



FUNDP  
Faculté des Sciences  
Département de Biologie  
Unité de Recherche en Biologie Moléculaire  
Laboratoire de Génétique Moléculaire (GEMO)

Rue de Bruxelles, 61  
B-5000 Namur  
Belgique

## Etude des kinases activatrices de Cdc2 chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*

Dissertation présentée par  
**Maxime Devos**  
En vue de l'obtention du grade  
De Docteur en Sciences

Composition du jury :  
Dr. Anabelle Decottignies, UCL  
Dr. Isabelle Georis, ULB  
Pr. Thierry Arnould, FUNDP  
Pr. Jean-Yves Matroule, président de jury, FUNDP  
Dr. Damien Hermand, promoteur, FUNDP

2009

## **Etude des kinases activatrices de Cdc2 chez la levure *Schizosaccharomyces pombe***

par Maxime Devos

Les kinases dépendantes des cyclines (CDK) appartiennent à un groupe de protéines kinases impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la régulation de la transcription. Pour être actives, les CDK doivent être phosphorylées par une kinase activatrice nommée CAK (Cdk-activating kinase). La levure de fission *Schizosaccharomyces pombe* possède deux types de CAK : le complexe trimérique Mcs6-Mcs2-Pmh1 et la protéine monomérique Csk1. Mcs6 et Csk1 sont toutes les deux capables de phosphoryler et d'activer Cdc2, la CDK régulant le cycle cellulaire, *in vitro* mais des données génétiques fortes indiquent que seule Mcs6 active Cdc2 *in vivo*. L'utilisation d'un mutant de Mcs6 sensible à un analogue d'ATP montre que la seule inactivation de Mcs6 est nécessaire et suffisante pour abolir la phosphorylation de Cdc2 *in vivo*. Nos données indiquent également que Csk1, contrairement à la kinase apparentée Cak1, est incapable d'immunoprécipiter et de phosphoryler Cdc2 à partir d'un lysat de levure de fission. Nos résultats établissent que Mcs6 est l'authentique CAK *in vivo* de Cdc2 chez *S. pombe*.

*Mots-clefs* : *Schizosaccharomyces pombe* ; Cdk-activating kinases ; Mcs6 ; Csk1 ; mutant « analogue sensitive »

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
Faculté des Sciences  
Rue de Bruxelles, 61 B-5000 Namur, Belgique

## **Study of Cdc2-activating kinases in *Schizosaccharomyces pombe***

by Maxime Devos

Cyclin-dependent kinases (CDK) belong to a group of kinases involved in both cell cycle control and transcription regulation. To be fully active, CDKs require phosphorylation by a Cdk-activating kinase (CAK). The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* possesses the two types of CAK : trimeric Mcs6-Mcs2-Pmh1 complex and monomeric Csk1 protein. Mcs6 and Csk1 can both phosphorylate and activate Cdc2, the main cell cycle regulator, *in vitro*. However, strong genetic data indicate that only Mcs6 activates Cdc2 *in vivo*. Analysis of an analog-sensitive mutant of Mcs6 show that the sole inactivation of Mcs6 is necessary and sufficient to abolish Cdc2 phosphorylation *in vivo*. Our data also indicate that Csk1, contrary to the related kinase Cak1, is unable to precipitate and phosphorylate Cdc2 from a fission yeast lysate. Here we establish that Mcs6 is the genuine CAK *in vivo* of Cdc2 in *S. pombe*.

**Keywords :** *Schizosaccharomyces pombe* ; Cdk-activating kinases ; Mcs6 ; Csk1 ; analogue sensitive mutant

Suite à un changement radical de sujet en milieu de thèse, vous trouverez dans ce manuscrit une partie en annexe sur l'étude de la protéine vacuolaire Spp40. En effet, le sujet originel de ma thèse portait sur l'étude de cette protéine vacuolaire de fonction inconnue, mais les recherches sur celle-ci n'apportant pas de résultats suffisamment concluants, un changement de sujet a donc été effectué. Ma thèse a dès lors été réorientée vers l'étude de l'activation des kinases dépendantes des cyclines, sujet principalement développé dans ce manuscrit.

## Remerciements

La rédaction de remerciements est bien plus compliquée qu'on ne le pense. Durant ces quatre années de thèse, il s'est passé tellement de choses et il y a donc beaucoup de personnes à remercier. Je vais tenter de n'oublier personne, mais les oubliés pourront toujours envoyer une lettre de réclamation à l'adresse suivante : rue du tout simplement n°7, 90210 Pountakana. Mon équipe d'experts se fera un plaisir de vous répondre dans les plus brefs délais (minimum trois ans comme chez Mobistar) et un bon pour un Quick gratuit sera offert à la millième plainte (et oui, j'ai des actions chez Quick depuis l'incident du Suprême Pepper). Comme vous pouvez le comprendre après la lecture de ces quelques lignes, ces remerciements seront remplis de « private joke » que seules les personnes concernées pourront généralement comprendre...

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux membres du jury de cette thèse, le Dr. Anabelle Decottignies, le Dr. Isabelle Georis, le Pr. Thierry Arnould, le Pr. Jean-Yves Matroule et le Dr. Damien Hermand, qui ont permis par leur lecture critique, l'épanouissement final de ce travail. Merci à vous.

Je remercie tout particulièrement mon promoteur le Dr. Damien Hermand ! Merci pour ton accueil dans un laboratoire aussi bien organisé et poussant à l'épanouissement scientifique. Je tiens particulièrement à te remercier car si je suis ici, aujourd'hui, à défendre cette thèse, c'est en grande partie grâce à toi. Tu m'as appris qu'il ne faut pas baisser les bras trop vite et que la persévérance est souvent payante. Je te remercie également pour avoir opéré en temps voulu les changements indispensables à la finition de ma thèse. Merci enfin pour ton professionnalisme et ton énorme savoir scientifique !

