



**HAL**  
open science

# L'ENIGME DU CYCLE DE TYROSINATION: DES REPONSES DANS LA LEVURE

Cécile Boscheron

► **To cite this version:**

Cécile Boscheron. L'ENIGME DU CYCLE DE TYROSINATION: DES REPONSES DANS LA LEVURE. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Joseph Fourier Grenoble I, 2006. tel-04216551

**HAL Id: tel-04216551**

**<https://hal.science/tel-04216551>**

Submitted on 25 Sep 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# **HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES**

Présentée par

**Cécile Boscheron**

## **L'ENIGME DU CYCLE DE TYROSINATION :**

### **DES REPONSES DANS LA LEVURE**

Soutenue le 19 Décembre 2006 devant la commission d'examen composée de :

Prof Claude Feuerstein, UJF Grenoble

*Président*

Prof Eric Gilson, ENSL Lyon

*Rapporteur*

Dr Didier Job, U366 CEA Grenoble

*Examineur*

Dr Alain Nicolas, Institut Curie Paris

*Rapporteur*

Prof Michel.Robert-Nicoud, UJF Grenoble

*Examineur*

Dipôme de la Faculté de Médecine au sein de l'Université Joseph Fourier

Préparée au laboratoire du cytosquelette unite INSERM

Département de Biologie Moléculaire et Structurale

CEA-Grenoble, France

## TABLE DES MATIERES

CURRICULUM VITAE.....	4
ACTIVITES D'ENCADREMENT ET D'ANIMATION DE LA RECHERCHE.....	5
LISTE DES PUBLICATIONS.....	6
ASPECTS MAJEURS DE MA CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE ANTERIEURE. ....	8
1. THÈSE.....	8
4 Contexte international et hypothèse de travail.....	8
4 Méthodologie utilisée.....	9
4 Résultats obtenus.....	10
2. POST-DOCTORAT.....	12
3.4 RÉFÉRENCES .....	12
PROGRAMME DE RECHERCHE ACTUEL. ....	13
1. INTRODUCTION.....	16
2. LE CYCLE DE TYROSINATION/DÉTYROSINATION DE LA TUBULINE.....	18
3. LA LEVURE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> , UN MODÈLE D'ÉTUDE DU C-TERMINUS DE LA TUBULINE α (TRAVAIL DE THÈSE ANNE-CLAIRE BADIN). ....	20
4. LES LEVURES DÉTYROSINÉES, UN MODÈLE D'ÉTUDE DES PROTÉINES S'ASSOCIANT AUX EXTRÉMITÉS PLUS DES MICROTUBULES (TRAVAIL DE THÈSE FABRICE CAUDRON). ....	23
<i>Paramètres contrôlant l'association de Bik1p aux microtubules détyrosinés.</i> .....	25
<i>Un nouveau modèle pour la localisation de la dynéine aux bouts + des microtubules.</i> .....	26
<i>Relations entre fonction et localisation de Bik1p.</i> .....	27
5. LES LEVURES DÉTYROSINÉES, UN MODÈLE D'ÉTUDE DE LA FONCTION DE CLIP170 PENDANT LA MITOSE. .....	30

<b>6. LES LEVURES DÉTYROSINÉES, UN MODÈLE D'ÉTUDE DES RELATIONS ENTRE MICROTUBULE ET POLARISATION CELLULAIRE (THÈSE FABRICE CAUDRON).</b> .....	<b>32</b>
<b>7. LES LEVURES, UN OUTIL POUR RECHERCHER DES MOLÉCULES INHIBITRICES DE CLIP 170 ET DE EB1.</b>	<b>35</b>
<b>REFRENCES</b> .....	<b>36</b>

## CURRICULUM VITAE

Nom patronymique : BOSCHERON  
Prénom : Cécile  
Date et lieu de naissance : 24/10/71 à Rouen (Seine Maritime).  
Nationalité : Française.  
Situation de famille : Vie en couple avec deux enfants.  
Adresse personnelle : 23 Bd maréchal Leclerc, 38000  
Grenoble, Tel : 06 98 91 71 39.  
Adresse professionnelle : Laboratoire du cytosquelette, CEA /  
DRDC / CS, unité INSERM U366,  
17 rue des martyrs, 38054 Grenoble cedex.  
Tel: 04 38 78 43 25, Mel: [cecile.boscheron@cea.fr](mailto:cecile.boscheron@cea.fr)

## EMPLOIS EXCERCES

Depuis 2000 : Poste de chercheur CEA au Laboratoire du cytosquelette, unité INSERM 366  
CEA Grenoble.

Sujet : L'énigme du cycle de tyrosination : des réponses chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

1998 -1999 : Post Doctorat au Département de Biologie Moléculaire, Université de Genève.

Sujet : "Etude de Dbp5p une protéine nécessaire au transport des ARNm chez la levure  
*Saccharomyces cerevisiae*".

1995 -1998 : Doctorat au Laboratoire de génétique et Biochimie des Télomères, unité CNRS  
UMR49, ENSL. Thèse soutenue le 3/07/98 ayant pour sujet "Interaction à distance dans la  
chromatine : le modèle de la répression généralisée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*"

1992 : Admission à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon.

## **ACTIVITES D'ENCADREMENT ET D'ANIMATION DE LA RECHERCHE**

### **Encadrement de doctorant**

- Depuis Septembre 2002 : Encadrement de la Thèse de Fabrice Caudron  
Sujet : Des microtubules détyrosinés, quelles conséquences pour la cellule ?
- Janvier 2000 – Janvier 2003 : Encadrement de la Thèse d'Anne-Claire Badin-Larçon.  
Soutenue le 28 Janvier 2003 ayant pour sujet : Rôle de l'acide aminé C-terminal de la tubuline alpha au cours du cycle cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae*.  
Ce travail a donné lieu a une publication dans la revue *PNAS* (Badin-Larçon et al., 2004).

### **Encadrement de stagiaires technicien et ingénieur**

- Depuis Mars 2006 : Encadrement du stage de fin de formation de Fanny Joly pour un M1 de diplôme pratique universitaire.
- Depuis Septembre 2005 : Encadrement de Bruno Morino en BTS Alternance.
- Septembre 2003 – Juin 2005 : Encadrement de Mélanie Arboléas en BTS Alternance.
- Septembre 2001 – Juin 2003 : Encadrement de Julien Rozier en BTS Alternance.

## LISTE DES PUBLICATIONS

Caudron, F., Andrieux, A., Job, D. and **Boscheron, C.** (2006) Deciphering the relationship between Bik1p (CLIP170) localization and function in yeast. Soumis.

Badin-Larcon, A.C.\*, **Boscheron, C.\***, Soleilhac, J.M., Piel, M., Mann, C., Denarier, E., Fourest-Lieuvin, A., Lafanechere, L., Bornens, M. and Job, D. (2004) Suppression of nuclear oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* expressing Glu tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 5577-5582. \* Ces auteurs ont également participé au travail. Facteur d'impact 10,4.

Fourel, G.\*, **Boscheron, C.\***, Revardel, E., Lebrun, E., Hu, Y.F., Simmen, K.C., Muller, K., Li, R., Mermod, N. and Gilson, E. (2001) An activation-independent role of transcription factors in insulator function. *EMBO Rep*, **2**, 124-132. \* Ces auteurs ont également participé au travail. Facteur d'impact 7,6.

Lebrun, E., Revardel, E., **Boscheron, C.**, Li, R., Gilson, E. and Fourel, G. (2001) Protosilencers in *Saccharomyces cerevisiae* subtelomeric regions. *Genetics*, **158**, 167-176. Facteur d'impact 4,1.

Schmitt, C., von Kobbe, C., Bachi, A., Pante, N., Rodrigues, J.P., **Boscheron, C.**, Rigaut, G., Wilm, M., Seraphin, B., Carmo-Fonseca, M. and Izaurralde, E. (1999) Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *Embo J*, **18**, 4332-4347. Facteur d'impact 10,5.

Maillet, L., **Boscheron, C.**, Gotta, M., Marcand, S., Gilson, E. and Gasser, S.M. (1996) Evidence for silencing compartments within the yeast nucleus: a role for telomere proximity and Sir protein concentration in silencer-mediated repression. *Genes Dev*, **10**, 1796-1811. Facteur d'impact 16,4.

**Boscheron, C., Maillet, L., Marcand, S., Tsai-Pflugfelder, M., Gasser, S.M. and Gilson, E. (1996) Cooperation at a distance between silencers and proto-silencers at the yeast HML locus. *Embo J*, **15**, 2184-2195. Facteur d'impact 10,5.**

## Aspects majeurs de ma contribution scientifique antérieure.

### 1. Thèse

La première partie de mon activité scientifique a été consacrée à l'étude des mécanismes de répression généralisée de la transcription au sein de domaine de la chromatine. Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de génétique et biochimie des télomères unité CNRS (UMR 49) ENS Lyon 69364 Lyon Cedex 07, sous la direction de Dr Gilson, juillet 95 jusqu'en juillet 98.

