3.3.4.1	Phénotype de la souche <i>chs1Δ</i>	75
3.3.4.2	Caractérisation du double mutant <i>syp1Δ chs1Δ</i>	75
3.3.5	Interaction génétique entre <i>SYP1</i> et <i>EDE1</i>	75
3.3.5.1	Phénotype de la souche <i>ede1Δ</i>	75
3.3.5.2	Caractérisation du double mutant <i>syp1Δ ede1Δ</i>	76
3.3.6	Interaction génétique entre <i>SYP1</i> et les gènes <i>CDC10</i> et <i>SLA1</i>	76
Chapitre 4	DISCUSSION	77
4.1	L'étude de la surexpression de <i>SYP1</i>	78
4.1.1	La formation de câbles d'actine dans la souche <i>pfy1Δ</i>	78
4.1.2	La formation des câbles d'actine par la surexpression de <i>SYP1</i> est dépendante des formines	79
4.1.3	<i>SYP1</i> agit par la voie de signalisation des protéines de type Rho	81
4.1.4	La surexpression de <i>SYP1</i> affecte la progression du cycle cellulaire	81
4.1.5	<i>SYP1</i> est impliqué dans l'établissement de la polarité cellulaire et la sélection du site de bourgeonnement	82
4.1.6	Implication de <i>SYP1</i> dans l'endocytose	82
4.2	L'étude de la localisation cellulaire de Syp1p	85
4.3	Recherche d'interaction génétique avec <i>SYP1</i>	87
4.3.1	Interaction génétique entre <i>SYP1</i> et les gènes <i>CDC10</i> et <i>SLA1</i>	87
4.3.2	Interaction génétique entre <i>SYP1</i> et les gènes <i>ARF3</i> , <i>BNI1</i> , <i>CHS1</i> et <i>EDE1</i>	89
Chapitre 5	CONCLUSION	91
5.1	Conclusion	92
5.2	Perspectives	95

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résultats des études d'immunoprécipitation chez <i>S. cerevisiae</i> présentant les complexes protéiques dans lequel Syp1p est retrouvée.	34
Tableau 2 : Souche bactérienne utilisée.	37
Tableau 3 : Souches de levure utilisées.	38
Tableau 4 : Complément d'acides aminés essentiels enrichi d'adénine et d'uracile.	41
Tableau 5 : Liste des plasmides utilisés.	42
Tableau 6 : Amorces utilisées pour la vérification des délétions des doubles mutants.	50
Tableau 7 : Résultats des décomptes cellulaires des souches dont la croissance est ralentie par la surexpression de <i>SYP1</i> (pEML02).	62
Tableau 8 : La surexpression de <i>SYP1</i> (pEML02) corrige partiellement le défaut d'endocytose des souches <i>ede1</i> Δ , <i>sac6</i> Δ et <i>sla1</i> Δ	66

Liste des figures

Figure 1 : La polymérisation de l'actine.....	3
Figure 2 : Organisation du cytosquelette d'actine au cours du cycle cellulaire.....	5
Figure 3 : La nucléation des filaments d'actine par le complexe nucléateur Arp2/3.	8
Figure 4 : Modèle de la nucléation de l'actine par les formines.....	10
Figure 5 : Rôle de la profiline dans la polymérisation de l'actine.	11
Figure 6 : Inhibition de la phospholipase C (PLC) par la profiline.....	12
Figure 7 : Régulation de la polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine.	14
Figure 8 : Patron de bourgeonnement axial et bipolaire chez <i>S. cerevisiae</i>	17
Figure 9 : Sélection du site de bourgeonnement et initiation de la polarité cellulaire.	18
Figure 10 : Localisation des septines au cours du cycle cellulaire.....	23
Figure 11 : Implication de Rho1p-Fks1p dans l'endocytose.....	28
Figure 12 : Représentation schématique du mécanisme de l'endocytose chez <i>S. cerevisiae</i>	30
Figure 13 : Modèle proposé pour un sentier de signalisation impliquant les suppresseurs de la délétion de la profiline (Marcoux et al., 2000).....	32
Figure 14 : Identification de <i>SYP1</i> en tant que suppresseur de la délétion de la profiline.	57
Figure 15 : La surexpression de <i>SYP1</i> par pEML02 dans la souche <i>pfy1Δ</i> à 30°C.....	57
Figure 16 : Correction de la croissance de la souche <i>pfy1Δ</i> par la surexpression de <i>SYP1</i>	58
Figure 17 : La formation de câbles d'actine par la surexpression de <i>SYP1</i> est dépendante des formines Bni1p et Bnr1p.....	60
Figure 18 : Correction partielle du bourgeonnement aléatoire de <i>arf3Δ</i> par la surexpression de <i>SYP1</i>	63
Figure 19 : La surexpression de <i>SYP1</i> par pEML02 corrige le défaut d'endocytose de la souche <i>ede1Δ</i>	65
Figure 20 : Correction du défaut d'endocytose de la souche <i>pfy1Δ</i> par la surexpression de <i>SYP1</i>	67
Figure 21 : Localisation cellulaire de la protéine Syp1p-GFP.....	70
Figure 22 : Vérification des délétions géniques des doubles mutants par PCR.	71
Figure 23 : Patron de bourgeonnement de la souche <i>syp1Δ</i>	72
Figure 24 : Patron de bourgeonnement de la souche <i>bni1Δ</i> à 37°C.....	74
Figure 25 : Séquence en acides aminés de la protéine Syp1p.....	84
Figure 26 : Illustration des domaines visés par la mutagenèse dirigée.....	95

Liste des abréviations

a.a. :	Acide aminé
Actine-F :	Actine filamenteuse
Actine-G :	Actine globulaire
BSA :	Bovine Serum Albumine (Sérum albumine bovine)
CTAB :	Bromure d'héxadécyltriméthyl ammonium
DO :	Densité optique
DTT :	1,4 – Dithiothréitol
EDTA :	Acide éthylène diamine tétraacétique
GFP :	Green fluorescent protein (Protéine verte fluorescente)
IPTG :	Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside
kDa :	Kilo Dalton
LiOAc :	Acétate de lithium
LY :	Lucifer Yellow
MOPS :	3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid
ORF :	Open reading frame (Cadre de lecture ouvert)
PCR :	Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
PEG :	Polyéthylèneglycol
SDS :	Sodium dodécyl sulfate
X-Gal :	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosidase

Chapitre 1 INTRODUCTION

1.1 Introduction générale

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un très bon modèle pour l'étude du cytosquelette des cellules eucaryotes. Cet organisme unicellulaire, pouvant être haploïde ou diploïde, possède un génome peu complexe et entièrement séquencé facilitant les études génétiques. Chez la levure, le cytosquelette est impliqué dans plusieurs processus cellulaires tels que la division cellulaire, la ségrégation des chromosomes, le positionnement et le mouvement des organites cellulaires, la formation du bourgeon, la croissance polarisée ainsi que l'endocytose et la sécrétion (Schmidt and Hall, 1998; Winsor and Schiebel, 1997). Le cytosquelette de *S. cerevisiae* se compose de deux types de fibres : les microtubules et les microfilaments. Les microtubules sont des polymères cylindriques de 24 ηm de diamètre composés d'hétérodimères de tubuline α et β . Ils sont impliqués principalement dans la séparation des chromosomes ainsi que dans le transport cellulaire et dans le positionnement et la migration du noyau dans le bourgeon au cours de la mitose (Schott et al., 2002; Winsor and Schiebel, 1997). Les microfilaments sont des polymères d'actine de formes hélicoïdales d'un diamètre de 7-9 ηm . Chez les cellules de mammifères, l'actine est principalement associée à la motilité cellulaire. Étant donné que *S. cerevisiae* est non motile, l'actine joue un rôle uniquement au niveau structural. Ainsi, l'actine est responsable du maintien de l'intégrité du cytosquelette, du bourgeonnement, de l'endocytose, de la sécrétion et de la réponse aux changements extracellulaires (Mulholland et al., 1997; Ng and Abelson, 1980; Riezman, 1993; Schmidt and Hall, 1998).

1.2 Le cytosquelette d'actine chez *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.1 L'actine

L'actine est une petite protéine de 375 a.a. ubiquitaire à toutes les cellules eucaryotes. Cette protéine cytoplasmique très abondante peut atteindre plus de 5% des protéines totales de la cellule. Chez *S. cerevisiae*, l'actine est codée par un seul gène, *ACT1*, dont la délétion est létale (Ng and Abelson, 1980). Dans la cellule, on l'a retrouve sous deux formes : la forme monomérique globulaire de 42 kDa (actine-G) et la forme filamenteuse (actine-F) constituée d'une suite de monomères d'actine-G polymérisés en longs filaments hélicoïdaux. L'actine globulaire peut fixer l'ADP et l'ATP et possède une activité ATPasique impliquée dans la polymérisation de l'actine (Schmidt and Hall, 1998). L'actine filamenteuse a la particularité de

posséder une extrémité positive (barbue) et une extrémité négative (pointue) lui conférant une structure polarisée. Cette polarité influence la polymérisation de l'actine qui s'effectue alors selon le modèle du tapis roulant « treadmilling », c'est-à-dire que la polymérisation s'effectue plus rapidement à l'extrémité barbue qu'à l'extrémité pointue. En effet, l'actine-G-ATP est promptement polymérisée à l'extrémité barbue du filament en formation. Par l'activité ATPasique de l'actine-G, l'hydrolyse de l'ATP en ADP est effectuée rapidement suite à la polymérisation. Lorsque les monomères d'actine sont associés à l'ADP le filament d'actine a alors tendance à se dépolymériser lentement (Figure 1). Toutefois, la polymérisation n'est pas dépendante de l'énergie puisqu'elle peut avoir lieu autant avec l'actine-G-ATP qu'avec l'actine-G-ADP quoique le processus de polymérisation soit beaucoup plus efficace avec l'actine-G-ATP (Schmidt and Hall, 1998; Theriot, 1997).

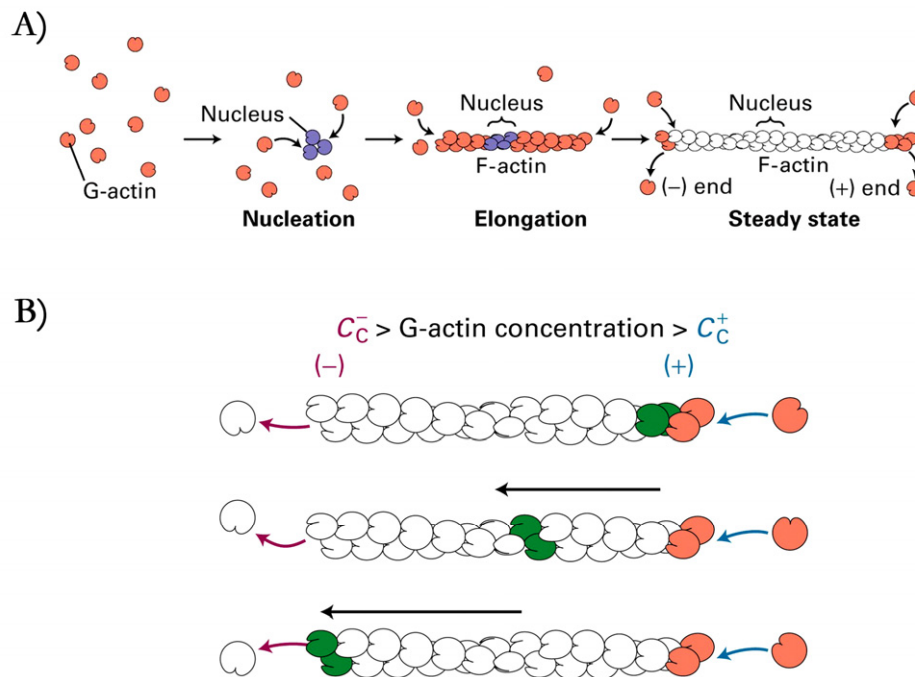


Figure 1 : La polymérisation de l'actine.

(A) L'actine-G-ATP a tendance à polymériser spontanément dans la cellule pour former les filaments d'actine. Les filaments d'actine possèdent une extrémité positive (+) et une extrémité négative (-) leur conférant une polarité. (B) Cette polarité engendre un mécanisme de polymérisation selon le modèle du tapis roulant ou « treadmilling », c'est-à-dire que la polymérisation s'effectue plus rapidement à l'extrémité positive qu'à l'extrémité négative. L'actine-G-ATP (rose) est rapidement hydrolysée en actine-G-ADP (vert) qui finira par être relâché à l'extrémité négative (-) du filament. Inspirée de (Lodish, 2003).

1.2.2 L'organisation du cytosquelette d'actine et le cycle cellulaire de *S. cerevisiae*.

L'actine filamenteuse chez la levure est présente sous deux formes distinctes : les granules corticaux et les câbles (Adams and Pringle, 1984). Les granules corticaux sont formés de courts fragments d'actine filamenteuse associés à de nombreuses protéines de liaison à l'actine. Les câbles sont formés de plusieurs filaments d'actine reliés de façon parallèle. La formation des granules corticaux et des câbles s'effectue selon deux voies distinctes : la formation des granules corticaux nécessite la présence du complexe Arp2/3 tandis que la formation des câbles implique plutôt les formines Bni1p et Brn1p (Machesky and Gould, 1999; Schott et al., 2002). Ces deux structures présentent une polarité qui change au cours du cycle cellulaire (Figure 2). Au tout début de la phase G1, les granules corticaux et les câbles sont distribués de manière aléatoire dans la cellule. Suivant la sélection du site de bourgeonnement, les granules corticaux se concentrent au nouveau site de bourgeonnement et les câbles s'orientent alors en leur direction. Tout au long de la maturation du bourgeon, les granules corticaux se concentrent dans le bourgeon tandis que les câbles, présents principalement dans la cellule mère, sont polarisés en direction des granules corticaux. À l'atteinte de la taille critique du bourgeon, les deux structures d'actine filamenteuse se redistribuent de façon aléatoire dans la cellule mère et dans le bourgeon. Au moment de la division cellulaire, les granules corticaux se concentrent au septum et les câbles présents dans le bourgeon et dans la cellule mère s'orientent en leur direction (Pruyne and Bretscher, 2000a; Pruyne and Bretscher, 2000b; Schmidt and Hall, 1998).

1.2.2.1 La conjugaison

Chez *S. cerevisiae* il existe deux types sexuels différents : *MATa* et *MAT α* . La conjugaison entre deux cellules haploïdes est dite hétérosexuelle, c'est-à-dire qu'elle ne peut avoir lieu qu'avec des cellules de type sexuel opposé. La cellule diploïde résultant de la conjugaison est de type *MATa/ α* (Tkacz and MacKay, 1979). Chacun des types sexuels sécrètent une phéromone appelée facteur **a** pour les cellules *MATa* et le facteur α pour les cellules *MAT α* . La conjugaison est initiée lorsque les cellules répondent de manière spécifique aux phéromones sécrétées par leur partenaire sexuel. La réponse aux phéromones provoque un arrêt de la croissance en phase G1 du cycle cellulaire. Le cytosquelette d'actine est dépolarisé temporairement pour ensuite se repolariser en direction du partenaire sexuel. La repolarisation

du cytosquelette provoque l'apparition d'une projection sexuelle aussi appelée shmoo (Figure 2). Les granules corticaux se retrouvent à l'extrémité du shmoo et les câbles d'actine sont orientés en direction des granules corticaux. (Tkacz and MacKay, 1979; Vallier et al., 2002).

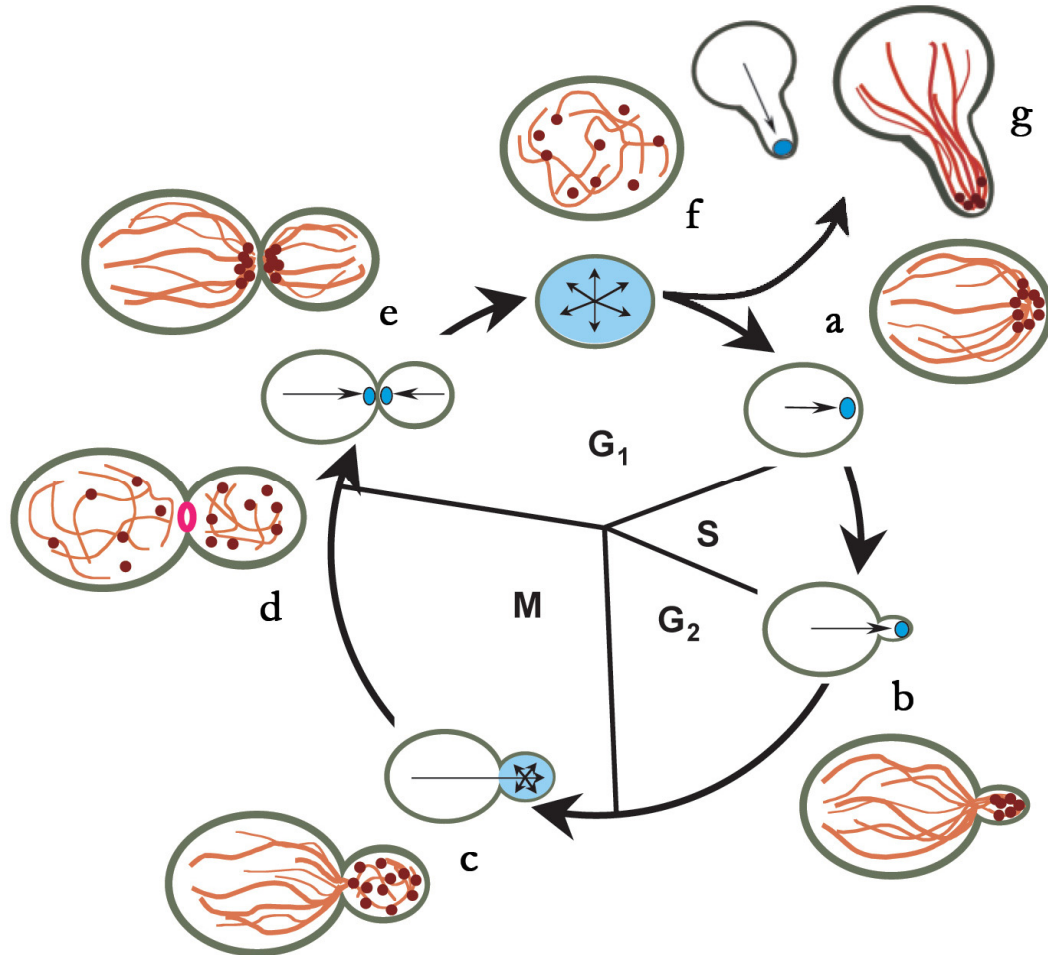


Figure 2 : Organisation du cytosquelette d'actine au cours du cycle cellulaire.

Les points rouges illustrent les granules corticaux et les lignes représentent les câbles. La polarité est illustrée en bleu et les flèches représentent la croissance polarisée. (a) Établissement de la polarité cellulaire en G1. Les granules corticaux se concentrent au site de bourgeonnement puis les câbles s'orientent en leur direction. (b) Croissance apicale du bourgeon. Les câbles pénètrent quelque peu dans le bourgeon permettant l'émergence de ce dernier. (c) Le changement de la polarité favorise la croissance isotropique du bourgeon. (d) La croissance du bourgeon terminée, les granules corticaux et les câbles se distribuent aléatoirement dans la cellule mère et le bourgeon. (e) Au moment de la division cellulaire, les granules corticaux se concentrent au septum et les câbles s'orientent en leur direction (f) La cellule fille connaît alors une période de croissance isotropique. (g) La présence de phéromones arrête la croissance en G1 et la cellule forme un shmoo permettant la conjugaison avec un partenaire de type sexuel opposé. Inspirée de Pruyne and Bretscher (2000a).

1.2.3 La polymérisation de l'actine

1.2.3.1 La nucléation par le complexe Arp2/3

La polymérisation des monomères d'actine-G purs n'est pas favorisée dans la cellule en raison de l'instabilité des dimères et trimères d'actine. Lorsque les filaments se composent de plus de trois monomères d'actine-G, la polymérisation se fait alors très rapidement à l'extrémité barbue du filament. Il existe trois mécanismes cellulaires pour l'obtention d'extrémité barbue : le clivage de filaments existants, le retrait des protéines de coiffe de l'extrémité barbue ou la nucléation d'un nouveau filament. Ce dernier mécanisme étant défavorisé en raison de l'instabilité des dimères et trimères d'actine, des protéines sont nécessaires pour accélérer la nucléation et par le fait même stabiliser ces dimères et trimères d'actine (Goode and Rodal, 2001; Millard et al., 2004).

Un des complexes impliqués dans la polymérisation de l'actine est le complexe Arp2/3. Il est formé de 7 sous-unités protéiques conservées chez tous les eucaryotes. Chez *S. cerevisiae*, les sous-unités sont Arp2p, Arp3p, Arc40p, Arc35p, Arc18p, Arc19p et Arc15p. Une mutation dans le gène de l'une ou l'autre de ces sous-unités provoque un défaut dans la formation et la localisation des granules corticaux ainsi que dans les processus cellulaires dans lesquels ils sont impliqués, notamment l'endocytose et la croissance polarisée (Winter et al., 1999). Ce complexe, initialement identifié chez *Acanthamoeba*, apparaît comme étant le nucléateur des nouveaux filaments d'actine en plus d'être responsable de la formation des branchements sur les filaments déjà existants (Machesky et al., 1994; Machesky and Gould, 1999; Millard et al., 2004; Volkman et al., 2001). Le complexe Arp2/3 se fixe à l'extrémité pointue du filament en formation servant ainsi de protéine de coiffe et favorisant l'élongation du filament par l'extrémité barbue. Enfin, le complexe Arp2/3 peut également se fixer sur un filament existant pour procéder au branchement d'un nouveau filament à un angle constant de 70° afin de créer une structure d'actine en réseau. La formation d'un branchement s'effectue à partir de l'extrémité pointue du nouveau filament et il semble que ce soit les sous-unités Arp2p et Arp3p qui forment les deux premières sous-unités de ce nouveau filament d'actine (Figure 3-A et B) (Goode and Rodal, 2001; Millard et al., 2004; Mullins and Pollard, 1999; Pollard and Beltzner, 2002; Volkman et al., 2001).

Pour être en mesure de stimuler la nucléation de l'actine, le complexe Arp2/3 doit être activé par d'autres protéines. Chez *S. cerevisiae*, l'activateur majeur du complexe Arp2/3 est la protéine Las17p/Bee1p, un homologue des protéines WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) humaines. Néanmoins, l'activation peut également se faire par les protéines Pan1p ou Abp1p (Goode and Rodal, 2001; Millard et al., 2004). Certaines évidences génétiques suggèrent que les myosines de type-I (Myo3p et Myo5p) puissent également servir d'activateur. Dans le cas des branchements, les filaments d'actine existant peuvent servir d'activateur secondaire du complexe Arp2/3 pour l'initiation du branchement (Goode and Rodal, 2001; Pollard and Beltzner, 2002).

La protéine Las17p possède dans sa région C-terminale un domaine acide (A) et un domaine WH2 (Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2) qui se fixe à l'actine. Le domaine A se fixe sur le complexe Arp2/3 et est responsable de son activation tandis que le domaine WH2 présente un monomère d'actine au complexe pour favoriser la nucléation. Un partenaire protéique important de Las17p est la verproline (Vrp1p), dont l'absence entraîne un défaut d'endocytose et de polarisation des granules corticaux (Donnelly et al., 1993). Vrp1p est une protéine homologue de WIP (WASP-interacting protein) qui se fixe au domaine WH1 de Las17p. Le complexe formé de Las17p et Vrp1p interagit ensuite avec le domaine SH3 (Src homology domain 3) des myosines de type-I, Myo3p et Myo5p. Les myosines possèdent un domaine acide semblable à celui de Las17p, qui permet d'activer le complexe Arp2/3. Ainsi, le complexe formé de Las17p, Vrp1p et les myosines active le complexe nucléateur ce qui induit la nucléation d'un nouveau filament d'actine (Figure 3-C) (Evangelista et al., 2000; Millard et al., 2004; Soulard et al., 2002).

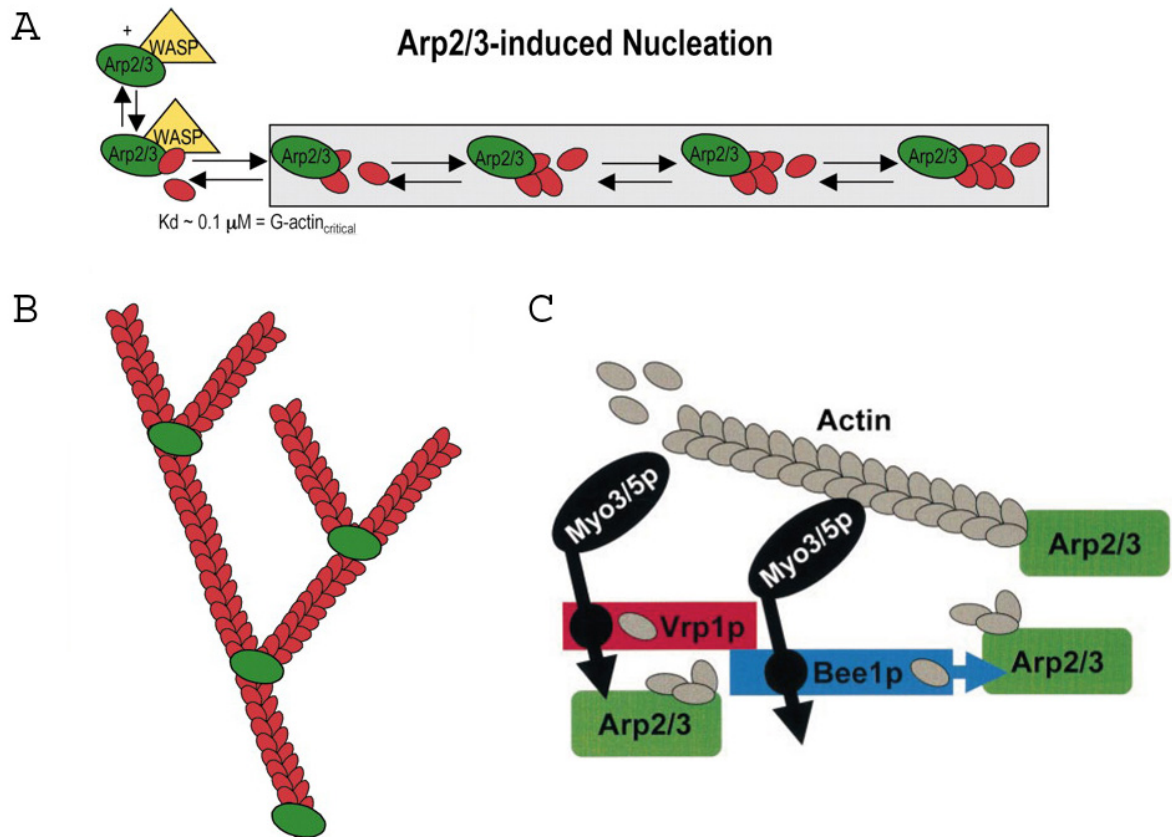


Figure 3 : La nucléation des filaments d'actine par le complexe nucléateur Arp2/3.

(A) Le complexe Arp2/3 doit être activé par une protéine de la famille WASP pour favoriser la nucléation de nouveaux filaments d'actine dont l'élongation a lieu à l'extrémité barbue. (B) La formation des structures d'actine filamentueuse en réseau par le complexe Arp2/3. Le branchement d'un nouveau filament s'effectue toujours à un angle de 70° par rapport au filament existant. (C) L'activation du complexe nucléateur est essentielle à son fonctionnement. L'activation nécessite la protéine Las17p/Bee1p, un homologue de WASP, qui interagit avec la verproline (Vrp1p). Les myosines de type-I (Myo3p et Myo5p) se fixent à leur tour par leur domaine SH3 (rond noir) sur les protéines Las17p/Bee1p et Vrp1p. L'activation se fait par le domaine A de Las17p/Bee1p (flèche bleue) ce qui permet la nucléation d'un nouveau filament. Las17p/Bee1p et Vrp1p fixent les monomères d'actine (ovale gris) pour les amener au complexe Arp2/3 et favoriser l'élongation du filament. Inspirée de Evangelista et al. (2000; 2003).

1.2.3.2 La nucléation par les formines

La nucléation des structures d'actine-F dépend généralement de l'activation du complexe Arp2/3. Des évidences génétiques ont toutefois démontré que ce complexe protéique n'était pas responsable de la nucléation de toutes les structures d'actine-F. Chez la levure, l'absence du complexe Arp2/3 mène à un défaut de formation des granules corticaux mais n'affecte pas la formation des câbles d'actine ou de l'anneau contractile (Evangelista et al., 2002). La nucléation d'une partie des filaments d'actine est donc indépendante du complexe nucléateur Arp2/3. Les formines appartiennent à une famille de protéines de régulation du cytosquelette hautement conservées chez tous les eucaryotes. Elles sont impliquées notamment dans la polarité de la cellule et dans la division cellulaire. Chez *S. cerevisiae* on retrouve deux formines, Bni1p et Bnr1p. La délétion du gène de l'une ou l'autre n'est pas létale mais la double délétion entraîne la mort cellulaire, indiquant que les deux gènes ont possiblement des fonctions redondantes dans la cellule (Imamura et al., 1997). Toutefois, des études récentes démontrent que les deux formines ne sont pas colocalisées et qu'elles ont chacune une fonction propre. Bni1p est localisée à l'extrémité du bourgeon et est responsable de la formation des filaments d'actine spécifiques au bourgeon tandis que Bnr1p est plutôt localisée à la base du bourgeon et est responsable de la nucléation des filaments d'actine de la cellule mère. Cependant, les deux formines sont requises pour la division cellulaire (Moseley and Goode, 2005). La première évidence de l'implication des formines dans la formation des structures d'actine filamenteuse est la production de câbles d'actine surnuméraires lors de la surexpression de la portion C-terminale de Bni1p (Evangelista et al., 1997; Evangelista et al., 2003). Ensuite, l'inactivation des formines dans un mutant thermosensible provoque la disparition des câbles d'actine en moins de deux minutes. Les câbles réapparaissent en autant de temps lorsque les cellules mutantes sont remises à une température permissive (Lew, 2002). Enfin, les formines augmentent la polymérisation de l'actine *in vitro* (Sagot et al., 2002).

Dans la portion C-terminale des formines on retrouve des domaines très conservés, FH1 et FH2 (formin homology domain 1 et 2). Le domaine FH2 permet la nucléation de l'actine à partir des monomères d'actine-G et reste associé à l'extrémité barbue du filament d'actine pour promouvoir l'élongation contrairement au complexe Arp2/3 et ce, même en présence de protéines de coiffe. Le domaine FH1 contient une région riche en proline qui s'associe à la profiline, une protéine de liaison aux monomères d'actine, et participe à la nucléation de

l'actine en collaboration avec le domaine FH2. En plus de la profiline, il a été démontré que la protéine Bud6p interagissait avec la portion C-terminale de Bni1p pour favoriser la nucléation par Bni1p mais pas par Bnr1p. Bud6p échange l'ADP pour de l'ATP sur les monomères d'actine tout comme la profiline (Moseley and Goode, 2005). Dans la portion N-terminale de certaines formines, on retrouve un domaine RBD (Rho-GTPase-binding domain) responsable d'une activation Rho-dépendante. D'autres formines possèdent un domaine FH3 qui détermine leur localisation cellulaire (Figure 4) (Moseley and Goode, 2005; Pruyne et al., 2004).

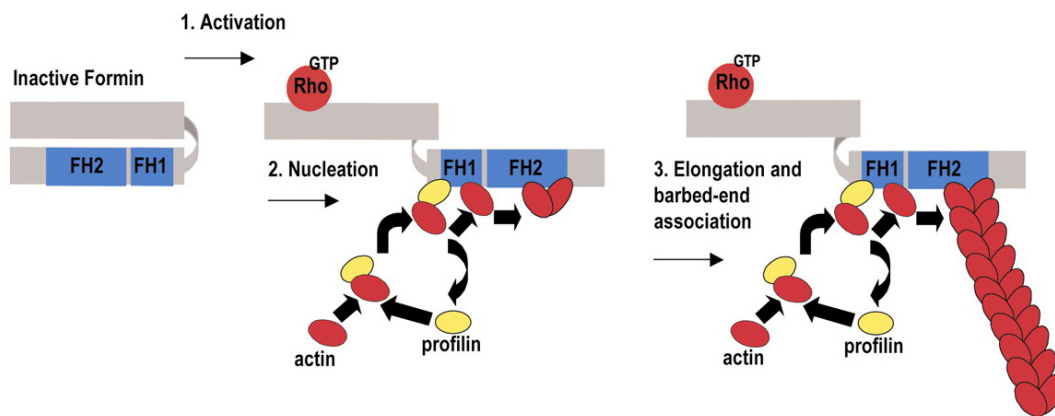


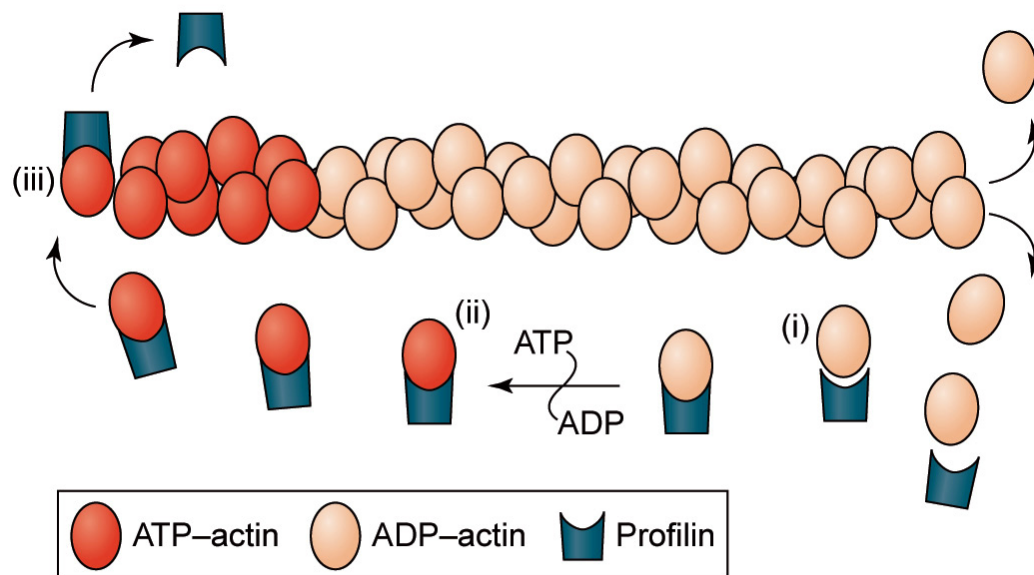
Figure 4 : Modèle de la nucléation de l'actine par les formines.

