



Utilisation de la levure en tant que modèle et outil : de la compréhension de la cytokinèse à l'étude de sélectivité d'une molécule à potentiel thérapeutique

Damien Guiffant

► To cite this version:

Damien Guiffant. Utilisation de la levure en tant que modèle et outil : de la compréhension de la cytokinèse à l'étude de sélectivité d'une molécule à potentiel thérapeutique. Biologie moléculaire. Rennes 1, 2008. Français. NNT : . tel-01112966

HAL Id: tel-01112966

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01112966>

Submitted on 4 Feb 2015

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.

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

N° ORDRE
de la thèse **3847**

THÈSE

Présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Pour obtenir

Le grade de : **DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

Mention : **Biologie**

PAR

Damien GUIFFANT

Equipes d'accueil : *Laboratoire « Protein Phosphorylation & Human Disease »*
UPS 2682, C.N.R.S, Station Biologique de Roscoff
& *Laboratoire « Yeast as a Model for Human Diseases »*
U613, INSERM, Faculté de Médecine de Brest

Ecole Doctorale : *Vie – Agro – Santé (V.A.S)*

Composante Universitaire : UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement, Rennes

TITRE DE LA THÈSE

Utilisation de la levure en tant que Modèle et Outil : De la compréhension de la cytokinèse à l'étude de sélectivité d'une molécule à potentiel thérapeutique.

SOUTENUE le **18 décembre 2008** devant la commission d'Examen

Mr Paul-Alain JAFFRES, Université de Bretagne Occidentale, Brest – Rapporteur
Mr Pierrick GANDOLFO, Université de Rouen, Rouen – Rapporteur
Mr Sven SAUPE, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaire, Bordeaux – Examineur
Mr Xavier LE GOFF, Université de Rennes 1, Rennes – Examineur
Mr Pascal LOYER, Université de Rennes 1, Rennes – Examineur
Mr Marc BLONDEL, Faculté de Médecine, Brest – Directeur de thèse
Mr Stéphane BACH, Station Biologique, Roscoff – Directeur de thèse

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	- 1 -
Liste des figures.....	- 5 -
Liste des abréviations.....	- 7 -
Liste des publications.....	- 8 -
Préambule.....	- 9 -
Introduction générale	- 13 -
Utilisation de la levure en tant que modèle et outil.	- 14 -
<i>Généralités</i>	<i>- 14 -</i>
<i>Intérêt de l'utilisation des levures</i>	<i>- 16 -</i>
<i>Levure et fonds génétiques.</i>	<i>- 17 -</i>
<i>La croissance des levures.....</i>	<i>- 17 -</i>
La croissance végétative.....	- 19 -
La reproduction sexuée.....	- 20 -
Le phénomène de sporulation.....	- 20 -
La croissance pseudohyphale	- 21 -
<i>D'un point de vue expérimental : facilité de manipulation génétique.....</i>	<i>- 21 -</i>
<i>Conclusion sur l'utilisation de la levure.</i>	<i>- 22 -</i>
Cycle de division cellulaire, CDKs et Cyclines	- 23 -
<i>Un bref historique de l'étude du cycle de division cellulaire.....</i>	<i>- 23 -</i>
<i>Précision sur le terme de « Cycle cellulaire ».....</i>	<i>- 25 -</i>
<i>Les quatre phases du cycle cellulaire.....</i>	<i>- 26 -</i>
<i>La régulation du cycle cellulaire.....</i>	<i>- 28 -</i>
Les complexes CDKs/cyclines	- 28 -
Régulation des CDKs	- 31 -
Rôles des CDKs.....	- 35 -
La notion de checkpoints.....	- 40 -
Implication des CDKs dans diverses pathologies.....	- 40 -
Le cycle cellulaire chez la levure de boulanger.....	- 43 -
<i>Généralités</i>	<i>- 43 -</i>
<i>La régulation du cycle cellulaire de S. cerevisiae.....</i>	<i>- 44 -</i>
Les points de contrôle du cycle chez S. cerevisiae	- 44 -
Le rôle central de Cdc28.....	- 45 -
Implication des cyclines dans le cycle cellulaire chez la levure	- 47 -
Les autres régulateurs du cycle cellulaire	- 49 -
<i>Une notion récente du contrôle du cycle : l'osmocheckpoint.....</i>	<i>- 52 -</i>
Contrôle de la phase G1 par les SAPKs	- 53 -
Contrôle de la phase G2 par les SAPKs	- 53 -
Contrôle de la mitose par les SAPKs.....	- 54 -
Première partie.....	- 55 -

Introduction.....	- 56 -
<i>Généralités</i>	<i>- 56 -</i>
<i>Deux voies redondantes permettent l'accomplissement de la cytokinèse.....</i>	<i>- 58 -</i>
<i>La dégradation de Hof1 par le protéasome est nécessaire à la contraction de l'anneau d'actomyosine</i>	<i>- 60 -</i>
La protéine Hof1.....	- 60 -
Aperçu du mode de fonctionnement de la protéolyse ubiquitine-protéasome dépendante	- 60 -
Dégradation de Hof1 via le SCF ^{Grr1}	- 63 -
<i>Le recyclage membranaire.....</i>	<i>- 65 -</i>
Résultats.....	- 68 -
<i>Le recyclage membranaire est polarisé au cours du cycle cellulaire</i>	<i>- 68 -</i>
<i>HOF1 et gènes du recyclage membranaire : des interactions génétiques</i>	<i>- 70 -</i>
<i>Un défaut de recyclage est spécifique au mutant hof1Δ.....</i>	<i>- 72 -</i>
<i>L'inactivation de HOF1 affecte spécifiquement le recyclage entre les endosomes et l'appareil de Golgi ..</i>	<i>- 75 -</i>
<i>Implication des différents domaines de Hof1 dans le recyclage membranaire</i>	<i>- 77 -</i>
Conclusions et perspectives	- 81 -
<i>Relation recyclage membranaire / cytokinèse chez les levures et les eucaryotes supérieurs.....</i>	<i>- 81 -</i>
<i>La protéine Hof1 joue un rôle dans le recyclage membranaire</i>	<i>- 82 -</i>
<i>Le recyclage de la chitine synthase : une fonction de Hof1 dans la cytokinèse ?</i>	<i>- 83 -</i>
<i>Hof1 : un lien entre cytokinèse et recyclage membranaire ?</i>	<i>- 85 -</i>
<i>Approche de la cytokinèse à l'aide d'une molécule naturelle.....</i>	<i>- 85 -</i>
<i>Autre(s) implication(s) du SCF^{Grr1} au moment de la cytokinèse</i>	<i>- 86 -</i>
Seconde partie	- 88 -
Introduction.....	- 89 -
<i>Les CDKs : des cibles de molécules thérapeutiques</i>	<i>- 89 -</i>
<i>Les intérêts de connaître la sélectivité d'une molécule.....</i>	<i>- 91 -</i>
<i>Les niveaux de sélectivité recherchés.....</i>	<i>- 94 -</i>
<i>Bioinformatique, biochimie, génétique : différentes méthodes d'évaluation de la sélectivité.....</i>	<i>- 95 -</i>
Approche in silico.....	- 96 -
Approche in vitro : utilisation d'un panel de cibles choisies	- 96 -
Les puces à protéines.....	- 97 -
Les puces à « Reverse transfected cells »	- 98 -
La méthode du phage display	- 99 -
Le triple hybride	- 100 -
Chromatographie d'affinité	- 103 -
Génétique de levure.....	- 104 -
Conclusion sur les différentes méthodes d'étude de la sélectivité d'un composé	- 107 -
<i>Présentation de la roscovitine</i>	<i>- 108 -</i>
Description de la (R)-roscovitine.....	- 109 -
Sélectivité de la roscovitine.....	- 111 -
Les effets biologiques de la roscovitine.....	- 112 -
Un dérivé inactif, la N6-méthyl-roscovitine	- 113 -
<i>Pourquoi la roscovitine ?</i>	<i>- 113 -</i>
Résultats.....	- 115 -
<i>Identification des cibles levuriennes de la roscovitine</i>	<i>- 116 -</i>

<i>Validation de deux cibles d'intérêts, Hog1 et Pho85 ; et de l'absence de Cdc28</i>	- 119 -
Cdc28, la CDK centrale du cycle cellulaire de <i>S. cerevisiae</i> n'est pas une cible de la roscovitine	- 119 -
Pho85, une cible levurienne de la roscovitine	- 121 -
Hog1, une cible levurienne de la roscovitine.....	- 129 -
<i>Utilisation de la levure dans l'étude de la sélectivité de la roscovitine : les problèmes de perméabilité cellulaire</i>	- 136 -
La sensibilité de différents mutants	- 136 -
La sensibilité de différents fonds génétiques.....	- 141 -
Conclusion.....	- 142 -
Conclusions et perspectives	- 143 -
<i>La roscovitine, un nouvel outil pour l'étude des mécanismes régulés par Pho85 et Hog1</i>	- 143 -
<i>D'autres cibles à valider</i>	- 144 -
<i>Inhibition de croissance : conséquence de l'inhibition de plusieurs cibles</i>	- 144 -
<i>Utilisation de la levure : une idée globale du niveau de sélectivité d'un composé</i>	- 145 -
<i>Mise en place d'un crible génétique</i>	- 146 -
<i>La levure, un outil de routine pour l'étude de la sélectivité</i>	- 147 -
Conclusions générales	- 148 -
Matériels et Méthodes	- 153 -
Les organismes et les milieux de cultures utilisés	- 154 -
<i>Escherichia coli</i>	- 154 -
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- 154 -
Mesure de densité cellulaire	- 155 -
Méthodes relatives aux acides nucléiques	- 155 -
<i>Extraction d'ADN plasmidique (miniprep)</i>	- 155 -
<i>Extraction d'ADN total de levure</i>	- 156 -
<i>Techniques de transformation</i>	- 156 -
<i>Restriction et électrophorèse sur gel d'agarose</i>	- 157 -
<i>Purification de fragments d'ADN</i>	- 157 -
<i>Estimation d'une concentration en ADN d'une solution</i>	- 157 -
<i>Ligation</i>	- 158 -
<i>Amplification d'un fragment d'ADN par PCR</i>	- 158 -
<i>Analyses génétiques</i>	- 159 -
Délétions de gènes chez la levure.....	- 159 -
Insertion d'un tag dans le génome : étiqueter un gène.....	- 161 -
Surexpression de gènes chez la levure.....	- 161 -
Préparation et dissection de tétrades.....	- 162 -
Analyses phénotypiques	- 163 -
Microscopie à fluorescence	- 166 -
Méthodes relatives aux protéines	- 167 -
<i>Extraction rapide de protéines</i>	- 167 -
<i>Extraction de protéines totales de levures : utilisation du One Shot Cell Disrupter</i>	- 167 -
<i>Dosage de protéines</i>	- 168 -

<i>Chromatographie d'affinité sur billes d'inhibiteurs immobilisés.....</i>	<i>- 168 -</i>
<i>Immunoprécipitation</i>	<i>- 173 -</i>
<i>Electrophorèse sur gel d'acrylamide</i>	<i>- 173 -</i>
<i>Coloration de gel au bleu de Coomassie et à l'Argent.....</i>	<i>- 174 -</i>
<i>Western Blot.....</i>	<i>- 174 -</i>
<i>Test d'activité kinase.....</i>	<i>- 175 -</i>
Références bibliographiques	- 176 -
Annexes	- 187 -

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'une cellule de levure	p.15
Figure 2 : Le cycle biologique de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	p.18
Figure 3 : Modes de bourgeonnement de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	p.19
Figure 4 : Représentation des couples CDK/cycline décrits <i>in vivo</i>	p.30
Figure 5 : Régulation des complexes CDK/cycline	p.32
Figure 6 : Représentation des cibles de CKI au cours du cycle cellulaire	p.34
Figure 7 : La régulation du cycle par les complexes CDK/cycline	p.36
Figure 8 : Fonctions biologiques des CDKs	p.39
Figure 9 : CDKs et pathologies	p.41
Figure 10 : Les couples Cdc28/cyclines au cours du cycle cellulaire de <i>S.cerevisiae</i>	p.48
Figure 11 : La cytokinèse, deux voies génétiques redondantes chez la levure	p.59
Figure 12 : Rôle de la dégradation de Hof1 dans le couplage entre les cycles chromosomique et cytoplasmique	p.65
Figure 13 : Représentation schématique du recyclage membranaire chez la levure	p.67
Figure 14 : Le recyclage membranaire de GFP-Snc1 est polarisé au cours du cycle cellulaire	p.69
Figure 15 : Interactions génétiques entre <i>HOF1</i> et des gènes impliqués dans le recyclage membranaire	p.71
Figure 16 : La délétion du gène <i>HOF1</i> affecte le recyclage membranaire	p.74
Figure 17 : La délétion de <i>HOF1</i> n'affecte ni l'exocytose, ni l'endocytose	p.76
Figure 18 : Implication des différents domaines de Hof1 dans le recyclage membranaire	p.79
Figure 19 : Chs2 peut être une cible recyclée de manière Hof1-dépendante	p.84
Figure 20 : Structures chimiques de la 11-O-méthylpseurotine A et de la pseurotine A	p.86
Figure 21 : Représentation du kinome humain et des CDKs humaines	p.90
Figure 22 : Représentation schématique de l'étude de la sélectivité d'un composé à l'aide de puces à protéines	p.98
Figure 23 : Représentation schématique de l'étude de la sélectivité d'un composé à l'aide de puces à « Reverse transfected cells »	p.99
Figure 24 : Représentation schématique de l'étude de la sélectivité d'un composé par la méthode du phage display	p.100

Figure 25 : Représentation schématique de l'étude de la sélectivité à l'aide du triple hybride en levure	p.102
Figure 26 : Différentes approches d'études de sélectivité à l'aide de la levure	p.105
Figure 27 : Représentation des énantiomères (S) et (R) de la roscovitine	p.110
Figure 28 : Apport de la mutation <i>erg6Δ</i> pour la sensibilité à la roscovitine	p.115
Figure 29 : Utilisation de la chromatographie d'affinité pour l'identification des cibles levuriennes de la roscovitine	p.117
Figure 30 : Vérification de l'absence de Cdc28 sur une matrice de (R)-roscovitine	p.120
Figure 31 : Détermination de l'IC ₅₀ des deux énantiomères de la roscovitine sur Pho85	p.123
Figure 32 : Validation de spécificité de la cible Pho85 et de son mode de fixation par compétition	p.124
Figure 33 : Effet de la (R)-roscovitine sur une souche de levure dépendante de Pho85	p.126
Figure 34 : Effet de la (R)-roscovitine sur la localisation du facteur de transcription Pho4-GFP	p.127
Figure 35 : Activité de Hog1 en présence de (R) et (S)-roscovitine	p.131
Figure 36 : Détermination de l'IC ₅₀ des deux énantiomères de la roscovitine sur Hog1	p.132
Figure 37 : Validation de la spécificité de la cible Hog1 et de son mode de fixation par compétition	p.133
Figure 38 : Conséquence de la forme prion de la protéine Sup35 sur l'effet et la sélectivité de la roscovitine	p.137
Figure 39 : Conséquences de la mutation <i>erg6Δ</i> dans différents fonds génétiques	p.138
Figure 40 : Conséquences des mutations de certains gènes du système PDR	p.141
Figure 41 : Comparaison du profil de sélectivité des énantiomères de la roscovitine sur différents lysats de levure	p.142
Figure 42 : Principe de délétion d'un gène chez la levure	p.160
Figure 43 : Test de sensibilité à une drogue : le test en halo	p.164
Figure 44 : Test de viabilité cellulaire : le test en goutte	p.166
Figure 45 : Longueur et hydrophobicité du bras liant la molécule à la matrice : deux paramètres importants	p.169
Figure 46 : Choix de la position de fixation du bras	p.170
Figure 47 : Identification des cibles d'une drogue par chromatographie d'affinité sur billes d'inhibiteurs immobilisés	p.172

Liste des abréviations

AD	<u>a</u> ctivation <u>d</u> omain
ADN	<u>a</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
ALS	<u>a</u> myotrophic <u>l</u> ateral <u>s</u> clerosis
ATP	<u>a</u> dénosine triphosphate
Cdc	<u>c</u> ell <u>d</u> ependant <u>c</u> ycle
CDKs	<u>c</u> yclin <u>d</u> ependant <u>k</u> inases
CKI	<u>c</u> yclin dependant <u>k</u> inase <u>i</u> nhibitor
CAK	<u>C</u> DK <u>a</u> ctivating <u>k</u> inase
CPM	<u>c</u> oups par <u>m</u> inute
DBD	<u>D</u> NA <u>b</u> inding <u>d</u> omain
DHFR	<u>d</u> i <u>h</u> ydrofo <u>l</u> ate <u>r</u> eductase
DMSO	<u>d</u> i <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulfo <u>x</u> ide
DO	<u>d</u> ensité <u>o</u> ptique
FCH	<u>F</u> es/ <u>C</u> ip4 <u>h</u> omology
GFP	<u>g</u> reen <u>f</u> luorescent protein
GST	<u>g</u> lutathione <u>S</u> - <u>t</u> ransferase
IC ₅₀	<u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration 50%
MAPK	<u>m</u> itogen <u>a</u> ctivated protein <u>k</u> inase
MAPKK	<u>M</u> APK <u>k</u> inase
MDR	<u>m</u> ultidrug <u>r</u> esistance
MEN	<u>m</u> itotic <u>e</u> xit <u>n</u> etwork
MPF	<u>m</u> aturation promoting <u>f</u> actor – <u>m</u> itosis promoting <u>f</u> actor
ORF	<u>o</u> pen <u>r</u> eadin <u>g</u> <u>f</u> rame
PEG	<u>p</u> oly <u>e</u> thylene <u>g</u> lycol
PGPH	<u>p</u> ostglutamyl peptide <u>h</u> ydrolytique
PDR	<u>p</u> leiotropic <u>d</u> rug <u>r</u> esistance
SBP	<u>s</u> pindle <u>p</u> ole <u>b</u> ody
SH3	<u>S</u> rc <u>h</u> omology <u>3</u>
SNC	<u>s</u> ystème <u>n</u> erveux <u>c</u> entral
TAP	<u>t</u> andem <u>a</u> ffinity <u>p</u> urification

Liste des publications

- [4]. **Guiffant D.**, Morillas M., Carter-O'Connell I., Posas F., O'Shea E.K., Meijer L., Blondel M. and Bach S. Chemical-biology evaluation of Seliciclib selectivity in yeast. *PLoS ONE*. 2008. **En préparation.**
- [3]. Corbel C., Haddoub R., **Guiffant D.**, Lozach O., Gueyrard D., Lemoine J., Ratin M., Meijer L., Bach S. and Goekjian P. Identification of potential cellular targets of aloisine A by affinity chromatography. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008. **Soumis.**
- [2]. Bamps S.[§], **Guiffant D.**[§], Galan J.M., Vandenhoute J. and Blondel M. Hof1/Cyk2 defines a link between membrane recycling and cytokinesis in yeast. *Biology of the cell*. 2008. **En révision.**
- [1]. **Guiffant D.**, Tribouillard D., Gug F., Galons H., Meijer L., Blondel M., and Bach S. Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography. *Biotechnology Journal*. 2007, 2, 68-75.

¹ Voir la section « Annexes ».

[§] Ces auteurs ont contribué de manière égale à la réalisation de ce travail.

Préambule

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit sont le fruit de quatre années passées dans le laboratoire du Dr. Laurent Meijer, à la Station Biologique de Roscoff dans l'équipe « *Protein Phosphorylation and Disease* », où j'ai été encadré par le Pr. Marc Blondel et le Dr. Stéphane Bach.

Au cours des quelques lignes qui vont suivre, je m'efforcerai de retracer, de manière brève, l'historique des thématiques de recherche dirigées par Laurent Meijer et de décrire ainsi le positionnement de mon sujet de recherche au sein de son équipe.

Au cours des années 80, le Dr. Laurent Meijer a étudié la maturation des oocytes d'étoile de mer en s'intéressant aux signaux hormonaux qui la contrôlaient. Il a été amené à déterminer le rôle des phosphorylations de protéines dans ces phénomènes et par la suite à s'intéresser aux mécanismes régissant la division de ce type de cellules (Arion & Meijer, 1989; Arion *et al.*, 1988; Meijer *et al.*, 1989). Durant la seconde moitié des années 90, le laboratoire s'est lancé dans l'identification d'inhibiteurs de protéines contrôlant le cycle cellulaire et de manière plus générale, les protéine kinases. Ces molécules, issues de criblages, ont donc un intérêt thérapeutique aux vues des implications de ces protéines dans diverses pathologies telles que les cancers, les maladies neurodégénératives, la polykystose rénale et le paludisme.

C'est de manière logique que les thématiques du laboratoire se sont orientées en suivant différents axes de recherche :

- le criblage de chimiothèques,
- la compréhension du mode de fonctionnement des molécules issues du criblage,
- l'étude fondamentale de processus biologiques avec l'aide de l'outil que représentent ces drogues. Ce type d'approche est aussi appelée « biologie chimique » ou « génétique chimique ».

En parallèle, au début des années 2000, Marc Blondel a été recruté au CNRS et a rejoint l'équipe de Laurent Meijer. Ses compétences ont apporté au laboratoire un outil mais aussi un modèle : la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Marc Blondel a alors entamé des travaux de recherche fondamentale sur la cytokinèse, dernière phase du cycle de division cellulaire, en utilisant la levure en tant que modèle. Il a d'autre part développé une nouvelle thématique : l'étude des maladies à prions telle que la maladie de Creutzfeld Jacob. Dans ce cas, la levure est utilisée en tant qu'outil afin de cribler des molécules actives contre les prions de levure. La plupart des drogues isolées dans ce crible se sont ensuite révélées actives contre le prion des mammifères.

Au cours de ma thèse, Marc Blondel a créé une nouvelle équipe à la faculté de médecine de Brest dans l'unité Inserm U613 du Pr. Claude Ferec. Cette équipe utilise toujours le modèle levure afin d'étudier les thématiques suivantes : la cytokinèse, les maladies à prions ainsi que des maladies génétiques humaines dont les maladies mitochondriales.

C'est dans ce contexte scientifique que j'ai rejoint l'équipe de Laurent Meijer en 2004 pour y effectuer mon stage de DEA. Au cours de ces 5 mois, sous la direction de Stéphane Bach, j'ai abordé l'étude de la sélectivité de diverses molécules ayant un potentiel thérapeutique, d'une part par voie biochimique et d'autre part, en utilisant une approche génétique à l'aide de la levure.

En janvier 2005, j'ai débuté ma thèse, sous la direction de Marc Blondel, avec pour but de travailler sur la cytokinèse. Faisant suite à la mitose, c'est la dernière phase du cycle de division d'une cellule, le moment où s'effectue la séparation physique entre la cellule fille et la cellule mère. Depuis plusieurs décennies, les chercheurs du monde entier ont fait preuve d'un attachement particulier à décrire le cycle cellulaire et ses modes de régulation du fait de son impact sur diverses pathologies, notamment les cancers. Malgré cela, la cytokinèse restait la phase du cycle cellulaire la moins connue¹ et méritait ainsi d'être étudiée avec plus de précision afin d'appréhender les processus biologiques impliqués dans sa régulation. Le but ultime de ce type de recherche est d'identifier des molécules capables de bloquer la séparation des cellules et ainsi de découvrir les premiers inhibiteurs spécifiques de cette phase.

Des travaux menés au laboratoire peu de temps avant mon arrivée ont montré l'implication de la protéine de levure Hof1 dans la séparation physique de la cellule mère et de la cellule fille (Blondel *et al.*, 2005). Afin que les cellules se séparent correctement après la mitose, cette protéine doit être dégradée de la façon ubiquitine et protéasome 26S dépendante. Néanmoins, le rôle biologique de Hof1 n'avait jusqu'alors pas été décrit. Une approche fondamentale devait alors permettre d'approfondir les connaissances sur le rôle biologique de cette protéine dans cette dernière phase du cycle de division des levures.

En parallèle, il avait été convenu que je poursuivrai mes travaux de DEA avec Stéphane Bach afin d'étudier la sélectivité de molécules ayant un potentiel thérapeutique tout en utilisant la levure en tant qu'outil. Aujourd'hui, la découverte d'une molécule d'intérêt passe par la connaissance de deux caractéristiques : son efficacité et sa sélectivité. Ces deux critères sont importants pour le développement clinique d'une drogue : elle doit être efficace et inoffensive. En effet, la notion de sélectivité cache celle d'effets secondaires. Une molécule peu sélective peut agir sur des cibles impliquées dans une pathologie mais aussi sur d'autres

¹ A titre d'illustration, une requête sur PubMed avec le terme *Mitosis* donne environ 5 fois plus de réponses qu'avec le terme *Cytokinesis* dans le titre et/ou le résumé de l'article

protéines nécessaires au bon fonctionnement d'une cellule. Connaître la cause des effets secondaires provoqués par un composé permet de l'améliorer grâce à des approches structure/activité, et ainsi d'avoir des molécules plus sélectives pour une cible cellulaire donnée. Les molécules de sélectivité forte sont les principes actifs des médicaments (dit *intelligents*) utilisés en thérapie. Ce type de traitements thérapeutiques est extrêmement récent : il date d'une dizaine d'année. Le fait d'améliorer la molécule considérée permet de l'optimiser avant qu'elle n'arrive en phase de test clinique et cela permet de limiter les risques d'un arrêt de développement avant une mise sur le marché.

Lors de ma thèse, nous nous sommes basés sur l'étude de la Roscovitine (qui avait été découverte au laboratoire (Meijer *et al.*, 1997) comme étant un inhibiteur chimique de différentes protéine kinases) car sa sélectivité était déjà bien décrite dans des études antérieures (Bach *et al.*, 2005). Les nouveaux résultats obtenus, en comparaison avec les données déjà publiées, servent de preuve de principe pour une telle approche en levure.

Ces deux axes de recherche m'ont amené à intituler mes travaux de thèse :

Utilisation de la levure en tant que Modèle et Outil : de la compréhension de la cytokinèse à l'étude de sélectivité d'une molécule à potentiel thérapeutique.

Après une introduction générale, l'étude sera présentée sous forme de deux parties distinctes. La première développera le rôle biologique de Hof1 : son implication dans la cytokinèse et le recyclage membranaire. Au cours de la seconde partie, je développerai l'étude de la sélectivité de la roscovitine à l'aide de la levure. Enfin, une conclusion générale sur l'ensemble de mes travaux clôturera le manuscrit.

Introduction générale

Utilisation de la levure en tant que modèle et outil.

Généralités

Une partie de la Recherche fondamentale en biologie a pour but de comprendre le mode de fonctionnement d'une cellule. A l'échelle macroscopique, c'est la connaissance des processus biologiques de tissus, d'organes et d'organismes qui est en jeu. Afin d'arriver à cette compréhension, les chercheurs utilisent des organismes modèles tels que les bactéries (*Escherichia coli*), les levures (notamment *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*), des animaux simples tels que la mouche du vinaigre (*Drosophila melanogaster*), les œufs ou les embryons d'invertébrés marins (tels que l'oursin, l'étoile de mer et la patelle) ou encore le nématode (*Caenorhabditis elegans*). Parmi les mammifères, la souris est un des modèles les plus utilisés. Dans le règne végétal, le riz, le maïs ou encore l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) sont les plus populaires dans les laboratoires.

Parmi ces organismes modèles, la levure *Saccharomyces cerevisiae* occupe une place de choix pour la communauté scientifique. En effet, bien que ce soit un organisme unicellulaire, cette cellule est un eucaryote, ce qui la rapproche plus de la cellule humaine que des procaryotes. Cette espèce n'est pas la seule levure décrite jusqu'à ce jour : on répertorie 60 genres représentant environ 500 espèces. D'un point de vue biotechnologique, il faut noter l'importance de la levure *Schizosaccharomyces pombe*, parfois décrite comme étant la plus proche de l'homme. Aussi, grâce à certains aspects originaux de leur physiologie, les levures *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris* et *Candida albicans* présentent une importance non-négligeable sur le plan biotechnologique. Dans cette partie du manuscrit, nous insisterons sur la description et l'utilisation de *S. cerevisiae* ; d'une part à cause de son utilisation très largement répandue (tant d'un point de vue recherche fondamentale que du point de vue industriel) mais aussi parce que ce travail de thèse a été réalisé en l'utilisant aussi bien en tant que modèle qu'en tant qu'outil.

Bien avant de faire son entrée dans les laboratoires, *S. cerevisiae* était déjà utilisée par l'Homme : bien qu'il aura fallu attendre le début du XIXe siècle et les travaux de Pasteur pour l'identifier et comprendre son rôle, elle est exploitée depuis des millénaires (6000 ans avant J.C) pour son aptitude à fermenter le glucose en éthanol (à des fins brassicoles) ou encore en dioxyde de carbone (pour le levage du pain). Comme toutes les espèces de levures, c'est un

champignon unicellulaire appartenant au phylum des ascomycètes. Son nom provient du fait que cet organisme servant à la fabrication du vin et de la bière (*cerevisiae* en référence à la cervoise) est un petit champignon (*-myces*) se nourrissant de sucre (*-Saccharo*).

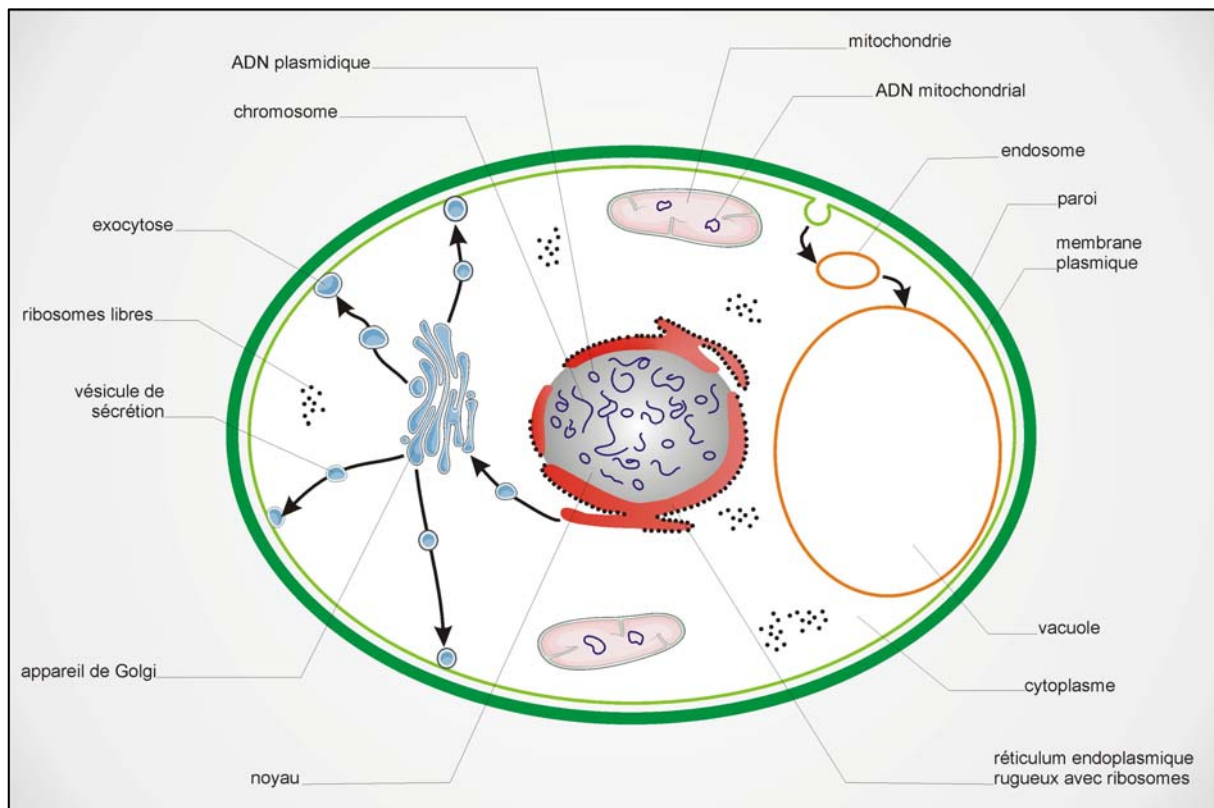


Figure 1 : Représentation schématique d'une cellule de levure. L'organisation cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* est fortement similaire à celle des cellules eucaryotes supérieures. Les organites présents sont les mêmes mais les cellules de levure se distinguent des cellules animales par leur petite taille : elles mesurent généralement 2 à 10µM contre 10 à 100µM pour la plupart des cellules eucaryotes supérieures.

Elle suscite l'intérêt des chercheurs depuis les années 50 où, grâce aux progrès de la microscopie, on a pu établir que son agencement se rapprochait fortement des cellules humaines (voir Figure 1). De plus, en 1992, une association de 35 laboratoires européens a entrepris le séquençage systématique du génome de cet organisme et en 1996, ce fut ainsi le premier eucaryote dont la séquence complète fut publiée (Goffeau *et al.*, 1996). Les avancées scientifiques permises par le décryptage du génome de *S. cerevisiae* ont entraîné un changement majeur dans le mode de travail des levuristes : désormais, il suffit de connaître une infime partie de la séquence d'une protéine pour connaître le gène qui la code, sa séquence et sa position sur le génome. L'ensemble de l'information génétique est répartie, chez *S. cerevisiae*, sur 16 chromosomes représentant un total de 13,5 Mbases (Dujon, 1996) et

environ 6600 cadres ouverts de lecture (ORF : Open ReadinG Frame). A ce jour, on estime à environ 4700 le nombre d'ORFs associés à une fonction cellulaire connue ou codant pour des protéines présentant une homologie de séquence avec des protéines caractérisées de levure ou d'autres organismes. Les autres ORFs, appelés gènes « orphelins » codent potentiellement pour des protéines fonctionnellement et/ou structurellement mal définies (pour 800 d'entre eux) voire totalement inconnues (pour environ 1100 de ces gènes) (Chiffres provenant la base de donnée SGD, www.yeastgenome.org). Ces connaissances ont changé la stratégie des chercheurs : auparavant, les laboratoires étudiaient les propriétés de certains gènes d'intérêt alors que dorénavant, on peut étudier l'ensemble des gènes d'un organisme : on parle alors d'approche globale de transcriptomique et de protéomique.

Intérêt de l'utilisation des levures

Parmi ces gènes de la levure, certains présentent clairement un intérêt biomédical. En effet, certains gènes levuriens ont un fort degré de conservation avec des gènes de cellules eucaryotes supérieures, tant en terme de séquence qu'en terme de fonction dans la cellule : c'est ainsi que la levure peut servir de modèle d'étude pour comprendre le mode de fonctionnement d'une cellule. En outre, la levure est l'organisme qui présente le plus de possibilités techniques dans le domaine des manipulations génétiques et moléculaires. Il en va de même pour l'étude des causes moléculaires de certaines maladies pour lesquelles des modèles ont été développés : à titre d'exemple, on peut citer l'étude du vieillissement cellulaire, des maladies à prion, des maladies mitochondriales, de la mucoviscidose ou encore de la maladie de Parkinson. Dans ces cas, la levure est un système simple servant à étudier les mécanismes d'une maladie mais elle peut aussi servir de « tube à essais biologique » pour caractériser des molécules à fort potentiel thérapeutique utilisable chez l'Homme du fait du haut degré de conservation des mécanismes impliqués dans ces pathologies.

Les autres arguments en faveur de l'utilisation de ces modèles se situent au niveau de la facilité de manipulation de cet organisme : contrairement aux cellules eucaryotes supérieures, elles sont faciles à utiliser expérimentalement du fait de leur rapidité à se diviser (en culture liquide comme sur milieu gélosé) comme du faible coût et de la simplicité des milieux de cultures.

Levure et fonds génétiques.

Sous ce terme, qui sert à définir les différentes souches de levures utilisées au laboratoire, se cache la notion de génotype. C'est l'information génétique portée par le génome qui varie d'une souche à l'autre. La majorité des souches étudiées en laboratoire dérive d'une souche diploïde appelée EM93. C'est à l'aide de cette souche, isolée à partir de figues en fermentation naturelle, que les gènes *MATa* et *MATα*, intervenant dans le déterminisme sexuel des souches haploïdes, ont été décrits en 1943 par Lindegren. A partir de plusieurs progeniteurs (dont EM93), la souche S288c a fait son apparition dans les laboratoires vers les années 50 ; elle a été utilisée pour le séquençage du génome de *S. cerevisiae* et elle est donc considérée comme étant la souche de référence pour les levuristes. C'est d'ailleurs à partir de souches dérivées de ce fond génétique qu'ont été créées les souches BY4741 (*Mat a*), BY4742 (*Mat α*) et BY4743 (*Mat a/α*) utilisées lors de cette thèse. Il faut aussi noter l'importance du fond génétique W303 qui a lui aussi été utilisé ici (voir section « Matériels et Méthodes ») et qui s'avère très pratique pour les expériences de génétique classique du fait de son excellente capacité à sporuler.

La croissance des levures.

Chez les eucaryotes, on distingue deux formes de croissance : la croissance sexuée et la croissance végétative. Les animaux et les plantes supérieures sont le plus souvent assujettis à une reproduction sexuée et ils sont dits diplobiontes. Leurs cellules possèdent deux copies de chaque chromosome, excepté dans le cas des gamètes, produits de la méiose, qui lors de la fécondation formeront un nouvel organisme diploïde. Certaines plantes sont par contre capables de se reproduire simplement par division cellulaire. Cette reproduction est dite asexuée ou encore végétative.

Concernant les levures, et plus particulièrement *S. cerevisiae*, le cycle de vie est décrit comme haplo-diplobiontique : ce terme illustre le fait que cet organisme est capable de croître à la fois à l'état haploïde et à l'état diploïde. Le passage de l'état haploïde à diploïde se fait par conjugaison ; à l'inverse, la méiose permet de passer de deux copies de chaque chromosome à une copie unique (voir Figure 2).

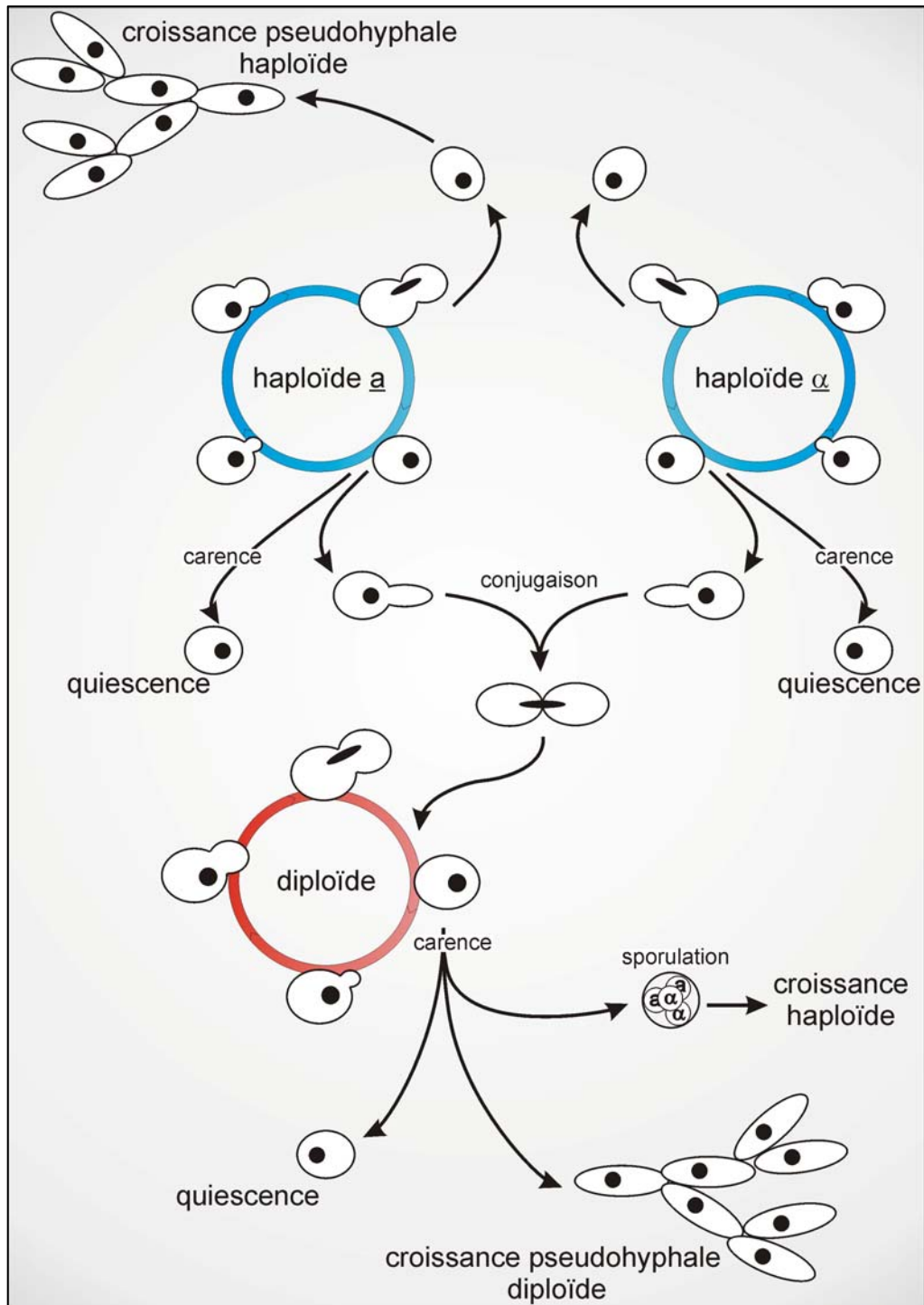


Figure 2 : Le cycle biologique de *Saccharomyces cerevisiae*. A l'état naturel, la levure présente une croissance végétative et vit préférentiellement sous la forme diploïde. Cela lui permet de s'adapter à des changements de milieu et ainsi de mieux résister aux divers stress qui endommagent l'ADN. Avoir deux copies de chaque gène lui permet une meilleure résistance. Dans des conditions de stress extrêmes, elle peut aussi s'orienter vers un état de quiescence ou encore vers une croissance pseudohyphale qui lui permet d'explorer le milieu à la recherche de nutriments. Enfin, pour se protéger des agressions extérieures, elle peut sporuler. Suite à cette dernière possibilité, dans des conditions redevenues normales, la levure peut se diviser sous une forme haploïde ou encore se conjuguer à une levure de type sexuel opposé afin de revenir vers une forme diploïde.

La croissance végétative

La croissance végétative de *S. cerevisiae* concerne aussi bien les cellules haploïdes que les cellules diploïdes et c'est sur ce principe que les levures utilisées en laboratoire sont « cultivées ». La reproduction végétative nous mène à la notion de cycle cellulaire. En effet, une cellule mère est capable de donner naissance à une cellule fille identique en termes de contenu chromosomique après la succession des phases G1, S, G2 et M qui seront décrites dans cette introduction. *Saccharomyces cerevisiae* se divise par bourgeonnement, d'où le terme de « levure bourgeonnante » (ou budding yeast) retrouvé dans nombre d'ouvrages et de publications. Ce bourgeonnement est axial dans le cas des cellules haploïdes : un nouveau bourgeon se forme préférentiellement à proximité du site précédent de bourgeonnement (marqué par une cicatrice). En ce qui concerne les cellules diploïdes, ce bourgeonnement est bipolaire : le nouveau bourgeon peut apparaître soit à côté du précédent site de bourgeonnement (on parle de bourgeonnement proximal), soit à son opposé (il s'agit de bourgeonnement distal). Il est à noter que les cellules filles favorisent le bourgeonnement au pôle distal (voir Figure 3).

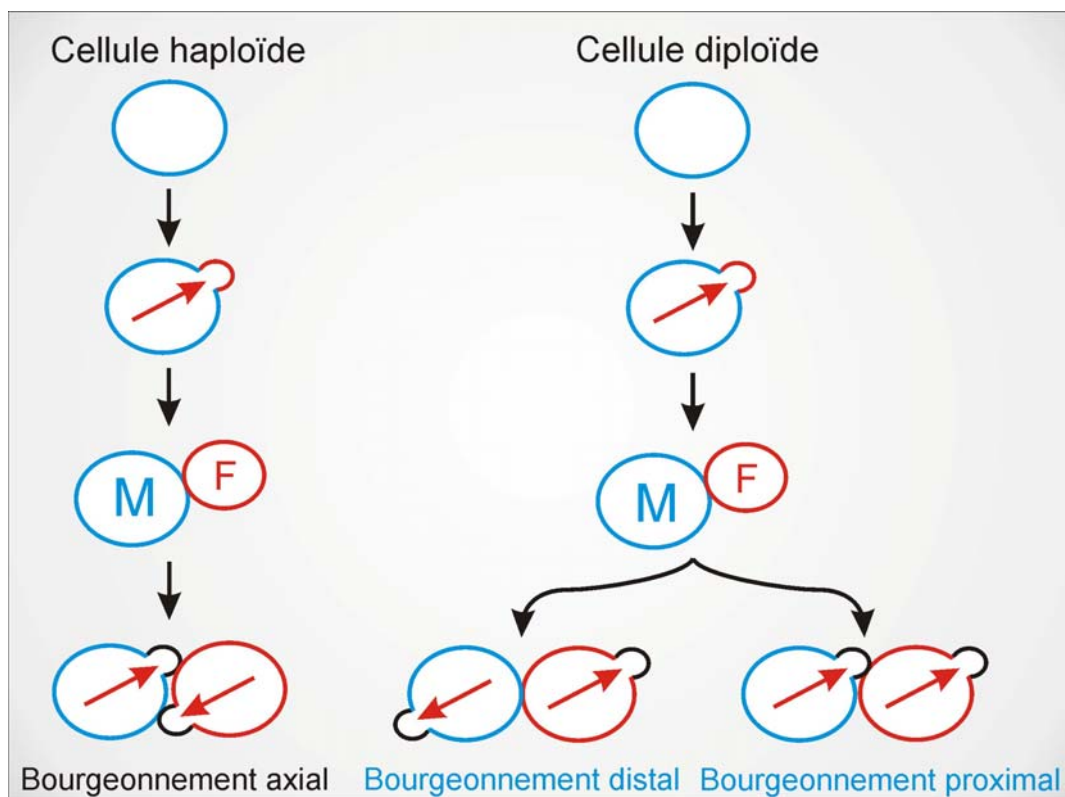


Figure 3 : Modes de bourgeonnement de *Saccharomyces cerevisiae*. Le mode de bourgeonnement varie en fonction de la ploïdie des cellules. Les cellules haploïdes présentent un mode de bourgeonnement axial alors que celui des cellules diploïdes est bipolaire.

La reproduction sexuée

En plus de la croissance végétative, *S. cerevisiae* est capable d'avoir une reproduction sexuée. Des cellules haploïdes sont capables de se comporter comme des gamètes et de former un zygote diploïde : ce phénomène est appelé conjugaison. Pour cela, chaque partenaire sexuel haploïde (*Mat a* ou *Mat α*) émet des phéromones sexuelles dans le milieu. Ce sont des petits peptides appelés *facteur a* ou *facteur α*, ce sont eux qui déterminent le type sexuel (ou haplotype) d'une souche haploïde. Ils se lient à des récepteurs exposés à la membrane des cellules de type sexuel opposé. Le zygote, formé par conjugaison, pourra alors croître de manière végétative par le biais de mitoses successives. A l'état naturel, c'est le mode croissance privilégié par la levure *S. cerevisiae*. En effet, la sporulation n'a lieu que pour passer à l'état de spores qui sont une forme de résistance aux carences et aux stress ; la conjugaison n'est utilisée que pour revenir à l'état diploïde lorsque les conditions de croissances sont redevenues convenables.

Le phénomène de sporulation

En condition de carence nutritionnelle, une souche diploïde subit une méiose et une sporulation. Il en résulte 4 cellules haploïdes (les spores) renfermées dans une sorte de sac appelé asque (d'où le nom d'ascomycète). Lorsque les conditions le permettent, elles sont, à leur tour, capables de se diviser de façon végétative, ou de se conjuguer avec un partenaire de type sexuel opposé pour retourner à l'état diploïde. Ce mode de croissance apparaît comme une défense de l'organisme face aux agressions extérieures. Ainsi, à l'état naturel, les levures se présentent majoritairement sous forme de cellules diploïdes.

Concernant ces vastes capacités d'adaptation, il est aussi important de souligner qu'à l'état naturel, les cellules haploïdes de *S. cerevisiae* peuvent changer de signe sexuel, on parle d'homothallisme. Cela lui assure un retour rapide à l'état diploïde même si une seule spore résiste aux carences ayant provoquées la sporulation. Les souches naturelles de levure sont en réalité incapables de se maintenir de façon stable dans l'état *Mat a* ou *Mat α*. Cette capacité à changer d'haplotype est un avantage certain pour les levures à l'état naturel mais c'est un problème pour le chercheur qui souhaite garder une souche à l'état haploïde, état le plus utilisé pour l'étude des mécanismes biologiques. Pour pallier à ce problème et ainsi conserver à volonté des clones haploïdes stables, le gène *HO* (pour homotallisme) qui code pour une

endonucléase indispensable au changement de signe sexuel, est inactivé dans toutes les souches de laboratoire.

La croissance pseudohyphale

Enfin, les cellules, haploïdes comme diploïdes, dans certaines conditions de carences nutritives, peuvent aussi développer des chaînes invasives appelées pseudohyphes. Ce développement filamentaire, dit pseudohyphal, permet de coloniser les milieux environnants afin de rechercher des conditions de croissances plus favorables. Quand c'est le cas, les cellules peuvent se différencier en levures bourgeonnantes classiques.

D'un point de vue expérimental : facilité de manipulation génétique.

En partie grâce à ces modes de croissance faciles à mettre en œuvre dans les laboratoires, *S. cerevisiae* est devenue un outil de référence en matière de manipulation génétique.

En utilisant diverses techniques (détaillées dans la section Matériels et Méthodes) basées sur l'utilisation de la PCR et de la transformation de levure, il est très aisé de générer une mutation sur un des seize chromosomes, voire même de supprimer un gène entier. La levure est le seul organisme eucaryote où la mutagenèse dirigée, au nucléotide près, est possible sur l'ensemble du génome nucléaire et mitochondrial. Un tel changement généré sur l'ADN d'une cellule sera transmis de génération en génération. Dans le cas d'un diploïde muté de manière hétérozygote, le phénomène de méiose/sporulation est exploité afin de générer diverses combinaisons de mutants et ainsi d'observer le phénotype résultant de la mutation dans un contexte haploïde. A titre d'exemple, lorsqu'un diploïde présentant une mutation hétérozygote pour deux gènes *X* et *Y* est mis sur un milieu de sporulation (carence nutritionnelle), il peut conduire à quatre spores ayant les génotypes suivants : Sauvage (*X*, *Y*), Simple mutant 1 (*X*, *y*), Simple mutant 2 (*x*, *Y*) et Double mutant (*x*, *y*) (les mutations sont ici représentées par les lettres minuscules).

De plus, il est possible d'intégrer une séquence d'ADN, le plus souvent une étiquette, encore appelée *tag*, à un endroit précis du génome. Cela permet entre autre de suivre l'expression de la protéine tagguée dans la cellule ou même sa localisation lorsque le tag est

visible en microscopie : c'est par exemple le cas avec un tag GFP (Green Fluorescence Protein). L'utilisation de la GFP est extrêmement répandue dans les laboratoires de recherches : c'est une petite protéine, issue de la méduse *Aequorea victoria*, dont la découverte et la transformation en outil de routine ont d'ailleurs valu l'attribution du prix Nobel de chimie en octobre 2008 à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien.

D'autre part, toujours en utilisant des techniques de biologie moléculaire, la construction de vecteurs de clonage, afin d'exprimer un gène dans la levure, peut se faire rapidement. L'expression du gène peut se faire de manière constitutive ou inductible en utilisant un large panel de promoteurs permettant des niveaux d'expression très variés.

Conclusion sur l'utilisation de la levure.

Parmi ces généralités, il faut retenir de l'utilisation de la levure dans les laboratoires de recherche concerne les points suivants :

- la ressemblance avec les autres cellules eucaryotes d'un point de vue architecture et voies de signalisation,
- la possibilité de mettre au point des modèles levure de pathologies humaines,
- la facilité et le faible coût des cultures,
- la souplesse de ce type de cellules par rapport aux manipulations génétiques,
- la croissance à l'état haploïde et diploïde, ainsi que le passage aisé et à volonté de l'un à l'autre,
- le nombre d'outils disponibles : il s'agit de l'organisme eucaryote pour lequel on dispose du plus grand nombre de possibilités expérimentales.

Cycle de division cellulaire, CDKs et Cyclines

Ce processus par lequel une nouvelle cellule est générée est essentiel lors du développement d'un individu (pour passer d'une cellule unique, la cellule œuf, à un organisme entier) mais aussi tout au long de sa vie. Afin d'assurer son bon fonctionnement et le maintien de son intégrité, un organisme doit sans cesse générer de nouvelles cellules : chaque jour chez un Homme adulte, des millions de divisions ont lieu. De plus, ce même processus biologique est à l'origine des proliférations cancéreuses lorsqu'il n'est plus contrôlé et que les divisions se font de manière anarchique. C'est pour ces raisons que la connaissance du cycle de division cellulaire est indispensable d'un point de vue médical.

Ainsi, il faut un très grand nombre de divisions cellulaires pour passer de l'œuf fécondé aux 10^{13} cellules qui compose le corps d'un individu humain adulte. Une fois arrivé à cet état, la plupart des cellules (99,99%) ne se divisent plus afin d'éviter une croissance ininterrompue et anarchique de l'individu. Au cours d'une journée, seule une cellule sur dix mille se divise pour assurer le maintien de l'homéostasie et compenser la perte de cellules telles que les cellules de la peau ou des différents épithéliums comme l'épithélium intestinal. En conclusion, il faut énormément de divisions pour former un individu adulte (10^{16} divisions sont nécessaires à former un organisme qui contient 10^{13} cellules) mais elles doivent être régulées de manière à éviter un développement anarchique des différents tissus de l'organisme et ainsi de prévenir la formation de tumeurs.

Un bref historique de l'étude du cycle de division cellulaire (Nurse, 1998)

Le concept selon lequel la cellule représente l'unité de base de la vie est apparu au milieu du XIX siècle. C'est en 1838 que Matthias Schleiden introduit la théorie cellulaire dans le domaine de l'histologie végétale. L'année suivante, Theodor Schwann étend cette conception aux cellules animales en établissant que « *Les cellules sont des organismes, et [que] les animaux comme les plantes sont des agrégats de ces organismes arrangés suivant des lois définies.* ». Dès lors, l'apparition de nouvelles cellules est une question à laquelle les biologistes du moment tentent de répondre et à laquelle plusieurs réponses ont été proposées. Une des premières hypothèses était qu'une cellule se forme à l'intérieur d'une cellule préexistante par des mécanismes impliquant des processus de cristallisation, ou du moins des phénomènes y ressemblant. En 1858, dans son ouvrage *Zellulärpathologie*, Rudolf Virchow,

introduit pour la première fois la notion de division cellulaire en affirmant que « *toute cellule était produite par une autre cellule* » (« *omnis cellula e cellula* »). Dans ce même ouvrage, Virchow montre qu'il est aussi un précurseur en matière de pathologies : il soutient que c'est au cœur de la cellule qu'il faut chercher l'explication des processus normaux aussi bien que des maladies et il introduit des notions se rapportant aux cancers (www.medarus.org).

Le processus de division cellulaire commence alors à être décrit plus précisément, en particulier grâce au développement de nouvelles techniques de microscopie : après avoir décrit la constance du nombre de chromosomes au sein d'une cellule d'une espèce donnée, Theodor Boveri, avec Walter Flemming, observe la condensation et la décondensation des chromosomes de manière cyclique. De plus, ils indiquent dans leurs publications que ces chromosomes se déplacent sur un fuseau. Le nom de *mitose*, connu aussi aujourd'hui sous le nom de *phase M*, est alors donné à cette suite d'évènements. Elle est opposée à l'interphase qui apparaissait alors comme une phase inerte. De plus, en 1882, Walter Flemming indique dans son ouvrage *Cell Substance, Nucleus and Cell Division*, qu'un noyau de cellule provient d'un noyau préexistant et paraphrase alors R. Virchow de la manière suivante : « *omnis nucleus e nucleo* ».

C'est au début du XXe siècle que le problème de la régulation du cycle cellulaire est abordé : Richard Hertwig met en avant l'importance de la relation entre le noyau et le cytoplasme. En effet, ses observations l'amènent à décrire le « ratio caryoplasmique », c'est-à-dire une constante proportion entre la masse du noyau et celle du cytoplasme. Cette théorie avance que face à une augmentation de la masse cytoplasmique, la cellule est obligée de se diviser afin de retrouver un état homéostatique sous-entendant une régulation de la division cyclique des cellules. Ces constatations sont confirmées par les travaux de Hartmann en 1928 et de Prescott en 1955 : des amibes privées d'une partie de leur cytoplasme sont incapables de se diviser. Cela suggère à l'époque qu'un facteur est accumulé de manière proportionnelle dans le cytoplasme et que ce dernier agit dans le déclenchement de la division cellulaire. Au cours des années 60, il est communément admis que ce facteur est une protéine ou un ensemble de protéines.

Au début des années 70, les différents évènements du cycle de division d'une cellule sont nommés en fonction des observations faites sur la séparation de l'ADN : la phase M

(séparation de l'ADN en deux lots) et la phase S (Synthèse de l'ADN), séparées par les phases G1 et G2 (phase d'activité maximale dans le cytoplasme)².

A cette époque et suite à ces avancées, les questions majeures étaient *Quelle(s) est (sont) cette (ces) protéine(s) de régulation et comment les étudier ?* Les travaux de Yoshio Masui ont en grande partie répondu à cette question par l'identification du MPF (*Maturation Promoting Factor* ou encore *M-phase Promoting Factor*). Cet élément est responsable de l'entrée en mitose des oocytes de Xénope bloqués en interphase. A la fin des années 80, ce MPF a été décrit comme étant l'association de deux protéines : une CDK et une cycline. En parallèle, Leland Hartwell, Paul Nurse et Tim Hunt avaient mis en évidence les protéines Cdc (pour Cell division cycle) responsables de la régulation de chacune des phases du cycle cellulaire. Ces deux découvertes, associées l'une à l'autre, ouvraient alors un vaste champ de recherche sur la régulation du cycle de division des cellules et sur le rôle majeur des complexes CDK/cycline dans ces processus. Cet aspect moléculaire de la régulation sera détaillé plus loin.

Précision sur le terme de « Cycle cellulaire »

Avant de rentrer dans les détails du cycle de division d'une cellule et de sa régulation, il est important d'éclaircir le terme de **cycle cellulaire**. En effet, la communauté scientifique s'accorde à dire qu'il correspond à la suite d'évènements qui permettent à la cellule de répartir son matériel génétique en deux lots identiques afin de générer deux cellules elles-mêmes identiques. Or il faut préciser que la répartition des chromosomes correspond au **cycle chromosomique** et qu'une cellule doit également procéder à un **cycle cytoplasmique** ainsi qu'à un **cycle centrosomique**.