#### 4 Contexte international et hypothèse de travail.

Les parties des chromosomes qui restent condensés pendant toute la durée du cycle cellulaire sont appelées hétérochromatiques (Weiler and Wakimoto, 1995). L'hétérochromatine permet la répression transcriptionnelle de gènes placés artificiellement à sa proximité. Chez la levure, une condensation similaire à celle des Métazoaires n'est pas visible. Pourtant, la chromatine silencieuse réprime l'expression de gènes placés à sa proximité. En outre, l'hétérochromatine et la chromatine silencieuse présentent plusieurs caractéristiques communes qui sont une hypoacétylation des histones, une réplication tardive en phase S, une plus faible accessibilité à des enzymes de restriction et enfin une transmission de ces caractères à la chromatine des cellules filles.

Chez la levure, les régions chromosomiques concernées par cette forme de chromatine sont les répétitions télomériques, les loci sexuels *HML* et *HMR* (appelés loci *HM*) et les unités de transcription ribosomiques (Sherman and Pillus, 1997). Chacun de ces domaines présente des séquences particulières qui sont nécessaires à l'initiation d'une chromatine silencieuse. Ces séquences sont des éléments cis-régulateurs appelés silencers, ils encadrent chacun des loci *HM*, constituent les séquences répétées des télomères et sont présent au sein des unités de transcription ribosomique (Sherman and Pillus, 1997). Les silencers sont constitués de un à trois sous-éléments : les proto-silencers (Boscheron *et al.* 1996). Les proto-silencers sont les séquences consensus de fixation pour des protéines de liaison à l'ADN, celles-ci interagissent avec d'autres protéines, les protéines Sirp, formant un complexe nucléoprotéique spécifique (Moretti *et al.* 1996). Ce complexe se propage continuellement sur la chromatine environnante par des interactions spécifiques avec les histones (Hecht *et al.* 1996). Ce modèle linéaire ne prend pas en compte de la possibilité d'interaction à plusieurs milliers de paires de bases de distance entre éléments silencers. Au début de ma thèse, je me suis demandé si des interactions fonctionnelles pouvaient exister entre deux silencers. Dans un deuxième temps, j'ai étudié la possibilité que la proximité physique des loci *HM* vis à vis des télomères aie une importance fonctionnelle dans l'établissement du silencing. En effet, les télomères sont regroupés en

foyers, localisés à la périphérie nucléaire suggérant qu'il puisse exister un compartiment nucléaire qui leur soit spécifique. Enfin, j'ai cherché à savoir si des éléments *cis*-régulateurs pouvaient empêcher des interactions à distance entre deux silenceurs. Ce travail m'a conduit à étudier des séquences d'inhibition du silencing (anti-silencing) dont certaines sont naturellement localisées à proximité des télomères de levure.

#### **4 Méthodologie utilisée**

Nous avons utilisé pour répondre aux questions évoquées ci dessus des gènes rapporteurs. Le premier gène rapporteur que nous avons utilisé est le gène *LacZ* d'*Escherichia coli* fusionné aux signaux d'initiation de transcription et de traduction du gène de levure *LEU2* (*LEU2-lacZ*). Cette construction *LEU2-LacZ* a été intégrée sur le chromosome à la place du locus *HML*. L'utilisation de ce gène nous a permis d'avoir une approche quantitative de son expression au locus *HML* avec des arrangements de silenceurs mutés ou non de chaque côté de ce gène (Figure 1). Nous avons également utilisé un système où un gène (*URA3*) et deux gènes (*URA3* et *TRP1*) ont été intégrés à proximité d'un télomère formé de novo à l'extrémité gauche du chromosome VII. Ce système nous permet de quantifier le silencing au niveau d'un télomère unique. La répression du rapporteur *URA3* est analysée par la résistance à une drogue, le 5-FOA (Acide 5-Fluoro-orotique), qui tue les cellules exprimant ce gène. Nous utilisons également le gène *TRP1* pour lequel nous quantifions l'expression par la quantité de colonies viable par rapport à la quantité de colonies capables de croître sur un milieu sans tryptophane.

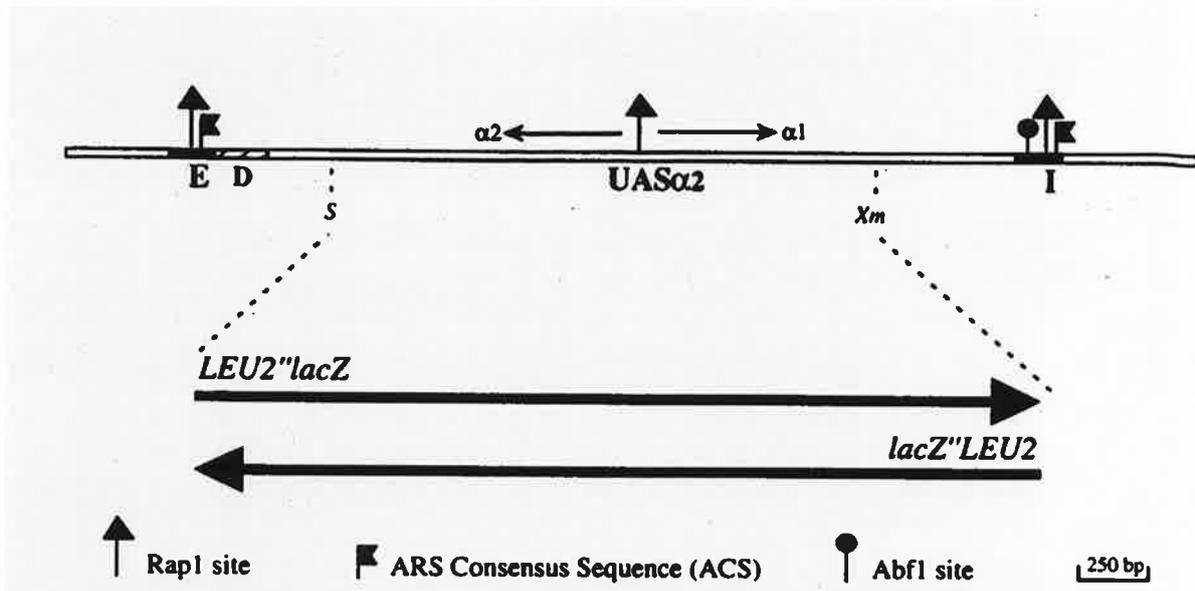


Figure 1 : Représentation du locus *HML* sauvage avec les silenceurs *HML E* et *HML I* et du gène rapporteur *LEU2-LacZ*. Les sites de liaison pour les protéines Rap1p, Abf1p et le complexe ORC sont représentés. Ce sont les proto silenceurs.

#### 4 Résultats obtenus

##### 1. Il existe une coopération à distance à plusieurs milliers de paires de bases entre les deux silenceurs d'HML

Le silencing des loci *HM* lorsqu'il est quantifié est plus fort que celui que l'on peut rencontrer à proximité des répétitions télomériques. Pourtant le nombre de séquences cis-régulatrices qui permettent d'initier la répression est beaucoup plus important à proximité des télomères (vingt sites pour un télomère contre six pour les loci *HM*). L'importance fonctionnelle de la localisation de part et d'autre des silenceurs dans ces loci, pourrait permettre de comprendre ce paradoxe apparent. Nous avons montré que deux silenceurs permettent d'établir une répression supérieure à l'addition de l'effet de chacun d'eux pris séparément. Ce résultat met en évidence une coopération entre les deux silenceurs pour la répression. Deuxièmement, des proto-silenceurs qui n'ont pas d'activité de répression en eux-mêmes, peuvent coopérer avec un silenceur distant de 3-4 kb et permettre une répression presque aussi forte que lorsque deux silenceurs sont présents. De manière intéressante, cette coopération "silenceur/proto-silenceur" n'est détectable que si le promoteur du gène rapporteur est localisé à proximité du silenceur. Cet effet de directionnalité suggère que le proto-silenceur renforce l'effet du silenceur sans agir lui-même en tant que tel. Ces travaux ont été publiés dans l'EMBO J. dans un article où je suis premier auteur (Boscheron et al. 1996).

## 2. Les télomères définissent un compartiment nucléaire fonctionnel pour le silencing

Les loci *HML* et *HMR* sont situés à proximité des télomères : 12,5 et 25 kb respectivement. Dans le but de savoir si cette proximité des loci *HM* par rapport aux télomères est importante pour l'établissement du silencing, les silenceurs du locus *HML*, encadrant les gènes rapporteurs *LEU2-lacZ* ou *URA3*, ont été intégrés à différentes positions loin des extrémités télomériques, par exemple au locus *LYS2* à 342 kb du télomère droit du chromosome II. A cette position ectopique aucun silencing n'est détecté. Par contre si un télomère est artificiellement recréé par fragmentation du chromosome II à 13kb du locus *LYS2* alors le silencing est établi. Ces résultats démontrent la nécessité de la proximité d'un télomère pour l'établissement du silencing aux loci *HM*. Des expériences d'immunofluorescence nous ont permis de montrer que les protéines Sirp sont localisées en foyer à la périphérie nucléaire comme les télomères. Nous proposons un modèle où lorsque les silenceurs sont en position normale, à proximité des télomères, ils sont également dans un compartiment nucléaire avec une forte concentration en protéine Sirp. Alors que lorsqu'ils sont situés loin du télomère, leur capacité à être localisés dans les régions à forte concentration en protéine Sirp est affectée. Ces travaux ont été publiés dans la revue *Genes & development* dans un article où je suis second auteur (Maillet et al. 1996).