Parlons maintenant de mon mémoire de fin d'études effectué à Boston grâce au Prof. J. Vandenhoute et au Dr. M. Vidal. Trois mois géniaux passés de l'autre côté de l'Atlantique avec Géraldine (dont le nom de code est Gégé) ! Ma « collègue » de cours et amie avec qui j'ai pu partager, en plus de ces quelques mois aux USA, pas mal de choses pendant ma thèse. Merci beaucoup pour m'avoir ouvert (avec cette chère Pascale) les portes d'endroits que même Jennifer Grey et Patrick Swayze (RIP) envieraient. En pensant à Boston, je pense directement à Melissa Price ; à la machine à laver « tueuse » ; à l'énorme chat ; au magasin Trader Joe's ; au « T » et à ses conductrices hurlant (le mot est faible) le nom des stations ; à la cantine du Children Hospital et son futuriste robot nettoyeur, aux vendredis pizzas-séminaires ; à Tracey et aux autres membres du labo ; aux descentes de ski sur le postérieur (j'ordonne qu'on supprime définitivement cette vidéo d'ailleurs !!!) ; à l'énorme monticule de neige à côté du parking ; à notre cher voisin Monsieur McDonalds ; au passage piéton en diagonal ; au Burger King et son Ultimate Burger ; à Denver et son jacuzzi... Que de bons souvenirs !

Tant que je parle de Boston et donc plus particulièrement de mes années de licence, il faut que j'évoque l'organisation non gouvernementale dont je faisais partie : le groupe « AB »... « AB » pour « Avec Biologiste » (officiellement en tout cas) car c'était un groupe composé de chimistes mais dirigé par un biologiste : moi ! (j'espère qu'elles ne liront jamais ça ☺). Les deux Isa(s), Céline, Audrey, Cindy et « Billy », je vous remercie pour ces quatre chouettes années. Je pense que mon corps et particulièrement mon estomac n'oublieront jamais nos pré-soirées suralcoolisées réalisées avant chaque festivité estudiantine... Un jour, c'est promis, je retenterai le Martini Fiero ! Puis, il y a également ma petite Mouscronnoise préférée : Tiffany. Que de fous rires et autres délires passés

ensemble durant nos années d'études. Merci aussi d'avoir été là quand j'avais besoin de toi, je t'embrasse et à très bientôt !

Au tour des membres du bureau GEMO maintenant. Ma thèse commence en octobre 2005 avec ma première manip qui consiste à aider durant l'aménagement du laboratoire de Damien... Évidemment pour quelqu'un d'aussi sportif et costaud que moi (j'ai une carte de sport depuis bientôt trois ans ☺) le déplacement de congélateur géant ne pose aucun problème ! Je suis heureux d'avoir pu assister à la création du labo de Damien dans lequel j'ai travaillé durant les quatre années suivantes. Mes deux premiers collègues de travail ont été Monique et Allan. Allan, tu es un garçon un peu timide au premier abord mais qui se révèle être quelqu'un de fort bien sympathique et un excellent collègue. Je te remercie pour tes conseils concernant aussi bien les manips, que la gestion du temps de la thèse. Ah, oui, je te suis également reconnaissant pour avoir tenté de m'introduire à l'univers de Steve Jobs et de ses Macintoshs... Alors que j'étais, à l'époque, 100% pro-PC, je suis aujourd'hui un des plus grands défenseurs d'Apple et des produits « pommés »... Aussi Allan, j'ai failli oublier de te remercier pour m'avoir refilé, pendant toutes ces années, la joie (=corvée) d'être responsable de la chambre noire et donc de devoir changer les bains de révélation/fixation. Un vrai plaisir, merci ! Je suis tellement heureux d'avoir pu passer le flambeau à une nouvelle victime : Fanélie ☺ ! Enfin, tout ça pour te dire que j'ai été ravi de passer ces deux premières années à tes côtés dans notre bureau. Juste une petite chose pour finir : le fait de porter un col roulé ne veut pas automatiquement dire qu'on a des marques à cacher (quelqu'en soit leur origine) dans le cou ! D'ailleurs, le pull-over était particulièrement à la mode en septembre 2006 ! Monique, tu es une vraie encyclopédie sur le travail au laboratoire. Une question ? La première chose à faire est de demander à Monique ! Je te dois énormément, aussi bien d'un point de vue professionnel que personnel. Merci d'avoir accepté l'énergumène que je suis et ce malgré certains de mes choix de vie ☺. Et puis, thank you (ah non, c'est vrai, je dois éviter l'anglais, si seulement je savais parler italien) pour la gestion de la « beer hour » ! Je suis heureux d'avoir pu être ton assistant pendant ces quelques années, bravo à toi pour ta gestion de cette tradition « génétique ». Monique, je te souhaite que du bonheur pour la suite, de toute façon avec ton superbe siège de jardin, je suis certain que cela ne peut que bien se passer pour toi !