Le cycle cytoplasmique correspond à des modifications de la membrane afin de contenir le volume croissant de la cellule (voir l'observation de R. Hertwing détaillée plus haut) avant sa séparation physique au cours de la cytokinèse. En parallèle, il y a une « copie » du cytoplasme et de tous ses composants : la cellule doit générer des organites nécessaires à la formation d'une nouvelle cellule et à son autonomie d'un point de vue métabolique (mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, ribosomes et autres...).

² La suite des évènements des phases G1, S et G2 correspond à ce qui avait initialement été décrit comme étant l'interphase.

Le cycle centrosomique permet la duplication du centrosome (encore appelé centre organisateur de microtubules) qui sera à l'origine de la mise en place du fuseau mitotique bipolaire. Celui-ci est indispensable au positionnement des chromosomes sur la plaque équatoriale et à leur séparation symétrique au cours de la mitose.

Bien que différents, ces trois cycles sont indissociables les uns des autres et doivent être parfaitement coordonnés dans le temps.

Le terme de cycle cellulaire désigne donc le plus souvent le cycle chromosomique. Ceci s'explique d'une part par un souci de simplicité mais aussi d'un point de vue historique. Comme il a déjà été signalé, les premières observations faites en microscopie optique ne permettaient de voir que la séparation en deux lots des chromosomes en opposition à l'interphase. La notion de cycle cellulaire se limitait alors à ce cycle chromosomique.

Les quatre phases du cycle cellulaire

Comme cela a été abordé auparavant, un cycle cellulaire eucaryote classique se caractérise par la suite de quatre phases. Il débute par la phase G1, est suivi de la phase S, puis de la phase G2 et enfin la mitose ou phase M. Afin que le cycle de division se passe dans de bonnes conditions, chaque phase ne peut débuter qu'à la condition que la phase précédente se soit bien déroulée. Il est à noter que la cytokinèse, dont nous parlerons plus longuement au cours de ce manuscrit ne fait pas partie de ce schéma classique : bien que faisant suite à la mitose, elle se rapporte au cycle cytoplasmique.

Les phases G1 et G2 sont deux périodes de latence. L'initiale G est utilisée pour signifier qu'il s'agit d'un intervalle (G pour Gap) durant lequel la cellule se prépare à la phase suivante, notamment en effectuant divers contrôles qui l'autoriseront à initier la phase suivante.

La phase G1 est une période de croissance de la cellule. C'est aussi une période de « contrôle qualité » de l'ADN avant le passage en phase S où il se duplique de manière semi-conservative. Là aussi, un contrôle est effectué afin de vérifier que la duplication du matériel génétique s'est bien déroulée ; il en découlera une répartition en lots identiques des chromosomes entre les deux cellules filles. La phase G2, comme la phase G1 est une période de contrôle mais c'est surtout une phase de préparation à la mitose. D'un point de vue

morphologique, la phase G2 est marquée par l'initiation de la condensation de la chromatine en chromosomes. Vient ensuite la mitose, elle distribue également l'ADN entre les deux cellules néoformées. La mitose présente plusieurs étapes définies comme suit d'un point de vue morphologique :

- la prophase : c'est le moment où les chromosomes, formés par deux chromatides sœurs, terminent leur condensation. Dans le cytoplasme, le fuseau de microtubules est mis en place. Il guidera les chromosomes dans leurs mouvements mais à ce stade, les microtubules kinétochoriens ne peuvent pas encore s'ancrer sur les centrosomes des chromosomes car ces derniers sont séquestrés dans le noyau.
- la prométaphase : c'est le moment où l'enveloppe nucléaire se désassemble. Les microtubules kinétochoriens peuvent alors agripper les chromosomes.
- la métaphase : en parallèle de la rupture de la membrane nucléaire, les chromosomes s'alignent sur la plaque équatoriale.
- l'anaphase : les chromatides sœurs se séparent, les chromosomes sont donc répartis en deux lots identiques et migrent vers les extrémités de la cellule. Un sillon de division commence à apparaître.
- la télophase : la migration des chromosomes est terminée et la reconstitution de l'enveloppe nucléaire débute. En parallèle, la cytokinèse débute afin de séparer physiquement les deux cellules, les chromosomes commencent alors à se décondenser.

Comme il a déjà été précisé, chaque étape ne peut commencer que si l'étape précédente s'est bien déroulée ; dans le cas contraire, la progression du cycle est arrêtée. Si tel est le cas, plusieurs possibilités sont offertes à la cellule. Le plus souvent, lorsque le problème n'est pas résolu, la cellule entre en apoptose et meurt. En ce qui concerne un blocage en phase G1, le devenir de la cellule est assez particulier : en fonction des stimuli et/ou des conditions extérieures, la cellule peut se différencier ou encore entrer en phase G0. Cette phase est appelée phase de quiescence.

Le déroulement décrit ici est une représentation schématique du cycle cellulaire eucaryote : dans la réalité, il offre une certaine souplesse dans la durée des différentes phases. D'un organisme à un autre, d'un tissu à un autre ou encore d'un type cellulaire à un autre, la durée de division peut varier : une cellule de mammifère met en moyenne 24 heures pour se diviser contrairement à une souche sauvage de *Saccharomyces cerevisiae* pour laquelle 90 minutes suffisent en milieu riche et à température optimale. Les eucaryotes supérieurs,

comme la levure *Schizosaccharomyces pombe*, se divisent par fission. Pour simplifier, on peut dire que la cellule se coupe en deux parties égales. *S. cerevisiae* est à ce point de vue une exception car elle se divise par bourgeonnement (d'où son autre nom de « levure bourgeonnante ») : la cellule mère émet un bourgeon vers lequel une projection du noyau va migrer sans qu'il n'y ait rupture de la membrane nucléaire. Enfin, dans certains cas, l'alternance des quatre phases n'est pas vérifiée : par exemple, chez le Xénope, après fécondation, une succession des phases S et M permet à l'œuf de grandir ; dans les glandes salivaires de la Drosophile, les chromosomes subissent plusieurs phases S successives sans qu'il n'y ait de mitose ; dans ce même organisme, les premières divisions après fécondation se font sans séparation physique entre les cellules menant à un syncytium plurinucléé ; et enfin, la méiose peut aussi être considérée comme un cycle de division atypique du fait que les deux divisions successives assimilables à deux mitoses ne sont précédées que d'une seule phase S.

La régulation du cycle cellulaire

Les complexes CDKs/cyclines

Les kinases sont des enzymes capables de catalyser la fixation d'un groupement phosphate sur leur(s) substrat(s). On distingue les lipide kinases des protéine kinases en fonction du substrat qu'elles phosphorylent. Parmi les protéine kinases, il existe différentes classes qui sont différenciées par la nature des résidus qu'elle peuvent phosphoryler : les sérine/thréonine kinases sont, avec les tyrosine kinases, les plus répandues. Chez l'Homme, on estime le nombre de kinase à environ 518 protéines, parmi lesquelles on retrouve la famille des CDKs (pour *Cyclin dépendant kinases* ou *kinases dépendantes des cyclines*). Ces dernières sont très largement étudiées pour leur rôle dans la régulation du cycle cellulaire. Elles appartiennent à la famille des sérine/thréonine kinases : le transfert du groupement phosphate se fait sur les chaînes latérales de certains résidus sérine et thréonine des protéines par réaction d'estérification sur leur fonction alcool. Bien que le séquençage du génome ait permis d'estimer l'existence d'une vingtaine de CDKs chez l'Homme (Meijer, 2006), seules onze d'entre elles (numérotées de 1 à 11) ont été répertoriées pendant très longtemps.

(Malumbres & Barbacid, 2005). Plus récemment, CDK12 et CDK13 ont été caractérisées (Chen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007).

La première CDK a été découverte au début des années 80 chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Une approche génétique a permis d'isoler des mutants dont la progression du cycle était altérée. Ces mutants appelés *CDC* (pour Cell Division Cycle) ont permis l'identification de *Cdc2* comme la clef de voute du cycle cellulaire : cette CDK, homologue de *Cdc28* de *S. cerevisiae* et depuis rebaptisée CDK1, est un des composants du MPF (Arion *et al.*, 1988; Labbe *et al.*, 1989) avec la cycline B (une cycline mitotique)

Ces kinases rentrent dans la catégorie des CDKs lorsqu'elles répondent à un certain nombre de critères définis par Meyerson et ses collaborateurs (Meyerson *et al.*, 1992) : elles doivent posséder un motif caractéristique de cette famille au niveau de leur site catalytique (séquence PSTAIRE en code acides aminés à une lettre pour CDK1, 2 et 3, les autres CDKs présentent des séquences proches telles que PISTVRE pour CDK4, PSSALRE pour CDK5, etc... (Malumbres & Barbacid, 2005)) et s'associer à une protéine activatrice. En effet, ces CDKs sont inactives sous forme monomérique : l'association à leur sous-unité régulatrice appelée cycline est indispensable pour la phosphorylation du substrat.

D'un point de vue structurel, les CDKs sont composés de deux lobes à l'intersection desquels se situe le site catalytique. Sur chacun de ces lobes on trouve deux régions spécifiques : une boucle régulatrice, dite boucle T (ou T-loop) et le motif caractéristique de type PSTAIRE cité ci-dessus.

Concernant les cyclines, leur nombre est estimé à environ 25 (Meijer, 2006) ; on en connaît à ce jour 12 familles (appelées de A à I, et K à L + la famille des cyclines T) pour lesquelles les associations avec les CDKs sont en majorité connues (voir Figure 4). Ces protéines doivent leur nom à leur présence cyclique au cours du cycle cellulaire : chacune d'entre elles, à l'exception des cyclines D et E au cours des cycles embryonnaires, subit une dégradation périodique en phase avec le cycle (Murray, 2004). La disparition des cyclines se fait par protéolyse ubiquitine/protéasome dépendante. Cette dégradation, qui a lieu suite à l'ubiquitination de la cible, est nécessaire à l'inactivation des CDKs. Deux types de complexes multienzymatiques entrent en jeu dans ces dégradations : les ubiquitines ligases de type APC (Anaphase promoting complex) et SCF (Skp1-Cullin E-box) sont impliqués selon la

cycline considérée. Le mode de fonctionnement du protéasome sera brièvement décrit dans la première partie de ce manuscrit.

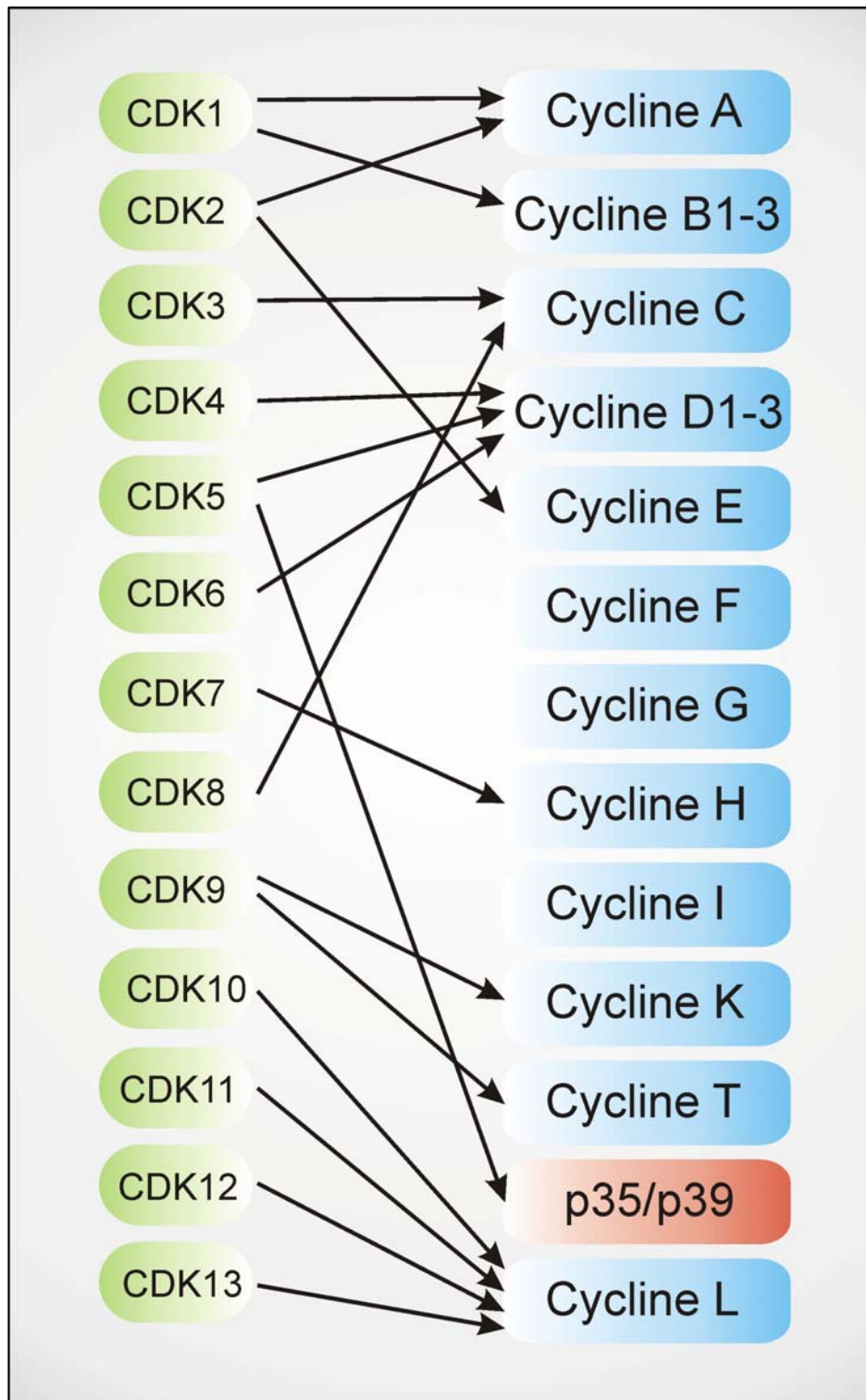


Figure 4 : Représentation des couples CDK/cycline décrits *in vivo*. Il est à noter que CDK5 s'associe majoritairement à p35/p39 qui, malgré son rôle activateur, n'est pas une cycline.

Régulation des CDKs

L'ensemble des mécanismes d'activation des CDKs est repris dans la figure 5.

L'association avec la cycline

L'activité d'une CDK est régulée à plusieurs niveaux par sa fixation à la cycline. En plus d'une présence régulée dans le temps, les cyclines contiennent des signaux de localisation intracellulaire. Ceci conduit donc à une activation phase- et localisation-dépendante de la CDK considérée.

De plus, la réaction de phosphorylation du substrat devient possible car la fixation de la cycline entraîne un changement de conformation de la kinase. Il se fait au niveau de son site catalytique afin de pouvoir accueillir la molécule d'ATP et le substrat : l'hélice de type PSTAIRE subit une rotation, permettant à l'ATP d'accéder à la poche qui lui est destinée, et la boucle T se déplace afin de permettre au substrat d'atteindre le site catalytique de la CDK.

Outre l'association des deux protéines, l'activité phosphorylatrice des complexes CDK/cycline est finement régulée par un équilibre de phosphorylations et de déphosphorylations. La présence d'un groupement phosphate sur certains résidus entraîne une activation du complexe, tandis que d'autres sont responsables de son inhibition.

Les phosphorylations activatrices

A titre d'exemple, CDK1, après le changement de conformation consécutif à son association avec une cycline, pourra être phosphorylée sur un résidu thréonine en position 161 (dans le cas de CDK2, il s'agit du résidu Thr-160). Cette étape de l'activation se fait par une autre kinase de type CAK (CDK Activating Kinase). Dans le cas de CDK1, CDK4 et CDK6, cette CAK est elle-même une CDK : associée à la cycline H et au cofacteur Mat1, CDK7 phosphoryle CDK1, 4 et 6 dans le but de les activer (Meijer, 2003).

Les déphosphorylations activatrices

Dans leur état inactif, les CDKs sont phosphorylées sur certains de leurs acides aminés (à l'exception de CDK7). Concernant CDK1 et CDK2, les groupements phosphate liés à la thréonine 14 (Thr-14) et à la tyrosine 15 (Tyr-15) empêchent leur activité kinase (Meijer, 2003). D'autres kinases telles que les CDK4, 6 et 9 sont inhibées par la fixation d'un unique groupement phosphate sur un résidu thréonine ou tyrosine (Nigg, 1995). Les résidus concernés se situent en fait au niveau du site catalytique de la protéine et lorsqu'ils sont phosphorylés, la liaison à l'ATP devient impossible. Ces phosphorylations inhibitrices sont réalisées par les kinases Wee1 ou Myt1. Alors que la seconde kinase est capable de phosphoryler à la fois les résidus Thr-14 et Tyr-15, Wee1 ne phosphoryle que la Tyr-15.

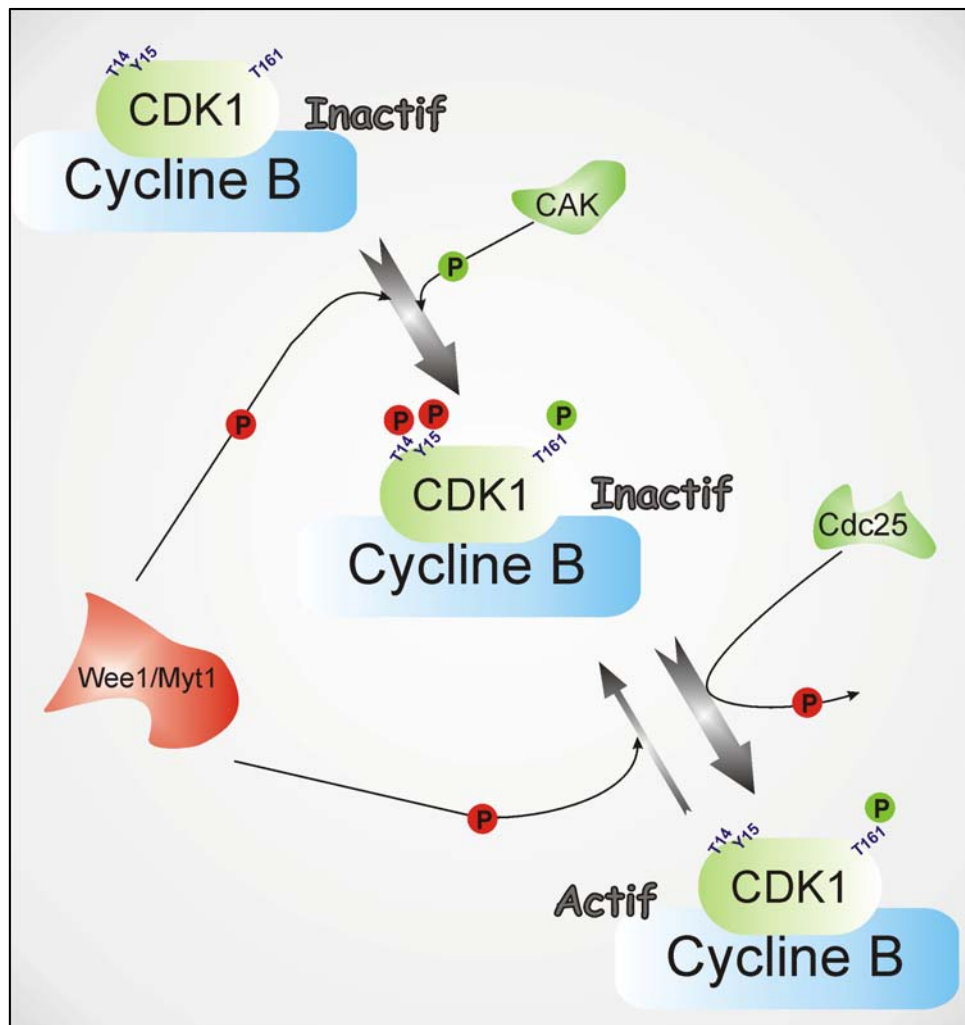


Figure 5 : Régulation des complexes CDK/cycline. L'activation de ces complexes se fait (i) par une phosphorylation activatrice (en vert) à l'aide d'une CAK (CDK7/cyclineH/Mat1 dans cet exemple) et (ii) des déphosphorylations activatrices à l'aide d'une phosphatase (Cdc25). Wee1 et Myt1 sont des kinases inhibitrices (en rouge).

Les CDKs doivent donc être activées par le biais de déphosphorylations. Cette étape de leur activation se fait grâce à des phosphatases qui, à l'inverse des kinases, catalysent le retrait d'un groupement phosphate sur leur substrat. Dans le cas décrit ici, les phosphatases de la famille des Cdc25 sont responsables de cette étape de l'activation. Ces protéines (Cdc25A, B ou C) sont capables de déphosphoryler à la fois la Thr-14 et la Tyr-15, elles ne diffèrent que par le moment du cycle où elles agissent (Meijer, 2003). Il faut noter que la phosphorylation inhibitrice sur Tyr-15 est dominante sur la phosphorylation activatrice de Thr-161 : une CDK phosphorylée sur ces deux résidus reste inactive.

Les inhibiteurs physiologiques des CDKs

Certaines protéines sont associées aux CDKs de manière à inhiber leur activité. Ces inhibiteurs sont appelés CKI (pour Cycline dependant kinases Inhibitors) et sont représentés par deux familles. Les membres de la famille protéique INK4 sont responsables de l'inhibition des CDK4 et CDK6 : ces protéines bloquent donc la progression du cycle en G1 (voir « Rôles des CDKs » ci-après). Elles agissent en se fixant à la CDK inactive et bloquent la liaison à leur cycline. La famille est constituée des protéines p15, p16, p17 et p18 (Canepa *et al.*, 2007).

L'autre famille d'inhibiteurs de CDKs, qui eux se fixent sur les complexes CDK/cycline, est appelée CIP/KIP. Elle est représentée par les protéines p21 et p27. Elles ont un effet inhibiteur sur CDK2 mais il a aussi été montré qu'elles peuvent avoir un effet activateur concernant CDK4.

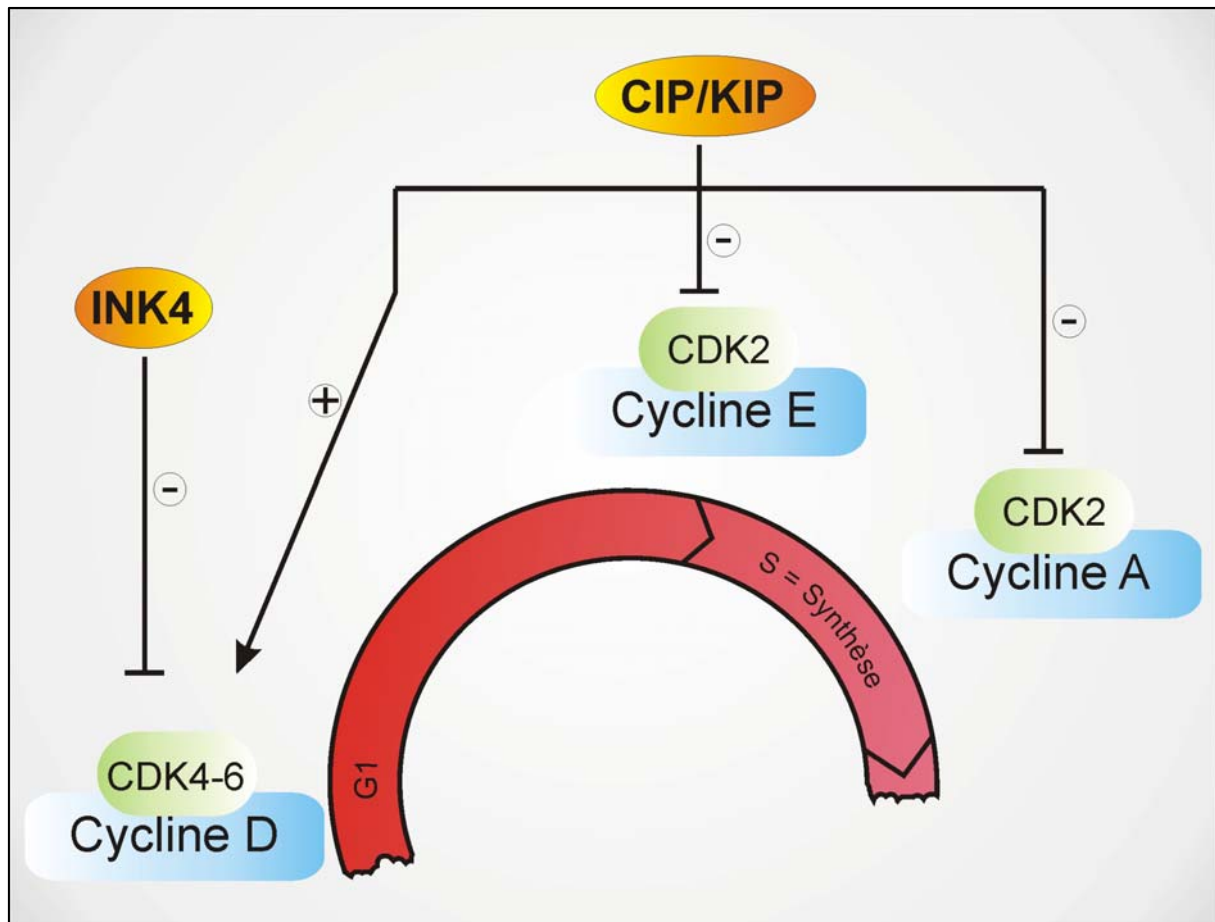


Figure 6 : Représentation des cibles des CKI au cours du cycle cellulaire. La famille INK4 permet une inhibition des CDK4-6/cycline D. Les CIP/KIP quand à elles sont capables d'inhiber les complexes CDK2/cycline E et CDK2/cycline A. Un rôle activateur de CDK4-6/cycline D a aussi été démontré.

Résumé sur la régulation des CDKs

Afin de résumer les derniers paragraphes, ce qu'il faut retenir concernant la régulation des CDKs est repris ici. Pour devenir active, une CDK doit :

- s'affranchir de l'activité d'inhibiteurs physiologiques (les CKI)
- être associée à une cycline
- être phosphorylée sur son résidu thréonine 161 (cas de CDK1)
- être déphosphorylée sur ses résidus thréonine 14 et tyrosine 15

Les conditions d'activation des CDKs sont reprises dans la figure 5 et l'action des CKI est représentée sur la figure 6.

Rôles des CDKs

Régulation du cycle cellulaire

Sur les 13 CDKs répertoriées à ce jour, six d'entre elles l'ont été en tant qu'acteurs du cycle cellulaire. Néanmoins, la fonction biologique des CDKs ne se limite pas à la progression du cycle cellulaire.

Les CDKs régulatrices de la division cellulaire sont CDK1, 2, 3, 4, 6 et 7. Elles ont chacune une fonction qui leur est attribuée à un moment donné du cycle de division (voir figure 7), de plus, il semblerait que CDK10 et CDK11 soient aussi indirectement impliquées dans la régulation de ce phénomène (Malumbres & Barbacid, 2005).

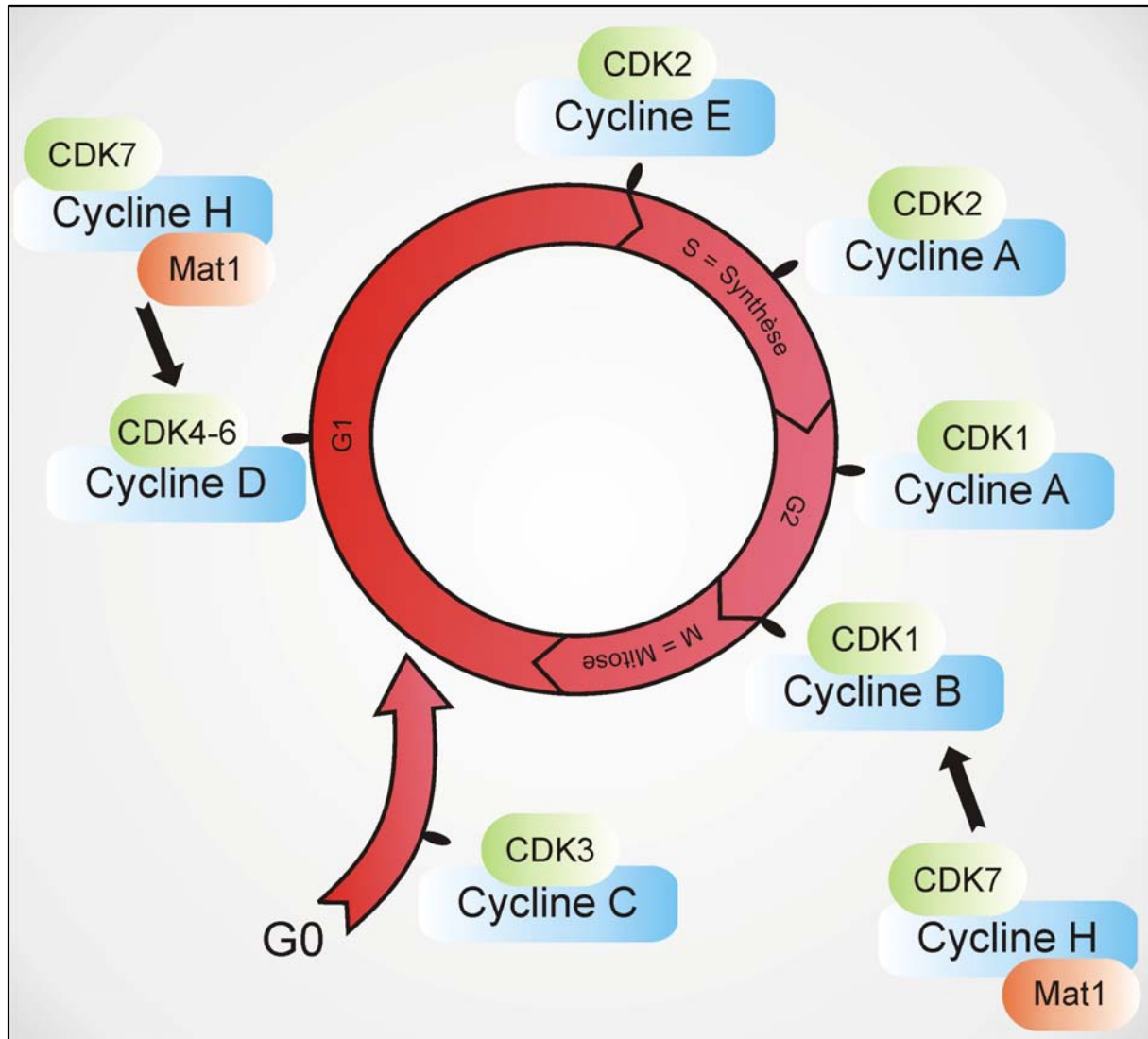


Figure 7 : La régulation du cycle par les complexes CDK/cycline. CDK1 couplée à la cycline A puis B régule l'entrée en mitose et sa progression. L'interphase est régulée par les couples CDK4-6/cycline D, CDK2/cycline E et CDK2/cycline A. Le complexe CDK7/cycline H/Mat1 est responsable de la phosphorylation activatrice de CDK1 et CDK4. Le couple CDK3/cycline C est quant à lui impliqué dans la sortie de quiescence.

- Intervention de CDK1

Cette CDK, dite CDK mitotique, s'associe à la cycline A à la transition S/G2 ; la fonction hypothétique de ce complexe est l'activation de CDK1/cycline B (Meijer, 2003). Ces deux protéines associées forment le complexe enzymatique clef de la division cellulaire. Comme il a déjà été écrit plus haut, ils sont en réalité les composants du MPF et régulent la transition G2/M et l'entrée en mitose (Nurse, 1990). Les substrats de ce complexe localisé au noyau lorsqu'il est actif, sont variés : il s'agit de protéines structurales et régulatrices telles que des kinases ou des phosphatases. La phosphorylation des substrats de CDK1/cycline B entraîne des événements morphologiques au sein de la cellule : la membrane nucléaire se rompt, les chromosomes se condensent et le fuseau mitotique se forme. D'autre part, le complexe APC (anaphase-promoting complex), encore appelé cyclosome, est activé par CDK1/cycline B. Cela entraîne la destruction de la sécurine. Cette protéine inhibe la séparase, responsable de la séparation des chromatides sœurs au cours de l'anaphase. De plus, la séparase est elle-même activée par CDK1/cycline B (Meijer, 2003).

A la fin de la mitose, le complexe CDK1/cycline B est responsable de sa propre inactivation. En effet, il active le cyclosome qui sera lui-même responsable de la destruction de la cycline B en fin de mitose et donc de la sortie de mitose.

- Intervention de CDK2

Tout d'abord, cette CDK est responsable de la transition G1/S. Associée à la cycline E, elle permettra de déclencher les mécanismes de réplifications de l'ADN : grâce à elle, le complexe réplicatif peut recruter cdc45, un facteur essentiel à la fixation de la polymérase sur l'ADN. De plus, elle phosphoryle le CKI p27. Son effet inhibiteur sera levé suite à l'ubiquitination et la dégradation engendrée par cette phosphorylation.

Par la suite, elle s'associe à la cycline A afin de permettre l'élongation de la réplication de l'ADN.

- Intervention de CDK3

Pendant longtemps, du fait de son faible taux d'expression mais aussi de la méconnaissance de l'identité de la cycline activatrice, CDK3 a eu un rôle inconnu ou du moins très mal compris. Plus récemment, son interaction avec la cycline C a été démontrée, ainsi que son action permettant aux cellules quiescentes (phase G0) d'entrer en division (transition G0/G1) (Ren & Rollins, 2004; Sage, 2004).

- Intervention de CDK4 et CDK6

Ces deux CDKs, associées à des cyclines D, sont responsables du déroulement de la phase G1. Deux facteurs de transcription, DP1 et E2F sont nécessaires à l'expression de certains gènes permettant la transition G1/S. Ces deux protéines sont inhibées par leur interaction avec la protéine du rétinoblastome Rb. Au cours de la phase G1, les complexes CDK4/cycline D et CDK6/cycline D sont à l'origine de la phosphorylation de Rb et ainsi de la libération des facteurs de transcription permettant le passage en phase S.

- Intervention de CDK7

Comme cela a été expliqué auparavant, cette CDK, en association avec la cycline H et un second partenaire, Mat1, est en fait un « régulateur de régulateurs du cycle », appelée CAK (CDK Activating Kinase). Elle est responsable de l'activation des complexes CDK1/cycline B et CDK4-6/cycline D en les phosphorylant sur leur résidu thréonine 160 ou 161 selon les CDKs.

Implication dans d'autres processus cellulaires

Les CDKs sont impliquées dans d'autres processus biologiques (Figure 8) tels que :

- l'apoptose (CDK1, 2, 5 et 11) (Meikrantz & Schlegel, 1996; Sandal *et al.*, 2002; Yun *et al.*, 2007),
- la différenciation cellulaire (CDK2, 5, 6 et 9) (Bagella *et al.*, 1998; Chen & Studzinski, 2001; Guo & Walsh, 1997; Matushansky *et al.*, 2000; Nikolic *et al.*, 1996; Tintignac *et al.*, 2000),
- les fonctions neuronales (CDK5) (Dhavan & Tsai, 2001; Kung *et al.*, 2006),
- la transcription (CDK7, 8, 9, 10 et 11) (Malumbres & Barbacid, 2005),
- et l'épissage alternatif (CDK 11, 12 et 13) (Chen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2003).

Détailler tous les rôles des CDKs dans ce manuscrit serait long et hors sujet. La Roscovitine étudiée au cours de ce travail de thèse, est un inhibiteur de différentes CDK. Elle est notamment responsable de l'inhibition de CDK5 et présente donc un intérêt thérapeutique

concernant certaines pathologies neurodégénératives. C'est pour cette raison que le rôle de cette CDK mérite d'être brièvement décrit.

CDK5 est exprimée dans tous les tissus mais son activité est essentiellement associée aux cellules où ses activateurs p35 et p39 sont aussi exprimés, c'est-à-dire au niveau du système nerveux central (SNC). Au cours du développement du SNC, CDK5 est impliquée dans le modelage, le positionnement et le guidage des axones ; elle est aussi impliquée dans la régulation du cytosquelette, l'adhésion cellulaire, le transport membranaire, le fonctionnement des synapses et la signalisation de différents neurotransmetteurs. (Dhariwala & Rajadhyaksha, 2008).

	CDK1	CDK2	CDK3	CDK4	CDK5	CDK6	CDK7	CDK8	CDK9	CDK10	CDK11	CDK12	CDK13
Cycle cellulaire	✓	✓	✓	✓		✓	✓			✓	✓		
Apoptose	✓	✓			✓						✓		
Différenciation cellulaire		✓			✓	✓			✓				
Epissage alternatif											✓	✓	✓
Fonctions neuronales					✓								
Transcription							✓	✓	✓	✓	✓		

Figure 8 : Fonctions biologiques des CDKs. Chacune des CDKs est impliquée dans la régulation de un ou plusieurs processus biologiques. Outre le cycle cellulaire, ce sont des acteurs majeurs de l'apoptose, de la différenciation cellulaire, de l'épissage alternatif, des fonctions neuronales ou encore de la transcription.

La notion de checkpoints

Cette notion de checkpoints, encore appelés « points de contrôle » a déjà été sous-entendue au cours de cette introduction. L'axiome qui établit que chacune des quatre phases du cycle cellulaire ne peut avoir lieu que si la phase précédente s'est correctement déroulée sous-entend un mécanisme de surveillance, au niveau moléculaire, de la cellule. Ces mécanismes ont pour unique but de faire en sorte que la transmission de l'information génétique se fasse de manière correcte à la cellule fille nouvellement formée. C'est pour cette raison que l'on peut résumer ces points de contrôle (i) à la vérification de l'état de l'ADN tout au long du cycle et (ii) à la mise en place et à la vérification de l'état du fuseau mitotique.

Concernant l'ADN (Nurse, 2000), à chaque étape, le « DNA damage checkpoint » est activé. En phase G1, lorsque l'ADN est endommagé, il ne pourra être répliqué que si la réparation se fait correctement. Le blocage en fin de phase G1 est assuré par l'inhibition de CDK2. On parle ici de « point de restriction » (ou point R) : c'est le moment où la cellule s'engage de manière irréversible dans son cycle de division. Lors de la phase S, si l'ADN néosynthétisé n'est pas une copie fidèle de celui de la cellule mère, le passage en G2 est compromis. En phase G2, en cas de dégradation du matériel génétique, l'activité de CDK1/cycline B sera retardée, bloquant ainsi l'entrée en mitose.

En parallèle, le checkpoint du fuseau (Spindle checkpoint) est responsable du bon déroulement des événements mitotiques suivants : l'attachement des chromosomes aux microtubules, l'orientation de la plaque équatoriale et la ségrégation chromosomique. En cas de dysfonctionnements, la cellule sera bloquée en mitose et celle-ci ne sera pas achevée.

L'activation de l'un des deux checkpoints entraîne dans un premier temps un blocage de l'avancement du cycle. Si la cellule ne peut résoudre le problème constaté, elle entre en apoptose (ou mort cellulaire programmée).

Implication des CDKs dans diverses pathologies

La multitude des processus biologiques dans lesquels les CDKs sont essentielles explique pourquoi leur régulation est nécessaire au maintien de l'intégrité de la cellule (et par extension, de l'organisme). Il apparaît alors logique qu'un mauvais fonctionnement ou une mauvaise régulation de leurs activités peut entraîner diverses pathologies (voir figure 9). En

effet, dans certaines maladies, des anomalies du fonctionnement des CDKs ont été constatées, ces anomalies étant des causes et/ou des conséquences des symptômes relevés. Quelques exemples de ces maladies liées aux CDKs sont ici présentés de manière non-exhaustive.

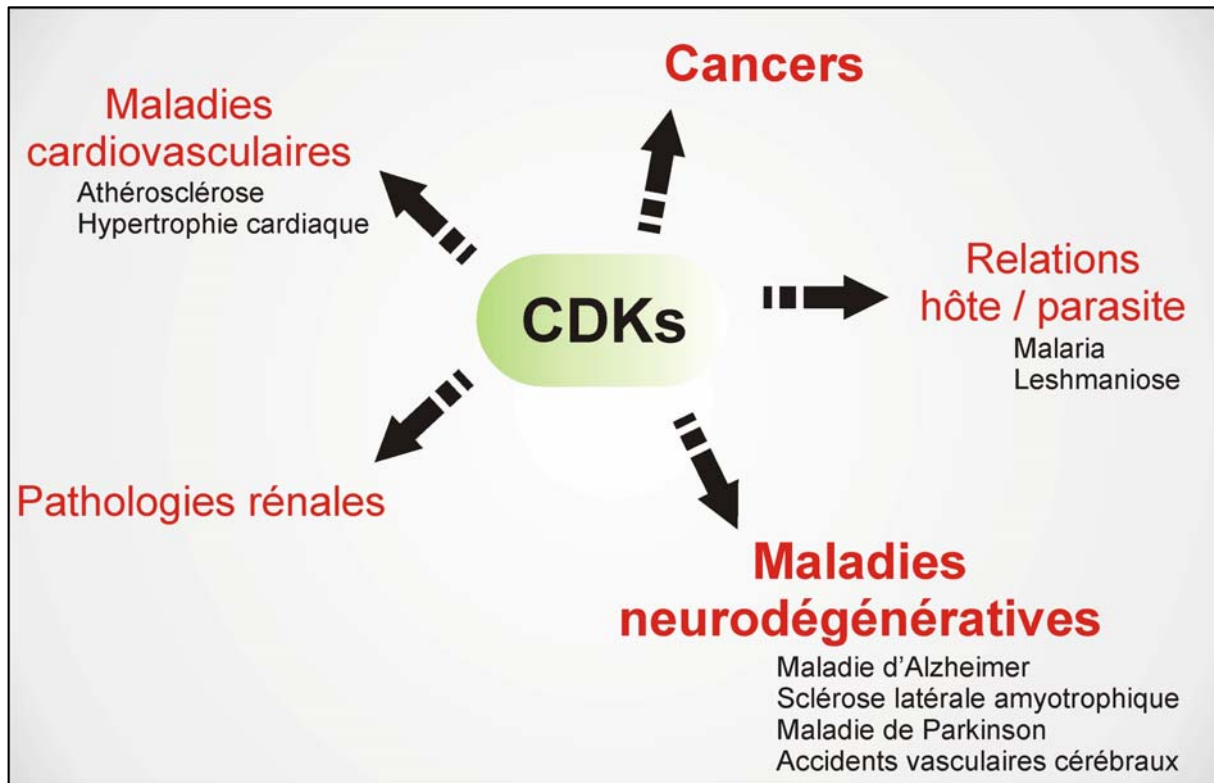


Figure 9 : CDKs et Pathologies. Au centre de la régulation de divers processus biologiques, les CDKs sont impliquées dans plusieurs types de pathologies. A ce jour, la recherche s'oriente plus particulièrement sur leur rôle dans différents cancers ainsi que dans certaines maladies neurodégénératives.

Les cancers

Dans ce type de pathologies, on assiste à une prolifération rapide et non contrôlée de la des cellules qui conduit à l'apparition des tumeurs et à leur développement anarchique. Dans la majeure partie des cas, ces altérations de fonctionnement découlent d'une surexpression de cyclines et de CDKs mais aussi d'inactivations de CKI (Malumbres & Barbacid, 2005; Tsihlias *et al.*, 1999). Afin d'illustrer ces propos, nous pouvons citer à titre d'exemple le cas de certains carcinomes mammaires où les cyclines D1, E et E2 sont surexprimées. D'autre part, 90% des carcinomes colorectaux présentent une surexpression de CDK2 et de la cycline

E. Enfin, dans de nombreux cancers (leucémies, sein, prostate et voies digestives), on a constaté l'absence de CKI de la famille INK4 et CIP/KIP (Tsihlias *et al.*, 1999).

L'observation et la connaissance de ces dysfonctionnements offrent de larges possibilités thérapeutiques. Il faut noter qu'à ce jour, le déroulement du cycle chromosomique est le plus largement étudié et ses effecteurs semblent être les cibles thérapeutiques les plus considérées par la recherche médicale.

Les maladies neurodégénératives

CDK5 est la CDK la plus impliquée dans ce type de pathologie. Comme cela a été relaté plus haut, les principaux activateurs de CDK5 sont les protéines p35 et p39. Le dimère CDK5/p35 est le plus étudié. Chez les malades atteints de sclérose latérale amyotrophique (ALS), de la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et d'Huntington, p35 se retrouve clivée en p25. Cette protéine tronquée est toujours capable d'activer CDK5 mais elle présente une stabilité bien plus grande que p35 (5 à 10 fois). Cela conduit au prolongement de l'activité de CDK5. De plus, un changement de localisation de p25, par rapport à celle de p35, entraîne une modification du spectre de substrats de CDK5 à l'origine d'effets néfastes (Patzke & Tsai, 2002). Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau, substrat de CDK5, présente une hyperphosphorylation, caractéristique de la maladie, qui entraîne son agrégation ; elle est en partie due à la dérégulation de l'activité de CDK5 : ces agrégats protéiques sont observés dans les cerveaux des malades. Concernant l'ALS, une phosphorylation anormale semble aussi être à l'origine de la dégénérescence nerveuse observée chez les patients.

Le cycle cellulaire chez la levure de boulanger

Généralités

Bien qu'il soit suffisamment proche du cycle de division d'une cellule eucaryote supérieure pour être un modèle de référence, le cycle de division de *S. cerevisiae* présente quelques particularités qui méritent d'être examinées avec un peu plus d'attention.

Bien que la division se fasse par bourgeonnement et qu'il n'y ait pas de rupture de l'enveloppe nucléaire, l'organisation temporelle du cycle cellulaire de *S. cerevisiae* reste la même que celle décrite précédemment : la succession des phases G1, S, G2 et M est respectée comme dans d'autres organismes. Malgré cela, une différence majeure se situe au niveau de la durée de la division de la cellule : alors qu'une cellule de mammifère met en moyenne 24 heures pour se diviser, la levure n'a besoin que de 90 minutes, dans des conditions de croissance idéales, pour donner naissance à une cellule fille.

L'interphase, malgré son nom, est très importante d'un point de vue synthèse. Elle est longue et précède la mitose qui se fait de manière rapide. Ainsi, la phase G1 est comme chez les eucaryotes supérieurs, la phase la plus longue du cycle cellulaire. Elle couvre près de 60% de la durée totale du cycle et prépare la formation d'une nouvelle cellule en augmentant le nombre d'organites (mitochondries, ribosomes, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, membranes plasmiques, etc...) ainsi que le volume qui les contient. Suivent alors les phases S et G2. A l'inverse de *S. pombe*, cette dernière est très courte chez *S. cerevisiae*, à tel point que certaines sources vont même jusqu'à dire qu'elle se confond plus ou moins avec la phase S : alors que les 16 chromosomes se dupliquent, le bourgeon commence à se former, et le corps polaire se duplique (cet événement marque le début de la mitose). Le corps polaire, encore appelé *Spindle Pole Body* (SBP), est l'équivalent du centrosome chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*. Il est enchâssé dans l'enveloppe nucléaire (à la différence du centrosome qui est un élément cytoplasmique) et ceci permet à ces deux types de levures d'effectuer leur mitose sans qu'il y ait de rupture de la membrane nucléaire, on parle alors d'endomitose.

La mitose est là aussi le moment du cycle où les chromosomes sont répartis en deux lots identiques entre la cellule mère et la cellule fille. Celle-ci est issue du bourgeon et elle est

donc libérée après la cytokinèse avec une taille inférieure à celle de la cellule mère. C'est là un caractère spécifique de *S. cerevisiae*, à l'opposé des eucaryotes supérieurs et de *S. pombe* où les cellules se séparent par fission et donnent donc naissance à deux cellules de même taille.

La régulation du cycle cellulaire de *S. cerevisiae*

Les points de contrôle du cycle chez *S. cerevisiae*

Bien que de nombreux mécanismes soient conservés entre les eucaryotes supérieurs et les levures *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*, des différences non négligeables existent, particulièrement entre ces deux types de levure. En effet, les stades critiques de la régulation du cycle ne sont pas les mêmes. Alors que le point Start (équivalent au point de restriction ou point R chez les eucaryotes supérieurs), moment où la cellule a atteint une taille critique et s'engage en phase S, est peu important chez *S. pombe*, il est décisif chez *S. cerevisiae*. A l'inverse, alors que les contrôles d'entrée en mitose, régulés par la kinase Wee1 (ou CDK7) et la phosphatase Cdc25 chez *S. pombe* et chez les vertébrés, sont extrêmement importants, ces régulations ont un rôle mineur chez la levure bourgeonnante.

Chez *S. cerevisiae*, il existe ainsi trois points de contrôle qui agissent en fin de phase G1 (point Start), en fin de phase G2 ainsi qu'en sortie de mitose.

Le point Start

C'est l'homologue du point de restriction des eucaryotes supérieurs. Chez *S. cerevisiae*, il précède de peu le passage en phase S et il s'agit clairement du point de contrôle majeur où la cellule s'engage de manière irréversible dans un nouveau cycle. A ce stade, si la cellule est diploïde, elle conserve encore le choix d'entrer en mitose ou en méiose jusqu'au début du processus de réplication de l'ADN. Pour le passage de ce *checkpoint*, la cellule se doit de vérifier qu'un certain nombre de conditions sont réunies pour que sa division se poursuive dans les meilleures conditions possibles. En effet, la cellule doit avoir atteint une taille suffisante pour donner naissance à une cellule fille viable. Elle doit être dans un milieu

de croissance qui lui est favorable. Enfin, des signaux de différenciation indiquant à la cellule d'entrer en croissance pseudohyphale ou encore de se conjuguer à une autre cellule dans le cas de cellules haploïdes, ne doivent pas interférer.

Une fois ce point de contrôle effectué, l'initiation de la duplication de l'ADN peut être engagée, tout comme la synthèse du bourgeon et la duplication du corps polaire (ou *Spindle Pole Body*). Ce checkpoint contrôle donc à la fois le déclenchement des cycles chromosomiques, cytoplasmiques et centrosomiques.

Les checkpoints d'entrée en mitose

A ce stade du cycle, la division de la cellule dépend du bon déroulement des événements ayant eu lieu au cours des phases S et G2. Un endommagement de l'ADN provoque donc un arrêt en fin de phase G2. De plus, l'absence d'apparition du bourgeon a aussi pour conséquence d'empêcher l'entrée en mitose. On parle à ce stade d'un point de contrôle de la morphogénèse (*morphogenesis checkpoint*) (Sia *et al.*, 1996). Dans le cas présent, l'avancement du cycle chromosomique ne peut avoir lieu si un problème se produit concernant le cycle cytoplasmique. De plus, des mutants n'ayant pas dupliqué leur corps polaire s'arrêtent aussi à ce niveau de la division. Ces observations indiquent clairement que les cycles chromosomique, cytoplasmique et centrosomique, bien qu'ils soient différents, sont en interconnexion étroite les uns avec les autres.

Les checkpoints de sortie de mitose

Si au cours de la mitose, la formation du fuseau mitotique est affectée, là aussi la levure arrête sa division en bloquant l'anaphase.

Le rôle central de Cdc28

Au cours des années soixante, les travaux de Hartwell ont menés à l'identification de différents mutants thermosensibles chez *S. cerevisiae* qui, à température restrictive, présentaient un arrêt dans une phase précise du cycle (Hartwell *et al.*, 1970). L'hypothèse était alors que les produits des gènes mutés étaient impliqués dans l'exécution ou dans la

régulation du cycle cellulaire. Ces mutants ont été baptisés *cdc* (pour *cell division cycle*) et ont permis une avancée considérable dans l'étude du cycle cellulaire. Les conséquences morphologiques de ces mutations (taille des cellules, contenu en ADN, forme des noyaux, développement des bourgeons) ont permis de déterminer le moment du cycle où ces protéines intervenaient et la protéine Cdc28 est alors apparue comme un élément central de ces mécanismes : un mutant *cdc28* est incapable de répliquer son ADN, de dupliquer son corps polaire (ou *Spindle Pole Body*) ou encore de former un bourgeon à température restrictive. Curieusement, la croissance des cellules n'est pas affectée dans ce cas précis : les cellules continuent de croître mais sans se diviser. Ces observations suggéraient que Cdc28 était, comme le MPF découvert chez le Xénope, un élément clef de la régulation du cycle cellulaire. L'approche moléculaire de ces études a permis de montrer que Cdc28 (tout comme son homologue de *S. pombe* Cdc2) était l'homologue fonctionnel de la protéine kinase CDK1 (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1991) responsable de l'activité du MPF. Chez la levure, le cycle cellulaire est donc régulé par le biais de CDKs. Là aussi, elles sont associées à des cyclines afin d'être actives. Plus précisément, le rôle central est tenu de façon quasi-exclusive par Cdc28 qui est associée à diverses cyclines en fonction de la phase du cycle dans laquelle se trouvent les cellules. Cette simplification des mécanismes de contrôles est un argument supplémentaire en faveur de l'utilisation de la levure dans l'étude du cycle cellulaire.

La levure *S. cerevisiae* possède au total 6 CDKs (dont Cdc28). Quatre d'entre elles, Kin28, Ctk1, Srb10 et Burl ne sont pas impliquées dans la régulation du cycle. Elles contrôlent la transcription par l'ARN polymérase II. Kin28 est l'homologue de la CAK humaine CDK7 qui active CDK1 et CDK4-6 par phosphorylation. Bien que cela ait longtemps été admis, Kin28 n'est pas une CAK de Cdc28, elle est incapable de l'activer (Thuret & Mann, 1998). Enfin Pho85, homologue fonctionnel de CDK5 humain (Huang *et al.*, 1999), est une CDK importante pour le contrôle du métabolisme du phosphate lorsqu'elle est associée à sa cycline Pho80. Associée aux cyclines Pcl1 et Pcl2, elle joue sans doute un rôle dans le contrôle de la transition G1/S mais il est relativement mineur dans la mesure où elle n'est requise que lorsque les cyclines G1, Cln1 et Cln2 sont inactivées. D'autre part, même surexprimée, Pho85 est incapable de compléter une délétion de Cdc28.

Implication des cyclines dans le cycle cellulaire chez la levure

Bien que le rôle central de Cdc28/CDK1 représente une simplification de la régulation du cycle, il faut noter que pour cette seule CDK, on dénombre neuf cyclines : trois cyclines G1 (Cln1, 2 et 3), deux cyclines de phase S (Clb5 et Clb6) et enfin les cyclines G2/M (Clb1 à 4). Au cours du cycle cellulaire, ces cyclines interviennent par paires.

A la fin de la phase G1, Cdc28 s'associe à Cln1 et 2. Ces complexes permettent à la cellule de passer le point de restriction Start.

Au cours de la phase de synthèse d'ADN, Clb5 et 6 sont associées à la CDK pour initier la duplication des chromosomes.

Les cyclines mitotiques sont au nombre de quatre. La première vague d'expression de cycline correspond à la présence de Clb3 et Clb4. Ces deux cyclines apparaissent au cours de la phase S pour arriver à leur niveau maximum d'expression à la transition S/G2. Plus tardivement, Clb1 et Clb2 sont associées à Cdc28. Ces quatre cyclines présentent une redondance fonctionnelle mais Clb2 est la plus importante au cours de la division mitotique : elle est capable de compléter le rôle des trois autres cyclines. Les cyclines mitotiques de la levure sont les homologues des cyclines B des eucaryotes supérieurs citées précédemment. Elles forment avec Cdc28 le MPF levurien (ici pour Mitosis Promoting Factor).

Comme chez les eucaryotes supérieurs, les cyclines décrites dans ce paragraphe s'accumulent de manière transitoire à un moment précis du cycle avant d'être dégradées. Il est difficile de déterminer précisément si la cycline associée à Cdc28 apporte une spécificité de substrat à cette dernière ou si ce sont les vagues d'expression de ces différentes cyclines qui en sont responsables. Il semblerait tout de même que ces deux phénomènes soient impliqués.

Une exception est à noter concernant Cln3 : tout d'abord, elle n'agit pas en paire avec une autre cycline et de plus, elle est dite « peu-cyclante ». Sa concentration cellulaire varie peu au cours du cycle. Il semblerait que ce soit un senseur signalant à la cellule qu'elle atteint la masse critique nécessaire afin de débiter la division de la cellule : en début de phase G1, elle est séquestrée dans le cytoplasme et sa localisation nucléaire est corrélée avec l'augmentation de la taille de la cellule (Chen *et al.*, 2000). Associée à Cdc28, elle active la transcription des deux autres cyclines G1, Cln1 et 2, provoquant ainsi le passage du point Start. Bien que sa quantité ne varie pas au cours du cycle, elle fait partie des cyclines et, plus précisément, c'est une cycline de la phase G1 avec Cln1 et Cln2 (Aldea *et al.*, 2007; Tyers *et al.*, 1993).

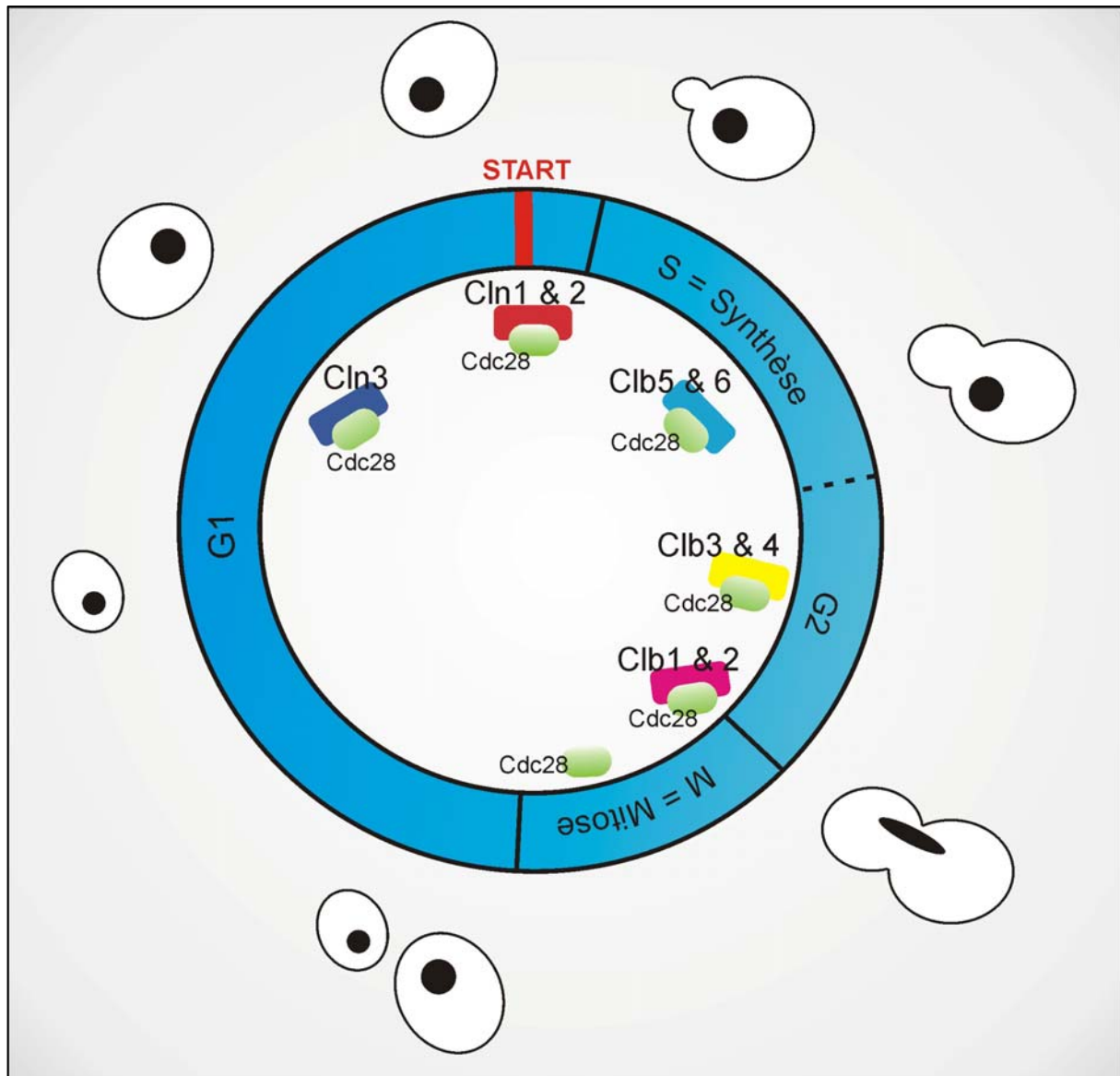


Figure 10 : Les couples Cdc28/cyclines au cours du cycle cellulaire de *S. cerevisiae*. Cdc28 est le régulateur central du cycle cellulaire chez la levure. Il est associé à différentes cyclines en fonction des phases de division de la cellule.