## 3-Des éléments isolateur du silencing ont une action indépendante de l'activation de la transcription

Une question d'importance est de savoir quels éléments génétiques régulent la formation de cette chromatine silencieuse. Il apparaît que des sites de liaison pour Tbf1p et l'activateur transcriptionnel Reb1p, présents dans les séquences subtélomérique X et Y', inhibent le silencing télomérique quand ils sont intégrés entre le télomère et un gène rapporteur. Nous avons montré que ces séquences d'ADN subtélomérique jouent le rôle de barrière dans la propagation du silencing. Cette action est indépendante de l'activation transcriptionnelle et est donc appelée isolatrice puisqu'elle se comporte de façon neutre face à la transcription mais isole des influences négatives de la chromatine silencieuse environnante. La fonction d'isolation peut être reproduite en ciblant différents domaines d'activation. Ces résultats permettent de proposer que certains promoteurs agissent comme des isolateurs et permettent la séparation du génome en différents domaines indépendants. Ces travaux ont été publiés dans *l'EMBO rep.* dans un article où je suis co-premier auteur (Fourel et al. 2001).

## 2. Post-Doctorat

Au cours de mon séjour post doctoral dans le laboratoire de E. Izaurralde (Université de Genève-Science II, SUISSE) j'ai participé à l'étude de l'hélicase à ARN Dbp5p. La séquence de la protéine Dbp5 a été conservée au cours de l'évolution et est retrouvée chez l'homme et la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons montré que la protéine humaine présente une localisation majoritairement cytoplasmique avec une fraction associée à l'anneau nucléaire (Schmitt, et al. 1999). Nous avons montré qu'il existe une interaction directe entre Dbp5 et la nucléoporeine Nup159 ainsi que son homologue humain CAN (Schmitt, et al. 1999).

## 3.4 Références

- Boscheron, C., Maillet, L., Marcand, S., Tsai-Pflugfelder, M., Gasser, S.M., and Gilson, E. (1996). Cooperation at a distance between silencers and proto-silencers at the yeast HML locus. *EMBO J.* 15, 2184-2195.
- Fourel, G., Boscheron, C., Revardel, E., Lebrun, E., Hu, Y., Carmine, K., Müller, K., Li, R., Mermoud, N., Gilson, E. (2001). An activation-independent role of transcription factors in insulator function. *EMBO J.* Accepted.
- Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S., and Grunstein, M. (1996). Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* 383, 92-96.
- Maillet, L., Boscheron, C., Gotta, M., Marcand, S., Gilson, E., and Gasser, S.M. (1996). Evidence for silencing compartments within the yeast nucleus: a role for telomere proximity and Sir protein concentration in silencer-mediated repression. *Genes Dev.* 10, 1796-1811.
- Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L., and Shore, D. (1994). Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev.* 8, 2257-2269.
- Sherman, J.M. and Pillus, L. (1997). An uncertain silence [see comments]. *Trends. Genet.* 13, 308-313.
- Weiler, K.S. and Wakimoto, B.T. (1995). Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 29:577-605, 577-605.
- Schmitt, C., von Kobbe, C., Bachi, A., Pante, N., Rodrigues, J.P., Boscheron, C., Rigaut, G., Wilm, M., Seraphin, B., Carmo-Fonseca, M., and Izaurralde, E. (1999). Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *EMBO J.* 18, 4332-4347.

## Programme de recherche actuel.

Depuis 2000, date à laquelle j'ai rejoint le groupe de Didier Job (U366 INSERM / Laboratoire du Cytosquelette, DRDC, CEA-Grenoble), nous avons utilisé la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour caractériser les cibles moléculaires d'une modification post traductionnelle de la tubuline. Cette modification est appelée cycle de tyrosination détyrosination. Elle concerne l'acide aminé C-terminal de la tubuline alpha, une tyrosine, qui est cycliquement clivée de la chaîne polypeptidique par une carboxypeptidase (TCP) et réajouté à cette même chaîne par la tubuline-tyrosine-ligase (TTL) (Ersfeld et al., 1993; Wehland et al., 1984) (Figure 2). Le cycle de tyrosination-détyrosination de la tubuline est connu depuis une trentaine d'années, et il est présent dans la plupart des cellules eucaryotes. Sa fonction est longtemps restée énigmatique. Toutefois ces dernières années, des études menées au laboratoire ont permis d'identifier un rôle important de la tyrosination de la tubuline dans la progression tumorale (Lafanechere et al., 1998; Mialhe et al., 2001) et les effets dramatiques de l'inhibition de la TTL dans la souris (Erck et al., 2005). Pour tenter de comprendre le rôle de ce cycle nous avons produit une souche de levure n'exprimant que de la tubuline alpha sans le dernier acide aminé aromatique (chez la levure, une phénylalanine). Ces cellules ont des défauts de positionnement du noyau en anaphase, indiquant un rôle crucial du C-terminus de la tubuline dans les interactions des microtubules avec les complexes de dynéine corticaux. En accord avec cette hypothèse, nous avons observé dans les cellules exprimant de la tubuline sans l'acide aminé terminal (tubuline Glu), une forte inhibition de l'interaction de la protéine de stabilisation de l'extrémité plus des microtubules Bik1p/CLIP170 avec les extrémités microtubulaire.

Par la suite, le défaut de localisation de la protéine CLIP170, homologue de Bik1p chez les mammifères, a été retrouvé dans les microtubules Glu des cellules de souris où le gène codant pour la Tubuline Tyrosine Ligase est délété. Les protéines Bik1p et CLIP170 vont l'objet d'études intensives depuis quelques années car elles ont des fonctions essentielles dans la polarisation cellulaire via les petites protéines G : Rac et CDC42 ; l'orientation du fuseau mitotique via le complexe dynéine/dynactine et l'ancrage des microtubules au kinétochore.

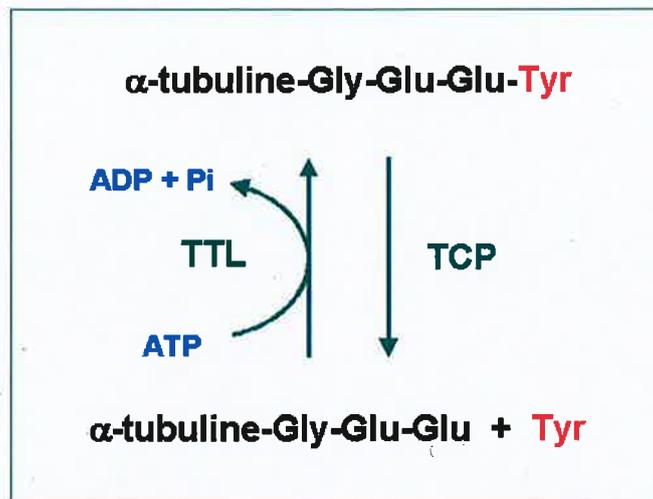


Figure 2: Le cycle de Détyrosination/Tyrosination de la tubuline (Tubuline Tyrosine Ligase (TTL), Tubuline Carboxy Peptidase (TCP))

Les travaux et les projets que je compte mener utilisent les levures produisant une tubuline alpha sans le dernier acide aminé (tubuline Glu) pour comprendre pourquoi les microtubules Glu lient moins bien la protéine Bik1p/CLIP170, en quoi ce défaut affecte les relations entre microtubules et cortex et entre microtubules et polarisation cellulaire.

Les études chez les mammifères ont permis de mettre en avant l'importance du cycle de tyrosination dans la différenciation neuronale (Erck et al., 2005). Il est reconnu que la cellule nerveuse est une cellule hautement polarisée, nous espérons que nos études chez la levure permettront d'apporter des informations sur le fonctionnement des microtubules Glu lors de la polarisation cellulaire. Par ailleurs il a aussi été montré que la TTL est un suppresseur de tumeur. Nous souhaitons comprendre le fonctionnement de Bik1p/CLIP170 dans le déroulement d'une mitose dans les levures Glu et les relations entre protéines des extrémités + des microtubules et le kinétochore. Enfin, une dernière approche plus technologique consistera en la recherche de drogues spécifiques des protéines Bik1p/CLIP170 par une méthode originale.

## 1. Introduction

Les microtubules sont des composants essentiels du cytosquelette des cellules eucaryotes. Ce sont des polymères protéiques de forme cylindrique résultant de l'arrangement adjacent et parallèle de  $13 \pm 2$  protofilaments. Chaque protofilament est constitué par l'assemblage linéaire d'une protéine hétérodimerique, la tubuline, composée des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Les microtubules présentent une polarisation structurale et dynamique. Les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  étant exposées chacune à l'une des deux extrémités du microtubule. D'une part, l'extrémité qui expose la sous unité  $\alpha$  désassemble, elle est appelée extrémité - et est localisée au niveau du centre organisateur (le centrosome chez les mammifères, le Spindle Pole Body chez la levure). D'autre part, l'extrémité qui expose la sous unité  $\beta$  assemble, elle est appelée extrémité + et est localisée au niveau de la périphérie cellulaire.

Le cytosquelette a de nombreuses fonctions. Il a tout d'abord un rôle dans tous les types de mouvements des cellules eucaryotes : contraction musculaire, battement des cils et des flagelles, mouvements mitotiques des chromosomes, et autres. De plus, le cytosquelette est l'unique structure cellulaire qui soit directement en contact avec toutes les organelles cellulaires, du noyau jusqu'au cortex cellulaire. Les microtubules prennent une part intégrante dans les différentes fonctions du cytosquelette. Ils ont plus particulièrement un rôle clé dans la motilité, le transport intracellulaire de vésicules, l'organisation et le positionnement des organelles et dans la mitose pour la ségrégation correcte des chromosomes.