La formine est d'abord activée par une protéine de type Rho liée au GTP ce qui libère les domaines FH1 et FH2 pour la nucléation. La profiline s'associe à une molécule d'actine-G-ATP puis se fixe ensuite à la région riche en proline du domaine FH1 afin de permettre la liaison de l'actine au domaine FH2. Le domaine FH2 utilise alors l'actine pour procéder à la nucléation d'un nouveau filament d'actine. L'élongation s'effectue à partir de l'extrémité positive (barbue) du filament. Tirée de Evangelista et al. (2003).

1.2.4 Les protéines de liaison à l'actine

1.2.4.1 La profiline

La profiline est une petite protéine cytoplasmique ubiquitaire de 15 kDa nécessaire à la croissance normale des cellules. Chez *S. cerevisiae*, elle est codée par l'unique gène *PFY1*. La profiline fait partie de la classe des protéines de liaison à l'actine (ABP – Actin binding protein) et joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité du cytosquelette. La profiline s'associe à l'actine-G dans un rapport 1 : 1 provoquant l'échange de l'ADP pour de l'ATP sur les monomères d'actine globulaire ce qui favorise la polymérisation (Figure 5). La profiline contribue également à la séquestration des monomères d'actine-G-ATP dans le cytoplasme en collaboration avec la thymosine- β 4 (Goldschmidt-Clermont et al., 1992; Haarer et al., 1990; Witke, 2004).



TRENDS in Cell Biology

Figure 5 : Rôle de la profiline dans la polymérisation de l'actine.

(i) La profiline séquestre les monomères d'actine-G diminuant ainsi le nombre de monomères d'actine libres dans le cytoplasme. (ii) Elle permet également l'échange de l'ADP pour de l'ATP sur les monomères d'actine-G pour contrôler la quantité disponible pour la polymérisation. (iii) Le complexe formé par l'actine-G-ATP et la profiline interagit avec l'extrémité positive (barbue) du filament d'actine en formation pour favoriser l'élongation. L'hydrolyse de l'ATP par l'activité ATPasique de l'actine produit l'actine-G-ADP qui est lentement relâchée du filament d'actine à l'extrémité négative (pointue). Tirée de Witke (2004).

La profiline interagit également avec les séquences riches en proline dont le domaine FH1 (Formin homology domain 1) de la formine Bni1p. L'interaction entre le domaine FH1 et la profiline permet la formation et l'élongation des filaments d'actine. Le complexe actine-G-ATP/profiline est recruté au domaine FH1 de la formine ce qui permet d'amener une molécule d'actine sur le domaine FH2 favorisant ainsi la nucléation et l'élongation des filaments d'actine. La profiline joue donc un rôle dans la nucléation et l'élongation des filaments d'actine par le domaine FH2 de la formine Bni1p (Figure 4) (Evangelista et al., 2003). Enfin, la profiline s'associe également au lipide membranaire phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂). Cette liaison contrôle la disponibilité de la profiline pour la liaison à l'actine car une molécule de profiline se fixe soit à l'actine, soit au PIP₂. De plus, la profiline inhibe l'hydrolyse du PIP₂ par la phospholipase Cγ (PLCγ) non-phosphorylée. Cette inhibition est levée lorsque la PLCγ est phosphorylée par un récepteur tyrosine kinase. Ainsi, la profiline joue un rôle de liaison entre la voie de signalisation des phosphatidylinositides et la régulation du cytosquelette (Figure 6) (Haarer et al., 1993; Machesky and Poland, 1993).

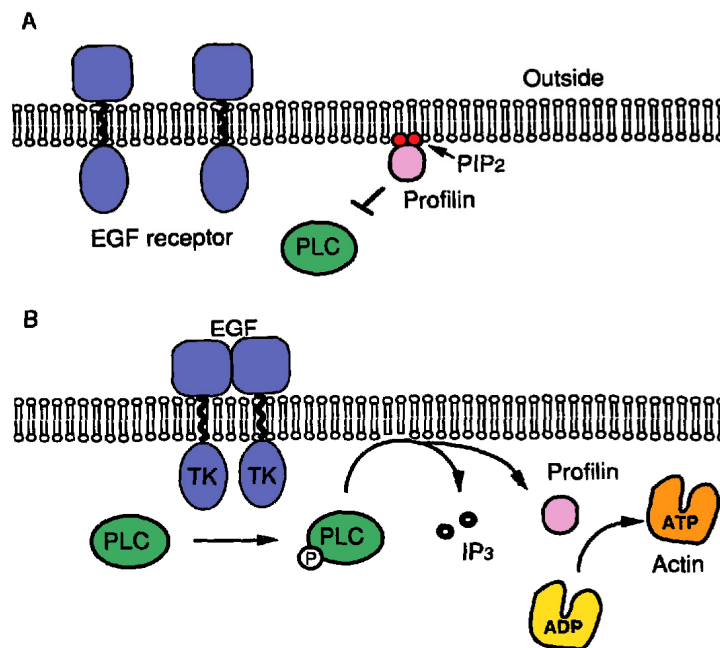


Figure 6 : Inhibition de la phospholipase C (PLC) par la profiline.

(A) La liaison de la profiline au lipide membranaire PIP₂ empêche l'hydrolyse de ce dernier par la phospholipase C non-phosphorylée. (B) L'activation d'un récepteur de type tyrosine kinase phosphoryle la PLC qui peut alors surmonter l'inhibition de la profiline et hydrolyser le PIP₂. La profiline ainsi libérée pourra alors se fixer à l'actine-G et échanger l'ADP pour de l'ATP. Tirée de Machesky and Poland (1993).

1.2.4.1.1 *Le phénotype associé à la délétion de la profiline*

La délétion du gène de la profiline chez *S. cerevisiae* est viable mais provoque un phénotype sévère pour la cellule. Les cellules déficientes en profiline sont très grosses et rondes et le cytosquelette d'actine est complètement désorganisé. En effet, il y a absence de câbles d'actine visibles, les granules corticaux sont dépolarisés et il y a accumulation de structures vésiculaires. Il y a également un défaut dans le mécanisme de sécrétion et de maturation du facteur α et la cellule est sensible au NaCl et à la caféine (Haarer et al., 1990; Marcoux et al., 1998; Marcoux et al., 2000; Zakrzewska et al., 2003). La caféine est un inhibiteur de la phosphodiesterase ce qui entraîne une accumulation d'AMPc dans la cellule. Cette accumulation suscite l'inhibition de la voie de signalisation de la PKC responsable du maintien de l'intégrité de la paroi cellulaire. Le défaut de cette voie est responsable entre autres de la sensibilité aux températures élevées et aux variations de pression osmotique du milieu (Bard et al., 1980; Heinisch et al., 1999). Finalement, la croissance des cellules déficientes en profiline est ralentie à la température permissive (30°C) et est inhibée à 37°C (Haarer et al., 1990; Marcoux et al., 1998; Marcoux et al., 2000; Zakrzewska et al., 2003).

1.2.4.2 **La cofiline**

La cofiline/ADF (actin depolymerization factor) est nécessaire à la progression rapide de la polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine (Lappalainen and Drubin, 1997; Theriot, 1997). Elle peut se fixer à l'actine-G ainsi qu'à l'actine-F pour stimuler la dépolymérisation à l'extrémité pointue des filaments. Elle possède également une faible activité de fragmentation des filaments d'actine non coiffés ce qui permet d'augmenter le nombre d'extrémités barbues libres pour la polymérisation. Chez *S. cerevisiae*, cette protéine est codée par le gène *COF1* dont la délétion est létale (Lappalainen and Drubin, 1997; Moon et al., 1993).

Plusieurs protéines collaborent avec la cofiline pour stimuler la dynamique du cytosquelette d'actine. En présence de la profiline, le processus de tapis roulant des filaments d'actine est considérablement augmenté. La cofiline stimule la dépolymérisation de l'actine à l'extrémité pointue tandis que la profiline, qui compétitionne avec la cofiline pour fixer les monomères d'actine-G-ADP, échange l'ADP pour de l'ATP sur l'actine-G favorisant la polymérisation à l'extrémité barbue du filament (dos Remedios et al., 2003). La protéine Aip1p (Actin interacting protein) favorise quant à elle la fragmentation des filaments d'actine en présence de

la cofiline. Elle reconnaît préférentiellement la cofiline liée à l'actine-F plutôt qu'à l'actine-G favorisant ainsi la fragmentation des filaments au dépens de la dépolymérisation. La protéine Aip1p sert également de protéine de coiffe à l'extrémité barbue des filaments fragmentés afin d'empêcher leur réassociation (Balcer et al., 2003; Ono, 2003). Enfin, une autre protéine, Srv2p, interagit avec les monomères d'actine liés à la cofiline. Elle est retrouvée sous forme d'un complexe multimérique dans la cellule. Elle permet le recyclage rapide de la cofiline puis favorise également l'échange nucléotidique sur les monomères d'actine par la profiline. Il a ainsi été démontré que le mécanisme d'assemblage/désassemblage des filaments d'actine nécessite plusieurs protéines en plus de la cofiline dont Aip1p, la profiline, Srv2p et les protéines de coiffes, Cap1p et Cap2p (Figure 7) (Balcer et al., 2003).

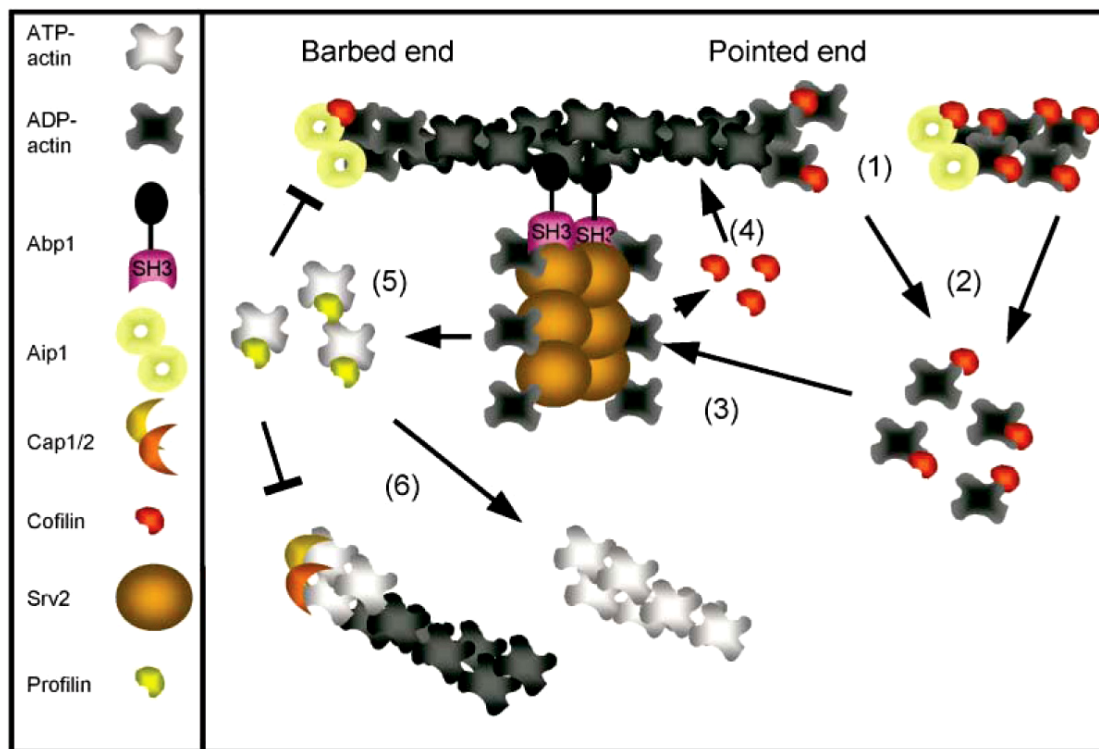


Figure 7 : Régulation de la polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine.

Le remodelage des filaments d'actine requiert de nombreuses protéines. (1) La cofiline et Aip1p stimulent la fragmentation. Aip1p sert de protéine de coiffe pour empêcher la réassociation du filament tandis que la cofiline favorise la dépolymérisation du fragment ce qui entraîne (2) l'accumulation de monomères d'actine-G-ADP-Cofiline. (3) Ceux-ci sont fixés par Srv2p qui active le recyclage de la cofiline (4) et favorise l'échange nucléotidique par la profiline (5). (6) L'actine-G-ATP est polymérisée à l'extrémité barbue d'un nouveau filament. Les protéines de coiffe bloquent l'ajout de nouveaux monomères terminant ainsi l'élongation. Tirée de Balcer et al. (2003).

1.2.4.3 Les protéines de coiffe

Chez *S. cerevisiae*, les protéines de coiffe forment des hétérodimères codées par les gènes *CAP1* et *CAP2*. Les protéines de coiffe se fixent à l'extrémité barbue des filaments d'actine pour réguler la polymérisation et la dépolymérisation de ces derniers. Comme la levure est non motile, les protéines de coiffe assurent principalement la stabilité des filaments d'actine en prévenant la dépolymérisation. En se fixant à l'extrémité barbue, elles inhibent aussi l'élongation des filaments. La délétion des deux gènes n'est pas létale mais affecte la stabilité des filaments d'actine et la polarité des granules corticaux (Karpova et al., 1995; Kim et al., 2004).

1.2.4.4 La twinfiline

La twinfiline (Twf1p) est une petite protéine de liaison à l'actine codée par le gène *TWF1*. Elle interagit essentiellement avec les monomères d'actine-G-ADP mais également avec les protéines de coiffe, Cap1p et Cap2p. L'interaction avec les protéines de coiffe est d'ailleurs essentielle à la fonction et la localisation cellulaire de la twinfiline (Falck et al., 2004). Le rôle de Twf1p dans la cellule est la séquestration des monomères d'actine-G-ADP dans le cytoplasme en plus d'assurer la localisation des monomères près des extrémités positives des filaments par son interaction avec les protéines de coiffe. L'interaction avec les monomères d'actine-G-ADP a pour effet d'inhiber l'échange nucléotidique sur les monomères en plus de prévenir la polymérisation à des endroits non désirés dans la cellule. La dissociation du complexe formé par Twf1p/Actine-G-ADP et les protéines de coiffe permet l'échange nucléotidique sur les monomères d'actine et la polymérisation à l'extrémité barbue du filament non coiffé. La twinfiline peut également interagir avec le PIP₂. Cette interaction inhibe son activité de séquestration (Falck et al., 2004; Palmgren et al., 2002).

1.2.4.5 La fimbrine

La fimbrine fait partie de la famille des protéines de pontage des filaments d'actine. Elle possède deux sites de liaison à l'actine ce qui lui permet de relier les filaments d'actine entre eux pour former les câbles et s'assurer de la stabilité des filaments d'actine. La fimbrine est le seul membre de cette famille chez *S. cerevisiae* et elle est codée par le gène *SAC6*. La délétion du gène n'est pas létale mais les cellules sont plus grosses, le cytosquelette d'actine est légèrement dépolarisé et elles présentent un défaut d'endocytose (Ayscough, 1998).

Récemment, une protéine ayant une fonction biologique semblable à la fimbrine a été identifiée, la protéine Scp1p. Cette protéine se fixe aux filaments d'actine, les relie entre eux et les stabilise pour contrer la dépolymérisation. Ainsi, il semble que Sac6p et Scp1p agissent de concert pour maintenir la stabilité des filaments d'actine et pour former les câbles d'actine (Goodman et al., 2003).

1.3 La signalisation du cytosquelette d'actine

La polarité cellulaire étant essentielle lors de la division cellulaire, il est donc primordial que ce processus soit étroitement régulé. Le bourgeonnement lors de la cytokinèse ou la formation du shmoo au moment de la conjugaison nécessite de nombreuses protéines de régulation dont plusieurs petites GTPases de la superfamille Ras ainsi que les régulateurs de ces GTPases.

1.3.1 La régulation des GTPases

On retrouve les GTPases sous une forme active lorsque liées au GTP et sous une forme inactive lorsque liées au GDP. La fonction des GTPases est sous le contrôle d'un cycle d'activation/inactivation régulé par un facteur d'échange guanosidique (GEF), une protéine d'activation des GTPases (GAP) et un inhibiteur de la dissociation du GDP (GDI). Le GEF favorise l'échange du GDP pour du GTP permettant l'activation de la GTPase tandis que la GAP augmente l'activité GTPasique intrinsèque favorisant plutôt l'hydrolyse du GTP en GDP ce qui inactive la GTPase. Le GDI quant à lui est responsable de la dissociation membranaire de la forme inactive de la GTPase ce qui empêche l'échange du GDP pour du GTP (Schmidt and Hall, 1998).

1.3.2 La sélection du site de bourgeonnement

On observe chez la levure *S. cerevisiae* deux patrons de bourgeonnement. Chez les cellules haploïdes le patron de bourgeonnement est axial, c'est-à-dire que la division s'effectue toujours à côté du site précédent (Figure 8). Les cellules diploïdes présentent plutôt un patron de bourgeonnement bipolaire. Dans ce cas, le bourgeonnement s'effectue au pôle opposé du site de bourgeonnement précédent (Figure 8) (Casamayor and Snyder, 2002; Chang and Peter, 2003). La sélection du site de bourgeonnement n'est donc pas aléatoire et nécessite des points de repères à la membrane plasmique « landmark protein » (Figure 9).

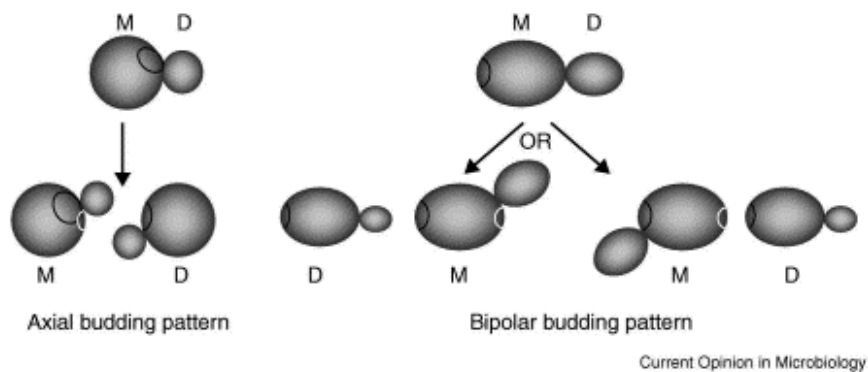


Figure 8 : Patron de bourgeonnement axial et bipolaire chez *S. cerevisiae*.

La cicatrice marquant l'emplacement où la cellule fille (D) était initialement attachée à la cellule mère (M) est appelée cicatrice de naissance (trait noir). Les cicatrices plus petites découlant de la séparation de la cellule fille sont plutôt appelées cicatrices de bourgeonnement (trait gris). Les cellules haploïdes présentent un patron de bourgeonnement axial, c'est-à-dire que le bourgeonnement se fait toujours à côté du site précédent. Les cellules diploïdes présentent un patron de bourgeonnement bipolaire. Dans ce cas, le bourgeonnement de la cellule fille se fait à l'opposé de la cicatrice de naissance tandis que pour la cellule mère le bourgeonnement se fait à côté du site précédent ou à l'opposé. Tirée de Casamayor and Snyder (2002).

Les protéines servant de points de repères pour le bourgeonnement axial sont codées par les gènes *BUD3*, *BUD4* et *AXL2/BUD10* tandis que les protéines codées par les gènes *BUD8* et *BUD9* sont les points de repères du bourgeonnement bipolaire. La localisation de ces points de repères, particulièrement les protéines Bud9p et Bud10p, nécessite la présence de l'anneau formé par les septines. Cette structure signale le futur site de bourgeonnement au début de la phase G1. Ce n'est qu'à la fin du cycle cellulaire que les points de repères s'associent aux septines pour établir le prochain site de bourgeonnement (Chang and Peter, 2003). L'établissement de la polarité cellulaire en direction du site de bourgeonnement s'effectue ensuite à travers une cascade de petites GTPases de la superfamille Ras (Figure 9). Bud1p/Rsr1p est une petite GTPase régulée par le GEF Bud5p ainsi que par la GAP Bud2p. Tout d'abord, la portion cytoplasmique de Bud10p interagit avec Bud5p ce qui mène à l'activation de Bud1p par l'échange du GDP pour du GTP (Figure 9). Tous les gènes *BUD* sont nécessaires à la sélection du site de bourgeonnement. L'absence de l'un de ces gènes n'empêche pas la formation d'un bourgeon mais occasionne un patron de bourgeonnement aléatoire. La forme active de Bud1p liée au GTP régule l'activité de la GTPase Cdc42p par

l'intermédiaire du GEF Cdc24p. C'est ce qui permet d'établir la polarité au site de bourgeonnement et de débiter la croissance du bourgeon (Chang and Peter, 2003; Nelson, 2003; Schmidt and Hall, 1998).

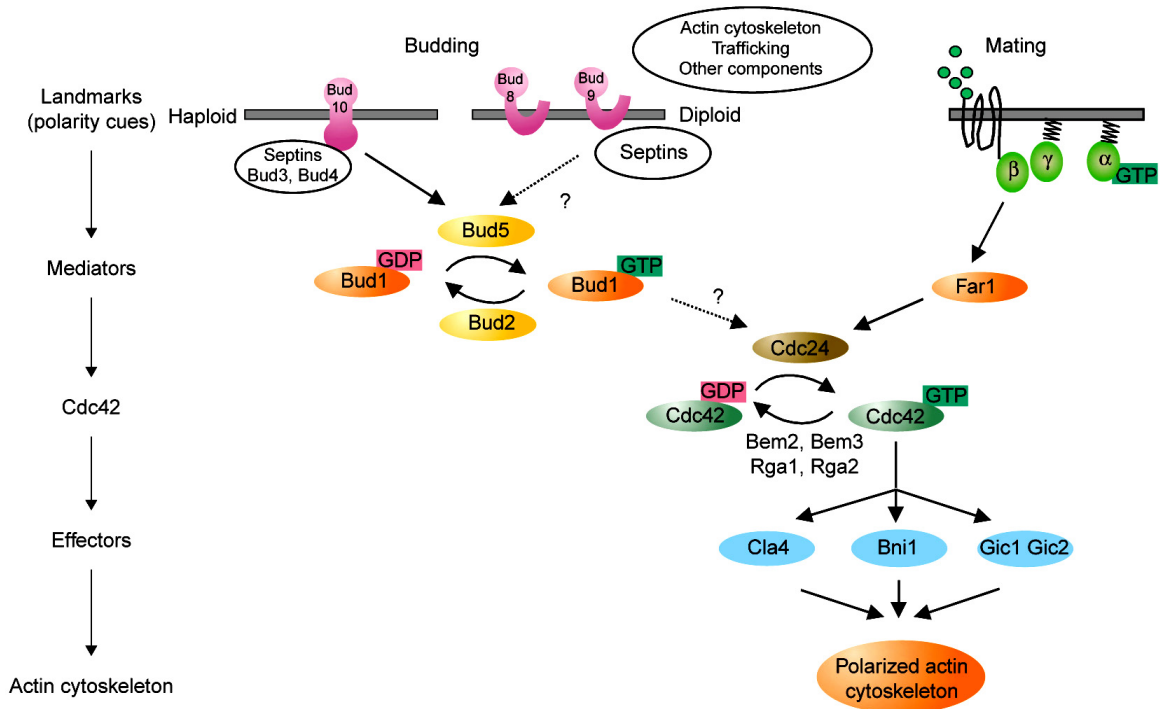


Figure 9 : Sélection du site de bourgeonnement et initiation de la polarité cellulaire.

Représentation schématique de la voie de signalisation menant à la croissance polarisée du bourgeon. Les points de repères « landmark proteins » identifient le site de bourgeonnement puis mènent à l'activation de Cdc42p via le recrutement du GEF Cdc24p par Bud1p. Cdc42p est le régulateur central de la polarité cellulaire. Le recrutement d'effecteurs tels que Cla4p et les formines permet l'organisation du cytosquelette d'actine au site de croissance et d'initier la croissance polarisée. Tirée de Chang and Peter (2003).

1.3.3 La croissance polarisée

La croissance polarisée du bourgeon est sous le contrôle de nombreuses protéines dont la plupart sont des petites GTPases de la famille Rho. Cette famille partage 30% d'identité avec Ras et est responsable de la régulation du cytosquelette d'actine en réponse aux signaux extracellulaires en plus de jouer un rôle important dans le bourgeonnement (Garcia-Ranea and Valencia, 1998). Chez *S. cerevisiae* on compte six membres de la famille Rho : Rho1p, Rho2p, Rho3p, Rho4p, Rho5p et Cdc42p (Schmidt and Hall, 1998; Schmitz et al., 2002).

1.3.3.1 La famille des Rho-GTPases

1.3.3.1.1 *Cdc42p – Régulateur central de la polarité cellulaire*

Le gène *CDC42* n'est pas essentiel à la survie cellulaire. Toutefois, l'absence de Cdc42p inhibe la croissance cellulaire polarisée, empêche la formation du bourgeon et les cellules deviennent grosses et rondes (Etienne-Manneville, 2004; Nelson, 2003). Le cycle d'activation/inactivation de cette petite GTPase nécessite le GEF Cdc24p et les GAP Rga1p, Rga2p et Bem3p (Gladfelter et al., 2004). Au début de la phase G1, le GEF Cdc24p est confiné dans le noyau par Far1p. Vers la fin de la phase G1, le complexe Cdc28p-Cln2p dégrade Far1p permettant l'exportation de Cdc24p vers le cytoplasme. La protéine Bud1p recrute Cdc24p ce qui a pour effet de localiser spécifiquement Cdc24p et Cdc42p au site de bourgeonnement et par la suite le GEF active Cdc42p (Etienne-Manneville, 2004). Une seconde protéine, Bem1p, est recrutée uniquement après l'activation de Cdc42p pour maintenir Cdc24p au site de la croissance polarisée. L'activation de Cdc42p entraîne le recrutement de plusieurs protéines effectrices au site de bourgeonnement afin d'activer la croissance polarisée. Le recrutement de Cyk1p/Iqg1p facilite l'accumulation des septines et permet également de localiser correctement Bud4p, un point de repère important pour la sélection du prochain site de bourgeonnement. Parmi les autres effecteurs de Cdc42p, on retrouve les kinases Cla4p et Ste20p et la formine Bni1p. L'interaction avec Cla4p, une PAK-kinase (p21-activated kinase), est nécessaire pour la fonction et la formation de l'anneau de septines tandis que Ste20p contrôle l'activation de Bni1p (Gladfelter et al., 2004; Kadota et al., 2004). Ste20p est également essentielle à la formation du shmoo lors de la conjugaison (Oehlen and Cross, 1998). Enfin, Cdc42p interagit directement avec Las17p ce qui permet de recruter le complexe activateur du nucléateur Arp2/3 formé de Las17p/Vrp1/Myo3p-Myo5p. Le recrutement du complexe Arp2/3 et des formines est directement responsable de la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine au site de la croissance polarisée (Chang and Peter, 2003; Etienne-Manneville, 2004; Oehlen and Cross, 1998).

1.3.3.1.2 *Les protéines Rho1p et Rho2p*

La petite GTPase Rho1p est une protéine essentielle à la survie cellulaire puisque la délétion du gène *RHO1* est létale (Madaule et al., 1987). Rho1p joue un rôle principalement dans la voie de signalisation de la paroi cellulaire puis dans l'organisation du cytosquelette d'actine et dans l'émergence et le maintien de la croissance du bourgeon. La protéine est d'ailleurs localisée au

site de bourgeonnement et à l'extrémité du bourgeon lors de l'émergence de ce dernier. Le mutant thermosensible cesse de croître à une température restrictive et présente un petit bourgeon et un phénotype de lyse cellulaire. Toutefois, le cytosquelette d'actine n'est pas désorganisé (Madden and Snyder, 1998; Schmidt and Hall, 1998). Rho1p est la sous-unité régulatrice de la β -1-3-glucane synthase, l'enzyme responsable de la synthèse du β -1-3-glucan qui est le constituant majeur de la paroi cellulaire de la levure. Rho1p interagit physiquement avec les deux sous-unités catalytiques, Fks1p et Fks2p. De plus, Rho1p interagit avec Pkc1p (protéine kinase C de la levure) ce qui stimule l'activation de la voie de signalisation des MAP kinases qui est impliquée notamment dans la synthèse de la paroi cellulaire mais aussi dans l'organisation du cytosquelette d'actine et le maintien de l'intégrité cellulaire (Sekiya-Kawasaki et al., 2002). La régulation du cytosquelette d'actine par Rho1p s'effectue par l'interaction avec la formine Bni1p, responsable de la nucléation et la formation des câbles d'actine (Evangelista et al., 1997).

Les protéines Bem2p, Sac7p et Bag7p sont les GAP de Rho1p tandis que les protéines Rom1p et Rom2p sont les GEF de Rho1p. L'absence de ces deux dernières protéines (Rom1/2p) est létale pour la cellule (Schmidt and Hall, 1998).

En ce qui concerne la GTPase Rho2p, la délétion du gène n'entraîne aucun phénotype visible mais augmente légèrement la sensibilité au benomyl, une drogue qui provoque la dépolymérisation des microtubules, ce qui suggère un rôle dans l'organisation des microtubules (Madaule et al., 1987; Madden and Snyder, 1998). Les gènes *RHO1* et *RHO2* partagent 53% d'identité entre eux et la surexpression de *RHO2* permet de corriger le mutant *rho1* suggérant une fonction redondante des gènes *RHO1* et *RHO2* (Schmidt and Hall, 1998). Les protéines Bem2p et Rom2p sont les GAP et GEF de Rho2p respectivement. Toutefois, les effecteurs de Rho2p n'ont toujours pas été identifiés (Madden and Snyder, 1998).

1.3.3.1.3 Les protéines Rho3p et Rho4p

Les GTPases Rho3p et Rho4p jouent également un rôle dans la croissance polarisée mais ne sont toutefois pas essentielles à la survie cellulaire. La délétion de *RHO4* n'engendre aucun phénotype visible tandis que la délétion de *RHO3* cause un défaut sévère de la croissance. La double délétion des gènes *RHO3* et *RHO4* est létale et la perte de *RHO3* est corrigée par la surexpression de *RHO4* ce qui indique des fonctions partiellement redondantes pour ces deux

protéines (Matsui and Toh-e, 1992). La délétion de *RHO3* est également corrigée par la surexpression de *SEC4*, une Rab-GTPase essentielle au fonctionnement de l'exocytose et qui est impliquée dans la fusion des vésicules exocytiques à la membrane plasmique. De plus, Rho3p interagit directement avec Sec4p et Tpm1p, qui code pour la tropomyosine, un composant structural majeur des filaments d'actine. Rho3p interagit aussi avec Myo2p, une myosine responsable du transport des vésicules sur les câbles d'actine, et Exo70p, une protéine retrouvée dans l'exocyste, un complexe régulateur de la sécrétion polarisée. Donc, la fonction majeure de Rho3p serait la régulation du transport vésiculaire (Pruyne and Bretscher, 2000a). Le seul régulateur des protéines Rho3p et Rho4p identifié à ce jour est Rgd1p, une protéine d'activation des GTPases (GAP), tandis que les formines sont les seuls effecteurs connus des protéines Rho3p et Rho4p (de Bettignies et al., 2001; Schmidt and Hall, 1998).

1.3.3.1.4 La protéine Rho5p

La protéine Rho5p n'est pas essentielle à la survie cellulaire et tout comme Rho1p, elle joue un rôle dans la voie de signalisation de l'intégrité de la paroi cellulaire. Toutefois, Rho5p agirait en tant que régulateur négatif sur la voie de signalisation de la PKC. La délétion de *RHO5* entraîne une augmentation de l'activité de la voie de signalisation de l'intégrité cellulaire et provoque par le fait même une augmentation considérable de la résistance à la caféine (20mM), composé pour lequel les mutants de la voie PKC sont très sensibles. De plus, la surexpression de *RHO5* ou l'expression de la forme constitutivement active rend les cellules hypersensibles à la caféine (7 mM). Ces résultats confirment que Rho5p régule négativement la voie de la PKC (Schmitz et al., 2002).