Arrivé à mi-thèse, deux extraterrestres ont débarqué dans le bureau... Il s'agissait des deux premières mémorissantes en GEMO : Julie et Fanélie. Votre arrivée a vraiment re-dynamisé le bureau et l'ambiance en GEMO. Julie, experte en immunoprécipitation chromatinienne et Fanélie, reine incontestée du micromanipulateur et du microscope. Les bons moments à charrier Julie (toujours gentiment bien évidemment) étaient vraiment très exquis. Fanélie, tu es une collègue très professionnelle et investie dans ton travail. Ton job, c'est ta passion et je suis certain que tu feras une très belle carrière... Je serais curieux de savoir le nombre d'heures que tu as passées devant les séries TV américaines ! Quoique ces dernières semaines, ton débit a grandement diminué à cause de... ta nouvelle passion pour l'alcool (nous, en d'autres termes) ! Une dernière chose concernant les séries TV, arrête de regarder ce stupide truc où il y a soi-disant un geek qui me ressemble !! Durant ces derniers mois, on est passé du stade de collègues à amis et ça, c'est vraiment sympa. Continue sur ta lancée et de toute façon, on reste en contact, tu verras c'est super difficile de se débarrasser de moi (de toute façon étant donné qu'on habite à 3 minutes l'un de l'autre, même si je voulais t'ignorer, cela serait impossible ☺).

L'année suivante, une nouvelle mémorissante est arrivée dans le bureau : Caroline. Tu es une fille très chouette et j'ai été content de passer ces quelques mois en ta compagnie. Bonne chance pour la suite !

On arrive tout doucement au mémorisant de la dernière année de ma thèse : Philippe, heu enfin Paul... Bon, pour mettre tout le monde d'accord, je vais l'appeler ici « PhiPaul » ou « Paulophilippe ». Un chouette mec, facile à vivre, coool, décontracté et très marrant. Quelle belle intégration dans le groupe ! Bon courage pour la suite et pour ta défense de mémoire quelques jours après moi... Je suis certain que tu vas gérer ça parfaitement.

Puis, il y a eu l'invasion française en GEMO avec l'arrivée de la fameuse post-doc : Julie ! Il m'est impossible d'oublier ta première visite dans le labo étant donné qu'après ton départ, j'ai été victime d'un harcèlement (moral et physique) par... Anne-Michèle Van Damme (ah non, Vandamme !) ! Combien de fois ai-je entendu : « Des nouvelles de la post-doc ? », « Elle arrive quand ? », « Elle va travailler sur quoi ? », « Elle ressemble à quoi ? »... Heureusement qu'à l'époque tu ne possédais pas les SMS gratuits car cela aurait viré au cauchemar ☺ Ah cette Miche Miche, il n'en existe qu'une seule sur terre, ça c'est certain et... heureusement ! On a sympathisé super vite, j'ai de suite réalisé que tu pouvais devenir mon souffre-douleur et que, en plus, tu en retirais pas mal de plaisir. Que de belles discussions sur l'iPhone dans la pièce pesée pendant la réalisation des nombreux réactifs pour mon test CPY. Merci pour ta sponsorship de €0,60, dans l'achat de l'iPhone 3G. Cette somme a au moins permis de payer la taxe recupel... Bravo, tu fais dans l'écologie, c'est Fanélie qui va être heureuse. Enfin, Anne-Michèle j'ai encore plein de choses à te dire, mais il vaut mieux, pour moi et ma prestigieuse réputation, que je te les dise oralement car ça ne laisse aucune trace matérielle. Bon à cause d'Anne-Michèle, je suis encore en train de m'égarer ! Revenons à Julie, la post-doc. Quelques mois après ta première visite, tu es enfin arrivée au labo. Venant tout droit d'une ville ensoleillée comme Bordeaux, tu as vite compris qu'en Belgique, le soleil était plus souvent dans le cœur des gens que dans le ciel (comme c'est beau !!!) Tu as vite été intégrée dans notre petit groupe et tu as vite adhéré aux traditions belges (bières, frites, bières, chocolats et encore bière) ! J'espère que tu vas garder bien précieusement ton somptueux masque du Rock Da Pop car il symbolise une soirée exceptionnelle qu'on a passée ensemble ! Enfin, il y a eu une myriade de soirées, verres, Peanuts et je suis certain qu'il y en aura encore bien d'autres. D'ailleurs, j'ai toujours trois bouteilles de Laurent Perrier dans mon frigo... Tout ça pour dire que ça a été un plaisir pour moi de travailler avec toi, tu es une fille très brillante et je te souhaite bonne chance pour la suite !

À côté du bureau GEMO, il y a aussi eu toutes les autres personnes de l'URBM ! Tout d'abord, merci à Richard pour toutes les chouettes soirées qu'on a passées ensemble et avec les autres membres de notre petit groupe. Nos escapades à Bruxelles ont toujours été très amusantes et Werchter a été grandiose (Lady Gaga Power) ! Et c'est sans parler des nombreuses soirées Xbox passées ensemble à défoncer du Locusts, je peux te l'avouer maintenant, ma nature pacifique m'obligeait à m'imaginer que ces créatures étaient des Anne-Michèles pour pouvoir les tuer ! On est ami et on le restera (je n'ai pas l'habitude de couper les ponts facilement, quoi qu'il ait été dit ☺). Dans quelques mois, tu seras à ma place, la fin approche aussi pour toi et j'espère que tu trouveras le post-doc de tes rêves ! Et puis, je ne peux pas oublier cette chère Rose-Ma, toujours partante pour un bon barbecue, une bonne soirée FUNDP et surtout pour une bonne beer hour ! C'est avec grand plaisir que je partageais notre Chimay Rouge hebdomadaire. Un changement radical de vie s'annonce également pour toi et je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite. Merci à Isa, France et Aurélie qui étaient toujours présentes à nos réunions GEMO pour nous donner des conseils avisés. Je n'oublie pas Dédé avec nos parties de Resident Evil 5, ainsi que les nombreux verres consommés ensemble. Il nous reste encore 10 Maes à écouler d'ailleurs, mais cette fois-ci on va essayer de trouver d'autres volontaires pour nous accompagner ! Merci à Aurore ou plutôt Bobine/Kiki (c'est quand même mieux que l'autre) pour tous