Parallèlement à cette diversité fonctionnelle, les populations de microtubules montrent des différences de stabilité, de morphologie et de composition biochimique. D'une manière générale, les fonctions des microtubules paraissent dépendre en grande partie de la régulation de leur degré d'assemblage et de leur interaction avec d'autres composants de la cellule, grâce à des protéines associées spécifiques (Microtubule Associated Protein : MAP). Des modifications de leur protéine constitutive principale, la tubuline, pourraient aussi directement affecter leur assemblage et leurs propriétés de liaison.

Les microtubules composés d'isotypes de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  existent dans les cellules sous forme d'un mélange de polymères similaires mais non identiques. Cette diversité est générée à deux niveaux : tout d'abord, par la transcription sélective de plusieurs gènes codant pour chaque sous unité ensuite par une variété de modifications post traductionnelles de la

tubuline, comme son acétylation, sa phosphorylation, sa glutamylation, sa polyglycylation ou encore sa tyrosination (Westermann and Weber, 2003). C'est cette dernière modification que j'étudie plus particulièrement.

## 2. Le cycle de tyrosination/détyrosination de la tubuline

Il s'agit de la suppression puis de la réaddition d'un résidu tyrosine sur l'extrémité carboxyterminale de la sous unité  $\alpha$  de la tubuline (Figure 2). Ce cycle, indépendant de la synthèse ribosomale, nécessite de l'ATP et met en jeu des enzymes spécifiques :

- d'une part, une tubuline carboxypeptidase, (TCP), qui n'a pas encore été purifiée à homogénéité (Argarana et al., 1980),
- d'autre part, la tubuline tyrosine ligase (TTL), purifiée à homogénéité (Schroder et al., 1985) et dont le gène a été cloné (Ersfeld et al., 1993).

Le cycle de tyrosination/détyrosination est spécifique du système microtubulaire. Il est conservé au sein des eucaryotes supérieurs.

La TTL et la TCP montrent des spécificités de substrat opposées : il a été montré que la TTL agit préférentiellement sur la tubuline libre et la TCP sur la tubuline assemblée en microtubules.

Par conséquent, les microtubules nouvellement assemblés sont principalement composés de tubuline tyrosinée (tubuline Tyr), alors que les microtubules stables sont principalement constitués de microtubules détyrosinés (tubuline Glu) (Lafanechere and Job, 2000). Néanmoins, l'étude des microtubules formés *in vitro* de tubuline Tyr pure ou de tubuline Glu pure n'a pas montrée de différence notable entre les deux types de polymères (Paturle et al., 1989). Dans les cellules, bien que les microtubules stables soient riches en tubuline Glu, il a été montré que la détyrosination n'est pas directement responsable de cette stabilité accrue (Wehland and Weber, 1987). Une troisième population de tubuline a été observée, il s'agit de tubuline qui ne peut être tyrosinée. Elle résulte du clivage de l'acide aminé carboxy terminal de la tubuline alpha Glu (Lafanechere et al., 1998). Cette modification est irréversible elle génère de la tubuline  $\Delta 2$  qui est retrouvée majoritairement, comme la tubuline Glu, dans les neurones (Erck et al., 2005) (Paturle-Lafanechere et al., 1994).

Le laboratoire de D. Job en collaboration avec diverses équipes a montré que l'inhibition du cycle de tyrosination-détyrosination avait des conséquences profondes sur la physiologie de la cellule.

Il a d'abord été établi un rôle de la tyrosination de la tubuline dans la progression tumorale en montrant successivement que la TTL se comportait comme un suppresseur de tumeur potentiel dans des modèles animaux (Lafanechere et al., 1998). Dans la continuité de ces travaux une étude sur des tumeurs mammaires chez la femme a permis de montrer que l'activité TTL était souvent supprimée et que celle-ci était corrélée avec un mauvais pronostic (Mialhe et al., 2001).

Les relations entre la tyrosination de la tubuline et le cycle cellulaire ont été testées sur l'oocyte d'étoile de mer. Dans l'oocyte d'étoile de mer, le blocage du C-terminus de la tubuline alpha par divers anticorps induit une inhibition de la division des oocytes, par blocage de la synthèse de cycline B et, indépendamment de cet effet, un blocage de l'assemblage du fuseau (Vee et al., 2001). Il a été montré que tous ces effets témoignent d'un rôle de la tubuline et de son C-terminus tyrosiné dans des processus de signalisation, et non sur l'assemblage de la tubuline en microtubules. De manière innovante, ces données suggèrent un rôle de la tubuline dans la signalisation mitotique.

Une autre approche, réalisée au laboratoire de D. Job, a été de générer une souris invalidée génétiquement pour le gène de la TTL. Les souriceaux homozygotes pour cette mutation meurent de troubles du système nerveux central quelques heures après leur naissance (Erck et al., 2005) montrant le caractère essentiel de cette enzyme.

### 3. La levure *Saccharomyces cerevisiae*, un modèle d'étude du C-terminus de la tubuline $\alpha$ (Travail de thèse Anne-Claire Badin).

Dans ce contexte, une préoccupation majeure du laboratoire de D. Job était d'identifier les mécanismes moléculaires affectés par la détyrosination de la tubuline et les raisons pour lesquelles cette détyrosination facilite la progression tumorale. Pour cela, lors de mon arrivée, Didier Job m'a proposé d'encadrer une étudiante en thèse (Dr Anne-Claire Badin) pour mener des approches génétiques dans la levure.

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* la tubuline alpha est codée principalement par le gène *TUB1*, un second allèle représentant 10% de la tubuline  $\alpha$  est codé par le gène *TUB3*. Le C-terminus de la tubuline  $\alpha$  a une séquence (Glu-Glu-Phe) analogue à celle des tubulines de mammifères (Glu-Glu-Tyr). Cette levure contient également un gène codant pour une protéine analogue à la TTL.

Nous avons développé des souches de levure contenant uniquement le gène *TUB1*, (dépourvue de gène *TUB3*), soit sous sa forme sauvage (souche *TUB1*) soit sous une forme mutée, codant pour une alpha tubuline dépourvue de phénylalanine C-terminale (souche *tub1-Glu*). La première observation que nous avons faite est que dans les souches *tub1-Glu*, toute l'alpha tubuline est sous forme Glu. L'homologue séquentiel de la TTL ne semble donc pas avoir l'activité tyrosine ligase chez la levure. D'un point de vue pratique, l'obtention de souches *tub1-Glu* stables permet par comparaison avec les souches *TUB1* de tester dans la levure le rôle de l'acide aminé C-terminal de la tubuline alpha. Les souches *tub1-Glu* miment ce qui se passe dans les cellules tumorales dépourvues de TTL, avec la réserve que dans ces dernières on trouve toujours de la tubuline Tyr provenant de la néo synthèse de tubuline. Dans les souches *tub1-Glu* de levure au contraire, la néo synthèse de tubuline alpha produit toujours de la tubuline Glu, et le système est, en quelque sorte, pur.

Nous nous sommes attachés à phénotyper cette souche Glu. Comparées aux souches contrôles, les souches *tub1-Glu* présentent une hypersensibilité au bénomyl (une drogue dépolymérisante des microtubules), et une croissance réduite. Ce phénotype est surtout clair à des températures inférieures à 20°C. A ces températures, en G2, les cellules *tub1-Glu* ont le noyau localisé au centre de la cellule au lieu d'être localisé à proximité du cou séparant cellules mères et fillé.

L'observation des levures en vidéo microscopie nous a permis d'identifier plus précisément le mécanisme impliqué dans les défauts de positionnement du noyau.

Dans les souches contrôles, le noyau oscille entre la cellule mère et la fille juste avant l'anaphase et ce phénomène est important pour permettre une migration nucléaire normale. Dans les souches *tub1-Glu*, les mouvements du noyau en mitose sont profondément perturbés (Figure 3). Ces oscillations du noyau sont connues pour dépendre des complexes de dynéine corticaux qui comprennent Bik1p, Pac1p, la dynactine Nip100p et un ancrage membranaire via Num1p (Farkasovsky and Kuntzel, 2001; Sheeman et al., 2003). Ces protéines appartiennent à la même voie génétique que la dynéine (Carminati and Stearns, 1997). En accord avec cette hypothèse, nous avons observé une forte inhibition de l'interaction de Bik1p avec les extrémités microtubulaire, dans les cellules exprimant de la tubuline « détyrosinée » (tubuline Glu) (Figure 4) (Badin-Larcon et al., 2004).

Ce travail a fait l'objet d'un commentaire dans la même revue le mois suivant (Bloom, 2004) car il présente la première caractérisation moléculaire de la fonction d'une modification post traductionnelle de la tubuline. Par la suite, le défaut de localisation de la protéine Bik1p a été retrouvé avec son homologue CLIP170 dans des cellules de souris où le gène de la TTL est délété (Erck et al., 2005).