1.4 La division cellulaire

Dernière étape de la croissance cellulaire, la cytotinèse correspond à la séparation de la cellule mère et de la cellule fille. Les septines sont des protéines hautement conservées chez tous les eucaryotes à l'exception des plantes. Ces protéines sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires en plus de la cytotinèse dont la sélection du site de bourgeonnement (en coopération avec les points de repères Bud3p et Bud4p), le dépôt de chitine au site de la division cellulaire (par le recrutement de Chs2p, Chs3p et Chs4p), la progression du cycle cellulaire, la formation d'une barrière de diffusion entre la cellule mère et la cellule fille (prévient la diffusion des protéines spécifiques au bourgeon tel que Spa2p, Sec3p, Sec5p, Ist2p)

et finalement dans la sporulation (Casamayor and Snyder, 2003; Kinoshita, 2003; Longtine and Bi, 2003). Les septines s'organisent en un complexe hétéro-oligomérique qui se présente sous la forme d'un filament circulaire d'un diamètre d'environ 10 η m localisé tout autour du site de bourgeonnement (Figure 10). Chez *S. cerevisiae*, on dénombre sept septines codées par les gènes *CDC3*, *CDC10*, *CDC11*, *CDC12*, *SHS1*, *SPR3* et *SPR28*. Les septines Cdc3p et Cdc12p sont essentielles à la survie cellulaire, tandis que Cdc10p et Cdc11p sont requises uniquement pour la croissance à des températures élevées. Shs1p est la seule septine non essentielle à la croissance cellulaire. Enfin, les septines Spr3p et Spr28p sont spécifiques à la sporulation mais leur fonction cellulaire reste incertaine (Casamayor and Snyder, 2003; Longtine and Bi, 2003).

La localisation des septines est dépendante de la GTPase Cdc42p tandis que les kinases Cla4p, Gin4p et Elm1p sont nécessaires à la formation de l'anneau de septines (Longtine and Bi, 2003). Cdc3p, Cdc10p, Cdc11p, Cdc12p et Shs1p sont exprimées et colocalisées au cortex cellulaire à la fin de la phase G1. Durant la croissance, elles prennent la forme d'un sablier entre le cortex cellulaire de la cellule mère et du bourgeon. Au moment de la division cellulaire, l'anneau formé par les septines se divise pour former deux anneaux séparant les cortex cellulaires de la cellule mère et de la cellule fille (Figure 10). Enfin, les septines sont nécessaires à la localisation de Myo1p, Chs2p et Chs3p durant la formation du septum primaire (Yeong, 2005).

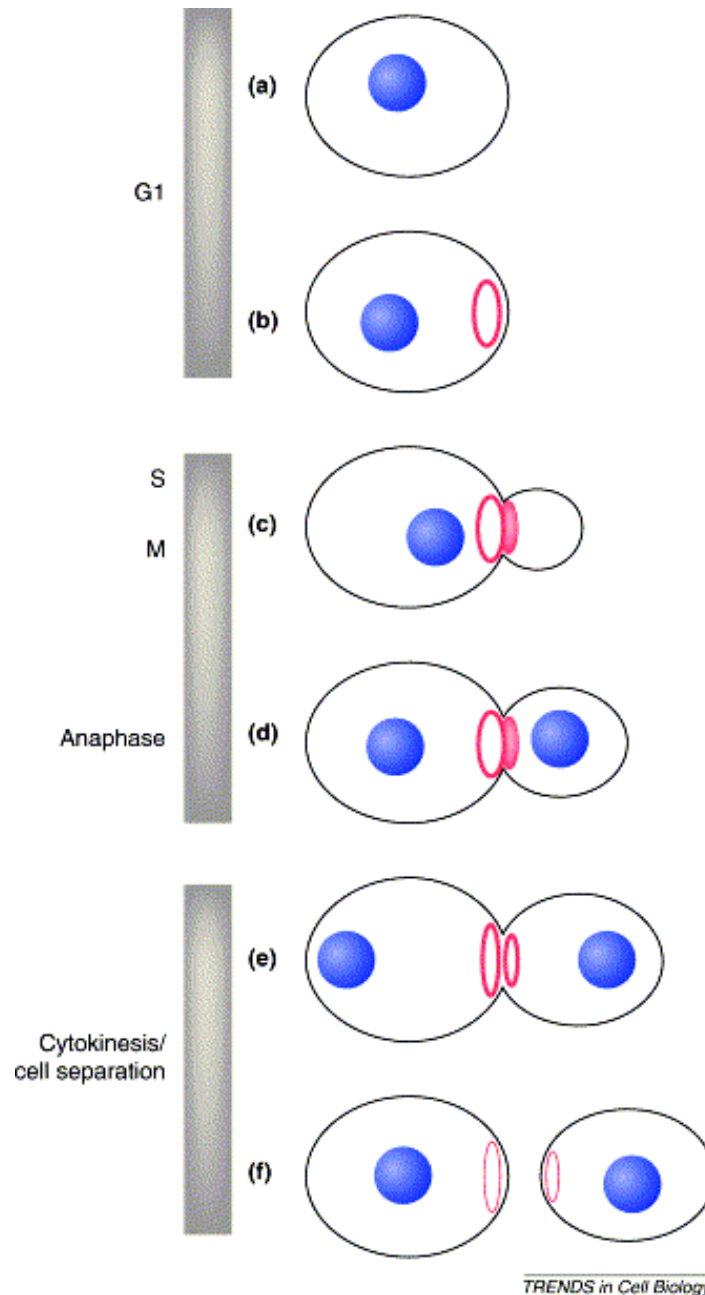


Figure 10 : Localisation des septines au cours du cycle cellulaire.

(a) Au tout début de la phase G1, lorsque les cellules n'ont pas encore de bourgeon, les septines ne présentent aucune localisation particulière dans la cellule. (b) À la fin de la phase G1, les septines se localisent au site d'émergence du bourgeon sous la forme d'un anneau. (c-d) Lors de l'émergence du bourgeon, les septines s'arrangent sous une forme analogue à un sablier et maintiennent cette localisation tout au long de la croissance du bourgeon. (e) Au moment de la division cellulaire, l'anneau se sépare pour former deux anneaux distincts au cortex cellulaire de la cellule mère et de la cellule fille. (f) Les anneaux demeurent au site de division après la séparation des cellules pour marquer l'ancien site de division cellulaire. Tirée de Longtine and Bi (2003).

1.4.1 Formation de la cicatrice de bourgeonnement

La paroi cellulaire de la levure est constituée principalement de β -1-3-glucan et de chitine, un polymère de N-acétyl-glucosamine. La chitine constitue seulement une faible proportion de la paroi cellulaire de la levure. Elle se retrouve surtout au site d'émergence du bourgeon, à la base du bourgeon entre la cellule mère et la cellule fille et constitue essentiellement le septum primaire (la cicatrice de bourgeonnement) (Madden and Snyder, 1998; Yeong, 2005). Lors de l'émergence du bourgeon, l'anneau de chitine déposée tout autour du site de bourgeonnement résulte de l'action de la chitine synthase III (Chs3p), une enzyme non essentielle dont la localisation dépend de son association avec Chs4p qui est responsable de l'activation de Chs3p. La localisation de Chs4p dépend quant à elle des septines et présente en plus une colocalisation avec ces dernières. La localisation de Chs3p nécessite également les protéines Myo2p et Chs5p. Chs5p est une protéine du TGN (Trans-Golgi Network) nécessaire à la morphogénèse et qui serait responsable du transport de Chs3p vers le site de bourgeonnement afin de permettre l'interaction avec Chs4p (Madden and Snyder, 1998). La formation du septum primaire à la fin de la division cellulaire résulte essentiellement de l'action de la chitine synthase II, Chs2p, laquelle est localisée au site de bourgeonnement uniquement à la fin de la mitose. Toutefois, Chs3p semble également impliquée dans la formation de cette structure puisqu'elle est également localisée au septum à la fin de la mitose. Enfin, la séparation est complétée à la suite de l'action de la chitinase Cts1p responsable de la dégradation du lien qui relie la cellule mère de la cellule fille. Celle-ci est spécifique à la cellule fille ce qui explique la présence de la cicatrice de bourgeonnement uniquement à la surface de la cellule mère tandis que la cellule fille présente une faible cicatrice de naissance. La chitine synthase I, Chs1p, agit ensuite sur la cellule fille pour réparer la paroi cellulaire afin d'éviter que la cellule fille se développe avec un trou dans sa paroi (Longtine and Bi, 2003; Madden and Snyder, 1998; Yeong, 2005).

Les protéines Chs1p et Chs3p sont retrouvées à l'intérieur du chitosome, une structure peu définie présente sous la membrane plasmique. Cette structure semble servir de réservoir pour les chitines synthases afin de les maintenir près du site de la division cellulaire. Le chitosome est une structure distincte de la membrane, de la vacuole et des vésicules sécrétrices. Étant donné que la formation du chitosome est dépendante de *SLA2/END4* et qu'en plus Chs1/3p sont retrouvées avec Ste2p lors du fractionnement cellulaire, cela suggère une similitude avec les endosomes (Ziman et al., 1996).

1.5 L'endocytose

L'endocytose est un mécanisme d'internalisation de molécules à partir de la membrane plasmique vers un compartiment de dégradation : le lysosome pour les cellules de mammifères et la vacuole pour la levure. Une portion de la membrane plasmique s'invagine, entraînant avec elle les molécules du milieu extracellulaire et les protéines membranaires dans un compartiment endocytique. La membrane plasmique se referme ensuite sur elle-même et se détache du reste de la membrane pour former la vésicule endocytique (Geli and Riezman, 1998; Riezman, 1985; Wiederkehr et al., 2001). L'endocytose permet d'internaliser plusieurs types de molécules telles que les protéines de la membrane plasmique, les lipides membranaires, les composants du milieu extracellulaire comme les fluides ou les molécules de faible poids moléculaire, des protéines et même de plus grosses particules. Selon la nature des molécules internalisées, on distingue deux types d'endocytose chez la levure : la pinocytose (action de boire) pour l'internalisation des fluides puis l'endocytose récepteur-dépendante pour l'internalisation des ligands liés à un récepteur membranaire (Riezman, 1985; Wesp et al., 1997). Les substances internalisées sont alors dirigées vers le compartiment de dégradation (la vacuole) en passant par deux compartiments endocytiques nommés endosome précoce et tardif (Geli and Riezman, 1998). Chez la levure, l'endocytose joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, l'apport de nutriments, la régulation du nombre de transporteurs et de canaux à la surface cellulaire ainsi que dans la régulation négative des récepteurs de phéromones en réponse à la liaison de ces dernières lors de la conjugaison (Gagny et al., 2000).

1.5.1 Isolation des mutants *end*

Plusieurs approches ont été utilisées dans le but d'identifier des mutants ayant un défaut dans l'une des étapes de l'endocytose, ce qui a permis d'identifier les mutants *end* (pour *endocytose*). L'approche initiale consistait à analyser une banque de mutants thermosensibles afin d'identifier les mutants incapables d'internaliser le facteur α . Cette approche a permis d'isoler les mutants *end3* et *end4* et par la suite les mutants *end5*, *end6* et *end7* (Munn, 2001; Munn et al., 1995; Raths et al., 1993). Ces résultats indiquent également que l'endocytose n'est pas un processus essentiel à la survie cellulaire puisque ces mutants thermosensibles présentent un défaut d'internalisation à des températures permissives (Munn, 2001). La seconde approche utilisée était basée sur la délétion de *VMA2*, une ATPase membranaire de la vacuole dont la

délétion entraîne un défaut de l'acidification de la vacuole. La recherche de létalité synthétique avec *vma2Δ* a permis d'identifier de nouveaux mutants *end*, soit *end8*, *end9*, *end10*, *end11* et *end14* (Munn and Riezman, 1994; Wesp et al., 1997). La létalité synthétique a également été confirmée avec les mutants *end3* et *end4* identifiés précédemment. Par la suite, la recherche de suppresseurs multicopies des ces mutants *end* s'avérait une option intéressante pour repérer de nouveaux régulateurs de l'endocytose. Le mutant *end5* correspond en réalité à la protéine Vrp1p qui est connue pour interagir directement avec Las17p, l'activateur du complexe Arp2/3. Dans le cas d'une interaction protéine-protéine critique pour la cellule, la surexpression du partenaire protéique devrait corriger le défaut associé à la délétion de l'autre membre du complexe (Munn, 2001). Effectivement, la surexpression de *LAS17* permet de corriger le défaut d'endocytose du mutant *end5* (Vrp1p). La délétion de *LAS17* a ensuite été analysée pour l'internalisation du facteur α et le résultat montre que Las17p est également importante pour l'endocytose (Munn, 2001).

1.5.1.1 Les mutants *end*: des régulateurs ou composants du cytosquelette d'actine

La caractérisation des mutants *end* a permis de constater que plusieurs des gènes mutés codaient des protéines importantes pour la régulation ou la composition du cytosquelette d'actine chez *S. cerevisiae*, tels que *END4(SLA2)*, *END5(VRP1)*, *END6(RVS161)*, *END7(ACT1)*, *END9(ARC35)* et *END14(SRV2)* (Munn, 2001). Ces données fournissaient alors de nouvelles évidences reliant le cytosquelette d'actine à l'endocytose.

1.5.2 Le rôle du cytosquelette d'actine dans l'endocytose

L'actine est indispensable au déroulement normal de l'endocytose. Toutefois, son rôle dans ce processus cellulaire n'est pas encore très bien compris. La première évidence reliant le cytosquelette d'actine et l'endocytose provient de l'étude du rôle des composants majeurs du cytosquelette dans l'endocytose. En premier lieu, cette étude a révélé que les microtubules ne sont pas requis pour l'endocytose puisque aucun défaut d'endocytose n'est associé à la délétion du gène *TUB2*, codant la tubuline, ni en présence de Nocodazole, un agent qui provoque la dépolymérisation des microtubules (Riezman, 1993). Par contre, l'analyse du mutant *act1-1* a révélé que l'actine était nécessaire au déroulement de l'endocytose mais seulement lors de l'internalisation. En effet, le mutant *act1-1* présente un taux d'internalisation du facteur α

inférieur à 10%, en comparaison avec des cellules sauvages, et il y a absence d'internalisation du Lucifer Yellow. De plus, les câbles d'actine semblent également importants pour l'étape de l'internalisation puisque la délétion du gène de la fimbrine, *SAC6*, codant une protéine responsable de la formation des câbles d'actine, cause un défaut important d'internalisation (Riezman, 1993). La seconde découverte majeure reliant le cytosquelette d'actine et l'endocytose a été l'établissement d'une corrélation entre le défaut d'internalisation et la dépolarisation des granules corticaux chez plusieurs mutants ayant un défaut d'endocytose (Munn, 2001). Les mutants de l'actine ou des protéines associées à l'actine présentent pour la majorité une dépolarisation du cytosquelette d'actine au cours du cycle cellulaire. Toutefois, ces mutants ne présentent pas tous un défaut d'endocytose. Par exemple, le mutant *myo2-66* présente un cytosquelette dépolarisé, il n'est pas viable à des températures restrictives mais il n'a aucun défaut d'endocytose (Munn et al., 1995). Toutefois, en ce qui concerne les mutants de l'endocytose (*end*), la majorité de ces mutants présentent une distribution aléatoire des granules corticaux et des câbles (Munn et al., 1995; Raths et al., 1993).

1.5.2.1 La voie de signalisation de Tor2p-Rho1p et l'endocytose

Dans le cadre d'un criblage pour l'identification de mutants défectueux pour l'internalisation des récepteurs, un mutant de *TOR2* (*tor2^{G2128R}*) a été identifié par son incapacité à internaliser le Lucifer Yellow (deHart et al., 2003). Chez la levure, la protéine Tor2p est une sérine/thréonine kinase dont l'unique fonction est le maintien de l'organisation du cytosquelette d'actine via la voie de signalisation de l'intégrité cellulaire qui est sous le contrôle de la GTPase Rho1p. Cette voie est activée en réponse à des signaux de croissance ou de stress cellulaire et agit directement sur la synthèse de la paroi cellulaire. L'identification d'un mutant de *TOR2* incapable d'internaliser le Lucifer Yellow a montré que Tor2p est impliquée dans l'endocytose en plus de la régulation de la synthèse de la paroi cellulaire. Le complexe formé de Rho1p-Fks1p, qui était plutôt connu pour son implication dans la synthèse de la paroi cellulaire, semble jouer également un rôle important dans l'étape de l'internalisation (deHart et al., 2003) (Figure 11). Enfin, un fait intéressant est que la localisation cellulaire de Rho1p est dépendante de la protéine Sla1p, un régulateur important de l'endocytose et de la formation des granules corticaux (Ayscough et al., 1999).

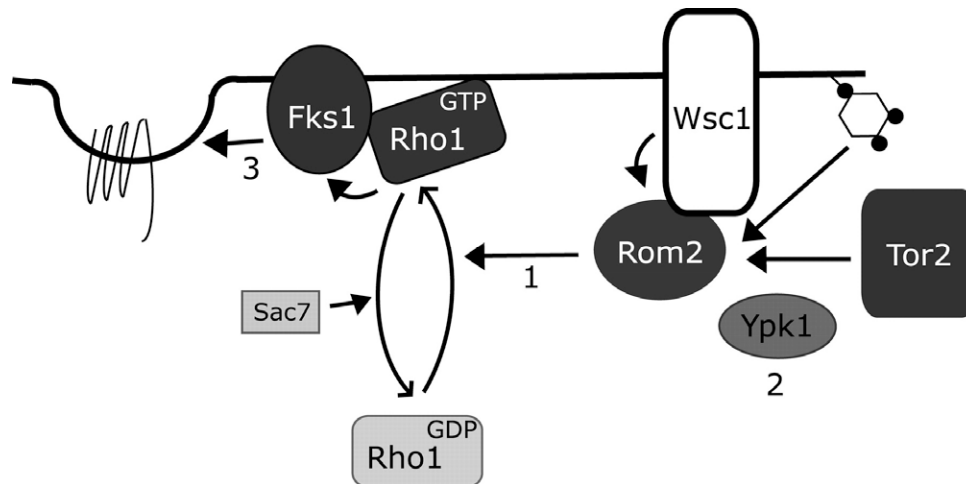


Figure 11 : Implication de Rho1p-Fks1p dans l'endocytose.

Les composants de la voie de signalisation de l'intégrité cellulaire sont impliqués dans l'étape de l'internalisation lors de l'endocytose. L'activation de Rom2p, le GEF de Rho1p, est nécessaire pour l'activation de Rho1p. La protéine Rom2p peut être activée par trois activateurs : Wsc1p, Tor2p et le PIP₂. Pour qu'une internalisation efficace ait lieu, Rom2p doit être activée par ces trois activateurs. L'effecteur de Rho1p, Fks1p, est requis pour l'internalisation possiblement en influençant la localisation cellulaire des régulateurs de l'endocytose ou simplement de Rho1p lui-même. Tirée de deHart et al. (2003).

1.5.2.2 Modèle de l'implication de l'actine dans l'endocytose

Il y a maintenant plus de dix ans que le lien entre le cytosquelette d'actine et l'endocytose a été établi (Riezman, 1993). Pourtant, ce n'est que tout récemment que les détails de l'implication de l'actine dans l'endocytose ont été mis en lumière. C'est en 2003 qu'on a réussi à démontrer pour la première fois l'implication directe de l'actine dans l'endocytose. La microscopie en temps réel a montré que l'actine s'accumule au site d'endocytose au moment de l'internalisation suggérant que l'actine dirigerait possiblement l'invagination de la membrane et/ou le mouvement de la vésicule dans le cytoplasme (Kaksonen et al., 2003). Il est bien connu que les granules corticaux sont impliqués à la fois dans la régulation du cytosquelette d'actine et dans l'endocytose. En étudiant six protéines associées aux granules corticaux (Abp1p, Arc15p, Las17p, Pan1p, Sla1p et Sla2p), Kaksonen et al. (2003) ont observé que la composition des granules corticaux est variable suivant les différentes étapes de l'endocytose et que l'internalisation implique un mécanisme d'assemblage/désassemblage de complexes protéiques. Ils ont également démontré que l'actine n'était impliquée qu'au moment de l'internalisation de la vésicule (Ayscough, 2005; Kaksonen et al., 2003).

Récemment, cette équipe a réalisé trois découvertes majeures sur le mécanisme d'endocytose chez la levure (Kaksonen et al., 2005). Premièrement, ils ont confirmé l'implication de la clathrine dans l'endocytose chez la levure. La microscopie quantitative en temps réel a permis d'observer que la clathrine arrive très tôt au site d'endocytose et qu'elle initie l'assemblage de la machinerie endocytique (Figure 12). Elle jouerait donc un rôle crucial dans l'initiation efficace de l'assemblage du site endocytique mais n'est toutefois pas requise pour l'invagination et la formation de la vacuole. La protéine Ede1p semble partager une fonction similaire à la clathrine puisque sa délétion entraîne le même phénotype, à savoir un défaut d'endocytose de l'ordre de 50-75% et la diminution du nombre de site d'internalisation (Ayscough, 2005; Kaksonen et al., 2005). Deuxièmement, l'analyse de nombreuses protéines de l'endocytose a permis de décrire quatre modules protéiques qui coopèrent pour diriger toutes les étapes de l'endocytose – de l'invagination à la scission de la vésicule (Figure 12). Le premier module, le revêtement, comporte des protéines qui s'assemblent à la membrane plasmique et provoquent l'invagination de la membrane. Ce module est composé de la clathrine, Sla1p, Sla2p, Pan1p et End3p. On retrouve également les protéines Ent1/2, mais leur rôle n'est pas bien compris. La formation de ce module est indépendante de l'actine mais son démantèlement nécessite la polymérisation de cette dernière. Le deuxième module, celui de l'actine, se compose bien sûr de l'actine ainsi que des protéines Cap1/2p, Sac6p, Abp1p et du complexe Arp2/3. Ce module est responsable de la formation d'un réseau d'actine permettant le mouvement dans le cytoplasme et la séparation de la vésicule de la membrane plasmique. Toutes les protéines de ce module sont dépendantes de l'actine pour leur localisation. Le troisième module, WASP/Myo, est formé de Las17p, de Myo5p et de Bbc1p. Ce module reste immobile à la surface de la membrane plasmique suivant la polymérisation de l'actine et le démantèlement du module de revêtement. Le quatrième et dernier module contient les protéines Rvs161p et Rvs167p, des analogues de l'amphiphysine. Elles sont localisées très brièvement au site d'endocytose après le début de la polymérisation et seraient possiblement responsables de la fission de la vésicule. Enfin, ils ont montré que l'actine dirige le mouvement de la vésicule dans le cytoplasme à partir de la membrane plasmique et non à partir de la surface de la vésicule (Figure 12). Ainsi, Kaksonen et al. (2005) ont pu détailler un schéma illustrant le mécanisme de l'endocytose avec ses nombreux régulateurs (Figure 12).

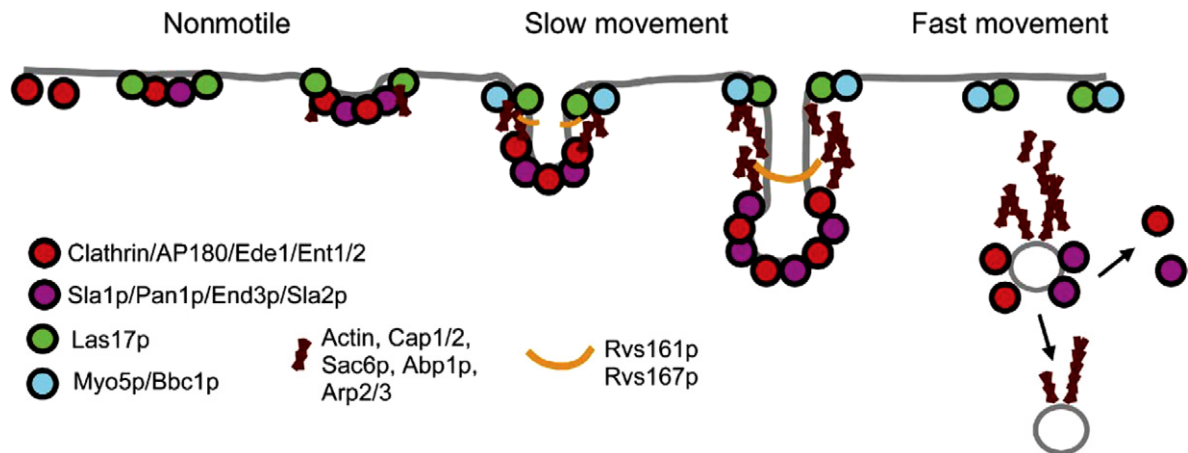


Figure 12 : Représentation schématique du mécanisme de l'endocytose chez *S. cerevisiae*.

La première étape de l'endocytose est le positionnement au site endocytique du module de revêtement composé de la clathrine, AP180, Ede1p et Ent1/2. Ensuite, il y a recrutement des autres protéines de ce module soit Sla1p, Sla2p, Pan1p, End3p et Las17p. Las17p, un homologue de WASP, active le complexe nucléateur Arp2/3 favorisant la polymérisation de l'actine. La polymérisation de l'actine est également régulée par Myo5p et Bbc1p, qui se positionnent et restent immobiles à la membrane plasmique. Les amphiphisines Rvs161p et Rvs167p seraient quant à elles responsables de la scission de la vésicule endocytique de la membrane plasmique. La polymérisation de l'actine dirige ensuite la vésicule à l'intérieur du cytoplasme. Cette dernière étape est suivie du démantèlement du module de revêtement et des protéines associées. Tirée de Ayscough (2005).

1.6 Étude de la régulation du cytosquelette d'actine

L'équipe du Dr Pallotta s'intéresse plus particulièrement à la régulation du cytosquelette d'actine chez la levure *S. cerevisiae*. Des études génétiques ont été réalisées précédemment dans le but d'identifier des suppresseurs de la délétion du gène de la profiline (*pfj1Δ*). La sensibilité au NaCl et à la caféine de cette souche ont été utilisées pour la sélection des suppresseurs. Un criblage génétique a permis d'identifier sept suppresseurs multicopies du phénotype associé à la délétion de la profiline : *MID2*, *RHO2*, *ROM1*, *ROM2*, *SMY1*, *SYP1* et *WSC1*. La surexpression de ces gènes chez les cellules déficientes en profiline permet de repolariser les granules corticaux dans le bourgeon sans toutefois permettre la formation de câbles d'actine visibles. Ces suppresseurs corrigent la sensibilité à la caféine et au NaCl en plus de diminuer la taille des cellules. Dans le cas des suppresseurs *ROM1*, *ROM2*, *SYP1* et *MID2*, on observe également la formation d'une paroi épaisse (Marcoux et al., 1998; Marcoux et al., 2000; Zakrzewska et al., 2003). Ces résultats suggèrent que ces suppresseurs passent par la voie de signalisation des protéines de type Rho et celle de Pkc1p pour repolariser les granules corticaux. En effet, on sait que Rho1p peut activer directement la synthèse de la paroi cellulaire en activant la β -1,3-glucane synthase ou indirectement par l'activation de PKC-MAPK (Sekiya-Kawasaki et al., 2002) (Figure 13).

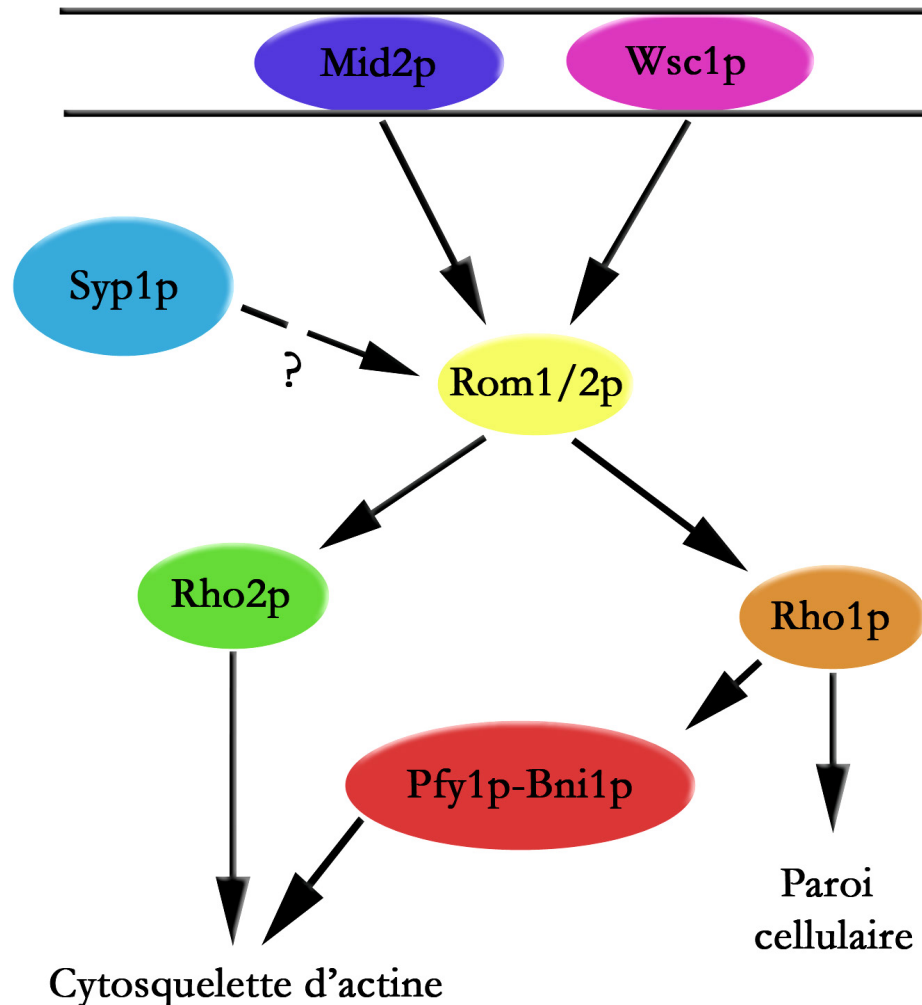


Figure 13 : Modèle proposé pour un sentier de signalisation impliquant les suppresseurs de la délétion de la profiline (Marcoux et al., 2000).

1.6.1 Le gène *SYP1*

Le gène *SYP1* a été identifié par le laboratoire du Dr Pallotta en tant que suppresseur multicopies de la délétion de la profiline (Marcoux et al., 2000). Dans cette étude, la surexpression de *SYP1* dans les cellules *pfy1Δ* a permis de repolariser les granules corticaux dans le bourgeon mais n'a pas permis l'apparition de câbles d'actine visibles. Des observations en microscopie électronique ont montré que la surexpression de *SYP1* provoquait la formation d'une paroi épaisse suggérant que la protéine Syp1p agit par les voies de signalisation de Rho1p et de Pkc1p. L'étude de la surexpression de *SYP1* dans les cellules sauvages haploïdes montre l'apparition d'une longue projection dans environ 10% des cellules tandis que dans les cellules diploïdes il y a apparition d'une petite protubérance en position opposée au bourgeon

(Marcoux et al., 2000). Le gène *SYP1* n'est pas essentiel à la croissance de la cellule puisque sa suppression n'est pas létale et ne provoque pas de phénotype particulier. Enfin, la localisation cellulaire à l'aide de la protéine de fusion Syp1p-GFP montre que Syp1p est localisée à la base du bourgeon tout au long de la croissance du bourgeon et à la plaque équatoriale lors de la division cellulaire (Zakrzewska, 2005).

À ce jour, aucune fonction biologique n'est encore associée à la protéine Syp1p. Toutefois, plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à sa fonction. Tout d'abord, Syp1p pourrait être impliquée dans la cytokinèse. En effet, la surexpression de *SYP1* permet de corriger le phénotype associé à la délétion de *cyk1Δ/IQG1* (Clive Price, communication personnelle). La protéine Cyk1p/IQG1 est un homologue de la protéine IQGAP chez les mammifères. Elle est impliquée dans le fonctionnement du cytosquelette et est associée à l'anneau contractile lors de la cytokinèse (Shannon and Li, 1999). De plus, Cyk1p/IQG1 est localisée au septum comme Syp1p et participe à la formation de l'anneau contractile (Shannon and Li, 1999). Aussi, la protéine Syp1p co-localise parfaitement avec les septines, des protéines essentielles à la division cellulaire. Ces données suggèrent donc que Syp1p pourrait être impliquée dans le processus de formation de l'anneau contractile responsable de la division cellulaire.

Plusieurs équipes de recherche ont réalisé des études d'immunoprécipitation et de chromatographie d'affinité afin d'identifier des complexes protéiques chez *S. cerevisiae*. Ces études ont permis d'identifier Syp1p parmi plusieurs complexes protéiques (Tableau 1). On retrouve dans ces complexes des protéines qui participent à la formation des granules corticaux ainsi que des régulateurs importants de l'endocytose tels que Ede1p, Las17p, Sla1p et Sla2p. Ces résultats suggèrent quant à eux un rôle dans l'endocytose puisque les granules corticaux sont essentiels au bon fonctionnement de l'endocytose et que les régulateurs identifiés sont également très importants pour ce processus cellulaire. Plusieurs recherches dans les banques de données ont été entreprises afin d'identifier des homologues de séquences ou des domaines particuliers sur la protéine Syp1p. Aucun résultat concluant n'a été obtenu mis à part un domaine coiled-coil à la position N-terminale de la protéine. Toutefois, étant donné que ce type de domaine est retrouvé sur de nombreuses protéines, cela ne donne pas beaucoup d'information pour le moment.

Tableau 1 : Résultats des études d'immunoprécipitation chez *S. cerevisiae* présentant les complexes protéiques dans lequel Syp1p est retrouvée.