Il faut aussi noter le rôle de certaines cyclines dans le contrôle du cycle cytoplasmique (Lew & Reed, 1995). L'apparition du bourgeon se fait par une croissance polarisée dans un premier temps avant de devenir isotropique. Les modifications subies par la membrane plasmique au cours de ces alternances de croissance sont régulées par les cyclines G1 et les cyclines mitotiques.

Au cours de la phase G1, la cellule croît de manière isotropique afin d'atteindre la taille critique initiant la division cellulaire. Par la suite, une croissance polarisée se met en place afin de faire apparaître le bourgeon en longueur. Cette émergence se fait à l'aide des complexes Cdc28/Cln. Au moment de l'entrée en mitose, l'activation des complexes

Cdc28/Clb1 et 2 entraîne une modification de la croissance du bourgeon vers un mode isotropique. Le bourgeon peut alors grossir jusqu'à atteindre une taille convenable pour donner naissance à une cellule fille. La sortie de mitose, qui est régulée par la dégradation des cyclines mitotiques, va entraîner une nouvelle période de croissance polarisée au niveau de la constriction entre la cellule mère et la cellule fille. Ceci est nécessaire à l'accomplissement de la cytokinèse.

Les autres régulateurs du cycle cellulaire

La régulation du cycle cellulaire, quel que soit le modèle décrit, peut être rattachée à quelques éléments clefs autres que les CDKs et les cyclines. Dans cette section, quelques acteurs supplémentaires de la régulation du cycle sont décrits de manière non exhaustive.

Les phosphorylations inhibitrices et activatrices de Cdc28

Comme cela a déjà été abordé plus haut, les CDKs subissent une régulation par le biais de phosphorylations et de déphosphorylations. Ces régulations sont conservées chez tous les eucaryotes et, concernant les complexes CDK1/cycline, elles régissent essentiellement l'entrée en mitose. Chez *S. cerevisiae*, ce type de régulation est secondaire étant donné que le point Start est le *checkpoint* le plus important. Malgré tout, ces mécanismes existent avec quelques détails qui leur sont propres.

La kinase Cak1 (aussi appelée Civ1) est responsable d'une phosphorylation activatrice de Cdc28 sur la thréonine 169 (Thuret *et al.*, 1996) (l'équivalent de la thréonine 161 pour CDK1 humaine). Il semble que ce soit la seule kinase responsable de cette étape d'activation chez la levure (Mendenhall & Hodge, 1998).

En parallèle, des phosphorylations inhibitrices sur les résidus 18 et 19 de Cdc28 (respectivement thréonine et tyrosine) sont présentes, elles correspondent aux phosphorylations des Thr-14 et Tyr-15 décrites plus haut concernant CDK1 humaine.

Concernant la phosphorylation de Thr-18, très peu de données sont disponibles. La phosphorylation inhibitrice de la Tyr-19 est quant à elle mieux documentée : elle est réalisée

par la kinase Swe1 (homologue de Wee1 découverte chez *S. pombe*). Son action est dite cycline dépendante car elle est capable de phosphoryler Cdc28 couplée à Clb2 mais ce n'est pas le cas lorsque qu'elle est associée à Cln2 ou encore à Cln3 (Booher *et al.*, 1993) : le niveau de régulation dans lequel elle est impliquée concerne donc la transition G2/M. Alors que sa surexpression entraine un blocage du cycle avant la mitose, l'absence de cet inhibiteur entraine une modification de la cinétique du cycle.

L'effet inhibiteur de Swe1 est contrecarré par la phosphatase Mih1. Cette protéine est l'homologue de la phosphatase Cdc25 décrite plus haut et retrouvée aussi chez *S. pombe*. Suite au passage du point Start par la levure, Mih1 permet la déphosphorylation de Tyr-19 de Cdc28 (Mendenhall & Hodge, 1998) en vue de l'entrée ultérieure en mitose.

Swe1 et Mih1 sont responsables du retard de la division nucléaire dans les cellules n'ayant pas encore émis un bourgeon après le passage du point Start. Ce sont donc les effecteurs principaux du point de contrôle de la morphogénèse (Sia *et al.*, 1996).

Cks1 : un activateur de Cdc28

Au-delà du rôle des cyclines, Cdc28 est activée par la protéine Cks1 (Cdc kinase stimulating protein). Bien que son rôle de d'activateur semble être unanimement reconnu, son fonctionnement reste obscur et controversé.

Initialement identifiée chez *S. pombe* (Suc1), son rôle dans le cycle cellulaire a aussi été démontré chez *S. cerevisiae*, ainsi que d'autres modèles concernant le cycle cellulaire tel que la patelle (Colas *et al.*, 1993). Son action a été mise en évidence à la fois dans les transitions G1-S et G2-M mais il a aussi été dit qu'il intervenait dans la sortie de mitose (Pines, 1996; Tang & Reed, 1993). D'autre part, le gène *CKS1* a d'abord été décrit comme un gène essentiel (Tang & Reed, 1993) avant qu'une équipe ne publie une observation inverse (Yu & Reed, 2004). Plusieurs hypothèses concernant son mode d'action ont été formulées. Une d'entre elles indiquait que Cks1 avait un rôle dans l'assemblage de certains complexes CDK/cycline ; des récents travaux confirment cette observation (Reynard *et al.*, 2000) en indiquant que l'activité des complexes Cdc28/Cln2 et Cdc28/Cln3 est diminuée chez des mutants *cks1Δ* (contrairement aux complexes Cdc28/Clb5 ainsi que Cdc28/Clb4) suggérant que cet activateur est requis pour la progression de la phase G1. D'autre part, il a aussi été montré que Cks1 serait nécessaire à la dégradation de certains acteurs du cycle par la voie

ubiquitine / protéasome dépendante. Ainsi, Pds1, un inhibiteur du cycle en anaphase serait détruit grâce à l'action de Cks1 (Kaiser *et al.*, 1999).

Bien que plusieurs hypothèses aient été formulées, le rôle de Cks1 chez la levure (et chez d'autres organismes) semble toujours relativement mal connu et curieusement peu étudié en comparaison avec d'autres acteurs du cycle tels que Sic1 et Far1 qui ont un effet inhibiteur.

Sic1, Far1 : des inhibiteurs de Cdc28

Sic1 et Far1 sont les deux CKI (Cyclin dépendant kinases inhibitors) connus de la levure *S. cerevisiae*. Ces deux inhibiteurs ont un rôle essentiel car ils régissent en grande partie l'entrée en phase S, et donc le passage du point de contrôle Start qui est le *checkpoint* majeur chez la levure bourgeonnante. Historiquement, il s'agit des deux premiers CKI à avoir été découvert (1993).

Sic1, homologue fonctionnel de la protéine humaine Kip1, est un inhibiteur des complexes Cdc28/Clb. Lorsque la cellule en G1 a atteint une taille critique, elle initie la formation du bourgeon, la duplication des SPB ainsi que la réplication de l'ADN. Ces événements qui marquent le début de la phase S dépendent de l'activation de Cdc28 couplée aux cyclines de type Cln (cyclines G1), mais la réplication de l'ADN est aussi dépendante de l'activation de Cdc28/Clb5 et Cdc28/Clb6. La protéine Sic1 qui apparaît à la fin de la mitose, inhibe le complexe Cdc28/Clb5 (mais pas les complexes Cdc28/Cln) en se fixant au niveau du site actif de la CDK, empêchant ainsi toutes liaisons possibles avec le substrat à phosphoryler (Mendenhall *et al.*, 1995). Cette régulation négative des complexes Cdc28/Clb est un élément clef du bon déroulement de la ségrégation des chromosomes : une délétion de *SIC1* est à l'origine de la perte de chromosomes (ou de fragments de chromosomes) au cours de la mitose qui suivra la réplication (Nugroho & Mendenhall, 1994). La protéine perd son effet inhibiteur en fin de phase G1, au moment où elle est adressée au protéasome pour sa dégradation (Schwob *et al.*, 1994) : afin d'être dirigée vers le protéasome, elle doit être phosphorylée par les complexes Cdc28/Cln ou encore par la CDK Pho85 couplée à la cycline Pcl1 (Huang *et al.*, 2007).

Far1 est l'effecteur final de la voie des MAP kinases (Mitogen activated protein) déclenchée par la présence des stimuli extérieurs que représentent les phéromones sexuelles. Lorsqu'une cellule haploïde détecte la présence de ce type de molécule émise par une cellule

de type sexuel opposé, une des conséquences visibles est la différenciation que subit la levure. Ce phénomène est nécessaire pour permettre la conjugaison de deux cellules et dépend de Far1. Outre cette différenciation, la conjugaison nécessite un arrêt de la progression du cycle en phase G1. Far1 exerce aussi ce rôle en se fixant directement sur les complexes Cdc28/cyclines G1 (Cln1, 2 et 3) afin de les inhiber. Pour cette raison, elle est également classée dans les CKI de *S. cerevisiae* (Peter & Herskowitz, 1994). Le niveau d'expression de ce facteur est aussi régulé par une dégradation cyclique via la voie ubiquitine / protéasome dépendante (Blondel *et al.*, 2000).

Une notion récente du contrôle du cycle : l'osmocheckpoint

Comme cela a été introduit dans le paragraphe précédent, la présence de phéromones dans le milieu déclenche l'activation d'une cascade enzymatique de MAP kinases (MAPK). Ce type de réaction en chaîne a pour conséquence l'arrêt de la progression du cycle en G1, en réponse aux éléments extérieurs. De la même manière, en condition de stress osmotique, la levure déclenche une cascade de MAPK, aussi appelée SAPK (pour Stress-activated protein kinases) afin de bloquer la progression du cycle et ainsi de se protéger de ces changements environnementaux. Ces régulations du cycle, dans des conditions de croissance particulières, introduisent une nouvelle notion de points de contrôle du cycle appelés *osmocheckpoints*, récemment décrits par J. Clotet et F. Posas (Clotet & Posas, 2007). Francesc Posas dirige l'unité *Cell Signaling Research* à Barcelone avec laquelle nous avons collaboré pour la partie « sélectivité » de ce travail.

Les cellules sont constamment exposées à des changements environnementaux tels que des modifications de pH, de température, d'oxygénation, d'apports nutritionnels, etc... Ces variations sont pour la cellule des stress auxquels elle répond en modulant ses activités internes dans le but de s'adapter aux nouvelles conditions qui lui sont imposées. Les agressions qui affectent le plus souvent une cellule sont des changements de pression osmotique : en cas de choc hyperosmotique, les cellules sont victimes d'une perte d'eau par diffusion passive contre laquelle elles réagissent, entre autres, par l'accumulation d'osmolytes. Chez *S. cerevisiae*, cette voie d'osmoadaptation a pour effecteur terminal la protéine Hog1 : au cours de la réalisation de cette thèse, cette MAPK a été identifiée comme

étant une des cibles de la (R)-roscovitine chez la levure, c'est pourquoi, cet *osmocheckpoint* est détaillé dans cette introduction.

En condition basale, la protéine Hog1 est retrouvée dans le cytoplasme comme dans le noyau. Lorsque la levure est soumise à un stress osmotique, la cascade enzymatique enclenchée mène à la phosphorylation de Hog1 qui est alors rapidement relocalisée au noyau.

Contrôle de la phase G1 par les SAPKs

L'activation de Hog1 en condition d'osmolarité élevée arrête la progression du cycle en phase G1. Afin d'être dégradée par le protéasome et ainsi de lever son effet inhibiteur, Sic1 doit être phosphorylée par les complexes Ccd28/Cln1, et Cdc28/Cln2 ; or en cas d'activation de Hog1, l'expression des cyclines Cln1, Cln2 et Clb5 est réprimée. Ceci représente une des causes de l'arrêt observé, à laquelle doit être ajouté le fait que Hog1 interagit directement avec Sic1 pour le phosphoryler sur le résidu Thr-173. Cette phosphorylation empêche sa reconnaissance par les mécanismes de destruction protéolytique. Hog1 activée est donc à la base de deux mécanismes indépendants qui maintiennent l'effet inhibiteur de Sic1 et qui empêchent la cellule de passer en phase S.

Contrôle de la phase G2 par les SAPKs

Ces mêmes conditions de stress peuvent aussi empêcher la cellule d'accomplir l'intégralité de la phase G2. Là encore, deux événements conséquents à l'activation de Hog1 sont responsables de ce blocage. Tout d'abord, on note dans ces conditions une diminution d'activité de Cdc28 couplée à la cycline Clb2, ainsi qu'une régulation négative de l'expression de cette même cycline alors que ce complexe CDK/cycline joue un rôle dans l'entrée en mitose. D'autre part, lors d'un cycle normal, la protéine Hsl1 recrute Hsl7 à la constriction entre la cellule mère et la cellule fille. Cette dernière entraîne avec elle Swe1 dans le but de la dégrader et de lever ainsi la phosphorylation inhibitrice qu'elle exerce sur Cdc28 couplée à Clb2. Lorsque Hog1 est activée, elle interagit directement avec Hsl1 au niveau de son site de fixation à Hsl7. Ainsi, Swe1 ne peut être dégradée et s'accumule, entraînant un maintien de l'inhibition de Cdc28/Clb2 et donc un blocage de l'entrée en mitose.

Contrôle de la mitose par les SAPKs

Le rôle des SAPKs dans le contrôle de la mitose est moins clair mais il semblerait qu'il existe tout de même. Chez *S. pombe*, il a été montré que suite un choc osmotique, les cellules en mitose se bloquent en anaphase/télophase : grâce à l'action spécifique de Sty1 (homologue de Hog1), la séparation des chromosomes n'a pas lieu.

D'autre part, la sortie de mitose semble aussi être régulée par les SAPKs en condition de stress. Le mécanisme sous-jacent à cette régulation de la sortie de mitose reste inconnu.

Première partie

Introduction

Généralités

La cytokinèse est la dernière étape du cycle cellulaire. Elle correspond à la séparation physique entre la cellule mère et sa cellule fille. Selon les ouvrages, cette phase du cycle cellulaire est aussi appelée cytocinèse, cytodiérèse ou encore plasmodiérèse. Dans ce manuscrit, c'est le terme de cytokinèse, une francisation de *cytokinesis*, qui sera utilisé.

La cytokinèse fait partie du cycle cytoplasmique. Faisant suite à la mitose, elle doit être parfaitement coordonnée avec le cycle chromosomique, tant spatialement que temporellement : elle doit se faire au milieu du fuseau mitotique de façon libérer deux cellules ayant des contenus chromosomiques similaires (Guertin *et al.*, 2002) et elle ne doit avoir lieu qu'une fois la séparation des chromosomes achevée.

Cette étape du cycle de division cellulaire est caractérisée par la mise en place d'un anneau contractile qui contient plusieurs protéines : l'actine et la myosine en sont les constituants majeurs et c'est pourquoi on retrouve très souvent dans la littérature le terme « anneau d'actomyosine » pour le désigner. Il se contracte au niveau équatorial du fuseau mitotique avant de se refermer complètement entre les deux cellules filles. Bien que la myosine ait un rôle central en tant que moteur de cette contraction, cette dernière nécessite l'intervention de diverses protéines telles que les septines, des protéines de la famille PCH, de la famille IQGAP ou encore des GTPases des familles Rac, Rho ou Cdc42. L'ordre d'intervention de toutes ces protéines, leur(s) fonction(s) et leur régulation sont encore très mal connus et reflétant ainsi l'état actuel des connaissances sur cette étape de la division : alors que la mitose a fait l'objet de nombreuses recherches et est à ce jour extrêmement bien documentée, la cytokinèse reste une phase du cycle cellulaire encore peu comprise.

Comme il a été souligné plus haut, la séparation physique des cellules ne peut avoir lieu que lorsque les chromosomes sont équitablement répartis dans les deux futures cellules filles. Trois types de kinases contrôlent cette répartition : les CDKs, la kinase Plk1 (polo kinase) et la kinase citron. Alors que le mode d'action de cette dernière reste flou, nous savons que l'inactivation du complexe CDK1/cycline B est indispensable au déclenchement

de la cytokinèse. En effet, cette CDK inhibe la myosine en phosphorylant sa chaîne légère. Plk1, quant à elle, participe à la destruction de la cycline B, permettant ainsi d'inactiver CDK1 (Meijer, 2003). D'autre part, plusieurs données indiquent que la cytokinèse implique divers processus biologiques tels que le trafic intracellulaire, la sécrétion et le recyclage membranaire.

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la cytokinèse présentent quelques particularités, essentiellement visibles d'un point de vue morphologique. Dans les cellules de mammifères et chez *Schizosaccharomyces pombe* (levure fissipare), la division se fait au milieu de la cellule : on parle de fissiparité. Chez *Saccharomyces cerevisiae* (levure bourgeonnante), la cellule en division détermine dès la phase G1 le futur lieu de clivage : c'est à cet endroit qu'apparaît alors le bourgeon qui donnera naissance à la cellule fille. Cette dernière est libérée après la cytokinèse avec une taille inférieure à celle de la cellule mère. En plus de cette différence, il faut aussi rappeler que les levures (*S. cerevisiae* et *S. pombe*) ont une mitose particulière : tout au long de la division cellulaire, l'enveloppe nucléaire reste intacte, on parle d'endomitose.

De plus, *S. cerevisiae* et *S. pombe*, présentent une paroi que n'ont pas les cellules animales. Cette paroi est essentiellement composée de polysaccharides disposés sur toute la surface membranaire. La chitine est aussi un constituant important de la paroi bien que présente en très faible proportion. Elle est régulée dans le temps et dans l'espace au cours du cycle cellulaire. La présence de la paroi implique, en plus de la formation de l'anneau contractile, celle d'un septum. A la fin de la phase G1, entre la formation de l'anneau d'actomyosine et l'apparition du bourgeon, la chitine synthase III (Chs3) forme un anneau de chitine qui persiste jusqu'à la cytokinèse. A la fin de la mitose, lorsque les deux noyaux sont séparés, la chitine synthase II (Chs2) est à l'origine de l'apparition centripète, au sein de l'anneau sus-cité, d'un disque de chitine : il forme le septum primaire. Par la suite, de part et d'autre de ce disque, le septum secondaire se forme. Finalement, la séparation physique des cellules a lieu sous l'action d'une endochitinase qui dégrade le septum primaire.

Deux voies redondantes permettent l'accomplissement de la cytokinèse

C'est donc par leur action synergique que la contraction de l'anneau d'actomyosine et la formation du septum vont permettre aux cellules de séparer. Une des particularités de *S. cerevisiae* est de pouvoir accomplir la cytokinèse malgré un déficit de l'anneau d'actomyosine ou de sa contraction (Bi *et al.*, 1998). Elle peut aussi accomplir la cytokinèse sans une voie active de la formation du septum. Dans les deux cas, la séparation des cellules est fortement retardée mais finit par se faire. Par contre, l'inactivation simultanée de ces deux processus empêche totalement les cellules de se séparer et est donc létale pour la levure. Ces deux événements distincts suggèrent donc la présence de deux voies de régulation de la cytokinèse : la voie de l'anneau d'actomyosine et la voie de la formation du septum. Chez la levure, ces deux mécanismes sont redondants dans le sens où la cytokinèse peut avoir lieu malgré le blocage d'une de ces deux voies (voir figure 11).

En amont, et contrôlant ces deux mécanismes, la protéine Iqg1 (aussi appelée Cyk1) : elle recrute notamment les filaments d'actine au niveau de l'anneau contractile.

La première voie, celle de l'anneau d'actomyosine, implique la formine Bni1 et la myosine-II Myo1. Ce sont ces deux protéines qui permettent l'assemblage d'un anneau contractile fonctionnel.

La deuxième voie contrôle la formation du septum et la séparation des cellules. Elle implique plusieurs protéines dont Bnr1 et la protéine de la famille PCH, Hof1.

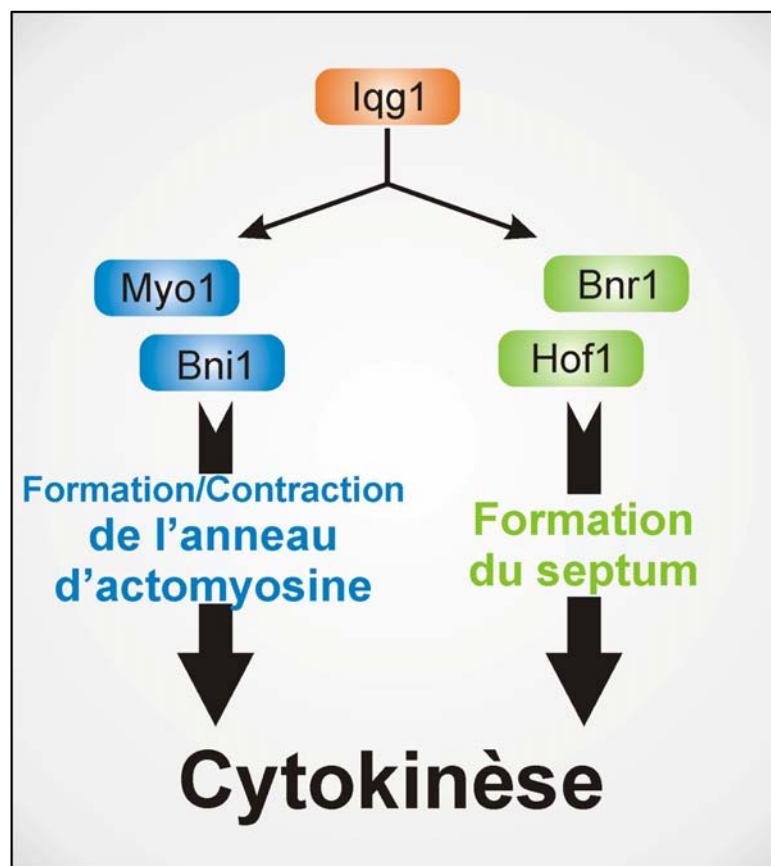


Figure 11 : La cytokinèse : deux voies génétiques redondantes chez la levure. L'accomplissement de la cytokinèse chez *S. cerevisiae* est dépendant de deux voies génétiques qui sont à la base (i) de la formation et de la contraction de l'anneau d'actomyosine et (ii) de la formation du septum. Ces deux voies génétiques sont redondantes : si une des deux voies est affectée, la seconde suffit à la cellule pour accomplir la cytokinèse.

La protéine Hof1 qui a été au cœur des travaux présentés dans ce manuscrit est impliquée dans la formation du septum et il a été suggéré qu'elle joue un rôle de coordination entre la formation de l'anneau contractile et celle du septum (Vallen *et al.*, 2000). De plus, d'autres auteurs ont émis l'hypothèse qu'elle pourrait moduler la stabilité de l'anneau d'actomyosine pendant sa contraction.

Malgré ces différentes hypothèses, le rôle biologique d'Hof1 était encore inconnu il y a quelques années. C'est dans ce contexte que notre équipe s'est intéressée à cette protéine et à sa (ses) fonction(s).

La dégradation de Hof1 par le protéasome est nécessaire à la contraction de l'anneau d'actomyosine

La protéine Hof1

Cette protéine de 76 kDa est localisée au niveau de la constriction entre la cellule mère et la cellule fille, à l'endroit même où se met en place l'anneau d'actomyosine. Elle tire son nom du fait que c'est l'homologue de Cdc15 retrouvée chez *S. pombe* (Hof1 pour *homolog of cdc fifteen*). Aussi appelée Cyk2, c'est une protéine de la famille PCH (pombe *Cdc15 homology*) dont les membres sont caractérisés par la présence de domaines particuliers dans un ordre précis (Lippincott & Li, 2000) : de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, on y trouve un domaine F-BAR formé de l'association des domaines FCH et *coiled-coil*, une ou plusieurs séquences PEST et enfin un ou plusieurs domaines SH3. Chacun de ses domaines est détaillé dans la partie « Résultats ». Comme pour Cdc15 chez *S. pombe*, la surexpression de Hof1 chez la levure bourgeonnante entraîne un défaut de cytokinèse : les cellules, incapables de se séparer après la mitose, ont une forme allongée (Lippincott & Li, 1998; Vallen *et al.*, 2000). La protéine de souris PSTPIP est l'homologue de ces protéines de levure. Surexprimée chez *S. pombe*, elle entraîne les mêmes phénotypes (Spencer *et al.*, 1997). Cette surexpression simule une dégradation déficiente de ces protéines : c'est en réalité ce phénomène qui empêche les cellules de se séparer. Cet aspect est détaillé plus loin dans ce manuscrit.

Aperçu du mode de fonctionnement de la protéolyse ubiquitine-protéasome dépendante

C'est la principale voie de dégradation des protéines solubles chez les eucaryotes. Ainsi, certains enzymes, protéines régulatrices, facteurs de transcription ou encore protéines anormales sont éliminés.

Le site de la protéolyse : le protéasome

Le protéasome 26S est un complexe multi-protéique. Il est formé d'un cylindre central (unité 20S) entouré de deux sous-unités régulatrices (unités 19S) qui forment un clapet d'entrée de part et d'autre du cylindre 20S. Il possède trois activités protéolytiques :

- une activité chymotrypsin-like clivant les protéines après des acides aminés hydrophobes,
- une activité trypsin-like qui coupe les peptides après des résidus basiques,
- une activité PGPH (Postglutamyl peptide hydrolytic-like) qui clive le substrat après les acides aminés acides.

Localisé dans le cytoplasme et dans le noyau, c'est donc la voie principale de dégradation des protéines solubles dans la cellule. Chez les mammifères, il résulte de cette activité peptidase des fragments peptidiques constitués de 3 à 25 acides aminés (Kisselev *et al.*, 1999).

Le protéasome 26S est le plus répandu mais il en existe d'autres types qui se distinguent par un changement des deux sous-unités régulatrices.

Ubiquitination des protéines : un pré-requis à la protéolyse

Afin que le protéasome reconnaisse les cibles qu'il doit dégrader, un signal lui permet de distinguer les protéines à dégrader de celles qui ne doivent pas l'être. Ce signal est un peptide de 76 acides aminés, l'ubiquitine, très conservé chez tous les eucaryotes (d'où son nom). Il est fixé par une liaison covalente entre son extrémité C-terminale et la chaîne latérale d'une lysine du substrat : la protéine cible est alors ubiquitinée. Cette ubiquitine peut, à son tour, être ubiquitinée sur une de ses lysines, formant ainsi des chaînes de poly-ubiquitine. Ce sont ces branches arborescentes de poly-ubiquitine qui permettent au protéasome de reconnaître les protéines qu'il doit dégrader.

La réaction d'ubiquitination nécessite l'intervention de plusieurs enzymes appelées E1, E2 et E3. L'ubiquitine est tout d'abord activée en formant une liaison thio-ester avec une cystéine de l'enzyme E1, dite « enzyme d'activation de l'ubiquitine ». L'ubiquitine peut alors être transférée sur l'enzyme E2, aussi appelée « enzyme de conjugaison ». Cette dernière est l'enzyme qui va catalyser l'ubiquitination, c'est-à-dire la formation de la liaison covalente entre la partie C-terminale de l'ubiquitine et la chaîne latérale d'une lysine de la protéine

cible. Enfin, la spécificité de substrat est assurée par l'ubiquitine ligase (ou enzyme E3). Ces enzymes E3 déterminent donc quelle protéine va être ubiquitinée (et donc dégradée par le protéasome 26S) ainsi que la localisation et le moment où cela aura lieu. Chez l'Homme, le nombre d'E3 est estimé à environ 500, ce qui est dix fois plus important que le nombre d'E2 (Semple, 2003). Bien qu'elle soit très peu décrite, une enzyme E4 semble intervenir dans certains cas afin de faciliter l'allongement de la chaîne d'ubiquitine (Koege *et al.*, 1999).

La découverte de l'ubiquitination des protéines ainsi que la compréhension de ce mode de protéolyse a permis de comprendre beaucoup de mécanismes de régulation cellulaire. Ces travaux ont été récompensés par l'attribution du prix Nobel de chimie à Irvin Rose, Avram Hershko et Aaron Ciechanover, en 2004.

Les complexes APC/C et SCF : deux types d'ubiquitine ligase

Il existe deux grandes familles d'ubiquitine ligase (E3). Elles se distinguent par leur manière d'agir lors de la fixation de l'ubiquitine au substrat. Une première famille a la particularité de former une liaison covalente avec l'ubiquitine avant de le transférer au substrat. A l'inverse, la seconde famille, participe au rapprochement de l'E2 et du substrat entre lesquels le transfert de l'ubiquitine se fait. Dans cette seconde famille, deux complexes protéiques sont particulièrement importants pour la régulation du cycle cellulaire. Il s'agit des E3 de type APC/C (Anaphase Promoting Complex / Cyclosome) et SCF (Skp-1 Cullin F-box protein).

L'APC est un complexe protéique composé d'au moins onze sous-unités protéiques. Parmi elles, y compris chez la levure, une sous-unité est variable : il s'agit d'une sous-unité adaptatrice qui peut être soit Cdc20 soit Cdh1. Cdc20 est maintenue inactive jusqu'à l'alignement complet et correct de tous les chromosomes sur la plaque métaphasique. Cette inhibition de Cdc20 est la conséquence d'une liaison avec des protéines du checkpoint du fuseau (voir « Introduction générale ») et une fois levée, l'APC/C^{Cdc20} peut alors réaliser l'ubiquitination spécifique des substrats mitotiques pour commencer l'anaphase mais aussi réaliser la sortie de mitose.

Un autre adaptateur de l'APC/C existe. Il s'agit de la protéine Cdh1 qui permet, après l'anaphase, d'ubiquitiner Cdc20 pour induire sa dégradation mais aussi celle de protéines dont la dégradation permettra à la cellule d'achever la mitose.

La structure du SCF est plus simple que celle de l'APC : elle consiste en un complexe de quatre protéines. Trois d'entre elles sont constantes et communes à tous les SCF : la culline (Cdc53 chez la levure *S. cerevisiae* ; elle entre en contact avec l'E2 qui est la protéine Cdc34), la protéine Hrt1 et enfin la protéine Skp1. La quatrième protéine qui entre dans la composition du SCF est une protéine à F-box : ce domaine caractéristique est en liaison directe avec la protéine Skp1. Cette protéine à F-box varie d'un complexe SCF à l'autre : tout comme Cdc20 et Cdh1 dans l'APC/C, elle joue un rôle de sous-unité adaptatrice qui reconnaît de manière spécifique le substrat qui doit être ubiquitiné et dégradé. Chez la levure, il existe une quinzaine de protéine à F-box dont les plus étudiées sont Cdc4, Met30 et Grr1. Ainsi le SCF^{Cdc4} reconnaît spécifiquement les CKI Sic1 et Far1, entraînant leur destruction et la possibilité pour la cellule d'entrer en phase S. Le SCF^{Met30} est à l'origine de la dégradation de Swe1 (kinase inhibitrice de Cdc28) et du facteur de transcription Met4. Le SCF^{Grr1} est, quant à lui, responsable de la destruction des cyclines G1 Cln1 et Cln2 et de la protéine Gic2, responsable de la formation du bourgeon.

D'après ces données, le SCF a donc semblé être impliqué essentiellement dans la transition entre les phases G1 et S et dans l'entrée en mitose. Plus récemment il a été montré au laboratoire que le SCF^{Grr1} permettait de réguler la cytokinèse chez la levure. Cette observation, dont a découlé le sujet de thèse présenté, est détaillée dans le paragraphe suivant.

Dégradation de Hof1 via le SCF^{Grr1}

La reconnaissance des différents substrats des E3 ligases de type SCF est contrôlée à au moins deux niveaux : (i) la phosphorylation des substrats (elle est indispensable à leur reconnaissance par la protéine à F-box) (Deshaies, 1997) et (ii) la localisation intracellulaire des protéines à F-box et des substrats (Blondel *et al.*, 2000). Parmi les protéines à F-box de la levure, Grr1 présente une localisation particulière dans l'espace et dans le temps : alors qu'elle se localise dans le noyau et le cytoplasme tout au long du cycle cellulaire, une fois la mitose terminée, on la retrouve au niveau de l'anneau d'actomyosine : cela suggère un rôle du

SCF^{Grr1} en cytokinèse. C'est ainsi que Hof1 a été identifiée comme étant un de ses substrats (Blondel *et al.*, 2005) : l'interaction entre ces deux protéines a été mise en évidence *in vivo* par la méthode du double hybride ainsi que par la technique du BiFC (Bimolecular fluorescence complementation). Hof1 est une sorte d' « agent double » de la cytokinèse : bien qu'elle soit nécessaire au bon accomplissement de cette phase, sa surexpression est toxique car elle empêche la séparation des cellules en fin de cytokinèse. En effet, la protéine doit être dégradée afin de permettre à la cellule d'achever sa séparation physique. Pour cela, elle est reconnue par le SCF^{Grr1} au niveau de son domaine PEST. Riche en résidus Proline, Acide Glutamique, Sérine et Thréonine, cette séquence est nécessaire pour la reconnaissance par l'E3 et donc son ubiquitination qui précède sa dégradation par le protéasome 26S (Blondel *et al.*, 2005).

Ces données ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme qui contribue à expliquer le couplage entre la mitose (cycle chromosomique) et la cytokinèse (cycle cytoplasmique) (voir figure 12) :

- à la fin de la mitose, Hof1 est phosphorylée de façon dépendante du MEN (Mitotic Exit Network : un réseau de protéine kinases activé pour la sortie de mitose),
- cette phosphorylation permet sa reconnaissance par Grr1 et donc son ubiquitination par l'E3 ligase SCF^{Grr1} conduisant à sa protéolyse par le protéasome 26S,
- la dégradation d'Hof1 permet une contraction correcte de l'anneau d'actomyosine nécessaire à l'achèvement de la cytokinèse,
- hof1ΔPEST, une forme mutée stabilisée (car non phosphorylable) de Hof1 retarde la contraction de l'anneau.

Un même mécanisme moléculaire (l'activation du MEN) conduit donc à la fois, à la sortie de la mitose et à l'accomplissement de la cytokinèse (Blondel *et al.*, 2005). Un tel couplage est important pour l'intégrité du génome : une mauvaise coordination entre mitose et cytokinèse peut conduire à des cellules aneuploïdes et/ou polyploïdes. Chez les eucaryotes supérieurs, de tels dysfonctionnements peuvent être à l'origine de cascades biologiques desquelles découle souvent l'apparition de tumeurs.

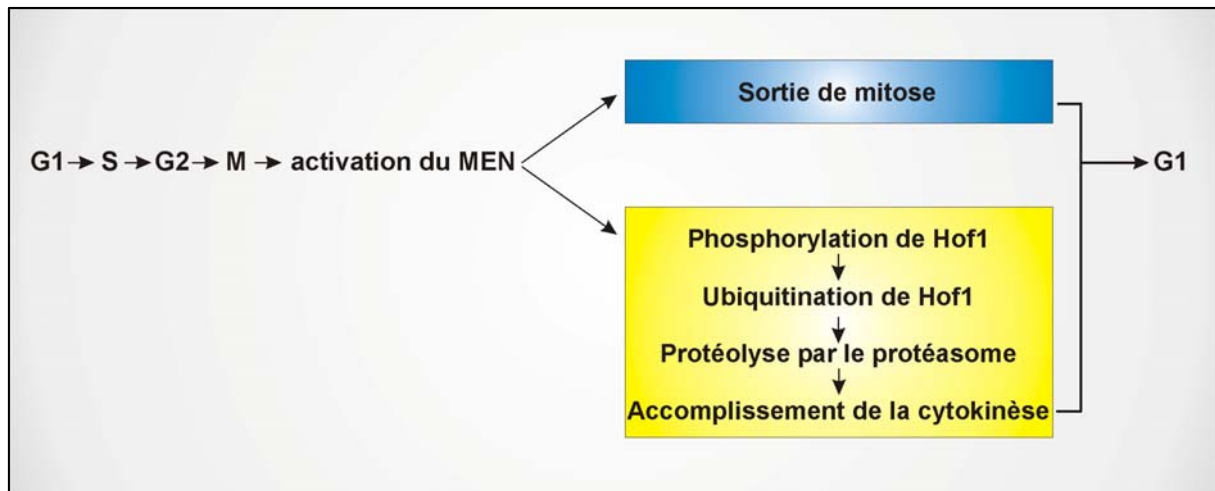


Figure 12 : Rôle de la dégradation de Hof1 dans le couplage entre les cycles chromosomique et cytoplasmique : un même évènement, l'activation du MEN, active la sortie de mitose et la dégradation de Hof1 par le SCF^{Grr1} qui permet l'accomplissement de la cytokinèse (d'après (Blondel *et al.*, 2005))

Le recyclage membranaire

Le recyclage membranaire joue un rôle essentiel dans la physiologie cellulaire. Il est responsable d'une partie importante du contrôle de la composition et de la fonction de la membrane plasmique. En effet, afin de maintenir une quantité normale de lipides et de protéines, la cellule utilise les mécanismes de sécrétion (ou d'exocytose) et d'endocytose entre lesquels il y a un équilibre.

Outre la libération de molécules par la cellule, l'exocytose permet la livraison de protéines membranaires nouvellement synthétisées à la membrane. Elles y sont incorporées par fusion des vésicules de transport qui proviennent de l'appareil de Golgi. La fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique est aussi à la base d'un apport de membrane qui va accroître la surface totale de la cellule lors de la division, et plus particulièrement lors de la formation du bourgeon chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Le phénomène inverse est l'endocytose. Une portion de la membrane plasmique s'invagine au sein de la cellule afin de générer une vésicule d'endocytose. L'internalisation de cette vésicule permet de contrôler la présence des protéines membranaires à la surface de la cellule. C'est un procédé très rapide qui peut se faire manière constitutive (ligand-

indépendante) ou bien sous la dépendance de la fixation d'un ligand à la protéine membranaire (Chen & Davis, 2002). D'une manière générale, la première voie est utilisée pour la dégradation des protéines membranaires dans la vacuole. Les vésicules d'endocytose formées fusionnent avec les endosomes. On en distingue deux sortes, morphologiquement et biochimiquement différentes : les endosomes précoces et les endosomes tardifs. Certaines protéines internalisées sont donc dirigées vers la vacuole qui est le lieu de la dégradation des protéines (ce type de dégradation protéique est différent de la voie ubiquitine / protéasome décrite auparavant, bien que l'endocytose soit souvent dépendante de l'ubiquitination des protéines membranaires qui internalisées (Galan *et al.*, 1996; Rotin *et al.*, 2000)).

Un troisième type de transport relie les voies d'endocytose et d'exocytose. Il s'agit du trafic antérograde et rétrograde qui permet les échanges entre les endosomes et l'appareil de Golgi. Ces échanges présentent de multiples possibilités : ils peuvent se faire entre les endosomes, qu'ils soient précoces ou tardifs, et l'appareil de Golgi. C'est ainsi que les protéines membranaires internalisées suite à la fixation de leur ligand peuvent être dirigées vers l'appareil de Golgi afin d'être recyclées à la membrane et non pas dégradées.

Ce genre de phénomène permet à la cellule de faire face aux variations environnementales en adaptant la composition protéique de la membrane d'une manière qui soit économique pour la cellule. Cela lui permet par exemple de relocaliser des récepteurs à un endroit bien précis : c'est le cas des récepteurs aux phéromones sexuelles chez *S. cerevisiae*. Les protéines Ste 2 et Ste3, qui correspondent respectivement aux récepteurs des facteurs α et a , sont réparties de manière uniforme sur la membrane des levures haploïdes. Lorsque ces récepteurs reçoivent leur ligand, une cascade de signalisation indique à la cellule qu'elle doit bloquer le cycle de division en phase G1. En parallèle, et de manière très rapide, les récepteurs vont être internalisés puis recyclés afin d'être concentrés sur la zone membranaire la plus proche du partenaire sexuel. Cela permet à la cellule de localiser son partenaire sexuel et de croître de manière polarisée vers lui (formation de *shmoo*s : terme utilisé en référence à des personnages de bande dessinée américaine des années 50 qui avaient une forme de poire).

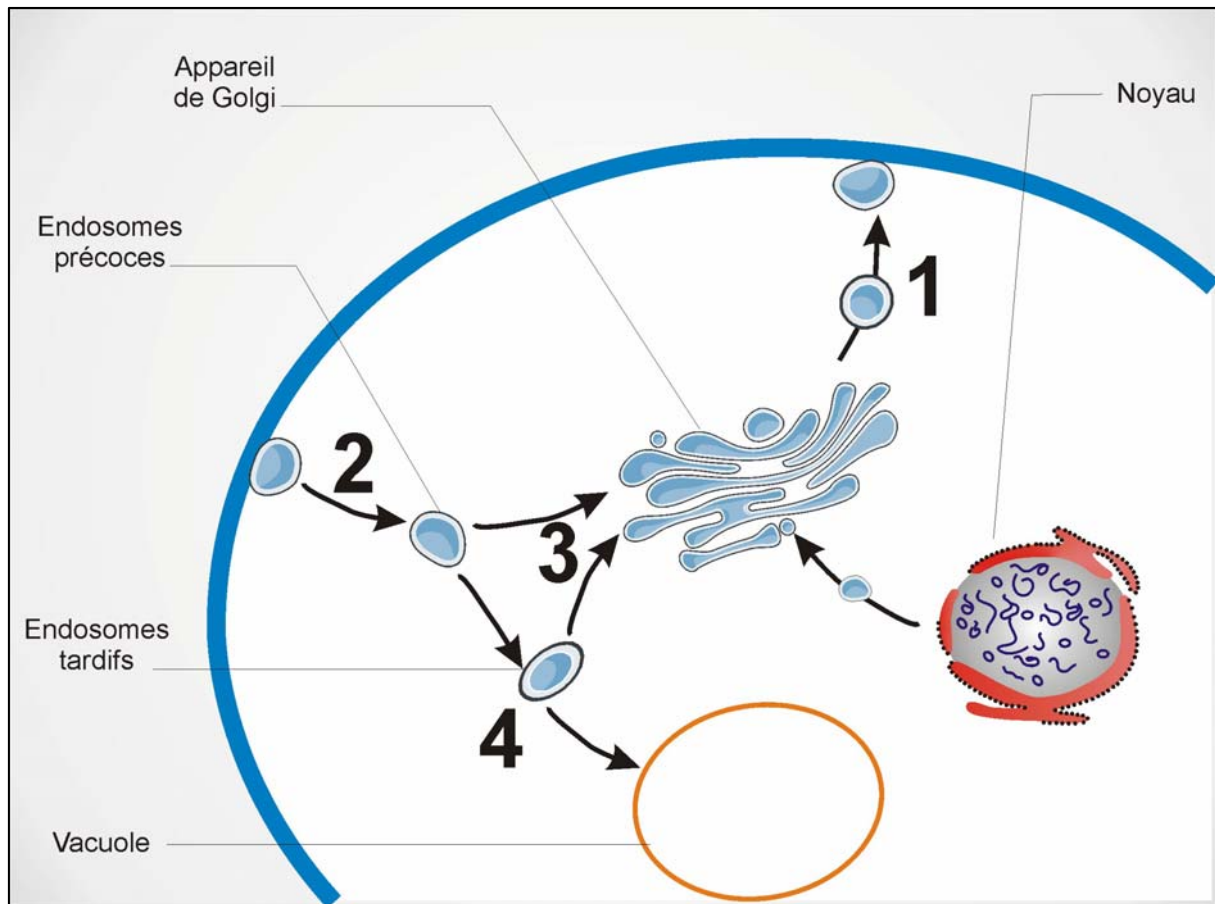


Figure 13 : Représentation schématique du recyclage membranaire chez la levure. Différentes étapes caractérisent le transport de membranes et de protéines membranaires chez la levure : **1** l'exocytose permet l'adressage de vésicules et de protéines membranaires vers la membrane plasmique. **2** Ces protéines peuvent être internalisées par voie d'endocytose. **3** Elles peuvent alors être dirigées vers l'appareil de Golgi dans le but d'être recyclées. **4** A l'inverse, certaines d'entre elles se dirigent vers la vésicule afin d'être dégradées.

La relation entre le recyclage membranaire et l'accomplissement de la cytokinèse a déjà été mise en évidence chez les eucaryotes supérieurs (Strickland & Burgess, 2004) mais jamais, à notre connaissance chez la levure. Les résultats présentés dans ce manuscrit sont en faveur d'un rôle de Hof1 dans le recyclage membranaire chez *S. cerevisiae*. Tout en considérant le rôle déjà connu de Hof1 dans la cytokinèse, il semblerait que les travaux présentés ici établissent, pour la première fois, une relation entre ces deux mécanismes.

Résultats

Les résultats présentés ici ont fait l'objet d'une publication soumise au journal *Biology of the cell*. L'article est actuellement en cours de révision (Bamps *et al.*, 2008).

Le recyclage membranaire est polarisé au cours du cycle cellulaire

Afin de suivre le recyclage membranaire au cours du cycle cellulaire de *S. cerevisiae*, nous avons utilisé un outil qui consiste à suivre la localisation et la phosphorylation du marqueur Snc1 (Galan *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2000). Cette protéine de levure est impliquée dans la fusion des vésicules émanant de l'appareil de Golgi avec la membrane plasmique. De plus, elle est impliquée dans l'endocytose et donc localisée dans les endosomes, ces compartiments qui fusionnent avec les vésicules d'endocytose. Une fois synthétisée, Snc1 est donc continuellement recyclée, passant d'une localisation membranaire à une localisation intracellulaire. En parallèle, ce marqueur est phosphorylé lorsqu'il est localisé à la membrane plasmique et déphosphorylé quand il est internalisé.

Nous avons transformé une souche de levure avec un vecteur exprimant la protéine Snc1 en fusion, sur son extrémité N-terminale, avec la protéine fluorescente verte (GFP). La protéine de fusion est exprimée sous la dépendance d'un promoteur constitutif TPI. Une souche sauvage transformée présentant un phénotype de recyclage classique sera caractérisée d'une part, par une localisation ubiquitaire de la fluorescence, avec un marquage bien plus fort au niveau de la membrane plasmique et d'autre part, par la présence de deux bandes distinctes lors d'un Western blot dirigé contre la GFP : la forme phosphorylée de la protéine est celle qui migre le moins. A l'inverse, une souche ayant un défaut de recyclage aura une fluorescence essentiellement localisée au niveau des endosomes voire de la vacuole (lieu de destruction des protéines). De façon corrélée avec l'absence d'accumulation membranaire de la protéine de fusion, sur un Western blot, seule la bande la plus basse sera visible (forme non phosphorylée localisée dans le cytoplasme).

Dans une souche sauvage (K699, fond W303), nous avons observé une localisation polarisée du marqueur GFP-Snc1 au cours du cycle cellulaire (voir figure 14). En plus des photos présentées (panel A), un film a été réalisé (JM Galan, IJM, Paris) en vidéo-microscopie (dont quelques images sont représentées dans le panel B). Dès la phase G1, on observe une localisation accentuée de ce recyclage à l'endroit où apparaît le bourgeon.

Jusqu'en fin de mitose, c'est dans la future cellule fille que ce recyclage est le plus intense. Par la suite, une fois la mitose accomplie (ceci est visible grâce au marquage du noyau au DAPI), il y a une relocalisation rapide de la fluorescence au niveau de la constriction entre la cellule mère et la cellule fille (indiquée par les flèches blanches sur les deux panels de la figure 14). Cette donnée indique que le recyclage membranaire est particulièrement actif au niveau de la constriction entre la cellule mère et la cellule fille, au moment où les deux cellules se séparent. Ces observations suggèrent que le recyclage membranaire est très actif dans les régions nécessitant une expansion de la membrane et plus particulièrement au niveau de la constriction entre cellule mère et cellule fille lors de la séparation physique des cellules. Ceci constitue une première indication d'un lien possible entre la cytokinèse et le recyclage membranaire.

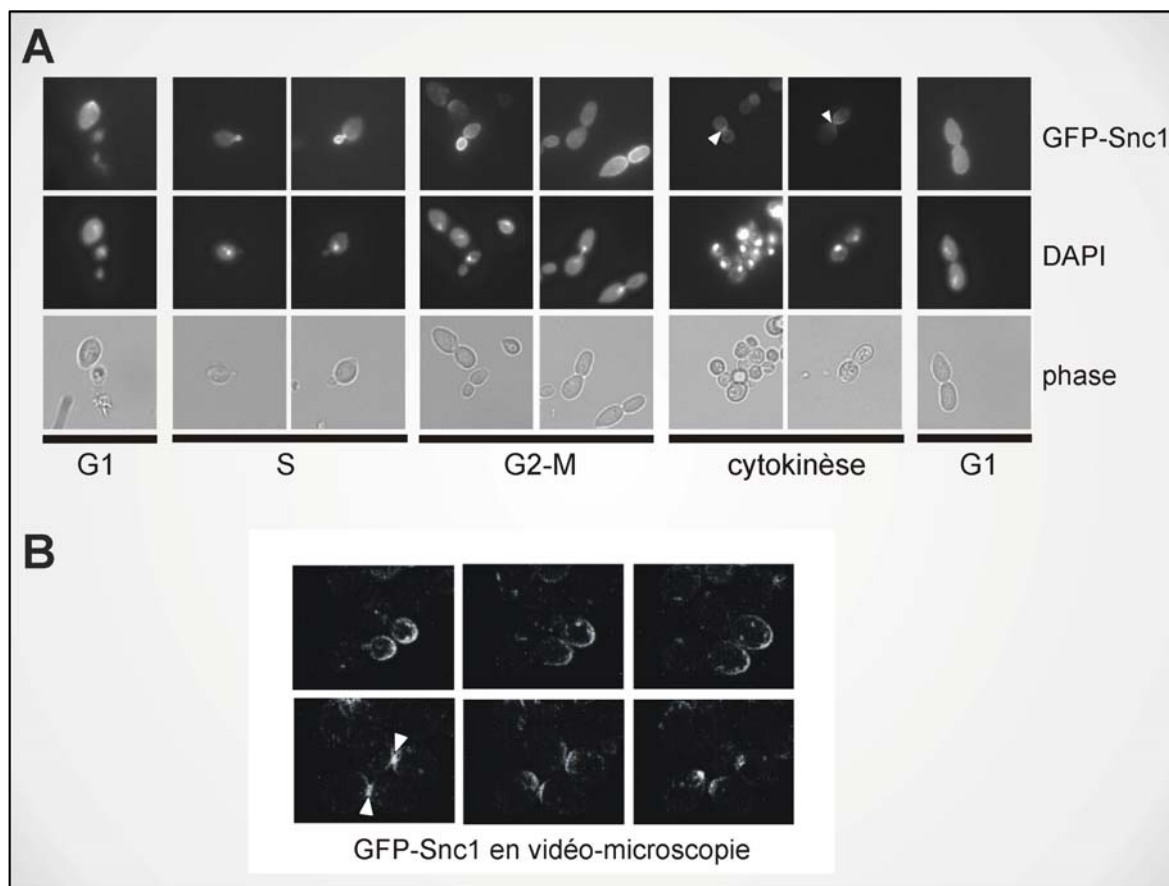


Figure 14 : Le recyclage membranaire de GFP-Snc1 est polarisé au cours du cycle cellulaire. Une souche sauvage de levure exprimant le marqueur de recyclage GFP-Snc1 est observée au microscope (**panel A**) à différents moments du cycle cellulaire. Ces différentes étapes de la division sont déterminées grâce à la morphologie des cellules (observation en phase) et à un marquage du noyau au DAPI. Le suivi du recyclage a aussi été observé en vidéo-microscopie : certaines images extraites du film sont représentées ici (**panel B**), elles ont été prises à des intervalles de temps de 4 minutes. Le fait le plus marquant est de voir que ce recyclage membranaire est particulièrement actif au niveau de la constriction au moment de la cytokinèse. Cette relocalisation est extrêmement rapide.

***HOF1* et gènes du recyclage membranaire : des interactions génétiques**

Afin de confirmer l'implication potentielle d'Hof1 dans le trafic membranaire au moment de la cytokinèse, nous avons recherché des interactions génétiques possibles entre le gène *HOF1* et d'autres gènes impliqués dans cette phase du cycle. De plus, nous avons étudié les interactions génétiques possibles entre *HOF1* et deux gènes nécessaires au recyclage membranaire : *VPS51* et *RCY1*.

Cette approche est basée sur le principe des phénotypes synthétiques. On dit qu'il y a une interaction génétique entre deux gènes quand la combinaison de mutations entre eux deux conduit à un phénotype non visible dans le cas des simples mutants. Ce phénotype peut être la mort cellulaire ; dans ce cas, on parle de létalité synthétique ou de co-létalité. Ici, la viabilité des levures est déterminée par l'utilisation des tests en gouttes. L'ensemble des résultats est repris dans le tableau ci-dessous (figure 15, panel A). Les signes + et – indiquent que les cellules sont viables ou non. Dans certains cas, elles sont viables mais sont thermosensibles (notées ts) ou cryosensibles (notées cs). Il est intéressant de noter que parmi tous les mutants de la cytokinèse, seule la délétion du gène *HOF1* montre une interaction génétique claire avec *VPS51* ainsi que *RCY1*. En effet, le double mutant *hof1Δ-vps51Δ* présente un fort défaut de croissance (panel B) mais aussi un changement morphologique très marqué (panel C) particulièrement évident lorsque l'on utilise un marquage au calcofluor (cet agent a une forte affinité pour la chitine présente dans la paroi cellulaire). Les mêmes observations ont été faites sur un double mutant *hof1Δ-rcy1Δ* (résultats non montrés). En parallèle, les doubles mutants *bni1Δ-vps51Δ* et *bni1Δ-rcy1Δ* (panel B et résultats non montrés) ont une croissance sensiblement identique à celle des simples mutants. Considérant l'ensemble de ces données, nous pouvons donc dire qu'il existe une relation, au moins en termes d'interaction génétique, entre la cytokinèse et le recyclage membranaire chez *S. cerevisiae*. Cette observation permet d'émettre une hypothèse quant au rôle de Hof1 dans le couplage de ces deux mécanismes.

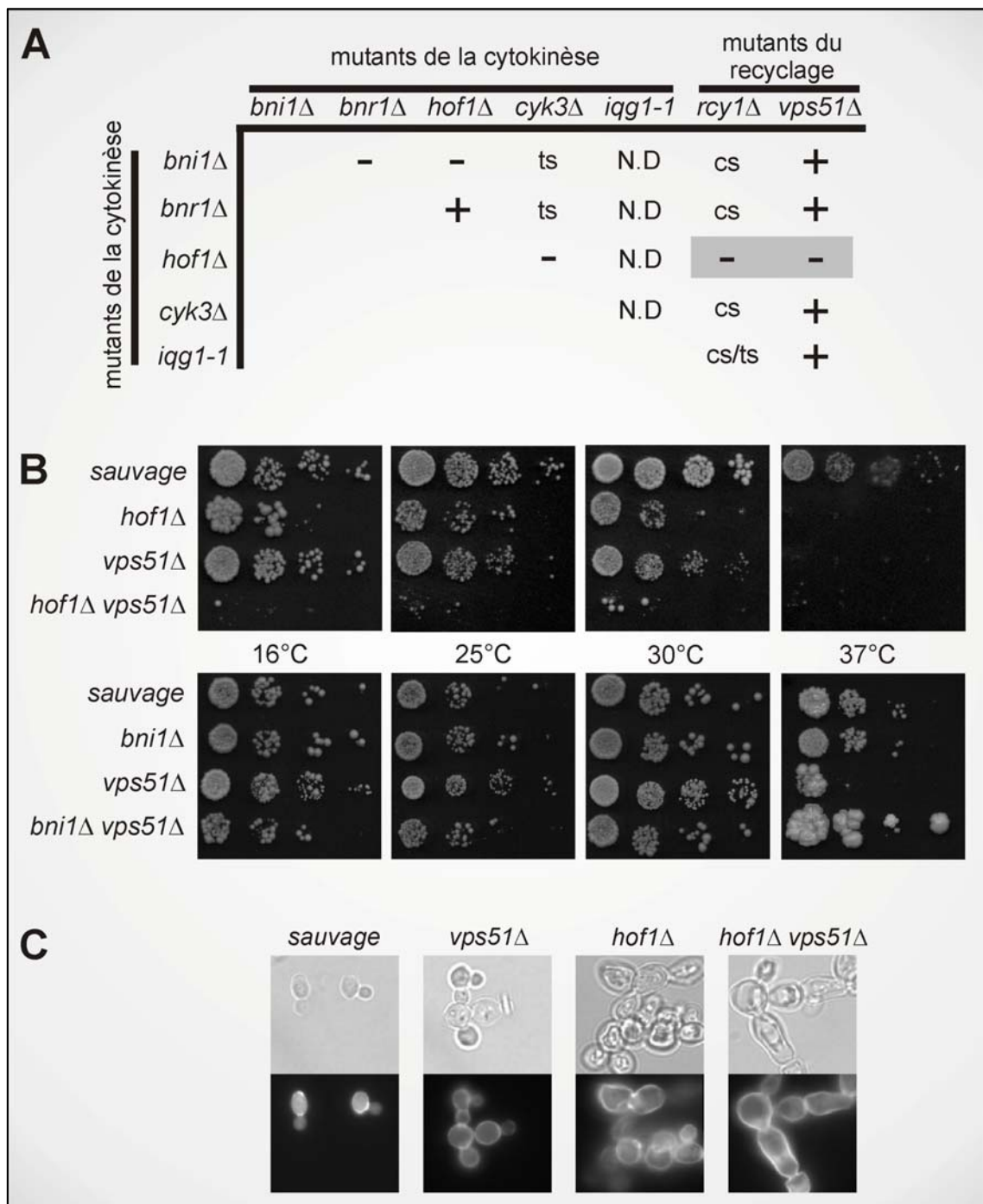


Figure 15 : Interactions génétiques entre *HOF1* et des gènes impliqués dans le recyclage membranaire. **A**, Résumé des phénotypes observés chez différents doubles mutants (ts & cs : viables mais croissance thermosensible et/ou cryosensible ; + : viables ; - : létales ou gros défauts de croissance ; N.D : non déterminé) : parmi les mutants de la cytokinèse, seul le gène *HOF1* montre une interaction génétique avec les gènes du recyclage. **B**, Le test en goutte confirme ces observations : alors qu'une mutation *hof1Δ* ou *vps51Δ* n'entraîne qu'un faible défaut de croissance, la double mutation est létale. Cela est spécifique de *HOF1* car le même type d'expérience avec le gène *BNII* n'affecte pas les cellules. **C**, Grâce à un marquage au calcofluor, on peut étudier la morphologie des cellules et on s'aperçoit qu'en plus de la létalité synthétique observée, la délétion du gène *VPS51* amplifie le défaut de cytokinèse des cellules *hof1Δ* : les cellules sont allongées et présentent des constriction élargies entre la cellule mère et la cellule fille.