Chez les mammifères, dans les cellules épithéliales MDCK, l'orientation du fuseau mitotique est contrôlée par des protéines conservées entre la levure et l'homme il s'agit de la dynéine, de Pac1p l'orthologue de la protéine de lissencéphalie LIS1 et de Bik1p l'orthologue de CLIP170 (Busson et al., 1998; Dujardin and Vallee, 2002). Des défauts de la régulation de l'orientation du fuseau mitotique ont également été retrouvés dans les cellules TTL – de souris (Peris et al., 2006). Ce dernier résultat pourrait être une des raisons pour lesquelles la suppression de la TTL favorise la progression tumorale. Effectivement, l'orientation du fuseau mitotique est intimement liée à l'orientation du plan de division qui est un des éléments assurant la cohérence d'un tissu épithélial.

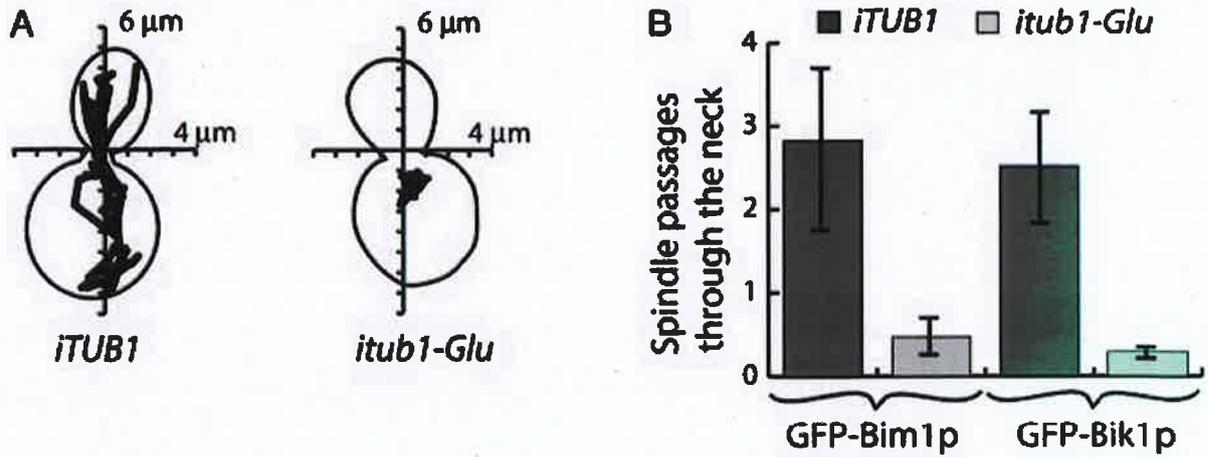


Figure 3 : Inhibition des oscillations nucléaire au sein de la souche *tub1-Glu*.

(A) Le déplacement du fuseau a été suivi pendant trente minutes à l'aide de la protéine de fusion GFP-Bim1. Deux tracés représentatifs de la situation quantifiée en (B) sont montrés.

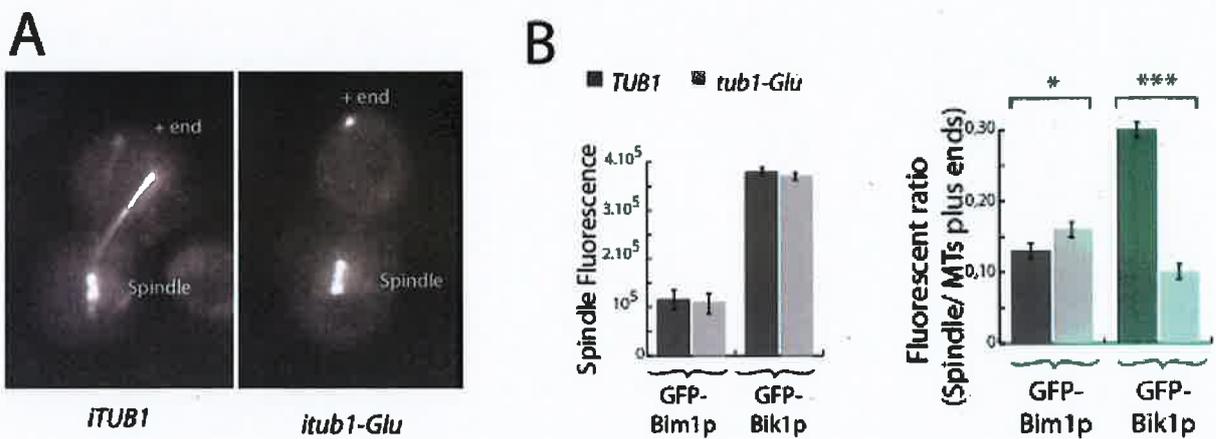


Figure 4 : Inhibition de la localisation de Bik1p dans les souches *tub1-Glu*.

(A) Localisation sur de la protéine GFP-Bik1p dans les souches *TUB1* et *tub1-Glu*. (B) Quantification des signaux de fluorescence dans les souches *TUB1* et *tub1-Glu* sur le fuseau mitotique et sur les extrémités microtubulaires avec les protéines GFP-Bik1p et GFP-Bim1p.

#### 4. Les levures détyrosinées, un modèle d'étude des protéines s'associant aux extrémités plus des microtubules (Travail de thèse Fabrice Caudron).

Les travaux précédents ont mis en évidence l'importance de la tyrosination dans l'interaction entre Bik1p/CLIP170 et les microtubules.

Les protéines qui se lient de façon spécifique aux extrémités + des microtubules font l'objet d'étude intensives depuis leur mise en évidence avec la localisation de CLIP170 en 1999 (Diamantopoulos et al., 1999; Perez et al., 1999). Parmi ces protéines on retrouve les protéines présentant un domaine de liaison aux microtubules riche en glycine (domaine CAP-Gly). On trouve également les protéines de la famille de EB1. Enfin on trouve également diverses protéines dont la dynéine cytoplasmique (voir pour revue (Galjart and Perez, 2003) et Table I).

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sc)	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Sp)	Vertebrates	Protein domains
Bim1p	Mal3p	EB1, EB2 (RP1), EB3	Calponin homology
Bik1p	Tip1p	CLIP170, CLIP115	CAP-Gly, metal binding
Nip100p	Ssm4p	p150Glued (Dynactin)	CAP-Gly
Dyn1p	Dhc1p	Chaîne lourde de la dynéine	Domaine moteur de la dynéine
Pac1p	x	Lissencephalie (LIS1)	Répétitions WD40
Stu1p	x	CLASP1 (Xorbit), CLASP2	Répétition HEAT
Stu2p	x	XMAP215 (chTOG)	Répétitions HEAT
Bud14p	Tea4p	x	SH3
Kel1p, Kel2p	Tea1p	x	Répétition Kelch
Kip2p	Tea2p	x	Domaine moteur kinésine
Kar9p	x	APC, APC2 (APCL)	

Table 1 : Principales protéines liant l'extrémité + des microtubules chez les deux levures et chez les Mammifères.

Une des questions posée est de savoir comment des protéines capables d'interagir *in vitro* sur toute la longueur des microtubules se retrouvent *in vivo* localisées à une de ses extrémités. Effectivement, seul un petit nombre de ses protéines interagissent préférentiellement *in vitro* avec les extrémités des microtubules stabilisés au taxol. Il s'agit des protéines de la levure Sc Stu2p et de la kinésine 14 Kar3p (Lansbergen and Akhmanova, 2006). Plusieurs protéines des bouts + des microtubules sont emmenées à ces extrémités par des moteurs moléculaires de type kinésine. C'est le cas chez la levure Sc de la kinesine Kip2p qui transporte Bik1p auquel est accrochée la dynéine et chez la levure Sp avec la kinesine Tea2p qui transporte la protéine Tip1p (Busch and Brunner, 2004; Komarova et al., 2005). Chez les mammifères CLIP170 interagit préférentiellement avec la tubuline libre et co-assemblerai sur l'extrémité plus des microtubules (Arnal et al., 2004; Folker et al., 2005). Enfin, de nombreuses protéines de bout + interagissent entre elles permettant la localisation des autres. De manière surprenante la famille des protéines EB1 est capable d'interagir avec presque toutes les autres protéines de bout + des microtubules.

Une autre question concerne la fonction de ces protéines aux extrémités + des microtubules ainsi que les relations entre leur localisation et leur fonction. Chez la levure les protéines Bik1p et Bim1p sont toutes deux localisées aux extrémités + des microtubules. Elles appartiennent à deux voies génétiques redondantes permettant le positionnement et la migration du fuseau mitotique entre la cellule mère et la cellule fille. La double délétion *BIMI* / *BIK1* est létale. Ces deux protéines permettent le positionnement et la migration du noyau par le couplage entre les extrémités des microtubules et d'autres structures cellulaires comme le cytosquelette d'actine pour Bim1p et le cortex pour Bik1p. Les souches de levure Glu sont un système expérimental original qui nous permet de comprendre les paramètres qui régulent la localisation de Bik1p sur les microtubules cytoplasmiques ainsi que les fonctions associés à cette localisation. Effectivement, dans ces souches, la protéine Bik1p voit son interaction directement inhibée avec les microtubules Glu alors que son expression, sa localisation au SPB et sur le fuseau mitotique ne sont pas affectées (Badin-Larcon et al., 2004).