	Étiquette	Gènes codant les protéines du complexe
Complexe 1	<i>YOL054W</i>	<i>YOL054W</i> , <i>YOR056C</i> , <i>SYPI</i> , <i>SPT16</i> , <i>POB3</i> , <i>MAM33</i> , <i>KNS1</i> , <i>HTB1</i> , <i>HTA2</i> , <i>HTA1</i> , <i>HHF1</i> , <i>GAC1</i> , <i>EDE1</i>
Complexe 2	<i>EDE1</i>	<i>SLA2</i> , <i>SYPI</i> , <i>YDR348C</i> , <i>EDE1</i>
Complexe 3	<i>MRPL9</i>	<i>MRP20</i> , <i>MRPL35</i> , <i>BUD3</i> , <i>MRPL24</i> , <i>UGT51</i> , <i>MRPL25</i> , <i>MRH4</i> , <i>MRPL20</i> , <i>SYPI</i> , <i>MRPL28</i> , <i>PRP43</i> , <i>UTP20</i> , <i>MRPL8</i> , <i>IMG1</i> , <i>MRPL36</i> , <i>MHR1</i> , <i>YML025C</i> , <i>SIN4</i> , <i>MRPL1</i> , <i>MRP7</i> , <i>YDR115W</i> , <i>MRPL4</i> , <i>NUG1</i> , <i>MRPL44</i> , <i>ROM2</i> , <i>MRPL13</i> , <i>TAF5</i> , <i>IMG2</i> , <i>MRPL7</i> , <i>MRPL39</i> , <i>MRP49</i> , <i>MRPL9</i>
Complexe 4	<i>SLA1</i>	<i>LAS17</i> , <i>INP52</i> , <i>STM1</i> , <i>YSC84</i> , <i>YPR171W</i> , <i>ECM25</i> , <i>LSB3</i> , <i>SYPI</i> , <i>BZZ1</i> , <i>SLA1</i>

Référence : <http://www.yeastgenome.org>

1.7 Origine et Objectifs du projet

L'identification de *SYP1* en tant que suppresseur multicopies du phénotype associé à la délétion de la profiline est à l'origine de ce projet. N'ayant aucune fonction cellulaire connue à ce jour, il devenait pertinent d'étudier la fonction cellulaire de ce nouveau gène. La correction du phénotype des cellules déficientes en profiline, une protéine nécessaire à la régulation du cytosquelette d'actine, permet de croire que Syp1p est importante pour la régulation du cytosquelette d'actine. De plus, l'identification de Syp1p dans des complexes protéiques avec des régulateurs de l'endocytose et du cytosquelette d'actine nous a mené vers l'hypothèse stipulant que Syp1p joue un rôle dans l'endocytose ainsi que dans la régulation du cytosquelette d'actine chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

L'objectif principal du projet était d'étudier la fonction cellulaire de *SYP1* chez *S. cerevisiae*. Pour atteindre cet objectif, nous avons réalisé une étude de la surexpression de *SYP1* dans de nombreuses souches mutantes afin d'identifier d'autres corrections du cytosquelette d'actine. Ensuite, nous avons étudié la localisation cellulaire de Syp1p afin de rechercher une délocalisation de la protéine dans le but d'identifier des partenaires protéiques potentiels pour Syp1p. Enfin, des doubles mutants ont été construits pour vérifier la présence d'interaction génétique avec *SYP1*.

Chapitre 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Souche bactérienne et conditions de croissance

2.1.1 Souche bactérienne

Tous les clonages ont été effectués à l'aide de la souche *Escherichia coli* DH5 α dont le génotype est présenté au Tableau 2.

Tableau 2 : Souche bactérienne utilisée.

Souche	Génotype
<i>E. coli</i> DH5 α	F^{\prime} / <i>endA1</i> , <i>bsdR17</i> , ($r_k^- m_k^+$), <i>supE44</i> , <i>tbi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> , (Nal1r), <i>relA1</i> , $\Delta(lacZYA-argF)U169$, <i>deoR</i> , ($\Phi 80dlac\Delta(lacZ)M15$)

2.1.2 Conditions de croissance

Le milieu de culture utilisé pour la croissance de la souche *E. coli* DH5 α est le milieu Luria-Bertani (LB), composé de NaCl à 1%, d'extrait de levure à 0,5% et de tryptone à 1%. Pour les milieux de cultures solides, de l'agar est ajouté à une concentration de 1,5% (m/v). La croissance des bactéries se fait à 37°C et la durée d'incubation est généralement comprise entre 16 et 18 heures. Les cultures en milieu liquide sont incubées avec agitation à 250 rpm.

La croissance et la sélection des bactéries transformées avec un plasmide portant le gène de résistance à l'ampicilline s'effectuent sur un milieu LB contenant de l'ampicilline à 100 μ g/ml. L'antibiotique est ajouté après la stérilisation, au milieu refroidi, à partir d'une solution mère d'ampicilline à 100 mg/ml.

2.2 Souches de levure et conditions de croissance

2.2.1 Souches de levure

Toutes les souches de levure utilisées dans le cadre de cette étude sont présentées au Tableau 3 avec leur génotype et la référence concernant leur origine.

Tableau 3 : Souches de levure utilisées.

Souches	Génotype	Référence
BY4741	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3</i>	1
BY4742	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3</i>	1
<i>app1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 app1Δ :: kan</i>	5
<i>arf3Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 arf3Δ :: kan</i>	5
<i>ark1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 ark1Δ :: kan</i>	5
<i>bbc1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bbc1Δ :: kan</i>	5
<i>bem2Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bem2Δ :: kan</i>	1
BHY46	<i>MATα ura3 his3 leu2 ade2 ade3 pfy1-111:LEU2</i>	3
<i>bni1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bni1Δ ::kan</i>	1
<i>bnr1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bnr1Δ ::kan</i>	1
<i>bsp1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bsp1Δ :: kan</i>	5
<i>bud3Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bud3Δ ::kan</i>	1
<i>bud4Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bud4Δ ::kan</i>	1
<i>bud6Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bud6Δ::kan</i>	1
<i>bud8Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bud8Δ ::kan</i>	1
<i>bzz1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 bzz1Δ :: kan</i>	5
<i>cap1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 cap1Δ :: kan</i>	5
<i>cdc10Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 cdc10Δ :: kan</i>	1
<i>cdc12-6</i>	<i>MATα his3-11, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3 cdc12-6</i>	11
<i>chs1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 chs1Δ ::kan</i>	1
<i>chs3Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 chs3Δ ::kan</i>	1
<i>chs4Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 chs4Δ ::kan</i>	1
<i>chs5Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 chs5Δ ::kan</i>	1
<i>chs6Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 chs6Δ ::kan</i>	1
<i>chs7Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 chs7Δ ::kan</i>	1
<i>cla4Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 cla4Δ ::kan</i>	1

Souches	Génotype	Référence
<i>crn1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 crn1Δ :: kan</i>	5
DJP102	<i>MATα lys2-80 ura3-52 his3-Δ200 trp1-1 leu2-3, 112 pfy1-Δ:: LEU2</i>	2
<i>drs2Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 drs2Δ ::kan</i>	1
<i>ede1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 ede1Δ ::kan</i>	1
ELY100	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 syp1Δ :: URA3 arf3Δ :: kan</i>	10
ELY200	<i>MATα his3 leu2 ura3 lys2 met15 syp1Δ :: URA3 bniΔ :: kan</i>	10
ELY300	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 syp1Δ :: URA3 cbs1Δ :: kan</i>	10
ELY400	<i>MATα his3 leu2 ura3 lys2 syp1Δ :: URA3 ede1Δ :: kan</i>	10
<i>end3Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 end3Δ::kan</i>	1
<i>ent1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 ent1Δ :: kan</i>	5
<i>ent2Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 ent2Δ :: kan</i>	5
<i>ent3Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 ent3Δ :: kan</i>	5
<i>ent4Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 ent4Δ :: kan</i>	5
EZY27	<i>MATα his3 leu2 lys2 ura3 syp1Δ :: URA3</i>	6
<i>far8Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 far8Δ :: kan</i>	5
<i>his1a</i>	<i>MATa his1</i>	1
<i>his1α</i>	<i>MATα his1</i>	1
<i>inp52Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 inp52Δ :: kan</i>	5
<i>inp53Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 inp53Δ :: kan</i>	5
<i>las17Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 las17Δ ::kan</i>	1
<i>myo4Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 myo4Δ :: kan</i>	5
NHM101	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 mid2Δ:: HIS3</i>	4
<i>prk1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 prk1Δ :: kan</i>	5
PY3517	<i>MATa bni1-FH2#1::HIS3 bnr1::kanR his3-Δ1 leu2-Δ0 ura3-Δ0 met15-Δ0</i>	7
<i>rgd1Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 rgd1Δ :: kan</i>	5

Souches	Génotype	Référence
RHO3/ <i>rho3</i> Δ	<i>MATa/MATα his3/his3 leu2/leu2 met15/MET15 lys2/LYS2 ura3/ura3 RHO3/ rho3Δ::kan</i>	1
<i>rho4</i> Δ	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 rho4Δ::kan</i>	1
<i>rvs161</i> Δ	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 rvs161Δ :: kan</i>	5
<i>rvs167</i> Δ	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 rvs167Δ :: kan</i>	5
<i>sac6</i> Δ	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 sac6Δ :: kan</i>	1
<i>scp1</i> Δ	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 scp1Δ :: kan</i>	5
SCY26	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 syp1Δ::kan</i>	4
<i>sla1</i> Δ	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 sla1Δ ::kan</i>	1
<i>sla2</i> Δ	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 sla2Δ ::kan</i>	1
<i>smy1</i> Δ	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 smy1Δ::kan</i>	1
<i>spa2</i> Δ	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 spa2Δ::kan</i>	1
<i>srv2</i> Δ	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 srv2Δ::kan</i>	1
<i>sur7</i> Δ	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 sur7Δ :: kan</i>	5
<i>tpm1</i> Δ	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 tpm1Δ :: kan</i>	5
<i>tnf1</i> Δ	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 tnf1Δ :: kan</i>	5
<i>vrp1</i> Δ	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 vrp1Δ:: kan</i>	1
Y1242	<i>MATα his3Δ 200 trp1-Δ1 ade2-101 lys2-801 ura3-52 rom2Δ ::HIS3</i>	9
Y1392	<i>MATa can1-100 ura3-1 leu2-3,-112 his3-11,-15 trp1-1 ade2-1 myo3Δ ::HIS3 myo5Δ:: TRP1</i>	8
<i>ydr348c</i> Δ	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 ydr348cΔ ::kan</i>	1

Références : (1) Souche provenant de la compagnie Invitrogen; (2) (Marcoux et al., 1998); (3) (Haarer et al., 1993); (4) (Marcoux et al., 2000); (5) Souche provenant de la compagnie Open Biosystems; (6) (Zakrzewska, 2005); (7) (Zakrzewska et al., 2003); (8) Gracieuseté de M Charlie Boone; (9) (Manning et al., 1997); (10) Cette étude; (11) (Lee et al., 2002)

2.2.2 Conditions de croissance

Le milieu de culture utilisé pour la croissance des levures est le YPD, un milieu riche et non sélectif composé d'extrait de levure à 1%, de peptone à 2% et de glucose à 2%. De l'agar est ajouté à 2% (m/v) pour les milieux solides. À moins d'indication contraire, la température optimale de croissance des levures est de 30°C. Les cultures en milieu liquide sont incubées avec agitation à 225 rpm. Les tests de croissance réalisés sur les doubles mutants se font sur un milieu YPD auquel on ajoute de la caféine à 1,25 mg/ml.

Le milieu de culture utilisé pour la sélection des différentes auxotrophies ou pour la détermination du génotype est un milieu minimal SD composé de glucose à 2%, d'un milieu azoté sans acides aminés (YNB – Yeast Nitrogen Base without amino acids) à 0,67% et d'un complément d'acides aminés essentiels enrichi d'adénine et d'uracile à 0,072% duquel est soustrait le composé utilisé pour la sélection. La composition de ce mélange est présentée au Tableau 4. De l'agar est ajouté à 2% (m/v) pour l'obtention de milieu solide. Pour effectuer les tests de croissance des souches avec plasmides, on ajoute de la caféine au milieu minimal à une concentration de 1,25 mg/ml. Pour la sélection des doubles mutants, de la généticine (G418) est ajoutée au milieu minimal à une concentration de 250 µg/ml. Dans le cadre de cette étude, la sélection des transformants s'est effectuée sur un milieu dépourvu d'uracile.

Tableau 4 : Complément d'acides aminés essentiels enrichi d'adénine et d'uracile.

Adénine	800 mg	Phénylalanine	2000 mg
Arginine	800 mg	Thréonine	8000 mg
Histidine	800 mg	Tryptophane	800 mg
Leucine	2400 mg	Tyrosine	1200 mg
Lysine	1200 mg	Uracile	800 mg
Méthionine	800 mg		

2.3 Constructions plasmidiques

Les plasmides utilisés dans le cadre de cette étude sont présentés au Tableau 5. Les plasmides pBS *SYP1* et pSGM (pRS426 *SYP1*-GFP) ont été préparés par Simon Cloutier (Cloutier, 2000). Le plasmide pEML02 a été construit à partir du plasmide pRS426 et pBS *SYP1*. Les deux plasmides ont été digérés par les enzymes de restrictions *SacI* et *KpnI* (New England Biolabs). Cette digestion permet d'extraire le gène *SYP1* et son promoteur du plasmide pBS *SYP1*. Ce fragment contient 545 pb en amont du codon de départ, la séquence codante du gène *SYP1* (2612 pb) et 74 pb en aval du codon de terminaison. La ligature de ce fragment a été faite dans les sites *SacI* et *KpnI* du vecteur pRS426.

Tableau 5 : Liste des plasmides utilisés.

Plasmides	Description
pBS <i>SYP1</i>	Plasmide pBlueScript II KS+ dans lequel le gène <i>SYP1</i> et son promoteur ont été clonés.
pRS426	Plasmide multicopie permettant la surexpression de gène.
pEML02	Plasmide multicopie pRS426 dans lequel le gène <i>SYP1</i> et son promoteur ont été clonés. Permet la surexpression de <i>SYP1</i> .
pSGM	Plasmide multicopie pRS426 dans lequel le gène <i>SYP1</i> -GFP a été cloné. Permet la localisation cellulaire de la protéine de fusion Syp1p-GFP.

2.4 Manipulation de l'ADN recombinant

2.4.1 Digestion par des enzymes de restriction

L'ADN plasmidique est digéré par des enzymes de restriction afin d'estimer la taille des plasmides, vérifier les clonages ou encore pour extraire un fragment d'intérêt d'un plasmide. Ainsi, la quantité d'ADN utilisée pour les différents types de digestions peut varier de 0,1 à 4 µg d'ADN. Pour procéder à la digestion enzymatique, on ajoute au volume d'ADN à digérer $\frac{1}{10}$ de volume du tampon 10X approprié à l'enzyme choisi, $\frac{1}{10}$ de volume de BSA 10X (si nécessaire), 1 unité d'enzyme de restriction pour 1 µg d'ADN à digérer puis le volume est complété avec de l'eau filtrée stérile. Le volume final de la digestion varie selon la quantité d'ADN à digérer. Dans le cas d'une simple estimation de la taille d'un plasmide, où la quantité

d'ADN à digérer varie entre 100 et 600 η g, la digestion peut se faire dans un volume final de 20 μ l. L'extraction d'un fragment d'intérêt nécessite une quantité d'ADN plus importante, de l'ordre de 1 à 4 μ g, puisque la digestion est suivie d'une extraction sur gel. Dans ce cas, le volume final de la digestion sera de 100 μ l. Dans le cas des digestions doubles, il arrive parfois que les tampons requis par les deux enzymes soient incompatibles empêchant la réalisation d'une digestion double. On procède alors à une digestion séquentielle où les deux digestions sont séparées par une précipitation d'ADN ou une extraction sur gel.

2.4.2 Ligature de fragments d'ADN

L'ADN plasmidique utilisé est d'abord rendu linéaire par une digestion à l'aide de deux enzymes de restriction différentes dont les sites de clivage se trouvent à l'intérieur du site de clonage multiple. L'utilisation de deux enzymes de restriction différentes évite que le plasmide ne se referme sur lui-même lors de la ligature. Le fragment d'ADN à insérer est digéré avec les mêmes enzymes que le plasmide créant ainsi des extrémités cohésives facilitant la ligature. Les enzymes utilisés pour la ligature de *SYP1* dans le plasmide pRS426 sont *SacI* et *KpnI* (New England Biolabs). La ligature se fait en présence de 50 à 100 η g d'ADN plasmidique linéaire et d'une quantité équimolaire du fragment d'ADN à insérer. On ajoute 2 μ l du tampon de ligature 10X, 1 unité d'ADN ligase du bactériophage T4 et le volume est complété à 20 μ l avec de l'eau filtrée stérile. La réaction se déroule à 16°C pendant 2 à 4 heures ou à 4°C pour toute la nuit.

2.4.3 Électrophorèse sur gel d'agarose

À moins d'indication contraire, les électrophorèses sont réalisées sur un gel d'agarose à 0,8%. L'agarose est mélangé au tampon d'électrophorèse TBE 1X (Tris basique à 0,090 M; acide borique à 0,090 M; EDTA à 0,002 M, pH 8,0) puis porté à ébullition pour dissolution complète. Du bromure d'éthidium à 0,5 μ g/ml est ajouté à l'agarose refroidi pour permettre la détection de l'ADN par l'exposition aux rayons U.V. Aux échantillons à analyser, on ajoute du tampon de chargement à une concentration finale de 1X (Tampon de chargement 6X : bleu de bromophénol à 0,1%; glycérol à 50%; SDS à 1%; EDTA à 0,1 M, pH 8,0). La migration des échantillons se déroule dans une cellule électrophorétique sous une tension de 100 V pendant environ 60 minutes. Les marqueurs de poids moléculaires utilisés sont l'ADN du bactériophage Φ X174 digéré par *HaeIII* et l'ADN du bactériophage λ digéré par *HindIII*.

2.4.4 Extraction d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose

La concentration en agarose du gel utilisé pour l'extraction d'un fragment d'ADN sur gel est de 0,7%. La migration de l'ADN est faite à 100 V jusqu'à ce que les différents fragments d'ADN soient parfaitement séparés. Lorsque la migration est complétée, le fragment d'intérêt est découpé à l'aide d'une lame tranchante directement dans le gel d'agarose placé sur une plaque U.V. Le fragment est ensuite traité avec la trousse d'extraction sur gel QIAquick® Gel Extraction Kit de la compagnie QIAGEN. La méthode utilisée est décrite dans le manuel de l'utilisateur fourni par la compagnie.

2.5 Transformation bactérienne et extraction de l'ADN plasmidique

2.5.1 Préparation des cellules compétentes

La souche bactérienne utilisée est rendue compétente par la méthode au chlorure de rubidium (RbCl) (Utermohlen, 1994). La souche *E. coli* DH5 α est inoculée dans 10 ml de milieu LB et incubée avec agitation pour la nuit à 37°C. Le lendemain, 250 ml de milieu RB + MgSO₄ à 20 mM (tryptone à 1%; extrait de levure à 0,5%; NaCl à 0,5%; pH 7,0-7,5) est inoculé avec 2,5 ml de la pré-culture (1 : 100). On incube à 37°C avec agitation jusqu'à l'obtention d'une DO₅₉₀ de 0,4 à 0,6. Les cellules sont ensuite centrifugées à 4°C pendant 5 minutes à 5000 rpm (Centrifugeuse Sorvall RC5-C; rotor GSA). Le surnageant est éliminé et le culot repris dans 100 ml de tampon TFB1 (RbCl à 100 mM; acétate de potassium à 30 mM; CaCl₂ à 10 mM; MnCl₂ à 50 mM; glycérol à 15%; pH 5,8) pré-refroidi sur la glace. Les cellules sont incubées durant 5 minutes sur glace. À partir de cette étape, il est important de garder les cellules sur la glace et d'utiliser du matériel préalablement refroidi sur la glace. On centrifuge à nouveau les cellules à 4°C pendant 5 minutes à 5000 rpm. Le surnageant est enlevé et le culot repris doucement dans 10 ml de tampon TFB2 (MOPS à 10 mM; CaCl₂ à 75 mM; RbCl à 10 mM; glycérol à 15%; pH 6,5) pré-refroidi sur la glace puis on laisse reposer sur glace pendant 15 à 60 minutes. Les cellules sont alors aliquotées dans des microtubes de 2,0 ml stériles à raison de 220 μ l par tube (quantité suffisante pour deux essais de transformation). Les cellules compétentes doivent être congelées rapidement dans un bain d'alcool éthylique 95% / glace sèche et conservées ensuite au congélateur à -80°C. Les cellules compétentes préparées selon cette méthode peuvent se conserver ainsi au moins un an.

2.5.2 Transformation bactérienne

Pour procéder à la transformation, les bactéries compétentes sont mises en présence de 50 à 200 η g d'ADN plasmidique et incubées sur la glace pour une période de 20 à 60 minutes. Les cellules sont par la suite soumises à un choc thermique d'une minute à 42°C puis immédiatement placées sur la glace pendant 2 minutes. On ajoute alors 400 μ l de milieu LB aux cellules qu'on incubent ensuite durant 30 minutes à 37°C sans agitation. Finalement, les cellules sont étalées sur un milieu LB contenant de l'ampicilline à 100 μ g/ml pour la sélection des transformants. Si le plasmide utilisé pour la transformation est pBlueScript il est possible de sélectionner les colonies blanches des transformants en étalant sur les boîtes 50 μ l d'IPTG à 100 mM et 50 μ l de X-Gal à 2%. Les boîtes sont incubées pendant 16 à 18 heures à 37°C.

2.5.3 Extraction de l'ADN plasmidique

2.5.3.1 Méthode au CTAB

Les plasmides obtenus après transformation sont isolés pour fin de vérification en utilisant la méthode au CTAB (bromure d'héxadécyltriméthyl ammonium). Tout d'abord, un clone isolé est ensemencé dans du milieu LB contenant de l'ampicilline à 100 μ g/ml et incubé toute la nuit à 37°C avec agitation. On prélève 1,5 ml de la culture de nuit qu'on centrifuge pendant 1 minute à 13 000 rpm (microcentrifugeuse). Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 200 μ l de tampon STET (sucrose à 8% (p/v); Tris-HCl à 50 mM, pH 8,0; EDTA à 50 mM; triton X-100 à 0,1% (v/v)). On ajoute ensuite 4 μ l de lysozyme à 50 mg/ml puis on laisse reposer pendant 5 minutes à la température ambiante avant de faire une incubation de 45 secondes dans l'eau bouillante. On centrifuge ensuite durant 10 minutes à 13 000 rpm. Sans verser le surnageant, le culot est enlevé à l'aide d'un cure-dent puis jeté. Au surnageant, on ajoute 2 μ l de RNase à 10 mg/ml puis on incube pendant 10 minutes à 68°C. On ajoute ensuite 10 μ l de CTAB à 5% (p/v dans du NaCl 0,5 M) et le tout est mélangé à l'aide d'un vortex puis centrifugé pendant 10 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant est éliminé puis le culot est repris dans 300 μ l de NaCl à 1,2 M. On ajoute ensuite 750 μ l d'alcool éthylique 95% puis, après avoir bien mélangé par inversion, on laisse reposer sur la glace pendant 10 minutes. On poursuit avec une centrifugation de 10 minutes à 13 000 rpm puis on élimine le surnageant à l'aide d'une micropipette. Le culot est lavé avec 250 μ l d'alcool éthylique à 70%. Les tubes doivent être centrifugés immédiatement pendant 2 minutes à 13 000 rpm sans être agités. Le

surnageant est éliminé à l'aide d'une micropipette puis le culot est laissé sécher à l'air libre pendant quelques minutes. Le culot peut être repris dans 50 µl de TE (Tris-HCl à 10 mM, pH 8,0; EDTA à 1 mM, pH 8,0) ou dans 50 µl d'eau filtrée stérile.

2.5.3.2 Méthode utilisant la trousse de la compagnie QIAGEN

Les plasmides utilisés pour les clonages ou le séquençage ont tous été isolés sur colonne provenant de la trousse d'extraction plasmidique QIAprep[®] Spin Miniprep Kit de la compagnie QIAGEN. Le protocole suivi est celui décrit dans le manuel de la compagnie.

2.6 Transformation de levures et isolation de l'ADN génomique

2.6.1 Transformation de *S. cerevisiae* par la méthode LIAC

Les souches de levure présentées au Tableau 3 ont été transformées avec les plasmides pEML02, pRS426 *YYP1*-GFP et parfois avec pRS426. Tout d'abord, 1,5 ml d'une culture de nuit de la souche à transformer est centrifugé. Le surnageant est décanté de façon à conserver 50 à 100 µl de liquide avec les cellules. On ajoute 2 µl de carrier DNA (ADN de sperme de hareng à 10 mg/ml, préalablement bouilli 20 minutes) et environ 1 µg de plasmide puis on mélange à l'aide d'un vortex quelques secondes. On ajoute ensuite 500 µl de PLATE mixture (PEG 4000 à 45%; LiOAC à 0,1 M; Tris-HCl à 10 mM pH 7,5; EDTA à 1 mM) et 20 µl de DTT à 1 M puis on mélange à l'aide d'un vortex quelques secondes. On laisse incubé à la température ambiante pendant 6 à 8 heures ou toute la nuit. Les cellules sont soumises à un choc thermique de 10 minutes à 42°C puis elles sont immédiatement centrifugées pendant 1 minutes à 13 000 rpm (microcentrifugeuse) et le surnageant est jeté. Le culot est repris dans 100 µl d'eau stérile puis les cellules sont étalées sur un milieu sélectif (Kaiser et al., 1994). À moins d'indication contraire, les boîtes sont incubées à 30°C pendant quelques jours, jusqu'à l'apparition des colonies.

2.6.2 Isolation de l'ADN génomique de *S. cerevisiae*

Un prélèvement de 1 à 3 ml d'une culture de nuit de la souche d'intérêt est centrifugé puis le culot est repris dans 200 µl de tampon SSTET (Triton X-100 à 2% (v/v); SDS à 1% (p/v); NaCl à 100 mM; Tris-HCl à 10 mM, pH 8,0; EDTA à 1 mM). On ajoute 200 µl d'un mélange

de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1) puis 300 mg de billes de verre de 425-600 μm de diamètre. Le tout est mélangé à l'aide d'un vortex pendant 4 minutes. Le lysat est centrifugé pendant 5 minutes à 13 000 rpm (microcentrifugeuse) et le surnageant est transféré dans un nouveau tube. On procède ensuite à des extractions au phénol : chloroforme jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'interphase visible. L'ADN génomique est précipité avec 2 volumes d'éthanol à 95% et $1/_{10}$ de volume d'acétate de sodium à 3 M pendant 15 minutes sur la glace puis centrifugé pendant 15 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant est éliminé par décantation puis 400 μl d'éthanol à 70% est ajouté sans mélanger et le tout est centrifugé immédiatement pour 2 minutes. Le surnageant est enlevé à l'aide d'une micropipette puis le culot est séché à l'air. Pour un ADN génomique exempt d'ARN, un traitement optionnel peut être fait en ajoutant 5 ηg de RNase A à l'ADN génomique. On incube pendant 15 minutes à 55°C puis une extraction au phénol : chloroforme est fait suivi d'une précipitation de l'ADN à l'éthanol. Le culot d'ADN est repris dans 50 μl d'eau stérile ou du TE (Hoffman and Winston, 1987).

2.7 Sporulation et dissection des tétrades

2.7.1 Création de doubles mutants et sporulation des souches diploïdes

2.7.1.1 Création des doubles mutants

Les doubles mutants *syp1 Δ arf3 Δ* , *syp1 Δ bni1 Δ* , *syp1 Δ chs1 Δ* et *syp1 Δ ede1 Δ* ont été créés en croisant la souche *syp1 Δ ::URA3 MAT α* avec les souches *arf3 Δ ::kan MAT α* , *bni1 Δ ::kan MAT α* , *chs1 Δ ::kan MAT α* et *ede1 Δ ::kan MAT α* respectivement. Dans un même tube contenant 5 ml de milieu de culture YPD, les deux souches à croiser, de type sexuel opposé, sont inoculées et incubées à 30°C avec agitation pour la nuit. Les gènes *URA3* et Kan^R sont les marqueurs utilisés pour la sélection des diploïdes. Le gène *URA3* permet la croissance sur un milieu minimal dépourvu d'uracile tandis que le gène Kan^R confère une résistance à la généticine (G418). Le lendemain, la sélection des diploïdes se fait sur un milieu SD sans uracile et contenant 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418. Seules les souches diploïdes posséderont les deux gènes marqueurs leur permettant de croître sur ce milieu sélectif. Les souches diploïdes hétérozygotes obtenues sont ensuite placées en condition favorisant la sporulation afin d'obtenir des doubles mutants haploïdes homozygotes.

2.7.1.2 Sporulation des souches diploïdes

La souche diploïde est inoculée dans 5 à 8 ml du milieu minimal approprié et incubée à 30°C avec agitation toute la nuit. Le lendemain, la culture est diluée dans 10 ml de milieu YPD frais afin d'obtenir une DO_{600} de 0,6. On laisse croître à 30°C avec agitation jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} d'environ 1,2. La culture est centrifugée pendant 5 minutes à 3000 rpm (centrifugeuse Sorvall RC5-C; rotor SA-600). Le surnageant doit être décanté délicatement puis le culot est lavé avec 20 ml d'eau filtrée stérile. On centrifuge à nouveau 5 minutes à 3000 rpm et le culot est repris dans 10 ml de milieu YEPA (acétate de potassium à 2%; bacto-peptone à 2%; extrait de levure à 1%). Les cellules sont incubées toute la nuit à 30°C avec agitation. Le lendemain, les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 3000 rpm puis le surnageant est décanté délicatement. Les cellules sont lavées deux fois avec 20 ml d'eau filtrée stérile puis le culot est repris dans 25 ml de milieu SPM (acétate de potassium à 0,3%; raffinose à 0,02%; complément d'acides aminés essentiels enrichi d'adénine et d'uracile 0,053%) que l'on dépose dans un erlenmeyer de 250 ml. Les cellules sont incubées à 30°C, pendant 2 à 3 jours, avec agitation ou jusqu'à l'apparition des tétrades.

2.7.2 Dissection des tétrades

La dissection des tétrades se fait à partir d'une souche diploïde ayant sporulée.

2.7.2.1 Digestion de la paroi cellulaire de l'asque

Afin de pouvoir procéder à la dissection, il faut tout d'abord éliminer la paroi cellulaire de l'asque contenant les quatre spores. On utilise la Zymolyase[®] 20T dont l'activité β -1,3-glucan laminaripentaohydrolase est responsable de l'hydrolyse des polymères de glucoses liés par un lien β -1,3. La digestion de la paroi cellulaire de l'asque est une étape très critique puisqu'une digestion trop longue entraînera la séparation des spores tandis qu'une digestion trop courte rendra très difficile la dissection. Un prélèvement de 150 μ l de la préparation de cellules ayant sporulée est fait. Les cellules sont centrifugées 20 secondes à 13 000 rpm (microcentrifugeuse) puis reprises dans 200 μ l de Zymolyase[®] 20T à 200 μ g/ml. L'incubation se fait à température pièce pour une période de 30 minutes (la durée de l'incubation peut varier selon la souche utilisée). Ensuite, on centrifuge à nouveau pendant 20 secondes à 13 000 rpm puis le culot est repris dans 50 à 100 μ l de sorbitol à 1M.

2.7.2.2 Microdissection des ascospores

Pour procéder à la microdissection des ascospores, des boîtes YPD au niveau doivent d'abord être préparées. Pour ce faire, il suffit de couler le milieu YPD dans les boîtes de Pétri et de les laisser figer sur une table ajustée avec un niveau. À l'aide d'un fil à boucle, une strie est tracée au centre de la boîte. La dissection des tétrades se fait ensuite à l'aide du microscope à dissection de chaque côté de la strie. Les spores sont incubées à 30°C pendant quelques jours où jusqu'à l'apparition des colonies correspondant aux spores disséquées.

2.7.2.3 Sélection des doubles mutants sur milieu sélectif

Afin de sélectionner le double mutant parmi les quatre spores qui ont formé des colonies, une réplique de la boîte est faite sur un milieu minimal SD URA⁻ / G418. Seul le double mutant pourra croître sur le milieu sélectif. Ensuite, il sera possible de déterminer son génotype en effectuant des tests de conjugaison et de croissance sur différents milieux sélectifs.

2.7.3 Vérification des délétions par PCR

Une vérification par amplification PCR des délétions géniques a été réalisée pour tous les doubles mutants dans le but de confirmer l'absence des deux gènes. La composition des milieux réactionnels pour la PCR est la suivante : 5 µl de Tampon 10X Taq polymerase Buffer contenant du MgCl₂ à 15 mM; 2 µl de dNTPs à 10 mM; 150 ng de chaque amorce; 50 ng d'ADN génomique; 2 µl de Taq polymerase et le volume est complété à 50 µl avec de l'eau filtrée stérile. Le programme du thermocycleur est le suivant : une première dénaturation de 10 minutes à 94°C suivi de 35 cycles d'une minute de dénaturation à 94°C, d'une minute d'hybridation des amorces et d'une minute d'élongation à 72°C et le cycle se termine par une élongation finale de 10 minutes à 72°C. La température et la durée de l'hybridation varient en fonction de la composition, de la longueur et de la concentration des amorces. En général, on utilise une température inférieure de 5°C au plus au T_m le plus bas calculé pour chacune des deux amorces. Les amorces utilisées pour les différentes amplifications sont présentées au Tableau 6.

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la vérification des délétions des doubles mutants.