Un défaut de recyclage est spécifique au mutant *hof1Δ*

Suite aux observations décrites plus haut, nous avons analysé les capacités de recyclage de différents mutants de cytokinèse, dont une souche *hof1Δ*, à l'aide de l'outil GFP-Snc1. Les mutants étudiés touchent les deux voies redondantes décrites au cours de l'introduction (figure 11) : les mutations *myo1Δ* et *bnl1Δ* concernent la voie de l'anneau d'actomyosine alors que les délétions de *HOF1* et *BNR1* concernent l'ajout de membrane. En outre, des souches *cyk3Δ* et *iqg1-1*, d'autres mutants de la cytokinèse ont été analysés. Les contrôles sont les souches *sauvage*, *bzz1Δ* et *ypt6Δ* : le produit du gène *YPT6* est nécessaire à la fusion des vésicules d'endocytose avec l'appareil de Golgi, sa délétion entraîne un défaut de recyclage clairement visible en microscopie lorsque Snc1 est couplé à la GFP (Siniosoglou *et al.*, 2000). Le gène *BZZ1* n'est pas directement impliqué dans la cytokinèse mais il code pour une protéine de la famille PCH tout comme *HOF1*.

Le suivi du marqueur Snc1 dans les mutants *myo1Δ*, *bnl1Δ*, *bnr1Δ*, *cyk3Δ* et *iqg1-1* montre que ces souches sont capables de réaliser un recyclage normal, tout comme la souche *sauvage* (voir figure 16, panel A). Cette observation est confirmée par Western blot (panel C) où la protéine de fusion GFP-Snc1 apparaît à la fois sous sa forme phosphorylée (marquée d'un astérisque) et non phosphorylée. Contrastant avec ces mutants, la souche *hof1Δ* montre un défaut de recyclage identique à celui du contrôle *ypt6Δ* : le marqueur GFP-Snc1 apparaît sous forme de points diffus au sein du cytoplasme (panel A) tout en apparaissant non phosphorylé (panel C). De plus, la localisation polarisée à la constriction qui est visible dans les autres souches au moment de la cytokinèse n'est plus visible dans la souche *hof1Δ* (marquée par des flèches blanches dans le panel A). Comme dans la souche *sauvage* (figure 14), dans un mutant *hof1Δ*, la protéine de fusion GFP-Snc1 est essentiellement présente dans le bourgeon jusqu'à la mitose. Malgré cela, on note que le défaut de recyclage est visible tout au long du cycle cellulaire et qu'il devient particulièrement remarquable lorsque la cellule approche de la cytokinèse. L'observation de la souche *bzz1Δ* montre, quant à elle, un recyclage identique à la souche *sauvage* : cela indique que le défaut observé est une conséquence spécifique à la délétion du gène *HOF1* et non pas un trait de caractère commun à un déficit d'une des protéines PCH en général.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons utilisé en collaboration avec Jean-Marc Galan, un test utilisant le colorant FM4-64. Cette molécule est placée dans le milieu de culture des levures qui peuvent alors l'incorporer. Une série de lavages permet d'éliminer les

fractions restantes de colorant dans le milieu avant de mesurer son relargage à l'aide d'un spectrofluorimètre (Wiederkehr *et al.*, 2000). La souche *hof1Δ* présente là aussi un défaut marqué de recyclage membranaire en comparaison avec les souches *bni1Δ* et *sauvage* (figure 16, panel D).

Ces dernières constatations renforcent l'hypothèse d'une relation entre le recyclage membranaire et la cytokinèse chez la levure *S. cerevisiae* tout en pointant le rôle de Hof1 dans le lien formé entre ces deux processus biologiques. Ainsi, nous avons ici un premier indice quant à la fonction biologique jusque là inconnue de cette protéine.

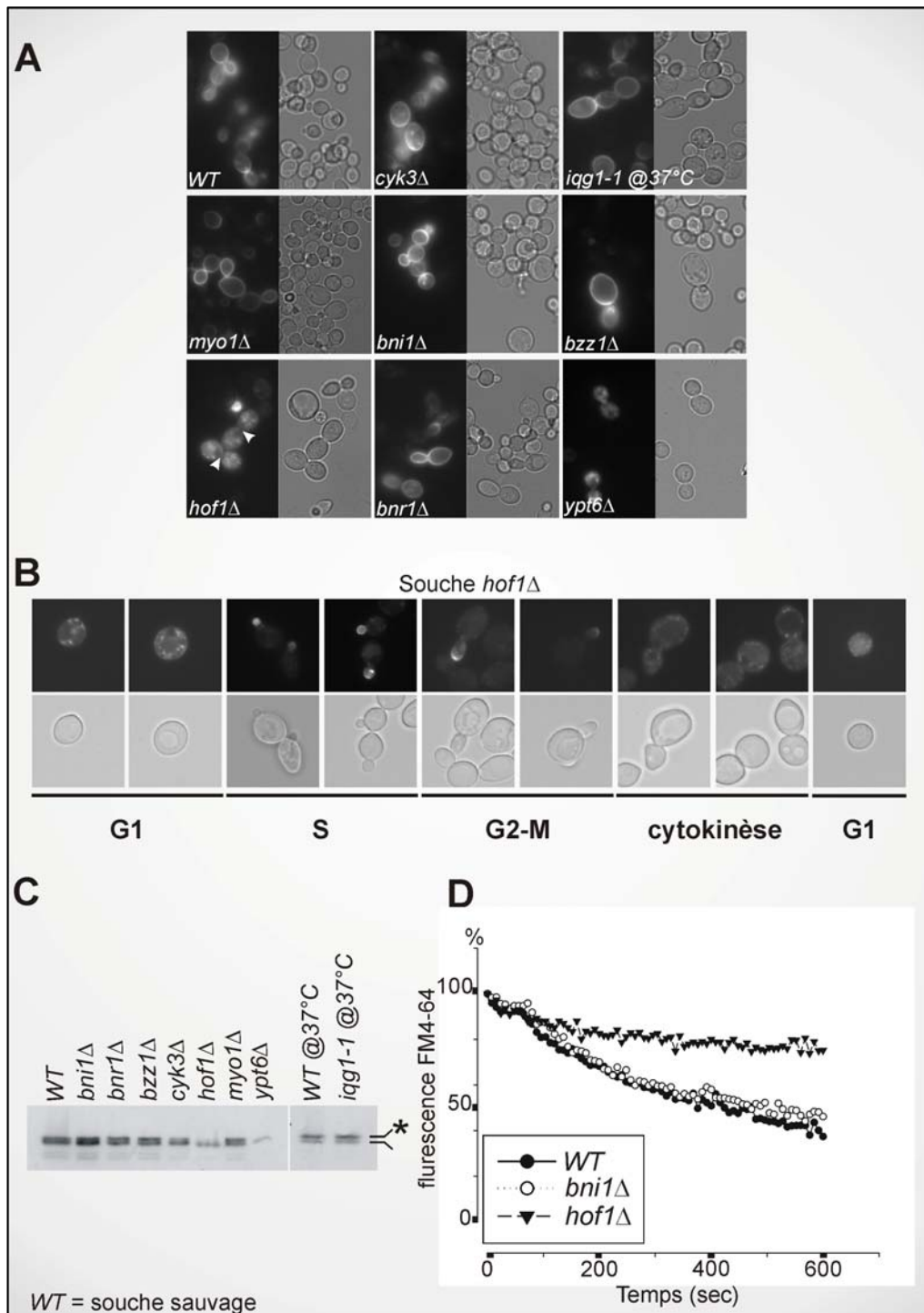


Figure 16 : La délétion du gène *HOF1* affecte le recyclage membranaire. **A**, Différents mutants de la cytokinèse exprimant la protéine GFP-Snc1 sont observés. Les souches *sauvage*, *bzz1Δ* et *ypt6Δ* servent de contrôles. En comparaison avec les mutants testés, seule la souche *hof1Δ* présente un défaut de recyclage membranaire. **B**, Le défaut de recyclage est visible tout au long du cycle cellulaire dans une souche *hof1Δ*. En particulier, la polarisation du recyclage disparaît au moment de la cytokinèse. **C**, L'état de phosphorylation de GFP-Snc1 permet de confirmer que l'exportation à la membrane est compromise dans la souche *hof1Δ* comme le mutant de recyclage *ypt6Δ*. **D**, Contrairement à la souche sauvage et au mutant *bni1Δ*, la souche mutée pour le gène *HOF1* est incapable d'exporter (et donc de recycler), le colorant FM4-64.

L'inactivation de *HOF1* affecte spécifiquement le recyclage entre les endosomes et l'appareil de Golgi

L'ensemble du phénomène de recyclage membranaire implique trois étapes bien distinctes : (i) l'exocytose permet d'amener une protéine de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique, (ii) l'endocytose est le processus inverse : elle permet d'internaliser les protéines membranaires et de les déplacer au sein du cytoplasme par le biais des endosomes et enfin (iii) la phase de recyclage à proprement parlé où les protéines présentes dans les endosomes sont dirigées vers l'appareil de Golgi pour être une nouvelle fois amenées à la membrane.

Le défaut de recyclage observé dans les mutants *hof1Δ* peut être la conséquence d'un problème au niveau de l'une ou plusieurs de ces phases. Afin de connaître l'étape (ou les étapes) responsable(s) de ce défaut, nous avons utilisé une forme mutée du marqueur Snc1. La protéine Snc1-pem, est mutée au niveau de son domaine d'internalisation : une fois localisée à la membrane, elle est incapable d'être internalisée (Lewis *et al.*, 2000). Couplée à la GFP, Snc1-pem est exclusivement localisée au niveau de la membrane plasmique (voir figure 17, panel A) du mutant *hof1Δ*, tout comme dans la souche *sauvage*. Là encore, le Western blot confirme cette observation par la présence unique de la forme phosphorylée du marqueur (marquée par un astérisque sur le panel B de la figure 17). Ces résultats indiquent clairement que la phase d'exocytose n'est pas affectée par la délétion du gène *HOF1*.

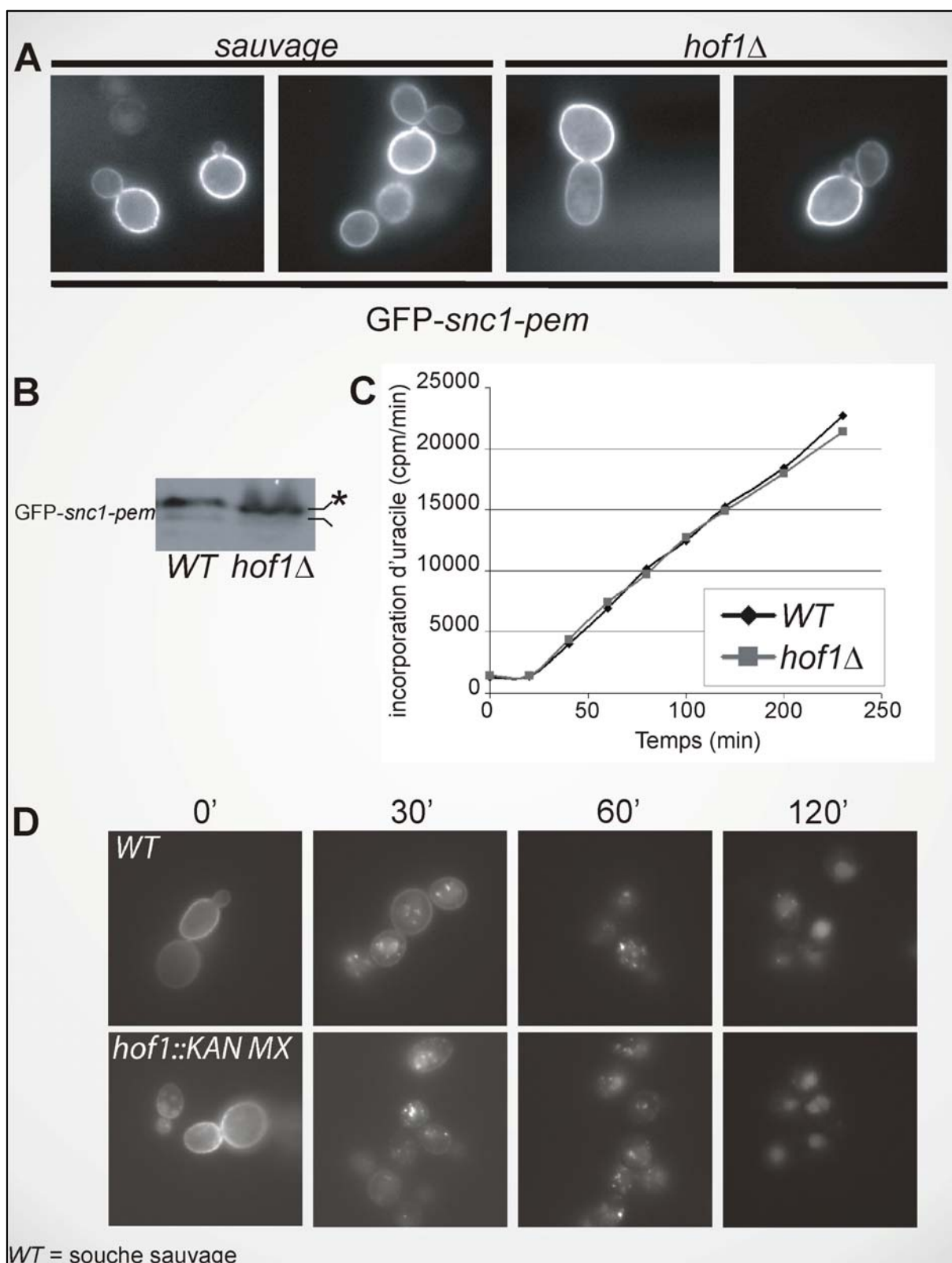


Figure 17 : La délétion de *HOF1* n'affecte ni l'exocytose, ni l'endocytose. Le marqueur GFP-Snc1-pem est muté pour son domaine d'internalisation. Dans la souche *hof1Δ*, il est correctement exporté à la membrane (**panel A**) où il est sous sa forme phosphorylée (* sur le **panel B**). De plus, la perméase Fur4 est exportée à la membrane où elle permet l'incorporation d'uracile avec une cinétique identique entre la souche sauvage et *hof1Δ* (**panel C**). Suite à un traitement à la cycloheximide, cette même perméase, couplée à la GFP est internalisée dans les mêmes délais que la souche soit mutée pour *HOF1* ou non (**panel D**).

Ces observations sont confirmées par un test d'incorporation de l'uracile. La protéine Fur4 est un transporteur d'uracile largement utilisé afin d'observer à la fois l'exocytose et l'endocytose chez la levure (Rotin *et al.*, 2000). Dans un premier temps, elle est exportée à la membrane où elle permet l'incorporation de l'uracile par la cellule. La protéine a donc été exprimée à l'aide d'un vecteur où l'expression du gène *FUR4* est sous la dépendance d'un promoteur inductible *GALI,10*. Il est alors possible, en mesurant la présence d'uracile dans les cellules, de déterminer la cinétique d'exportation du transporteur à partir de l'induction de son expression. Dans le mutant *hof1Δ*, l'incorporation se fait à une vitesse identique à celle de la souche *sauvage* (figure 17, panel C) indiquant que l'endocytose n'est pas affectée par la délétion du gène *HOF1*.

Tout en sachant que la mutation *hof1Δ* n'affecte pas l'adressage des protéines à la membrane, il fallait s'assurer que l'accumulation intracellulaire de GFP-Snc1 ne pouvait être due à une endocytose accélérée. Pour cela, c'est à nouveau la protéine Fur4 qui a permis de répondre à la question. En effet, en présence de cycloheximide, la synthèse protéique est rapidement bloquée d'une part, mais on constate aussi une rapide internalisation de Fur4 qui précède sa dégradation dans la vacuole (Galan *et al.*, 1996). A l'aide d'une protéine de fusion Fur4-GFP, nous avons pu étudier la cinétique de ce phénomène dans les souches *sauvage* et *hof1Δ* : elle est identique dans ces deux souches indiquant que l'endocytose n'est pas affectée dans une souche dont le gène *HOF1* est délété (figure 17, panel D).

Toutes ces données indiquent que la délétion du gène *HOF1* affecte spécifiquement le passage des protéines entre les endosomes et l'appareil de Golgi, sans altérer les phénomènes d'exocytose et d'endocytose.

Implication des différents domaines de Hof1 dans le recyclage membranaire

La séquence protéique de Hof1 présente différents domaines caractéristiques des protéines de la famille PCH. Ils sont listés ci-dessous, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale.

Domaine FCH (Fes/CIP4 homology) : il a été identifié pour la première fois sur la protéine Cdc15 de *S. pombe* qui, après la mitose, forme une structure en anneau qui se localise au niveau de l'anneau d'actine. Il semble que la protéine Cdc15 joue un rôle dans le réarrangement du cytosquelette pour permettre à la cytokinèse d'avoir lieu.

Domaine Coiled-coil : littéralement traduit par « rouleau enroulé », ce domaine est un motif structural au sein duquel deux à sept hélices α s'enroulent les unes autour des autres comme les brins d'une corde. Outre son rôle dans la structure tridimensionnelle d'une protéine, ce type de domaine peut être à la base d'une dimérisation.

Domaine F-BAR : il est caractérisé par la présence contigüe des domaines FCH et Coiled-coil. Récemment décrit, le domaine F-BAR possède une forme incurvée et il se lie aux membranes par sa face concave (Frost *et al.*, 2007; Shimada *et al.*, 2007). Il est ainsi impliqué dans la courbure des membranes et on le retrouve dans beaucoup de protéines impliquées dans le trafic membranaire.

Domaine PEST : il s'agit d'une séquence peptidique riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T). Leur présence caractérise souvent (mais pas toujours) des protéines dont la durée de demi-vie est courte. Il semblerait que ce soit, dans la plupart des cas, un signal de dégradation par le biais du protéasome (Rechsteiner & Rogers, 1996). Concernant Hof1, ceci a été vérifié car la délétion de ce domaine empêche la dégradation de la protéine et par conséquent, retarde la cytokinèse (Blondel *et al.*, 2005).

Afin de mieux caractériser la fonction de Hof1 dans le recyclage membranaire, nous avons observé la capacité de différentes formes mutantes de la protéine (représentées dans le panel A de la figure 18) à compléter l'absence du gène *HOF1* chez la levure. Les constructions utilisées expriment chacune une forme du gène privé d'un des domaines listés ci-dessus. Les différentes formes mutantes sont exprimées sous le contrôle d'un promoteur constitutif ADH dont le taux d'expression est proche du propre promoteur de *HOF1* (Blondel *et al.*, 2005). De plus, un tag HA³ est fusionné sur l'extrémité C-terminale de chaque protéine ; ce tag n'affecte pas la fonction de la protéine Hof1 sauvage (Blondel *et al.*, 2005). L'expression des formes mutées de Hof1 est vérifiée par Western blot à l'aide d'un anticorps spécifiquement dirigé contre l'étiquette HA³ (résultats non montrés). En parallèle, les souches sont co-transformées avec le vecteur permettant l'expression du marqueur GFP-Snc1.

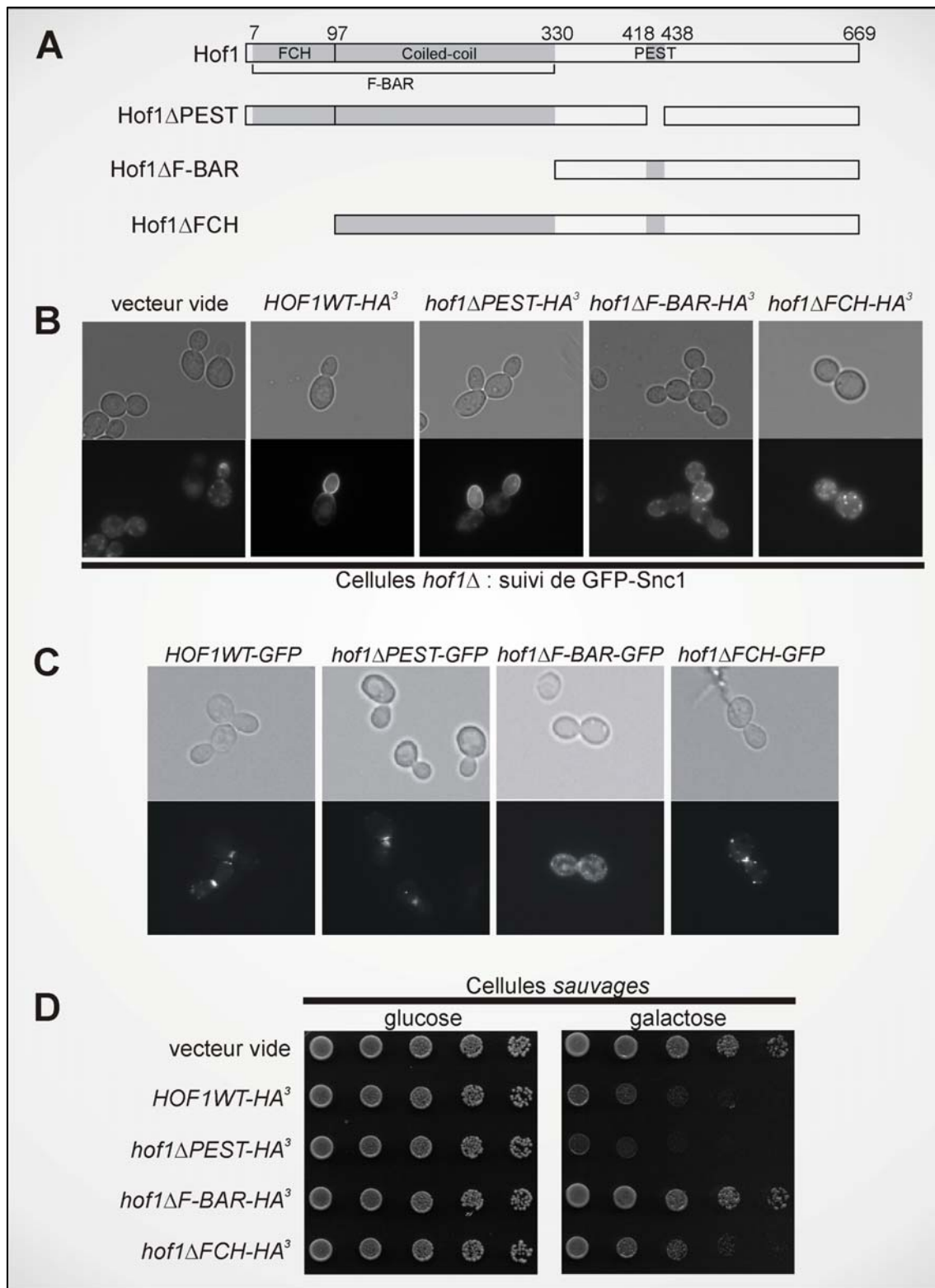


Figure 18 : Implication des différents domaines de Hof1 dans le recyclage membranaire.
A, Représentation schématique des formes mutantes de Hof1 utilisées. **B**, La capacité des différents mutants à compléter le défaut de recyclage d'une souche *hof1Δ* est suivie grâce au marqueur GFP-Snc1. Seules les formes sauvage et *hof1ΔPEST* restaurent le recyclage. **C**, le défaut de recyclage observé avec les formes *hof1ΔF-BAR* ou *hof1ΔFCH* n'est pas dû à un changement de localisation de la protéine : celle-ci est toujours localisée à l'anneau contractile au moment de la cytokinèse. **D**, La surexpression de ces deux formes de Hof1 n'entraîne pas de toxicité comme pour la forme sauvage ou ΔPEST.

La localisation de GFP-Snc1 montre que la protéine Hof1-HA³ est capable de restaurer un recyclage membranaire normal. Cette observation est importante car elle confirme que la présence du tag HA³ n'entrave pas la fonction biologique de Hof1. En parallèle, comme nous pouvions nous y attendre, la souche *hof1Δ* transformée avec le vecteur vide est incapable de recycler GFP-Snc1 (voir figure 18, panel B). D'autre part, on constate que la délétion du domaine F-BAR, ou même uniquement du domaine FCH, annule la fonction de Hof1 dans le recyclage membranaire. A l'inverse, l'absence du domaine PEST n'affecte pas la fonction de la protéine Hof1 dans le recyclage.

Avant de conclure sur l'implication de chacun des domaines dans le recyclage, nous avons vérifié que la localisation de ces formes de Hof1 n'était pas modifiée. Pour cela, les différentes formes mutantes de *HOF1* ont été mises en fusion par leur extrémité C-terminale avec la GFP (voir figure 18, panel C). Toutes ces formes de la protéine sont localisées, comme dans la souche *sauvage*, au niveau de l'anneau contractile d'actomyosine, indiquant que la perte de fonction de *hof1ΔF-BAR* et de *hof1ΔFCH* dans le recyclage n'est pas la conséquence d'un changement de localisation cellulaire.

Enfin, nous avons déterminé la toxicité de ces différentes formes de Hof1 lorsqu'elles sont surexprimées à partir du promoteur fort et inductible *GAL1,10*. Comme cela a déjà été décrit (Blondel *et al.*, 2005; Lippincott & Li, 1998; Vallen *et al.*, 2000), Hof1wt et *hof1ΔPEST* surexprimées sont toxiques pour la cellule (voir figure 18, panel D). Cette toxicité liée à la surexpression découle de la stabilisation de la protéine. A l'inverse, les protéines *hof1ΔF-BAR* et *hof1Δ-FCH* sont beaucoup moins toxiques. Ainsi, la toxicité observée lorsque Hof1 est surexprimée serait liée à sa fonction dans le recyclage membranaire.

En conclusion, la fonction de recyclage de Hof1 chez la levure dépend du domaine N-terminal F-BAR et, plus précisément, du domaine FCH. Ces deux domaines sont aussi nécessaires pour bloquer la cytokinèse lorsque Hof1 est surexprimée.

Conclusions et perspectives

Jusqu'à présent, les données dont nous disposons indiquaient une implication claire de la protéine de levure Hof1 dans le bon déroulement de la cytokinèse sans toutefois donner plus de précisions quant à sa fonction biologique exacte (Blondel *et al.*, 2005; Lippincott & Li, 1998; Vallen *et al.*, 2000). Les résultats présentés dans cette première partie apportent de nouvelles connaissances quant à son rôle biologique : d'une part, elle semble être impliquée dans le recyclage membranaire ; d'autre part, il apparaît que ce rôle serait important pour la réalisation de la fonction d'Hof1 dans la cytokinèse.

Relation recyclage membranaire / cytokinèse chez les levures et les eucaryotes supérieurs

L'importance du recyclage membranaire dans l'accomplissement de la cytokinèse ainsi que dans le modelage de l'actine a déjà été relatée concernant les cellules d'eucaryotes supérieurs (Strickland & Burgess, 2004). Les voies de signalisation régulant le recyclage membranaire existent aussi chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* mais, à notre connaissance, elles n'ont encore jamais été reliées à un quelconque évènement se rapportant au cycle cellulaire. Les résultats présentés ici constitueraient donc la première constatation de cette relation étroite entre le recyclage membranaire et la cytokinèse chez la levure, tout en plaçant la protéine Hof1 au centre de ces évènements.

Plusieurs implications d'Hof1 dans des processus biologiques avaient déjà été mises en avant dans d'autres publications.

Elle semble coordonner la sortie de mitose et l'accomplissement de la cytokinèse. En effet, pour que les cellules puissent se séparer, Hof1 doit être dégradée par le protéasome. Pour cela, elle doit être phosphorylée afin d'être reconnue par le SCF^{Grr1} (l'E3-ligase) qui permettra sa poly-ubiquitination. Cette phosphorylation est dépendante du MEN (Mitotic Exit Network) qui contient un certain nombre de kinases indispensables à la sortie de mitose chez les eucaryotes (Blondel *et al.*, 2005). Ainsi la présence de la protéine Hof1 est à la base d'une synchronisation des cycles chromosomique et cytoplasmique.

De plus, Hof1 semble être impliquée dans un couplage entre les deux voies redondantes de la cytokinèse que représentent la contraction de l'anneau d'actomyosine et la formation du septum entre les deux cellules (Vallen *et al.*, 2000).

Par ailleurs, Hof1 module la contraction de l'anneau d'actomyosine : bien que sa délétion ne pose pas de problèmes à la formation de cet anneau, elle entraîne, de manière rapide, son désassemblage lors de sa contraction, menant ainsi à un arrêt de la cytokinèse (Lippincott & Li, 1998). Ce blocage est aussi constaté lorsqu'on interfère avec la dégradation de Hof1 après la séparation de l'anneau de septine ou en la surexprimant (Blondel *et al.*, 2005).

Ici nous apportons la preuve que la perte de fonction de Hof1 dans le recyclage membranaire, par la suppression du domaine F-BAR ou même seulement FCH, entraîne aussi une perte de toxicité par sa surexpression. Cela permet de suggérer que, chez *S. cerevisiae*, l'implication d'Hof1 dans le recyclage membranaire est liée à son rôle dans la cytokinèse.

La protéine Hof1 joue un rôle dans le recyclage membranaire

Les expériences menées au laboratoire indiquent qu'il existe des interactions génétiques claires entre une délétion du gène *HOF1* et des mutations/délétions de gènes qui régulent le recyclage membranaire. De plus, parmi plusieurs mutants de la cytokinèse connus et testés au cours de ce travail, seule la souche *hof1Δ* présente un défaut de recyclage et nous montrons que l'extrémité N-terminale de la protéine est nécessaire à l'accomplissement de cette fonction. Bien que ces données ne précisent pas le mode d'action exact de la protéine, nous savons qu'elle agit précisément dans le temps (moment de la séparation physique des cellules) et dans l'espace (au niveau de l'anneau contractile). Cela constitue un premier indice quant à sa fonction biologique, jusqu'alors inconnue. L'identification de protéines potentiellement impliquées dans la cytokinèse, et devant être adressées par recyclage membranaire au site de séparation d'une manière Hof1-dépendante, représente la perspective la plus importante de ce travail.

Dans ce but, nous avons essayé d'identifier des protéines susceptibles d'interagir de manière physique, directement ou indirectement, avec Hof1. Pour cela, l'approche du TAP-tag (Tandem Affinity Purification) (Rigaut *et al.*, 1999) a été retenue. Elle consiste à exprimer

le gène *HOF1* en fusion avec un tag qui est constitué de plusieurs domaines : un domaine protéine A, un site de clivage reconnu par la protéase TEV (issue du virus du tabac) et un domaine de liaison à la calmoduline. Cela permet, à partir d'un lysat de levure, de purifier la protéine taguée ainsi que de copurifier les complexes protéiques dans lesquels elle est engagée. Bien que le TAP-tag ait largement fait ses preuves chez les levures (*S. cerevisiae* et *S. pombe*), il nécessite d'utiliser de grande quantité de protéines. Après de multiples tests, nous en avons conclu que Hof1 était trop faiblement exprimée pour réaliser ce genre d'expériences. Notre hypothèse a été appuyée par le fait que l'utilisation de cette technique à l'échelle du protéome n'avait pas permis d'identifier les partenaires de Hof1 (Gavin *et al.*, 2002).

L'identification de ces interactants reste donc une des priorités pour affiner les connaissances sur le mode d'action précis de Hof1.

Le recyclage de la chitine synthase : une fonction de Hof1 dans la cytokinèse ?

La protéine Chs2 est la sous-unité catalytique responsable de la formation du septum primaire de chitine, elle est déposée au niveau de la constriction entre la cellule mère et la cellule émergente. La délétion de *CHS2*, comme celle de *HOF1*, n'est pas létale pour la cellule mais elle cause un fort défaut de cytokinèse et la retarde : alors que l'anneau contractile se forme normalement, il ne se contracte pas de manière efficace chez ces deux mutants. Les phénotypes morphologiques de ces deux mutants sont aussi très proches. De plus, la délétion de *CHS2* présente une létalité synthétique avec le gène *BNII* ; ce n'est pas le cas entre *CHS2* et *HOF1* (résultats non montrés), indiquant alors que les produits de ces deux gènes agissent dans la même voie, à savoir celle de l'ajout de membrane (voir figure 11). C'est pour ces raisons que nous émettons l'hypothèse que Hof1 et Chs2 pourraient agir dans la même voie et que Chs2 pourrait être une des protéines dont le recyclage à la membrane plasmique est Hof1-dépendant et permettrait la formation du septum primaire et donc le bon accomplissement de la cytokinèse, et ceci de manière Hof1-dépendante. Des données préliminaires indiquent que la localisation de Chs2 est altérée dans un mutant *hof1Δ* : cette localisation se fait bien au niveau de l'anneau contractile mais dans une proportion significativement inférieure à celle observée dans des cellules sauvages ou *bni1Δ* (voir figure

19). Il se pourrait, que dans ces mutants, seules les protéines Chs2 néo-synthétisées soient exportées à la membrane et ne soient pas recyclées par la suite.

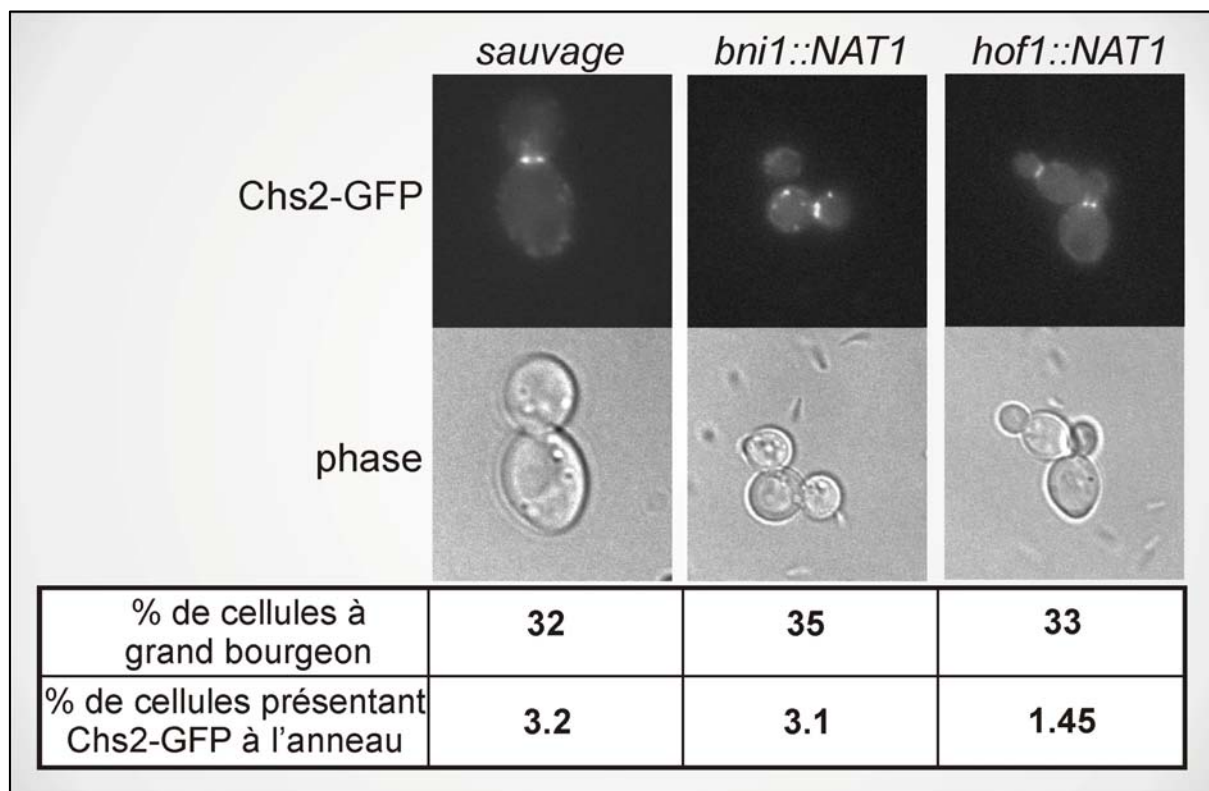


Figure 19 : Chs2 peut être une cible recyclée de manière Hof1-dépendante. Alors que Chs2 est normalement localisée à l'anneau contractile dans un mutant *hof1Δ*, la proportion de cellule exprimant Chs2-GFP est significativement inférieure à celle observée dans la souche sauvage ou *bni1Δ*.

Il faut tout de même admettre que ce défaut de localisation est relativement subtil. Actuellement, nous tentons de réaliser le même type d'expérience avec la protéine Chs3. En effet, celle-ci suit une voie de recyclage identique à Chs2 mais la délétion de *CHS3* n'entraîne pas de défaut de cytokinèse. Ceci permettrait alors de voir si le recyclage de Chs2 est bien Hof1-dépendant.

Ces résultats préliminaires suggèrent toutefois qu'Hof1 permettrait, de par la fonction qu'elle exerce dans le recyclage, de concentrer rapidement et efficacement Chs2 au niveau de l'anneau contractile, au moment où il se contracte, afin de permettre la synthèse du septum primaire. Cette hypothèse mérite d'être confirmée : elle est donc la base d'une autre perspective majeure à ce travail.

Hof1 : un lien entre cytokinèse et recyclage membranaire ?

Comme il a déjà été souligné, l'incapacité de certaines formes mutantes d'Hof1 à compléter le défaut de recyclage membranaire, mise en parallèle avec le fait que la surexpression de ces mêmes formes ne bloque pas la cytokinèse, suggère qu'il existe un chevauchement, au moins partiel, entre ces deux fonctions de Hof1. Nous pouvons alors imaginer que le rôle principal de cette protéine serait d'activer le recyclage membranaire à l'anneau contractile pendant la mitose. Une fois la séparation du noyau achevée, l'activation du MEN mène à la dégradation de Hof1 par le protéasome 26S suite à sa reconnaissance par le SCF^{Grr1} et à son ubiquitination. Ceci achèverait alors le recyclage polarisé dans cette zone de la cellule, permettant alors la contraction de l'anneau d'actomyosine et la séparation physique de la cellule fille. Dans un tel scénario, Hof1 serait vraiment un lien entre les mécanismes de recyclage et de cytokinèse.

Si cette hypothèse est validée, il se pourrait alors que la fonction de Hof1 dans le recyclage membranaire soit un mécanisme conservé au cours de l'évolution : en effet, la protéine PCH Cdc15 de *S. pombe* est l'homologue de Hof1. Lorsqu'elle est surexprimée ou inactive, un défaut de cytokinèse est aussi observé chez cette espèce de levure.

Approche de la cytokinèse à l'aide d'une molécule naturelle

Au cours de l'année 2007, une étude publiée dans *Journal of Natural Products* faisait référence à l'identification d'une nouvelle molécule issue d'un dérivé marin de l'organisme *Aspergillus fumigatus* (Boot *et al.*, 2007).

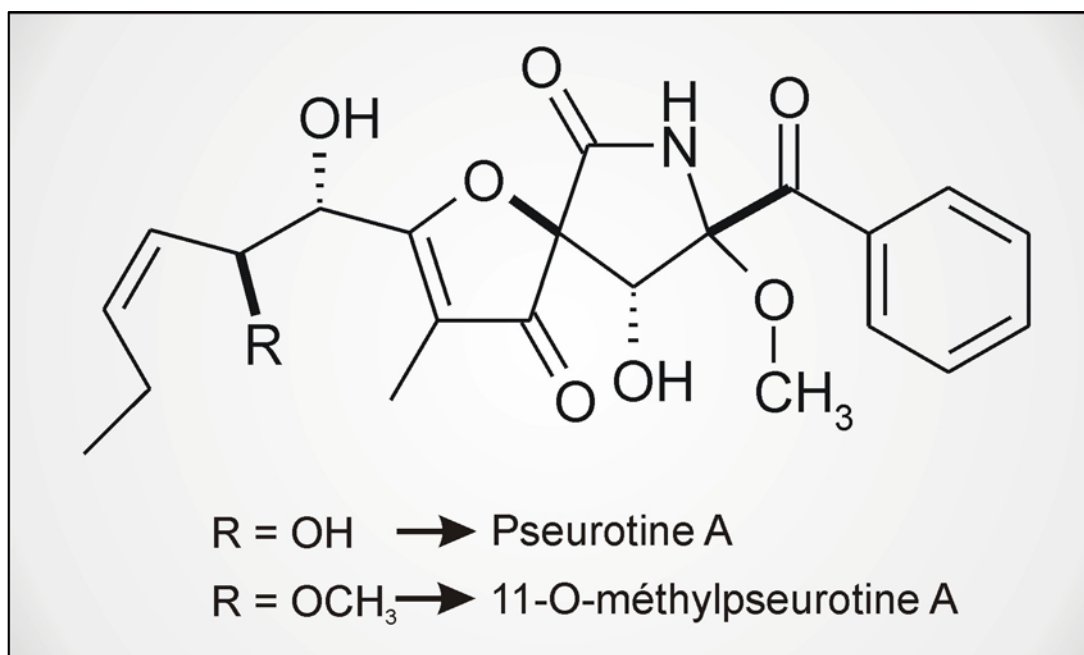


Figure 20 : Structures chimiques de la 11-O-méthylpseurotine A et de la pseurotine A. La 11-O-méthylpseurotine A, issue d'une forme marine d'*Aspergillus fumigatus*, inhibe le phénotype causé par la délétion de *HOF1*. La pseurotine A est un composé inactif sur les souches *hof1Δ*.

Des extraits totaux de cet organisme ont été utilisés pour réaliser un crible phénotypique sur un panel de souches de levures mutantes. La plus forte activité visible, en comparaison à une souche sauvage, a été observée sur un mutant *hof1Δ* pour lequel le défaut de cytokinèse n'était plus visible. Il s'est avéré que la molécule responsable de cette inhibition est la 11-O-méthylpseurotine A (voir figure 20). En parallèle, la pseurotine A, déjà connue, a été isolée et a montré qu'elle était inactive sur les cellules *hof1Δ*.

L'utilisation de telles molécules doit donc pouvoir devenir un outil efficace pour l'étude de la régulation de la cytokinèse en général, et plus particulièrement pour approfondir les connaissances sur le rôle biologique de Hof1. De plus, un outil comme celui-ci devrait permettre de faciliter la découverte des autres cibles du SCF^{Grr1}. Cette perspective est développée dans le paragraphe suivant.

Autre(s) implication(s) du SCF^{Grr1} au moment de la cytokinèse

Différents résultats génétiques obtenus au laboratoire indiquent clairement que le SCF^{Grr1}, en plus de la protéine Hof1, a d'autres substrats au cours de la cytokinèse. En effet, comme nous l'avons souligné, cette E3 ligase est « recrutée » à l'anneau contractile au

moment de la cytokinèse pour permettre la dégradation de Hof1. Or dans une souche dont le gène *HOF1* est délété, Grr1 est toujours présente à l'anneau contractile au moment de la cytokinèse. De plus, la double mutation de *GRR1* et *HOF1* entraîne un défaut de cytokinèse bien pire que la double mutation *grr1Δ-bni1Δ* indiquant que l'E3 ligase a au moins un autre substrat impliquée dans la voie de l'anneau d'actomyosine (résultats non montrés). Il serait donc pertinent de se pencher sur des cibles potentielles caractérisées par leur implication dans la cytokinèse, leur localisation au niveau de la constriction, l'existence (facultative) d'une séquence PEST et enfin, par la toxicité de leur surexpression (mimant une absence de dégradation protéasome-dépendante).

Seconde partie

Un médecin, c'est quelqu'un qui verse des drogues qu'il connaît peu dans un corps qu'il connaît moins.

Voltaire, Epigrammes.

Introduction

Les CDKs : des cibles de molécules thérapeutiques

L'ajout d'un groupement phosphate sur des protéines cibles constitue un des mécanismes de régulation moléculaire de l'activité d'une protéine essentiels à la vie d'une cellule, et par extension, d'un organisme. Ces réactions sont catalysées par des protéine kinases (voir figure 21) dont le nombre est, à l'heure actuelle, estimée à 518 chez l'Homme (Manning *et al.*, 2002) et 113 chez *S. cerevisiae* (Hunter & Plowman, 1997). La grosse majorité d'entre elles sont des sérine/thréonine kinases et des tyrosine kinases. L'importance des mécanismes de phosphorylation est connue et reconnue : elle a d'ailleurs été à l'origine de l'attribution de trois prix Nobel de Médecine. Dès 1992, Edwin Krebs et Edmond Fischer obtenaient cette distinction pour la découverte des protéine kinases. En 2000, Paul Greengard recevait ce prix pour ses travaux démontrant l'importance des phosphorylations dans les mécanismes d'action des neurotransmetteurs. Enfin, en 2001, Paul Nurse, Tim Hunt et Leland Hartwell ont été décorés pour leurs travaux sur le contrôle du cycle cellulaire et le rôle majeur des complexes CDK/cycline dans sa régulation.

Fort logiquement, ce type de protéines est impliqué, lorsque leur fonctionnement est perturbé, dans de nombreuses pathologies. Depuis le début des années 80, cette classe de protéines intéresse la recherche biomédicale en tant que cibles thérapeutiques. A ce jour, après les récepteurs couplés aux protéines G, les protéine kinases représentent la seconde classe de cibles thérapeutiques pour l'industrie pharmaceutique (Cohen, 2002) avec des implications potentielles dans le domaine des cancers, de l'inflammation, du diabète ainsi que des maladies neuro-dégénératives (Bach *et al.*, 2005).

Comme cela a déjà été relaté, une dérégulation du cycle cellulaire est une caractéristique commune à tous les cancers. Elle résulte très souvent d'un changement d'expression et/ou d'activité des cyclines, des CDKs et de toutes autres protéines contrôlant les CDKs, et donc la division des cellules. Pour cette raison, les CDKs sont aujourd'hui une classe de cibles thérapeutiques largement étudiée pour la recherche de molécules anticancéreuses (Basso & Doll, 2006; Tsihlias *et al.*, 1999). De plus, de part son rôle dans les fonctions neuronales, CDK5 constitue une cible de choix pour différentes maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer.

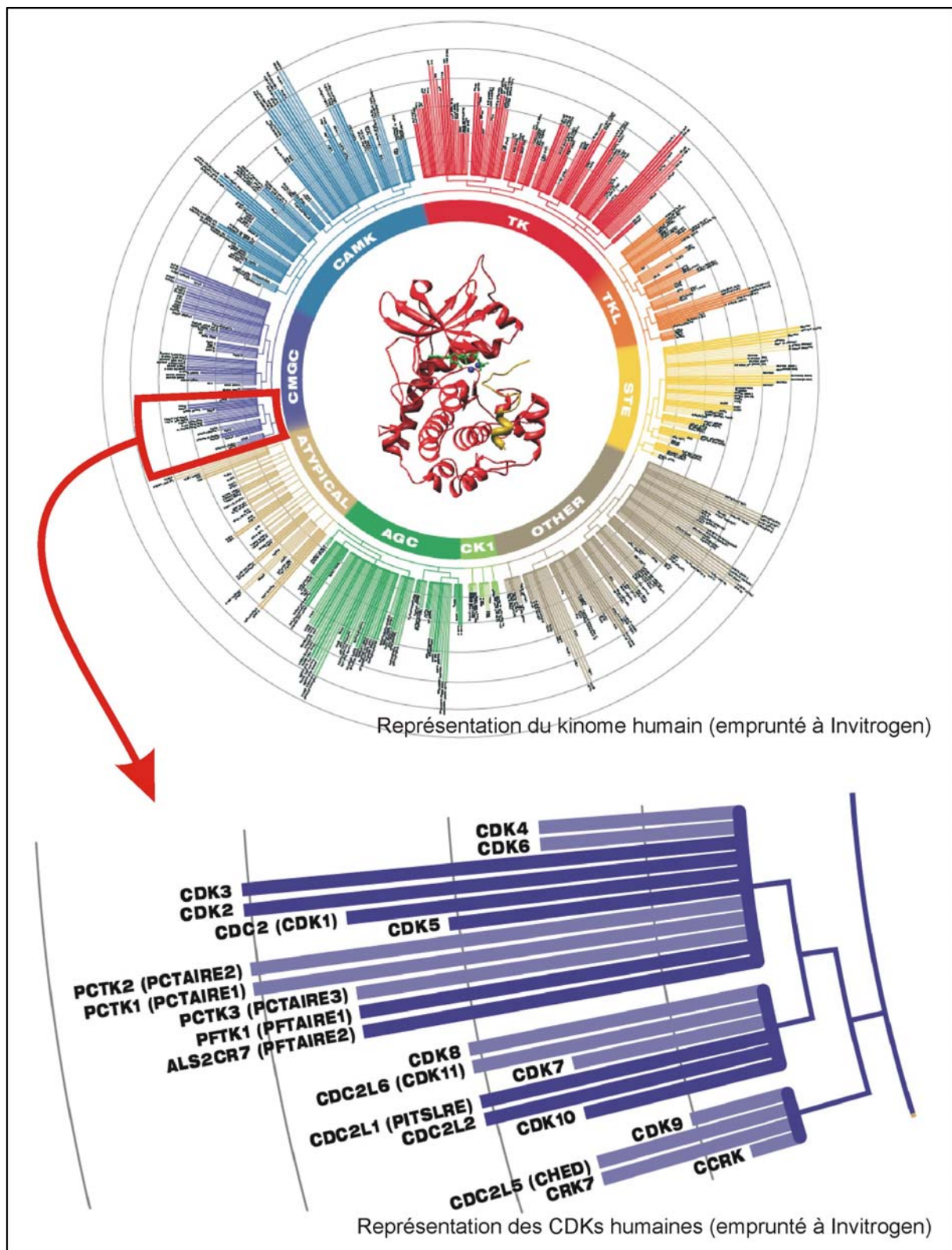


Figure 21 : Représentation du kinome humain et des CDKs humaines. On estime à 518 le nombre de protéine kinases chez l'Homme. Elles représentent une classe majeure de cibles thérapeutiques. Parmi elles, les CDKs, acteurs centraux de la régulation du cycle cellulaire, font l'objet d'une attention particulière pour la recherche de molécules actives contre les différentes formes de cancers mais aussi contre certaines maladies neurodégénératives. (NB : CRK = CDK12 et CDC2L5 = CDK13 : (Chen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007))

Les intérêts de connaître la sélectivité d'une molécule

La recherche de molécules présentant un intérêt thérapeutique commence la plupart du temps par une étape de criblages. Ceux-ci sont variés : ils peuvent être phénotypiques (contexte cellulaire) ou encore enzymatiques (*in vitro*). Dans le cadre d'un criblage enzymatique, le but est de sélectionner une cible d'intérêt, dont l'implication dans une pathologie étudiée est connue. Ce mode de criblage existe à différentes échelles en fonction du nombre de composés évalués par expérience, du criblage à faible débit à très haut débit. Ce dernier peut se faire sur des plaques contenant 1536 puits. Le but est d'isoler un *Hit*, c'est-à-dire une molécule dont découle l'effet recherché (effet inhibiteur dans la plupart des cas) sur la (les) cible(s) d'intérêt. Malheureusement, l'obtention d'un Hit n'est pas synonyme de la découverte d'un nouveau médicament : ces tests étant réalisés *in vitro*, de longues et coûteuses étapes supplémentaires sont nécessaires avant d'envisager une mise sur le marché de cette molécule en tant que médicament. Ces études sont appelées « essais cliniques » et correspondent à « *tout projet de recherche qui affecte de façon prospective des sujets animaux ou humains à des groupes d'intervention et de comparaison afin d'étudier la relation de cause à effet entre un acte médical et l'évolution d'un état de santé* ». Ces essais visent à évaluer l'efficacité mais aussi l'innocuité d'un traitement ; ils comprennent différentes étapes résumées ici :

Etude pré-clinique : cette phase d'expérimentation a pour but d'étudier le mode d'action d'une molécule à l'aide de tests *in vitro* et *in vivo*. Elle comporte des essais sur des animaux afin de montrer que le composé présente un intérêt thérapeutique visible avec un niveau d'effets secondaires acceptable.

Etude de phase I : elle suit la phase d'expérimentation animale et est préliminaire à l'étude d'efficacité d'un médicament. Réalisée sur des volontaires sains (ou parfois sous forme de traitements dits compassionnels), elle a pour but d'évaluer la cinétique et le métabolisme de la substance testée mais aussi la tolérance du receveur à cette molécule.

Etude de phase II : elle consiste à évaluer la dose optimale à administrer au patient de manière à avoir un meilleur rapport efficacité/innocuité.

Etude de phase III : c'est l'étude d'efficacité à proprement parlé, elle compare le nouveau traitement à un placebo ainsi qu'à des molécules de référence si elles existent.

Etude de phase IV : c'est le suivi à long terme d'un médicament afin de vérifier l'absence d'effets secondaires rares ou encore de complications tardives.

L'analyse des résultats obtenus tout au long de ces tests cliniques bénéficie des données de sélectivité d'une molécule, c'est-à-dire la connaissance la plus exhaustive possible des cibles moléculaires touchées dans la cellule.

Dans le domaine de la recherche d'inhibiteurs de kinases, les molécules actives isolées sont, dans la grande majorité des cas, des petits composés dont la structure est proche de celle de l'ATP (on parle de molécules mimétiques de l'ATP). Ils agissent ainsi de manière compétitive en se fixant dans la poche à ATP de la kinase (Cohen, 2002; Daub, 2005; Daub *et al.*, 2004a; Daub *et al.*, 2004b) : ils bloquent ainsi l'activité kinase de l'enzyme et empêchent donc la phosphorylation du substrat. Par conséquent, les voies de signalisation dans lesquelles est impliqué ce substrat sont bloquées.

Depuis le début des années 90, une centaine d'inhibiteurs de kinases sont entrés en phase de test clinique (Reichert & Wenger, 2008). Pour la première fois, en 1995, un composé de ce type a obtenu une autorisation de mise sur le marché au Japon : il s'agit du Fasudil qui est utilisé pour traiter les vasospasmes cérébraux (Cohen, 2002). Depuis le début des années 2000, divers inhibiteurs de kinases ont obtenu cette même autorisation. Parmi eux, on peut citer l'Imatinib (Glivec – Novartis), le Gefitinib (Iressa – AstraZeneca), l'Erlotinib (Tarceva – Roche), le Sorafenib (Nexavar – BayerPharma) ou encore le Dasatinib (Sprycel – Bristol MyersSquibb). Ces médicaments, optimisés pour inhiber une seule cible (Bantscheff *et al.*, 2007), ont franchi toutes les étapes des tests cliniques vers la mise sur le marché sans que l'on connaisse toujours réellement de manière exhaustive les protéines qu'ils ciblent (Bach *et al.*, 2005; Daub *et al.*, 2004a; Goldstein *et al.*, 2008). En effet, la sélectivité de ces molécules a été initialement testée contre un panel de kinases purifiées recouvrant de façon non-exhaustive le kinome humain. En 2005, environ 40% des kinases humaines étaient purifiées et disponibles pour mettre en place ces études de sélectivité (Daub, 2005). A ce jour, il est possible d'utiliser un panel contenant un peu plus de 300 protéine kinases (Invitrogen). Mais dans la majorité des cas, les panels utilisés n'atteignant que rarement 200 protéines (151 kinases testées dans le cas de l'étude de la molécule de roscovitine (Bach *et al.*, 2005)), d'autres cibles potentielles des molécules ne sont pas considérées dans ces études. Ces protéines *oubliées* représentent une majorité du kinome (Daub *et al.*, 2004a). De plus, toutes les protéines pouvant interagir avec l'ATP ou de manière plus générale, avec des purines (environ 2000 chez l'Homme) sans être des kinases ne sont pas considérées dans ce genre d'étude (Bantscheff *et al.*, 2007). En

conséquence, les données de sélectivité obtenues sont souvent difficiles à corrélérer avec les effets observés sur des cellules (Daub *et al.*, 2004a) et, en tous cas, clairement incomplètes.

De manière générale, cette constatation est illustrée par la publication en 2006 de John Overington (Overington *et al.*, 2006). Il estime à 1357 le nombre de molécules sur le marché des médicaments dont 1204 sont des petites molécules chimiques de masse moléculaire proche de 350 g.mol⁻¹. Il est extrêmement surprenant de voir que le nombre de cibles de ces molécules est d'une part, relativement faible, mais surtout qu'il est très discutable, et discuté. Depuis 1996, diverses hypothèses ont été émises : initialement estimé à 483, ce chiffre a été plusieurs fois revu et estimé à 120, 273, 218, 268 et enfin 324 dans la référence citée ici. En outre, une approche *in silico* en 2003 avait déterminé le nombre de cibles de l'ensemble des molécules sur la marché à 14000 avant d'être abaissé à 6000 par les mêmes auteurs. La variabilité de ces chiffres donne une bonne idée de la faible connaissance de la sélectivité de médicaments, même lorsqu'ils sont sur le marché depuis plusieurs années.

Ces dernières années, l'importance de ces études de sélectivité a été reconnue et devient une priorité pour les différents acteurs de la recherche (Kung & Shokat, 2005; Terstappen *et al.*, 2007), ceci pour différentes raisons décrites ci-dessous.

Tout d'abord, ces études de sélectivité permettent d'avoir une connaissance des cibles inconnues et non attendues (appelées *off targets* en anglais). De ce fait, il est possible d'appréhender les effets secondaires possibles d'une molécule en connaissant les autres voies de signalisation affectées par le composé. Ces acquis permettent aussi de comprendre le mode d'action d'une molécule et les effets qui en découlent sur la physiologie de la cellule. La biologie, associée à la chimie, peut alors tenter de modifier la molécule de manière à augmenter son efficacité tout en essayant de maintenir une innocuité maximum dans le but d'optimiser les chances de la molécule de franchir toutes les étapes des tests cliniques. Ces aspects sont importants pour des laboratoires de recherche académique ou encore de petites start-up impliquées dans les premières phases de développement de molécules à visée thérapeutique.

Les grosses entreprises pharmaceutiques souhaitent également connaître d'une manière plus précise les cibles des molécules qu'elles développent. Cela leur permet d'envisager un repositionnement pour un composé qui n'atteint pas la mise sur le marché dans

le champ d'application pour lequel il était prévu. De plus, elles essayent par ce moyen de disposer de nouveaux brevets pour des médicaments génériques ou sur le point de le devenir.