### **Paramètres contrôlant l'association de Bik1p aux microtubules Glu.**

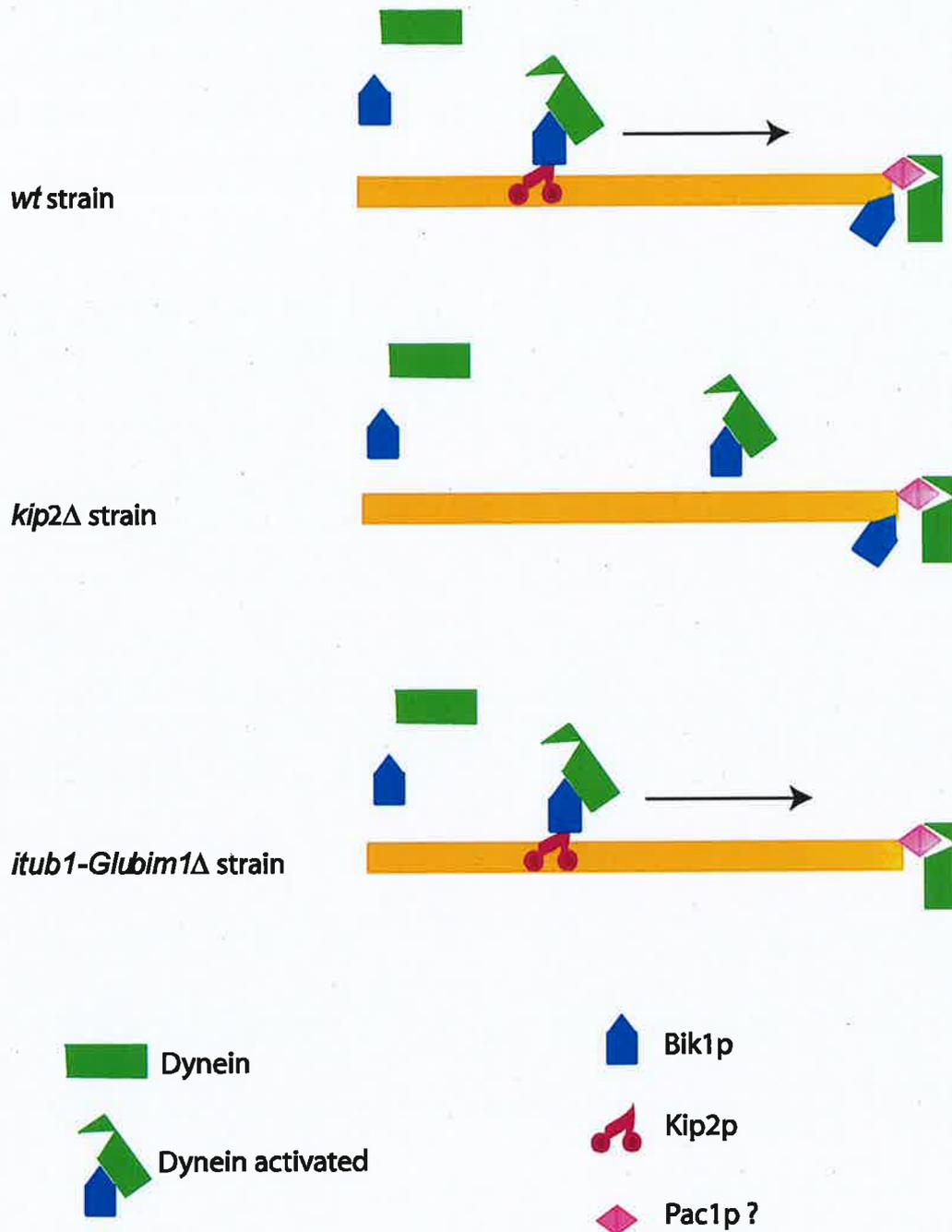
Nous avons cherché à connaître les paramètres qui contrôlent l'association résiduelle de Bik1p sur la tubuline Glu. Nous avons dans un premier temps testé l'influence de Bim1p qui interagit avec Bik1p (Lin et al., 2001) et dont les homologues chez les mammifères et chez la levure *Sp* sont déterminants pour la localisation de CLIP170. Nous observons qu'en l'absence de la protéine Bim1p, les souches de levure Glu *bim1Δ*, perdent tout signal cytoplasmique de Bik1p alors que cette délétion n'a pas d'effet dans les souches contrôles. L'effet de Bim1p sur la localisation de Bik1p dans les souches Glu est dosage dépendant. Ces résultats indiquent que dans les levures Glu Bik1p interagit avec l'extrémité des microtubules par l'intermédiaire de Bim1p. Par ailleurs, si nous sur exprimons la protéine Bik1p nous nous apercevons que Bim1p n'est plus requis pour l'association de Bik1p sur les extrémités de microtubules Glu. Ces résultats nous permettent de proposer que l'association de Bik1p avec l'extrémité des microtubules dépende d'au moins trois paramètres indépendant qui sont par ordre d'importance : une tubuline alpha sauvage, la concentration cellulaire de Bik1p et enfin la présence de Bim1p (Figure 5). Effectivement, dans la souche *tub1-Glu*, Bik1p interagit beaucoup plus faiblement avec les microtubules Glu révélant des conditions qui facilitent cette association comme sa surexpression ou la présence de Bim1p. Nous proposons également que l'action de Bim1p ne soit pas de lier directement Bik1p mais passe par une modification de la dynamique ou de la structure des extrémités + des microtubules.



l'activer. Dans une souche Glu *bim1* $\Delta$  la dynéine est transportée et activée par Bik1p. L'activation lui permet d'interagir avec l'extrémité des microtubules en l'absence de quantités détectables de Bik1p.

### **Relations entre fonction et localisation de Bik1p**

Dans ces conditions, nous avons formulé l'hypothèse que la viabilité des souches de levure Glu *bim1* $\Delta$  était liée au fonctionnement normal de la dynéine. Afin de tester cette hypothèse et puisque la double délétion de *BIMI* et *DYN1* est létale, nous avons invalidé le gène codant pour la kinésine *KIP2* pour abolir le transport de la dynéine aux extrémité +. La double délétion de *BIMI* et de *KIP2* n'est pas létale dans les souches contrôle. Par contre, nous observons une baisse de la viabilité des souches Glu *bim1* $\Delta$  *kip2* $\Delta$ . La moitié des spores attendues sont viables avec une courbe de croissance normale. Ces cellules ont perdues les interactions connues et détectables avec le cortex. Elles utilisent la forme ovale de la cellule comme mode de positionnement du fuseau le long de l'axe fille - mère.



**Figure 5 : Un modèle pour l'association de la dynéine avec l'extrémité des microtubules dans différentes souches. La localisation de la dynéine à ces extrémités est complètement abolie dans des souches sans Bik1p. Nous proposons que Bik1p permettent une activation de la dynéine qui permet son interaction avec une protéine qui pourrait être Pac1p. Dans la souche *tub1-Glu bim1* le transport de la dynéine est normal, ce qui permet l'activation et la localisation de la dynéines aux extrémités des microtubules**

Cette observation s'inscrit dans des recherches récentes montrant qu'en l'absence d'élément de positionnement corticaux le fuseau s'aligne le long du plus grand axe (Strauss et al., 2006).

Les protéines Bik1p et Dynéine sont nécessaire à la viabilité des levures dans un fond génétique délété pour *BIM1*. Elles doivent donc jouer un rôle essentiel dans les souches Glu *bim1Δ kip2Δ* malgré leur suppression des extrémités + des microtubules. L'hypothèse la plus simple est que ces protéines soient aussi impliquées dans le positionnement gouverné par la forme de la cellule. Effectivement dans cette situation les pôles du fuseau sont directement en contact avec le cortex et les protéines Bik1p et Dynéine sont encore localisées sur les pôles. Une autre hypothèse est que La dynéine et Bik1p soient impliquées dans des mécanismes essentiels indépendant du positionnement du noyau le long de l'axe mère – fille. Il est particulièrement frappant de noter que tout comme la dynéine et Bik1p la protéine Bim1p est aussi localisée au niveau des SPB et au sein du fuseau. Ces protéines pourraient avoir des redondances de fonction indépendamment des mécanismes de positionnement du noyau sur la morphogenèse ou la dynamique des SPB ou du fuseau mitotique.

Il existe donc plusieurs fonctions essentielles de Bik1p. La première est de permettre le transport de la dynéine aux bouts + des microtubules cytoplasmiques. La seconde est probablement encore liée à son interaction avec la dynéine permettant son action ou son recrutement aux SPB.

## 5. Les levures détyrosinées, un modèle d'étude de la fonction de CLIP170

### pendant la mitose.

Nous avons vu qu'il existe des fonctions essentielles de Bik1p indépendantes de sa localisation aux extrémités des microtubules cytoplasmiques. Une première hypothèse est que Bik1p aie des fonctions au SPB, sur les microtubules intranucléaire ou aux kinétochores puisque sa localisation demeure détectable dans ces domaines. Pour tester cette hypothèse nous nous proposons de construire un mutant thermosensible de *BIK1* dans une souche *bim1Δ*. Dans ce contexte nous devrions pouvoir étudier les fonctions de Bik1p au cours de la mitose, sur le SPB et sur les microtubules intranucléaire. Pour cela nous étudierons le déroulement de la mitose à température restrictive par des expériences de vidéo microscopie avec le marquage de la tubuline, des SPB ou des centromères. Concernant les fonctions sur le kinétochore, nous analyserons la composition du kinétochore par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine.