Amorce	Séquence	Description de l'amorce
<i>SYP1</i> 5' BamHI	CGGGATCCCGGCITTTCA GATACTATCTAGC	Amorce située à 794pb en amont de l'ATG du gène <i>SYP1</i> . (Tm = 58°C)
<i>SYP1</i> 3' KpnI	GGGGTACCCCGGAAAAT ATGATTTAGCGGC	Amorce située à 94pb en aval du codon de terminaison (TGA) du gène <i>SYP1</i> . (Tm = 56°C)
<i>CHS1</i> Forward	ACAGCCATTAGTGTGAA ATTTGATT	Amorce située à 236pb en amont de l'ATG du gène <i>CHS1</i> . (Tm = 58°C)
Kan Reverse	CTGCAGCGAGGAGCCCT AAT	Amorce située dans la cassette kan servant à confirmer les délétions (Invitrogen) (Tm = 64,5°C)
<i>ARF3</i> 5' BamHI	CGGGATCCGGTGTATGC AGATTCAACACC	Amorce située à 500pb en amont de l'ATG du gène <i>ARF3</i> . (Tm = 62°C)
<i>BNI1</i> Forward	GTGGCATTCITTTTCTTCA CCC	Amorce située à 212pb en amont de l'ATG du gène <i>BNI1</i> . (Tm = 62°C)
<i>BNI1</i> Reverse	GCAATAGTAGAGATCAT TTGAG	Amorce située à 177pb en aval du codon de terminaison (TAA) du gène <i>BNI1</i> . (Tm = 60°C)
<i>EDE1</i> Forward	CCTGTITTTTATCTGTGTG TTTTCAA	Amorce située à 47 pb en amont de l'ATG du gène <i>EDE1</i> . (Tm = 66°C)
<i>EDE1</i> Reverse	TCAGCTTCGAGGAAGAA GTACA	Amorce située à 43 pb en aval du codon de terminaison (TAA) du gène <i>EDE1</i> . (Tm = 64°C)

2.8 Test de conjugaison

Le test de conjugaison permet de déterminer le type sexuel des levures, *MATa* ou *MAT α* . La souche à tester « X » est tout simplement croisée avec deux souches contrôles et le diploïde qui en résulte nous informe sur le type sexuel de la souche « X ». Les souches contrôles utilisées sont *bis1a* et *bis1 α* . Ces souches présentent une auxotrophie unique pour l'histidine par la délétion du gène *bis1*. Dans les souches de laboratoire, l'auxotrophie pour l'histidine est due à la délétion du gène *bis3*. Ainsi, s'il y a conjugaison entre la souche contrôle et la souche « X », le

diploïde résultant n'aura plus aucune auxotrophie et pourra croître sur un milieu minimal sans acide aminé. Au jour 1, les souches contrôles sont mises en culture dans 3 ml de milieu YPD et incubées pour la nuit à 30°C avec agitation. Au jour 2, on prélève 300 µl de la culture de nuit qu'on étale sur un milieu solide YPD afin d'obtenir un tapis cellulaire. Les boîtes sont incubées pendant 2 à 3 jours à 30°C. Au jour 3, on dépose 5 µl de culture des souches à tester sur une boîte YPD (en duplicata) en plus des souches BY4741 *MAT α* et BY4742 *MAT α* , dont les types sexuels sont connus, de façon à obtenir des ronds de cellules. On incube à 30°C toute la nuit. Au jour 4, les souches à tester sont croisées avec les souches *his1 α* et *his1 α* sur deux nouveaux milieux YPD en faisant des répliques des boîtes avec des velours. Les boîtes sont incubées toute la nuit à 30°C. Au jour 5, on fait une réplique de chaque boîte avec un velours sur des milieux minimaux SD sans acides aminés (glucose à 2%; milieu azoté sans acide aminé (YNB – Yeast Nitrogen Base without amino acids) à 0,67%) puis on incube toute la nuit à 30°C. Le type sexuel des souches « X » est déterminé en comparant les résultats obtenus avec ceux des souches BY4741 et BY4742 dont les types sexuels sont connus.

2.9 Détermination du génotype

La détermination du génotype des doubles mutants se fait simplement par la mise en culture de ces derniers sur différents milieux sélectifs permettant de déterminer leurs différentes auxotrophies. Les différents milieux sélectifs sont choisis d'après les auxotrophies présentes dans les souches parentales utilisées pour la création des doubles mutants. On utilise un milieu minimal SD ne contenant pas l'acide aminé pour lequel on veut tester l'auxotrophie. Les boîtes sont incubées toute la nuit à 30°C. L'auxotrophie pour un acide aminé est déterminée simplement en observant s'il y a absence de croissance sur ces différents milieux de sélection.

2.10 Test de croissance

La sensibilité à la caféine est vérifiée par des tests de croissance sur un milieu auquel on ajoute de la caféine à une concentration de 1,25 mg/ml tandis que la croissance des cellules est vérifiée simplement en incubant les souches à 30°C et à 37°C. On doit tout d'abord effectuer un décompte cellulaire afin de faire un premier dépôt de 1×10^5 cellules suivi du dépôt de trois dilutions successives de 1 :10 (1 :10; 1 :100 et 1 :1000). Les boîtes sont incubées à 30°C et à

37°C pendant 48 heures. On compare ensuite la croissance des souches testées par rapport à la croissance de la souche sauvage.

2.11 Coloration et microscopie

2.11.1 Coloration de l'actine filamenteuse (actine-F)

L'observation du cytosquelette d'actine est possible grâce à la phalloïdine, une toxine fongique provenant d'*Amanita phalloides* qui a la propriété de se fixer spécifiquement à l'actine filamenteuse. Couplée à un fluorochrome, elle permet d'observer l'organisation de l'actine-F durant le cycle cellulaire à l'aide d'un microscope à fluorescence. La coloration s'effectue sur une culture en phase exponentielle de croissance. Les cellules sont incubées à 30°C ou à 37°C jusqu'à l'obtention d'une culture en phase exponentielle de croissance. Elles sont ensuite fixées pendant 30 minutes à température ambiante par l'ajout de formaldéhyde à une concentration finale de 3,7%. Les cellules sont lavées avec du PBS (NaCl à 0,8%; KCl à 0,02%; Na₂HPO₄ à 0,15%; KH₂PO₄ à 0,024%; pH 7,4 ajusté avec HCl) puis colorées avec 0,3 µM de phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR). La coloration se fait dans l'obscurité à température ambiante pendant une heure. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS puis montées sur une lame pour l'observation au microscope à fluorescence à l'aide d'un objectif 100X. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de l'AlexaFluor 488 sont de 495 nm et 519 nm respectivement. Le filtre utilisé pour la microscopie en fluorescence est le filtre I3 de la compagnie Leica (Zakrzewska et al., 2003).

2.11.2 Coloration des cicatrices de bourgeonnement (chitine)

Plusieurs mutations ont pour effet de provoquer des patrons de bourgeonnement anormaux. Pour observer ces différents patrons de bourgeonnement, on utilise le Calcofluor White, un colorant fluorescent hautement spécifique aux structures riches en chitine telles les cicatrices de bourgeonnement. Cette coloration s'effectue sur une culture en phase stationnaire. Les cellules provenant d'une culture de nuit sont fixées avec de la formaldéhyde à une concentration finale de 3,7% pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite centrifugées et le culot est repris dans 1 ml de solution A (K₂HPO₄ à 6,25 mM, KH₂PO₄ à 13,75 mM; MgCl₂ à 0,5 mM) contenant de la formaldéhyde à 3,7% puis on laisse reposer une heure à la température ambiante. Les cellules sont lavées trois fois avec 1 ml de la

solution A puis reprises dans un volume final de 1 ml de solution A. On prélève 200 μ l de la suspension cellulaires auxquelles on ajoute $\frac{1}{10}$ de volume de Calcofluor White 10 mg/ml (SIGMA). L'incubation se fait à température ambiante dans l'obscurité pendant 30 minutes. Les cellules sont lavées 3 à 5 fois avec du PBS puis le culot est repris dans 50 à 100 μ l de milieu de montage (glycérol 90%; PBS 10%). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du Calcofluor White sont de 395 η m et 440 η m respectivement. L'observation se fait au microscope à fluorescence à l'aide du filtre D de la compagnie Leica et de l'objectif 100X (Marcoux et al., 2000).

2.11.3 Essai d'endocytose par l'internalisation du Lucifer Yellow

Le Lucifer Yellow (LY) est une petite molécule fluorescente chargée négativement et hautement soluble ce qui rend improbable sa diffusion à travers la membrane plasmique. Cette molécule s'accumule de façon non saturable dans la vacuole ce qui permet de vérifier s'il y a un défaut dans le mécanisme d'endocytose (Wiederkehr et al., 2001). L'accumulation du LY dans la vacuole dépend de la durée d'incubation, de la température et de l'énergie disponible (Riezman, 1993). Les cellules sont incubées toute la nuit à 30°C avec agitation dans 3 ml de milieu YPD ou minimal sélectif pour les souches portant un plasmide. On prélève ensuite 100 μ l de la culture de nuit pour inoculer 3 ml de milieu frais YPUAD (extrait de levure à 1%; peptone à 2%; glucose à 2%; adénine et uracile à 40 μ g/ml). L'incubation se fait à 30°C ou à 37°C avec agitation jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} de 0,2 à 0,5 puis on centrifuge 1 ml de cette culture. Le surnageant est décanté puis le culot est repris dans 90 μ l de milieu frais YPUAD. On ajoute ensuite 10 μ l de LY à 40 mg/ml (LY CH dilithium salt, SIGMA). On incube à 30° ou à 37°C pendant 90 minutes dans l'obscurité avec agitation. La réaction est arrêtée par l'ajout de 900 μ l de tampon ICE-COLD (succinate de sodium à 50 mM, pH 5,0; NaN_3 à 20 mM). Les cellules sont lavées 5 fois avec le tampon ICE-COLD. On reprend finalement le culot dans 10 à 30 μ l de tampon ICE-COLD puis on monte une lame pour l'observation au microscope à fluorescence sous le filtre I3 de la compagnie Leica et à l'aide d'un objectif 100X. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du LY sont de 428 η m et 536 η m respectivement. Pour appuyer les résultats des observations de la fluorescence, les photos sont prises en duplicata mais en utilisant cette fois le contraste interférentiel de Nomarski ce qui permet de bien visualiser la vacuole (Dulic et al., 1991).

2.11.4 Observation en contraste interférentiel (Nomarski)

L'observation de la morphologie cellulaire ou des variations morphologiques provoquées par la surexpression de *SYPI* est réalisée en contraste interférentiel de Nomarski. Il suffit simplement de préparer une lame à partir d'une culture en phase exponentielle puis d'observer directement à l'aide d'un microscope équipé pour la visualisation en Nomarski sous un objectif 100X.

2.11.5 Observation de la GFP (Green fluorescent protein)

L'observation de la localisation cellulaire à l'aide de la GFP se fait de la même manière qu'en Nomarski, c'est-à-dire à partir d'une culture en phase exponentielle directement montée sur une lame. L'observation se fait à l'aide de l'objectif 100X. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de la GFP-S65G-S72A sont de 490 nm et 509 nm respectivement. Cette forme de la GFP possède deux substitutions : le codon sérine 65 est substitué pour une glycine et le codon sérine 72 est substitué pour une alanine. Ces modifications sont nécessaires pour l'expression de la GFP chez la levure. Elles ont pour effet de décaler le pic d'excitation à 490 nm et d'augmenter l'intensité de la fluorescence (Cormack et al., 1997). Le filtre utilisé pour la visualisation de la GFP est le filtre I3 de la compagnie Leica.

Chapitre 3 **RÉSULTATS**

3.1 La surexpression de *SYP1*

3.1.1 La surexpression de *SYP1* corrige le phénotype associé à la délétion du gène de la profiline

La délétion du gène de la profiline (*PFY1*) n'est pas létale pour la cellule mais entraîne de profondes modifications dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Les cellules déficientes en profiline sont en effet très grosses et rondes et leur cytosquelette d'actine est complètement désorganisé. Les câbles d'actine ne sont plus visibles et les granules corticaux sont dépolarisés; ils sont maintenant répartis à la fois dans la cellule mère et dans le bourgeon. Les cellules présentent également un défaut dans la maturation et la sécrétion du facteur α , elles sont sensibles à la pression osmotique et le patron de bourgeonnement est aléatoire. Enfin, la croissance est ralentie à la température permissive (30°C) et aucune croissance n'est possible à 37°C ou sur un milieu contenant de la caféine (Haarer et al., 1990; Marcoux et al., 1998). Un criblage génétique effectué sur une souche déficiente en profiline, *pfy1Δ*, a permis d'identifier *SYP1* en tant que suppresseur multicopies de la délétion de la profiline (Marcoux et al., 2000). La surexpression de *SYP1* dans la souche *pfy1Δ* permettait de corriger le patron de bourgeonnement aléatoire et la croissance en plus de repolariser les granules corticaux dans le bourgeon et diminuer la taille des cellules. Toutefois, elle ne permettait pas l'apparition de câbles d'actine visibles dans cette souche (Figure 14) (Marcoux et al., 2000).

La recherche de suppresseurs s'est faite à l'aide d'une banque d'ADN génomique préparée dans le plasmide YEp24, capable d'intégrer de très gros fragments d'ADN. Pour faciliter la poursuite de l'étude de ce nouveau gène, *SYP1* a été cloné avec son promoteur dans le plasmide multicopie pRS426 créant le plasmide pEML02. La souche *pfy1Δ* a été transformée avec ce plasmide simplement pour vérifier l'expression de *SYP1*. Toutefois, la surexpression de *SYP1* dans la souche *pfy1Δ* à l'aide de pEML02 ne présente plus les mêmes caractéristiques que celles obtenues précédemment avec le plasmide YEp24. La surexpression de *SYP1* à l'aide de pEML02 permet maintenant l'apparition de câbles d'actine visibles en plus de repolariser les granules corticaux (Figure 15). La croissance à 37°C et sur un milieu contenant de la caféine est également corrigée (Figure 16).

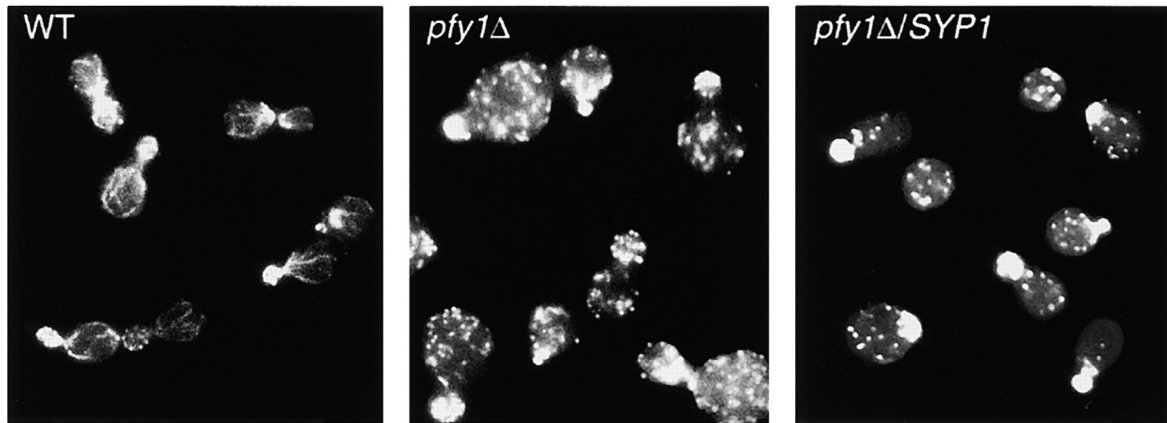


Figure 14 : Identification de *SYP1* en tant que suppresseur de la délétion de la profiline.

Les cellules ont été fixées en phase exponentielle de croissance avec la formaldéhyde à 3,7% puis colorées avec la phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor 488 afin d'observer les structures d'actine filamenteuse. Au moment de l'identification de *SYP1*, la surexpression de ce gène dans la souche *pfy1Δ* permettait de diminuer la taille des cellules et de repolariser les granules corticaux mais ne permettait pas l'apparition de câbles d'actine visibles. Le plasmide YEp24 était utilisé pour la surexpression de *SYP1*. La photo est tirée de Marcoux et al. (2000).

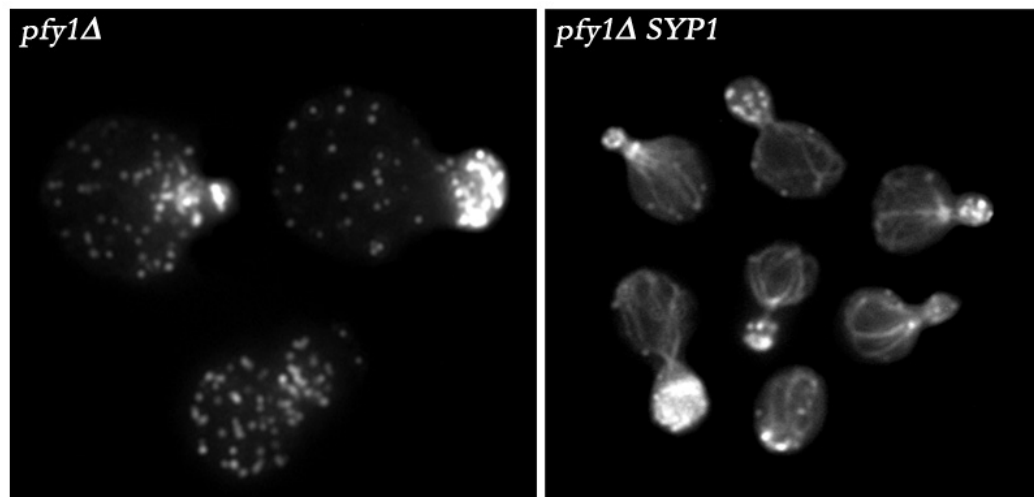


Figure 15 : La surexpression de *SYP1* par pEML02 dans la souche *pfy1Δ* à 30°C.

Les cellules ont été fixées en phase exponentielle de croissance avec la formaldéhyde à 3,7% et colorées avec la phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor 488 afin d'observer les structures d'actine filamenteuse. La surexpression de *SYP1*, par le plasmide pEML02, corrige le phénotype associé à la délétion de la profiline (*pfy1Δ*). Les cellules sont plus petites, les granules corticaux sont polarisés dans le bourgeon et il y a apparition de câbles d'actine visibles.

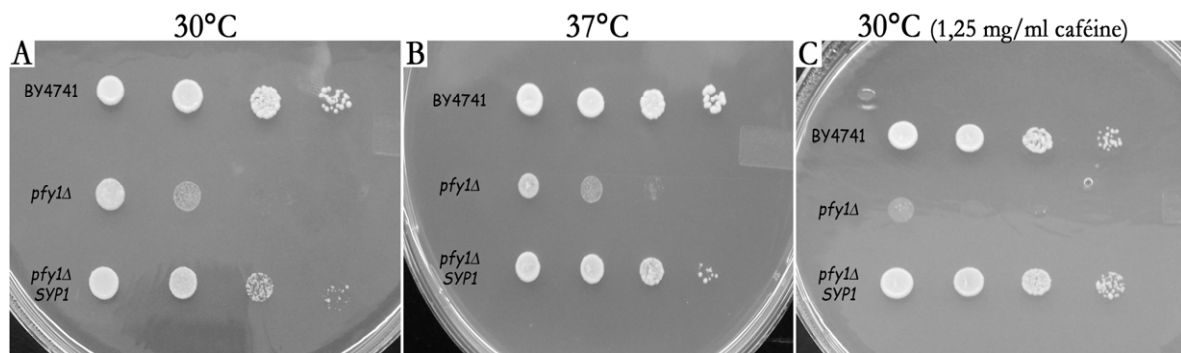


Figure 16 : Correction de la croissance de la souche *pfy1Δ* par la surexpression de *SYP1*.

Un total de $1,0 \times 10^5$ cellules suivi de trois dilutions en série de 1 : 10 sont déposées sur un milieu minimal SD sans uracile. Les boîtes sont incubées pendant 48 heures à 30°C ou à 37°C. La croissance de la souche *pfy1Δ*, surexprimant *SYP1* ou non, est comparée à celle de la souche sauvage BY4741. (A) À 30°C, la croissance de la souche *pfy1Δ* est ralentie. La surexpression de *SYP1* par le plasmide pEML02 permet d'améliorer la croissance. (B) À 37°C, la surexpression de *SYP1* par pEML02 restaure parfaitement la croissance de la souche *pfy1Δ* par rapport à la souche sauvage BY4741. (C) La souche déficiente en profiline est sensible à la caféine. La surexpression de *SYP1* par pEML02 corrige la sensibilité à la caféine et restaure la croissance.

3.1.1.1 *SYP1* agit par la voie de signalisation de *RHO2* pour repolariser le cytosquelette d'actine

À la suite de l'obtention de ces résultats inattendus de la surexpression de *SYP1* dans la souche déficiente en profiline, le phénotype de la surexpression de *SYP1* par le nouveau plasmide pEML02 dans le double mutant *pfy1-111 rho2Δ* a été vérifié afin de confirmer ou infirmer les résultats obtenus précédemment. La surexpression de *SYP1* dans la souche *pfy1-111 rho2Δ* à l'aide du plasmide YEp24 ne permet pas de corriger le phénotype du double mutant ni l'apparition de câbles d'actine visibles (Marcoux et al., 2000). Ces résultats ont alors mené à la conclusion que *SYP1* agit par la voie de signalisation de *RHO2* pour repolariser le cytosquelette d'actine de la souche *pfy1Δ* (Marcoux et al., 2000). L'analyse de l'organisation du cytosquelette d'actine du double mutant *pfy1-111 rho2Δ* surexprimant *SYP1* à l'aide du plasmide pEML02 confirme les résultats obtenus précédemment, c'est-à-dire aucune correction de l'organisation du cytosquelette d'actine et aucun changement phénotypique (données non montrées). Ces résultats confirment la conclusion émise précédemment voulant que *SYP1* agit via la voie de signalisation de *RHO2* pour repolariser le cytosquelette d'actine et la formation de câbles d'actine visibles dans la souche déficiente en profiline.

3.1.1.2 La formation de câbles d'actine par la surexpression de *SYP1* requiert la présence des formines Bni1p et Bnr1p.

La formation des câbles d'actine est régulée essentiellement par les formines Bni1p et Bnr1p. Le double mutant *bni1-FH2#1 bnr1Δ* (PY3517) porte une mutation thermosensible de l'allèle *BNI1* et une délétion complète du gène *BNR1*. Ces cellules ont un cytosquelette d'actine normal à 25°C mais lorsque mises à 30°C il n'y a plus de câbles d'actine visibles et les granules corticaux sont partiellement dépolarisés. À 37°C aucune croissance n'est possible (Evangelista et al., 2003; Zakrzewska et al., 2003). Nous avons vérifié si la formation des câbles d'actine par la surexpression de *SYP1* dans la souche déficiente en profiline était dépendante de la présence des formines en surexprimant *SYP1* dans la souche *bni1-FH2#1 bnr1Δ* (PY3517). Les cellules ont été mises en culture à 30°C ainsi qu'à 37°C pour vérifier s'il y avait apparition de câbles d'actine visibles et correction du défaut de la croissance. La surexpression de *SYP1* par le plasmide pEML02 n'a pas permis de restaurer la croissance à 37°C (données non montrées) et n'a eu aucun effet sur l'organisation du cytosquelette d'actine (Figure 17). Aucun câble d'actine

n'est visible dans les cellules et les granules corticaux sont toujours partiellement dépolarisés. Donc, la formation de câbles d'actine par la surexpression de *SYP1* est dépendante de la présence des formines Bni1p et Bnr1p.

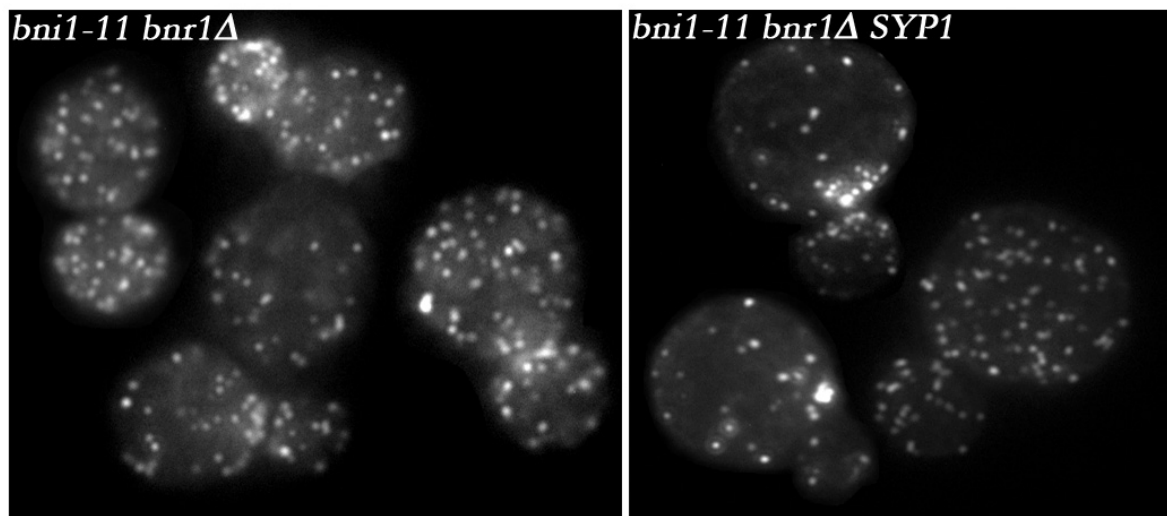


Figure 17 : La formation de câbles d'actine par la surexpression de *SYP1* est dépendante des formines Bni1p et Bnr1p.

Les cellules ont été fixées en phase exponentielle de croissance avec la formaldéhyde à 3,7% et colorées avec la phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor 488 afin d'observer les structures d'actine filamenteuse. Le double mutant *bni1-FH2#1 bnr1Δ* ne présente aucun câble d'actine et les granules corticaux sont dépolarisés à 30°C. La surexpression de *SYP1* dans cette souche, par le plasmide pEML02, ne permet pas l'apparition de câbles d'actine visibles ce qui indique que la formation des câbles d'actine par la surexpression de *SYP1* est dépendante des formines.

3.1.1.3 La surexpression de *SYP1* et le cytosquelette d'actine dans les souches mutantes

Le gène *SYP1* a été identifié initialement en tant que suppresseur multicopies de la délétion de la profiline ce qui a mené à l'hypothèse qu'il pouvait jouer un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris l'étude de la surexpression de *SYP1* dans plusieurs souches mutantes à l'aide du plasmide pEML02 afin d'observer l'effet de la surexpression de *SYP1* sur l'organisation du cytosquelette d'actine. Les souches utilisées portent des délétions sur des gènes impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine (*bem2Δ*, *rho4Δ*, *rom2Δ*, *spa2Δ*), de l'endocytose (*ede1Δ*, *end3Δ*, *las17Δ*, *myo3Δ*, *myo5Δ*, *sac6Δ*, *sla1Δ*, *sla2Δ*, *vrp1Δ*), du bourgeonnement (*bud3Δ*, *bud4Δ*, *bud6Δ*, *bud8Δ*),

de la division cellulaire (*cdc10Δ*, *cdc12-6*, *cla4Δ*, *chs3Δ*, *chs4Δ*) ou d'autres gènes reliés plus ou moins directement à toutes ces fonctions cellulaires (*chs1Δ*, *chs5Δ*, *chs6Δ*, *chs7Δ*, *mid2Δ*, *smv1Δ*, *ydr348cΔ*). L'analyse de l'organisation du cytosquelette d'actine avant et après surexpression de *SYP1* a été faite à 30°C et à 37°C. Aucune correction de l'organisation du cytosquelette d'actine n'a été observée parmi toutes les souches étudiées, pas plus que l'aggravation d'un phénotype par la surexpression de *SYP1*. Toutefois, nous avons remarqué que la surexpression de *SYP1* provoque un ralentissement important de la croissance de quelques souches : *bni1Δ*, *cdc10Δ*, *chs5Δ*, *cla4Δ*, *end3Δ* et *sla2Δ*. Le ralentissement de la croissance a été comparé avec celui provoqué par la surexpression de *SYP1* dans la souche sauvage. Ce phénomène a été confirmé par un décompte cellulaire des cellules en phase G₀, des cellules en cours de division cellulaire (possédant un bourgeon en croissance) ainsi que dans quelques cas, des cellules ayant un problème de division cellulaire (plusieurs bourgeons ou pas de division). Un minimum de trois cent cellules ont été comptées et les résultats sont présentés sous forme de pourcentage dans le Tableau 7.

3.1.2 La surexpression de *SYP1* corrige le bourgeonnement aléatoire de *arf3Δ*

Les cellules haploïdes présentent un patron de bourgeonnement axial, c'est-à-dire que le bourgeonnement se fait toujours à côté du site précédent. La délétion du gène *ARF3* provoque l'apparition d'un patron de bourgeonnement aléatoire. Dans ce cas, le bourgeonnement se fait tout autour de la cellule de manière aléatoire et les cicatrices de bourgeonnement ne se touchent plus. Le pourcentage de cellules qui présentent un patron de bourgeonnement aléatoire à 30°C est de 40% et passe à 90% lorsqu'on incube les cellules à 37°C (Figure 18). Dans le cadre de l'étude du gène *ARF3* (en cours au laboratoire, Alexandra Lambert), *SYP1* a été surexprimé dans la souche *arf3Δ* afin d'observer l'effet de la surexpression sur le patron de bourgeonnement de cette souche. La surexpression de *SYP1* corrige partiellement le bourgeonnement aléatoire de la souche *arf3Δ* ce qui permet de recouvrer un patron de bourgeonnement axial. En effet, les cellules incubées à 30°C retrouvent à 90% un patron de bourgeonnement axial comparativement à seulement 45% des cellules lorsqu'elles sont incubées à 37°C (Alexandra Lambert, résultats non publiés) (Figure 18).

	T°C	Souches dont la croissance est ralentie par la surexpression de <i>SYP1</i>													
		Pourcentage des cellules comptées à 30°C et à 37°C (%)													
		BY4741	BY4741 <i>SYP1</i>	<i>bni1</i> Δ	<i>bni1</i> Δ <i>SYP1</i>	<i>cdc10</i> Δ	<i>cdc10</i> Δ <i>SYP1</i>	<i>chs5</i> Δ	<i>chs5</i> Δ <i>SYP1</i>	<i>cla4</i> Δ	<i>cla4</i> Δ <i>SYP1</i>	<i>end3</i> Δ	<i>end3</i> Δ <i>SYP1</i>	<i>sla2</i> Δ	<i>sla2</i> Δ <i>SYP1</i>
Cellules en G0	30	30	54	27	42	50	49	37	49	28	55	32	52	36	51
	37	36	53	29	43	48	80	40	62	34	58	40	58	37	61
Cellules en division	30	70	46	73	58	49	48	63	51	67	45	68	48	64	49
	37	64	47	68	50	17	7	60	38	55	42	50	42	63	39
Cellules anormales	30	0	0	0	0	1	3	0	0	5	0	0	0	0	0
	37	0	0	3	7	35	13	0	0	11	0	0	0	0	0

Tableau 7 : Résultats des décomptes cellulaires des souches dont la croissance est ralentie par la surexpression de *SYP1* (pEML02).

Pour chaque décompte cellulaire un minimum de 300 cellules d'une culture en phase exponentielle de croissance ont été comptées. Les cellules en G0 sont celles sans bourgeon, les cellules en division sont celles possédant un bourgeon en croissance et les cellules anormales sont celles ayant plus d'un bourgeon ou encore des cellules ayant des problèmes de division cellulaire. Des duplicata ont été faits pour s'assurer de la validité des résultats des décomptes et chaque fois les décomptes étaient reproductibles. BY4741 était la souche sauvage de référence pour l'établissement du verdict de ralentissement de la croissance par la surexpression de *SYP1*.

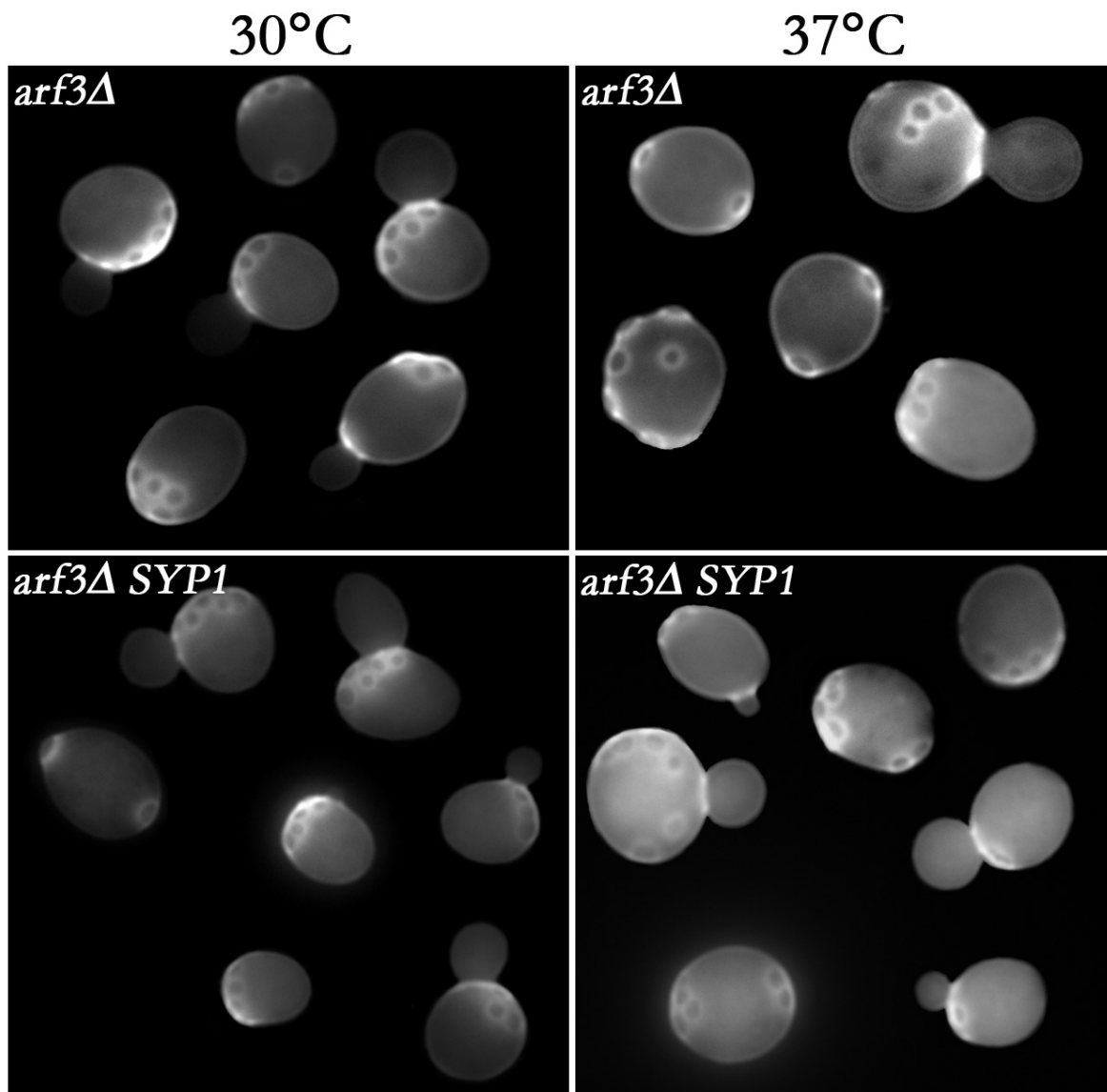


Figure 18 : Correction partielle du bourgeonnement aléatoire de *arf3Δ* par la surexpression de *SYP1*.