Un des éléments illustrant l'engouement pour le repositionnement thérapeutique est la constitution de chimiothèques commerciales ou académiques de composés ayant déjà été commercialisés pour une application donnée. Ainsi, la *Prestwick Chemical Library*® distribué par Prestwick Chemical Inc., est constituée de 1120 drogues dont 90% ont déjà passé les phases d'études cliniques ; c'est aussi sur ce principe qu'a été développée la collection « FDA-approved » de Tebu-Bio. D'autre part, le projet « *Johns Hopkins Clinical Compound Screening Initiative* » propose aussi des molécules déjà approuvées pour une mise sur le marché : à terme, cette collection a pour ambition de proposer 11000 composés sélectionnés pour leur grande diversité chimique et pharmacologique. L'utilisation de ces chimiothèques permet d'envisager une « nouvelle vie » pour un médicament : sachant qu'il est sans danger pour l'Homme, si sa sélectivité est aussi connue, il pourra être rapidement dirigé vers un nouveau champ d'application bien précis. Le but de cette démarche est donc de limiter au maximum le temps qui sépare la découverte d'une molécule active du terme de son développement sous forme d'un médicament.

A titre d'exemple de repositionnement thérapeutique, nous pouvons citer le Guanabenz (Tribouillard-Tanvier *et al.*, 2008). Cette molécule, présente dans la collection Prestwick, est utilisée en routine dans le traitement de l'hypertension et ceci sans effets secondaires majeurs. Au cours d'un criblage, ce composé s'est avéré actif contre le prion de levure. Des tests supplémentaires sur des cellules de mammifères en culture, ainsi que chez la souris, ont montré son efficacité contre la forme mammifère du prion. Ce genre de découverte permet d'envisager une nouvelle utilisation de la drogue en tant que médicament dans des délais relativement courts puisqu'elle peut entrer directement en phase II d'étude clinique.

Les niveaux de sélectivité recherchés

Le fait, pour un inhibiteur, d'avoir plusieurs cibles au sein de la cellule peut avoir plusieurs conséquences :

- la titration de la drogue par des cibles autres que la cible contre laquelle il a été sélectionnée. La quantité d'inhibiteur « disponible » pour inhiber cette dernière sera ainsi moindre.

- l'inhibition de ces cibles autres peut être à l'origine d'effets secondaires plus ou moins importants à l'origine d'un changement du ratio bénéfices/effets secondaires.

De ce point de vue, on pourrait penser que la situation idéale serait alors d'avoir un inhibiteur présentant une forte sélectivité, voire une sélectivité « absolue ».

D'un autre point de vue, il faut considérer que dans la cellule, certaines protéines jouent un rôle redondant. Du moins, lorsque certaines d'entre elles sont inactives, d'autres sont capables de les remplacer. A titre d'exemple, bien que plusieurs CDKs soient nécessaires à la progression du cycle, CDK1 semble capable à elle seule d'assurer les différents passages d'une étape du cycle à l'autre (Santamaria *et al.*, 2007). Considérant ce genre d'observations, on s'aperçoit qu'un composé ayant une trop forte sélectivité peut ne pas induire d'effet(s) cellulaire(s) et donc ne pas être un traitement thérapeutique idéal, à moins d'être associé à une ou plusieurs autres drogues. De plus, des inhibiteurs qui présenteraient une sélectivité absolue conduiraient certainement beaucoup plus facilement à l'apparition de résistances à leur effet (comme cela arrive souvent dans les traitements de maladies infectieuses et de cancers).

Ces arguments sont présentés ici afin d'insister sur le fait que le niveau de sélectivité idéal n'existe pas, ou du moins, qu'il devrait être défini pour chaque cible (et chaque pathologie) considérée. Ceci souligne une fois de plus l'importance de connaître la sélectivité d'un composé d'intérêt afin de pouvoir optimiser son développement et obtenir la molécule ayant le meilleur rapport bénéfices/risques.

Bioinformatique, biochimie, génétique : différentes méthodes d'évaluation de la sélectivité

Plusieurs méthodes ont été adaptées ou mises en place afin d'étudier la sélectivité d'un composé, particulièrement pour des composés de bas poids moléculaire. En dehors de l'approche *in vitro* dans laquelle l'effet inhibiteur d'une molécule sur un panel de kinase est étudié, ces techniques permettent de découvrir uniquement des interactions entre la drogue et ses cibles potentielles. On sait alors que la molécule se fixe sans avoir d'indices sur l'action qu'elle a sur la molécule : l'effet peut être inhibiteur, mais aussi activateur ou même neutre. La découverte de cible doit donc toujours être validée par des tests complémentaires.

Un bref aperçu des techniques utilisables est présenté au cours des paragraphes suivants.

Approche in silico

Ce type d'approche est très complexe, et le plus souvent dédié au criblage de petites molécules : beaucoup de composés sont exposés à un nombre de cibles potentielles faible voire égal à un. Stefan Zahler *et al.* ont inversé le principe de cette approche pour tester une drogue contre un très large panel de cibles potentielles. Ici la seule limite est la taille des bases de données utilisées. Ainsi, dans cet exemple, de nouvelles cibles ont été découvertes pour trois dérivés de l'indirubine. Cette molécule provient d'une recette de la médecine traditionnelle chinoise qui permet de traiter la leucémie myéloïde chronique (Zahler *et al.*, 2007). Il a été démontré que parmi les ingrédients de cette recette, l'indirubine avait un effet inhibiteur de kinases

Ce genre d'approche, utilisée pour la première fois avec des inhibiteurs de kinases, permet de faciliter et d'accélérer le processus de développement d'une drogue mais ne peut se suffire à lui-même : il doit toujours être accompagné d'une validation à la paillasse à l'aide de tests cellulaires ou encore dans ce cas précis de tests kinases réalisés *in vitro*.

Approche in vitro : utilisation d'un panel de cibles choisies

Cette manière de procéder est le plus souvent utilisée au début de l'étude d'une molécule à visée thérapeutique. Le principe est d'observer les capacités d'inhibition d'une molécule sur un nombre donné de kinases. Au laboratoire, nous disposons d'un panel d'environ 30 kinases (dont cinq sont utilisées en routine dans les campagnes de criblage) qui permet d'obtenir un premier profil de sélectivité. La taille des différents panels disponibles sur le marché (décrits précédemment) représentent un inconvénient de la méthode. Lorsqu'une molécule se démarque des autres à la suite d'un criblage, son efficacité peut être testée sur plusieurs cibles. Si elles sont peu nombreuses, les données obtenues n'apportent pas réellement une connaissance exhaustive de la sélectivité et dès lors que ce nombre augmente, cela devient couteux en temps et en argent. Afin de pallier à ces difficultés, des entreprises se

sont spécialisées dans la mise en place de ce type de procédure. Encore une fois, il faut souligner que cette pratique est très loin d'être exhaustive mais c'est néanmoins un préalable à la mise place de techniques plus lourdes. En effet, l'intérêt croissant pour ce domaine amène la communauté scientifique à imaginer de nouvelles approches combinant criblage et sélectivité. Avec l'évolution des moyens techniques et le nombre croissant de kinases disponibles pour des tests *in vitro*, il est actuellement envisagé de cribler des collections de drogues sur de larges panels de kinases permettant ainsi d'identifier plus rapidement des molécules actives qui présenteraient une sélectivité adaptée aux champs d'application étudié (Goldstein *et al.*, 2008).

En parallèle de cette technique, nous pouvons citer le travail de la société américaine Ambit Biosciences. Elle propose de tester l'interaction entre une molécule et 402 kinases humaines dont elle dispose. Cette technique, rapide et efficace, est basée sur le principe de compétition avec un composé contrôle capable de se fixer au niveau du site actif de la kinase. Dans cette méthode, seule l'interaction est mise en avant. De plus, il faut garder à l'esprit que les protéines sont recombinantes et qu'elles ne sont donc pas dans des conditions physiologiques. Leur activité face à ces composés n'est pas testée et il faut donc déterminer par la suite l'effet de la drogue sur la cible : activateur, inhibiteur ou encore nul.

Les puces à protéines

Le but de cette méthode, réalisable à grande échelle, est d'identifier les interactions qui se créent entre un composé de bas poids moléculaire et ses cibles. L'élaboration de la puce nécessite de produire et de purifier les protéines avant de pouvoir les fixer sur un support qui est le plus souvent une lame de verre. Une fois les différentes protéines disposées sur le support, elles sont mises en présence de la molécule dont on cherche à définir la sélectivité. Cette drogue, préalablement marquée de manière fluorescente ou radioactive, se fixe à ses cibles potentielles ; après des lavages stringents, la détection de la molécule marquée en telle ou telle position indique une interaction avec les protéines fixées à cet endroit (voir figure 22).

Dans ce type de technique, les protéines spottées sur le support sont incapables de former des complexes protéiques et de plus, elles sont dépourvues de toutes modifications

post-traductionnelles : les conditions exactes de la cellule ne sont donc pas recréées et cela risque d'entraîner des changements d'affinité pour la drogue mise en présence. De plus, le nombre de protéines et la proximité qui existe entre elles sur le support peuvent générer un encombrement stérique qui viendrait à empêcher la fixation de la molécule sur les cibles exposées.

L'avantage majeur de cette technique est la quantité relative de chacune des protéines testées : elle est toujours identique. Ainsi, l'expérimentateur s'affranchit des problèmes de titration qui peuvent être rencontrés sur un lysat cellulaire. Cette méthode peut donc s'avérer complémentaire de la chromatographie d'affinité sur billes d'inhibiteurs immobilisés (décrite plus loin) où une protéine fortement exprimée pourrait se fixer préférentiellement à la matrice, au détriment de cibles dont l'expression serait faible (Terstappen *et al.*, 2007).

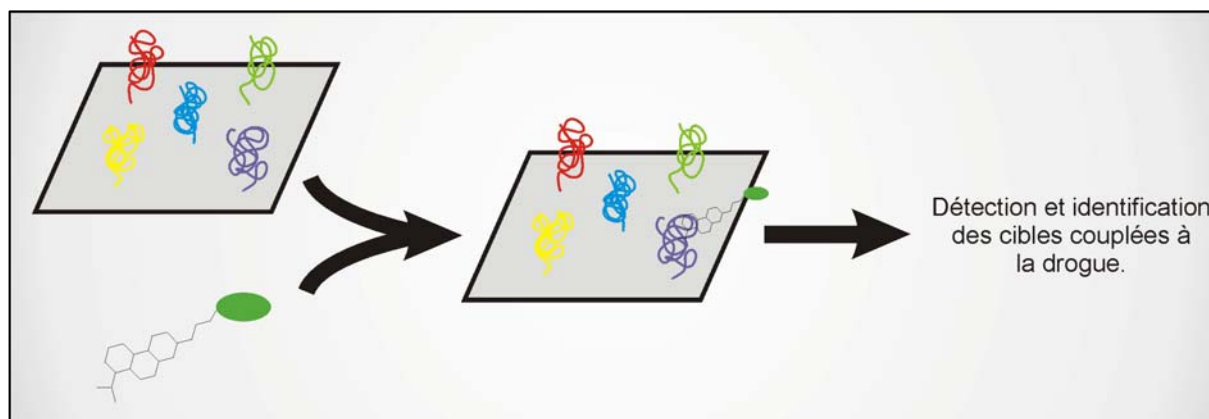


Figure 22 : Représentation schématique de l'étude de la sélectivité d'un composé à l'aide de puces à protéines. Les cibles potentielles sont fixées sur un support puis mises en présence du composé testé. Ce dernier est marqué de manière fluorescente ou radioactive afin de localiser les interactions formées et d'identifier la cible.

Les puces à « Reverse transfected cells »

L'objectif de cette technique est assez proche de celui décrit avec les puces à protéines. Ici, des plasmides contenant des ADNc sont hybridés sur un support de verre recouvert d'une solution gélatineuse. Les plasmides y sont placés de manière robotisée à des emplacements précis avant que l'ensemble ne soit immergé dans un milieu de transfection. Des cellules adhérentes sont alors mise en culture et se divisent deux à trois fois : des clusters de cellules transfectées peuvent alors exprimer les différentes protéines cibles qui pourront

interagir avec la drogue radio-marquée dont la sélectivité est étudiée (voir figure 23). Contrairement à la précédente technique, des problèmes d'expression différentielle peuvent ici être rencontrés ; de plus, l'efficacité de transfection est un facteur variable qui peut compromettre la détection de l'interaction drogue/protéine. L'avantage de cette technique réside dans sa forme compacte et dans sa stabilité à long terme : les ADNc ne sont exprimés en protéines que lorsqu'on en a besoin. Bien qu'une preuve de concept ait été obtenue pour cette technique (Ziauddin & Sabatini, 2001), elle est peu utilisée et ne semble pas avoir les faveurs des biologistes pour l'étude de la sélectivité d'une molécule.

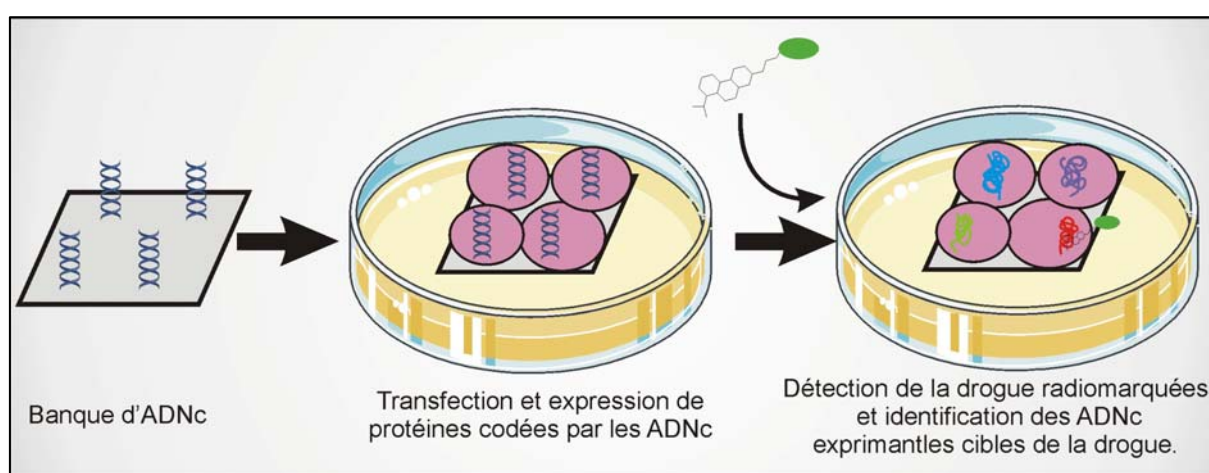


Figure 23 : Représentation schématique de l'étude de la sélectivité d'un composé à l'aide de puces à « Reverse transfected cells ». Des ADNc codant pour des cibles potentielles sont fixés sur un support. Ce dernier est mis en présence de cellules qui sont transfectées puis mises en culture afin d'exprimer les cibles potentielles. Le composé d'intérêt interagissant avec une protéine exprimée est détecté grâce à la présence d'un radioélément auquel il est couplé.

La méthode du phage display

A l'origine, ce genre de technique a été développé pour sélectionner et générer des anticorps qui pouvaient se lier à un antigène spécifique. Cela a aussi permis de mettre en évidence des interactions protéine/protéine avant d'être utilisé pour l'identification des liaisons drogue/cibles.

Le phage display consiste, dans le cadre de l'étude de la sélectivité, à cloner des ADNc dans le génome de phages. En fusion avec une protéine de surface du phage, le produit de

l'ADNc sera exprimé à la surface de celui-ci. La banque de phage ainsi constituée est mise en présence du composé étudié, lui-même fixé à une matrice. Les phages retenus sur la matrice sont amplifiés en bactéries afin d'isoler les ADNc qu'ils contiennent et de les identifier par séquençage. L'amplification du phage, et donc de l'ADNc, permet de connaître la nature des cibles fixées en faible nombre sur la matrice d'inhibiteur ou présentant une faible affinité pour celui-ci (voir figure 24). Tout comme la technique des puces à protéines, le phage display peut venir en complément de la chromatographie d'affinité (Bach *et al.*, 2006a).

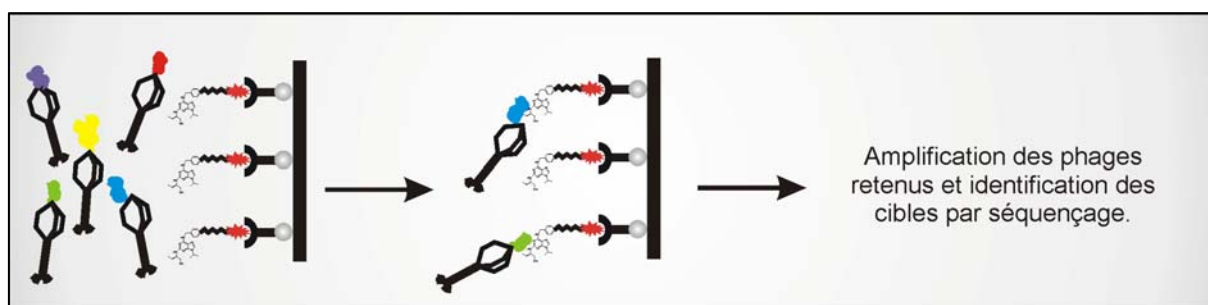


Figure 24 : Représentation schématique de l'étude de la sélectivité d'un composé par la méthode du phage display. Les cibles potentielles sont exprimées à la surface des phages. Le composé, fixé à une matrice, permet la rétention des phages exprimant ses cibles. Ces phages sont alors amplifiés et les ADNc des cibles qu'ils contiennent sont identifiés par séquençage.

Le triple hybride

Cette méthode est dérivée du double hybride, un outil puissant largement répandu pour démontrer une interaction physique entre deux protéines dans un contexte cellulaire. Dans un système double hybride classique, deux protéines hybrides, lorsqu'elles interagissent, mènent à la reconstitution d'un activateur transcriptionnel et ainsi à l'expression d'un gène rapporteur. Ici, un troisième composant est intégré au système (Becker *et al.*, 2004) : il s'agit de la molécule testée, liée à un ligand (classiquement, il s'agit du méthotrexate). Une protéine hybride, l'appât, est exprimée ; elle contient un domaine de liaison à l'ADN (DBD pour DNA Binding Domain) ainsi qu'un domaine de liaison au ligand couplé à la molécule. Le plus souvent, il s'agit de la DHFR (Dihydrofolate réductase). Afin de déterminer les cibles d'une molécule, on utilise une banque d'ADNc fusionnés à un domaine d'activation transcriptionnelle (AD pour Activation Domain). La drogue étudiée, couplée au ligand, fait le pont entre les deux protéines de fusion lorsqu'une cible s'y fixe. Ainsi, si ce type de complexe est généré dans la cellule, l'expression du gène rapporteur est alors possible : le domaine

DBD est toujours fixé sur les séquences activatrices en amont du gène rapporteur alors que le domaine AD se place au niveau de son promoteur et recrute un complexe de transcription. Les cellules exprimant le gène rapporteur sont alors sélectionnées afin d'isoler le vecteur proie et d'identifier le gène codant potentiellement pour une cible de la drogue étudiée (voir figure 25).

L'avantage majeur de cette technique réside dans le fait que l'interaction est recréée *in vivo*. Il faut tout de même garder à l'esprit que les conditions intracellulaires de la levure peuvent différer de celles des cellules mammifères ; le mauvais repliement des protéines ainsi que les modifications post-traductionnelles peuvent être différents et ainsi entraîner des résultats « faux positifs » ou « faux négatifs ». Pour pallier à ce problème, une méthode de triple hybride (ainsi que de double hybride) a été mise en place dans des cellules mammifères (Caligiuri *et al.*, 2006). Concernant le triple hybride en levure, un autre problème est celui de la présence de la paroi cellulaire. En effet, comme cela est décrit dans la partie résultats, un des paramètres qui doit être pris en compte lorsqu'on utilise la levure est la faible perméabilité de ces organismes face à certains composés (Luesch *et al.*, 2005). Ici, ce problème risque en plus d'être amplifié par la présence du bras PEG qui lie le composé d'intérêt au ligand utilisé. Curieusement, ce problème est peu discuté dans la littérature.

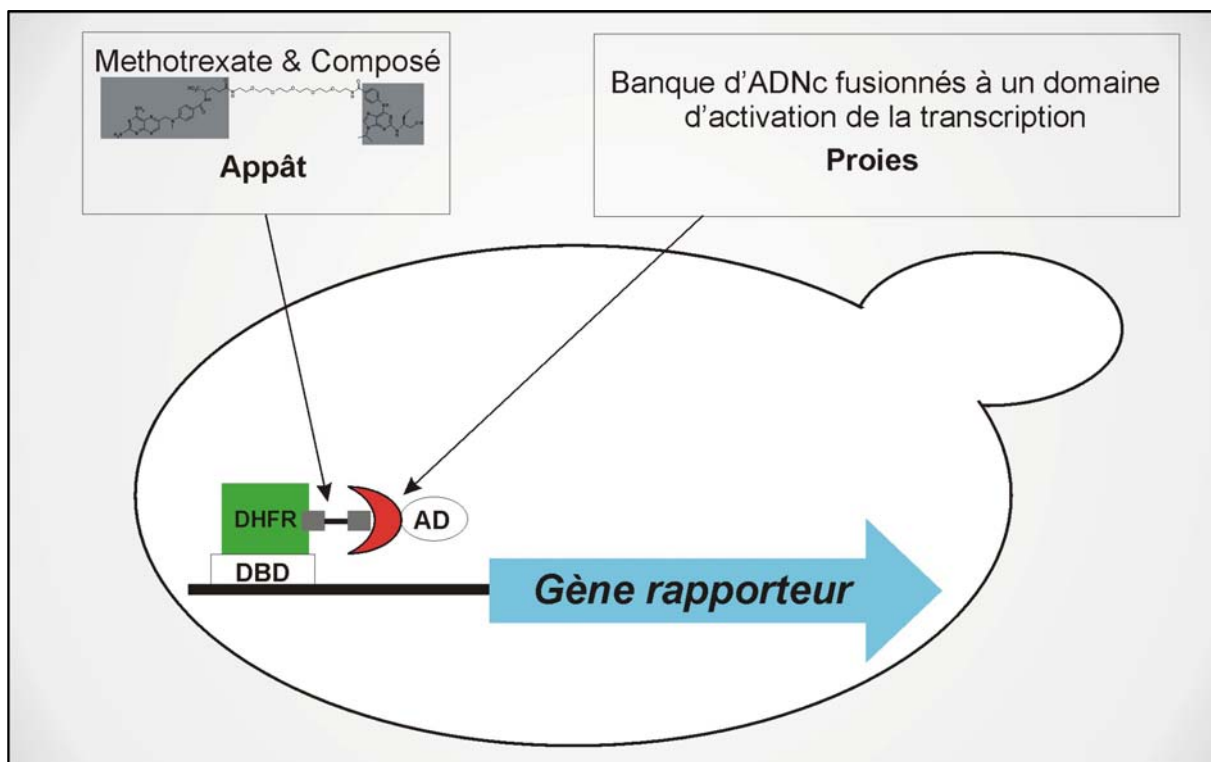


Figure 25 : Représentation schématique de l'étude de la sélectivité à l'aide du triple hybride en levure. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD), avec la présence d'un domaine d'activation de la transcription (AD) permettent d'exprimer un gène rapporteur. Une molécule hybride fait le pont entre ces deux éléments : il s'agit de l'appât. Il comprend un ligand (pour l'interaction avec le DBD) ainsi que la drogue étudiée. Les cibles potentielles de la drogue sont exprimées en fusion avec le domaine AD (ce sont les proies). L'interaction drogue/cible est donc mise en avant par l'expression d'un gène rapporteur qui permet de sélectionner les souches exprimant cette cible. Elle peut alors être identifiée.

Chromatographie d'affinité

Cette méthode biochimique est décrite et représentée dans la section « Matériels et Méthodes » (figure 45 à 47) ainsi que dans la section « Annexes » ainsi que dans diverses publications (Bach *et al.*, 2006a; Guiffant *et al.*, 2007; Knockaert & Meijer, 2002).

A l'origine utilisée pour purifier des protéines, elle a été adaptée à l'identification des cibles d'une molécule fixée sur une matrice. Le principe de la chromatographie d'affinité sur billes d'inhibiteurs immobilisés est de mettre en présence un lysat cellulaire et l'inhibiteur étudié. Ce dernier est couplé à une matrice de sépharose par le biais d'un bras PEG. Ainsi, on « pêche » les cibles de la drogue dans les extraits protéiques.

D'une manière rapide et efficace, la chromatographie d'affinité permet de réaliser une analyse de la sélectivité à l'échelle du protéome puisqu'elle est faite sur un lysat contenant la totalité des protéines du tissu utilisé. L'inhibiteur immobilisé pourra interagir avec une cible pour laquelle il a une forte affinité, bien qu'elle soit faiblement exprimée. En parallèle, il pourra aussi s'associer avec une cible fortement exprimée pour laquelle il a une faible affinité. Un des inconvénients de cette méthode réside donc dans la quantité relative des protéines cibles qui sont présentes dans l'extrait ; cette quantité est proportionnelle à leur niveau basal d'expression. Une cible faiblement exprimée ne sera pas retenue par la matrice face à une cible de même affinité dont l'expression serait beaucoup plus forte.

Ce principe de titration de la drogue peut aussi être utilisé à l'avantage de l'expérimentateur afin de vérifier la spécificité de l'interaction inhibiteur/cible potentielle : pour cela, avant de réaliser l'étape de chromatographie à proprement parlé, le lysat doit être mis en présence de la drogue libre (sans bras de liaison ni matrice) en excès. Si celle-ci se fixe de manière spécifique sur la cible considérée, la liaison de l'inhibiteur immobilisé est ensuite empêchée : on parle ici de compétition. Ainsi, la quantité de cible spécifique fixée sur la matrice est inversement proportionnelle à la concentration de composé libre mis en compétition avec le composé immobilisé.

Cette méthode d'étude de sélectivité a été utilisée avec succès concernant l'étude de différents inhibiteurs chimiques de protéine kinases : le purvalanol (Knockaert & Meijer, 2002), les paullones (Knockaert *et al.*, 2002), les indirubins (Meijer *et al.*, 2003), l'hymenialdisine (Wan *et al.*, 2004), le Gefitinib (Iressa) (Brehmer *et al.*, 2005) et plus récemment, la roscovitine (Bach *et al.*, 2005).

Concernant l'étude des cibles d'inhibiteurs de protéine kinases, Marcus Bantscheff *et al.* ont développé une technique dérivée de cette méthode de chromatographie d'affinité (Bantscheff *et al.*, 2007) : les KinobeadsTM forment une matrice d'affinité constituée de sept inhibiteurs de kinases peu sélectifs. Cette matrice permet de capturer un grand nombre de kinases représentatif de toutes les familles. De plus, les KinobeadsTM permettent la fixation de nombreuses protéines liant l'ATP ou les purines en général. La chromatographie d'affinité est réalisée en présence de l'inhibiteur de kinase d'intérêt. Il va agir par compétition avec les inhibiteurs de la matrice et prévenir la fixation de ses cibles sur cette matrice. La liaison des protéines à la matrice est suivie quantitativement par spectrométrie de masse. Une preuve de principe a déjà été publiée pour cette technique (Bantscheff *et al.*, 2007) aujourd'hui développée par la compagnie CellZome.

Génétique de levure

Toutes les méthodes décrites précédemment, exceptée l'approche *in silico*, utilisent la molécule dont on étudie la sélectivité sous une forme modifiée. En effet, le composé est soit fixé à une matrice, soit marqué par un fluorochrome ou un radioélément ou encore lié à une autre molécule (cas du triple hybride). Ces fixations sur un des atomes de la molécule sont réalisées de manière à ne pas altérer le phénotype observé en présence de la drogue libre. Malgré cela, on peut facilement imaginer que la fixation de certaines cibles soit compromise par la présence de cet élément supplémentaire. C'est sur ce point que réside la force des techniques basées sur la génétique de levure : le composé peut être utilisé sous sa forme libre. En tenant compte de cela, différentes approches sont possibles. Elles sont reprises sur la figure 26 et détaillées ci-dessous.

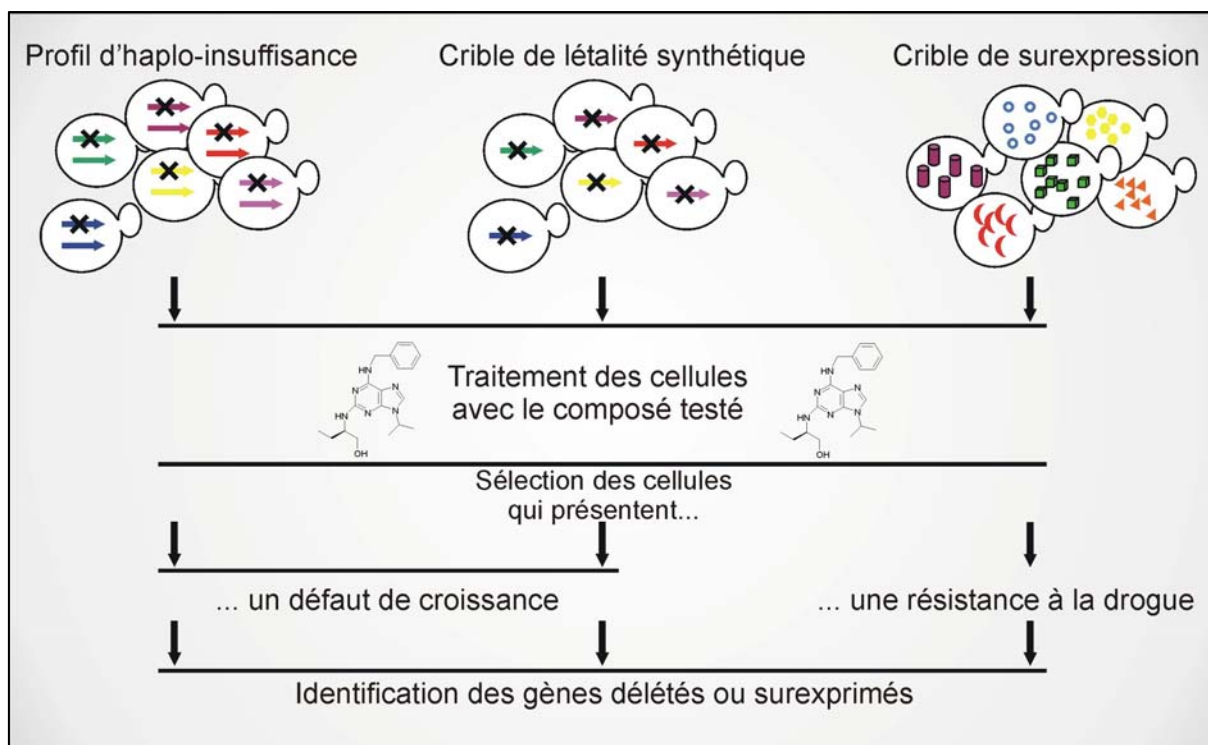


Figure 26 : Différentes approches d'étude de sélectivité à l'aide de la levure. (Emprunté à (Bach *et al.*, 2006a))

Profil d'haplo-insuffisance

Cette approche nécessite l'utilisation d'une collection de souches de levures diploïdes présentant chacune une délétion hétérozygote pour un gène. L'hypothèse qui conduit à l'identification des cibles de la molécule testée consiste à dire qu'en réduisant le nombre de copie d'un gène de deux exemplaires (dans la souche diploïde sauvage) à un exemplaire (dans la souche hétérozygote pour la délétion), on obtient une souche potentiellement plus sensible à la drogue d'intérêt. Le principe est donc de sélectionner les souches qui montrent un défaut de croissance lorsqu'elles sont en présence de la drogue : celle-ci diminue l'activité du produit du gène restant, mimant ainsi une délétion complète du gène. Cette approche permet donc d'évaluer l'ensemble des gènes de levure essentiels à la survie cellulaire comme ceux qui ne le sont pas.

En plus des problèmes de perméabilité qui doivent être considérés lorsqu'on utilise la levure, il faut avoir à l'esprit que les homologues levuriens de certains gènes dont l'inactivation est létale chez les eucaryotes supérieurs, peuvent avoir un caractère non-essentiel chez la levure. Une inhibition totale de ces cibles chez la levure peut donc passer inaperçue et ce paramètre est une limite à la technique décrite ici. De plus, il faut avoir à

l'esprit que l'inhibition d'une protéine par un composé chimique peut ne pas entraîner les mêmes conséquences qu'une délétion du gène correspondant (Knight & Shokat, 2007).

Crible de létalité synthétique

On parle d'interactions génétiques et de létalité synthétique lorsque la mutation de deux gènes considérés séparément n'entraîne pas de phénotype visible sur la croissance des cellules alors que la délétion simultanée de ceux-ci est à l'origine de la mort des cellules ou au moins d'un phénotype mesurable. Ce résultat suggère que les produits des deux gènes interviennent dans un processus biologique commun. La technique décrite ici utilise ce principe en postulant que l'inactivation d'un gène, accompagnée de l'inhibition chimique du produit d'un autre gène, peut amener à une létalité synthétique ou au moins un phénotype synthétique : on peut alors parler ici d'interactions « *chimio-génétiques* ».

Les souches utilisées sont haploïdes et présentent des mutations pour un gène donné. Ces levures sont traitées avec la molécule étudiée à des doses sub-létales (Parsons *et al.*, 2004). Les produits des gènes dont la délétion entraîne une augmentation de la sensibilité à la drogue sont donc potentiellement des cibles directes ou encore des protéines impliquées dans les mêmes voies de signalisation que ces cibles. Ces profils d'interactions chimio-génétiques sont comparés à ceux obtenus avec des cribles d'interactions génétiques. Cette technique, bien qu'elle ait fait ses preuves (Parsons *et al.*, 2004), ne permet de considérer que les quelques 5000 gènes dont la délétion n'est pas létale pour la levure. De plus, il ne faut pas perdre de vue, comme il a déjà été souligné, qu'une inhibition n'entraîne pas forcément les mêmes conséquences que la délétion d'un gène (Knight & Shokat, 2007).

Crible génétique de surexpression

Cette méthode permet d'identifier les gènes dont la surexpression confère une résistance à l'inhibiteur étudié (Luesch *et al.*, 2005). Ce type de crible est basé sur le fait que des cellules qui expriment une cible potentielle à un niveau plus élevé toléreront des concentrations plus fortes d'inhibiteur. Une souche de levure est donc transformée avec une banque plasmidique d'ADNc. La surexpression est due soit au nombre de copie par cellule de ces plasmides multicopies soit à l'expression dépendante d'un promoteur fort, inductible ou

constitutif. Ces cellules sont mises en culture en présence de doses létales de l'inhibiteur considéré afin d'isoler les clones capables de croître en sa présence. Les plasmides présents dans ces clones sont purifiés afin d'identifier par séquençage l'identité de la protéine qui a titré la drogue.

Cette technique implique que l'inhibiteur ait un effet négatif sur la croissance des levures. Cette condition, si elle n'est pas remplie, empêchera l'identification des cibles. Les différentes limites de la méthode sont les suivantes : (i) les cibles de l'inhibiteur ne sont pas essentielles ou n'ont pas d'homologues chez la levure (lorsque la banque utilisée est une banque d'ADN de levure), (ii) les effets de la drogue sur une cible sont masqués par la présence de protéines non inhibées par la molécule et ayant un effet redondant ou enfin, (iii) la drogue ne pénètre pas dans les levures à cause de la présence d'une paroi et/ou d'un système d'efflux des molécules toxiques pour la cellule. Ce sont là les limitations de cette technique qui semble pourtant être à la fois la plus simple des approches génétiques d'un point de vue expérimental et aussi celle qui laisse le plus de possibilités de cribles. En effet, diverses banques sont disponibles ou peuvent être construites. On peut ainsi rechercher les cibles d'une molécule au sein d'une banque d'ADNc de levure ou de toutes autres espèces.

Conclusion sur les différentes méthodes d'étude de la sélectivité d'un composé

Les techniques d'étude de sélectivité passées en revue dans ce chapitre montrent qu'il existe différentes approches toutes aussi originales les unes que les autres mais présentant des biais et des limites différentes. Il apparaît clairement que la méthode d'étude idéale n'existe pas. Chaque cible potentielle identifiée doit être validée afin de s'affranchir de l'identification de « faux positifs ». De plus, le risque majeur est de passer à côté de cibles réelles : afin d'éviter ces « faux négatifs » et d'avoir le profil de sélectivité le plus complet possible pour une molécule donnée, il convient d'utiliser au moins deux méthodes qui se complètent l'une et l'autre.

C'est à partir de cette constatation que ce projet d'étude de la sélectivité d'une drogue à potentiel thérapeutique a débuté au laboratoire. Au vu de l'expérience de notre équipe en matière de chromatographie d'affinité, mais aussi de l'utilisation courante de la levure en tant qu'outil, nous avons débuté un projet visant à étudier de manière

systématique la sélectivité d'un inhibiteur suivant les deux axes suivants : l'approche biochimique (chromatographie d'affinité) et l'approche génétique (basée sur le crible de surexpression décrit dans le paragraphe précédent). La molécule modèle que nous avons choisie est la roscovitine.

Présentation de la roscovitine

La modulation de l'activité des CDKs peut être réalisée par différentes approches, soit en inhibant leurs principaux régulateurs comme les cyclines par exemple, soit en interférant directement avec leur activité catalytique. C'est cette dernière approche qui a été la plus largement explorée et qui a conduit au développement de près de 120 inhibiteurs chimiques de CDKs dont une dizaine est actuellement en cours de développement clinique en tant que molécules anticancéreuses (Bettayeb *et al.*, 2008b). Parmi ceux-ci, la roscovitine, une purine, mime l'ATP au niveau du site catalytique de la kinase. La roscovitine a été développée au laboratoire et son nom rappelle son origine géographique. L'histoire de cette molécule débute en 1973, par la découverte de la 6-diméthylaminopurine (6-DMAP) par Lionel Rebhun qui constate qu'elle bloque la division d'œufs d'oursins. Suite à ces constatations, l'isopentenyladenine, une cytokine végétale proche de la 6-DMAP, émerge aux travers des travaux de Jaroslav Vesely. Elle apparaît plus efficace pour inhiber l'activité du complexe CDK1/cycline B impliqué dans la transition G2/M du cycle. Suite à ces travaux, Vesely développe à Roscoff, avec Laurent Meijer, un dérivé encore plus actif : l'olomoucine (Vesely *et al.*, 1994). Cette molécule inhibe aussi le complexe CDK1/cycline B et on découvre qu'elle agit comme un compétiteur de l'ATP (Meijer & Raymond, 2003), tout comme la majorité des inhibiteurs pharmacologiques de CDKs (Knockaert & Meijer, 2002). Enfin, la roscovitine, dérivée de l'olomoucine, encore plus active contre CDK1/cycline B, est apparue en 1997 (Meijer *et al.*, 1997). Par la suite, cette molécule est devenue un des composés phares étudiés au laboratoire. Du fait de la présence d'un carbone asymétrique, elle présente deux formes énantiomères : (R) et (S). La (R)-roscovitine dont une licence sur brevet a été prise par la société écossaise Cyclacel Ltd. est actuellement en fin de phase II d'étude clinique pour le traitement des cancers du sein et du poumon non à petite cellule ainsi que le lymphome B. Depuis, la molécule a montré des activités potentielles pour le traitement de nombreuses autres maladies telles que la glomérulonéphrite (une maladie inflammatoire des reins liée à une prolifération non contrôlée des cellules rénales) ou diverses maladies neurodégénératives.

La roscovitine est maintenant en phase I de test clinique pour le traitement de la glomerulonéphrite, et en phase II pour une forme bien particulière de cette maladie : la néphropathie à IgA (ou maladie de Berger) (Meijer, 2006).

En outre, la (R)-roscovitine est également devenue un outil couramment utilisé en biologie cellulaire pour l'étude du cycle cellulaire : elle est commercialisée par plusieurs sociétés, notamment Calbiochem. D'autre part, grâce à des études structure/activité, des dérivés plus puissants ont pu être synthétisés. Parmi eux, le purvalanol B est un composé plus puissant d'un point de vue inhibition mais il s'est avéré être aussi plus toxique sur des lignées cellulaires. Lorsque l'on découvre un composé de ce genre, bien que sa progression en tant que médicament soit compromise, il peut servir d'outil pour l'étude de mécanismes fondamentaux en recherche. Plus récemment, des analogues de la roscovitine ont été développés. Le CR8 et le N-&N1 ont montré une meilleure efficacité et une sélectivité qui semble être légèrement plus forte que celle qui caractérise la roscovitine (Bettayeb *et al.*, 2008a; Bettayeb *et al.*, 2008b).

Description de la (R)-roscovitine

La famille des purines 2,6,9-trisubstituées représente les premiers inhibiteurs de CDKs décrits et largement étudiés. La roscovitine entre dans cette catégorie et c'est un des inhibiteurs de CDKs les plus étudiés et utilisés dans les laboratoires. C'est la forme énantiomère (R) qui est actuellement la plus développée.

Le nom chimique de cette molécule est le suivant :

2-(1-ethyl-2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurine

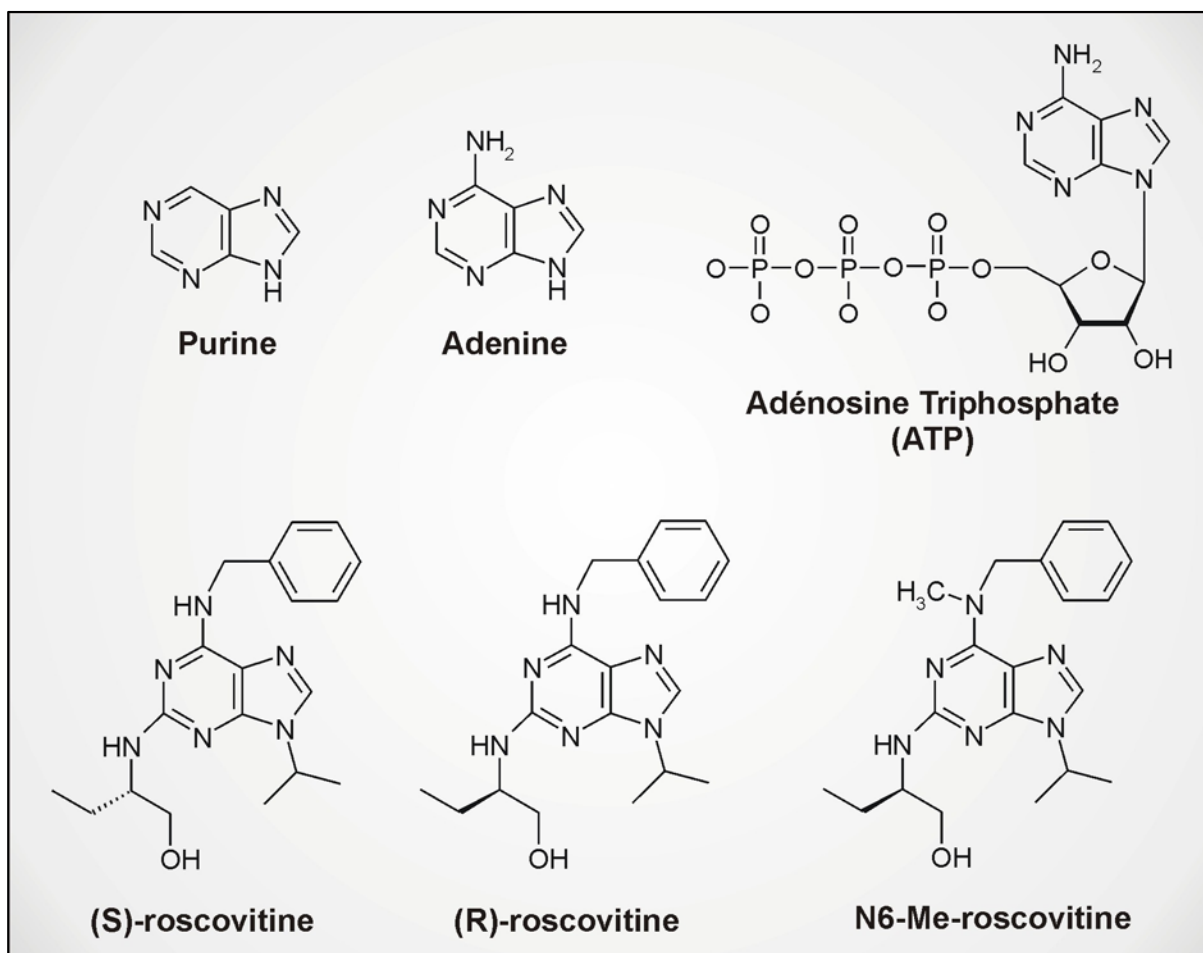


Figure 27 : Représentation des énantiomères S et R de la roscovitine. Ces deux molécules sont des purines et leur structure leur permet d’agir comme un mimétique de l’ATP. L’ajout d’un groupement méthyl (CH_3) sur l’atome d’azote n°6 donne un composé biologiquement inactif : la N6-méthyl-roscovitine.

On la retrouve aussi sous le nom de CYC202 ou encore Seliciclib. Elle a une masse moléculaire de $354,45 \text{ g.mol}^{-1}$ et entre donc dans la catégorie des inhibiteurs de bas poids moléculaire expliquant que l’on retrouve souvent l’appellation de « petit composé chimique » pour ce genre de molécule. La molécule telle que nous l’utilisons au laboratoire est synthétisée par des chimistes avec qui nous collaborons : elle est sous forme de poudre blanche faiblement soluble dans l’eau. Il est recommandé de la diluer dans du DMSO, solvant considéré comme universel. Elle est par ailleurs soluble dans une solution d’acide chlorhydrique (HCl) à 50mM, pH2.5. Cette caractéristique est très importante dans le cadre de son utilisation chez l’Homme et de son administration orale. De plus, lors des différents tests que nous avons effectués pour la réalisation de ce travail, nous avons constaté que sa solubilité est aussi bonne dans l’acétone. L’intérêt de connaître ces différents solvants réside dans les effets que ceux-ci peuvent avoir sur les cellules lors de tests cellulaires. Par exemple,

concernant la levure, l'utilisation du DMSO entraîne des modifications morphologiques des cellules. Si on souhaite observer ce genre de changements suite au traitement des cellules avec une drogue, l'acétone peut être un meilleur solvant car elle entraîne moins de variations au niveau de ces paramètres.

Sélectivité de la roscovitine

Cette molécule synthétique est née de l'optimisation structurale de l'olomoucine. Sur un premier panel de 24 kinases, cet inhibiteur s'est avéré être plus sélectif que son prédécesseur. D'autres études successives ont permis de connaître sa sélectivité mais aussi son activité sur 151 protéine kinases humaines (Bach *et al.*, 2005) : les cibles CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 et CDK9 (contrairement à CDK4, CDK6 et CDK8) sont inhibées par la (R)-roscovitine avec des IC₅₀ inférieures à 1 μM. Quelques autres kinases telles que CaM kinase 2, CK1α et CK1δ, DYRK1A, EPHB2, ERK1 et ERK2, FAK et IRAK4 sont plus faiblement inhibées : les IC₅₀ de la (R)-roscovitine sur ces cibles est comprise entre 1 et 40 μM. La majorité des autres kinases formant ces panels est insensible la drogue (Meijer, 2006). Bien que les panels testés ne représentent qu'environ 30% des kinases codées par le génome humain, ces premières constatations ont permis de dire que cette molécule était relativement sélective des CDKs.

Cette approche de la sélectivité a été complétée par la mise en place de la méthode de chromatographie d'affinité sur billes de (R)-roscovitine (Bach *et al.*, 2005). Elle a permis de retrouver et ainsi de valider l'inhibition de cibles déjà décrites telles que les CDKs, différentes isoformes de la CaM kinase 2, ERK1 et ERK2 ainsi que CK1α. De plus, une nouvelle cible a été découverte grâce à cette méthode : la pyridoxal kinase (PDXK). Cet enzyme phosphoryle et active la vitamine B6 ; ce n'est donc pas une CDK.

L'approche du triple hybride a aussi permis de valider des cibles connues et d'en découvrir d'autres : CK1ε et la CDK-like PCTK1. Il s'est avéré que la (R)-roscovitine est capable de se fixer de manière faible à d'autres kinases : CLK1, PAK4, PCTK3, PKWA et GSK3α (Becker *et al.*, 2004).

Enfin, la méthode du phage display a elle aussi permis de valider certaines cibles et d'en découvrir de nouvelles : CK1γ1, CK1γ2, CLK2, CLK4 et enfin TTK.

Les effets biologiques de la roscovitine

L'effet de la drogue a été évalué sur de nombreuses lignées de cellules mammifères en culture, le plus souvent des lignées humaines. Deux événements majeurs liés au traitement avec cette drogue ont été relatés : un arrêt dans la progression du cycle cellulaire mais aussi une induction de la mort cellulaire (encore appelée apoptose).

Dépendant de la lignée considérée, de la durée du traitement et de la dose d'inhibiteur administrée, le blocage du cycle a été constaté au cours des phases G₀, G₁, S et à la transition G₂/M. Cet arrêt est la conséquence de l'inhibition d'activité des différents couples CDK/cycline impliqués dans ces phases (Meijer, 2006). La (R)-roscovitine agit à différents niveaux de régulation : tout d'abord, elle inhibe l'activité de CDK7, bloquant alors la phosphorylation activatrice sur la thréonine des CDK1, 2 et 4. D'autre part, la molécule inhibe l'activité catalytique du complexe CDK2/cycline E ; il en résulte un manque de phosphorylation nécessaire à la dégradation de l'inhibiteur naturel p27^{KIP1} : cela mène à sa stabilisation et au maintien de son rôle inhibiteur de CDK2 et CDK4 et donc à un blocage du cycle en G₁.

Au-delà des effets sur ses cibles directes, le traitement à la (R)-roscovitine est la cause d'événements biochimiques et morphologiques liés à l'activité des CDKs. Ainsi, elle est capable de bloquer divers événements tels que la réplication de l'ADN, la formation du nucléole, la duplication de centrosome, la fragmentation de l'appareil de Golgi, et enfin la rupture de l'enveloppe nucléaire. Le blocage de ces processus biologiques est aussi responsable de l'arrêt de la progression de la division cellulaire.

En ce qui concerne la mort cellulaire, elle est induite dans la majorité des lignées cellulaires qui ont été testées et elle peut l'être à n'importe quelle phase du cycle. Toutes les caractéristiques de la mort cellulaire programmée sont alors observées : condensation de la chromatine, fragmentation de l'ADN nucléaire, activation des caspases et libération du cytochrome C.

Chez l'Homme, la demi-vie de la (R)-roscovitine est relativement courte et ses métabolites sont sans effets sur la cellule. Cela a l'avantage de cibler préférentiellement les cellules cancéreuses qui sont dépendantes de facteurs agissant à court terme mais aussi d'éviter un effet à long terme qui pourrait nuire aux cellules saines.

Un dérivé inactif, la N6-méthyl-roscovitine

La chromatographie d'affinité a permis de mettre en évidence une cible non attendue de la roscovitine : la PDXK (voir paragraphe « Sélectivité de la roscovitine »). Afin de déterminer les éventuelles conséquences de l'inhibition de la PDXK par la molécule, et par extension les effets secondaires que l'on pourrait lui imputer, un composé dérivé de la roscovitine a été développée.

La co-cristallisation de la drogue avec CDK2 montrait que l'atome d'azote en position 6 est impliquée dans une liaison hydrogène cruciale pour la liaison drogue/CDKs (De Azevedo *et al.*, 1997; Mapelli *et al.*, 2005). En parallèle, ce même type d'approche réalisé avec la PDXK a indiqué que la roscovitine se fixe cette fois dans un sillon au niveau du site de fixation du pyridoxal. Cette interaction ne fait pas intervenir l'azote en position 6 qui peut donc être substitué par un groupement méthyl (CH₃).

Ceci a pour effet d'empêcher sa liaison avec les CDKs mais pas avec la PDXK. La molécule ainsi crée est la N6-méthyl-roscovitine. Des tests biologiques ont montré que ce composé n'entraînaient pas d'effets anti-prolifératifs ni pro-apoptotique impliquant que l'inhibition de la PDXK n'est pas à l'origine des effets observés lors d'un traitement avec la roscovitine. Même si l'existence de cette cible n'entraîne pas d'effets majeurs, il faut garder à l'esprit qu'une cible comme celle-ci peut « diluer » la drogue et ainsi limiter son action. La PDXK étant fortement exprimée au niveau du cerveau, elle pourrait être à l'origine d'une faible efficacité de la roscovitine dans le cadre du traitement de maladies neurodégénératives. Le composé N6-méthyl-roscovitine sert donc de molécule contrôle, inactive sur les protéine kinases.

Pourquoi la roscovitine ?

La sélectivité et le mode d'action de la (R)-roscovitine dans des cellules mammifères ont donc été largement étudiés et sont à ce jour bien connus. C'est pour cette raison que nous avons choisi de mettre en place notre système d'étude de sélectivité avec cette drogue. Le but

est d'apporter une preuve de concept que l'utilisation de la levure *S. cerevisiae* peut être appliquée à l'étude de petits composés chimiques inhibiteurs de CDKs.

En effet, la découverte chez la levure des cibles de la roscovitine par le biais de la chromatographie d'affinité sera comparée avec les cibles humaines. Les homologies (si possible fonctionnelles) détectées entre les protéines des deux organismes seront autant de preuves validant notre approche.

La mise en place d'un crible génétique en levure nécessite dans un premier temps d'apporter une preuve de concept. Là encore, l'utilisation de la roscovitine est justifiée. En effet, si la banque utilisée est une banque d'ADNc de levure, les résultats obtenus avec la chromatographie d'affinité peuvent apporter cette validation. Dans le cas de l'utilisation d'une banque d'ADNc humains, les connaissances des cibles de la roscovitine décrites dans la littérature seront aussi là pour montrer la pertinence des protéines identifiées.

Résultats

Ce sujet a été initié suite à l'observation d'un phénotype d'inhibition de croissance des levures (voir figure 28). Ce phénotype suggérait que la roscovitine, plus particulièrement sa forme (R), ciblait des protéines essentielles chez la levure, ces cibles de levures pouvant avoir des homologues dans les cellules eucaryotes supérieures. Il est toutefois à noter que l'inhibition de croissance observée est relativement faible et visualisable uniquement dans un contexte *erg6Δ*. Cette mutation est connue pour augmenter la perméabilité de la membrane et/ou de la paroi des cellules de levures (Bach *et al.*, 2003; Bach *et al.*, 2006b).

L'hypothèse de départ a donc été la suivante : l'identification des cibles d'une drogue d'intérêt peut être réalisée à l'aide d'un organisme simple, facile à manipuler et peu onéreux. Une vision globale de la sélectivité d'un composé, la connaissance de ses cibles et donc de son mode d'action peuvent être mis en évidence, au moins en partie, et de manière rapide à l'aide de la levure.

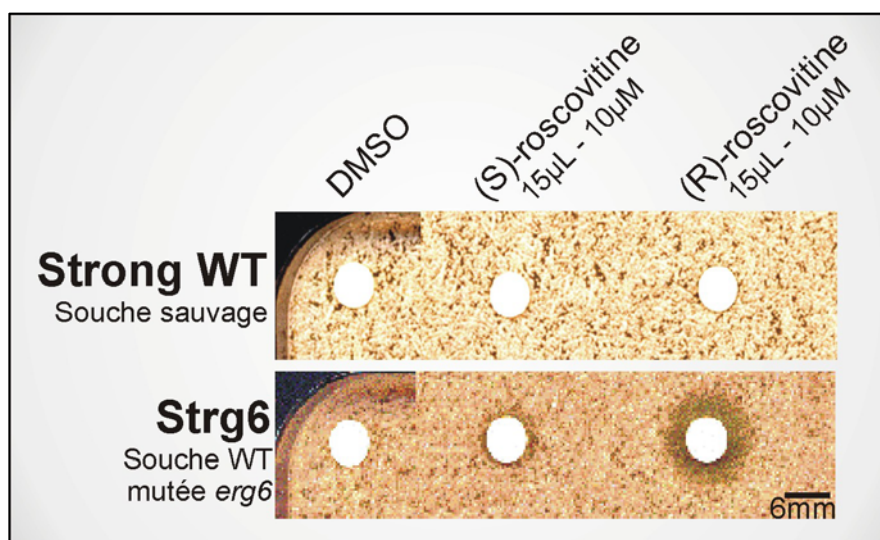


Figure 28 : Apport de la mutation *erg6Δ* pour la sensibilité à la roscovitine. Dans le fond génétique considéré (74-D694), la délétion du gène *ERG6* est un pré-requis à l'obtention d'un phénotype de défaut de croissance.

Dans un premier temps, nous avons utilisé la chromatographie d'affinité pour connaître les cibles levuriennes de la roscovitine chez la levure. Avant de développer l'approche génétique, les cibles identifiées par voies biochimiques devaient être validées comme étant de réelles cibles de la drogue. Les cibles confirmées ont ensuite été comparées à celles détectées chez l'Homme afin de juger de la pertinence de l'utilisation d'un modèle d'étude unicellulaire. Cette validation représente une majeure partie des résultats qui vont être développés ici. Enfin, nous avons optimisé les conditions permettant d'obtenir une bonne sensibilité des levures à la roscovitine dans le but de mettre en place un crible génétique permettant, à la différence de la chromatographie d'affinité, d'utiliser la molécule de roscovitine libre (c'est-à-dire sans bras espaceur lié à une matrice solide) afin de caractériser les cibles cellulaires par une autre approche, le but est étant d'être le plus exhaustif possible.

Identification des cibles levuriennes de la roscovitine

La méthode de chromatographie d'affinité sur billes de (S) et (R)-roscovitine, couplée à la spectrométrie de masse (empreintes peptidiques), a permis l'identification des cibles potentielles de ces deux énantiomères. Lors de la préparation de la matrice, une saturation est réalisée à l'aide d'éthanolamine (voir section « Matériels et Méthodes »). Des billes ne présentant que ce composé permettent de discriminer d'éventuelles fixations non-spécifiques à la matrice et servent donc de contrôle. D'autre part, une matrice de N6-méthyl-roscovitine (composé inactif sur les protéines kinases (Bach *et al.*, 2005)) est aussi utilisée en tant que témoin, ce composé n'ayant aucun effet d'inhibition sur la croissance des levures.