ces bons moments, le dernier en date est le réveillon de la nouvelle année. Merci aussi pour ton aide lors de la préparation de mon gâteau GEMO au sucre ☺. Reste plus qu'à planifier notre prochaine sortie dans notre belle capitale ! Merci Marie G pour ta bonne humeur et tes photos de stars (je dois avouer que tu as largement gagné notre petit jeu). Merci à Sophie qui a été ma collègue de paillasse en GEMO durant quelques semaines. Merci à l'ensemble des chefs de l'URBM pour la gestion de cette unité où il fait vraiment bon vivre. Et bien évidemment j'ai également une pensée pour tous les autres URBMiens sans qui, ces 4 années, n'auraient pas été aussi chouettes ! Je remercie également le personnel des autres unités des FUNDP et particulièrement l'équipe du Prof. M. Jadot qui m'a grandement assisté sur le projet « p40 ».

Je m'écarte un peu du laboratoire maintenant... Commençons par ma « PrincesS\* », ou plutôt Jen, on a partagé bien trop de choses pour utiliser nos anciens pseudos. Je me souviens encore très bien de ce soir-là sur le rebord de l'ancienne Fortis quand une jeune inconnue est venue m'accoster en me disant qu'elle était PrincesS\*... Tu es une fille géniale et toujours de bonne humeur (à part quand tu as mal aux pieds car à ces moments-là mieux vaut se mettre aux abris). On a passé de superbes soirées ensemble, tu te souviens de la soirée « fête nationale » avec Erica, la reine de l'accordéon, ou encore de notre petite expédition parisienne. Des moments inoubliables ! J'espère pouvoir te rendre visite durant ton escapade québécoise !

En parlant des personnes que j'ai rencontrées aux « caves », il m'est impossible de ne pas parler de Miss Kiwi, ou plutôt Kimberliiii comme tu aimes que je t'appelle. Ça fait un petit paquet d'années qu'on se connaît et des soirées alcoolisées ensemble il y en a eu beaucoup. Parfois trop alcoolisées, d'ailleurs, je tiens d'ailleurs à te rappeler que la consommation excessive de Gold Stike (surtout flambé directement dans la bouche) est incompatible avec l'ascension d'escalier, même celui de ton propre appartement. Et puis, j'ai une seule chose à dire : vive la victoire de Mathias ! Quelle folie pendant ces vendredis soirs et particulièrement cette soirée-là, heureusement pour nous que le ridicule ne tue pas. Comment oublier notre folle virée en cuistax à la mer du nord avec Alex, Alison et Laurent. J'espère que la police a finalement abandonné les recherches du cuistax fou... Tout ça pour vous remercier ta sœur et toi d'être là. Même si vous avez toutes les deux votre petit caractère, on se marre toujours énormément ensemble. Puis, je suis Max, hein, comment ne pas s'amuser avec moi !? Au fait, on va boire un p'tit verre vendredi soir ? J'en profite aussi pour remercier toutes les chouettes personnes que j'ai côtoyées dans le cadre des « caves ».

Au tour de Salombooo ou plutôt Laetitia. Encore une personne au grand cœur que j'ai eu la chance de rencontrer durant mon périple namurois... Quand je repense à nos premiers messages échangés, de vrais romans mais OMG qu'est ce qu'ils étaient drôles. Trois années après quand je m'amuse à les relire, je suis toujours plié en au moins dix morceaux ! Puis, après l'échange de nombreux messages, on a quand même pris le risque de se rencontrer... Ah non, c'est vrai, petite rectification, on s'est rencontré par hasard parmi des milliers de personnes aux fêtes de la Wallonie à Namur. En y repensant c'était tellement improbable qu'on tombe nez à nez ce soir-là... Des fêtes de la Wallonie magiques cette année-là. Les activités qu'on a réalisées resteront gravées dans ma tête pendant encore au moins 34 ans (tu remarques la précision, hein). Tu te souviens du souper de Laurent avec Christine, la petite québécoise, tabernacle mais quelle folie ce soir-là ! J'ai passé à tes côtés des moments très forts et parfois aussi émotionnellement très intenses. Je suis heureux d'avoir pu être à tes côtés lors de moments difficiles comme tu l'as été pour moi. Merci ma belle ! On formait une bien belle équipe,

dommage que le temps et les événements nous aient poussés à un peu s'éloigner, mais ce n'est que partie remise ! On va vite rattraper ça dans les semaines à venir.

Il m'est impossible de ne pas parler de Laurent et de ses amis dans mes remerciements ! Tout d'abord, merci à toi Laurent pour ce tu m'as apporté, tu as été à l'origine d'un tournant important dans ma vie et je t'en remercie. Tu es un type bien et bonne chance pour la suite. Ingrid, j'ai vraiment passé de chouettes moments avec toi : les soirées à ton kot, les guindailles, le séjour à Salamanke... De plus, alors que j'étais convaincu de perdre contact avec l'ensemble de votre groupe, tu m'as prouvé que je n'étais pas simplement l'ami de ton ami mais qu'on était réellement amis ! D'ailleurs, c'est toujours avec un énorme plaisir que je fais des guindailles avec toi. La dernière en date, la Saint-Nicolas, a encore été fameuse ☺. Bon voyage en Australie et profite un Max ! Céline et ta superbe chevelure, on a également passé pas mal de soirées fort sympathiques ensemble. Tu m'as souvent bien fait rigoler avec ton audace et ce particulièrement durant le carnaval des ours (quelle folie cet après-midi-là) ! Jean-Pol tu es une personne extra, de chouettes moments passés avec toi, que cela soit pendant les soirées ou encore les virées à Récréalle, à Ikea ou à Poisson d'or ! J'espère qu'on aura bientôt l'occasion de se boire un petit verre et tu verras, j'ai bien changé, maintenant il faut littéralement m'arracher de mon verre pour m'obliger à quitter le café ☺ Merci à Nico pour ses enseignements sur la portée de kayak, Sylvie pour tous ses bons plans sur les guindailles namuroises, Apo pour son amour des boules chat et Elodie pour sa sympathie et sa bonne humeur constante ! Je remercie aussi toutes les autres personnes que j'ai rencontrées dans le cadre de votre petit groupe. Je vous souhaite à tous plein de bonheur pour la suite !