Les expériences que nous avons réalisées jusqu'à présent nous ont montré qu'il existe des fonctions essentielles de Bik1p indépendantes de sa localisation aux extrémités des microtubules cytoplasmique mais aussi que de telles fonctions essentielles existent pour la dynéine. Chez les métazoaires, la dynéine est nécessaire à l'organisation du fuseau mitotique et à la rupture de l'enveloppe nucléaire. Nous nous proposons donc d'étudier les fonctions de cette protéine sur le SPB où elle est encore localisée dans les souches *tub1-Glu bim1 kip2*. Pour cela nous construirons un mutant thermosensible de *DYNI* dans une souche *bim1Δ*.

Une dernière question est l'importance de ces protéines sur la ségrégation du matériel génétique. Nous avons évoqué le rôle de la tyrosination de la tubuline dans la progression tumorale (Lafanechere et al., 1998; Mialhe et al., 2001), des effets dramatiques de l'inhibition de la TTL dans la souris (Erck et al., 2005), l'observation que la TTL est fréquemment supprimée lors de la progression tumorale et enfin que cette suppression et la détyrosination massive de la tubuline qui en résulte sont associées a une agressivité tumorale augmentée (Kato et al., 2004; Mialhe et al., 2001). Une hypothèse reste donc que la détyrosination aie une action sur la séparation fidèle des chromosomes. Pour tester cette hypothèse nous proposons d'utiliser la création d'un mini chromosomes portant le gène codant pour la GFP

(Hegemann et al., 1999). Nous quantifierons la ségrégation de ce mini chromosome au cours de la mitose dans les souches *TUB1 bim1*, *tub1-Glu bim1* et dans ces mêmes souches avec les mutants thermosensibles de *BIK1* et de la dynéine.

## **6. Les levures détyrosinées, un modèle d'étude des relations entre microtubule et polarisation cellulaire (Thèse Fabrice Caudron).**

Nous avons déterminé que les levures détyrosinées sont un modèle pour comprendre l'effet de la tyrosination chez les métazoaires. Nous avons donc utilisé cet outil génétique pour connaître les gènes qui compensent l'effet de cette mutation. Pour cela nous avons utilisé l'approche de synthèse létalité qui permet de découvrir les gènes non essentiels en eux – même mais essentiels en combinaison avec la mutation Glu. Ce crible permet de connaître les gènes qui agissent dans une voie indépendante mais dont la fonction est redondante avec la mutation Glu.

L'équipe d'Alain Nicolas (Institut Curie, Paris) a développé un crible primaire automatisé qui permet de sélectionner des candidats qui sont ensuite vérifiés en dissection de tétrade. Nous avons établi une collaboration avec le groupe d'Alain Nicolas pour utiliser ce crible et pour profiter des connaissances dont ils disposent dans ce domaine. Nous avons réalisé deux cribles dans le fond génétique utilisé, un pour l'invalidation de *tub3* (allèle non essentiel et codant pour 10% de la tubuline alpha total) et un pour l'invalidation de *tub3* combiné à la mutation *tub1-Glu*. Le principe du crible repose sur le croisement de la souche Glu avec une collection de mutants non essentiels (4500 gènes sur les 6000 présents chez *Sc*). Les diploïdes résultants sont sélectionnés sur un milieu adéquat et mis à sporuler. Enfin on étale les spores sur un milieu qui permet de sélectionner les haploïdes présentant la triple mutation *tub3*, *tub1-Glu* et gène X. Si rien ne pousse sur ce dernier milieu c'est que le gène considéré est synthétique létal avec la mutation Glu. Nous avons trouvé un gène synthétique létal avec *tub3*, huit gènes synthétique létaux avec *tub3*, *tub1-Glu* et un gène synthétique létal avec *tub1-Glu* (Table 2).

Gène ORF	Interaction génétique	Description
<i>CIN8</i>	SL avec <i>tub3</i>	Kinésine mitotique
<i>TUP1</i>	SL faible avec <i>tub3, tub1-Glu</i>	Répresseur général de la transcription
<i>HTZ1</i>	SL faible avec <i>tub3, tub1-Glu</i>	Histone, impliquée dans le contrôle de la régulation de transcription
YCL060C	SL avec <i>tub3, tub1-Glu</i>	ORF hypothétique
YKL031W	SL avec <i>tub3, tub1-Glu</i>	ORF hypothétique
<i>FKS1</i>	SG avec <i>tub3, tub1-Glu</i>	Sous unité catalytique d'une 1-3 bêtaglucane synthase impliquée dans la synthèse et la maintien de la paroi cellulaire
<i>CDC50</i>	SL faible avec <i>tub3, tub1-Glu</i>	Protéine endosomale qui régule la polarité cellulaire
<i>MNN9</i>	SL faible avec <i>tub3, tub1-Glu</i>	Sous unité d'une mannosyl transferase du golgi qui sert à l'élongation du squelette des mannanes
<i>BTS1</i>	SL avec <i>tub3, tub1-Glu</i>	Géranylgeranyl di phosphate synthase requise pour l'attachement de protéines à la membrane
<i>VPS15</i>	SL avec <i>tub1-Glu</i>	Sérine/Thréonine protéine kinase impliquée dans le tri des protéines vacuolaires

Table 2 : Gènes interagissant génétiquement avec *tub3* et *tub1-Glu*. Les candidats confirmés en dissection de tétrade sont repris dans ce tableau avec une brève description de leur fonction. Interactions génétiques : SL, synthétique létalité ; SG, croissance réduite. La létalité synthétique est décrite comme faible, lorsque quelques triples mutants ont été retrouvés mais dans la majorité des cas la combinaison des trois mutations est létale.

En ce qui concerne les synthétiques létaux avec *tub3*, nous trouvons *CIN8* comme cela avait déjà été décrit (Tong et al., 2001; Tong et al., 2004).

Les gènes les plus intéressants sont sans doute *BTS1*, *VPS15*, *CDC50* et *FKS1*. Ils sont impliqués dans l'adressage aux membranes, le trafic vacuolaire et la polarité cellulaire. Une première constatation est que ces gènes ont tous à voir avec la polarité ou la morphogénèse de la membrane. Ce fait nous a initialement beaucoup surpris mais il pourrait montrer l'importance des complexes de l'extrémité plus des microtubules dans les contacts avec le cortex.

*FKS1* code avec son homologue *FKS2* pour la sous unité catalytique de la 1,3  $\beta$  glucan synthase qui permet la production du 1,3  $\beta$  glucan constituant 50 à 60 % de la paroi cellulaire chez *Sc*. Cette enzyme interagit et est activée par la petite protéine G Rho1p (Drgonova et al.,

1996; Qadota et al., 1996). D'autre part, en affectant l'activité de la 1,3  $\beta$  glucan synthase on bloque le cycle cellulaire et ce blocage dépend de la protéine à domaine CAP-Gly Nip100p et des autres constituants de la dynactine (Suzuki et al., 2004). Afin de comprendre pourquoi la 1,3  $\beta$  glucan synthase a des fonctions redondantes avec la tyrosination de la tubuline nous avons étudié l'influence du régulateur de Fks1p : la protéine Rho1p. Cette protéine existe sous une forme liée au GTP active et une forme liée au GDP inactive. Nous avons utilisé un mutant qui a une cinétique d'hydrolyse du GTP réduite conduisant à l'équivalent d'un mutant super actif. Nous montrons que ce mutant permet une localisation accrue de Bik1p/CLIP170 à l'extrémité des microtubules dans les cellules contrôles et dans les cellules Glu. C'est la première fois qu'une relation directe entre les éléments de polarisation cellulaire et la protéine Bik1p est mise en évidence. Nous voulons maintenant comprendre comment cette régulation de la localisation de Bik1p est mise en place et nous analysons différents mutants pour identifier la voie affectée. Ce travail est à mettre en perspective avec des observations similaires effectuées dans les cellules de mammifères pour la localisation de CLIP170 dans des domaines où les petites protéines G, Rho et Rac sont activées (L.Peris et D. Job, communication personnelle).

BTS1, VPS15, CDC50 ces trois gènes codent respectivement une enzyme permettant l'accrochage à la membrane des petites protéines G, une kinase impliquée dans le tri vacuolaire et une protéine endosomale régulant la polarité cellulaire. Nous voulons comprendre quelle est la relation entre la fonction de ces gènes et les microtubules. Pour cela nous allons effectuer une série de test et analyser le fonctionnement des microtubules et des protéines des extrémité + des microtubules dans chacun des simples mutants *bts1*, *vps15*, *cdc50*.

## 7. Les levures, un outil pour rechercher des molécules inhibitrices de CLIP

### 170 et de EB1.

L'obtention d'inhibiteurs chimiques des protéines CLIP170 et EB1 serait des outils utiles pour des études de biologie fondamentale. D'autre part, EB1 est impliquée dans des cancers du colon et ces inhibiteurs pourraient être testés sur l'animal entier comme anti-cancéreux potentiel (Berrueta et al., 1998; Bienz, 2002). Pour CLIP170, cette protéine serait impliquée dans le fonctionnement du système nerveux central (Galjart N. communication personnelle). Un inhibiteur serait une molécule intéressante à tester sur l'animal entier.

A cette fin nous nous voulons utiliser une approche originale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Dans cet organisme de nombreux criblages ont été réalisés. La lecture de l'effet d'une molécule chimique se fait en densité optique et reflète la croissance et la viabilité cellulaire.