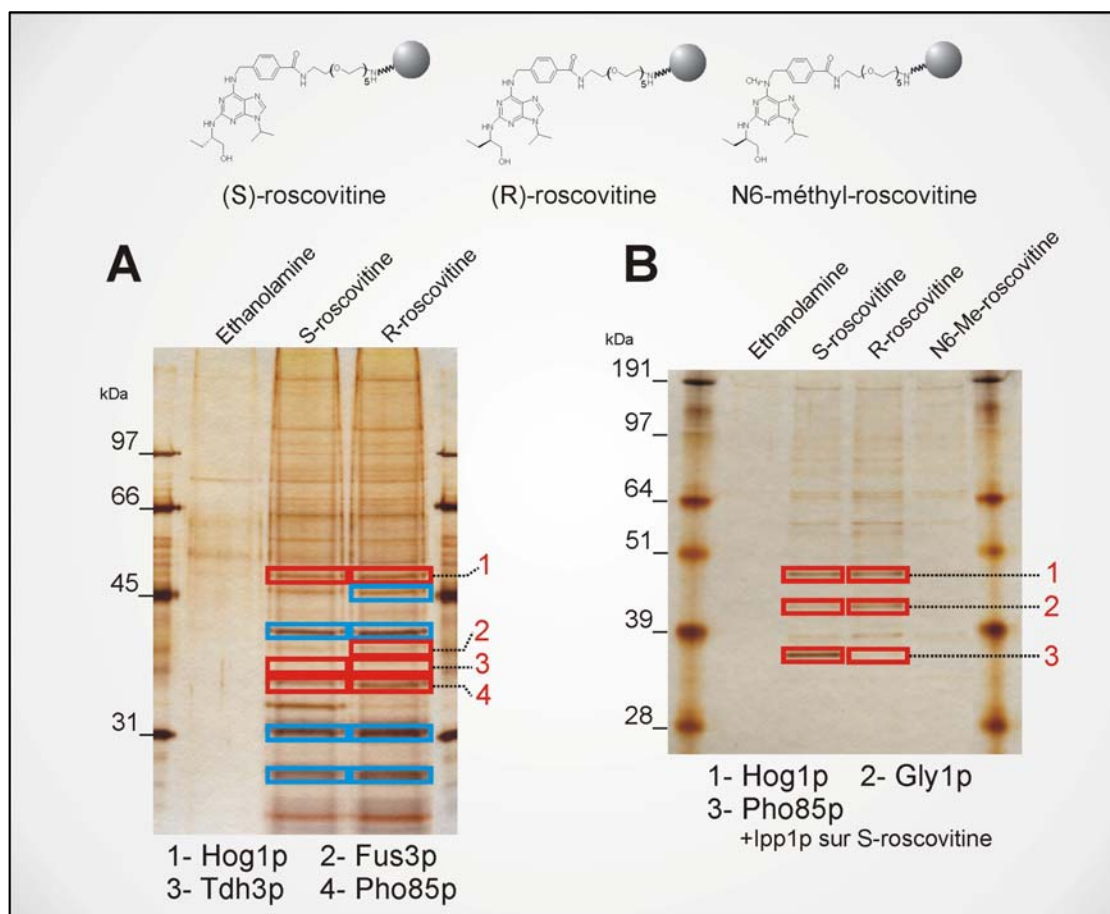


Figure 29 : Utilisation de la chromatographie d'affinité pour l'identification des cibles levuriennes de la roscovitine. Deux expérimentations indépendantes et séparées dans le temps (A et B) ont permis de mettre un nom sur diverses protéines se liant aux deux formes du composé. Les cibles identifiées qui ont semblé être pertinentes sont encadrées en rouge et identifiées par les numéros associés. Les protéines entourées de bleu n'ont été retrouvées qu'une fois, elles correspondent à des protéines ribosomales fortement représentées dans le lysat.

L'identification des cibles de la roscovitine a été réalisée lors de deux expérimentations indépendantes. Les protéines identifiées sont répertoriées sur la figure 29. Elles sont listées et sommairement décrites ci-dessous. Certaines des protéines ne sont pas citées ici de part le caractère inconnu de leur(s) fonction(s) biologique(s).

Hog1p est une MAPK (Mitogen-activated protein kinase) impliquée dans la transduction du signal d'adaptation au stress osmotique : elle permet à la cellule de se protéger des chocs hyper-osmotiques auxquels elle peut être confrontée. Une présentation plus détaillée est réalisée plus loin.

Fus3p est aussi une MAPK. Elle est impliquée dans le phénomène de conjugaison entre deux cellules de levure de signes sexuels opposés : elle bloque la croissance cellulaire afin que les deux cellules puissent émettre leur phéromone respective et se reconnaître pour former une cellule diploïde.

Tdh3p : retrouvée dans le cytoplasme et dans la paroi, c'est une des glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase impliquée dans la glycolyse et la néoglucogenèse. Cette protéine est très abondante dans la cellule.

Gly1p : cette thréonine aldolase joue un rôle dans la biosynthèse de la glycine. Cet acide aminé provient du clivage de la L-allo-thréonine et de la L-thréonine.

Ipp1p : cette protéine n'est retrouvée que sur les billes de (S)-roscovitine. C'est une pyrophosphatase inorganique retrouvée dans le cytoplasme. Bien que l'on sache qu'elle catalyse l'échange d'oxygène entre le phosphate inorganique (encore appelé ortho-phosphate) et l'eau, très peu de données bibliographiques sont disponibles concernant cette protéine. Toutefois, il est décrit qu'elle est fortement exprimée et essentielle à la viabilité de la levure. Il semblerait donc que la fixation de la drogue à cette cible n'inhibe pas la totalité de Ipp1 présente dans la cellule, vu la faible toxicité de la (S)-roscovitine sur des cellules de levure en croissance. Il est également possible que cette protéine soit entraînée par une autre cible de la drogue. La technique de chromatographie d'affinité permet en effet d'isoler des complexes multi-protéiques et Ipp1 interagit avec plus de 40 protéines différentes chez la levure.

Pho85p : c'est une des six CDKs de la levure. Interagissant avec dix cyclines différentes, elle est impliquée dans plusieurs processus biologiques dont la progression de la phase G1 et la réponse cellulaire aux conditions environnementales. Une description plus détaillée de cette protéine est réalisée plus loin.

Entourées de bleu sur la figure 29 (panel A), d'autres cibles ont été identifiées lors de la première expérience réalisée. Il s'agit pour l'ensemble d'entre elles de protéines ribosomales formant la petite et la grande sous-unité du ribosome 80S. Parmi elles, le facteur eEF2, responsable de la translocation des ARNt et ARNm après formation de la liaison peptidique. Ce complexe est aussi capable de lier les nucléotides adényliques au niveau de sa

partie C-terminale (Soe *et al.*, 2007), ce qui pourrait expliquer que tous ces composants se seraient fixés sur la roscovitine dans des conditions de stringences faibles.

Suite à ces premières identifications, il nous est apparu très étrange de ne pas identifier Cdc28, la principale CDK régulatrice du cycle cellulaire de la levure. En effet, son homologue fonctionnel humain CDK1 est non seulement une cible bien décrite de la roscovitine (la drogue présente une IC₅₀ inférieure à 1µM sur CDK1/cycline B (Bach *et al.*, 2005)) mais c'est également cette CDK qui a permis l'isolement de la molécule.

Basé sur le fait que la roscovitine soit un inhibiteur de protéine kinases, nous avons confirmé qu'elle n'inhibe pas Cdc28 et nous sommes largement intéressés à deux cibles (Hog1 et Pho85) identifiées lors des deux expérimentations présentées ci-dessus. La drogue pouvant interagir avec leur homologue humain (respectivement la MAP kinase p38 et CDK5), la confirmation de ces cibles permet de valider l'utilisation du modèle levure.

Validation de deux cibles d'intérêts, Hog1 et Pho85 ; et de l'absence de Cdc28

Cdc28, la CDK centrale du cycle cellulaire de *S. cerevisiae* n'est pas une cible de la roscovitine

Lors de la première série de purification des cibles potentielles de la roscovitine chez la levure, nous avons détecté une protéine de taille équivalente à 34 à 35kDa. En nous basant sur les cibles moléculaires déjà connues (des CDKs pour la plupart), nous avons une forte suspicion sur son identité. Ne disposant alors pas d'un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine Cdc28, nous avons utilisé un anticorps anti-PSTAIRE. Dirigé contre cette séquence en acides aminés très conservée, le Western blot nous a confirmé qu'il s'agissait bien d'une CDK. Le problème que nous rencontrions alors était que Pho85 possède cette même séquence et une taille quasiment identique (34kDa pour Cdc28 et 34,9kDa pour Pho85). Les deux identifications réalisées par la suite avaient alors confirmé qu'il s'agissait de Pho85, Cdc28 ne semblant pas retenue sur les billes d'inhibiteurs.

Cdc28, dont le rôle central chez *S. cerevisiae* est décrit dans l'introduction générale, est l'homologue de la protéine kinase CDK1 humaine. Cette protéine est une cible bien caractérisée de la roscovitine : le composé présente une IC_{50} de $0,65\mu M$ pour cette kinase (Bach *et al.*, 2005). Il est donc étonnant que Cdc28 ne soit pas inhibée par la roscovitine, qu'elle soit sous la forme énantiomère (R) ou (S) mais cela pourrait expliquer la toxicité relativement faible observée sur les levures en croissance (figure 28).

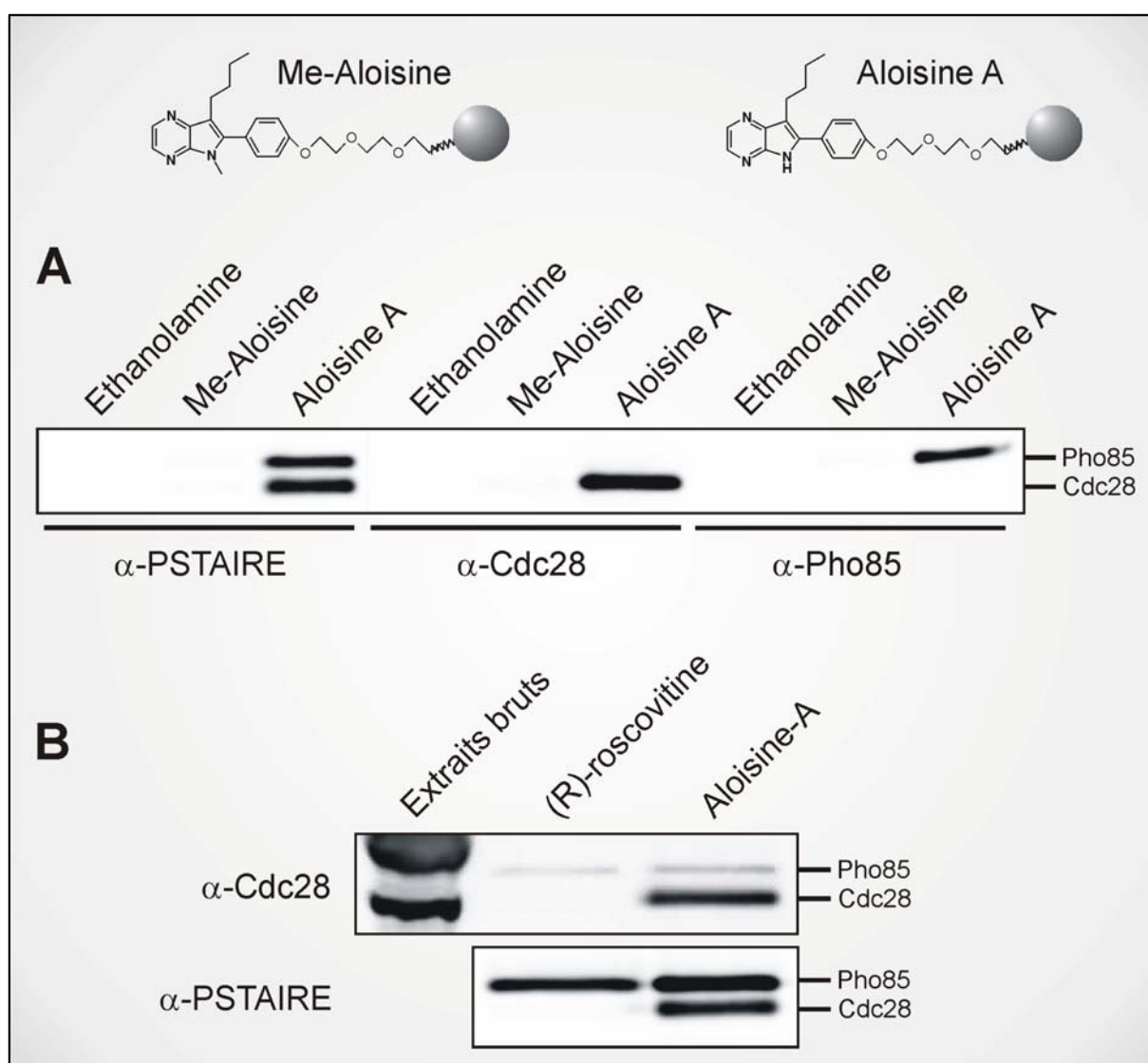


Figure 30 : Vérification de l'absence de Cdc28 sur une matrice de (R)-roscovitine. L'aloisine A, un composé structuellement proche de la roscovitine, fixe à la fois Cdc28 et Pho85 (**panel A**) et ceci de manière spécifique. L'utilisation des anticorps qui ont révélé ces liaisons montre aussi que Cdc28 ne se fixe pas sur la (R)-roscovitine (**panel B**). (**NB** : Deux quantités différentes de protéines totales ont été utilisées pour ces expériences : 1mg pour la réalisation du panel A contre 4mg pour celle du panel B) (Corbel *et al.*, 2008).

Grâce au Dr Carl Mann du CEA de Saclay, nous avons pu aborder cette problématique plus précisément : son laboratoire nous a fourni un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine Cdc28 qui, par rapport à l'anti-PSTAIRE, nous permet de nous affranchir de la détection de Pho85 sur les matrices d'affinité utilisées. L'utilisation d'une matrice d'Aloisine A (un autre composé de la famille des purines dont la structure est représentée sur la figure 30) est ici un élément de comparaison : cette molécule immobilisée sur les billes de sépharose se fixe à la fois sur Pho85 et Cdc28 (Corbel *et al.*, 2008). Ceci est visualisé à l'aide de trois anticorps différents : anti-PSTAIRE, anti-Cdc28 et anti-Pho85 (figure 37, panel A).

L'anti-Cdc28 permet de visualiser la présence de cette CDK sur la matrice d'Aloisine A. D'autre part, Pho85, qui présente 50% d'identité avec Cdc28, est légèrement révélée par cet anticorps lorsque la quantité de protéine utilisée est forte (4mg de lysat pour la réalisation du panel B contre 1mg pour celle du panel A). On peut alors voir que Cdc28 n'est pas présente sur la matrice de (R)-roscovitine indiquant encore une fois qu'elle n'est très certainement pas une cible de notre drogue d'intérêt (figure 37, panel B).

L'étude *in vitro* de l'activité kinase de Cdc28, en présence de roscovitine est en cours. Ceci est réalisé à l'aide du complexe Cdc28/Clb2 purifié (voir la section « Matériels et Méthodes »). Nous attendons de ce type d'expérience une IC₅₀ particulièrement forte pour la roscovitine. Ce résultat sera comparé avec celui obtenu pour l'aloisine A qui présente une IC₅₀ de 2,5µM sur Cdc28 (Corbel *et al.*, 2008).

Pho85, une cible levurienne de la roscovitine

Description et fonction biologique

Pho85 est une des six CDKs de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Elle est l'homologue fonctionnel de CDK5, une CDK humaine impliquée dans la différenciation cellulaire, l'apoptose et surtout les fonctions neuronales : une surexpression de CDK5 dans des levures complémente la majorité des changements observés dans une souche *pho85Δ*. Inversement, Pho85 exprimée en cellules mammifères est capable de s'associer aux activateurs de CDK5 (p35 et p39) pour former des complexes CDK/activateur fonctionnels (Huang *et al.*, 1999).

Tout comme Cdc28 avec qui elle a 50% d'identité de séquence, elle est activée par plusieurs cyclines : les Pcls (Pho85 cyclins). Ces protéines régulatrices, au nombre de dix, sont classées en deux sous-familles et confèrent à Pho85 une spécificité de substrat dont découlent divers rôles dans la cellule. Ainsi, elle est impliquée dans la progression de la phase G1, dans le contrôle de la polarité cellulaire et du cytosquelette d'actine, dans la régulation de l'expression de gènes, dans le métabolisme du phosphate (première fonction qui lui a été attribuée (Moffat *et al.*, 2000), d'où son nom : phosphate metabolism) et du glycogène, et enfin, dans la signalisation des changements environnementaux. Malgré la grande variété de fonctions qui lui sont imputées, Pho85 n'est pas essentielle pour la survie de la cellule.

Les deux sous-familles de cyclines activant Pho85, caractérisées par des similarités de séquences, sont les suivantes :

- la sous-famille Pho80p comprend les cyclines Pho80, Pcl6, Pcl7, Pcl8 et Pcl10 qui impliquent Pho85 dans la réponse cellulaire adaptée aux carences nutritionnelles de la cellule ainsi qu'à la réponse aux modifications environnementales.

- l'autre sous-famille de cyclines est nommée Pcl1,2. Elle comprend les protéines Pcl1, Pcl2, Pcl9, Clg1 et Pcl5. Alors que Pcl5 est impliquée dans la réponse aux nutriments comme les cyclines de la sous-famille Pho80, les autres membres de cette sous-famille régulent la progression du cycle cellulaire et la transcription durant ce dernier.

Les substrats de Pho85 sont nombreux et leur phosphorylation entraîne diverses conséquences telles que leur changement de localisation, de stabilité ou encore d'activité enzymatique. Le substrat le mieux caractérisé est le facteur de transcription Pho4 ; en présence de phosphate inorganique, il est phosphorylé par le complexe Pho85/Pho80, ce qui le maintient inactif, dans le cytoplasme. En présence de Pho81, un CKI (CDK inhibitor), et dans des conditions où le phosphate devient rare pour la cellule, Pho4 est déphosphorylé et importé dans le noyau (Kaffman *et al.*, 1998) où il peut activer l'expression des gènes *PHO* et *VTC* régulant le métabolisme du phosphate (Huang *et al.*, 2007).

Couplée à la cycline Pcl10, Pho85 ajoute un groupement phosphate sur une glycogène synthase. Ceci a pour effet d'inhiber la biosynthèse du glycogène.

Un des autres substrats important de Pho85 est la protéine Sic1. Cet inhibiteur de Cdc28/Clb5 doit être dégradé afin de permettre à la cellule de poursuivre sa phase de réplication d'ADN. Pour que cette protéolyse ait lieu, Sic1 doit être phosphorylée et cette réaction peut être catalysée par l'action de Pho85 couplée à la cycline Pcl1.

Démonstration de l'inhibition de Pho85 par la roscovitine

Afin de tester l'éventuel effet inhibiteur de la roscovitine sur Pho85, nous avons mis en place une collaboration avec Erin O'Shea et Ian Carter-O'Connell du département de Biologie cellulaire et moléculaire à l'Université d'Harvard. Une des thématiques principales du laboratoire d'Erin O'Shea est l'étude des voies de signalisation impliquant la protéine Pho85. Plus particulièrement, Ian Carter s'intéresse au complexe Pho85/Pho80 et à son inhibiteur Pho81 et à leur rôle dans la régulation du facteur de transcription Pho4. Pour cette raison, ils disposent des outils utiles à la mesure de l'activité kinase de Pho85. C'est ainsi qu'il a été possible de déterminer les IC_{50} des deux formes de la roscovitine sur cette cible.

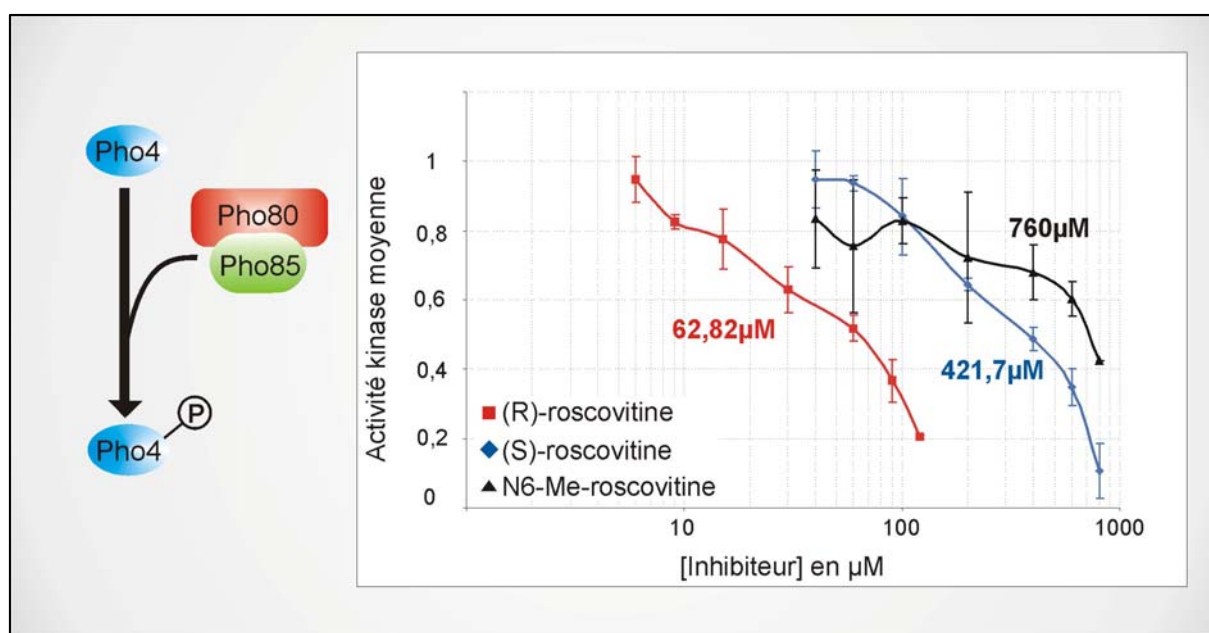


Figure 31 : Détermination de l' IC_{50} des deux énantiomères de la roscovitine sur Pho85. Le pourcentage d'activité kinase de Pho85 est déterminé pour différentes concentrations de drogues testées. Cela permet de déterminer l' IC_{50} de la (R) et de la (S)-roscovitine sur Pho85. Ces valeurs sont respectivement de $62,82\mu M$ et $421,7\mu M$. Concernant la N6-méthyl-roscovitine, son IC_{50} est de $760\mu M$.

Ce test d'inhibition *in vitro* nous a permis de déterminer que les IC_{50} de la (R) et de la (S)-roscovitine sont respectivement de $62,82\mu M$ et de $421,7\mu M$. Ces données montrent bien que la roscovitine, plus précisément la forme (R), inhibe la kinase Pho85. Alors que la (S)-roscovitine inhibe très mal Pho85, il faut toutefois noter que l' IC_{50} de la (R)-roscovitine sur Pho85 est relativement élevée : à titre d'exemple, la forme (R) de la drogue présente une IC_{50} inférieure de $0,16\mu M$ sur l'homologue humain CDK5.

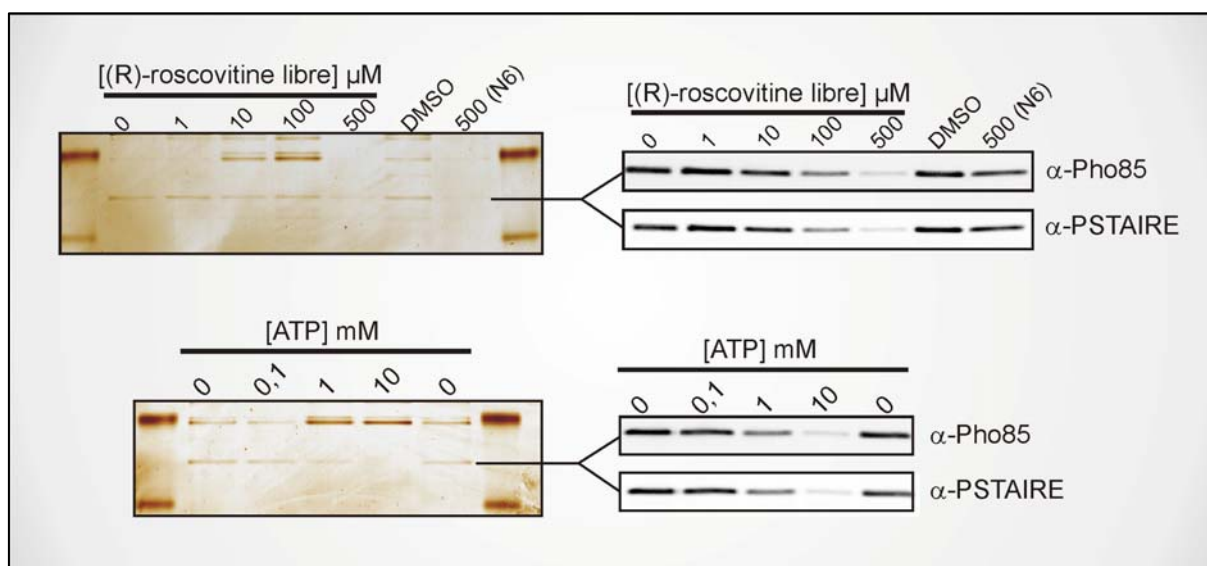


Figure 32 : Validation de la spécificité de la cible Pho85 et de son mode de fixation par compétition. Une chromatographie d'affinité sur billes de (R)-roscovitine est réalisée en présence de concentrations croissantes de drogue libre ou d'ATP. La fixation de Pho85 sur les billes est suivie d'une part par une coloration à l'argent du gel de polyacrylamide et d'autre part, à l'aide d'un anticorps dirigé contre cette protéine ou d'un anticorps anti-PSTAIRE, séquence caractéristique de certaines CDKs.

La spécificité de la cible Pho85 a été vérifiée par compétition, tant avec la drogue libre (forme (R)) qu'avec l'ATP. Les expériences de compétition consistent à réaliser une chromatographie d'affinité en présence de drogue libre (molécule de roscovitine sans le bras espaceur). Lorsque celle-ci est en excès dans le mélange réactionnel, les cibles s'y fixent préférentiellement, entraînant alors une diminution de la quantité des cibles potentielles retenues sur la matrice de drogue immobilisée. A l'inverse, une présence massive d'un composé inactif sur les cibles protéine kinases (ici la N6-méthyl-roscovitine) ne doit pas générer cette diminution.

Lorsque la drogue cible des kinases et agit comme un mimétique de l'ATP en se fixant dans sa poche catalytique, il est aussi possible de réaliser ce genre de compétition en présence d'ATP à de fortes concentrations. Ainsi, ces kinases se lient préférentiellement avec l'ATP en excès, empêchant ainsi leur fixation à la matrice. Cela permet de préciser le mode d'interaction de la drogue sur une nouvelle cible.

Ainsi, la quantité de la CDK de levure fixée sur la matrice de (R)-roscovitine est inversement proportionnelle à la concentration de drogue libre présente dans le mélange au cours de l'étape de chromatographie. Deux expériences témoin ont été réalisées : d'une part

en absence de drogue et d'autre part, en présence de DMSO, solvant dans lequel est solubilisée la drogue libre. En comparaison de ces contrôles, la diminution de fixation de Pho85 sur les billes est visible sur un gel de polyacrylamide coloré à l'argent et confirmé à l'aide de deux anticorps reconnaissant la cible étudiée : l'un d'entre eux reconnaît la séquence PSTAIRE caractéristique de certaines CDKs, l'autre est un anticorps spécifique de Pho85. Cette donnée indique clairement que Pho85, bien qu'inhibée de manière relativement faible par la (R)-roscovitine ($IC_{50} > 60 \mu M$), est une cible spécifique de cet énantiomère mais aussi de la (S)-roscovitine (résultats non montrés).

La concentration maximale de (R)-roscovitine utilisée est ici de $500 \mu M$. Nous avons donc testé l'effet de la N6-méthyl-roscovitine à cette même concentration : ce composé libre n'entre pas en compétition avec l'inhibiteur fixé sur la matrice. Cela nous indique que la roscovitine inhibe très probablement Pho85 en utilisant un mode de fixation similaire aux CDKs (CDK2 et CDK5) avec lesquelles elle a été co-cristallisée (De Azevedo *et al.*, 1997; Mapelli *et al.*, 2005).

A partir de cette dernière constatation, il est facile d'imaginer que là aussi le composé agit en tant que mimétique de l'ATP, bloquant ainsi son entrée dans le site catalytique de la kinase et par extension, la fixation d'un groupement phosphate sur les différents substrats. Cette hypothèse est validée par l'utilisation d'ATP libre dans le milieu réactionnel : dans ces conditions, des concentrations croissantes bloquent aussi la fixation de la cible sur la matrice indiquant que la drogue entre bien en compétition avec l'ATP.

Suite à ces observations effectuées *in vitro*, deux types d'expériences nous ont permis de valider, *in vivo*, l'inhibition de Pho85 par la (R)-roscovitine.

La première manipulation a été réalisée en exploitant les données de Hernan Espinoza en 1994 (Espinoza *et al.*, 1994) : alors que Pho85 est décrite comme étant une protéine non essentielle à la viabilité de *S. cerevisiae*, elle le devient lorsque les gènes des cyclines G1 Cln1 et Cln2 sont délétées. Nous avons donc utilisé une souche mutée pour les gènes codant ces deux cyclines : la souche CMY57, fournie par le Dr Carl Mann du CEA de Saclay, présente une délétion pour ces deux gènes (*cln1Δ*, *cln2Δ*).

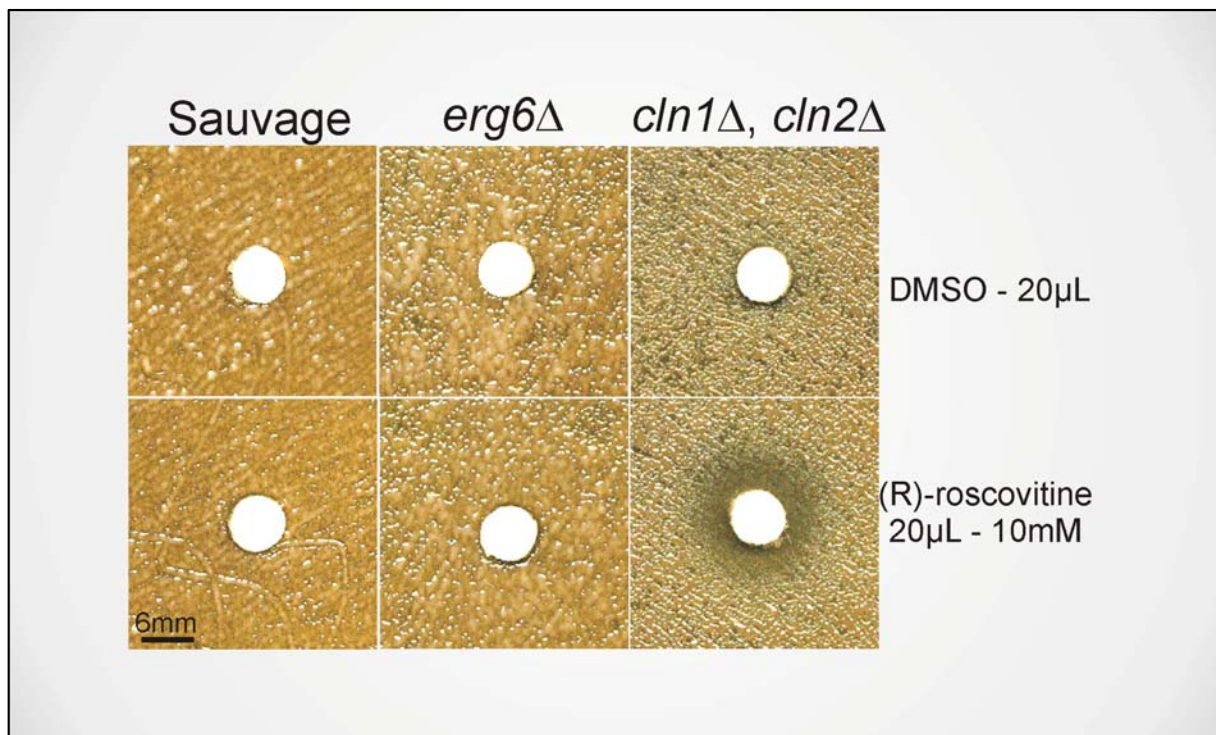


Figure 33 : Effet de la (R)-roscovitine sur une souche de levure dépendante de Pho85. La double mutation des cyclines Cln1 et Cln2 affecte le rôle central de Cdc28 au cours de la phase G1. Cela rend la protéine Pho85 essentielle à la viabilité de la cellule. Dans ce cas, l'utilisation de la roscovitine entraîne une inhibition de croissance qui n'est pas caractérisée dans une souche sauvage, même lorsque la perméabilité à la drogue est augmentée (souche *erg6Δ*).

Dans le cas où Pho85 est indispensable à la division des cellules, la (R)-roscovitine entraîne une inhibition de croissance marquée par une zone sombre dépourvue de cellules lors d'un test en halo (figure 35). Cela indique clairement que cette CDK de levure est inhibée par la drogue étudiée. Bien que le problème de perméabilité des levures à diverses molécules soit abordé plus loin dans ce manuscrit, il est intéressant de noter dès à présent que la souche ici utilisée est sensible à la drogue, sans même présenter de mutations affectant la perméabilité de la membrane cellulaire ni des systèmes de résistance aux drogues (systèmes PDR). Ceci sous-entend que même si une souche sauvage ne montre pas de sensibilité à la roscovitine, une certaine quantité de drogue semble pénétrer dans les cellules.

La seconde approche *in vivo* a été réalisée en tirant partie du fait que le complexe Pho85/Pho80 phosphoryle le facteur de transcription Pho4 et le maintient dans le cytoplasme. En suivant la localisation de ce substrat, nous pouvons ainsi déterminer, *in vivo*, le niveau d'activité de Pho85. Pour cela, nous avons mis en place au laboratoire la méthode décrite par Charles Kung en 2006 (Kung *et al.*, 2006). Erin O'Shea nous a fourni le plasmide EB0347 (Lau *et al.*, 1998) qui permet d'exprimer en levure le gène *PHO4* sous la dépendance de son propre promoteur. De plus, la protéine Pho4 exprimée est fusionnée à un tag GFP sur son extrémité N-terminale : cela permet de suivre sa localisation en microscopie à fluorescence.

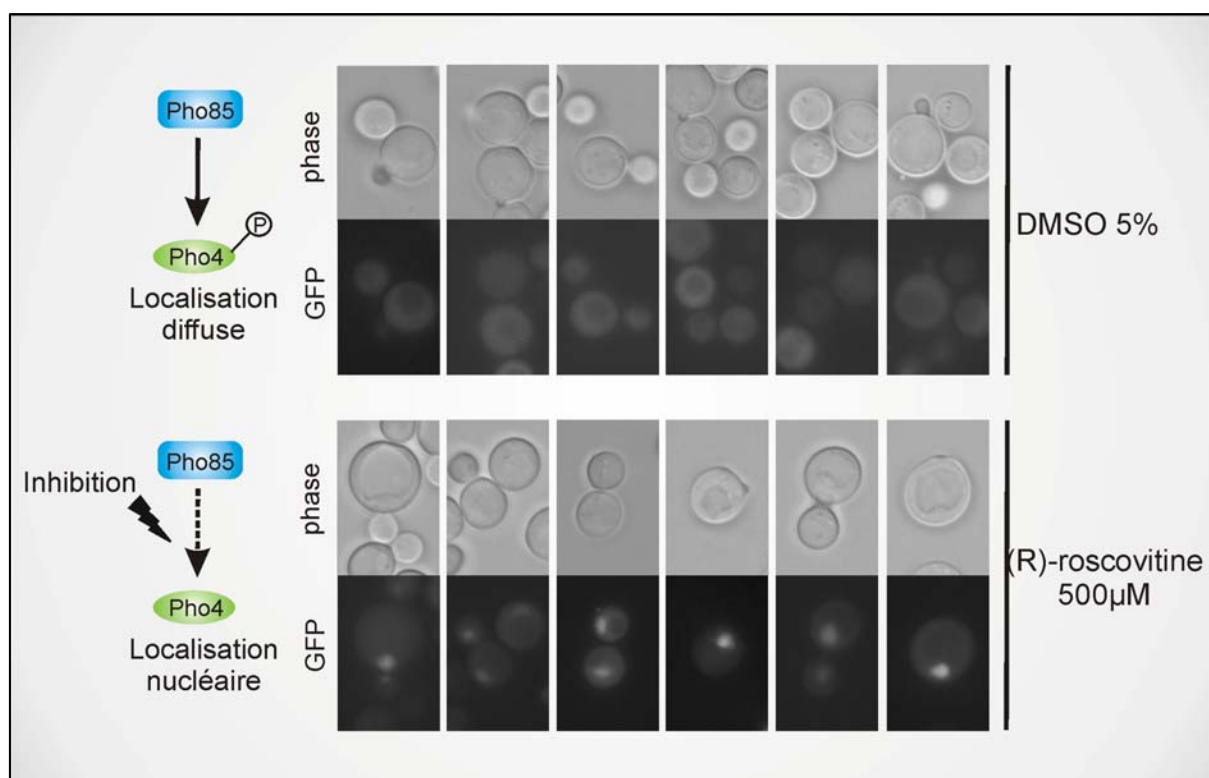


Figure 34 : Effet de la (R)-roscovitine sur la localisation du facteur de transcription Pho4. En présence de phosphate, lorsque Pho85 est active, elle maintient la protéine Pho4 sous sa forme phosphorylée ; cette dernière est alors maintenue inactive et exportée dans le cytoplasme. Le suivi de la localisation de Pho4-GFP en microscopie permet ainsi de déterminer le niveau d'activité de Pho85. La localisation nucléaire de Pho4-GFP dans la souche YRP1 transformée à l'aide du vecteur EB0347, en présence de roscovitine, indique que Pho85 est inhibée par la drogue.

La souche YRP1 (*erg6Δ*, *pdr5Δ*, *snq2Δ*) nous a été fournie par le Dr Karl Kuchler (Medical University of Vienna, Austria). Elle est utilisée pour ce test car elle montre une bonne sensibilité à la roscovitine. L'aspect de la sensibilité de la levure à diverses drogues est décrit plus loin dans ce manuscrit mais il convient de souligner dès à présent que l'intérêt de

cette souche réside dans le fait que la drogue peut pénétrer la cellule grâce à la déstabilisation de la membrane, cette dernière étant la conséquence de la mutation du gène *ERG6*. De plus, cette souche présente deux mutations pour les transporteurs Pdr5 et Snq2 : ces effecteurs du système PDR (Pleiotropic drug resistance) sont, avec d'autres transporteurs, responsables de l'efflux de drogues et leur mutation affecte la capacité des cellules à rejeter activement la molécule dans le milieu extérieur.

Afin de rendre cette expérience réalisable, la roscovitine a été solubilisée dans du DMSO de manière à avoir un pourcentage final de solvant de 5%. C'est donc dans ces conditions qu'a été réalisée l'expérience témoin (figure 36, panel du haut) : les cellules sont mises en cultures dans un milieu de croissance classique contenant du phosphate et permettant de maintenir le vecteur EB0347. A un instant *T*, le DMSO seul ou contenant la (R)-roscovitine est ajouté dans le milieu et les observations sont réalisées environ une heure plus tard.

Dans les conditions témoin, la fluorescence associée à la localisation de la protéine Pho4 montre que cette dernière est présente de manière ubiquitaire dans la cellule. Cette constatation indique donc qu'elle est inactive car phosphorylée par le complexe nucléaire Pho85/Pho80. La forme phosphorylée de Pho4 est en effet reconnue par le transporteur Msn5 et cela conduit à son exportation hors du noyau (Kaffman *et al.*, 1998). En présence de (R)-roscovitine (figure 36, panel du bas), on observe de nombreuses cellules présentant un marquage nucléaire. Pho85 semble être inhibée *in vivo* par la roscovitine, empêchant ainsi la phosphorylation de Pho4-GFP qui est alors accumulée dans le noyau. La forte concentration de drogue utilisée est sans doute à rapprocher de l'IC₅₀ relativement élevée de la (R)-roscovitine sur Pho85 (>60µM) en comparaison à celle obtenue sur son homologue CDK5 (<1µM).

Conclusion

Bien que cette CDK soit assez faiblement inhibée par la (R)-roscovitine, cette cible, homologue fonctionnel de CDK5, apporte la preuve que la levure peut être un système modèle permettant l'étude des cibles de composés à fort potentiel thérapeutique.

D'autre part, il faut souligner que nous avons ici un inhibiteur capable de cibler une CDK importante de la levure (Pho85) sans bloquer l'activité de la kinase majeure que représente Cdc28. De ce fait, la (R)-roscovitine peut être un bon outil pour les équipes de recherches intéressées par l'étude des mécanismes régulés à la fois par Pho85 et Cdc28 ou bien tout simplement dépendants de l'activité de Pho85 seule.

Hog1, une cible levurienne de la roscovitine

Description et fonction biologique

Produit du gène *HOG1* porté par le chromosome XII, cette protéine porte ce nom du fait de son implication dans la réponse au stress osmotique (HOG pour High Osmolarity Glycerol response). C'est une MAPK qui affecte, en réponse à une forte osmolarité du milieu, l'expression de gènes, la progression du cycle en phase G1 et G2 (voir « Introduction générale » et (Clotet & Posas, 2007)). Dans ces conditions de culture, la perte d'activité du gène entraîne des défauts de croissance ainsi que des modifications morphologiques des cellules. D'autre part, une activation constitutive de l'expression de ce gène est létale. La protéine Hog1 est l'homologue de la MAPK p38 qui, chez les mammifères, joue un rôle dans l'inflammation et les réponses au stress. Cette MAPK humaine est d'ailleurs une cible thérapeutique étudiée et des inhibiteurs (tels que le SB203580) sont en phase d'essais cliniques notamment comme anti-inflammatoire.

En conditions hyperosmotiques, Hog1 est le substrat de la MAPKK Pbs2 : elle est phosphorylée sur les résidus thréonine 174 et tyrosine 176 et importée dans le noyau. Une fois l'équilibre rétabli, diverses phosphatases enlèvent ces groupements phosphates provoquant son exportation dans le cytoplasme.

Lorsqu'elle est activée et localisée dans le noyau, elle module l'expression de près de 600 gènes par la phosphorylation de différents facteurs de transcription. Outre ces substrats, elle présente diverses cibles dont les régulateurs du cycle Sic1 et Hsl1 (voir « Introduction générale – Osmocheckpoints »).

Malgré les quelques modifications morphologiques citées plus haut concernant la délétion du gène *HOG1*, la protéine n'est pas essentielle hormis dans des conditions de croissance hyper-osmotiques. Ainsi, la délétion est décrite comme étant létale en présence de NaCl. Nous aurions voulu utiliser ces données afin de voir si une inhibition de Hog1 par la roscovitine entraînait le même phénotype mais la drogue, déjà très peu soluble en temps normal précipite en présence de sels dans le milieu de croissance. Bien que nous n'ayons pas pu utiliser ce genre d'approche, plusieurs autres expériences nous ont permis de prouver que Hog1 est bien inhibée par la roscovitine.

Validation de l'inhibition de Hog1 par la roscovitine

Afin de valider l'inhibition de Hog1 par la roscovitine, et plus particulièrement par la forme R, nous avons mis en place une collaboration avec le Dr. Monserrat Morillas et le Pr. Francesc Posas. Leur équipe, établie à Barcelone, travaille sur la transduction des signaux au sein de la cellule et plus particulièrement sur la réponse aux stress osmotiques. La protéine Hog1, sa régulation et ses rôles physiologiques sont au cœur de leurs recherches. Ils disposent de plusieurs tests, *in vitro* mais aussi *in vivo* pour suivre l'activité de cette MAPK. Ainsi, ils observent la capacité de Hog1 à phosphoryler différents substrats tel que Sic1 ou Hsl1 (Clotet *et al.*, 2006; Escote *et al.*, 2004). Dans le cas de notre approche, c'est l'action de Hog1 sur Sic1 qui a été étudiée : la MAPK, fusionnée à un tag poly-histidine, est produite en bactérie, tout comme le substrat Sic1 qui lui est fusionné à un tag GST. Environ 1µg de Hog1 et Sic1 sont incubés ensemble et en présence d'ATP. La liaison entre les deux protéines et la réaction de phosphorylation sont suivies par Western blot en utilisant un anticorps phosphospécifique.

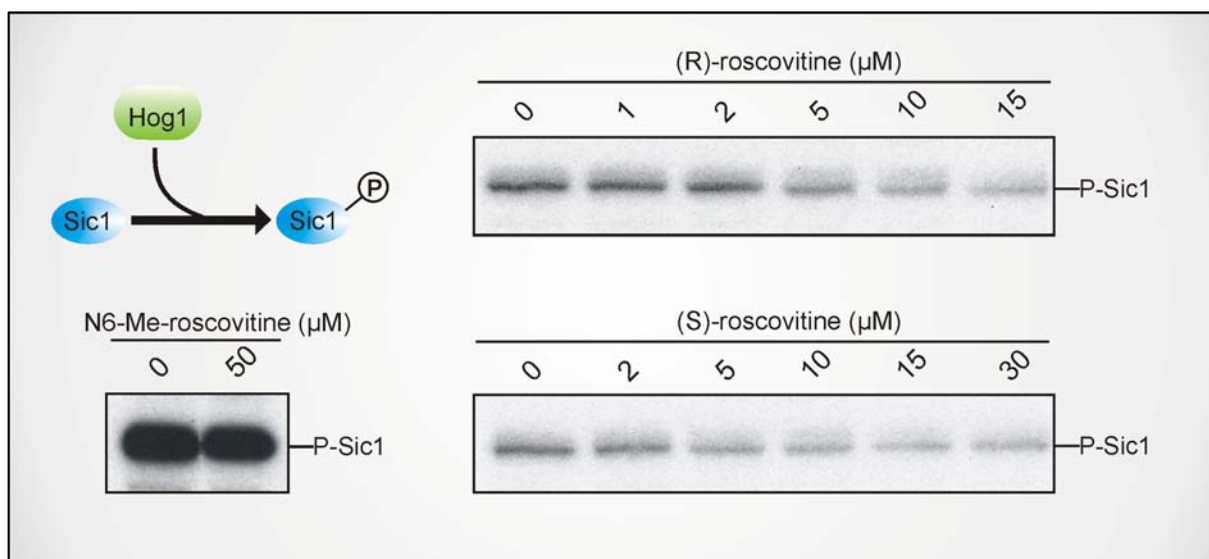


Figure 35 : Activité de Hog1 en présence de (R) et (S)-roscovitine. La phosphorylation de Sic1 est le reflet de l'activité kinase de Hog1. En présence de doses croissantes des deux énantiomères, on observe une diminution de la phosphorylation du substrat Sic1. Cette dernière est observée à l'aide d'un anticorps phospho-spécifique. Le composé contrôle (N6-méthyl-roscovitine) est utilisé à une concentration largement supérieure aux deux autres molécules : ce composé est inactif sur Hog1.

L'approche *in vitro* de la phosphorylation de Sic1 montre un effet inhibiteur des deux formes de la roscovitine sur Hog1 (figure 30). En effet, la quantité de substrat phosphorylé est inversement proportionnelle à la concentration de drogue utilisée. Toutefois, des différences sont à noter entre les deux énantiomères : il faut utiliser des concentrations plus fortes de (S)-roscovitine pour observer des effets comparables à ceux de la (R)-roscovitine. Alors qu'une concentration de 15μM suffit pour observer un effet inhibiteur de la (R)-roscovitine, il faut utiliser deux fois plus de (S)-roscovitine pour observer une inhibition similaire en comparaison avec les conditions sans drogues.

Cette expérience a aussi été réalisée avec la N6-méthyl-roscovitine. Cet analogue, inactif sur les cibles de la roscovitine, l'est également sur Hog1 : utilisé à une forte concentration (50μM), l'état de phosphorylation de Sic1 reste inchangé par rapport à celui qui est obtenu sans aucun inhibiteur. Cette donnée indique que l'inhibiteur se fixerait sur Hog1 de la même manière qu'il le fait sur des cibles telles que les CDKs (en particulier CDK2 et CDK5 humaines avec lesquelles il a été co-cristallisé).

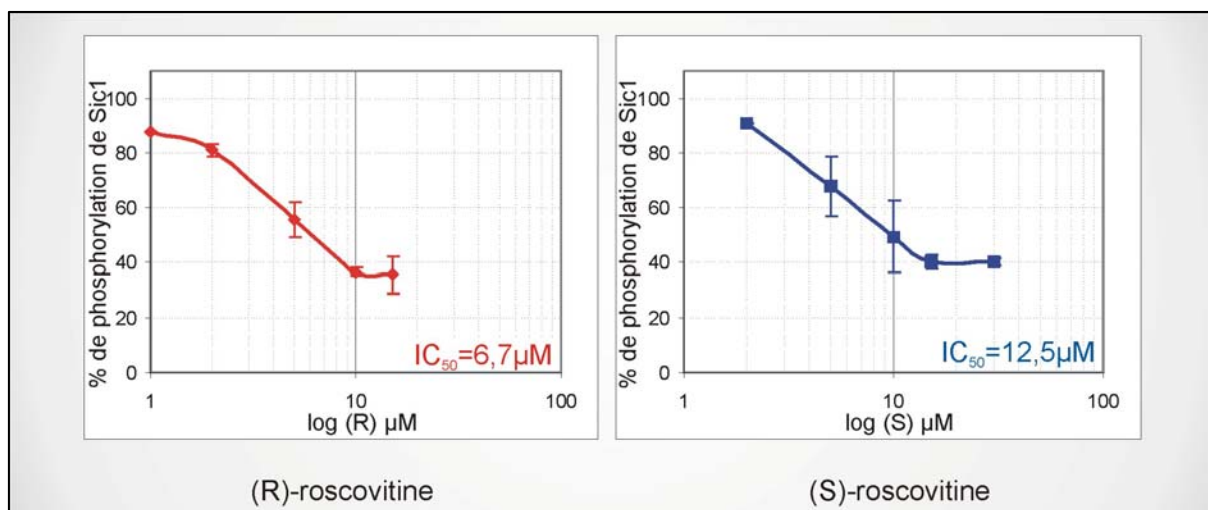


Figure 36 : Détermination de l' IC_{50} des deux énantiomères de la roscovitine sur Hog1. Le pourcentage de phosphorylation de Sic1, ici exprimé, reflète le pourcentage d'activité de la MAPK Hog1. Il est donné en fonction de la concentration de drogue utilisée (ici notée en log) et permet de déterminer l' IC_{50} de la (R) et de la (S)-roscovitine sur Hog1. Ces valeurs sont respectivement de 6,7 μ M et 12,5 μ M.

Un test d'activité kinase, *in vitro*, a permis de quantifier le pourcentage de phosphorylation du substrat Sic1. Ces valeurs reflètent la capacité de Hog1 à phosphoryler un substrat en présence de l'inhibiteur et ceci à différentes concentrations. Le substrat purifié est mis en présence de Hog1 et de 32 P-ATP ; la kinase est activée par la MAPKK Pbs2.

Exprimées en fonction de la concentration de drogue utilisée, ces valeurs permettent de déterminer l' IC_{50} des deux énantiomères (voir figure 31). La (R)-roscovitine, avec une IC_{50} de 6,7 μ M, est environ deux fois plus efficace que la (S), en accord avec ce qui a été observé dans l'expérience précédente (figure 30). Ces deux observations indiquent une fois de plus que la (R)-roscovitine semble, de manière générale, être plus efficace sur Hog1 que la (S)-roscovitine. Nous pouvons aussi émettre l'hypothèse suivante : l'inhibition de croissance constatée lors des tests en halo (figure 28) est plus importante en présence de (R)-roscovitine. Cette observation est peut-être due, au moins en partie, à un effet inhibiteur plus important de cet énantiomère sur la cible considérée ou sur un ensemble de cible qui comprend Hog1.

La fixation d'une cible sur la matrice d'inhibiteur peut se faire de manière non-spécifique (par exemple en se liant au bras espaceur). Afin de le vérifier, mais aussi d'appréhender le mode de fixation de l'inhibiteur sur la cible, nous avons réalisé des expériences de compétitions comme pour la cible Pho85.

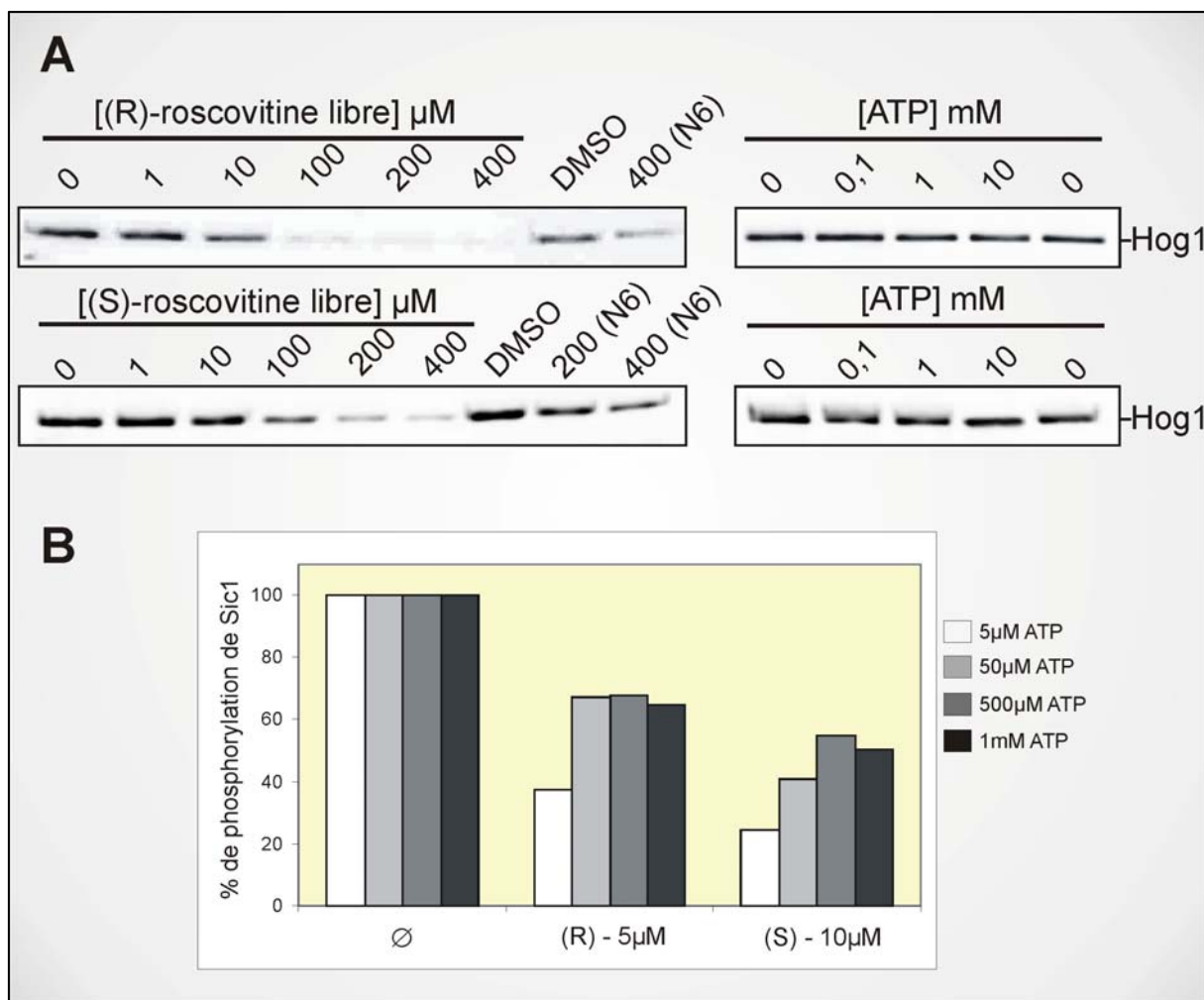


Figure 37 : Validation de la spécificité de la cible Hog1 et de son mode de fixation par compétition. **A**, Une chromatographie d'affinité sur billes de (R) ou de (S)-roscovitine est réalisée en présence de concentrations croissantes de drogue libre ou d'ATP. La fixation d'Hog1 sur les billes est suivie à l'aide d'un anticorps dirigé contre cette protéine. **B**, La phosphorylation du substrat Sic1 est observée en présence des deux énantiomères de roscovitine (à des concentrations proches de leur IC_{50}) et de concentrations croissantes d'ATP : les résultats sont exprimés en pourcentages de phosphorylation de Sic1.

Comme pour la cible Pho85, des compétitions ont été réalisées afin d'étudier la fixation de la roscovitine sur Hog1. Dans un premier temps, cette expérience a été réalisée au laboratoire (figure 32, panel A). Des concentrations croissantes de (R) ou de (S)-roscovitine empêchent la fixation de Hog1 sur la matrice. La concentration la plus élevée utilisée au cours de cette manipulation est de 400 μM et on constate que le composé contrôle (N6-méthyl-roscovitine) à cette même concentration n'affecte que très peu la fixation de la cible sur la matrice. Ces deux observations, associées à l'absence d'inhibition par la N6-méthyl-roscovitine (figure 30), permettent de conclure que la liaison formée entre Hog1 et la (R)-roscovitine au cours d'une chromatographie d'affinité est bien spécifique et qu'elle se fait de

la même manière qu'avec d'autres cibles (cas de CDK2 et CDK5 avec lesquelles la roscovitine a été co-cristallisée (De Azevedo *et al.*, 1997; Mapelli *et al.*, 2005)).

En présence d'ATP à des concentrations croissantes dans le milieu, il n'est pas possible d'observer une diminution de la fixation de Hog1 sur les matrices. Cela pourrait suggérer que la roscovitine ne se fixe pas au niveau de la poche à ATP de Hog1. Ce résultat surprenant peut être une conséquence d'un problème lié au type d'approche (trop forte concentration d'Hog1, meilleure affinité pour la roscovitine que pour l'ATP, etc...). Cela nous a donc amené à aborder le problème d'une autre manière, ceci grâce aux outils dont disposent Francesc Posas et Montserrat Morillas (figure 37, panel B).

Comme dans les expériences précédentes, la phosphorylation de Sic1 est le paramètre permettant d'appréhender l'activité de la MAPK en présence de drogue. Ceci a été réalisé en présence des deux énantiomères (R) et (S) de la roscovitine à des concentrations proches de leur IC₅₀ (respectivement 5 et 10µM). La phosphorylation du substrat, suivie par un test d'activité kinase (figure 37, panel B), est réalisée avec différentes concentrations d'ATP. On constate, en présence des drogues, que plus il y a d'ATP dans le milieu, plus le substrat est phosphorylé. Cela indique que l'activité de Hog1 est de moins en moins inhibée par la roscovitine en présence de quantités croissantes d'ATP. Ceci suggère alors que la kinase se lie à l'ATP au détriment des drogues. Nous sommes là en présence de deux résultats un peu contradictoires. Malgré tout, Hog1 étant une MAPK, il est fort probable que la roscovitine agisse en se fixant dans la poche à ATP afin de bloquer l'activité kinase de la protéine, comme cela a été décrit et reconnu pour plusieurs autres cibles. Cette hypothèse mériterait d'être validée par diverses approches : la plus efficace serait bien évidemment de co-cristalliser Hog1 avec la roscovitine mais n'ayant pas encore été cristallisée, cette approche est bien évidemment coûteuse en temps.