Plus globalement, je dois aussi remercier Apple et son iPhone 3G(S), Facebook et tous mes « amis » que je matraque d'actualités, Quick et tous ses repas si équilibrés, Leffe et sa présence tout au long de mes soirées, mes compagnons de trains Namur-Bruxelles et toutes les folles soirées passées à Bruxelles, les Wallos et les chouettes rencontres que j'ai pu y faire, Namur et ses taxes communales de seconde résidence, le FNRS et sa bourse assez sympathique, les lunettes dirty et la classe qu'elles m'ont généralement donnée ...

Il serait certainement honteux d'oublier le plus important : ma famille ! Merci à Maman et Papa pour m'avoir permis de m'envoler vers la belle ville de Namur après mes études secondaires ! Votre soutien, même avec les 110 km (je viens de vérifier sur l'application Google Map de mon iPhone 3GS) qui séparent Namur de Tournai, m'a toujours aidé à surmonter les épreuves rencontrées durant ces huit dernières années. Merci aussi à ma petite Maman pour les montagnes de linges que tu as eu à laver. Maman, j'ai une bonne nouvelle pour toi, il y en aura encore durant les 10 années à venir ☺. Prochain investissement : l'iPhone 4G et non pas une machine à laver ! Je n'oublie pas de remercier ma grande sœur, Delphine, et toute sa petite famille (JP, Alex et Bibi ☺), ainsi que ma petite sœur Julie pour leur présence.

# TABLE DES MATIERES

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABLE DES MATIERES.....                                                                         | 10 |
| ABREVIATIONS.....                                                                               | 13 |
| INTRODUCTION .....                                                                              | 16 |
| I. Le cycle cellulaire et la protéine Cdc2.....                                                 | 2  |
| 1. Généralités sur le cycle cellulaire.....                                                     | 2  |
| 2. Le cycle cellulaire chez la levure <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....                    | 3  |
| 2.1 Généralités sur <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....                                      | 3  |
| 2.2 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> et l'étude du cycle cellulaire.....                        | 3  |
| 2.3 Cycle biologique de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....                                  | 4  |
| 2.4 Comparaison entre <i>Schizosaccharomyces pombe</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..... | 5  |
| 3. Les kinases dépendantes des cyclines (CDK).....                                              | 6  |
| 4. Implication des CDK dans le cycle cellulaire et la transcription.....                        | 8  |
| 5. Régulation du complexe Cdc2/Cdc13 de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....                  | 9  |
| II. Etude de la famille des kinases Cdk7 .....                                                  | 12 |
| 1. Caractérisation de Cdk7 chez les métazoaires : .....                                         | 12 |
| 1.1 Découverte de l'activité CAK de Cdk7 (=Mo15) sur les CDK .....                              | 12 |
| 1.2 Découverte de l'activité kinase de Cdk7 sur le CTD .....                                    | 13 |
| 2. Caractérisation de Kin28 chez <i>S. cerevisiae</i> : .....                                   | 16 |
| 3. Confirmation de la fonction CAK de Cdk7.....                                                 | 16 |
| III. Etude de la famille des kinases Cak1 .....                                                 | 17 |
| 1. Découverte de la CAK de <i>S. cerevisiae</i> : Cak1.....                                     | 17 |
| 2. Particularités des kinases de la famille Cak1 .....                                          | 17 |
| IV. Situation chez <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....                                       | 19 |
| 1. Étude de Mcs6, homologue chez <i>S. pombe</i> de Cdk7.....                                   | 19 |
| 1.1 Découverte des mutants mcs « mitotic catastrophe suppressors » .....                        | 19 |
| 1.2 Interaction allèle-spécifique entre <i>mcs2/mcs6</i> et <i>cdc2</i> .....                   | 19 |
| 1.3 Identification et caractérisation du gène <i>mcs2</i> .....                                 | 20 |
| 1.4 Identification et caractérisation du gène <i>mcs6</i> .....                                 | 20 |
| 2. Etude Csk1, homologue chez <i>S. pombe</i> de Cak1 .....                                     | 20 |
| 2.1 Découverte et identification de Csk1.....                                                   | 20 |
| 2.2 Activation du complexe Mcs6/Mcs2 par Csk1 .....                                             | 20 |
| 2.3 Existence d'une fonction CAK de Csk1 sur Cdc2 ?.....                                        | 21 |
| OBJECTIFS.....                                                                                  | 22 |
| RESULTATS.....                                                                                  | 24 |
| I. Etude <i>in vivo</i> des rôles de Mcs6 .....                                                 | 25 |
| 1. Rappel des fonctions de Mcs6 .....                                                           | 25 |
| 2. Création et caractérisation d'un mutant « analogue sensitive » <i>mcs6-as</i> .....          | 25 |
| 2.1 Création du mutant <i>mcs6-as</i> .....                                                     | 25 |
| 2.2 Caractérisation du mutant <i>mcs6-as</i> .....                                              | 28 |
| 2.3 Amélioration du mutant <i>mcs6-as</i> .....                                                 | 28 |
| 2.4 Utilisation du mutant <i>mcs6-as2</i> avec le N <sup>6</sup> -(benzyl)-ATP .....            | 31 |
| 3. Inhibition de l'activité de Mcs6-as2 <i>in vivo</i> avec le 3-MB-PP1 .....                   | 33 |
| 3.1 Effet de l'inhibition sur la fonction CAK de Mcs6 .....                                     | 33 |
| 3.1.1 Effet sur la phosphorylation de Cdc2.....                                                 | 33 |
| 3.1.2 Effet sur l'activité kinase de Cdc2.....                                                  | 33 |
| 3.2 Effet de l'inhibition sur la fonction « CTD kinase » de Mcs6.....                           | 35 |