La délétion du gène *ARF3* entraîne l'apparition d'un patron de bourgeonnement aléatoire dans une proportion de 40% à 30°C et de 90% à 37°C. La surexpression de *SYP1* par le plasmide pEML02 dans la souche *arf3Δ* corrige partiellement ce patron de bourgeonnement aléatoire. Les cellules *arf3Δ* qui surexpriment *SYP1* présentent un patron de bourgeonnement aléatoire dans une proportion de seulement 10% à 30°C et de 55% à 37°C (Alexandra Lambert, résultats non publiés).

3.1.3 La surexpression de *SYP1* corrige le défaut d'endocytose de *ede1Δ*, *sac6Δ* et de *sla1Δ*

La protéine Syp1p est retrouvée dans plusieurs complexes protéiques impliquant des régulateurs de l'endocytose tels que Sla1p, Sla2p, Ede1p, Las17p et Inp52p (Tableau 1) (Gavin et al., 2002; Puig et al., 2001). D'après ces informations, nous avons émis l'hypothèse que *SYP1* pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'endocytose et lancé une étude afin de vérifier cette hypothèse. Le gène *SYP1* a été surexprimé dans plusieurs souches portant une délétion d'un gène impliqué dans la régulation de l'endocytose (*arf3Δ*, *ark1Δ*, *ede1Δ*, *end3Δ*, *ent1Δ*, *ent2Δ*, *ent3Δ*, *ent4Δ*, *inp52Δ*, *inp53Δ*, *prk1Δ*, *rvs161Δ*, *rvs167Δ*, *sla1Δ*, *sla2Δ*, *vrp1Δ*, Y1392 (*myo3Δmyo5Δ*)).

L'absence d'un régulateur de l'endocytose n'entraîne pas automatiquement l'interruption complète de l'endocytose dans ces cellules mais plutôt un défaut qui peut être quantifié dans une population de cellule à l'aide du marqueur fluorescent Lucifer Yellow (LY). Le défaut d'endocytose de chacune des souches mutantes étudiées a été établi en comparant le nombre de cellules dont l'internalisation du marqueur fluorescent est normale avec le nombre de cellules qui ne présentent pas d'internalisation du marqueur dans une population en croissance. Parmi toutes les souches étudiées, la surexpression de *SYP1* permet de corriger le défaut d'endocytose de trois souches seulement : *ede1Δ*, *sac6Δ* et *sla1Δ*. Ces trois souches présentent un pourcentage de cellules incapables d'internaliser le LY de 80%, 40% et 30% respectivement. La surexpression de *SYP1* dans la souche *sla1Δ* permet de corriger parfaitement le défaut d'endocytose lorsque l'on compare à la souche sauvage. En effet, le pourcentage des cellules *sla1Δ SYP1* incapables d'internaliser le LY passe de 30% à seulement 3%. Dans le cas de la surexpression de *SYP1* dans la souche *ede1Δ*, la correction n'est pas totale. Toutefois, le pourcentage de cellules qui présentent un défaut d'internalisation du LY passe tout de même de 80% à 20%, c'est donc une amélioration de 4 fois (Figure 19). Dans la souche *sac6Δ*, la correction est plus difficile à observer mais elle est tout de même notable, puisque le pourcentage passe de 41% à 14% de cellules incapables d'internaliser le LY. Étant donné que la correction des souches *sla1Δ* et *sac6Δ* est observable uniquement en procédant à un décompte cellulaire, aucune image ne peut réellement représenter cette correction. Ainsi, les résultats sont présentés sous forme de pourcentage dans le Tableau 8.

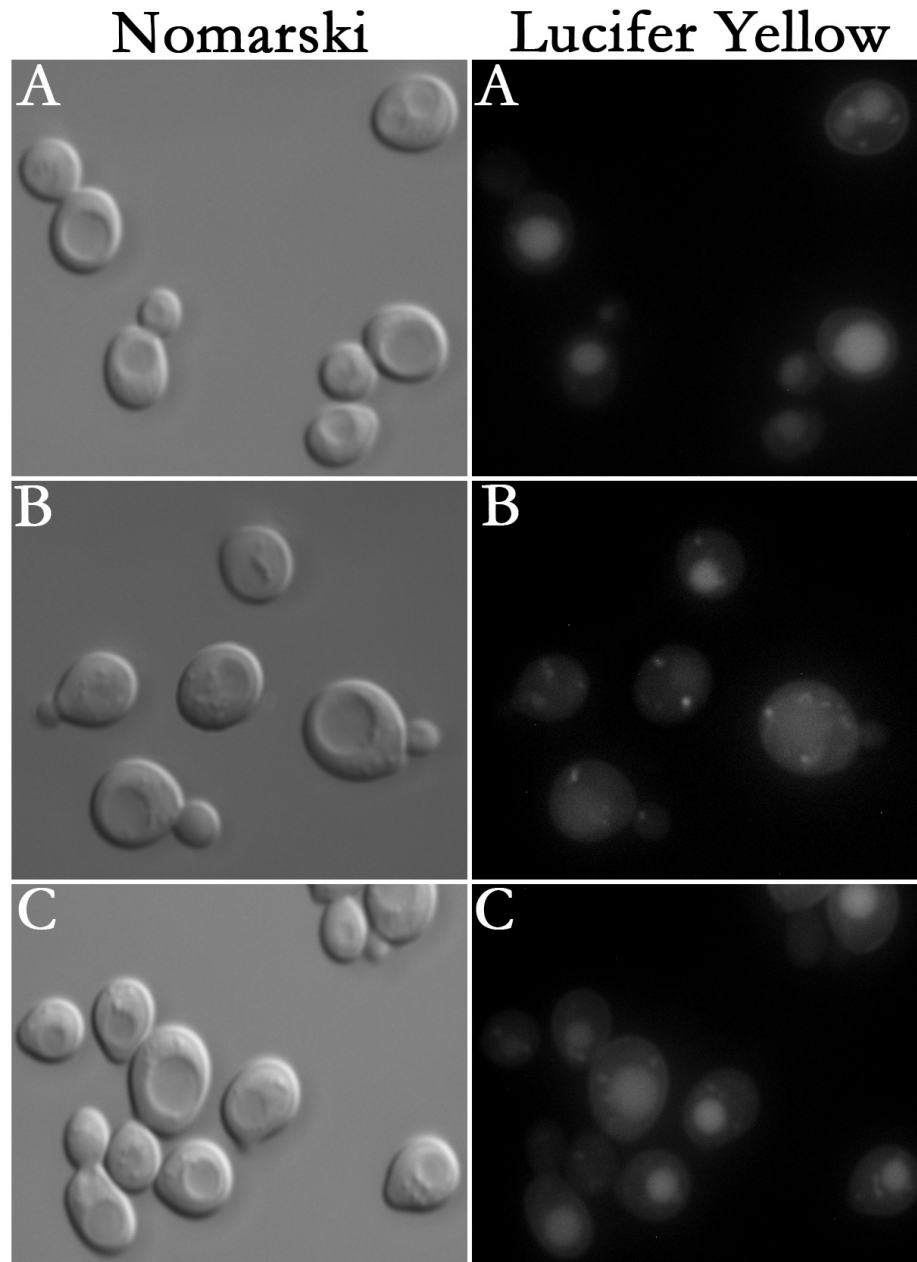


Figure 19 : La surexpression de *SYP1* par pEML02 corrige le défaut d'endocytose de la souche *ede1Δ*.

L'essai d'endocytose est réalisé sur une culture en phase exponentielle de croissance mise en présence de LY à 4 mg/ml pour une période de 90 minutes. Les photos sont prises en duplicata soit en contraste interférentiel de Nomarski et en fluorescence pour observer l'internalisation du LY dans la vacuole. (A) L'internalisation du LY dans la souche sauvage présentée à titre de référence. (B) La souche *ede1Δ* présente un défaut d'internalisation du LY dans la vacuole. (C) Correction de l'endocytose par la surexpression de *SYP1* (pEML02) dans la souche *ede1Δ*.

Souches	Internalisation du Lucifer Yellow
<i>ede1Δ</i>	20%
<i>ede1Δ SYP1</i>	80%
<i>sac6Δ</i>	59%
<i>sac6Δ SYP1</i>	86%
<i>sla1Δ</i>	70%
<i>sla1Δ SYP1</i>	97%

Tableau 8 : La surexpression de *SYP1* (pEML02) corrige partiellement le défaut d'endocytose des souches *ede1Δ*, *sac6Δ* et *sla1Δ*.

L'essai d'endocytose est réalisé avec 1ml d'une culture en phase exponentielle de croissance. Les cellules sont mises en présence de LY à 4 mg/ml et incubées à 30°C avec agitation pendant 90 minutes. Les cellules sont ensuite lavées cinq fois avec le tampon ICE COLD pour arrêter la réaction et éliminer l'excès de colorant. L'observation de la vacuole est faite au microscope à fluorescence sous le filtre I3 de la compagnie Leica.

3.1.3.1 Correction du défaut d'endocytose dans la souche *pfy1Δ*

Étant donné que la surexpression de *SYP1* dans la souche déficiente en profiline (*pfy1Δ*) restaure la croissance et la formation de câbles d'actine nous avons vérifié ce qui en était de l'endocytose dans cette souche également. L'essai d'endocytose avec le LY a montré que l'absence de profiline affectait de façon très importante le mécanisme d'endocytose puisque la presque totalité des cellules ne présente aucune internalisation du marqueur fluorescent dans la vacuole (Figure 20). La surexpression de *SYP1* dans la souche déficiente en profiline, en plus de corriger le défaut de l'organisation du cytosquelette, corrige également le défaut d'endocytose (Figure 20).

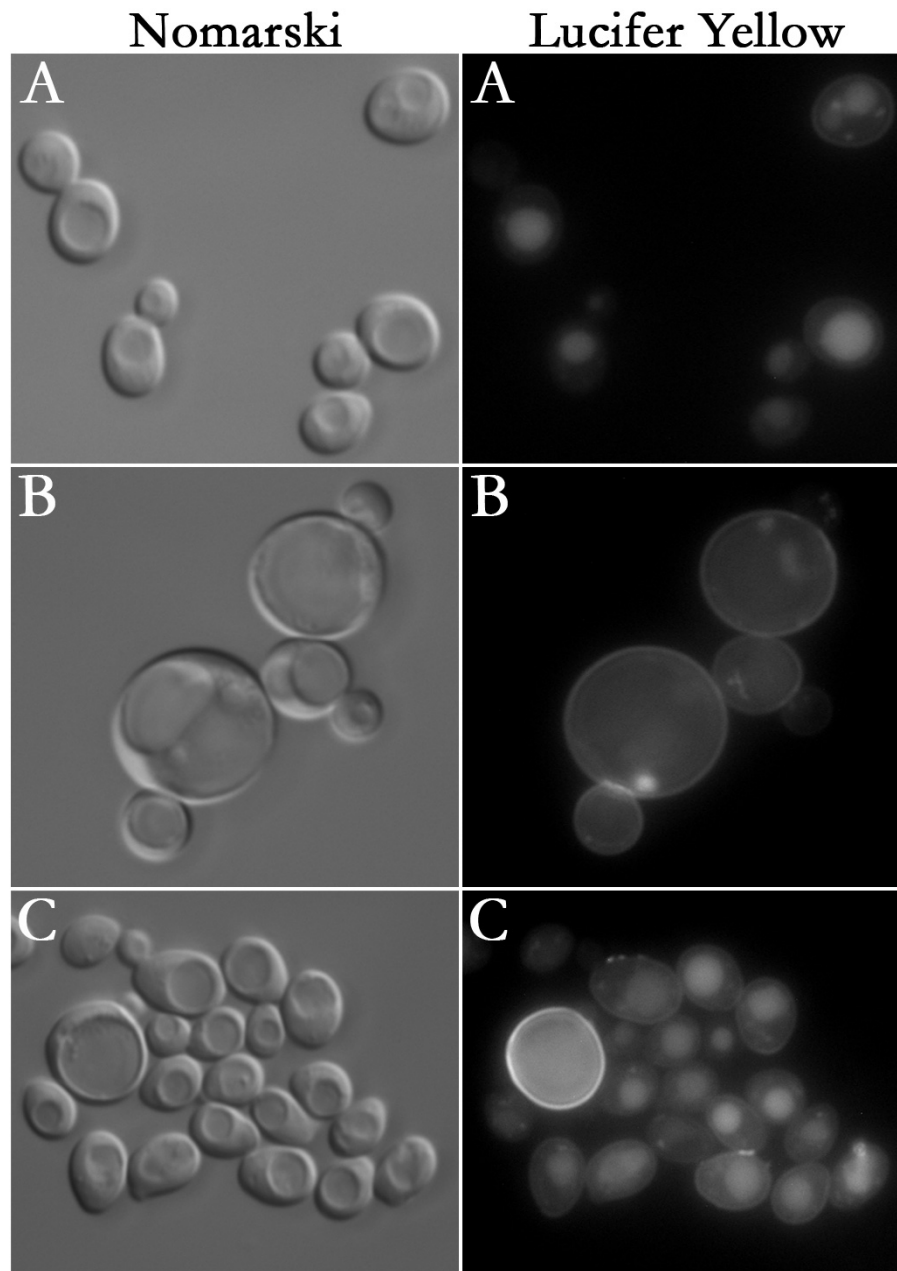


Figure 20 : Correction du défaut d'endocytose de la souche *pff1Δ* par la surexpression de *SYP1*.

L'essai d'endocytose est réalisé sur une culture en phase exponentielle de croissance mise en présence de LY à 4 mg/ml pour une période de 90 minutes. Les photos sont prises en duplicata soit en contraste interférentiel de Nomarski et à l'aide de la fluorescence pour observer l'internalisation du LY dans la vacuole. (A) L'internalisation du LY dans la souche sauvage présentée à titre de référence. (B) Aucune internalisation n'est observée dans la souche *pff1Δ*. (C) La surexpression de *SYP1* (pEML02) dans la souche *pff1Δ* corrige le défaut d'endocytose.

3.2 Localisation cellulaire de Syp1p

Au moment de la découverte de Syp1p, aucune information pertinente n'était disponible à propos de cette protéine. La mise en évidence de sa localisation cellulaire à l'aide de la GFP (green fluorescent protein) s'avérait donc une avenue intéressante pour tenter de déterminer sa fonction cellulaire. La protéine de fusion Syp1p-GFP a été construite et clonée dans le plasmide pRS426 pour surexprimer et observer la localisation cellulaire de Syp1p dans la souche sauvage (Cloutier, 2000). La localisation cellulaire de la protéine Syp1p a été déterminée par l'observation en microscopie à fluorescence d'une culture en phase exponentielle de croissance surexprimant la protéine de fusion Syp1p-GFP à partir du plasmide multicopie pRS426 (pSGM). Les cellules sans bourgeon ou en phase stationnaire de croissance présentent une coloration diffuse dans la cellule en plus de présenter une localisation de Syp1p en périphérie de la cellule. Tout au long de la croissance du bourgeon, la localisation de Syp1p varie selon le stade du bourgeonnement. La localisation en périphérie est conservée mais la protéine se concentre à la base du bourgeon et dans le bourgeon tout au long de la croissance de ce dernier. Au moment de la division cellulaire, Syp1p est localisée au septum (Cloutier, 2000; Marcoux et al., 2000; Zakrzewska, 2005) (Figure 21-A).

3.2.1 Localisation cellulaire de Syp1p dans les souches mutantes

L'étude de la localisation cellulaire de Syp1p s'est poursuivie dans de nombreuses souches portant une délétion génique afin de repérer une ou plusieurs délocalisation de la protéine. Une délocalisation de la protéine permettrait d'identifier des partenaires protéiques potentiels de Syp1p ou à tout le moins des protéines essentielles à la localisation cellulaire de Syp1p et possiblement associer une fonction cellulaire à la protéine. Toutes les souches présentées au Tableau 3 ont été transformées avec pSGM afin d'identifier une délocalisation de la protéine Syp1p, ce qui représente un total de 61 souches différentes. Le choix des délétions géniques utilisées pour l'étude de la délocalisation s'est fait selon les hypothèses émises sur le rôle possible de la protéine Syp1p, c'est-à-dire dans la division cellulaire, dans l'endocytose et dans la régulation du cytosquelette d'actine ou tout simplement à partir de protéines ayant une localisation similaire à Syp1p. Les résultats obtenus montrent que dans 56 des 61 souches étudiées la protéine Syp1p est bien localisée, c'est-à-dire que la localisation est la même que celle observée dans la souche sauvage, BY4741 (résultats non montrés).

3.2.1.1 Délocalisation de la protéine Syp1p dans les mutants *bni1Δ*, *chs1Δ*, *cdc10Δ*, *cla4Δ* et *cdc12-6*.

L'étude de la localisation cellulaire de Syp1p a permis d'identifier cinq partenaires protéiques potentiels puisque les résultats montrent cinq cas de délocalisation de la protéine Syp1p. En effet, dans les mutants *bni1Δ*, *chs1Δ*, *cdc10Δ*, *cla4Δ* et *cdc12-6*, la protéine présente un défaut dans sa localisation cellulaire à la fois à 30°C et à 37°C. Dans les mutants *chs1Δ* et *bni1Δ*, la délocalisation de Syp1p s'observe par l'absence de fluorescence ou par une coloration diffuse dans le cytoplasme respectivement (Figure 21-B et C). Dans les mutants *cla4Δ* et *cdc10Δ*, la délocalisation s'observe principalement dans les cellules en phase avancée du bourgeonnement. En effet, au moment où Syp1p est normalement localisée au septum, aucune fluorescence n'est observée à cet endroit dans ces deux mutants (Figure 21-E et F). La mutation *cdc12-6* est thermosensible, donc le phénotype associé à cette mutation s'exprime seulement à des températures non permissives. La température non permissive de cette mutation est 30°C. Ainsi, à 25°C la protéine ne présente aucun défaut de localisation cellulaire puisque la mutation n'est pas exprimée (données non montrées). Lorsqu'on incube cette souche à 30°C, elle présente alors un défaut de division cellulaire qui entraîne une délocalisation de la protéine Syp1p (Figure 21-D). Dans tous les cas, sauf dans les mutants *bni1Δ* et *chs1Δ*, la localisation ponctuelle de Syp1p en périphérie de la cellule est conservée.

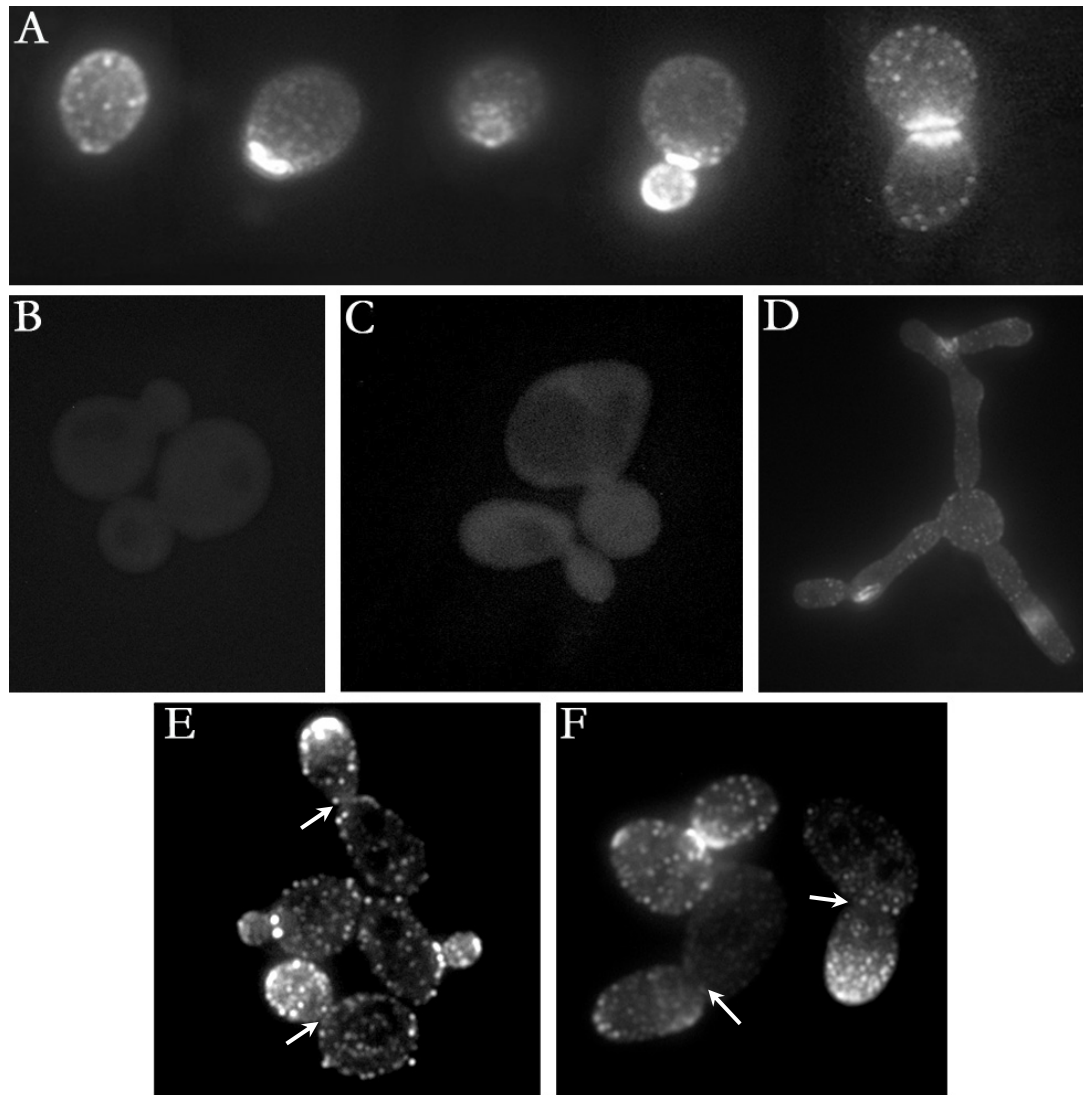


Figure 21 : Localisation cellulaire de la protéine Syp1p-GFP.

La protéine de fusion Syp1p-GFP est surexprimée à partir du plasmide pSGM. (A) Localisation cellulaire de la protéine Syp1p-GFP au cours des différentes étapes du cycle cellulaire dans la souche sauvage BY4741 à 30°C (photo tirée de Zakrzewska (2005)). (B) et (C) Délocalisation de la protéine Syp1p dans les mutants *chs1Δ* et *bni1Δ* respectivement. La délocalisation se caractérise par une absence de fluorescence dans *chs1Δ* tandis que dans *bni1Δ* on observe plutôt une coloration diffuse dans le cytoplasme et dans le bourgeon. (D-F) Délocalisation de la protéine Syp1p dans les mutants *cdc12-6*, *cdc10Δ* et *cla4Δ* respectivement. Dans ces trois souches, la délocalisation se caractérise par l'absence de Syp1p au septum. En D, (*cdc12-6*) la protéine conserve uniquement sa localisation ponctuelle en périphérie de la cellule. En E et en F, les flèches indiquent l'endroit où la protéine Syp1p est absente car elle conserve sa localisation dans le bourgeon et en périphérie de la cellule.

3.3 Interaction génétique

La création de double mutant est souvent utilisée pour obtenir de l'information sur la fonction d'un gène par l'identification d'interactions génétiques ou encore de létalité synthétique. Jusqu'à maintenant aucune interaction génétique n'a été identifiée avec *SYP1*. Selon les résultats obtenus dans l'étude de la surexpression de *SYP1* et la localisation cellulaire de Syp1p, des doubles mutants ont été créés afin d'identifier de possibles interactions génétiques avec *SYP1* et peut-être préciser sa fonction cellulaire. Les doubles mutants *syp1Δ arf3Δ*, *syp1Δ bni1Δ*, *syp1Δ chs1Δ*, *syp1Δ ede1Δ*, *syp1Δ sla1Δ* et *syp1Δ cdc10Δ* ont donc été créés. La vérification des délétions géniques a été faite par amplification par PCR à l'aide d'amorces spécifiques. Les résultats ont ensuite été analysés sur un gel d'agarose (Figure 22).

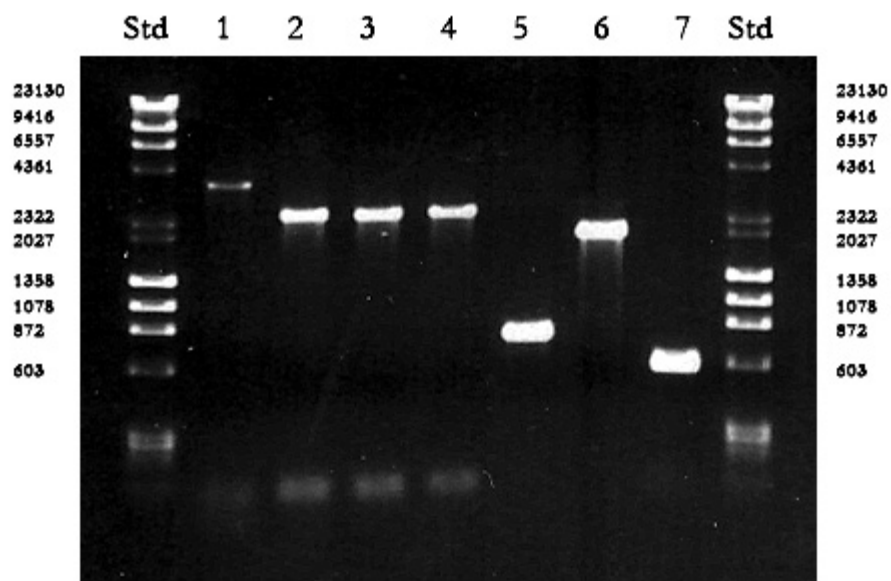


Figure 22 : Vérification des délétions géniques des doubles mutants par PCR.

(Std) Les standards de poids moléculaire utilisés sont l'ADN du bactériophage Φ X174 digéré par *Hae*III et l'ADN du bactériophage λ digéré par *Hind*III; (1) Amplification du gène *SYP1* avec les amorces *SYP1* 5' *Bam*HI et *SYP1* 3' *Kpn*I; (2-4) Vérification de la délétion de *syp1Δ::URA3* à l'aide des amorces *SYP1* 5' *Bam*HI et *SYP1* 3' *Kpn*I : (2) *syp1Δ arf3Δ*; (3) *syp1Δ bni1Δ*; (4) *syp1Δ chs1Δ*; (5) Vérification de la délétion de *arf3Δ::kan* dans la souche *syp1Δ arf3Δ* à l'aide des amorces *ARF3* 5' *Bam*HI et Kan Reverse; (6) Vérification de la délétion de *bni1Δ::kan* dans la souche *syp1Δ bni1Δ* à l'aide des amorces *BNI1* Forward et *BNI1* Reverse; (7) Vérification de la délétion de *chs1Δ::kan* dans la souche *syp1Δ chs1Δ* à l'aide des amorces *CHS1* Forward et Kan Reverse. La migration s'est faite à 100 V sur un gel d'agarose à 0,8%.

3.3.1 Phénotype de la souche *syp1Δ*

Avant d'entreprendre les analyses des doubles mutants, il est important de connaître le phénotype de la souche *syp1Δ* afin de pouvoir comparer les phénotypes des doubles mutants et de conclure s'il y a ou non aggravation d'un phénotype. La délétion du gène *SYP1* n'affecte pas la morphologie cellulaire ni la vitesse de croissance. L'organisation du cytosquelette d'actine de la souche *syp1Δ* est normale à la fois à 30°C et à 37°C. Les granules corticaux se retrouvent dans le bourgeon et les câbles d'actine sont bien orientés en direction des granules corticaux. De plus, aucun problème apparent dans l'endocytose n'a été détecté lors de l'essai d'internalisation du Lucifer Yellow. Toutefois, lorsque les cellules sont incubées à 37°C, on observe un bourgeonnement aléatoire dans environ 60% des cellules (Figure 23).

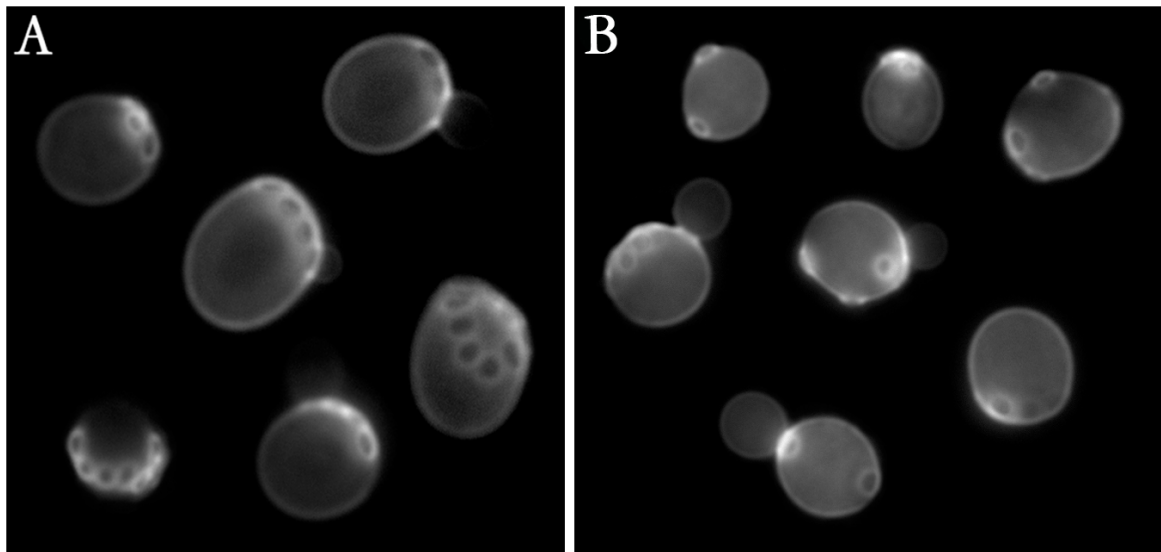


Figure 23 : Patron de bourgeonnement de la souche *syp1Δ*

(A) La souche *syp1Δ* présente un patron de bourgeonnement axial lorsque les cellules sont incubées à 30°C. (B) Lorsque les cellules sont incubées à 37°C, environ 60% des cellules présentent un patron de bourgeonnement aléatoire.

3.3.2 Interaction génétique entre *SYP1* et *ARF3*

La surexpression de *SYP1* corrige partiellement le patron de bourgeonnement aléatoire de la délétion de *ARF3* (Figure 18). Ce résultat nous a guidé vers la création d'un double mutant *syp1Δ arf3Δ* afin de vérifier s'il existe une interaction génétique entre ces deux gènes.

3.3.2.1 Phénotype de la souche *arf3Δ*

La délétion du gène *ARF3* n'affecte pas la croissance cellulaire à 37°C ni celle sur un milieu contenant de la caféine. L'observation des structures d'actine filamenteuse à l'aide de la phalloïdine conjuguée à l'AlexaFluor 488 montre un cytosquelette d'actine bien polarisé à 30°C. Toutefois, lorsqu'on incube les cellules à 37°C on en observe alors 30% avec deux bourgeons et un cytosquelette d'actine dépolarisé (Zakrzewska et al., 2003). La coloration des cicatrices de bourgeonnement a montré que le patron de bourgeonnement est aléatoire pour 40% des cellules à 30°C et pour 90% des cellules incubées à 37°C (Figure 18). Enfin, aucun défaut d'endocytose n'a été observé lors de l'essai d'internalisation du Lucifer Yellow.

3.3.2.2 Caractérisation du double mutant *syp1Δ arf3Δ*

Aucune interaction génétique n'a été identifiée entre *SYP1* et *ARF3*. Le mutant avec la double délétion est viable et sa croissance n'est affectée ni à 30°C ou à 37°C ni sur un milieu contenant de la caféine. La caractérisation du double mutant tant pour l'organisation du cytosquelette d'actine, du patron de bourgeonnement ou de l'internalisation du Lucifer Yellow n'a pas permis d'observer de phénotype particulier (tel que l'aggravation d'un phénotype ou une amélioration par effet de suppression).