Conclusion

Ces diverses approches nous permettent de valider l'inhibition de Hog1 par les deux énantiomères de la roscovitine, la forme (R) étant la plus efficace. A notre connaissance, peu de composés ciblent spécifiquement la MAPK humaine p38. Parmi eux, nous pouvons citer les molécules SB202190, SB203580 et SB220025 : ces composés, en particulier le premier,

semblent inhiber Hog1. Alors qu'elle inhibe peu la MAPK humaine, la roscovitine apparaît donc comme un nouvel outil pour les levuristes intéressés par la régulation de la voie de signalisation Hog1.

Utilisation de la levure dans l'étude de la sélectivité de la roscovitine : les problèmes de perméabilité cellulaire

Notre organisme modèle est un eucaryote. Malgré tout, quelques différences font de la levure un modèle présentant des particularités qui ne sont pas à négliger : parmi elles, la présence d'une paroi : associée à la membrane plasmique, elle confère à la levure une perméabilité limitée à beaucoup de molécules. La levure est ainsi en partie protégée des agressions extérieures grâce à la présence de cette double protection.

D'autre part, les levures possèdent un système de résistance aux drogues auxquelles elles pourraient être exposées : le système PDR (pour Pleiotropic Drug Resistance). Ce système est l'homologue du système MDR (Multi-drug Resistance) des eucaryotes supérieurs.

Lors de l'étude de la sélectivité de la roscovitine, l'approche par chromatographie d'affinité se faisant sur des lysats de levure, on s'est affranchi de ces problèmes. Concernant la mise en place d'un crible génétique, il fallait considérer ces limites afin d'utiliser des souches de levures qui soient sensibles à la drogue.

La sensibilité de différents mutants

La mutation du gène ERG6

La faible perméabilité des levures à différentes petites molécules est en partie due à la présence de l'ergostérol (équivalent du cholestérol des eucaryotes supérieurs) qui est un des constituant majoritaire de leur membrane. La biosynthèse de ces lipides découle d'une cascade métabolique impliquant les gènes *ERG* (au nombre de 29). Le gène *ERG6* code pour une stérol méthyltransférase impliquée dans les étapes ultimes de la biosynthèse de l'ergostérol et sa délétion a souvent été décrite comme augmentant la perméabilité des cellules de levures (Bach *et al.*, 2003; Bach *et al.*, 2006b).

Lors des premiers essais de sensibilité de la levure à la roscovitine, nous avons constaté que nous étions aussi confrontés à ce problème de perméabilité. En effet, l'approche de la sensibilité par le test en halo ne montrait aucun changement visible de la croissance des

levures excepté dans le cas d'une mutation du gène *ERG6* (souche *erg6::TRP1*) où un petit halo de non-croissance (zone sombre dépourvue de cellules) était visible (figure 28).

Cette première observation a été faite à l'aide d'un fond génétique dit « exotique » différent du fond S288c couramment utilisé par les levuristes. Les souches *Strong* et *Strg6* (*erg6Δ*), issues du fond 74-D694 ont été utilisées afin de mettre en place un criblage dans le but d'isoler des drogues antiprions (Bach *et al.*, 2003). Ces souches, qui présentent un phénotype [*PSI*+], contiennent la protéine Sup35p sous une forme agrégée. C'est une forme prion qui apparaît suite à une inactivation autocatalytique de la protéine ; elle devient alors insoluble. Afin de nous assurer que la sensibilité à la roscovitrine n'était pas une conséquence de cette prionisation, nous avons traité ces souches au Chlorure de Guanidium (GuHCl) : ce traitement permet de faire disparaître cette forme agrégée de Sup35p et ainsi d'obtenir un phénotype [*psi*-], caractérisé par la couleur rouge des colonies de levures. Cette souche un peu plus « classique » présente une sensibilité identique, voire plus forte, à la drogue (figure 38, panel A). Cela suggère une interférence possible entre la sensibilité à la roscovitrine et l'état [*PSI*+]
ou [*psi*]-. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé une expérience de chromatographie d'affinité sur billes de (R)-roscovitrine. La comparaison des profils de sélectivité de la drogue sur ces deux souches montre qu'elles présentent deux profils rigoureusement identiques (panel B).

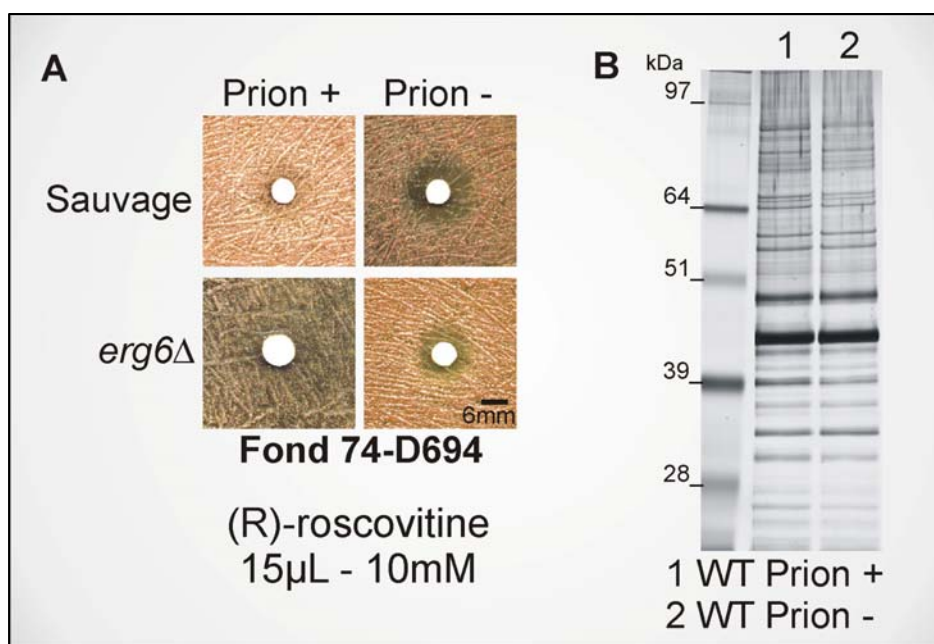


Figure 38 : Conséquence de la forme prion de la protéine Sup35p sur l'effet (**panel A**) et la sélectivité (**panel B**) de la roscovitrine. **A**, la forme prion (phénotype [*PSI*+]) n'est pas responsable de l'effet de la drogue sur la croissance des cellules. **B**, les protéines qui se fixent à la drogue restent les mêmes, que la protéine Sup35p soit sous sa forme agrégée ou non.

En ne considérant que cet aspect de la perméabilité de la levure, la souche Strg6 présentant le phénotype [*psi*-] apparaissait alors comme un outil envisageable pour notre approche génétique.

Comme il a été signalé plus haut, ce fond génétique (74-D694) est peu utilisé par la communauté des levuristes. Nous avons donc souhaité nous servir de souches plus communes telles que les souches K699 (fond génétique W303) ou encore BY4741 (dérivée du fond S288c, le plus répandu dans la littérature). Les levures du fond génétique W303, même lorsqu'elles sont mutées pour le gène *ERG6*, ne présentent aucun défaut de croissance (résultats non montrés). Concernant la souche BY4741, elle présente une très légère sensibilité, plus faible que celle de Strg6, lorsque sa membrane est déstabilisée par l'absence d'Erg6 (figure 39 et figure 40, panel A).

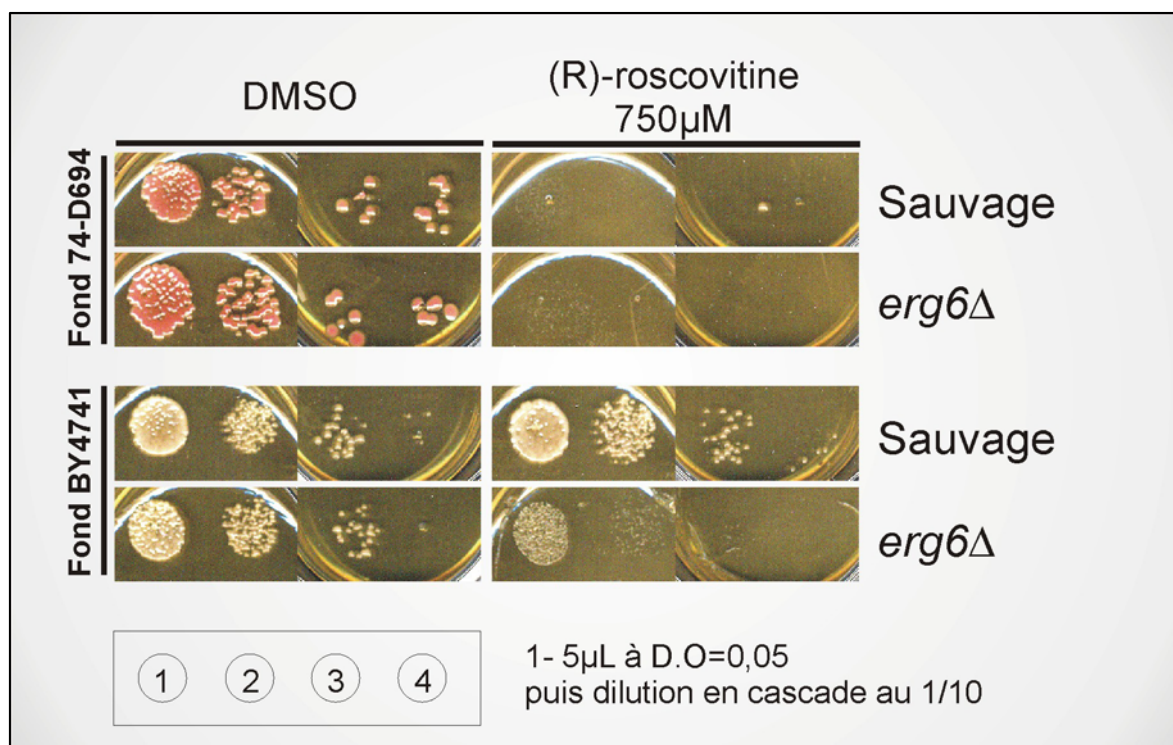


Figure 39 : Conséquences de la mutation *erg6Δ* dans différents fonds génétiques. Les levures *erg6Δ*, lorsqu'elles sont traitées à la roscovitine montrent un défaut de croissance. L'impact du traitement diffère en fonction du fond génétique considéré.

Il faut noter, suite à l'observation des figures 39 et 40, que le phénotype de croissance est différent entre la technique de test en halo et de test en goutte. En effet, dans le cas des tests en goutte, la drogue est présente dans le milieu de culture, ce qui lui assure une meilleure

répartition dans ce dernier. Concernant les tests en halo, la drogue doit diffuser dans un milieu déjà solidifié et cette diffusion dépend aussi de l'épaisseur de la gélose dans la boîte utilisée : plus on s'éloigne du filtre où est déposé la drogue, plus sa concentration dans le milieu diminue. Cela explique la sensibilité apparemment plus forte en présence de roscovitine à 750µM dans le milieu par rapport à la diffusion de 15µL de drogue à 10mM.

Les mutants du système PDR

Le phénomène de résistance aux drogues est un problème rencontré dans le traitement chimiothérapique de cancers mais aussi d'infections bactériennes ou fongiques. Le mécanisme majoritairement responsable de ces résistances est régi par le système MDR (pour Multi-drug Resistance) dont les effecteurs sont des transporteurs membranaires de la famille des ABC transporteurs qui permettent un efflux des drogues. Chez *S. cerevisiae*, ce système existe aussi et il correspond à deux réseaux de gènes qui agissent ensemble : les gènes *PDR* et *YAP*. Les gènes les plus impliqués dans ces phénomènes sont ceux du système MDR. A sa base, *PDR1* et *PDR3* codent pour des facteurs de transcription régulant l'expression d'autres gènes *PDR* codant eux-mêmes pour des pompes à efflux (Kolaczowska & Goffeau, 1999). Le génome de la levure code pour 22 transporteurs potentiels de ce type parmi lesquels Pdr5p, Yor1p, Snq2p et Ycf1p. Ces quatre transporteurs permettent à la levure de se protéger d'une grande variété de drogues ; lorsqu'ils sont surexprimés, la cellule présente une résistance accrue à ces mêmes drogues (Emter *et al.*, 2002).

Dans la littérature, il a été relaté à plusieurs reprises que des mutations de ces gènes permettaient d'augmenter la sensibilité à divers types de molécules. Ainsi, la double mutation *pdr1Δ-pdr3Δ*, en déstabilisant tout le système PDR, est responsable dans certains cas d'une réponse plus forte à un traitement chimique. Ainsi, une étude a montré que sur une banque de plus de 70000 composés, 4,1% d'entre eux entraînaient un défaut de croissance dans une souche *pdr1Δ-pdr3Δ* alors que seuls 2,7% de ces mêmes molécules causaient les mêmes effets sur une souche sauvage (Colas, 2008).

De la même manière, la double délétion des gènes *PDR16* et *PDR17* affecte la synthèse des lipides membranaires et augmente la diffusion passive à travers la membrane (van den Hazel *et al.*, 1999).

La mutation du gène *PDR5* permet à elle seule d'augmenter la sensibilité à certaines drogues. Cette sensibilité n'est pas aussi marquée que celle d'un mutant *erg6Δ*, mais des

travaux ont montré que ces deux mutations avaient des effets indépendants et additifs (Emter *et al.*, 2002). Enfin, plusieurs travaux sur la levure utilisaient la souche YRP1 triplement mutée pour les *ERG6*, *PDR5* et *SNQ2* (Gray *et al.*, 1998; Kung *et al.*, 2006). La stratégie de ce mutant est de permettre l'entrée des drogues par le biais de la mutation *erg6Δ* mais aussi d'en limiter la sortie par les pompes à efflux codées par *PDR5* et *SNQ2*, d'où un effet additif.

C'est sur ces données bibliographiques que nous avons essayé de comparer plusieurs souches entre elles afin de déterminer celle qui serait la plus sensible à la (R)-roscovitine.

Au vu des résultats obtenus dès les premiers tests, nous savions que la mutation *erg6Δ* devait être un paramètre constant dans les cellules dont nous voulions augmenter la sensibilité. En effet, bien que le système d'efflux d'une drogue soit problématique, il ne peut poser de problèmes que si la drogue a pu pénétrer auparavant dans les cellules.

Nous avons donc décidé de tenter dans un premier temps les combinaisons de délétions suivantes : *erg6Δ*, *erg6Δ-pdr1Δ*, *erg6Δ-pdr3Δ* et *erg6Δ-pdr1Δ-pdr3Δ*. Les doubles mutants obtenus n'ont pas présenté de sensibilité accrue à la roscovitine (résultats non montrés) et malgré diverses approches, la triple délétion n'a pas réussi à être effectuée dans les différentes souches de levures que nous avons utilisées.

Par ailleurs, nous avons obtenu une série de mutants : *erg6Δ*, *pdr5Δ* et *erg6Δ-pdr5Δ* dans le fond génétique BY à la suite de la sporulation d'une souche diploïde BY4743 (dérivée du fond S288c et identique à BY4741). Chacun des simples mutants montre une bonne sensibilité à la cycloheximide comme le relate Emter *et al.* (Emter *et al.*, 2002). Toutefois, avec le fond génétique que nous avons utilisé, cette sensibilité n'est pas augmentée par la double mutation *erg6Δ-pdr5Δ*. D'autre part, ce fond génétique, quelques soient les mutations qu'il présente, ne montre aucune sensibilité à la roscovitine par l'approche du test en halo (figure 40, panel A).

Enfin, nous nous sommes procuré la souche YRP1 (*erg6Δ-pdr5Δ-snq2Δ*), citée précédemment, auprès du laboratoire de Karl Kuchler (Medical University, Vienna). Cette souche, aussi dérivée du fond génétique S288c, est mutée pour *ERG6*, mais aussi *PDR5* et *SNQ2*. C'est finalement elle qui a montré, au cours des différents essais, la plus grande sensibilité de croissance à la roscovitine (figure 40, panel B).

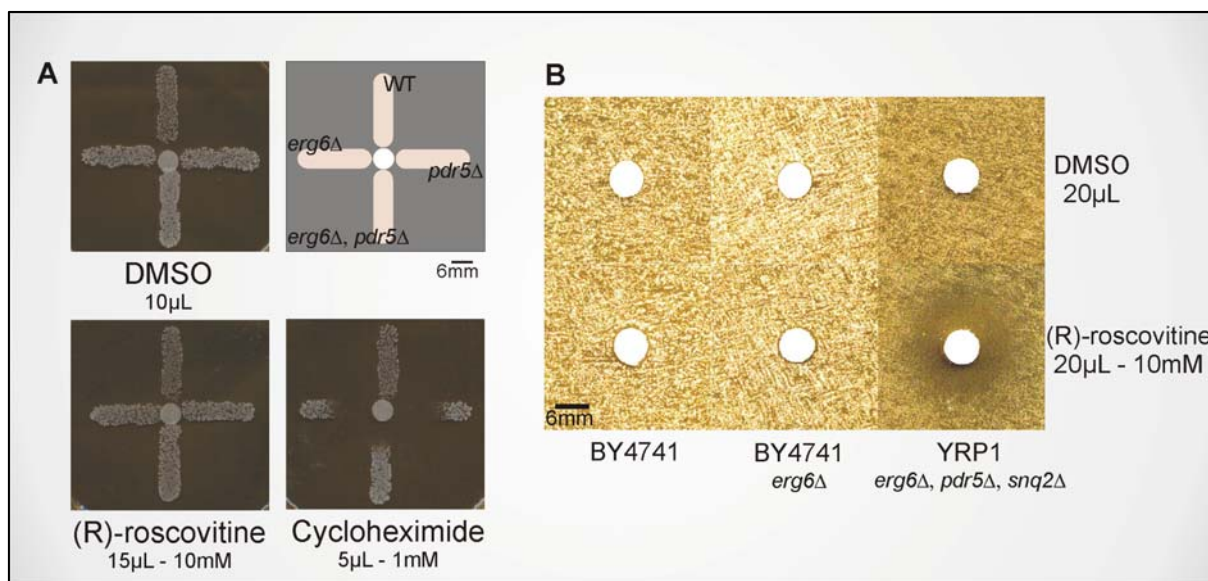


Figure 40 : Conséquences des mutations de certains gènes du système PDR. Plusieurs délétions simultanées peuvent agir en synergie et augmenter la sensibilité des levures à une drogue. **A**, concernant la roscovitine, la délétion simultanée de *ERG6* et *PDR5* ne suffit pas à augmenter la sensibilité à la drogue. **B**, une troisième délétion, celle du gène *SNQ2* dans la souche YRP1, permet d'obtenir à partir d'une souche viable, une sensibilité maximum à l'inhibiteur étudié.

La sensibilité de différents fonds génétiques

Au-delà des différents mutants que nous avons testés, nous avons eu l'occasion d'utiliser des souches provenant de différents fonds génétiques et de comparer nos observations à celles décrites dans la littérature. La simple constatation que la sensibilité à la roscovitine varie en fonction des fonds génétiques considérés suffit à conclure que ce paramètre doit être suivi de près, en plus des éventuelles mutations qui permettent de diminuer la résistance à une drogue étudiée.

Cette observation soulève la question suivante : les cibles d'une drogue sont-elles les mêmes d'un fond génétique à un autre ? Pour y répondre, nous avons comparé le profil de sélectivité des formes (R) et (S) de la roscovitine après chromatographie d'affinité, et ceci sur les fonds génétiques cités précédemment (74-D694, W303 et BY4741) (figure 41).

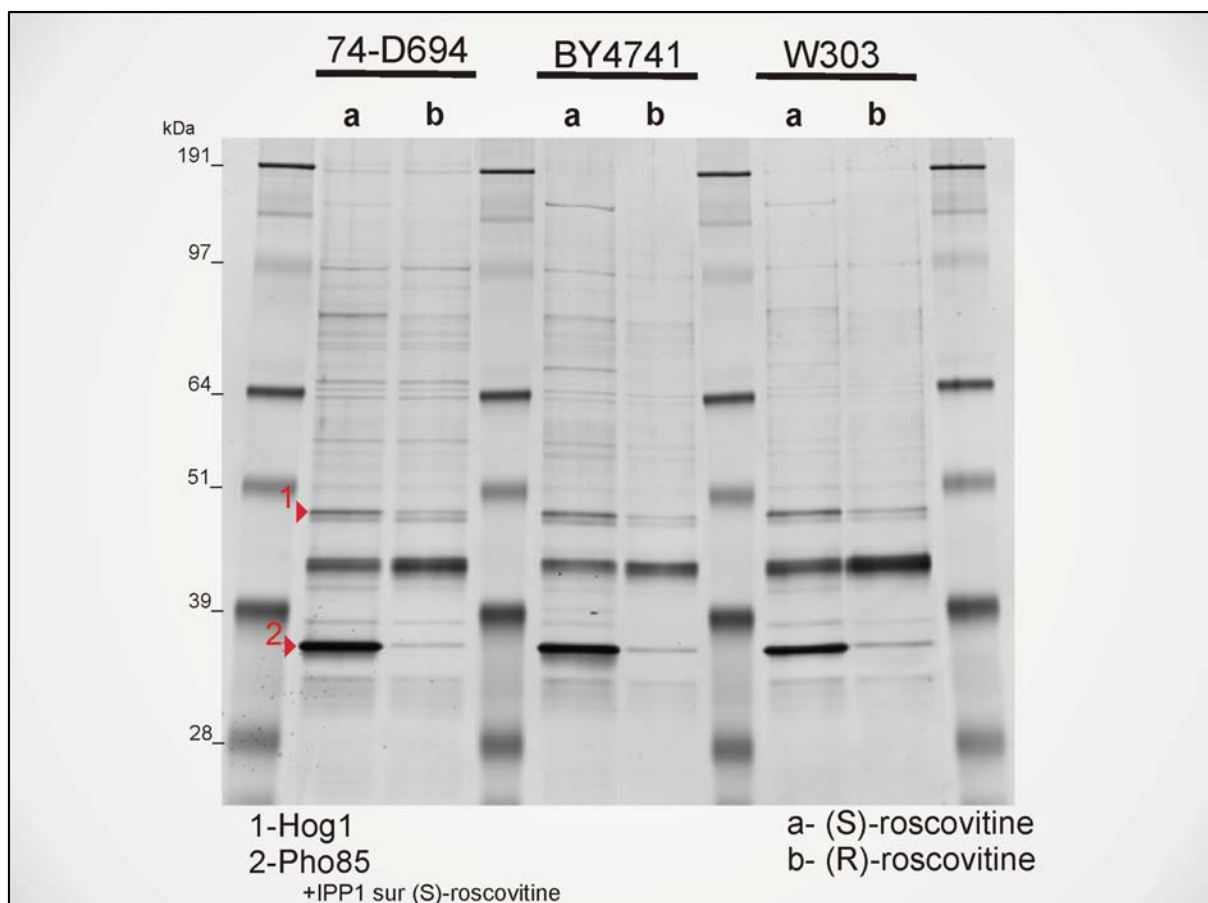


Figure 41 : Comparaison du profil de sélectivité des énantiomères de la roscovitine sur différents lysats de levure. Trois fonds génétiques présentant des sensibilités différentes aux deux drogues sont utilisés pour cette chromatographie d'affinité. En utilisant 3mg de protéines totales, les profils de sélectivité semblent rester les mêmes d'un fond génétique à l'autre.

Bien que l'intensité de quelques bandes varie très légèrement d'un fond génétique à l'autre, les profils de sélectivité obtenus semblent être identiques et cela indique que le fond génétique testé n'est pas un frein à l'utilisation de la levure pour déterminer les cibles d'une drogue : les différences entre fonds génétiques concernent l'import et le rejet des drogues ; la nature des protéines ciblées par la roscovitine est inchangée.

Conclusion

La littérature décrit de nombreuses possibilités pour augmenter la sensibilité d'une souche de levure à une famille de composés chimiques. Ces observations peuvent être valables pour certains composés et ne pas l'être pour d'autres. Nous avons pu illustrer ces propos en utilisant la roscovitine sur différentes souches. Dans le cadre de notre étude, afin de mettre en place une approche de l'étude de la sélectivité, nous devons trouver une souche

viable malgré les délétions qu'elle présente et montrant un défaut de croissance en présence de notre drogue d'intérêt. Pour cette raison, la souche YRP1 semble la plus appropriée pour une approche génétique.

Conclusions et perspectives

La roscovitine, un nouvel outil pour l'étude des mécanismes régulés par Pho85 et Hog1

La première conclusion qui ressort des résultats présentés ici est que nous avons mis en évidence que la roscovitine est un inhibiteur spécifique de deux cibles d'intérêt chez la levure.

D'une part, notre molécule d'intérêt apparait comme étant un nouvel outil pour l'étude d'Hog1. La MAPK humaine p38 est l'homologue de cette protéine et elle est impliquée dans diverses pathologies. Au cours de l'introduction générale de ce manuscrit, le fait que la levure soit un organisme modèle pour l'étude de diverses maladies a été abordé. Nous pouvons alors imaginer que lors de l'étude de ces diverses pathologies, la roscovitine puisse être un outil pertinent.

D'autre part, Pho85 est une protéine kinase présentant diverses fonctions et elle est un modèle très important pour l'étude du cycle cellulaire ainsi que pour d'autres processus biologiques (Huang *et al.*, 2007). Comme il a déjà été signalé, Pho85 associée à certaines cyclines régule le déroulement de la phase G1 du cycle cellulaire. Certains de ses substrats sont aussi phosphorylés par la protéine kinase Cdc28 associée à ses cyclines de type Cln (cyclines de la phase G1). Nous sommes donc ici en présence d'un inhibiteur qui ne cible qu'une seule de ces deux CDKs de levure. A notre connaissance, aucune molécule n'a été à ce jour décrite comme étant capable d'inhiber une de ces deux cibles et pas l'autre. Dans certains cas, il arrive qu'un composé puisse inhiber fortement Cdc28 et plus faiblement Pho85 *in vitro*, c'est le cas du GW297361 (Kung *et al.*, 2006). Le problème de ce genre de molécule est

d'avoir des effets *in vivo* inverses : en effet, comme le montre l'étude de Charles Kung, une inhibition partielle de Pho85 peut être suffisante pour déclencher les voies de signalisation qui sont sous sa dépendance alors qu'une inhibition partielle de Cdc28 n'entraîne pas nécessairement de blocage du cycle cellulaire. La (R)-roscovitine peut donc pallier à ce genre de problème en n'inhibant qu'une seule de ces deux CDKs.

De la même manière, nous avons vu qu'en conditions de stress osmotique, Hog1 bloquait le cycle cellulaire en phase G1 via Cdc28. L'utilisation de la roscovitine peut aussi, dans ce genre de contexte, devenir un outil important car il est sélectif de cette MAPK sans inhiber Cdc28.

D'autres cibles à valider

L'identification de diverses cibles potentielles, suite à la chromatographie d'affinité, nous a montré que des protéines, autres que Hog1 et Pho85, semblaient se fixer sur l'inhibiteur. Chacune de ces cibles mériterait elle aussi une validation de leur inhibition par la drogue et/ou leur identification par une autre méthode d'étude de sélectivité.

Dans un premier temps, la MAPK Fus3 mériterait que l'on s'y intéresse car il s'agit d'une autre protéine kinase. Bien qu'elle agisse dans le phénomène de conjugaison et qu'elle ne présente pas de rôle manifeste au cours d'un cycle de division « classique », là encore, la roscovitine pourrait devenir un outil utile dans l'étude fondamentale des mécanismes biologiques dans lesquels elle est impliquée.

Inhibition de croissance : conséquence de l'inhibition de plusieurs cibles

Toutes les cibles potentielles identifiées en spectrométrie de masse sont des protéines non essentielles à la viabilité de la cellule. Or l'effet inhibiteur de la roscovitine, et plus particulièrement celui de sa forme (R), entraîne une inhibition de croissance qui, si elle est faible, n'en demeure pas moins réelle, au moins dans certains contextes génétiques. Nous pouvons donc conclure que cet effet est la conséquence d'une inhibition simultanée de plusieurs cibles au sein de l'organisme utilisé. Suite à la validation des cibles Hog1 et Pho85, il semblerait que l'inhibition simultanée de ces deux protéines ne soit pas la cause du blocage

de la croissance cellulaire, ou du moins qu'elle ne suffise pas pour donner le phénotype observé. En effet, la délétion des deux gènes *HOG1* et *PHO85* est viable (Tong *et al.*, 2004). Il faut garder à l'esprit que l'inhibition chimique d'une cible peut entraîner un phénotype sensiblement différent de celui qui est généré par la délétion du gène de cette cible (Knight & Shokat, 2007) : la délétion d'un gène entraîne une suppression totale de la protéine alors que l'inhibition chimique de celle-ci n'est rarement totale.

La validation ou même la découverte d'autres cibles, pourraient apporter un intérêt certain dans l'explication du faible défaut de croissance observé lors des tests en halo. Il serait intéressant de déterminer le nombre de cibles inhibées simultanément qui sont à l'origine du phénotype. Il faut également déterminer la nature des cibles inhibées afin de pouvoir éventuellement mettre en évidence des interactions génétiques jusque là non décrites.

Utilisation de la levure : une idée globale du niveau de sélectivité d'un composé

La simplicité de la culture des levures ainsi que l'obtention rapide d'une grande quantité de lysat protéique permet dans un premier temps d'avoir une idée générale de la sélectivité d'un composé. Pour cela, l'aide des chimistes est un point majeur de cette étude. En effet, c'est grâce à leurs compétences que nous disposons des composés présentant le bras qui permet de les greffer sur une matrice. Les « billes d'inhibiteurs » peuvent alors être réalisées par nos soins avant de réaliser différentes expériences de chromatographie d'affinité sur billes d'inhibiteurs immobilisés.

Même si les cibles levuriennes d'un composé ne correspondent pas exactement à celles qui pourraient être identifiées dans des cellules eucaryotes supérieures, l'utilisation de *S. cerevisiae* permet très rapidement d'appréhender de manière globale le nombre de protéines liées à la drogue étudiée : les cibles potentielles retenues étant plus ou moins nombreuses, une première estimation du niveau de sélectivité peut être réalisée.

Dans certains cas, comme nous l'avons montré à plusieurs reprises, certaines protéines homologues des cibles identifiées s'avèrent être elles-mêmes inhibées par le composé d'intérêt. Associé au fait que la levure soit beaucoup plus facilement abordable que les cellules d'eucaryotes supérieurs d'un point de vue expérimental, cette observation est un

argument majeur en faveur de l'utilisation de cet eucaryote unicellulaire comme modèle d'étude.

Mise en place d'un crible génétique

Au-delà de ces premières observations, la perspective la plus importante suite à la réalisation de ce travail est la mise en place d'un crible génétique. En effet, chacune des méthodes permettant une étude de sélectivité présente des avantages et des inconvénients. Elles ont toutes un risque de faux-positifs et de faux-négatifs qui leur est propre. Par exemple, toutes les techniques qui utilisent une drogue sur laquelle est fixé un bras, présentent le risque de manquer des cibles potentielles dont la présence du bras empêche la fixation. Aucune de ces approches ne représente la technique idéale qui permettra d'avoir une connaissance exhaustive des cibles d'un inhibiteur. Il faut donc essayer, dans la mesure du possible, d'associer les données obtenues par la réalisation d'au moins deux d'entre elles. Dans notre cas, il apparaissait logique d'associer la chromatographie d'affinité (qui est une technique pour laquelle notre laboratoire présente une forte compétence) à l'utilisation de la levure (organisme utilisé en tant que modèle et outil depuis plusieurs années dans notre équipe).

Pour cette méthode, le crible de surexpression a été retenu (figure 26). Le but est d'identifier les gènes qui, lorsqu'ils sont surexprimés, permettent à la levure de se diviser malgré la présence d'un inhibiteur. Cela implique que le composé ait un phénotype facilement mesurable, par exemple qu'il ait un effet négatif sur la croissance des levures. En partant du principe que tous les composés présentant un intérêt certain n'entraînent pas toujours un blocage de la croissance cellulaire (ou tout autre phénotype mesurable), nous sommes en présence d'une des limites de cette technique. Les premiers essais ont consisté à déterminer quelle souche serait la plus adaptée pour ce crible, c'est-à-dire quelle souche présente la plus forte sensibilité à la roscovitine. L'association de trois mutations s'est avérée être la meilleure solution dans notre cas précis. C'est donc la souche YRP1 (*erg6Δ, pdr5Δ, snq2Δ*) qui sera utilisée pour la mise en place du crible génétique.

La réalisation du crible génétique a lieu suite à la transformation de la souche de levure avec une banque d'ADN. Nous disposons au laboratoire d'une banque de fragments génomiques de *S. cerevisiae* ; ces fragments ont une taille moyenne de 4 kbases et sont ainsi susceptibles de contenir en moyenne deux gènes complets. Chaque cellule transformée surexprime potentiellement une ou deux protéines. C'est avec cette banque que nous avons réalisé une première approche : en présence de (R)-roscovitine, plusieurs colonies se

développent et malgré un bruit de fond déterminé en comparaison avec la souche témoin (non transformée), il semble que dans certaines d'entre elles, la titration de la drogue ait bien lieu et qu'une identification des cibles puisse être réalisée par séquençage, après purification du plasmide. Bien que nécessitant une mise au point des conditions expérimentales, cette technique ouvre des perspectives intéressantes quant à un criblage à haut débit des cibles d'un composé d'intérêt.

Ces perspectives sont d'autant plus grandes que cette technique peut être réalisée avec diverses banques d'ADNc. Au-delà de la découverte de cibles levuriennes, nous envisageons l'utilisation d'ADNc humains, et plus particulièrement de banques de protéine kinases ou même de CDK.

La levure, un outil de routine pour l'étude de la sélectivité

En partant du principe que ce genre de crible est réalisable au laboratoire, nous espérons pouvoir développer cette double approche (chromatographie d'affinité et crible de surexpression) afin d'avoir à disposition un outil de routine qui permettra de définir de manière simple et rapide les cibles potentielles d'un composé d'intérêt issu du criblage de chimiothèques. Bien que quelques mises au point soient nécessaires pour chacune des molécules (production de la molécule avec un bras de liaison à la matrice d'affinité et vérification du phénotype provoqué par le composé), cela permettrait de gagner un temps considérable sur les études pré-cliniques en améliorant les molécules, d'une part d'un point de vue structure/activité et d'autre part en limitant la fixation des cibles non souhaitées sur le composé d'intérêt.

Conclusions générales

Ce travail de thèse s'est articulé autour de deux sujets différents pour lesquels l'utilisation de la levure a été le point commun : cet organisme a servi de modèle pour une approche fondamentale de la cytokinèse, mais aussi d'outil pour étudier la sélectivité de la (R)-rosocvitine, un petit composé à fort potentiel thérapeutique.

Le premier axe, fondamental, a permis d'élargir les connaissances sur la cytokinèse et plus particulièrement sur la fonction biologique de la protéine de levure Hof1.

Des travaux préalablement réalisés au laboratoire, montraient que, chez *S.cerevisiae*, il existe une relation entre la cytokinèse et la protéolyse ubiquitine-protéasome dépendante via le SCF^{Grr1}. Le système ubiquitine-protéasome constitue la principale voie de dégradation des protéines solubles chez les eucaryotes. Pour cela, les protéines cibles doivent être poly-ubiquitinées en faisant intervenir une série d'enzymes dont les ubiquitines ligases. Parmi elles, les complexes de type SCF présentent une protéine adaptatrice (protéine à F-box) qui assure la spécificité de substrat en le reconnaissant au bon moment et au bon endroit. La protéine à F-box Grr1 est localisée au niveau de l'anneau d'actomyosine au moment de la cytokinèse : elle se localise à cet endroit pour permettre la dégradation (entres autres) de la protéine Hof1. Alors que l'on sait que la surexpression de Hof1, tout comme sa stabilisation (absence de dégradation), empêche la séparation des cellules, son rôle biologique exact demeure encore mal connu.

Au-delà de son rôle dans la cytokinèse, Hof1 est au cœur d'un mécanisme qui permet un couplage entre cette phase du cycle cytoplasmique et la mitose. En coordonnant ces deux événements, la cellule évite l'apparition de cellules aneuploïdes et/ou polyploïdes. C'est pour cette raison que nous avons souhaité mieux comprendre la fonction biologique de Hof1.

Les premières données suggéraient une implication de Hof1 dans le recyclage membranaire. Des études plus approfondies ont permis de mettre en évidence plusieurs points :

- Le recyclage membranaire est polarisé au cours du cycle cellulaire : il a essentiellement lieu dans le bourgeon jusqu'en fin de mitose et est rapidement relocalisé à l'anneau contractile au moment de la cytokinèse. Cela suggère que le

recyclage membranaire est particulièrement actif dans les régions de la cellule qui nécessitent un élargissement de la surface membranaire.

- Le gène *HOF1* présente des interactions génétiques avec d'autres gènes impliqués dans le recyclage membranaire.
- Le gène *HOF1* est le seul des gènes impliqués dans la cytokinèse dont la délétion affecte spécifiquement le recyclage membranaire et plus particulièrement les échanges entre les endosomes et l'appareil de Golgi.
- Alors que la surexpression de Hof1 ou de sa forme privée du domaine PEST bloque la cytokinèse et est toxique pour la cellule, la surexpression de formes mutantes de la protéine Hof1 dans lesquelles les domaines F-BAR ou FCH sont absents n'empêche pas la division des cellules. L'expression de ces mêmes formes de la protéine Hof1 ne permet pas de restaurer le recyclage dans une souche *hof1Δ*. L'extrémité N-terminale de cette protéine est donc indispensable à la fonction de recyclage de Hof1 ainsi qu'à sa toxicité lorsqu'elle est surexprimée.

Alors qu'un lien avait déjà été fait entre la cytokinèse et le recyclage membranaire chez les eucaryotes supérieurs, notre étude apporte, pour la première fois, à notre connaissance, les premiers éléments indiquant que ces deux mécanismes biologiques sont aussi reliés chez la levure. Il semblerait que la chitine synthase II (Chs2) puisse être recyclée de manière Hof1-dépendante au niveau de la constriction entre les deux cellules afin de former le septum primaire qui, une fois dégradé, permettra la séparation de la cellule mère et de la cellule fille.

Le second axe de recherche développé est plus appliqué. Il visait à mettre en place une méthode utilisant la levure pour étudier la sélectivité de composés chimiques ayant un fort potentiel thérapeutique.

L'étude du mode d'action d'une drogue passe par une connaissance précise de sa sélectivité, c'est-à-dire la détermination de ses protéines cibles *in vivo*. Afin de mettre en place notre approche, nous avons choisi la roscovitine comme composé modèle. Cette molécule est actuellement en phase IIb d'étude clinique dans le cadre du traitement du cancer

du sein, du poumon non à petites cellules, et du lymphome B. En mimant la molécule d'ATP, elle agit sélectivement contre une famille de protéine kinases, les CDKs. Cependant, des études de sa sélectivité ont montré qu'elle agissait aussi sur d'autres substrats et qu'il était difficile d'identifier *in vitro* et de manière exhaustive ses cibles. En effet, pour cela, il faudrait pouvoir tester les 518 protéine kinases potentiellement codées par le génome, sans oublier les autres enzymes et protéines liant l'ATP (estimées à près de 2000 chez l'Homme).

C'est dans ce contexte que nous avons voulu mettre en œuvre une méthode permettant rapidement d'avoir une idée globale de la sélectivité d'une molécule, tout en utilisant la levure. Dans un premier temps, nous avons appliqué la méthode de la chromatographie d'affinité sur billes d'inhibiteurs immobilisés sur les protéines de cet organisme, ceci afin de valider la pertinence de son utilisation dans ce type d'approche. C'est ainsi que nous avons identifié plusieurs cibles potentielles de la roscovitine dont la MAPK Hog1 et la CDK Pho85. Par diverses approches, ces deux cibles se sont révélées être spécifiques et réellement inhibées par le roscovitine, et plus particulièrement par son énantiomère (R).

La MAPK Hog1 est l'homologue de la protéine humaine p38 et est inhibée *in vitro* par la (R)-roscovitine. De la même manière, la protéine humaine CDK5 est l'homologue fonctionnel de Pho85. Elle aussi est une cible bien caractérisée de la drogue étudiée. Ces données indiquent donc que la levure *S. cerevisiae* est un outil pertinent pour approfondir les connaissances sur la sélectivité d'un inhibiteur.

Outre Pho85 et Hof1, il semblerait que la protéine Cdc28, CDK essentielle et centrale de la régulation du cycle cellulaire de la levure, ne soit pas une cible de la roscovitine. Cdc28 est l'homologue structural et fonctionnel de la protéine humaine CDK1. Cette dernière est une cible bien caractérisée de la roscovitine : en effet, la structure de ce composé a été optimisée au départ pour inhiber CDK1/cycline B. Cela indique que l'utilisation de la levure et de la chromatographie d'affinité ne peut suffire à étudier de manière approfondie la sélectivité d'une drogue. C'est pour cette raison que nous envisageons d'élargir cette étude en employant en parallèle une approche génétique. La méthode du crible de surexpression permet d'isoler les gènes qui, surexprimés, annulent le phénotype de sensibilité à la drogue. Au-delà de la surexpression de protéines de levure, il est envisageable, par le biais de banque d'ADNc, d'exprimer des cibles de différents organismes.

Associées l'une à l'autre, ces deux techniques permettraient alors de mettre en place une approche de routine pour l'étude de la sélectivité d'une drogue et ainsi d'aider à l'optimiser dès les premières étapes de son développement clinique.

Au premier abord, les deux sujets exploités peuvent paraître extrêmement éloignés l'un de l'autre. Dans une perspective plus lointaine, il est pourtant possible de les relier.

En effet, certains régulateurs de la cytokinèse, en particulier ceux pourvus d'une activité enzymatique mesurable (*in vivo* ou *in vitro*), pourraient être utilisés comme cibles moléculaires afin d'identifier de nouvelles molécules bloquant la division cellulaire et donc potentiellement anticancéreuses. De la même manière, nous pouvons imaginer qu'un inhibiteur d'interactions protéine/protéine, plus particulièrement de l'interaction entre Hof1 et Grr1, pourrait bloquer de manière spécifique la cytokinèse.

De tels produits, outre leur intérêt certain pour l'étude fondamentale de la cytokinèse elle-même, pourraient être à la base d'applications thérapeutiques potentielles. L'étude de la sélectivité de ces molécules pourrait alors bénéficier de l'approche décrite dans le cadre de ce travail de thèse. La grande expérience des deux laboratoires (auxquels je suis rattaché) dans ce genre de transfert de technologie devrait apporter les bonnes conditions à une valorisation des résultats issus de ce projet de recherche fondamentale.

Matériels et Méthodes

Les organismes et les milieux de cultures utilisés

Les milieux de cultures décrits dans les paragraphes suivants sont utilisés selon les besoins sous forme liquide ou solide. Dans ce cas, 2% d'agar sont ajoutés au milieu avant qu'il ne soit autoclavé. Les pourcentages exprimés ici correspondent à des rapports masse/volume.

Escherichia coli

La souche HB101, électro-compétente, est utilisée pour recevoir les vecteurs recombinants construits au laboratoire et les amplifier avant transformation en levure. Le milieu de culture choisi pour ces souches est le milieu LB (Luria Bertani) : il contient 2,5% de LB Broth, Miller (SIGMA).

Saccharomyces cerevisiae

Dans la majeure partie des cas, la croissance des cellules se fait à 29°C, avec une légère agitation : les précultures, cultures de petits volumes ($\approx 5\text{mL}$) se font sur une roue. Les plus grosses cultures, en erlenmeyer, se font sur un plateau agitateur ($\approx 180\text{ rpm}$). Les milieux utilisés en routine sont les suivants :

Milieu riche (YPD) :

Il est constitué de 2% glucose, 2% bacto peptone (BD Science) et 2,4% d'extraits de levure (SIGMA). En cas de résistance à la généticine (G418), l'antibiotique est ajouté au milieu à une concentration finale de $100\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Milieu minimum (MML) :

Il contient 0,7% de YNB (yeast nitrogen base without amino acids, BD Science). En fonction des auxotrophies que présentent certaines souches, il est complété à l'aide d'acides aminés et/ou de bases azotées. La source de sucre

est aussi ajoutée à 2% final. Dans la majorité des cas, il s'agit de glucose. Il peut être remplacé par du raffinose et/ou du galactose lorsqu'on veut induire une production de protéine dont le gène est sous la dépendance d'un promoteur inductible Gal.

NB : le milieu MMLC est constitué des mêmes éléments auxquels on ajoute du « casaminoacid » à 0,1% final. Ce milieu permettra une sélection uniquement sur les marqueurs Ura, Ade et Trp.

Milieu de sporulation (SPO) :

Afin de déclencher le phénomène de sporulation chez une souche diploïde, elle est mise sur un milieu carencé, à température ambiante durant quelques jours. Ce milieu simple est constitué de 1% d'acétate de potassium.

Mesure de densité cellulaire

A l'issue d'une culture de cellules (bactéries et levures), la turbidité (densité de cellules) est estimée par la mesure de la densité optique (DO ou OD) à une longueur d'onde de 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Eppendorf, BioPhotometer). On estime qu'une unité de DO représente 1.10^7 cellules.mL⁻¹ pour une souche diploïde. Dans le cas d'une souche haploïde, cela correspond à 2.10^7 cellules.mL⁻¹.

Méthodes relatives aux acides nucléiques

Extraction d'ADN plasmidique (miniprep)

L'amplification des vecteurs navettes se fait en bactérie. Leur purification est ensuite réalisée à l'aide du kit proposé par la marque Quiagen : QIAprep® Spin Miniprep Kit.

Extraction d'ADN total de levure

Dans le cadre de ce travail, ce type d'extraction a toujours été réalisé de manière simplifiée en vue de réaliser une PCR permettant de valider l'insertion d'un fragment d'ADN dans le génome de la levure. Elle se fait sur la base du protocole suivant : les cellules en solution dans de l'eau sont lysées par agitation brutale en présence de billes de verre (SIGMA) et de phénol. Il s'en suit des extractions successives au phénol puis au chloroforme.

Techniques de transformation

➤ des bactéries

Les transformations des bactéries HB101, par des vecteurs navettes, ont été réalisées par électroporation. Au préalable, les cellules sont rendues compétentes après leur culture dans du milieu LB. Trois cycles de centrifugations/lavages dans de l'eau stérile froide (4°C) sont nécessaires avant de mettre les cellules dans une solution de glycerol 10%. Ces cellules sont alors aliquotées par 50µL et peuvent être conservées à -80°C.

L'électroporation se fait dans des cuves BioRad en mettant en présence un aliquot de bactéries électrocompétentes et l'ADN à transformer. Le choc électrique est produit par un appareil BioRad Gene Pulser II configuré pour les valeurs suivantes : 2500V/25µF/200Ω. Suite au choc électrique, dont la durée doit être comprise entre 4,5 et 5ms, les cellules sont reprises dans 900µL de LB puis mises à 37°C durant 45 minutes avant d'être étalées sur un milieu sélectif (dans la majeure partie des cas LB+ampicilline 50µL.mL⁻¹).

➤ des levures

Les souches de levures sont transformées selon la technique décrite par Ito (Ito *et al.*, 1983) et améliorée par Gietz (Gietz *et al.*, 1992). Cela permet la pénétration d'ADN dans une cellule de levure, que ce soit un fragment double brin ou un plasmide.

La culture de la souche à transformer est arrêtée au cours de la phase exponentielle et le culot de cellule est lavé puis repris dans une solution de TE/LiAc. On y ajoute une solution d'ADN

monobrin (issue de sperme de saumon) et une solution de PEG/TE/LiAc qui faciliteront la pénétration de l'ADN à transformer dans la cellule. Une agitation de 30 minutes à température ambiante précède le choc thermique de 15 minutes à 42°C. Les cellules pourront alors être étalées sur un milieu sélectif qui permettra la sélection des mutants. Dans le cas d'une transformation d'un gène de résistance à un antibiotique, il est nécessaire de laisser les cellules en milieu YPD durant trois heures avant de les mettre sur milieu sélectif.

Restriction et électrophorèse sur gel d'agarose

L'ADN est digéré en utilisant des enzymes provenant des fournisseurs New England Biolabs et Roche. Les restrictions se font en suivant les recommandations techniques pour ces produits.

Les fragments d'ADN digéré sont séparés sur gels d'agarose 1%, réalisés à l'aide de tampon TBE (Tris, Acide Borique, EDTA). Du bromure d'ethidium (BEt) est incorporé à ces gels afin de visualiser les bandes sous UV.

Purification de fragments d'ADN

Après leur séparation sur gel, les fragments sont extraits du gel puis purifiés à l'aide du kit proposé par la marque Quiagen : QIAquick® Gel Extraction Kit.

Estimation d'une concentration en ADN d'une solution

Les diverses manipulations réalisées au cours de ce travail ne nécessitent pas de dosage précis de concentrations en ADN. Seule une estimation suffit et elle est déterminée par la comparaison de l'intensité de fluorescence émise sous UV (sur un gel d'agarose) par le BEt intercalé entre, d'une part, les acides nucléiques de l'échantillon et, d'autre part, les acides nucléiques d'une quantité donnée d'un marqueur de poids moléculaire (Smart Ladder™, Eurogentec).

Ligation

Les ligations sont réalisées en utilisant le kit T4 DNA ligase commercialisé par Roche Applied Science.

Amplification d'un fragment d'ADN par PCR

L'amplification d'un fragment d'ADN est réalisée à l'aide d'un thermocycleur TPersonal, Biometra. Les différentes étapes sont reprises ci-dessous.

étape 1 : 10 min à 95°C

étape 2 : 20 sec à 95°C

étape 3 : 90 sec à 50°C

étape 4 : 90 sec à 72°C

étape 5 : retour à l'étape 2 pour 29 cycles

étape 6 : 10 min à 72°C

étape 7 : +∞ à 4°C

NB : **étape 2** = dénaturation, **étape 3** = hybridation des amorces, **étape 4** = élongation.

Les durées et les températures des étapes 3 et 4 peuvent varier en fonction de la séquence d'ADN à amplifier.

Les polymérases utilisées sont :

- la Taq DNA polymérase (Roche Applied Science) pour une utilisation courante
- l'Expand Long Template PCR System (Roche Applied Science) pour l'amplification de fragments de grandes tailles (supérieurs à 3 kb). Dans ce cas, la température d'élongation est de 68°C.

Analyses génétiques

Délétions de gènes chez la levure

La délétion d'un fragment de génome de la levure se fait par l'insertion d'une "cassette de délétion" ((Baudin *et al.*, 1993), principe décrit en figure 42). Cette dernière est produite par la technique de PCR qui permet d'amplifier un gène "marqueur de sélection" (*TRP1* par exemple) flanqué des séquences situées en amont et en aval du site chromosomique du gène à muter (*ERG6* pour ce même exemple). Pour cela, un vecteur contenant le gène marqueur sert de matrice. Les amorces utilisées doivent contenir une région complémentaire aux sites flanquants le gène à inactiver (traits bleus de S1 et S2 sur la figure 42) et une région complémentaire aux extrémités du gène de délétion (traits rouges de S1 et S2 sur la figure 42). Ainsi, les amorces permettent dans un premier temps l'amplification de ce dernier puis le produit de cette PCR pourra, par recombinaison homologue, venir remplacer le gène à déléter après transformation de la levure.

Par la suite, la mutation est vérifiée par PCR. Une première amorce (F sur la figure) est complémentaire de la séquence nucléotidique située 200 nucléotides en amont du gène et une seconde (R sur la figure) est complémentaire inverse du gène marqueur. Si un fragment d'ADN de la taille attendue est amplifié, nous pouvons conclure à l'intégration de ce gène marqueur au locus attendu dans le génome levurien.

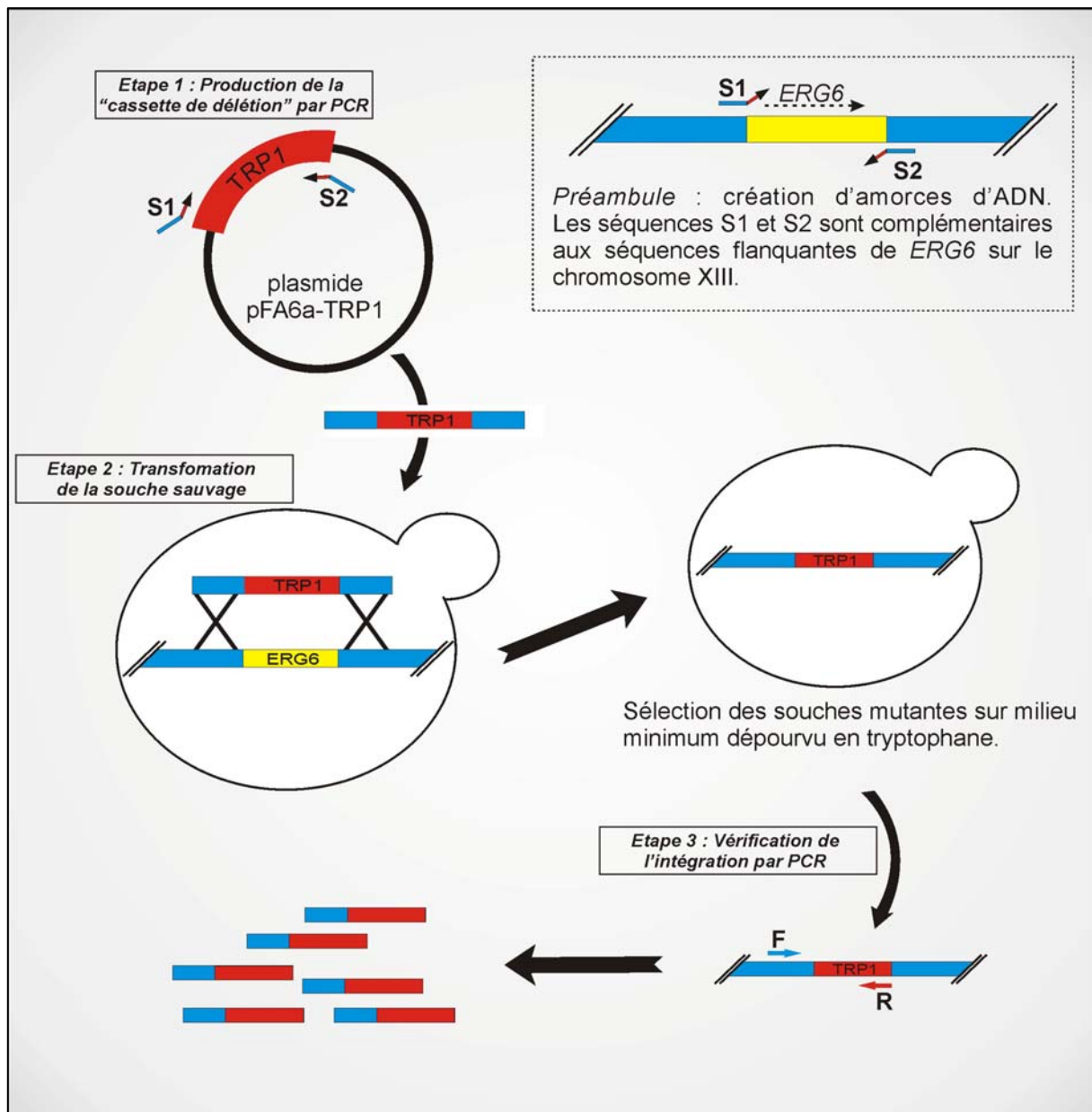


Figure 42 : Principe de délétion d'un gène chez la levure. Cette technique consiste à amplifier par PCR un gène marqueur qui témoignera du remplacement du fragment d'ADN à supprimer par ce marqueur. Ce remplacement se fait par recombinaison homologue. L'exemple présenté concerne le remplacement du gène *ERG6* par le marqueur de sélection *TRP1*.

Insertion d'un tag dans le génome : étiqueter un gène

Pour diverses expériences, nous avons souvent été amené à fixer un tag (ou étiquette) sur un gène :

- expression d'une protéine taguée à la GFP, protéine fluorescente lorsqu'elle est excitée sous UV
- expression d'une protéine taguée avec un épitope hemagglutinine (communément appelé HA)
- etc...,

L'insertion de ces tags se fait sur le même principe que la délétion de gènes décrite ci-dessus. Dans ce travail de thèse, tous ces tags ont été ajoutés à l'extrémité C-terminale de la protéine : le fragment d'ADN inséré par recombinaison homologue est donc construit de manière à ce qu'il remplace le codon stop du gène.

Surexpression de gènes chez la levure

La surexpression d'un gène en levure consiste à l'intégrer au sein d'un vecteur navette "*E. coli* – *S. cerevisiae*". Pour cela, il doit être préalablement amplifié par PCR avec des séquences, en amont et en aval, clivables par des enzymes de restriction compatibles avec les sites de clonage du vecteur d'expression choisi. Ce choix se porte donc sur le site multiple de clonage qu'offre le vecteur mais aussi sur :

- le marqueur d'auxotrophie qui permettra la sélection des transformants.
- le promoteur fort qui permettra la surexpression. Il peut être constitutif (niveau basal d'expression stable) ou inductible (surexpression entraînée par la présence d'un activateur tel que le galactose par exemple).

Suite à son amplification, le fragment d'ADN est donc restreint à ses deux extrémités et le vecteur, ouvert par les mêmes enzymes de restriction. Les produits de ligation sont transformés dans les bactéries HB101 afin d'amplifier la nouvelle construction. Cette dernière est alors purifiée et si elle s'avère être bonne (vérification par carte de restriction), la transformation en levure est alors possible. La surexpression sera immédiatement effective dans le cas d'un promoteur constitutif et elle pourra être provoquée au moment le plus opportun dans le cas d'un promoteur inductible. Dans ce dernier cas, si le promoteur est de

type GAL, la culture se fait en présence de raffinose dans un premier temps. Le galactose est ensuite ajouté afin de commencer la surexpression. En effet, le raffinose a la propriété de ne pas réprimer ce promoteur, contrairement au glucose.

Préparation et dissection de tétrades

Pour l'analyse génétique de la ségrégation d'un caractère, les souches diploïdes étudiées sont cultivées pendant 4 jours à 25°C sur un milieu solide de sporulation. Afin de digérer la paroi de l'asque, une suspension cellulaire est ensuite réalisée dans de la zymoliase à 5mg.mL⁻¹ (ICN Biomedicals). La préparation est maintenue pendant 30 minutes à température ambiante et est ensuite déposée sous forme de gouttes sur une boîte de milieu riche YPD et les asques contenant 4 spores sont disséquées avec un micromanipulateur (de marque SINGER, type MSM300). La croissance des spores se fait à 29°C sur le même milieu et les colonies issues des spores sont ensuite utilisées pour l'analyse phénotypique où elles sont repiquées sur les différents milieux solides de sélection, par réplique de la boîte mère.

Afin de déterminer le type sexuel d'une colonie, elle est étalée sous forme de "patches" sur un milieu riche et mélangée avec une souche de référence dont l'haplotype est connu. Après trois heures à 30°C, si la souche de référence est de type sexuel opposé à celui de la colonie étudiée, on peut observer la formation de zygotes. Ils sont aisément remarquables soit par leur taille supérieure, soit si la fusion des cellules n'est pas totale, par la forme en "haltère" du diploïde en formation.