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4. Complémentation partielle du mutant <i>mcs6-as2</i> par la kinase Cak1 de <i>S. cerevisiae</i> .....                                | 35 |
| 4.1 Effet de l'expression de Cak1 sur la fonction CAK de Mcs6 .....                                                                    | 35 |
| 4.1.1 Effet sur la phosphorylation de Cdc2 .....                                                                                       | 35 |
| 4.1.2 Effet sur l'activité kinase de Cdc2 .....                                                                                        | 35 |
| 4.2 Effet de l'expression de Cak1 sur la fonction « CTD kinase » de Mcs6 .....                                                         | 35 |
| 4.3 Complémentation partielle du phénotype de <i>mcs6-as2</i> par Cak1 .....                                                           | 36 |
| 5. Conclusion sur l'étude des rôles de Mcs6 <i>in vivo</i> .....                                                                       | 36 |
| II. Etude <i>in vivo</i> des mutants <i>CAK1-as</i> et <i>csk1-as</i> .....                                                            | 38 |
| 1. Rappel de l'ambiguïté de la relation Csk1-Cdc2 .....                                                                                | 38 |
| 2. Création des mutants « analogue sensitive » <i>csk1-as</i> et <i>CAK1-as</i> .....                                                  | 38 |
| 3. Marquage <i>in vivo</i> des substrats de Csk1 .....                                                                                 | 42 |
| 3.1 Principe du test .....                                                                                                             | 42 |
| 3.2 Résultats obtenus et mises au point .....                                                                                          | 42 |
| 3.2.1 Premiers essais .....                                                                                                            | 42 |
| 3.2.2 Ajout de la protéine de fusion GST-Csk1-as purifiée .....                                                                        | 44 |
| 3.2.3 Surexpression plasmidique des kinases <i>in vivo</i> .....                                                                       | 44 |
| 3.2.3.1 Surexpression des protéines fusionnées au le tag HA .....                                                                      | 44 |
| 3.2.3.2. Utilisation du N <sup>6</sup> -(benzyl)-ATP .....                                                                             | 48 |
| 4. Phosphorylation <i>in vivo</i> des protéines associées à Cak1 et Csk1 .....                                                         | 50 |
| 5. Conclusion sur l'étude <i>in vivo</i> de la relation entre Csk1/Cdc2 .....                                                          | 50 |
| III. Étude des particularités des kinases Csk1 de <i>S. pombe</i> et Cak1 de <i>S. cerevisiae</i> .....                                | 52 |
| 1. Contexte de ce travail .....                                                                                                        | 52 |
| 2. Particularités des kinases Csk1 et Cak1 .....                                                                                       | 52 |
| 3. Optimisation de <i>csk1-as</i> et <i>CAK1-as</i> .....                                                                              | 55 |
| 3.1 Mutation K40G dans Csk1-as .....                                                                                                   | 55 |
| 3.2 Mutation S16V dans Cak1-as .....                                                                                                   | 55 |
| 4. Effet des mutations K40G et S16V sur l'activité kinase <i>in vitro</i> .....                                                        | 55 |
| 4.1 Test kinase <i>in vitro</i> avec la kinase Csk1-as K40G .....                                                                      | 59 |
| 4.2 Test kinase <i>in vitro</i> avec la kinase Cak1-as S16V .....                                                                      | 59 |
| 5. Effet des mutations K40G et S16V sur la complémentation <i>in vivo</i> de la mutation <i>civ1-4</i> chez <i>S. cerevisiae</i> ..... | 59 |
| 5.1 Complémentation de <i>civ1-4</i> par Csk1 et ses dérivés .....                                                                     | 59 |
| 5.2 Complémentation de <i>civ1-4</i> par Cak1 et ses dérivés .....                                                                     | 60 |
| 6. Conclusion sur les tentatives d'amélioration de la kinase Csk1-as et Cak1 .....                                                     | 60 |
| DISCUSSION .....                                                                                                                       | 61 |
| I. Discussion et conclusion .....                                                                                                      | 62 |
| II. Discussion générale et perspectives .....                                                                                          | 66 |
| MATERIELS ET METHODES .....                                                                                                            | 69 |
| I. Outils utilisés .....                                                                                                               | 70 |
| 1. La levure de fission <i>Schizosaccharomyces pombe</i> : .....                                                                       | 70 |
| 2. Vecteurs d'expression utilisés : .....                                                                                              | 70 |
| 3. Milieux pour cultiver pour <i>S. pombe</i> : .....                                                                                  | 71 |
| 4. Marquage du N <sup>6</sup> -(benzyl)-ADP .....                                                                                      | 72 |
| II. Techniques utilisées .....                                                                                                         | 73 |
| 1. Transformation de <i>S. pombe</i> : .....                                                                                           | 73 |
| 2. Contrôle de l'expression protéique par Western Blot .....                                                                           | 73 |
| 3. Mutagenèse dirigée : .....                                                                                                          | 74 |
| 3.1 Création des mutants « analogue sensitive » .....                                                                                  | 74 |
| 3.2 Ajout des mutations K40G dans Csk1, S16V dans Cak1 et S165A dans Mcs6 ....                                                         | 75 |
| 4. Ajout de l'épitope carboxy-terminal TAP(2x) .....                                                                                   | 75 |