3.3.3 Interaction génétique entre *SYP1* et *BNI1*

Tout d'abord, l'étude de la localisation cellulaire a montré que la protéine Syp1p était délocalisée dans la souche *bni1Δ* (Figure 21). Ce résultat suggère que la formine Bni1p est nécessaire à la localisation cellulaire de Syp1p. Ensuite, il a été remarqué que dans la souche *bni1Δ*, la surexpression de *SYP1* provoquait un ralentissement important de la croissance cellulaire (Tableau 7). Ainsi, ces résultats nous ont guidé vers la création du double mutant *syp1Δ bni1Δ* afin de vérifier s'il existe une interaction génétique entre les deux gènes soit par une létalité synthétique ou par l'apparition ou l'aggravation d'un phénotype.

3.3.3.1 Phénotype de la souche *bni1Δ*

La souche *bni1Δ* ne présente pas de phénotype particulier, car l'absence de Bni1p est compensée par la présence d'une seconde formine, Bnr1p. Toutefois, la souche présente un patron de bourgeonnement aléatoire lorsque les cellules sont incubées à 37°C. Dans ces

conditions il est également possible d'observer des cellules à deux bourgeons ou des cellules en forme de bonhomme de neige, c'est-à-dire des cellules qui présentent un second bourgeon sur le premier bourgeon. Ce phénotype est toutefois retrouvé chez moins de 10% de la population de cellules (Tableau 7, Figure 24).

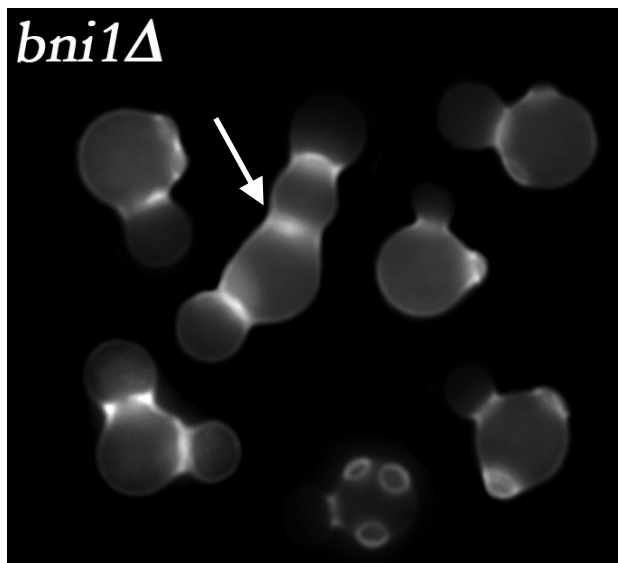


Figure 24 : Patron de bourgeonnement de la souche *bni1Δ* à 37°C.

La souche *bni1Δ* présente un patron de bourgeonnement normal ou axial à 30°C. Toutefois, lorsque la croissance s'effectue à 37°C, (photo à gauche) le patron de bourgeonnement devient aléatoire. De plus, certaines cellules présentent deux bourgeons sur la même cellule et parfois le second bourgeon émerge du premier bourgeon créant une morphologie cellulaire en forme de bonhomme de neige (flèche).

3.3.3.2 Caractérisation du double mutant *syp1Δ bni1Δ*

Aucun phénotype particulier n'a été identifié lors de la caractérisation de ce double mutant. La croissance cellulaire est comparable à celle de la souche sauvage et les cellules ne sont pas sensibles à la caféine. En ce qui concerne l'organisation du cytosquelette d'actine, le patron de bourgeonnement et l'endocytose, aucune anomalie n'a été détectée. Le cytosquelette d'actine est polarisé, le patron de bourgeonnement est aléatoire à 37°C tout comme les cellules *syp1Δ* et *bni1Δ* et aucun défaut n'a été remarqué dans l'internalisation du Lucifer Yellow.

3.3.4 Interaction génétique entre *SYP1* et *CHS1*

L'étude de la localisation cellulaire a montré que Syp1p était délocalisée dans la souche *chs1Δ*. Nous avons donc émis l'hypothèse que la protéine Chs1p pourrait être nécessaire à la localisation de Syp1p dans la cellule. À partir de cette hypothèse nous avons voulu vérifier si la double délétion *syp1Δ chs1Δ* était létale ou si elle provoque l'apparition d'un phénotype particulier qui indiquerait une possible interaction génétique entre les deux gènes.

3.3.4.1 Phénotype de la souche *chs1Δ*

La délétion de *CHS1*, une chitine synthase, ne provoque pas de phénotype important. La croissance cellulaire est normale à la fois à 30°C et à 37°C et les cellules ne présentent pas de sensibilité à la caféine. L'organisation du cytosquelette d'actine est normale, les granules corticaux sont polarisés dans le bourgeon tandis que les câbles sont orientés en leur direction. Le patron de bourgeonnement est normal à 30°C, toutefois l'incubation de la souche *chs1Δ* à 37°C entraîne l'apparition d'un patron de bourgeonnement aléatoire dans près de 90% des cellules.

3.3.4.2 Caractérisation du double mutant *syp1Δ chs1Δ*

La double délétion des gènes *SYP1* et *CHS1* n'affecte pas la croissance puisque le double mutant présente une croissance comparable à la souche sauvage à la fois à 30°C et à 37°C ainsi que sur un milieu contenant de la caféine. L'organisation du cytosquelette d'actine est comparable au phénotype des souches *syp1Δ* et *chs1Δ*. Les granules corticaux sont localisés dans le bourgeon tandis que les câbles d'actine sont orientés en direction de ces derniers. L'analyse du patron de bourgeonnement n'a rien révélé de concluant, c'est-à-dire que le patron de bourgeonnement est normal à 30°C et aléatoire à 37°C mais ce phénotype est le même que celui observé dans les souches *syp1Δ* et *chs1Δ*.

3.3.5 Interaction génétique entre *SYP1* et *EDE1*

La délétion du gène *EDE1* affecte gravement l'étape de l'internalisation lors de l'endocytose et la surexpression de *SYP1* dans la souche *ede1Δ* permet de corriger ce défaut d'internalisation. Selon ce résultat et le fait que nous soupçonnons que Syp1p joue un rôle dans l'endocytose, nous avons vérifié si la double délétion *syp1Δ ede1Δ* est létale pour la cellule ou si elle provoque des modifications dans l'organisation du cytosquelette d'actine puisque ce dernier est impliqué dans l'étape de l'internalisation.

3.3.5.1 Phénotype de la souche *ede1Δ*

La protéine Ede1p est très importante pour l'étape de l'internalisation lors de l'endocytose. Elle semble avoir une fonction similaire à la clathrine puisque sa délétion entraîne un phénotype semblable à celui d'un mutant de clathrine, soit un défaut d'endocytose d'environ

50-75% (Ayscough, 2005) (Figure 19). La croissance de cette souche n'est toutefois pas affectée par l'absence de cette protéine et aucune sensibilité à la caféine n'est observée. Le cytosquelette d'actine est normal, les granules corticaux sont polarisés dans le bourgeon tandis que les câbles d'actine sont orientés en direction des granules corticaux. La taille des cellules est légèrement supérieure à celle des cellules sauvages et le patron de bourgeonnement est aléatoire dans environ 30% des cellules à la fois à 30°C et à 37°C.

3.3.5.2 Caractérisation du double mutant *syp1Δ ede1Δ*

La caractérisation du double mutant *syp1Δ ede1Δ* n'a pas permis d'identifier une interaction génétique entre les gènes *SYP1* et *EDE1*. Les observations de l'organisation du cytosquelette d'actine, du patron de bourgeonnement ainsi que de l'efficacité d'internalisation du Lucifer Yellow du double mutant n'ont pas montré de phénotype particulier, c'est-à-dire que les résultats concordent tous avec ceux obtenus pour les mutants simples.

3.3.6 Interaction génétique entre *SYP1* et les gènes *CDC10* et *SLA1*

En ce qui concerne les doubles mutants *syp1Δ cdc10Δ* et *syp1Δ sla1Δ* il n'a pas été possible d'obtenir les doubles mutants car ces souches n'ont pas été en mesure de former des tétrades. La sporulation a été tentée à 30°C puis à 25°C et dans les deux cas aucune tétrade ne s'est formée.

Chapitre 4 **DISCUSSION**

4.1 L'étude de la surexpression de *SYP1*

4.1.1 La formation de câbles d'actine dans la souche *pfy1Δ*

Le gène *SYP1* a été identifié pour la première fois en tant que suppresseur multicopies du phénotype associé à la délétion de la profiline. La surexpression de *SYP1* dans la souche *pfy1Δ* permettait de repolariser les granules corticaux dans le bourgeon et de corriger le défaut de croissance à température élevée ainsi que sur un milieu contenant de la caféine sans toutefois permettre l'apparition de câbles d'actine visibles (Figure 14) (Cloutier, 2000; Marcoux et al., 1998). Dans le cadre de l'étude de la surexpression du gène *SYP1* dans différentes souches mutantes, le gène *SYP1* a été cloné dans le plasmide multicopie pRS426. À notre grand étonnement, les résultats obtenus avec le plasmide pEML02 (pRS426 *SYP1*) dans la souche *pfy1Δ* ne concordent pas avec ceux de la surexpression de *SYP1* par le plasmide YEp24, utilisé lors des études antérieures. En effet, la surexpression de *SYP1*, par le plasmide pEML02, dans la souche *pfy1Δ*, permet de repolariser les granules corticaux dans le bourgeon, de corriger la croissance à 37°C et sur un milieu contenant de la caféine mais cette fois on observe en plus l'apparition de câbles d'actine visibles dans la cellule contrairement à ce qui avait été observé auparavant (Figure 15; Figure 16).

Ces résultats, d'abord surprenant, sont peut-être explicables. Les deux plasmides, pRS426 et YEp24, étant très similaires, les résultats de la surexpression d'un gène à l'aide de l'un ou de l'autre devraient être comparables. Ils sont caractérisés par la présence de l'origine de réplication de levure 2μ, ils ont un nombre équivalent de copies par cellule (~10-40) et leur taux de ségrégation est analogue. Toutefois, dans le cas du plasmide YEp24, la taille de l'insert et la séquence de celui-ci peut affecter négativement le nombre de copies du plasmide par cellule ainsi que le taux de ségrégation. Ce phénomène n'est cependant pas observé avec pRS426 (Rose and Broach, 1991). Dans le cadre des résultats présentés ici, le changement le plus important apporté est donc l'utilisation du plasmide pRS426 au lieu de YEp24. Aussi, il est raisonnable de considérer la taille de l'insert utilisé sachant que cela peut influencer le nombre de copies par cellule et le taux de ségrégation du plasmide YEp24. La taille de l'insert du plasmide pEML02 est de 3231 pb alors que celle de l'insert du plasmide YEp24 est d'environ 5000 pb. Il est donc possible que le nombre de copies du plasmide pEML02 par

cellule soit supérieur au nombre de copies de YEp24, ce qui pourrait peut-être expliquer les résultats différents obtenus avec pEML02.

Un second changement aurait pu être à l'origine de ces résultats soit le changement de l'appareil photo et du système de traitement de l'image. En effet, avant le début de mes travaux les photos étaient prises avec un appareil à développer utilisant un film de type Kodak TMY 400 et une durée d'exposition d'environ 25 secondes. Maintenant, le microscope est équipé d'un système de photographie numérique relié à un ordinateur ce qui permet d'ajuster plus facilement la durée d'exposition et la mise au point de l'image observée en temps réel sur l'écran de l'ordinateur. Toutefois, l'ancien système permettait très bien d'observer les câbles d'actine dans la souche sauvage. Donc, s'il y avait eu apparition de câbles d'actine visibles lors de la surexpression de *SYP1* dans la souche *pfy1Δ*, ils auraient dû être observés de la même façon que dans une cellule sauvage. De ce fait, ce changement ne peut expliquer les différences dans les résultats obtenus. Enfin, la souche *pfy1Δ* a été analysée afin de vérifier l'absence d'une contamination par les cellules sauvages ce qui aurait invalidé ces nouveaux résultats. Les résultats confirment le phénotype de la souche déficiente en profiline donc l'absence de contamination. Il apparaît donc que le changement de plasmide pour l'étude de la surexpression de *SYP1* est à l'origine du changement phénotypique, soit l'apparition des câbles d'actine visibles dans la souche *pfy1Δ*.

4.1.2 La formation des câbles d'actine par la surexpression de *SYP1* est dépendante des formines

Chez la levure, les formines Bni1p et Bnr1p ont une fonction partiellement redondante puisque la délétion d'un gène est compensée par la présence du second et que la délétion des deux gènes est létale pour la cellule (Imamura et al., 1997). Toutefois, elles possèdent tout de même une fonction distincte dans la cellule (Moseley and Goode, 2005). La principale fonction de ces protéines est la formation des câbles d'actine et du maintien de la polarité cellulaire lors de la croissance. Les formines agissent de concert avec de nombreuses protéines dont la profiline, qui se fixe au domaine FH1 des formines et dont le rôle est d'échanger l'ADP pour de l'ATP sur les monomères d'actine-G, pour faciliter la polymérisation de l'actine sur le domaine FH2 des formines (Figure 4). Une seconde protéine, Bud6p, semble jouer un rôle similaire à la profiline en permettant également l'échange nucléotidique sur les monomères

d'actine mais interagit uniquement avec la formine Bni1p (Evangelista et al., 1997; Evangelista et al., 2003; Moseley and Goode, 2005). La double délétion des gènes *BUD6* et *PFY1* est létale pour la cellule suggérant un fonction redondante pour ces deux gènes (Moseley et al., 2003).

La surexpression de *SYP1* dans la souche déficiente en profiline permet la repolarisation complète du cytosquelette y compris l'apparition de câbles d'actine visibles (Figure 15). Étant donné que la formation de câbles d'actine par la surexpression de *SYP1* est indépendante de la profiline, il a été vérifié si elle était également indépendante des formines. La surexpression de *SYP1* dans le mutant thermosensible *bni1-FH2#1 bnr1Δ* (PY3517) n'a pas permis de restaurer le phénotype de ce mutant ni la formation de câbles d'actine visibles. Il apparaît donc que la formation des câbles d'actine par la surexpression de *SYP1* dans la souche *pfy1Δ* est indépendante de la profiline mais dépendante de la présence des formines Bni1p et Bnr1p. Sachant que Bud6p possède une fonction similaire à Pfy1p, il est possible que la protéine Bud6p soit suractivée, directement ou par l'intermédiaire d'une seconde interaction protéique, lors de la surexpression de *SYP1*, ce qui permettrait la formation de câbles d'actine visibles dans la souches *pfy1Δ*. Pour tester cette possibilité, j'ai observé les résultats de la surexpression de *SYP1* dans la souche *bud6Δ* (non montrés) sur l'organisation du cytosquelette d'actine. Cette souche présente un cytosquelette d'actine partiellement désorganisé mais le phénotype est beaucoup moins sévère que celui de la souche *pfy1Δ* (Moseley et al., 2003). La surexpression de *SYP1* dans la souche *bud6Δ* ne provoque aucun changement dans l'organisation du cytosquelette d'actine ce qui appuie l'hypothèse que la surexpression de *SYP1* passe par *BUD6* pour mener à la formation de câbles d'actine dans la souche *pfy1Δ*. Dans les cellules *pfy1Δ*, la protéine Bud6p est présente mais peut-être en quantité insuffisante pour compenser l'absence de la profiline. La surexpression de *SYP1* permet peut-être une suractivation de Bud6p qui est alors en mesure de remédier à l'absence de la profiline et permettre un échange plus efficace de l'ADP pour de l'ATP sur les monomères d'actine-G. Cette suractivation de Bud6p pourrait donc être à l'origine de l'apparition des câbles d'actine visibles dans les cellules déficientes en profiline. Il serait intéressant de vérifier s'il existe une interaction génétique entre *SYP1* et *BUD6*, ce qui validerait cette hypothèse. Dans le cas de *PFY1*, aucune interaction génétique avec *SYP1* n'a été identifié (Cloutier, 2000; Marcoux et al., 2000; Zakrzewska, 2005).

4.1.3 *SYP1* agit par la voie de signalisation des protéines de type Rho

Tel que mentionné précédemment, la surexpression de *SYP1* dans la souche *pfy1Δ* permet de rétablir parfaitement l'organisation du cytosquelette d'actine en plus de permettre l'apparition de câbles d'actine visibles. La surexpression de *SYP1* dans la souche thermosensible *pfy1-111 rho2Δ* ne permet toutefois pas de corriger son phénotype suggérant que la correction du phénotype de la souche *pfy1Δ* passe par la voie de signalisation de *RHO2* pour permettre la repolarisation des granules corticaux et la formation de câbles d'actine visibles (Marcoux et al., 2000). Étant donné que les résultats obtenus avec la souche *pfy1Δ* diffèrent de ceux obtenus initialement, la surexpression de *SYP1* dans la souche *pfy1-111 rho2Δ* a été vérifiée afin de confirmer ou infirmer l'implication de *RHO2* dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Les résultats obtenus confirment l'implication de *RHO2* dans la polarité du cytosquelette puisque aucune correction n'est observée suite à la surexpression de *SYP1* dans la souche *pfy1-111 rho2Δ* (données non montrées). Cela confirme l'hypothèse suggérant que *SYP1* passe par la voie de signalisation des protéines de types Rho pour repolariser le cytosquelette d'actine et que la formation des câbles d'actine est dépendante de la voie de signalisation de Rho2p (Marcoux et al., 2000).

4.1.4 La surexpression de *SYP1* affecte la progression du cycle cellulaire

L'étude de la surexpression de *SYP1* s'est poursuivie dans de nombreuses souches mutantes dans lesquelles un gène important pour l'organisation du cytosquelette d'actine, de la division cellulaire, du bourgeonnement ou de l'endocytose a été supprimé. Toutes ces fonctions impliquent directement le cytosquelette d'actine et certains résultats obtenus avec Syp1p suggèrent un rôle pour cette nouvelle protéine dans l'une ou l'autre de ces fonctions cellulaires (voir INTRODUCTION). L'analyse morphologique en contraste interférentiel de Nomarski a révélé un retard de croissance important pour quelques mutants surexprimant *SYP1* (*bni1Δ*, *cdc10Δ*, *chs5Δ*, *cla4Δ*, *end3Δ* et *sla2Δ*). En effet, un décompte cellulaire a révélé une nette diminution des cellules en bourgeonnement (G1) par rapport à une culture de cellules sauvages sans plasmide. Cette diminution est associée par le fait même à une augmentation du nombre de cellules en phase G0 du cycle cellulaire de ces souches. Il est important de noter que la

croissance de la souche sauvage surexprimant *SYP1* est également affectée (Tableau 7). Ces résultats révèlent que la surexpression de *SYP1* affecte la progression normale du cycle cellulaire en bloquant la progression entre la phase G0/G1 du cycle cellulaire.

4.1.5 *SYP1* est impliqué dans l'établissement de la polarité cellulaire et la sélection du site de bourgeonnement

La surexpression de *SYP1* permet de corriger partiellement le défaut de bourgeonnement aléatoire de la souche *arf3Δ*. Cette souche présente un patron de bourgeonnement aléatoire de 40% à 30°C et de 90% à 37°C ((Huang et al., 2003); Alexandra Lambert, résultats non publiés). La surexpression de *SYP1* dans cette souche permet de retrouver un patron de bourgeonnement axial à 30°C tandis qu'à 37°C la correction du bourgeonnement est seulement partielle. À cette dernière température, seulement 45% des cellules présentent un patron de bourgeonnement axial ce qui est néanmoins une amélioration de 50% par rapport à la souche *arf3Δ*. La création du double mutant *syp1Δ arf3Δ* n'a pas permis d'identifier une interaction génétique entre les gènes *ARF3* et *SYP1*. Ces résultats soulèvent donc la possibilité que les gènes *SYP1* et *ARF3* soient plutôt reliés fonctionnellement entre eux ou encore dans une même voie de signalisation puisque *SYP1* permet de corriger en partie le défaut de bourgeonnement de la souche *arf3Δ*. De plus, il semble que Syp1p est impliquée dans l'établissement de la polarité cellulaire et dans la sélection du site de bourgeonnement, deux fonctions qui sont aussi associées à la protéine Arf3p (Huang et al., 2003).

4.1.6 Implication de *SYP1* dans l'endocytose

Une des fonctions cellulaires proposées pour Syp1p est un rôle dans l'endocytose puisque Syp1p a été retrouvée dans des complexes protéiques avec plusieurs régulateurs importants de l'endocytose (Bzz1p, Ede1p, Inp52p, Las17p, Sla1p, Sla2p) (Tableau 1). Dans le cadre de l'étude de la surexpression de *SYP1*, l'essai d'internalisation du LY a été effectué dans plusieurs souches mutantes pour un gène régulateur de l'endocytose dans le but d'identifier une correction du défaut d'internalisation par la surexpression de *SYP1*. Parmi les mutants étudiés, la surexpression de *SYP1* a permis de corriger le défaut d'endocytose de trois mutants seulement : *ede1Δ*, *sac6Δ* et *sla1Δ*. La souche *ede1Δ* présente une absence d'internalisation du LY dans plus de 80% des cellules. La surexpression de *SYP1* dans cette souche permet de ramener

à 20% le nombre de cellules incapables d'internaliser le LY. L'équipe de Kaksonen et al. (2003) suggère que Ede1p joue un rôle similaire à la clathrine étant donné que la mutation de ces protéines confère un phénotype similaire. Il serait donc intéressant de vérifier si la surexpression de *SYP1* dans un mutant de clathrine corrige aussi bien le phénotype que dans la souche *ede1Δ*. Dans les souches *sac6Δ* et *sla1Δ*, le défaut est de moindre importance soit de 41% et 30% respectivement. La surexpression de *SYP1* dans ces souches ramène le défaut d'internalisation à 14% et à 3% pour *sac6Δ* et *sla1Δ* respectivement. La correction du défaut d'endocytose de la souche *sla1Δ* est complète puisque le nombre de cellules incapables d'internaliser le LY est maintenant comparable à celui observé dans les cellules sauvages.

Ces résultats sont intéressants puisqu'il s'avère que Syp1p est retrouvée en complexe avec les protéines Ede1p et Sla1p (Tableau 1). La région N-terminale de la protéine Ede1p possède une très forte homologie avec la protéine humaine Eps15. Cette dernière est impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine chez les mammifères. Ces protéines possèdent toutes deux trois domaines EH (Epsin Homology domain), un domaine coiled-coil et une région riche en proline (Gagny et al., 2000). Le domaine EH a une taille d'environ 100 acides aminés et est impliqué dans les interactions protéine-protéine. Il est retrouvé principalement chez les protéines impliquées dans l'endocytose, notamment End3p et Pan1p en plus de Ede1p (Gagny et al., 2000; Paoluzi et al., 1998). La technologie du « phage-display » (présentation de peptide à la surface de phages filamenteux) a permis d'identifier un motif qui se fixe spécifiquement au domaine EH, le motif NPF (Asn-Pro-Phe) (Gagny et al., 2000). Ce motif n'est malheureusement pas reconnu par les différentes bases de données disponibles sur Internet, nous avons donc cherché la présence de ce type de motif chez Syp1p en analysant la séquence en acides aminés. Un motif NPF est présent en position C-terminale aux positions N846-P847-F848 (Figure 25). Étant donné qu'aucune interaction génétique entre *SYP1* et *EDE1* n'a été identifiée, ce motif NPF interagit peut-être avec un autre domaine EH. Il s'avère que la protéine Sla1p possède un domaine HD1 qui est reconnu pour interagir avec de nombreux motifs NPF notamment celui de la protéine Lsb5p impliquée aussi dans l'endocytose (Costa et al., 2005). Cette possibilité est appuyée par le fait qu'il semble y avoir une interaction génétique entre *SYP1* et *SLA1*. Une mutagenèse dirigée du motif NPF pourrait indiquer s'il est vraiment essentiel à la localisation cellulaire de Syp1p. Le domaine coiled-coil de Syp1p attire également l'attention puisque la majorité des régulateurs de l'endocytose en possède un et qu'il semble

impliqué dans la formation d'homo- ou d'hétérodimères (Gagny et al., 2000). Il serait donc intéressant de muter ce domaine et d'observer la localisation cellulaire de Syp1p. Aussi, une analyse protéique en condition non dénaturante permettrait de vérifier si la protéine Syp1p forme des dimères dans le cytoplasme.

MTEQRTKYADSILTTKSPYEATETIRIRLSQVKLLNKDFYLLFKELANLKRNYAQ
 QLRKIIAENEDITKILNAQMIESNVLTPQEMSAFRFNSLGELRNVWDTVIEELKSD
 LKSSTEYYNTLDQQVVRELKESVENNTSWRESKDLHSLKSKNAASIEHYSKNNE
 NSSHLEEARRQWDQQSPYLFELFETIDYNRLDTLKNCLRFQTSFSDYLLNTTKE
 CETVMTKFLAFEPQSEIDRFKASQYNFQLSSSSKEVVPNNASPASATGARPVS
 VSNGAANTEREKKSPQKDKRKSFAFGNIGHRLASASSSLTHNDLMNNEFSDSTNN
 SSLKSKKSSHTLRKVGSI FGRNKTKNKRQQQSSSN SHIQASITETPNNSSTRVSST
 ATSSIIYQKQRRPTYSSSKSNWTPGEASDTPPLPPHATPKNVDAPVTADTPPAQT
 FTPSEVPPSTPQQSSPPTAKEPDSSNLPKTVPISISQPPLQPQSKTKPLPVEPASPSIS
 LPTATVDNQPSGQVDSRPLHIRAPALPPSRKQNFHNRDSQLYDSLPHNGSGATPT
 SSSLSSIPQERPVSTLSSQITGELRELNPQATGSSTSLVGQSLFQHSSLDTSQFGLNA
 SIAEVLNASFKDGMLQNSQLIGEIALNYLPNSVMNSPLPIGINLRINNGAKFEKVL
 NQAFIERVAPEEFKVNPSFIDSRTLGAIKYSIKEPIAPIVIHPVWRFESHQASVVLTV
 KMSPSLPDEISQIVIEDLVVFNIDGANATSALSKPQGSFSKEKKRITWRFKEPVV
 LTRNGEGQRLIARFITDGLAHESAKGVITKFTISETDNVALPHSGAGSGITLTCQEL
 DENNPF GGEWLDVNTKRTLTTGNYHGLA

Figure 25 : Séquence en acides aminés de la protéine Syp1p.

Illustration (jaune) de la présence d'un motif NPF en C-terminale de la protéine Syp1p. Ce type de motif est connu pour interagir avec le domaine EH, retrouvé principalement chez les protéines impliquées dans l'endocytose. La séquence est tirée du site SGD (*Saccharomyces* Genome Database : www.yeastgenome.org)

Les données sur la composition en acides aminés et les résultats du LY font donc la preuve que Syp1p est impliquée dans l'endocytose confirmant ainsi l'hypothèse de départ sur la fonction cellulaire de *SYP1*. Toutefois, étant donné que la délétion de *SYP1* n'entraîne pas de défaut d'endocytose, il est possible que la protéine joue un rôle secondaire dans ce processus cellulaire puisqu'elle n'y est pas essentielle. De plus, nous suggérons qu'elle se situe sous les protéines Ede1p et Sla1p dans la ou les voies de signalisation impliquées puisque la surexpression de *SYP1* permet de corriger le défaut d'endocytose associé à ces souches.

4.2 L'étude de la localisation cellulaire de Syp1p

L'identification de *SYP1* en tant que suppresseur de la délétion de la profiline a mis en évidence un nouveau gène dont le rôle était totalement inconnu. La localisation cellulaire de la protéine s'avérait donc une avenue intéressante pour tenter d'associer une fonction cellulaire à Syp1p. De ce fait, l'observation de la protéine de fusion Syp1p-GFP dans la souche sauvage a permis de déterminer la localisation cellulaire de Syp1p. Dans les cellules en phase stationnaire, la protéine est localisée en périphérie de la cellule et de façon diffuse dans le cytoplasme. Puis, Syp1p se positionne au future site de bourgeonnement et semble former un anneau autour de ce site (Figure 21-A). Tout au long de la croissance du bourgeon, Syp1p se localise à la base du bourgeon et dans le bourgeon. Au moment de la division cellulaire elle se localise au septum et semble alors former deux anneaux de part et d'autre de la cellule mère et du bourgeon (Figure 21-A) (Cloutier, 2000; Marcoux et al., 2000; Zakrzewska, 2005). Ces observations correspondent à la localisation cellulaire de nombreuses protéines impliquées dans la polarité cellulaire mais plus particulièrement à celle des septines, des protéines essentielles à la division cellulaire (Figure 10), suggérant une implication de Syp1p dans ce processus cellulaire.

Afin de préciser le rôle de la protéine dans la cellule, nous avons procédé à une étude de la localisation cellulaire de Syp1p dans de nombreuses souches mutantes afin d'identifier un ou plusieurs cas de délocalisation de la protéine Syp1p. La localisation cellulaire de Syp1p a donc été examinée dans 61 souches portant la délétion d'un gène impliqué soit dans l'organisation du cytosquelette d'actine, dans l'endocytose ou dans la division cellulaire, toutes des fonctions qui sont potentiellement reliées à Syp1p. Dans 56 de ces souches, la localisation cellulaire de Syp1p est normale, c'est-à-dire à la base du bourgeon, dans le bourgeon et en périphérie de la cellule ainsi qu'au septum au moment de la division cellulaire. Toutefois, une délocalisation de la protéine Syp1p a été observée dans cinq souches différentes. Tout d'abord, dans les mutants *bni1Δ* et *chs1Δ* la délocalisation de la protéine s'observe par une coloration diffuse dans le cytoplasme ou une absence de coloration respectivement. Dans le cas de la délocalisation de Syp1p dans le mutant *chs1Δ*, il serait pertinent de vérifier si l'absence de coloration est provoquée par une absence d'expression de la protéine Syp1p-GFP en réponse à la délétion du gène *CHS1* ou si c'est en raison de sa dégradation. En 2002, Kruse et al. ont observé ce phénomène lors de la localisation cellulaire de Myo4p dans les mutants *she2Δ* et *she3Δ* (Kruse et al., 2002). Dans ces mutants, ils ont noté une absence de fluorescence de Myo4p-GFP. Ils

ont conclu que cette absence de fluorescence était provoquée par un repliement incorrect de la protéine dans le cytoplasme car le niveau d'expression était sensiblement le même que dans une cellule sauvage. Sachant que les protéines mal repliées sont rapidement dégradées, cela pourrait expliquer l'absence de fluorescence (Kruse et al., 2002). Ce raisonnement pourrait s'appliquer à Syp1p-GFP dans la souche *chs1Δ*. Toutefois, il serait nécessaire de vérifier le niveau d'expression de *SYP1* dans le mutant *chs1Δ* afin de valider cette affirmation. Ensuite, une délocalisation de Syp1p a aussi été observée dans les mutants *cdc10Δ*, *cdc12-6* et *cla4Δ*. Dans ces souches toutefois, la délocalisation de Syp1p n'est pas généralisée à l'ensemble du cycle cellulaire mais uniquement à un stade précis. En effet, Syp1p n'est pas localisée au septum au moment de la division cellulaire mais elle conserve néanmoins une localisation normale dans le bourgeon et en périphérie de la cellule contrairement à ce qui est observé dans les mutants *bni1Δ* et *chs1Δ* (Figure 21).

Ces résultats soulignent l'importance de ces cinq protéines (Bni1p, Cdc10p, Cdc12p, Chs1p et Cla4p) pour la localisation cellulaire de Syp1p, puisque l'absence de l'un de ces gènes entraîne une délocalisation de la protéine dans la cellule. Toutes ces protéines sont impliquées de près ou de loin dans le processus de la division cellulaire. D'abord, les septines Cdc10p et Cdc12p sont très importantes pour la cellule puisque leur absence occasionne un défaut important de la division voire même la mort cellulaire dans le cas de Cdc12p. Ce qui est intéressant, c'est que Syp1p partage la même localisation cellulaire que ces protéines dans une cellule sauvage (Figure 10 et Figure 21 - A) et que l'absence des septines entraîne une délocalisation de Syp1p. Ensuite, Cla4p est une protéine importante pour la formation de l'anneau de septines lors de la croissance cellulaire et son absence empêche la formation du septum au moment de la division cellulaire (Longtine and Bi, 2003). Donc, Cla4p est étroitement liée aux septines et à la division cellulaire et son absence cause également la délocalisation de Syp1p. En ce qui concerne Chs1p, celle-ci est responsable de la réparation de la paroi cellulaire de la cellule fille suite à la séparation de la cellule mère et du bourgeon. Chs1p est localisée au site de la division cellulaire par l'intermédiaire du chitosome, dont la localisation est dépendante de *END4/SLA2*, un régulateur important de l'endocytose (Ziman et al., 1996). Étant donné qu'un rôle dans l'endocytose est proposé pour Syp1p, il y a peut-être un lien entre Syp1p et Chs1p dans la régulation de l'endocytose ou dans la division cellulaire. Enfin, Bni1p est surtout impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine par la formation des câbles d'actine mais elle est

également nécessaire au maintien de la polarité du cytosquelette d'actine tout au long de la croissance cellulaire. La délocalisation de Syp1p dans la souche *bni1Δ* confirme un rôle pour cette protéine dans le maintien de la polarité cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine. Enfin, les résultats de l'étude de la localisation cellulaire confirment un rôle pour Syp1p dans la polarité cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine en plus d'appuyer l'hypothèse d'un rôle possible pour Syp1p dans la division cellulaire malgré le fait qu'aucun défaut dans ce processus cellulaire ne soit associé à la délétion de *SYP1*.

4.3 Recherche d'interaction génétique avec *SYP1*

Suite aux résultats obtenus lors de l'étude de la localisation cellulaire et de la surexpression de *SYP1*, des doubles mutants ont été créés dans le but d'identifier des interactions génétiques avec ce gène. La création de doubles mutants pourrait permettre de préciser la fonction cellulaire de la protéine Syp1p et permettre son intégration dans une voie de signalisation. Les doubles mutants *syp1Δ arf3Δ*, *syp1Δ bni1Δ*, *syp1Δ chs1Δ*, *syp1Δ ede1Δ*, *syp1Δ sla1Δ* et *syp1Δ cdc10Δ* ont donc été créés.