Pour l'obtention de diploïdes (lors de la construction des mutants diploïdes homozygotes), des souches de type conjuguant opposé sont mélangées sur un milieu solide et la préparation est analysée après quelques heures. Les zygotes sont isolés avec le micromanipulateur et cultivés sur milieu solide.

Analyses phénotypiques

Le test en halo : test de sensibilité à une drogue

Le test en halo est basé sur le principe de l'antibiogramme (voir figure 43). Il permet d'observer la croissance cellulaire en présence d'une drogue donnée. Dans un premier temps, les cellules sont étalées à l'aide de billes de verre afin de former, après croissance, un tapis de colonies cellulaires sur une boîte de Pétri. Juste après étalement, 15 à 20µL de drogue à 10mM sont déposés sur un papier filtre de 6mm de diamètre. En diffusant dans le milieu gélosé à partir de la pastille, un gradient de concentration de la drogue dans le milieu va s'établir. Après quelques jours à la température adéquate, il sera alors possible d'observer un halo autour de la pastille, correspondant à une inhibition de la croissance cellulaire. Le diamètre de ce halo varie en fonction de la tolérance des cellules vis-à-vis de la drogue déposée. Les drogues testées dans cette étude sont diluées dans du DMSO. De ce fait, sur chaque boîte, un témoin négatif sera réalisé en déposant 15µL de ce solvant des molécules sur une pastille.

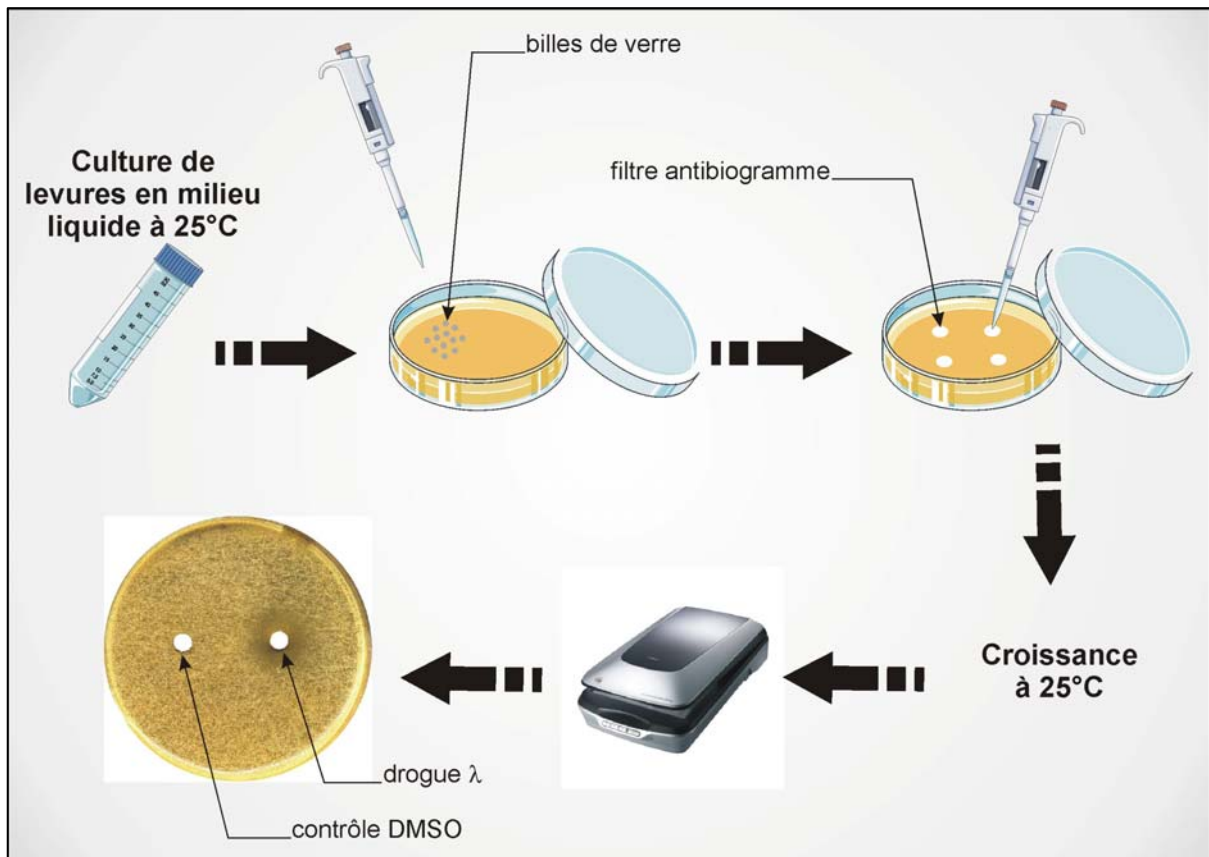


Figure 43 : Test de sensibilité à une drogue, le test en halo. Les levures sont réparties sous forme de tapis sur un milieu de culture gelifié. Les drogues utilisées sont distribuées sur des papiers filtres de 6mm de diamètre. Cela permet au drogues de diffuser dans le milieu de culture tout en créant un gradient de concentration inversement proportionnel à l'éloignement du disque. Un halo correspondant ici à un défaut de croissance peut être observé lorsque la drogue a un effet délétère sur la croissance des levures.

Le test en goutte : test de viabilité

Ce test permet de comparer la croissance de deux ou plusieurs souches dans une condition donnée. Les souches à étudier sont mises en culture en milieu liquide puis lorsqu'elles arrivent à une D.O_{600nm} de 0,5, on prépare des dilutions sérielles au 1/10^e dans de l'eau stérile. Sur une boîte de Pétri contenant le milieu de sélection approprié, pour une souche donnée, on dépose ces différentes suspensions cellulaires sous forme de gouttes de 5µL, les unes à côté des autres (panel A, figure 44).

Le plus souvent, il s'agit d'observer la croissance d'une souche mutée ou bien surexprimant un gène afin de tester l'éventuelle inhibition de croissance due à ce changement de génotype. Si une inhibition de croissance est observée, elle peut être la conséquence d'un simple blocage du cycle ou du caractère létal des modifications observées.

A titre d'exemple, sur le panel B de la figure 44, nous avons cherché à voir l'effet de la surexpression du gène de levure *HOF1* sur la croissance cellulaire. La souche sauvage a été transformée à l'aide d'un vecteur contenant le gène étudié sous la dépendance d'un promoteur fort inductible GAL. En parallèle, cette même souche de levure a été transformée avec le vecteur vide ayant servi au clonage du gène *HOF1* : ceci est la souche contrôle. Dans cet exemple, nous voyons que la surexpression du gène sur un milieu contenant du galactose entraîne une toxicité qui se traduit par une diminution du nombre de colonies capables de croître en comparaison avec la souche contrôle.

De la même manière, il est possible de vérifier la sensibilité d'une souche de levure à une concentration donnée de drogue. Dans ce cas, la molécule est incorporée au milieu de croissance gélosé.

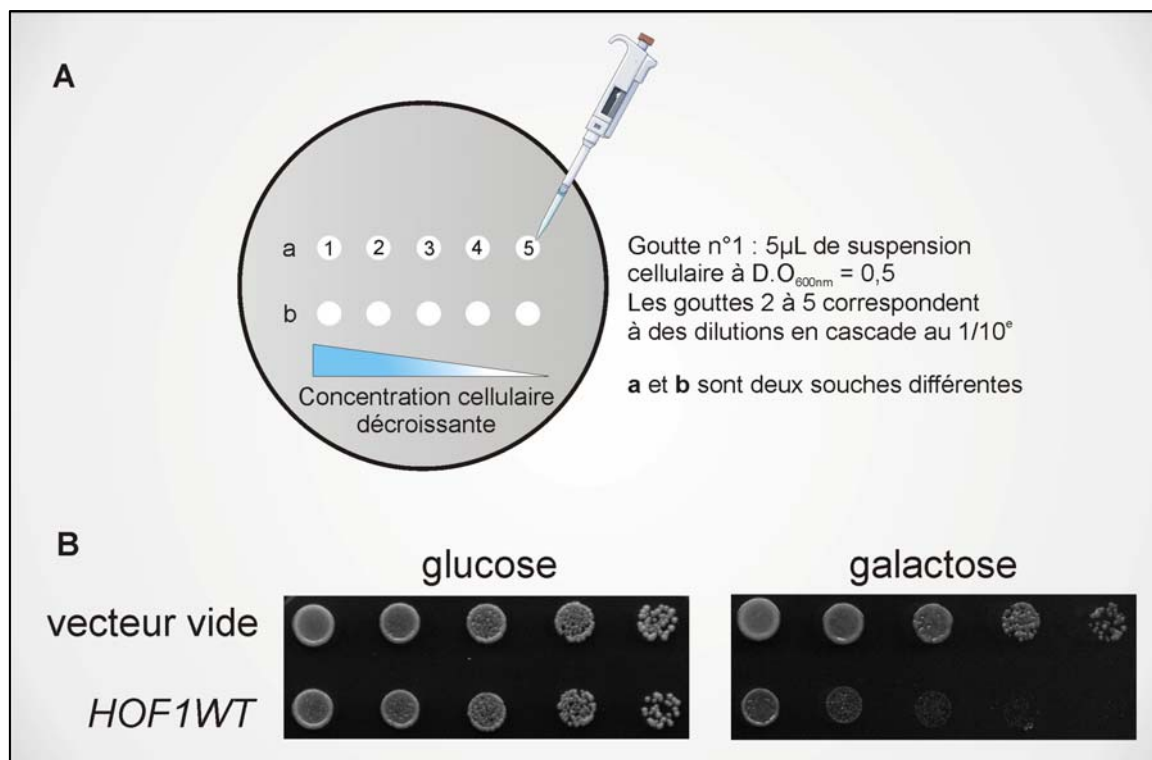


Figure 44 : Test de viabilité cellulaire, le test en goutte. Réalisé dans le but de vérifier la viabilité d'une souche suite à une mutation ou en présence d'une drogue, ce test permet de comparer la croissance de plusieurs souches dans une même condition.

Microscopie à fluorescence

Les protéines taguées avec la GFP sont visualisées à l'aide d'un microscope Olympus BX61 équipé d'un filtre Chroma GFP4 (longueur d'onde d'excitation : 455nm-495nm). Les photos présentées dans ce rapport sont réalisées à l'aide d'une caméra Diagnostic Instrument Spot RT et traitées à l'aide du logiciel Photoshop CS (Adobe).

Les cellules exprimant la GFP sont mises en croissance dans un milieu de culture approprié puis 1mL de suspension cellulaire est centrifugé brièvement. Le surnageant est éliminé en retournant le tube et les cellules sont reprises dans le milieu restant. 2,3µL sont déposés entre lame et lamelle. Les observations se font sous l'objectif x100 à immersion.

Méthodes relatives aux protéines

Extraction rapide de protéines

Cette méthode est utilisée en parallèle des observations microscopiques pour vérifier l'expression des protéines taggées par Western Blot à l'aide d'anticorps spécifiques de ces étiquettes. Pour cela, on prélève 1mL de culture dont on mesure la D.O. On y ajoute successivement 100µL de deux solutions (Solution 1 : NaOH, β-mercaptoethanol ; Solution 2 : TCA 50%). On laisse incuber chaque solution au moins 10 minutes à 4°C avant de centrifuger le tube. Le culot est rincé à l'acétone puis il est repris dans le tampon de charge avant la migration sur gel de polyacrylamide : 50µL de bleu 2X pour 1mL de culture à D.O_{600nm} égale à 1. Les protéines sont dénaturées à 95°C durant 3 minutes.

Extraction de protéines totales de levures : utilisation du *One Shot Cell Disrupter*

Pour la préparation de lysat de levures, les cellules sont mises en culture en milieu liquide jusqu'à l'obtention d'une D.O_{600nm} proche de 2 (culture en phase exponentielle). Le culot de cellules est obtenu par centrifugation (3000rpm durant 15 minutes, à 4°C) et dilué dans un tampon élaboré au laboratoire, le "tampon de casse" (25mM Tris pH7.4, 100mM NaCl, 0.2% Triton X100, 15mM *p*-nitrophenylphosphate, 0.1mM Na-Vanadate, 1mM PMSF, cocktails d'inhibiteurs de protéases (CompleteTM, Roche)).

Les levures sont lysées à l'aide d'un casseur de cellules "One Shot" (Constant Systems LTD). Cet appareil permet, avec une pression de 2,5 à 2,7 kbar, de casser les parois des levures, ce qui est le problème majeur des autres protocoles de lyse. Chaque échantillon subit deux passages dans la machine avant d'être centrifugé durant 20 minutes à 13000rpm.

Dosage de protéines

Les dosages de protéines sont réalisés selon la méthode décrite par Bradford (Bradford, 1976). Le kit utilisé est le Bio-Rad protein assay (Bio-Rad).

Chromatographie d'affinité sur billes d'inhibiteurs immobilisés

Cette expérience permet de caractériser les cibles cellulaires *in vivo* d'une drogue en identifiant les protéines spécifiquement retenues sur une matrice (autrement appelée *billes*) liant de façon covalente le composé d'intérêt ((Guiffant *et al.*, 2007) voir la section « Annexes »). C'est une manière parmi d'autres de connaître les cibles cellulaires d'un composé chimique ayant un potentiel thérapeutique (voir l'introduction de la seconde partie de ce manuscrit). A l'origine, cette technique a permis de purifier des protéines à l'aide d'un substrat ou d'un cofacteur immobilisé. Plus récemment, avec les progrès du microséquençage et de la spectrométrie de masse, elle a été développée dans le but décrit ci-dessus.

Préparation de la molécule

La mise en place de cette méthode se fait en étroite collaboration avec des équipes de chimistes, qui dans un premier temps fixent un bras (ou linker) sur la molécule étudiée. Plusieurs paramètres, listés ci-dessous, doivent être pris en compte dans cette étape :

La nature du bras :

Lors de ce travail, nous avons utilisé un bras PEG (Polyethylene glycol).

La longueur du bras :

La fixation des cibles devient impossible sur un bras trop court à cause d'un problème d'encombrement stérique entre la drogue et la matrice. Un bras trop long risque de se replier sur lui-même et d'avoir les mêmes conséquences (voir figure 45).

L'hydrophobicité du bras :

Si elle est trop élevée, il y a un risque d'auto-agrégation qui bloque la fixation des cibles (voir figure 45). De plus, il se peut que diverses macromolécules présentes dans le lysat cellulaire se fixent de manière non spécifique lors de l'étape de chromatographie.

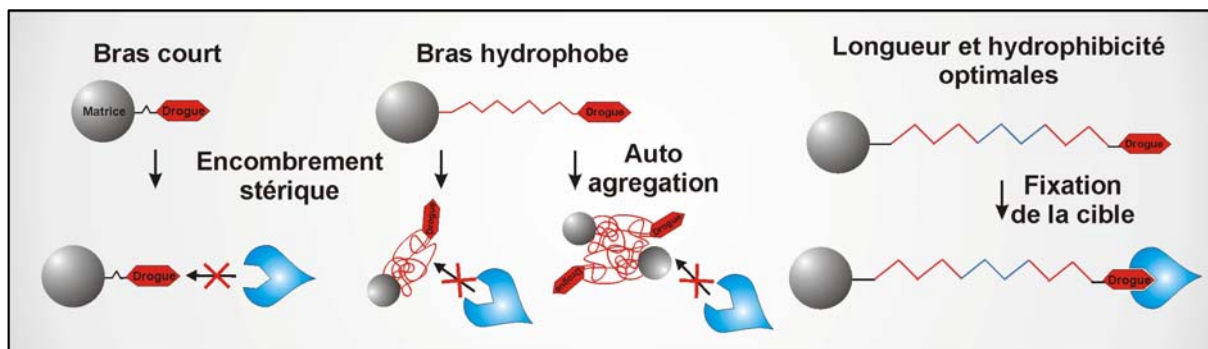


Figure 45 : Longueur et hydrophobicité du bras liant la molécule à la matrice : deux paramètres importants. Ces deux paramètres sont à prendre en compte afin d'éviter tout problèmes d'encombrement stérique ou d'auto-agrégation des billes d'inhibiteur qui pourraient empêcher la fixation des cibles.

La position du bras sur la molécule étudiée :

Bien que le chimiste ait une multitude de possibilités pour fixer le linker, il est nécessaire de vérifier que cette modification ne change pas l'activité biologique du composé. Si une partie de la molécule est engagée dans l'interaction drogue/cible, les atomes de cette région ne peuvent pas être choisis pour cette fixation.

Le choix de la position peut s'effectuer de deux manières : soit le chimiste prépare plusieurs molécules et leur activité biologique est ensuite testée, soit une étude préliminaire de l'interaction entre la drogue et une de ses cibles connues est réalisée au préalable. Dans le cas de la roscovitine, le choix de la meilleure position pour le linker a pu être fait grâce à l'étude tridimensionnelle de son interaction avec certaines CDKs comme CDK2 et CDK5 (De Azevedo *et al.*, 1997; Mapelli *et al.*, 2005). Ces co-cristallisations ont montré que le groupement benzyl de la roscovitine est dirigé vers l'extérieure de la poche à ATP de ces CDKs (voir figure 46). C'est donc un carbone de ce groupement (noté * sur la figure 46) qui a été retenu pour l'ajout du bras qui reliera alors la molécule à la matrice.

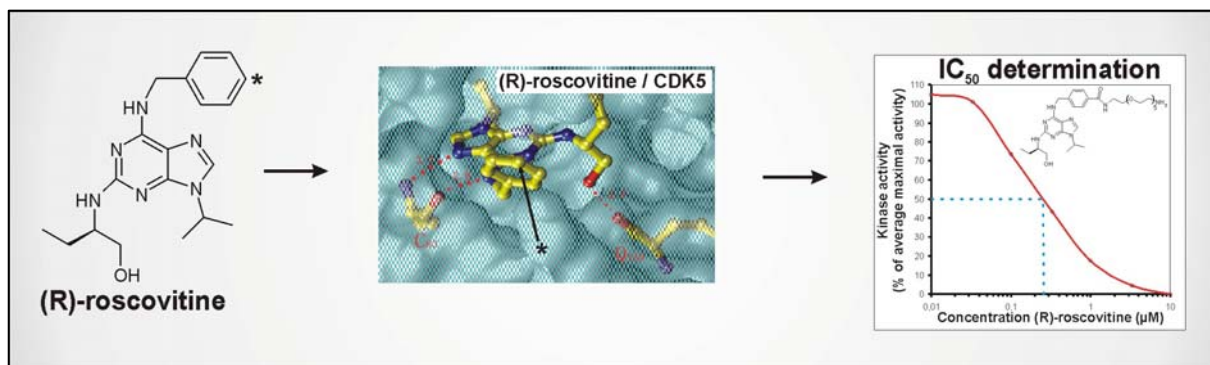


Figure 46 : Choix de la position de fixation du bras. Cette fixation ne peut se faire de manière aléatoire sur la molécule d'intérêt. Cela risquerait de bloquer toute activité de la molécule et donc d'empêcher la fixation des cibles sur la matrice.

Fixation de la molécule sur la matrice

L'étape suivante consiste à fixer la molécule avec son bras sur les billes de sépharose. La matrice CNBr-activated Sepharose 4B® (Amersham Biosciences) a été retenue pour les travaux concernant la roscovitine. Les billes sont commercialisées sous forme de poudre. Dans un premier temps, elles sont hydratées et lavées à plusieurs reprises à l'aide d'une solution d'HCl 1mM. Deux lavages supplémentaires dans le tampon de couplage (pH8.3, NaHCO₃ 0.1 M, NaCl 0.2M) permettent d'activer les sites réactifs de la matrice. La fixation de l'inhibiteur se fait durant une nuit, à température ambiante, sous agitation lente. La molécule, solubilisée dans du DMSO, est diluée dans du tampon de couplage de manière à la mettre dans la proportion de 3μmol pour 1mL de billes tassées. Afin d'éviter des interactions non spécifiques sur la matrice, on procède à une étape de saturation. Pour cela, la matrice est mise en présence d'une solution 1M éthanolamine. Le protocole de fixation se termine par une série de lavages effectués en alternance dans le tampon de couplage et le tampon de lavage (pH4, Acetate de Sodium 0.1M).

Les billes sont alors diluées au 1/4 et stockées à 4°C dans un tampon *Bead Buffer* (pH7.4, Tris 50mM, NaF 5mM, NaCl 250mM, EDTA 5mM, EGTA 5mM, NP-40 0.1%, inhibiteurs de protéases (Leupeptine 10μg.mL⁻¹, Aprotinine 10μg.mL⁻¹, inhibiteur de Trypsine 10μg.mL⁻¹ & Benzamidine 100μM)).

Etape de chromatographie sur billes d'inhibiteurs immobilisés

L'étape de chromatographie à proprement parlé consiste à mettre en présence la matrice d'inhibiteur (10µL de billes tassées) et le lysat protéique à étudier (voir figure 47). Les proportions varient en fonction du type de lysat et des expériences ultérieures envisagées : en général, 1 à 3 mg de protéines sont utilisées. Le volume total est complété dans un microtube à 1,2mL environ par du *Bead Buffer* afin d'optimiser le contact entre la matrice et les cibles potentielles. Ce contact se fait sous agitation lente des tubes à 4°C durant 30 minutes. Suite à cette étape, une première centrifugation est réalisée afin de collecter les billes et les cibles qui s'y sont fixées. Afin de s'assurer de la spécificité des interactions et de limiter le bruit de fond, 4 lavages au *Bead Buffer* sont nécessaires avant de décrocher les cibles fixées. Cette élution se fait par l'ajout de tampon de charge (Invitrogen) d'une part, et la dénaturation par la chaleur d'autre part (3min à 95°C). Les protéines ainsi éluées sont séparées sur gel de polyacrylamide. L'analyse de celui-ci se fait par coloration au bleu de Coomassie ou à l'argent. L'identification des cibles les plus abondantes retenues spécifiquement est réalisée par microséquençage de peptides internes, par spectrométrie de masse (après excision de la bande) ou encore par Western blot lorsqu'il y a de fortes suspicions sur l'identité d'une bande.

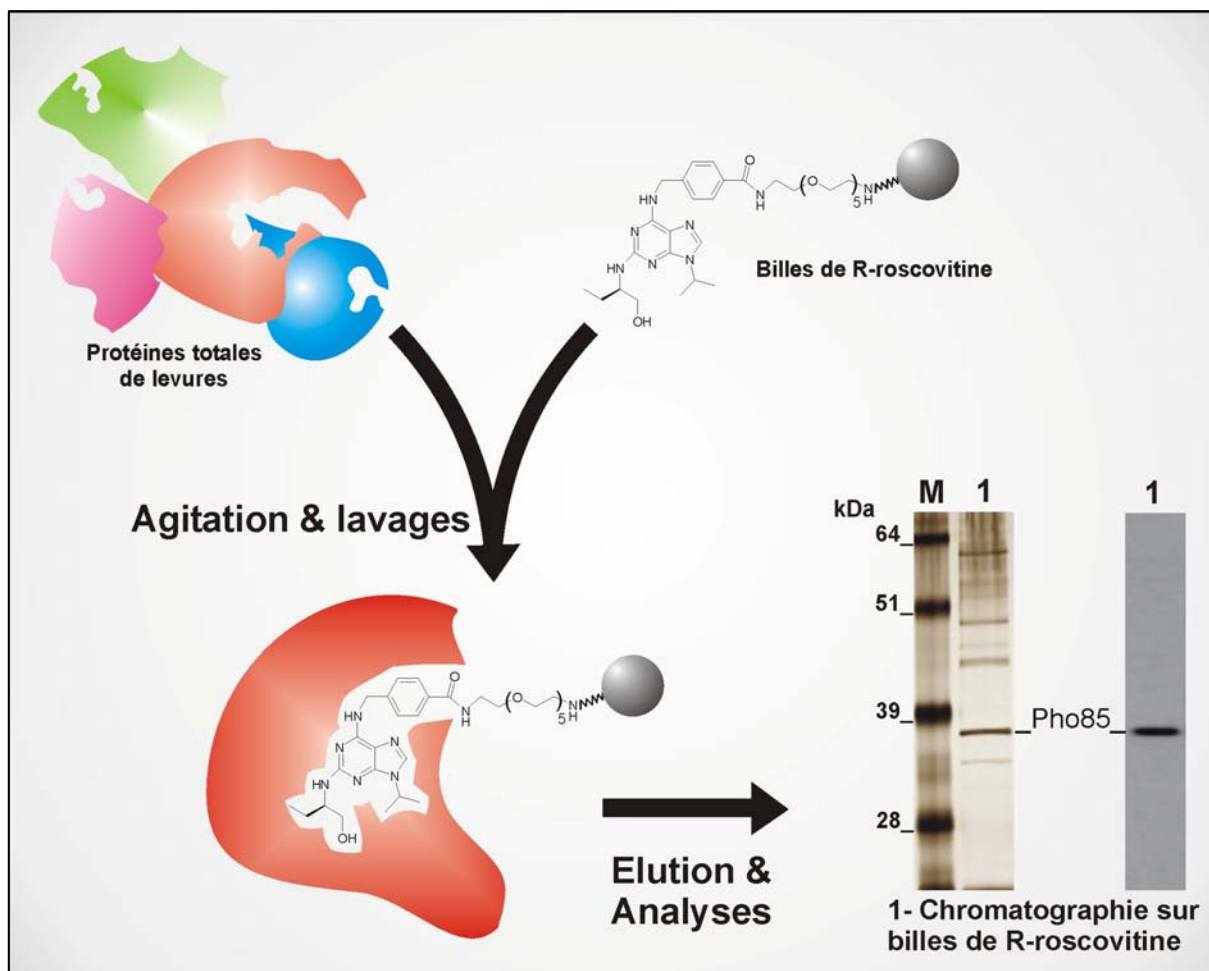


Figure 47 : Identification des cibles d'une drogue par chromatographie d'affinité sur billes d'inhibiteurs immobilisés. Un extrait protéique total est mis en présence de la matrice d'inhibiteur. Au cours d'une agitation douce, l'inhibiteur peut fixer ses cibles potentielles. Afin de limiter l'identification de faux positifs, plusieurs lavages peuvent être effectués dans des tampons présentant une stringence adéquate. Les cibles sont identifiées, après migration sur un gel de polyacrylamide en condition dénaturante, à l'aide de la spectrométrie de masse ou encore par Western blot lorsque l'expérimentateur a une suspicion quant à l'identité de la cible.

Immunoprécipitation

Cette technique de biochimie a été utilisée au cours de ce travail afin de purifier un complexe CDK/cycline et de mesurer son activité kinase en présence de concentrations croissantes d'inhibiteurs.

Une souche exprimant la protéine Clb2 tagguée HA a permis de purifier le complexe Cdc28/Clb2. 3mg de lysat sont mis en agitation lente à 4°C durant 90 minutes en présence d'un anticorps anti-HA (anti-HA monoclonal, MMS-101R, Covance) d'une matrice de protéine A/G (protein A/G PLUS-agarose, Sc-2003, Santa Cruz) et de tampon PY (pH7.2, β -glycerophosphate 60mM, *p*-nitrophenylphosphate 15mM, MOPS 25mM, EGTA 15mM, MgCl₂ 15mM, DTT 2mM, Na Vanadate 1mM, NaF 1mM, di Na-phenylphosphate 1mM, inhibiteurs de protéases (Leupeptine 10 μ g.mL⁻¹, Aprotinine 10 μ g.mL⁻¹, inhibiteur de Trypsine 10 μ g.mL⁻¹ & Benzamidine 100 μ M)). Afin de s'assurer d'une meilleure spécificité des complexes fixés et de limiter le bruit de fond, 4 lavages au *Bead Buffer* sont nécessaires.

La purification du complexe est vérifiée par Western blot ; dans ce cas, l'élution se fait par l'ajout du tampon de charge (Invitrogen) et dénaturation (3min à 95°C). Si l'immunoprécipitation est suivie d'un test d'activité kinase, un cinquième lavage au tampon C (pH7, β -glycerophosphate 60mM, *p*-nitrophenylphosphate 30mM, MOPS 25mM, EGTA 5mM, MgCl₂ 15mM, DTT 1mM, Na Vanadate 0.1mM) est réalisé.

Electrophorèse sur gel d'acrylamide

La séparation de protéines sur gel de polyacrylamide est réalisée à l'aide de la gamme de produits NuPAGE® proposée par la marque Invitrogen. Les gels utilisés lors de cette étude sont des gels pré-coulés NuPAGE® Novex 10% Bis-Tris.

Coloration de gel au bleu de Coomassie et à l'Argent

La coloration des gels d'acrylamide se fait à l'aide des kits suivants :

- Bio-Safe™ Coomassie (Bio-Rad) pour les colorations au bleu de Coomassie.
- Plus One™, Silver Staining kit (Amersham BioScience) pour les colorations à l'argent.

L'identification des cibles levuriennes de la roscovitine a été obtenue après une coloration au bleu de Coomassie. Ce type de coloration permet de visualiser des bandes contenant au moins 8ng de protéines et est facilement compatible avec la spectrométrie de masse. La coloration à l'argent est beaucoup plus sensible : le seuil de visibilité d'une bande est de 0,2ng de protéines par bande. Son utilisation est aussi compatible avec la spectrométrie de masse à condition de modifier en partie le protocole conseillé par le fournisseur : l'utilisation de glutaraldéhyde est à proscrire lors de la coloration.

Western Blot

Cette méthode très courante dans les laboratoires de recherches permet de détecter une protéine dans un échantillon à l'aide d'un anticorps qui la reconnaît spécifiquement. Dans un premier temps, les protéines de l'échantillon sont séparées sur gels de polyacrylamide. Une fois la migration terminée, elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (PROTRAN®, Whatman) : cette étape se fait à l'aide du système *Blot Module* (Invitrogen), sous un courant constant de 200mA pour un gel et 400mA pour deux gels, dans une solution de *Blotting Buffer* et Ethanol (le *Blotting Buffer* 10X est constitué de Tris 250mM, Glycine 1,92M). Afin de s'assurer d'un transfert maximum, cela se fait durant 90 minutes.

Une fois le transfert effectué, la membrane est saturée afin d'éviter une fixation non spécifique de l'anticorps primaire utilisé. Cette phase est réalisée en une heure dans une solution de TBST (pH7.4, NaCl, Tris, Tween-20) contenant 5% de lait en poudre et 1% de BSA. L'anticorps primaire est dilué dans une solution de TBST (le choix de cette dilution se fait en fonction de l'anticorps utilisé : de 1/3000 à 1/500) puis est mis en contact avec la membrane de nitrocellulose ; cette étape se fait sous agitation lente durant une heure à température ambiante ou sur la nuit à 4°C. Suite à une série de lavages au TBST, l'anticorps secondaire, déterminé en fonction de l'hôte ayant généré l'anticorps primaire, est à son tour mis en contact avec la membrane pendant une heure. Cet anticorps secondaire est couplé à

l'enzyme HRP (Horse Radish Peroxidase). C'est grâce à cet élément que la détection du complexe antigène/anticorps sera possible : l'enzyme catalyse l'oxydation du luminol en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ce qui entraîne l'émission de lumière à 430nm. Cette réaction se fait dans une solution d'ECL (*Enhanced Chemiluminescence*) préparée extemporanément : tampon Tris 100mM, H_2O_2 , luminol, acide coumarique. Le résultat est obtenu à l'aide d'une camera CCD (*Charge coupled device*) et du logiciel ChemiCapt fournis par la société Vilber Lourmat.

Test d'activité kinase

Ce test *in vitro* a été réalisé pour la détermination des IC_{50} de diverses drogues sur la kinase de levure Cdc28. L' IC_{50} est la concentration de drogue nécessaire pour inhiber 50% de l'activité kinase d'un complexe CDK/cycline.

Suite à sa purification (voir le protocole d'immunoprécipitation décrit plus haut), le complexe Cdc28/Clb2-HA est incubé à 30°C durant 30 minutes dans un volume réactionnel de 30 μ L. Ce volume contient, 5 μ L de substrat histone H1 (1mg.mL⁻¹), 6 μ L d'ATP[γ -³³P] (15 μ mol.L⁻¹) et des concentrations croissantes de drogues. Le volume final est complété par le tampon C (pH7, β -glycerophosphate 60mM, *p*-nitrophenylphosphate 30mM, MOPS 25mM, EGTA 5mM, MgCl₂ 15mM, DTT 1mM, Na Vanadate 0.1mM). Il faut noter que dans la détermination des IC_{50} développées ici, face aux problèmes de solubilisation qu'elles présentent, les molécules étudiées sont diluées dans une solution de DMSO. Le test kinase se fait avec une concentration constante de 5% DMSO finale. Chaque condition est testée en duplicate.

Suite à l'incubation, 20 μ L de solution sont déposés sur des papiers de phosphocellulose Whatman P81. Ces papiers sont alors lavés trois fois dans une solution d'acide phosphorique 1% avant que les mesures de radioactivité soient effectuées par un compteur (Tri-Carb 2800 TR, Perkin Elmer) en présence de 1mL de liquide de scintillation ACS (Amersham). Les résultats sont exprimés en CPM (coups par minutes) et sont traduits en pourcentage d'activité par rapport au contrôle (mélange réactionnel sans inhibiteur).

Références bibliographiques

A

- Aldea M., Gari E., and Colomina N. (2007). Control of cell cycle and cell growth by molecular chaperones. *Cell Cycle* **6**: 2599-603.
- Arion D., and Meijer L. (1989). M-phase-specific protein kinase from mitotic sea urchin eggs: cyclic activation depends on protein synthesis and phosphorylation but does not require DNA or RNA synthesis. *Exp Cell Res* **183**: 361-75.
- Arion D., Meijer L., Brizuela L., and Beach D. (1988). cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* **55**: 371-8.

B

- Bach S., Blondel M., and Meijer L. (2006a). "Evaluation of CDK inhibitor selectivity: from affinity chromatography to yeast genetics.," CRC Press.
- Bach S., Knockaert M., Reinhardt J., Lozach O., Schmitt S., Baratte B., Koken M., Coburn S. P., Tang L., Jiang T., Liang D. C., Galons H., Dierick J. F., Pinna L. A., Meggio F., Totzke F., Schachtele C., Lerman A. S., Carnero A., Wan Y., Gray N., and Meijer L. (2005). Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J Biol Chem* **280**: 31208-19.
- Bach S., Talarek N., Andrieu T., Vierfond J. M., Mettey Y., Galons H., Dormont D., Meijer L., Cullin C., and Blondel M. (2003). Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol* **21**: 1075-81.
- Bach S., Tribouillard D., Talarek N., Desban N., Gug F., Galons H., and Blondel M. (2006b). A yeast-based assay to isolate drugs active against mammalian prions. *Methods* **39**: 72-7.
- Bagella L., MacLachlan T. K., Buono R. J., Pisano M. M., Giordano A., and De Luca A. (1998). Cloning of murine CDK9/PITALRE and its tissue-specific expression in development. *J Cell Physiol* **177**: 206-13.
- Bamps S., Guiffant D., Galan J., Vandenhaute J., and Blondel M. (2008). Hof1/Cyk2 defines a link between membrane recycling and cytokinesis in yeast. *Biol Cell* **In revision**.
- Bantscheff M., Eberhard D., Abraham Y., Bastuck S., Boesche M., Hobson S., Mathieson T., Perrin J., Raida M., Rau C., Reader V., Sweetman G., Bauer A., Bouwmeester T., Hopf C., Kruse U., Neubauer G., Ramsden N., Rick J., Kuster B., and Drewes G. (2007). Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* **25**: 1035-44.
- Basso A. D., and Doll R. J. (2006). Inhibition of cyclin-dependent kinases - a review of the recent patent literature. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* **1**: 357-67.
- Baudin A., Ozier-Kalogeropoulos O., Denouel A., Lacroute F., and Cullin C. (1993). A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **21**: 3329-30.
- Becker F., Murthi K., Smith C., Come J., Costa-Roldan N., Kaufmann C., Hanke U., Degenhart C., Baumann S., Wallner W., Huber A., Dedier S., Dill S., Kinsman D., Hediger M., Bockovich N., Meier-Ewert S., Kluge A. F., and Kley N. (2004). A three-hybrid approach to scanning the proteome for targets of small molecule kinase inhibitors. *Chem Biol* **11**: 211-23.

- Bettayeb K., Oumata N., Echalié A., Ferandin Y., Endicott J. A., Galons H., and Meijer L. (2008a). CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene*.
- Bettayeb K., Sallam H., Ferandin Y., Popowycz F., Fournet G., Hassan M., Echalié A., Bernard P., Endicott J., Joseph B., and Meijer L. (2008b). N-&-N, a new class of cell death-inducing kinase inhibitors derived from the purine roscovitine. *Mol Cancer Ther* **7**: 2713-24.
- Bi E., Maddox P., Lew D. J., Salmon E. D., McMillan J. N., Yeh E., and Pringle J. R. (1998). Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis. *J Cell Biol* **142**: 1301-12.
- Blondel M., Bach S., Bamps S., Dobbelaere J., Wiget P., Longaretti C., Barral Y., Meijer L., and Peter M. (2005). Degradation of Hof1 by SCF(Grr1) is important for actomyosin contraction during cytokinesis in yeast. *Embo J* **24**: 1440-52.
- Blondel M., Galan J. M., Chi Y., Lafourcade C., Longaretti C., Deshaies R. J., and Peter M. (2000). Nuclear-specific degradation of Far1 is controlled by the localization of the F-box protein Cdc4. *Embo J* **19**: 6085-97.
- Booher R. N., Deshaies R. J., and Kirschner M. W. (1993). Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *Embo J* **12**: 3417-26.
- Boot C. M., Gassner N. C., Compton J. E., Tenney K., Tamble C. M., Lokey R. S., Holman T. R., and Crews P. (2007). Pinpointing pseurotins from a marine-derived *Aspergillus* as tools for chemical genetics using a synthetic lethality yeast screen. *J Nat Prod* **70**: 1672-5.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brehmer D., Greff Z., Godl K., Blencke S., Kurtenbach A., Weber M., Muller S., Klebl B., Cotten M., Keri G., Wissing J., and Daub H. (2005). Cellular targets of gefitinib. *Cancer Res* **65**: 379-82.

C

- Caligiuri M., Molz L., Liu Q., Kaplan F., Xu J. P., Majeti J. Z., Ramos-Kelsey R., Murthi K., Lievens S., Tavernier J., and Kley N. (2006). MASPIT: three-hybrid trap for quantitative proteome fingerprinting of small molecule-protein interactions in mammalian cells. *Chem Biol* **13**: 711-22.
- Canepa E. T., Scassa M. E., Ceruti J. M., Marazita M. C., Carcagno A. L., Sirkin P. F., and Ogara M. F. (2007). INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* **59**: 419-26.
- Chen F., and Studzinski G. P. (2001). Expression of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 activator p35Nck5a in human monocytic cells is associated with differentiation. *Blood* **97**: 3763-7.
- Chen H. H., Wang Y. C., and Fann M. J. (2006). Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Mol Cell Biol* **26**: 2736-45.
- Chen H. H., Wong Y. H., Genevriere A. M., and Fann M. J. (2007). CDK13/CDC2L5 interacts with L-type cyclins and regulates alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* **354**: 735-40.

- Chen K. C., Csikasz-Nagy A., Gyorffy B., Val J., Novak B., and Tyson J. J. (2000). Kinetic analysis of a molecular model of the budding yeast cell cycle. *Mol Biol Cell* **11**: 369-91.
- Chen L., and Davis N. G. (2002). Ubiquitin-independent entry into the yeast recycling pathway. *Traffic* **3**: 110-23.
- Clotet J., Escote X., Adrover M. A., Yaakov G., Gari E., Aldea M., de Nadal E., and Posas F. (2006). Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *Embo J* **25**: 2338-46.
- Clotet J., and Posas F. (2007). Control of cell cycle in response to osmostress: lessons from yeast. *Methods Enzymol* **428**: 63-76.
- Cohen P. (2002). Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* **1**: 309-15.
- Colas P. (2008). High-throughput screening assays to discover small-molecule inhibitors of protein interactions. *Curr Drug Discov Technol* **5**: 190-9.
- Colas P., Serras F., and Van Loon A. E. (1993). Microinjection of suc1 transcripts delays the cell cycle clock in *Patella vulgata* embryos. *Int J Dev Biol* **37**: 589-94.
- Corbel C., Haddoub R., Guiffant D., Lozach O., Gueyrard D., Lemoine J., Ratin M., Meijer L., Bach S., and Goekjian P. (2008). Identification of potential cellular targets of aloisine A by affinity chromatography. *J Med Chem* **Submitted**.

D

- Daub H. (2005). Characterisation of kinase-selective inhibitors by chemical proteomics. *Biochim Biophys Acta* **1754**: 183-90.
- Daub H., Godl K., Brehmer D., Klebl B., and Muller G. (2004a). Evaluation of kinase inhibitor selectivity by chemical proteomics. *Assay Drug Dev Technol* **2**: 215-24.
- Daub H., Specht K., and Ullrich A. (2004b). Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **3**: 1001-10.
- De Azevedo W. F., Leclerc S., Meijer L., Havlicek L., Strnad M., and Kim S. H. (1997). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem* **243**: 518-26.
- Deshaies R. J. (1997). Phosphorylation and proteolysis: partners in the regulation of cell division in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev* **7**: 7-16.
- Dhariwala F. A., and Rajadhyaksha M. S. (2008). An unusual member of the Cdk family: Cdk5. *Cell Mol Neurobiol* **28**: 351-69.
- Dhavan R., and Tsai L. H. (2001). A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 749-59.
- Dujon B. (1996). The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet* **12**: 263-70.

E

- Emter R., Heese-Peck A., and Kralli A. (2002). ERG6 and PDR5 regulate small lipophilic drug accumulation in yeast cells via distinct mechanisms. *FEBS Lett* **521**: 57-61.
- Escote X., Zapater M., Clotet J., and Posas F. (2004). Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat Cell Biol* **6**: 997-1002.
- Espinoza F. H., Ogas J., Herskowitz I., and Morgan D. O. (1994). Cell cycle control by a complex of the cyclin HCS26 (PCL1) and the kinase PHO85. *Science* **266**: 1388-91.

F

Frost A., De Camilli P., and Unger V. M. (2007). F-BAR proteins join the BAR family fold. *Structure* **15**: 751-3.

G

- Galan J. M., Moreau V., Andre B., Volland C., and Haguenaue-Tsapis R. (1996). Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J Biol Chem* **271**: 10946-52.
- Galan J. M., Wiederkehr A., Seol J. H., Haguenaue-Tsapis R., Deshaies R. J., Riezman H., and Peter M. (2001). Skp1p and the F-box protein Rcy1p form a non-SCF complex involved in recycling of the SNARE Snc1p in yeast. *Mol Cell Biol* **21**: 3105-17.
- 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., Edelmann 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.
- Gietz D., St Jean A., Woods R. A., and Schiestl R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425.
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., and Oliver S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546, 563-7.
- Goldstein D. M., Gray N. S., and Zarrinkar P. P. (2008). High-throughput kinase profiling as a platform for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 391-7.
- Gray N. S., Wodicka L., Thunnissen A. M., Norman T. C., Kwon S., Espinoza F. H., Morgan D. O., Barnes G., LeClerc S., Meijer L., Kim S. H., Lockhart D. J., and Schultz P. G. (1998). Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* **281**: 533-8.
- Guertin D. A., Trautmann S., and McCollum D. (2002). Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 155-78.
- Guiffant D., Tribouillard D., Gug F., Galons H., Meijer L., Blondel M., and Bach S. (2007). Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography. *Biotechnol J* **2**: 68-75.
- Guo K., and Walsh K. (1997). Inhibition of myogenesis by multiple cyclin-Cdk complexes. Coordinate regulation of myogenesis and cell cycle activity at the level of E2F. *J Biol Chem* **272**: 791-7.

H

- Hartwell L. H., Culotti J., and Reid B. (1970). Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66**: 352-9.
- Hu D., Mayeda A., Trembley J. H., Lahti J. M., and Kidd V. J. (2003). CDK11 complexes promote pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* **278**: 8623-9.
- Huang D., Friesen H., and Andrews B. (2007). Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol Microbiol* **66**: 303-14.
- Huang D., Patrick G., Moffat J., Tsai L. H., and Andrews B. (1999). Mammalian Cdk5 is a functional homologue of the budding yeast Pho85 cyclin-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14445-50.
- Hunter T., and Plowman G. D. (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci* **22**: 18-22.

I

- Ito H., Fukuda Y., Murata K., and Kimura A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-8.

K

- Kaffman A., Rank N. M., O'Neill E. M., Huang L. S., and O'Shea E. K. (1998). The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* **396**: 482-6.
- Kaiser P., Moncollin V., Clarke D. J., Watson M. H., Bertolaet B. L., Reed S. I., and Bailly E. (1999). Cyclin-dependent kinase and Cks/Suc1 interact with the proteasome in yeast to control proteolysis of M-phase targets. *Genes Dev* **13**: 1190-202.
- Kisselev A. F., Akopian T. N., Woo K. M., and Goldberg A. L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* **274**: 3363-71.
- Knight Z. A., and Shokat K. M. (2007). Chemical genetics: where genetics and pharmacology meet. *Cell* **128**: 425-30.
- Knockaert M., and Meijer L. (2002). Identifying in vivo targets of cyclin-dependent kinase inhibitors by affinity chromatography. *Biochem Pharmacol* **64**: 819-25.
- Knockaert M., Wieking K., Schmitt S., Leost M., Grant K. M., Mottram J. C., Kunick C., and Meijer L. (2002). Intracellular Targets of Paullones. Identification following affinity purification on immobilized inhibitor. *J Biol Chem* **277**: 25493-501.
- Koegl M., Hoppe T., Schlenker S., Ulrich H. D., Mayer T. U., and Jentsch S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**: 635-44.
- Kolaczowska A., and Goffeau A. (1999). Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug Resist Updat* **2**: 403-414.

- Kung C., Kenski D. M., Krukenberg K., Madhani H. D., and Shokat K. M. (2006). Selective kinase inhibition by exploiting differential pathway sensitivity. *Chem Biol* **13**: 399-407.
- Kung C., and Shokat K. M. (2005). Small-molecule kinase-inhibitor target assessment. *Chembiochem* **6**: 523-6.

L

- Labbe J. C., Picard A., Peaucellier G., Cavadore J. C., Nurse P., and Doree M. (1989). Purification of MPF from starfish: identification as the H1 histone kinase p34cdc2 and a possible mechanism for its periodic activation. *Cell* **57**: 253-63.
- Lau W. W., Schneider K. R., and O'Shea E. K. (1998). A genetic study of signaling processes for repression of PHO5 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **150**: 1349-59.
- Lew D. J., and Reed S. I. (1995). Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev* **5**: 17-23.
- Lewis M. J., Nichols B. J., Prescianotto-Baschong C., Riezman H., and Pelham H. R. (2000). Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol Biol Cell* **11**: 23-38.
- Lippincott J., and Li R. (1998). Dual function of Cyk2, a cdc15/PSTPIP family protein, in regulating actomyosin ring dynamics and septin distribution. *J Cell Biol* **143**: 1947-60.
- Lippincott J., and Li R. (2000). Involvement of PCH family proteins in cytokinesis and actin distribution. *Microsc Res Tech* **49**: 168-72.
- Luesch H., Wu T. Y., Ren P., Gray N. S., Schultz P. G., and Supek F. (2005). A genome-wide overexpression screen in yeast for small-molecule target identification. *Chem Biol* **12**: 55-63.

M

- Malumbres M., and Barbacid M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30**: 630-41.
- Manning G., Whyte D. B., Martinez R., Hunter T., and Sudarsanam S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**: 1912-34.
- Mapelli M., Massimiliano L., Crovace C., Seeliger M. A., Tsai L. H., Meijer L., and Musacchio A. (2005). Mechanism of CDK5/p25 binding by CDK inhibitors. *J Med Chem* **48**: 671-9.
- Matushansky I., Radparvar F., and Skoultschi A. I. (2000). Reprogramming leukemic cells to terminal differentiation by inhibiting specific cyclin-dependent kinases in G1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14317-22.
- Meijer L. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie* **5**: 311-326.
- Meijer L., Arion D., Golsteyn R., Pines J., Brizuela L., Hunt T., and Beach D. (1989). Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. *Embo J* **8**: 2275-82.
- Meijer L., Bettayeb, K. and Galons, H. (2006). "(R)-Roscovitine (CYC202, Seliciclib)," CRC Press.

- Meijer L., Borgne A., Mulner O., Chong J. P., Blow J. J., Inagaki N., Inagaki M., Delcros J. G., and Moulinoux J. P. (1997). Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* **243**: 527-36.
- Meijer L., and Raymond E. (2003). Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials. *Acc Chem Res* **36**: 417-25.
- Meijer L., Skaltsounis A. L., Magiatis P., Polychronopoulos P., Knockaert M., Leost M., Ryan X. P., Vonica C. A., Brivanlou A., Dajani R., Crovace C., Tarricone C., Musacchio A., Roe S. M., Pearl L., and Greengard P. (2003). GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem Biol* **10**: 1255-66.
- Meikrantz W., and Schlegel R. (1996). Suppression of apoptosis by dominant negative mutants of cyclin-dependent protein kinases. *J Biol Chem* **271**: 10205-9.
- Mendenhall M. D., al-Jumaily W., and Nugroho T. T. (1995). The Cdc28 inhibitor p40SIC1. *Prog Cell Cycle Res* **1**: 173-85.
- Mendenhall M. D., and Hodge A. E. (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1191-243.
- Meyerson M., Enders G. H., Wu C. L., Su L. K., Gorka C., Nelson C., Harlow E., and Tsai L. H. (1992). A family of human cdc2-related protein kinases. *Embo J* **11**: 2909-17.
- Moffat J., Huang D., and Andrews B. (2000). Functions of Pho85 cyclin-dependent kinases in budding yeast. *Prog Cell Cycle Res* **4**: 97-106.
- Murray A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**: 221-34.

N

- Nigg E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **17**: 471-80.
- Nikolic M., Dudek H., Kwon Y. T., Ramos Y. F., and Tsai L. H. (1996). The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev* **10**: 816-25.
- Ninomiya-Tsuji J., Nomoto S., Yasuda H., Reed S. I., and Matsumoto K. (1991). Cloning of a human cDNA encoding a CDC2-related kinase by complementation of a budding yeast cdc28 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9006-10.
- Nugroho T. T., and Mendenhall M. D. (1994). An inhibitor of yeast cyclin-dependent protein kinase plays an important role in ensuring the genomic integrity of daughter cells. *Mol Cell Biol* **14**: 3320-8.
- Nurse P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**: 503-8.
- Nurse P. (1998). Yoshio Masui and cell cycle control, past, present and future. *Biol Cell* **90**: 447-52.
- Nurse P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* **100**: 71-8.

O

- Overington J. P., Al-Lazikani B., and Hopkins A. L. (2006). How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**: 993-6.

P

- Parsons A. B., Brost R. L., Ding H., Li Z., Zhang C., Sheikh B., Brown G. W., Kane P. M., Hughes T. R., and Boone C. (2004). Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat Biotechnol* **22**: 62-9.
- Patzke H., and Tsai L. H. (2002). Calpain-mediated cleavage of the cyclin-dependent kinase-5 activator p39 to p29. *J Biol Chem* **277**: 8054-60.
- Peter M., and Herskowitz I. (1994). Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* **265**: 1228-31.
- Pines J. (1996). Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins. *Curr Biol* **6**: 1399-402.

R

- Rechsteiner M., and Rogers S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**: 267-71.
- Reichert J. M., and Wenger J. B. (2008). Development trends for new cancer therapeutics and vaccines. *Drug Discov Today* **13**: 30-7.
- Ren S., and Rollins B. J. (2004). Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* **117**: 239-51.
- Reynard G. J., Reynolds W., Verma R., and Deshaies R. J. (2000). Cks1 is required for G(1) cyclin-cyclin-dependent kinase activity in budding yeast. *Mol Cell Biol* **20**: 5858-64.
- Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B., Wilm M., Mann M., and Seraphin B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**: 1030-2.
- Rotin D., Staub O., and Haguenauer-Tsapis R. (2000). Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* **176**: 1-17.

S

- Sage J. (2004). Cyclin C makes an entry into the cell cycle. *Dev Cell* **6**: 607-8.
- Sandal T., Stapnes C., Kleivdal H., Hedin L., and Doskeland S. O. (2002). A novel, extraneuronal role for cyclin-dependent protein kinase 5 (CDK5): modulation of cAMP-induced apoptosis in rat leukemia cells. *J Biol Chem* **277**: 20783-93.
- Santamaria D., Barriere C., Cerqueira A., Hunt S., Tardy C., Newton K., Caceres J. F., Dubus P., Malumbres M., and Barbacid M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* **448**: 811-5.
- Schwob E., Bohm T., Mendenhall M. D., and Nasmyth K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* **79**: 233-44.
- Semple C. A. (2003). The comparative proteomics of ubiquitination in mouse. *Genome Res* **13**: 1389-94.
- Shimada A., Niwa H., Tsujita K., Suetsugu S., Nitta K., Hanawa-Suetsugu K., Akasaka R., Nishino Y., Toyama M., Chen L., Liu Z. J., Wang B. C., Yamamoto M., Terada T.,

- Miyazawa A., Tanaka A., Sugano S., Shirouzu M., Nagayama K., Takenawa T., and Yokoyama S. (2007). Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. *Cell* **129**: 761-72.
- Sia R. A., Herald H. A., and Lew D. J. (1996). Cdc28 tyrosine phosphorylation and the morphogenesis checkpoint in budding yeast. *Mol Biol Cell* **7**: 1657-66.
- Siniosoglou S., Peak-Chew S. Y., and Pelham H. R. (2000). Ric1p and Rgp1p form a complex that catalyses nucleotide exchange on Ypt6p. *Embo J* **19**: 4885-94.
- Soe R., Mosley R. T., Justice M., Nielsen-Kahn J., Shastry M., Merrill A. R., and Andersen G. R. (2007). Sordarin derivatives induce a novel conformation of the yeast ribosome translocation factor eEF2. *J Biol Chem* **282**: 657-66.
- Spencer S., Dowbenko D., Cheng J., Li W., Brush J., Utzig S., Simanis V., and Lasky L. A. (1997). PSTPIP: a tyrosine phosphorylated cleavage furrow-associated protein that is a substrate for a PEST tyrosine phosphatase. *J Cell Biol* **138**: 845-60.
- Strickland L. I., and Burgess D. R. (2004). Pathways for membrane trafficking during cytokinesis. *Trends Cell Biol* **14**: 115-8.

T

- Tang Y., and Reed S. I. (1993). The Cdk-associated protein Cks1 functions both in G1 and G2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **7**: 822-32.
- Terstappen G. C., Schlupen C., Raggiacchi R., and Gaviraghi G. (2007). Target deconvolution strategies in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **6**: 891-903.
- Thuret J., and Mann C. (1998). Cell cycle activating kinases: in vivo veritas? *Medecine Sciences* **14**: 215-218.
- Thuret J. Y., Valay J. G., Faye G., and Mann C. (1996). Civ1 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase. *Cell* **86**: 565-76.
- Tintignac L. A., Leibovitch M. P., Kitzmann M., Fernandez A., Ducommun B., Meijer L., and Leibovitch S. A. (2000). Cyclin E-cdk2 phosphorylation promotes late G1-phase degradation of MyoD in muscle cells. *Exp Cell Res* **259**: 300-7.
- 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**: 808-13.
- Tribouillard-Tanvier D., Beringue V., Desban N., Gug F., Bach S., Voisset C., Galons H., Laude H., Vilette D., and Blondel M. (2008). Antihypertensive drug guanabenz is active in vivo against both yeast and mammalian prions. *PLoS ONE* **3**: e1981.
- Tsihlias J., Kapusta L., and Slingerland J. (1999). The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med* **50**: 401-23.
- Tyers M., Tokiwa G., and Futcher B. (1993). Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *Embo J* **12**: 1955-68.

V

- Vallen E. A., Caviston J., and Bi E. (2000). Roles of Hof1p, Bni1p, Bnr1p, and myo1p in cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11**: 593-611.
- van den Hazel H. B., Pichler H., do Valle Matta M. A., Leitner E., Goffeau A., and Daum G. (1999). PDR16 and PDR17, two homologous genes of *Saccharomyces cerevisiae*, affect lipid biosynthesis and resistance to multiple drugs. *J Biol Chem* **274**: 1934-41.
- Vesely J., Havlicek L., Strnad M., Blow J. J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D. S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S., and et al. (1994). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* **224**: 771-86.

W

- Wan Y., Hur W., Cho C. Y., Liu Y., Adrian F. J., Lozach O., Bach S., Mayer T., Fabbro D., Meijer L., and Gray N. S. (2004). Synthesis and target identification of hymenialdisine analogs. *Chem Biol* **11**: 247-59.
- Wiederkehr A., Avaro S., Prescianotto-Baschong C., Haguenuer-Tsapis R., and Riezman H. (2000). The F-box protein Rcy1p is involved in endocytic membrane traffic and recycling out of an early endosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **149**: 397-410.

Y

- Yu V. P., and Reed S. I. (2004). Cks1 is dispensable for survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Cycle* **3**: 1402-4.
- Yun X., Wu Y., Yao L., Zong H., Hong Y., Jiang J., Yang J., Zhang Z., and Gu J. (2007). CDK11(p58) protein kinase activity is associated with Bcl-2 down-regulation in pro-apoptosis pathway. *Mol Cell Biochem* **304**: 213-8.

Z

- Zahler S., Tietze S., Totzke F., Kubbutat M., Meijer L., Vollmar A. M., and Apostolakis J. (2007). Inverse in silico screening for identification of kinase inhibitor targets. *Chem Biol* **14**: 1207-14.
- Ziauddin J., and Sabatini D. M. (2001). Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature* **411**: 107-10.

Annexes

Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography.

Guiffant D., Tribouillard D., Gug F., Galons H., Meijer L., Blondel M., and Bach S.
Biotechnology Journal. 2007, 2, 68-75.

Les molécules de bas poids moléculaire représentent une classe importante de composés à fort potentiel thérapeutique. Les meilleurs d'entre eux doivent présenter à la fois une forte efficacité et une sélectivité optimale afin de répondre aux deux critères les plus importants pour le développement clinique d'une molécule : efficacité et innocuité. Le but est donc de déterminer quel inhibiteur est le plus efficace contre les cibles d'intérêt, tout en n'engendrant pas d'effets secondaires par l'inhibition de cibles secondaires (*off targets*). Une des techniques envisageables pour déterminer les cibles d'un composé est la chromatographie d'affinité sur billes d'inhibiteurs immobilisés. Cette méthode, couramment employée au laboratoire, permet de purifier et d'identifier les cibles dont l'inhibition entraîne l'effet curatif souhaité, mais aussi les cibles secondaires qui permettront d'envisager les effets secondaires possibles de la molécule. Dans ce document, la technique de chromatographie d'affinité est détaillée, de la mise en place de la matrice à l'identification des cibles fixées.