|                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5. Utilisation des inhibiteurs de kinases -as.....                                         | 76  |
| 6. Marquage <i>in vivo</i> des substrats de Csk1 sur des extraits totaux .....             | 77  |
| 7. Expression et purification des protéines recombinantes .....                            | 78  |
| 8. Immunoprécipitation et test kinase <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....              | 79  |
| 9. Test de complémentation du mutant <i>civ1-4</i> chez <i>S. cerevisiae</i> .....         | 80  |
| BIBLIOGRAPHIE.....                                                                         | 81  |
| ANNEXE : ETUDE DE Spp40.....                                                               | 91  |
| I. Introduction du sujet .....                                                             | 92  |
| II. Résultats du projet .....                                                              | 94  |
| 1. Caractérisation de Spp40.....                                                           | 94  |
| 1.1 Le gène codant Spp40 chez <i>S. pombe</i> n'est pas essentiel .....                    | 94  |
| 1.2 Localisation subcellulaire de Spp40-GFP.....                                           | 95  |
| 1.3 Phénotypage du délétant de la protéine Spp40.....                                      | 96  |
| 2. Recherche de partenaires via crible co-létalité .....                                   | 96  |
| 3. Etude comparative du métabolome vacuolaire d'une souche délétée pour <i>Spp40</i> ..... | 98  |
| III. Conclusion .....                                                                      | 101 |
| IV. Bibliographie .....                                                                    | 102 |

## **ABBREVIATIONS**

## Liste des abréviations :

**1-NM-PP1** : 1-(1,1-dimethylethyl)-3-(1-naphthalenylmethyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine

**2-NA-PP1** : 2-(1,1-dimethylethyl)-3-(1-naphthalenyl)-1H-pyrazolo[3, 4-d]pyrimidin-4-amine

**<sup>32</sup>P** : radio-isotope 32 du Phosphore

**3-MP-PP1** : 4-Amino-1-tert-butyl-3-(3-methylbenzyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine

**AA** : acide aminé

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADP** : adénosine diphosphate

**ARN Pol II** : ARN Polymérase II

**ARN** : acide ribonucléique

**ATP** : adénosine triphosphate

**BSA** : bovine serum albumin

***C. albicans*** : *Candida albicans*

**CAK** : CDK-activating kinase

**CDCFDA** : 5-(and-6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate

**CDK** : cyclin dependent kinase

**Complexe PIC** : complexe de pré-initiation

**CPY** : carboxy-peptidase Y

**CTD** : domaine C-terminal

**DMSO** : diméthylsulfoxyde

**Domaine RING finger** : domaine de liaison du Zinc (RING provient de Really Interesting New Gene)

**DPNK** : nucleoside 5'-diphosphate kinase

**DTT** : dithiothreitol

***E. coli*** : *Escherichia coli*

**ECL** : electrochemical luminescence

**EMM** : Edinburgh Minimal Medium

**YES** : yeast extract with supplements

**EMS** : ethylmethanesulfonate

**Fraction MLP** : fraction contenant les mitochondries, lysosomes et peroxisomes

**Fraction N** : fraction « noyau »

**Fraction S** : fraction « surnageant »

**FSBA** : 5'-fluorosulfonylbenzoyladenosine

**Csk** : cyclin suppressing kinase

**Cdc** : cell division cycle

**Mcs** : mitotic catastrophe suppressor

**GST** : glutathione S-transferase

***H. sapiens*** : *Homo sapiens*

**HEPES** : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

**IP** : immunoprécipitation  
**IPTG** : isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside  
***K. lactis*** : *Kluyveromyces lactis*  
**Kan** : kanamycine  
**kDa** : kilodalton  
**LAMPS** : lysosome-associated membrane protein  
**LiAc** : lithium acétate  
**LIMPS** : lysosomal integral membrane protein  
**Mutant « as »** : mutant « analogue sensitive »  
**PAP** : peroxydase anti-peroxydase  
**PBS** : phosphate buffered saline  
**PEG** : polyethylene glycol  
**pH** : potentiel hydrogène  
**Phase G1** : phase Gap 1  
**Phase G2** : phase Gap 2  
**Phase M** : phase de mitose  
**Phase S** : phase de synthèse  
**P-TEF-B** : positive transcription elongation factor b  
***S. cerevisiae*** : *Saccharomyces cerevisiae*  
***S. japonicus*** : *Schizosaccharomyces japonicus*  
***S. octosporus*** : *Schizosaccharomyces octosporus*  
***S. pombe*** : *Schizosaccharomyces pombe*  
**SDS-PAGE** : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
**TAP** : tandem affinity purification  
**TFIIH** : facteur de transcription IIH  
**T-loop** : boucle protéique contenant une thréonine  
**Wt** : wild type (sauvage)