4.3.1 Interaction génétique entre *SYP1* et les gènes *CDC10* et *SLA1*

Tout d'abord, il a été impossible d'obtenir les doubles mutants *syp1Δ cdc10Δ* et *syp1Δ sla1Δ*. Ces mutants ont été incapables de former des tétrades lors de la sporulation rendant impossible la dissection des ascospores et par le fait même l'obtention d'un double mutant haploïde. Le gène *CDC10* code une septine dont la délétion provoque un problème de division cellulaire des cellules *cdc10Δ*. La protéine Cdc10p est retrouvée dans l'anneau de septines avec Cdc3p, Cdc11p et Cdc12p. Cette structure est nécessaire pour le déroulement normal de la division cellulaire. Dans le cas de la sporulation, les septines sont également impliquées mais principalement Spr3p et Spr28p. Aucune information n'indique que Cdc10p est importante pour la formation des ascospores (Kinoshita, 2003). En ce qui concerne la protéine Sla1p, elle est principalement impliquée dans l'endocytose et la formation des granules corticaux en plus d'être responsable de la localisation cellulaire de la GTPase Rho1p, impliquée notamment dans la synthèse de la paroi cellulaire, et de Sla2p, un autre régulateur de l'endocytose (Ayscough et al., 1999). Aucune étude ne fait mention de l'implication de Sla1p dans la formation des ascospores. Toutefois, des résultats récents font la preuve de l'implication du cytosquelette

d'actine et de l'endocytose dans le processus de sporulation (Morishita and Engebrecht, 2005). En effet, ces résultats soulignent l'importance de la protéine End3p dans la formation des ascospores. Cette protéine a été associée initialement à l'endocytose lors de la recherche de mutants incapables d'internaliser le LY (Raths et al., 1993). De plus, elle est retrouvée dans un complexe essentiel à l'endocytose dans lequel on retrouve Sla1p (Morishita and Engebrecht, 2005). Néanmoins, aucune étude ne mentionne l'implication directe de Sla1p dans la sporulation. Une autre équipe de recherche a publié une étude portant sur le phénotype de la sporulation de 624 souches mutantes. Aucun des gènes identifiés ne correspond à *CDC10* ni à *SYP1* ni à *SLA1*, mais cela n'écarte pas totalement la possibilité que ces gènes peuvent jouer un rôle plus ou moins important dans la sporulation (Briza et al., 2002). Ces résultats suggèrent donc une interaction génétique entre *SYP1* et *CDC10* et *SYP1* et *SLA1*, puisque dans les deux cas la double délétion semble être à l'origine de l'incapacité de sporuler. Il serait donc pertinent de vérifier si les souches *syp1Δ/syp1Δ*, *sla1Δ/sla1Δ* et *cdc10Δ/cdc10Δ* sont aptes à former facilement des tétrades ce qui éliminerait la possibilité que le défaut découle uniquement de ces mutations. En effet, si la sporulation s'effectue sans problème cela confirmerait qu'il y a effectivement une interaction génétique entre *SYP1* et *SLA1* et *SYP1* et *CDC10* et que cette interaction est à l'origine de l'incapacité de sporuler des doubles mutants.

Les septines sont requises pour la sporulation, cependant seules Srp3p et Spr28p sont associées uniquement à ce mécanisme cellulaire. Pour confirmer l'implication de Syp1p dans la sporulation il serait pertinent d'étudier la localisation cellulaire de Syp1p dans les souches *spr3Δ* et *spr28Δ* afin de voir s'il y a une délocalisation comme dans le cas des souches *cdc10Δ* et *cdc12-6*. Aussi, les doubles mutants *syp1Δ spr3Δ* et *syp1Δ spr28Δ* devraient être construits afin de vérifier la présence d'une interaction génétique entre ces gènes et *SYP1*.

Il serait intéressant également de vérifier la possibilité d'une interaction génétique entre les gènes *SYP1* et *END3*. Lors de l'étude de la surexpression de *SYP1* une diminution importante de la croissance de *end3Δ* reliée à la surexpression de *SYP1* a été observée (Tableau 7). La protéine Syp1p semble interagir avec Sla1p, puisqu'on les retrouve dans un même complexe (Tableau 1) et qu'il semble en plus avoir une interaction génétique entre eux. La protéine Sla1p interagit quant à elle avec End3p. Il serait donc possible qu'il y ait une interaction indirecte

entre Syp1p et End3p. La création d'un double mutant *syp1Δ end3Δ* pourrait informer sur une possible interaction génétique et confirmer un possible rôle dans la sporulation.

Il a été mentionné plus haut que la localisation cellulaire de Rho1p est sous le contrôle de Sla1p (Ayscough et al., 1999). La surexpression de *SYP1* permet de corriger le défaut associé à la délétion de *SLA1* et agit en plus sur Rho1p puisque la surexpression provoque l'apparition d'une paroi épaisse dans les cellules. Ce même phénotype est observé suite à la surexpression de *RHO1* (Marcoux et al., 2000). La petite GTPase Rho1p est responsable de la synthèse de la paroi cellulaire soit par l'activation de la voie de la PKC ou en activant la β -1-3-glucane synthase. Rho1p est d'ailleurs la portion régulatrice de cette enzyme responsable de la synthèse du β -1-3-glucan, composant majeur de la paroi cellulaire mais également de la paroi des ascospores (Morishita and Engebrecht, 2005). Il est possible que Syp1p agisse sur la voie de signalisation de *RHO1* principalement pour la formation de la paroi au moment de la formation des ascospores ou de l'endocytose. Il serait intéressant d'étudier cette voie de signalisation afin de mieux comprendre le rôle de *SYP1* dans la voie de signalisation de *RHO1* et la synthèse de la paroi cellulaire.

4.3.2 Interaction génétique entre *SYP1* et les gènes *ARF3*, *BNI1*, *CHS1* et *EDE1*

En ce qui concerne les doubles mutants *syp1Δ arf3Δ*, *syp1Δ bni1Δ*, *syp1Δ chs1Δ* et *syp1Δ ede1Δ*, aucun problème de sporulation n'y est associé. Ainsi, les doubles mutants haploïdes ont tous été obtenus. Afin d'identifier une possible interaction génétique entre *SYP1* et les différents gènes sélectionnés, ces doubles mutants ont été caractérisés en commençant par vérifier la croissance à la température restrictive ainsi que sur un milieu contenant de la caféine. Dans tous les cas, la croissance observée est comparable à celle de la souche sauvage à la fois à 30°C et à 37°C ainsi que sur un milieu contenant de la caféine. De plus, l'analyse des structures d'actine filamenteuse n'a détecté aucun défaut dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Le cytosquelette d'actine est polarisé, c'est-à-dire que les granules corticaux sont dans le bourgeon et les câbles d'actine sont orientés en direction de ces derniers, ce qui correspond au phénotype associé à chacune des délétions utilisées pour la création des doubles mutants. Donc, les double délétions n'affectent pas l'organisation du cytosquelette d'actine. L'examen du patron de bourgeonnement ainsi que l'internalisation du LY, qui permet de détecter un défaut de

l'endocytose, a été réalisé sur chacune des nouvelles souches. Les phénotypes observés étaient tous les mêmes que ceux observés initialement dans les mutants simples, c'est-à-dire un patron de bourgeonnement aléatoire à 37°C et aucun défaut d'endocytose.

D'après les résultats obtenus, on peut conclure qu'il n'existe pas d'interaction génétique entre *SYP1* et les gènes *ARF3*, *BNI1*, *CHS1* ou *EDE1*. Aucun phénotype particulier n'a été observé pas plus que l'aggravation ou la suppression d'un phénotype existant dans les souches utilisées pour la création des doubles mutants.

Chapitre 5 CONCLUSION

5.1 Conclusion

La régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine implique de nombreuses protéines dont la profiline, une petite protéine impliquée dans la polymérisation des filaments d'actine. La délétion du gène *PFY1* n'est pas létale mais engendre un phénotype sévère marqué principalement par un cytosquelette d'actine entièrement désorganisé. Les granules corticaux sont dépolarisés et les câbles d'actine ne sont plus visibles. La recherche de suppresseurs multicopies pour la délétion de ce gène a conduit à l'identification de nombreux suppresseurs dont le gène *SYP1*, un ORF nommé ainsi pour *Suppressor of Yeast Profilin deletion* (Cloutier, 2000; Marcoux et al., 2000). Dans le cadre de la présente étude, il a été observé que la surexpression de *SYP1* permet non seulement de repolariser les granules corticaux dans le bourgeon et de corriger la croissance mais qu'en plus elle permet l'apparition de câbles d'actine visibles dans les cellules *pfy1Δ*. Ce changement phénotypique, par rapport à ce qui avait été noté par Marcoux et al. (2000), serait le résultat de l'utilisation d'un nouveau plasmide pour la surexpression de *SYP1*, soit pRS426 en remplacement de YEp24. Le nombre de copies plus élevées et le taux de ségrégation plus stable de ce plasmide seraient à l'origine de l'apparition des câbles d'actine visibles par la surexpression de *SYP1* dans la souche déficiente en profiline.

En accord avec les résultats obtenus lors de l'étude de la surexpression de *SYP1* et de la localisation cellulaire de Syp1p, il est possible d'affirmer que Syp1p joue un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine. La formation des câbles d'actine est indépendante de la profiline mais nous avons démontré qu'elle était dépendante des formines. De plus, l'absence de la formine Bni1p affecte la localisation cellulaire de Syp1p, confirmant son implication dans l'établissement de la polarité cellulaire. Nous proposons donc que *SYP1* pourrait agir par l'intermédiaire de Bud6p et de Bni1p pour conduire à la formation des câbles d'actine. En effet, Bud6p joue un rôle similaire à celui de la profiline, c'est-à-dire permettre l'échange de l'ADP pour de l'ATP sur les monomères d'actine et amener ces monomères d'actine au domaine FH2 de la formine Bni1p afin de former les filaments d'actine. Les résultats obtenus de la surexpression de *SYP1* dans la souche *bud6Δ* appuie cette affirmation puisque aucun changement phénotypique n'a été observé. De plus, l'absence de la formine Bni1p empêche la formation des câbles d'actine par la surexpression de *SYP1* et la protéine Syp1p n'est pas localisée correctement dans la souche *bni1Δ*.

La vérification des résultats de la surexpression de *SYP1* dans la souche *ppy1-111 rho2Δ* corroborent les informations précédentes, c'est-à-dire qu'il n'y a aucune correction de l'organisation du cytosquelette d'actine de cette souche (Marcoux et al., 2000). Il est donc justifié d'affirmer que la surexpression de *SYP1* agit par la voie de signalisation de *RHO2* pour repolariser les granules corticaux et permettre la formation de câbles d'actine visibles dans la souche *ppy1Δ*.

La localisation cellulaire de Syp1p est compromise dans plusieurs souches dont les gènes mutés sont impliqués dans le maintien de la polarité et la division cellulaire dont les septines. De plus, la surexpression de *SYP1* provoque un ralentissement notable de la croissance cellulaire en bloquant la progression du cycle cellulaire entre la phase G0/G1. Le fait que Syp1p partage la même localisation cellulaire que les septines, que ces dernières soient essentielles à sa localisation et que la surexpression de *SYP1* nuit à la progression du cycle cellulaire appuie l'hypothèse que Syp1p est impliquée dans la progression du cycle cellulaire et qu'elle joue un rôle dans la division cellulaire. La délétion du gène *SYP1* n'entraîne pourtant pas de défaut de division cellulaire mais la double délétion *syp1Δ cdc10Δ* est létale puisque aucun double mutant n'a pu être obtenu. Sachant que certaines septines sont impliquées dans la sporulation, nous proposons que Syp1p joue un rôle dans la sporulation plutôt que dans la division cellulaire.

Finalement, la surexpression de *SYP1* permet de restaurer le défaut d'internalisation du Lucifer Yellow dans les souches *ede1Δ*, *sla1Δ* et *sac6Δ*. Cela confirme un rôle pour Syp1p dans l'endocytose et appuie l'hypothèse de départ. Toutefois, Syp1p joue probablement un rôle de moindre importance dans le mécanisme d'internalisation lors de l'endocytose puisque la délétion de *SYP1* n'entraîne pas de défaut d'internalisation. Nous avons aussi fait la preuve de l'absence d'interaction génétique entre les gènes *SYP1* et *EDE1*. Il est donc probable que Syp1p se situe sous la protéine Ede1p dans la voie de signalisation de l'internalisation, ce qui explique la correction de la souche *ede1Δ*. Nous avons identifié une seconde interaction génétique avec *SYP1*, cette fois avec le gène *SLA1*. Tout comme le double mutant *syp1Δ cdc10Δ*, le double mutant *syp1Δ sla1Δ* est létal puisqu'il a été impossible d'obtenir le double mutant. La protéine Sla1p est importante pour l'endocytose et la formation des granules corticaux. La correction du défaut d'endocytose de la souche *sla1Δ* fait la preuve une fois de plus de l'implication de Syp1p dans l'organisation du cytosquelette d'actine et dans le

mécanisme d'endocytose. Rappelons que *syp1Δ* ne présente pas de défaut d'endocytose. Ces résultats tendent alors à appuyer l'hypothèse d'un rôle dans la sporulation. Récemment, la preuve a été faite de l'implication directe du cytosquelette d'actine et de l'endocytose dans la sporulation par l'importance de la protéine End3p, un régulateur de l'endocytose nécessaire à la formation des ascospores (Morishita and Engebrecht, 2005). Il se trouve que Sla1p est retrouvée en complexe avec End3p dans la cellule ce qui laisse croire que Sla1p pourrait elle aussi être importante pour la sporulation et par le fait même Syp1p.

Enfin, la surexpression de *SYP1* corrige partiellement le défaut de bourgeonnement de la souche *arf3Δ* suggérant une relation fonctionnelle entre ces deux protéines puisqu'il n'y a pas d'interaction génétique entre les deux gènes. De plus, *syp1Δ* possède aussi un patron de bourgeonnement aléatoire à 37°C, confirmant un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine. La localisation cellulaire de Syp1p au site de bourgeonnement et les résultats obtenus dans la souche *arf3Δ* font la preuve de l'implication de *SYP1* dans l'établissement de la polarité cellulaire et dans la sélection du site de bourgeonnement.

5.2 Perspectives

Les connaissances acquises dans le cadre de cette étude permettent d'affirmer que Syp1p joue un rôle dans l'endocytose et la régulation du cytosquelette d'actine chez *Saccharomyces cerevisiae*. Toutefois, il serait très intéressant de poursuivre l'étude de la fonction cellulaire de *SYP1* en suivant les points soulevés dans la discussion. Notamment la création de doubles mutants avec *BUD6*, avec les septines *SPR3* et *SPR28* et enfin avec le gène *END3* impliqué à la fois dans l'endocytose et la sporulation. Il faudrait également effectuer la vérification de l'efficacité de la sporulation des souches *syp1Δ/syp1Δ*, *sla1Δ/sla1Δ* et *cdc10Δ/cdc10Δ*. Enfin, il serait très pertinent de confirmer l'importance du motif NPF et du domaine coiled-coil pour l'endocytose et la formation de dimères en procédant à la mutagenèse dirigée sur ces portions de la séquence (Figure 26). Les différents mutants devront ensuite être analysés pour la localisation cellulaire de Syp1p mutée.

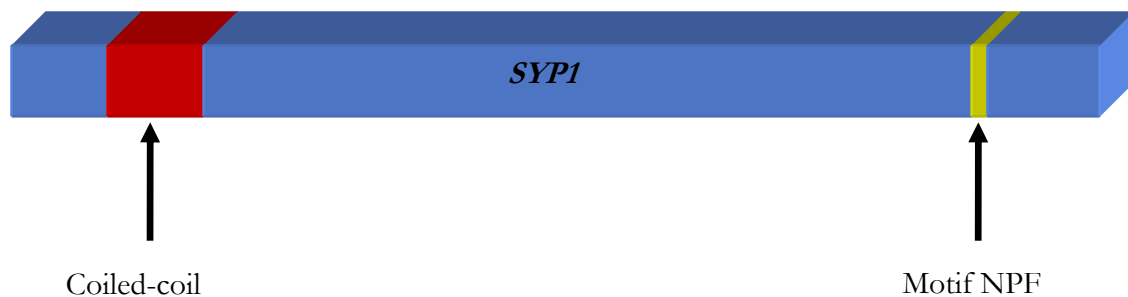


Figure 26 : Illustration des domaines visés par la mutagenèse dirigée.

Références

- Adams, A. E., and Pringle, J. R. (1984): Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **98**, 934-45.
- Ayscough, K. R. (1998): In vivo functions of actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 102-11.
- Ayscough, K. R. (2005): Defining protein modules for endocytosis. *Cell* **123**, 188-90.
- Ayscough, K. R., Eby, J. J., Lila, T., Dewar, H., Kozminski, K. G., and Drubin, D. G. (1999): Sla1p is a functionally modular component of the yeast cortical actin cytoskeleton required for correct localization of both Rho1p-GTPase and Sla2p, a protein with talin homology. *Mol Biol Cell* **10**, 1061-75.
- Balcer, H. I., Goodman, A. L., Rodal, A. A., Smith, E., Kugler, J., Heuser, J. E., and Goode, B. L. (2003): Coordinated regulation of actin filament turnover by a high-molecular-weight Srv2/CAP complex, cofilin, profilin, and Aip1. *Curr Biol* **13**, 2159-69.
- Bard, M., Neuhauser, J. L., and Lees, N. D. (1980): Caffeine resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **141**, 999-1002.
- Briza, P., Bogengruber, E., Thur, A., Rutzler, M., Munsterkotter, M., Dawes, I. W., and Breitenbach, M. (2002): Systematic analysis of sporulation phenotypes in 624 non-lethal homozygous deletion strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**, 403-22.
- Casamayor, A., and Snyder, M. (2002): Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* **5**, 179-86.
- Casamayor, A., and Snyder, M. (2003): Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Mol Cell Biol* **23**, 2762-77.
- Chang, F., and Peter, M. (2003): Yeasts make their mark. *Nat Cell Biol* **5**, 294-9.
- Cloutier, S. (2000): Identification d'un nouveau gène, SYP1, impliqué dans l'organisation du cytoaquelette d'actine, pp. 1-170, Mémoire de maîtrise. Université Laval, Québec.
- Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A., Falkow, S., and Brown, A. J. (1997): Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**, 303-11.
- Costa, R., Warren, D. T., and Ayscough, K. R. (2005): Lsb5p interacts with actin regulators Sla1p and Las17p, ubiquitin and Arf3p to couple actin dynamics to membrane trafficking processes. *Biochem J* **387**, 649-58.
- de Bettignies, G., Thoraval, D., Morel, C., Peypouquet, M. F., and Crouzet, M. (2001): Overactivation of the protein kinase C-signaling pathway suppresses the defects of cells lacking the Rho3/Rho4-GAP Rgd1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **159**, 1435-48.
- deHart, A. K., Schnell, J. D., Allen, D. A., Tsai, J. Y., and Hicke, L. (2003): Receptor internalization in yeast requires the Tor2-Rho1 signaling pathway. *Mol Biol Cell* **14**, 4676-84.
- Donnelly, S. F., Pocklington, M. J., Pallotta, D., and Orr, E. (1993): A proline-rich protein, verprolin, involved in cytoskeletal organization and cellular growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **10**, 585-96.
- dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., and Nosworthy, N. J. (2003): Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* **83**, 433-73.

- Dulic, V., Egerton, M., Elguindi, I., Raths, S., Singer, B., and Riezman, H. (1991): Yeast endocytosis assays. *Methods Enzymol* **194**, 697-710.
- Etienne-Manneville, S. (2004): Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci* **117**, 1291-300.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M. S., Chow, C. J., Adames, N., Pringle, J. R., Peter, M., and Boone, C. (1997): Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* **276**, 118-22.
- Evangelista, M., Klebl, B. M., Tong, A. H., Webb, B. A., Leeuw, T., Leberer, E., Whiteway, M., Thomas, D. Y., and Boone, C. (2000): A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* **148**, 353-62.
- Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D. C., Boone, C., and Bretscher, A. (2002): Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol* **4**, 32-41.
- Evangelista, M., Zigmund, S., and Boone, C. (2003): Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci* **116**, 2603-11.
- Falck, S., Paavilainen, V. O., Wear, M. A., Grossmann, J. G., Cooper, J. A., and Lappalainen, P. (2004): Biological role and structural mechanism of twinfilin-capping protein interaction. *EMBO J* **23**, 3010-9.
- Gagny, B., Wiederkehr, A., Dumoulin, P., Winsor, B., Riezman, H., and Haguenaer-Tsapis, R. (2000): A novel EH domain protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Ede1p, involved in endocytosis. *J Cell Sci* **113**, 3309-19.
- Garcia-Ranea, J. A., and Valencia, A. (1998): Distribution and functional diversification of the ras superfamily in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **434**, 219-25.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M. A., Copley, R. R., Edelman, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., and Superti-Furga, G. (2002): Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-7.
- Geli, M. I., and Riezman, H. (1998): Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. *J Cell Sci* **111**, 1031-7.
- Gladfelter, A. S., Zyla, T. R., and Lew, D. J. (2004): Genetic interactions among regulators of septin organization. *Eukaryot Cell* **3**, 847-54.
- Goldschmidt-Clermont, P. J., Furman, M. I., Wachsstock, D., Safer, D., Nachmias, V. T., and Pollard, T. D. (1992): The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol Biol Cell* **3**, 1015-24.
- Goode, B. L., and Rodal, A. A. (2001): Modular complexes that regulate actin assembly in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* **4**, 703-12.
- Goodman, A., Goode, B. L., Matsudaira, P., and Fink, G. R. (2003): The *Saccharomyces cerevisiae* calponin/transgelin homolog Scp1 functions with fimbrin to regulate stability and organization of the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **14**, 2617-29.

- Haarer, B. K., Lillie, S. H., Adams, A. E., Magdolen, V., Bandlow, W., and Brown, S. S. (1990): Purification of profilin from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of profilin-deficient cells. *J Cell Biol* **110**, 105-14.
- Haarer, B. K., Petzold, A. S., and Brown, S. S. (1993): Mutational analysis of yeast profilin. *Mol Cell Biol* **13**, 7864-73.
- Heinisch, J. J., Lorberg, A., Schmitz, H. P., and Jacoby, J. J. (1999): The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **32**, 671-80.
- Hoffman, C. S., and Winston, F. (1987): A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-72.
- Huang, C. F., Liu, Y. W., Tung, L., Lin, C. H., and Lee, F. J. (2003): Role for Arf3p in development of polarity, but not endocytosis, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**, 3834-47.
- Imamura, H., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Kamei, T., Takahashi, K., Sasaki, T., and Takai, Y. (1997): Bni1p and Bnr1p: Downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **16**, 2745-2755.
- Kadota, J., Yamamoto, T., Yoshiuchi, S., Bi, E., and Tanaka, K. (2004): Septin ring assembly requires concerted action of polarisome components, a PAK kinase Cla4p, and the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15**, 5329-45.
- Kaiser, C., Michaelis, S., and Mitchell, A. (1994): Modified lithium acetate yeast transformation, pp. 201-2. In C. S. H. L. Press (Ed.): *Methods in yeast genetics*, Cold Spring Harbor, NY.
- Kaksonen, M., Sun, Y., and Drubin, D. G. (2003): A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* **115**, 475-87.
- Kaksonen, M., Toret, C. P., and Drubin, D. G. (2005): A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* **123**, 305-20.
- Karpova, T. S., Tatchell, K., and Cooper, J. A. (1995): Actin filaments in yeast are unstable in the absence of capping protein or fimbrin. *J Cell Biol* **131**, 1483-93.
- Kim, K., Yamashita, A., Wear, M. A., Maeda, Y., and Cooper, J. A. (2004): Capping protein binding to actin in yeast: biochemical mechanism and physiological relevance. *J Cell Biol* **164**, 567-80.
- Kinoshita, M. (2003): The septins. *Genome Biol* **4**, 236.
- Kruse, C., Jaedicke, A., Beaudouin, J., Bohl, F., Ferring, D., Guttler, T., Ellenberg, J., and Jansen, R. P. (2002): Ribonucleoprotein-dependent localization of the yeast class V myosin Myo4p. *J Cell Biol* **159**, 971-82.
- Lappalainen, P., and Drubin, D. G. (1997): Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature* **388**, 78-82.
- Lee, P. R., Song, S., Ro, H. S., Park, C. J., Lippincott, J., Li, R., Pringle, J. R., De Virgilio, C., Longtine, M. S., and Lee, K. S. (2002): Bni5p, a septin-interacting protein, is required for normal septin function and cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **22**, 6906-20.
- Lew, D. J. (2002): Formin' actin filament bundles. *Nat Cell Biol* **4**, E29-30.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M.P., Zippursy, S.L., Darnell, J. (2003): *Molecular Cell Biology*. WH Freeman and Company. New York.

- Longtine, M. S., and Bi, E. (2003): Regulation of septin organization and function in yeast. *Trends Cell Biol* **13**, 403-9.
- Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T. D. (1994): Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol* **127**, 107-115.
- Machesky, L. M., and Gould, K. L. (1999): The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 117-21.
- Machesky, L. M., and Poland, T. D. (1993): Profilin as a potential mediator of membrane-cytoskeleton communication. *Trends Cell Biol* **3**, 381-5.
- Madaule, P., Axel, R., and Myers, A. M. (1987): Characterization of two members of the rho gene family from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 779-83.
- Madden, K., and Snyder, M. (1998): Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu Rev Microbiol* **52**, 687-744.
- Manning, B. D., Padmanabha, R., and Snyder, M. (1997): The Rho-GEF Rom2p localizes to sites of polarized cell growth and participates in cytoskeletal functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **8**, 1829-44.
- Marcoux, N., Bourbonnais, Y., Charest, P. M., and Pallotta, D. (1998): Overexpression of MID2 suppresses the profilin-deficient phenotype of yeast cells. *Mol Microbiol* **29**, 515-26.
- Marcoux, N., Cloutier, S., Zakrzewska, E., Charest, P. M., Bourbonnais, Y., and Pallotta, D. (2000): Suppression of the profilin-deficient phenotype by the RHO2 signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **156**, 579-92.
- Matsui, Y., and Toh-e, A. (1992): Isolation and characterization of two novel ras superfamily genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **114**, 43-9.
- Millard, T. H., Sharp, S. J., and Machesky, L. M. (2004): Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* **380**, 1-17.
- Moon, A. L., Janmey, P. A., Louie, K. A., and Drubin, D. G. (1993): Cofilin is an essential component of the yeast cortical cytoskeleton. *J Cell Biol* **120**, 421-35.
- Morishita, M., and Engebrecht, J. (2005): End3p-Mediated Endocytosis Is Required for Spore Wall Formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **170**, 1561-74.
- Moseley, J. B., and Goode, B. L. (2005): Differential activities and regulation of *Saccharomyces cerevisiae* formin proteins Bni1 and Bnr1 by Bud6. *J Biol Chem* **280**, 28023-33.
- Moseley, J. B., Sagot, I., Manning, A. L., Xu, Y., Eck, M. J., Pellman, D., and Goode, B. L. (2003): A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol Biol Cell* **2**, 2.
- Mulholland, J., Wesp, A., Riezman, H., and Botstein, D. (1997): Yeast actin cytoskeleton mutants accumulate a new class of Golgi-derived secretory vesicle. *Mol Biol Cell* **8**, 1481-99.
- Mullins, R. D., and Pollard, T. D. (1999): Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 244-9.
- Munn, A. L. (2001): Molecular requirements for the internalisation step of endocytosis: insights from yeast. *Biochim Biophys Acta* **1535**, 236-57.

- Munn, A. L., and Riezman, H. (1994): Endocytosis is required for the growth of vacuolar H(+)-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes. *J Cell Biol* **127**, 373-86.
- Munn, A. L., Stevenson, B. J., Geli, M. I., and Riezman, H. (1995): end5, end6, and end7: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **6**, 1721-42.
- Nelson, W. J. (2003): Mum, this bud's for you: where do you want it? Roles for Cdc42 in controlling bud site selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioessays* **25**, 833-6.
- Ng, R., and Abelson, J. (1980): Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 3912-6.
- Oehlen, L. J., and Cross, F. R. (1998): The role of Cdc42 in signal transduction and mating of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 8556-9.
- Ono, S. (2003): Regulation of actin filament dynamics by actin depolymerizing factor/cofilin and actin-interacting protein 1: new blades for twisted filaments. *Biochemistry* **42**, 13363-70.
- Palmgren, S., Vartiainen, M., and Lappalainen, P. (2002): Twinfilin, a molecular mailman for actin monomers. *J Cell Sci* **115**, 881-6.
- Paoluzi, S., Castagnoli, L., Lauro, I., Salcini, A. E., Coda, L., Fre, S., Confalonieri, S., Pelicci, P. G., Di Fiore, P. P., and Cesareni, G. (1998): Recognition specificity of individual EH domains of mammals and yeast. *Embo J* **17**, 6541-50.
- Pollard, T. D., and Beltzner, C. C. (2002): Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 768-74.
- Pruyne, D., and Bretscher, A. (2000a): Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci* **113**, 365-75.
- Pruyne, D., and Bretscher, A. (2000b): Polarization of cell growth in yeast. II The role of the cortical actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **113**, 571-85.
- Pruyne, D., Gao, L., Bi, E., and Bretscher, A. (2004): Stable and dynamic axes of polarity use distinct formin isoforms in budding yeast. *Mol Biol Cell* **15**, 4971-89.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001): The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-29.
- Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F., and Riezman, H. (1993): end3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **120**, 55-65.
- Riezman, H. (1985): Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis. *Cell* **40**, 1001-9.
- Riezman, H. (1993): Yeast endocytosis. *Trends Cell Biol* **3**, 273-7.
- Rose, M. D., and Broach, J. R. (1991): Cloning genes by complementation in yeast. *Methods Enzymol* **194**, 195-230.
- Sagot, I., Rodal, A. A., Moseley, J., Goode, B. L., and Pellman, D. (2002): An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol* **4**, 626-31.
- Schmidt, A., and Hall, M. N. (1998): Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 305-38.

- Schmitz, H. P., Huppert, S., Lorberg, A., and Heinisch, J. J. (2002): Rho5p downregulates the yeast cell integrity pathway. *J Cell Sci* **115**, 3139-48.
- Schott, D., Huffaker, T., and Bretscher, A. (2002): Microfilaments and microtubules: the news from yeast. *Curr Opin Microbiol* **5**, 564-74.
- Sekiya-Kawasaki, M., Abe, M., Saka, A., Watanabe, D., Kono, K., Minemura-Asakawa, M., Ishihara, S., Watanabe, T., and Ohya, Y. (2002): Dissection of upstream regulatory components of the Rho1p effector, 1,3-beta-glucan synthase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **162**, 663-76.
- Shannon, K. B., and Li, R. (1999): The multiple roles of Cyk1p in the assembly and function of the actomyosin ring in budding yeast. *Mol Biol Cell* **10**, 283-96.
- Soulard, A., Lechler, T., Spiridonov, V., Shevchenko, A., Li, R., and Winsor, B. (2002): *Saccharomyces cerevisiae* Bzz1p is implicated with type I myosins in actin patch polarization and is able to recruit actin-polymerizing machinery in vitro. *Mol Cell Biol* **22**, 7889-906.
- Theriot, J. A. (1997): Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J Cell Biol* **136**, 1165-8.
- Tkacz, J. S., and MacKay, V. L. (1979): Sexual conjugation in yeast. Cell surface changes in response to the action of mating hormones. *J Cell Biol* **80**, 326-33.
- Utermohlen, J. (1994): RbCl Transformation Procedure for Improved Efficiency. *The NEB Transcript* **6**, 7.
- Vallier, L. G., Segall, J. E., and Snyder, M. (2002): The alpha-factor receptor C-terminus is important for mating projection formation and orientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Motil Cytoskeleton* **53**, 251-66.
- Volkman, N., Amann, K. J., Stoilova-McPhie, S., Egile, C., Winter, D. C., Hazelwood, L., Heuser, J. E., Li, R., Pollard, T. D., and Hanein, D. (2001): Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science* **293**, 2456-9.
- Wesp, A., Hicke, L., Palecek, J., Lombardi, R., Aust, T., Munn, A. L., and Riezman, H. (1997): End4p/Sla2p interacts with actin-associated proteins for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **8**, 2291-306.
- Wiederkehr, A., Meier, K. D., and Riezman, H. (2001): Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in fluid-phase endocytosis. *Yeast* **18**, 759-73.
- Winsor, B., and Schiebel, E. (1997): Review: an overview of the *Saccharomyces cerevisiae* microtubule and microfilament cytoskeleton. *Yeast* **13**, 399-434.
- Winter, D. C., Choe, E. Y., and Li, R. (1999): Genetic dissection of the budding yeast Arp2/3 complex: a comparison of the in vivo and structural roles of individual subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7288-93.
- Witke, W. (2004): The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol* **14**, 461-9.
- Yeong, F. M. (2005): Severing all ties between mother and daughter: cell separation in budding yeast. *Mol Microbiol* **55**, 1325-31.
- Zakrzewska, E. (2005): La signalisation et le cytosquelette d'actine., pp. 1-211, Thèse de Doctorat, Université Laval.

- Zakrzewska, E., Perron, M., Laroche, A., and Pallotta, D. (2003): A role for GEA1 and GEA2 in the organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **165**, 985-95.
- Ziman, M., Chuang, J. S., and Schekman, R. W. (1996): Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. *Mol Biol Cell* **7**, 1909-19.