Chez la levure, les homologues de CLIP170 (Bik1p) et EB1 (Bim1p) ne sont pas essentiels en eux-mêmes mais ils sont vitaux lorsqu'ils sont invalidés ensemble. Le principe du test repose sur cette propriété.

Nous allons nous placer dans une souche invalidée génétiquement pour *BIMI* ou *BIK1*, dans ces deux souches la viabilité dépend respectivement de la fonction des protéines Bik1p ou Bim1p. Une molécule inhibant la protéine restante (Bik1p ou Bim1p) entraînera une perte de la viabilité. Comme cette propriété se vérifie aussi pour une inhibition d'une protéine de la même voie que Bik1p ou Bim1p nous rechercherons les molécules qui peuvent aussi inhiber CLIP170 ou EB1.

Afin de connaître l'effet des molécules chimiques sélectionnées, nous disposons des systèmes mammifères et levure pour tester la localisation et la fonction des protéines CLIP170 et EB1. Nous pourrions déterminer si les touchent ont pour cible ces protéines ou si elles touchent des effecteurs amont.

## REFERENCES

- Argarana, C.E., Barra, H.S. and Caputto, R. (1980) Tubulin-tyrosine carboxypeptidase from chicken brain: properties and partial purification. *J Neurochem*, **34**, 114-118.
- Arnal, I., Heichette, C., Diamantopoulos, G.S. and Chretien, D. (2004) CLIP-170/tubulin-curved oligomers coassemble at microtubule ends and promote rescues. *Curr Biol*, **14**, 2086-2095.
- Badin-Larcon, A.C., Boscheron, C., Soleilhac, J.M., Piel, M., Mann, C., Denarier, E., Fourest-Lieuvin, A., Lafanechere, L., Bornens, M. and Job, D. (2004) Suppression of nuclear oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* expressing Glu tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 5577-5582.
- Berrueta, L., Kraeft, S.K., Tirnauer, J.S., Schuyler, S.C., Chen, L.B., Hill, D.E., Pellman, D. and Bierer, B.E. (1998) The adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10596-10601.
- Bienz, M. (2002) The subcellular destinations of APC proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 328-338.
- Bloom, K. (2004) Microtubule composition: cryptography of dynamic polymers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6839-6840.
- Busch, K.E. and Brunner, D. (2004) The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules. *Curr Biol*, **14**, 548-559.
- Busson, S., Dujardin, D., Moreau, A., Dompierre, J. and De Mey, J.R. (1998) Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr Biol*, **8**, 541-544.
- Carminati, J.L. and Stearns, T. (1997) Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J Cell Biol*, **138**, 629-641.
- Diamantopoulos, G.S., Perez, F., Goodson, H.V., Batelier, G., Melki, R., Kreis, T.E. and Rickard, J.E. (1999) Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *J Cell Biol*, **144**, 99-112.
- Drgonova, J., Drgon, T., Tanaka, K., Kollar, R., Chen, G.C., Ford, R.A., Chan, C.S., Takai, Y. and Cabib, E. (1996) Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science*, **272**, 277-279.
- Dujardin, D.L. and Vallee, R.B. (2002) Dynein at the cortex. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 44-49.
- Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A.D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saoudi, Y., Pointu, H., Bosc, C., Salin, P.A., Job, D. and Wehland, J. (2005) A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Ersfeld, K., Wehland, J., Plessmann, U., Dodemont, H., Gerke, V. and Weber, K. (1993) Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. *J Cell Biol*, **120**, 725-732.
- Farkasovsky, M. and Kuntzel, H. (2001) Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast. *J Cell Biol*, **152**, 251-262.
- Folker, E.S., Baker, B.M. and Goodson, H.V. (2005) Interactions between CLIP-170, tubulin, and microtubules: implications for the mechanism of Clip-170 plus-end tracking behavior. *Mol Biol Cell*, **16**, 5373-5384.
- Galjart, N. and Perez, F. (2003) A plus-end raft to control microtubule dynamics and function. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 48-53.

- Hegemann, J.H., Klein, S., Heck, S., Guldener, U., Niedenthal, R.K. and Fleig, U. (1999) A fast method to diagnose chromosome and plasmid loss in *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Yeast*, **15**, 1009-1019.
- Kato, C., Miyazaki, K., Nakagawa, A., Ohira, M., Nakamura, Y., Ozaki, T., Imai, T. and Nakagawara, A. (2004) Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *Int J Cancer*, **112**, 365-375.
- Komarova, Y., Lansbergen, G., Galjart, N., Grosveld, F., Borisy, G.G. and Akhmanova, A. (2005) EB1 and EB3 Control CLIP Dissociation from the Ends of Growing Microtubules. *Mol Biol Cell*, **16**, 5334-5345.
- Lafanechere, L., Courtoy-Cahen, C., Kawakami, T., Jacrot, M., Rudiger, M., Wehland, J., Job, D. and Margolis, R.L. (1998) Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *J Cell Sci*, **111 ( Pt 2)**, 171-181.
- Lafanechere, L. and Job, D. (2000) The third tubulin pool. *Neurochem Res*, **25**, 11-18.
- Lansbergen, G. and Akhmanova, A. (2006) Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic*, **7**, 499-507.
- Lin, H., de Carvalho, P., Kho, D., Tai, C.Y., Pierre, P., Fink, G.R. and Pellman, D. (2001) Polyploids require Bik1 for kinetochore-microtubule attachment. *J Cell Biol*, **155**, 1173-1184.
- Mialhe, A., Lafanechere, L., Treilleux, I., Peloux, N., Dumontet, C., Bremond, A., Panh, M.H., Payan, R., Wehland, J., Margolis, R.L. and Job, D. (2001) Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. *Cancer Res*, **61**, 5024-5027.
- Paturle-Lafanechere, L., Manier, M., Trigault, N., Pirollet, F., Mazarguil, H. and Job, D. (1994) Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J Cell Sci*, **107 ( Pt 6)**, 1529-1543.
- Paturle, L., Wehland, J., Margolis, R.L. and Job, D. (1989) Complete separation of tyrosinated, detyrosinated, and nontyrosinatable brain tubulin subpopulations using affinity chromatography. *Biochemistry*, **28**, 2698-2704.
- Perez, F., Diamantopoulos, G.S., Stalder, R. and Kreis, T.E. (1999) CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell*, **96**, 517-527.
- Peris, L., Thery, M., Faure, J., Saoudi, Y., Lafanechere, L., Chilton, J.K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., Wehland, J., Andrieux, A. and Job, D. (2006) Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol*, **174**, 839-849.
- Qadota, H., Python, C.P., Inoue, S.B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D.E. and Ohya, Y. (1996) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science*, **272**, 279-281.
- Schroder, H.C., Wehland, J. and Weber, K. (1985) Purification of brain tubulin-tyrosine ligase by biochemical and immunological methods. *J Cell Biol*, **100**, 276-281.
- Sheeman, B., Carvalho, P., Sagot, I., Geiser, J., Kho, D., Hoyt, M.A. and Pellman, D. (2003) Determinants of *S. cerevisiae* dynein localization and activation: implications for the mechanism of spindle positioning. *Curr Biol*, **13**, 364-372.
- Strauss, B., Adams, R.J. and Papalopulu, N. (2006) A default mechanism of spindle orientation based on cell shape is sufficient to generate cell fate diversity in polarised *Xenopus* blastomeres. *Development*, **133**, 3883-3893.

- Suzuki, M., Igarashi, R., Sekiya, M., Utsugi, T., Morishita, S., Yukawa, M. and Ohya, Y. (2004) Dynactin is involved in a checkpoint to monitor cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Cell Biol*, **6**, 861-871.
- Tong, A.H., Evangelista, M., Parsons, A.B., Xu, H., Bader, G.D., Page, N., Robinson, M., Raghibizadeh, S., Hogue, C.W., Bussey, H., Andrews, B., Tyers, M. and Boone, C. (2001) Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science*, **294**, 2364-2368.
- Tong, A.H., Lesage, G., Bader, G.D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G.F., Brost, R.L., Chang, M., Chen, Y., Cheng, X., Chua, G., Friesen, H., Goldberg, D.S., Haynes, J., Humphries, C., He, G., Hussein, S., Ke, L., Krogan, N., Li, Z., Levinson, J.N., Lu, H., Menard, P., Munyana, C., Parsons, A.B., Ryan, O., Tonikian, R., Roberts, T., Sdicu, A.M., Shapiro, J., Sheikh, B., Suter, B., Wong, S.L., Zhang, L.V., Zhu, H., Burd, C.G., Munro, S., Sander, C., Rine, J., Greenblatt, J., Peter, M., Bretscher, A., Bell, G., Roth, F.P., Brown, G.W., Andrews, B., Bussey, H. and Boone, C. (2004) Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science*, **303**, 808-813.
- Vee, S., Lafanechere, L., Fisher, D., Wehland, J., Job, D. and Picard, A. (2001) Evidence for a role of the (alpha)-tubulin C terminus in the regulation of cyclin B synthesis in developing oocytes. *J Cell Sci*, **114**, 887-898.
- Wehland, J., Schroder, H.C. and Weber, K. (1984) Amino acid sequence requirements in the epitope recognized by the alpha-tubulin-specific rat monoclonal antibody YL 1/2. *Embo J*, **3**, 1295-1300.
- Wehland, J. and Weber, K. (1987) Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of alpha-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. *J Cell Sci*, **88** ( Pt 2), 185-203.
- Westermann, S. and Weber, K. (2003) Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 938-947.