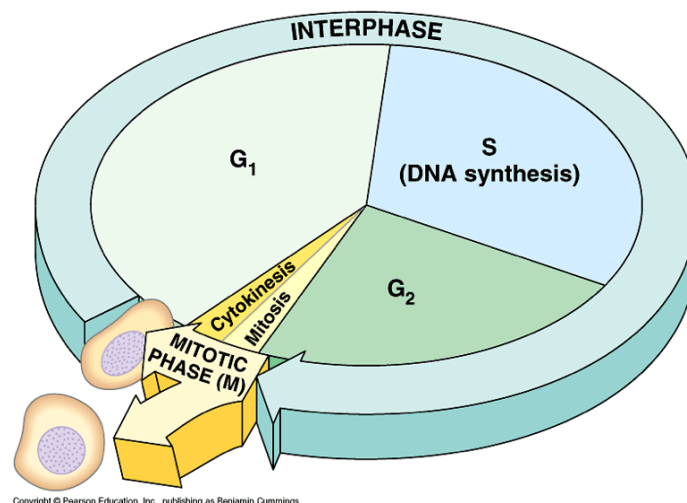
## **INTRODUCTION**

## I. Le cycle cellulaire et la protéine Cdc2

### 1. Généralités sur le cycle cellulaire

L'étude du cycle cellulaire commence en 1855 quand un scientifique nommé Rudolf Carl Virchow comprend que les nouvelles cellules dérivent de cellules préexistantes. Avec l'arrivée des premiers microscopes, les embryologistes ont été capables d'analyser en détail la cytologie du cycle cellulaire sans pour autant connaître les mécanismes moléculaires sous-jacents. Durant les années 1980, l'essor de la biologie moléculaire a permis aux scientifiques de comprendre le fonctionnement moléculaire du cycle cellulaire. Leurs travaux ont révélé que les processus basiques et les mécanismes de contrôle impliqués dans le cycle cellulaire étaient universels à l'ensemble des eucaryotes.

Le cycle cellulaire est une suite complexe d'événements ayant pour fonction de multiplier par deux l'ensemble des composants indispensables à la survie de la cellule pour ensuite les répartir dans deux cellules-filles. Toutes les cellules eucaryotes procèdent à travers une série d'états discrets (Murray et *al.*, 1989 ; Nurse et *al.*, 1990). Les deux états principaux du cycle sont la phase S (pour synthèse) pendant laquelle le matériel génétique est répliqué et la phase M (pour mitose) au cours de laquelle les chromosomes ségrégent fidèlement entre les deux futures cellules-filles. Entre ces deux phases, existent également des périodes appelées G<sub>1</sub> (entre la phase M et la phase S), et G<sub>2</sub> (entre la phase S et la phase M). Ces deux phases sont caractérisées par une synthèse active des composants cellulaires afin d'assurer la croissance. La **figure A** présente le cycle cellulaire tel qu'il peut être observé chez la plupart des métazoaires.

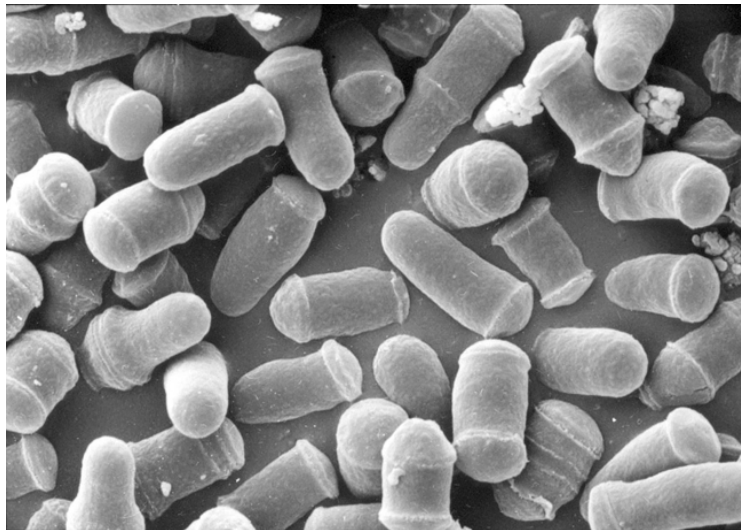


**Figure A.** Représentation schématique du cycle cellulaire eucaryote. La phase M inclut la mitose et la cytokinèse. L'interphase dure environ 90% du cycle et inclut la phase G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> et S. (Image de l'ouvrage Biology 6<sup>e</sup> de Campbell – Reece, 2002)

## 2. Le cycle cellulaire chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*

### 2.1 Généralités sur *Schizosaccharomyces pombe*

La levure de fission *Schizosaccharomyces pombe* est une levure ascomycète homothallique isolée par P. Linder en 1890 à partir d'une bière africaine à base d'une céréale cultivée principalement dans les zones sèches, le millet. La cellule est de forme cylindrique et sa taille est d'environ 3 à 4 µm de diamètre pour 7 à 15 µm de longueur selon la période du cycle cellulaire (**figure B**). Le génome haploïde comprend 14 millions de paires de bases (4970 gènes) réparties en 3 chromosomes.



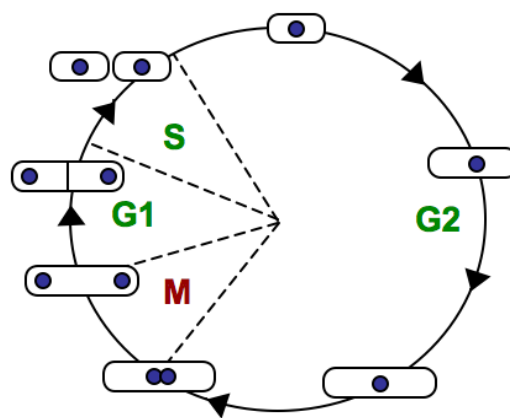
**Figure B.** La levure de fission *Schizosaccharomyces pombe* vue en microscopie électronique à balayage (Photo de Mary Parker, Institute of Food Research).

### 2.2 *Schizosaccharomyces pombe* et l'étude du cycle cellulaire

*S. pombe* constitue un excellent modèle pour étudier les régulations fondamentales du cycle cellulaire car elle maintient constamment sa forme cylindrique en croissant exclusivement aux extrémités et se divise par une fission médiane pour produire deux cellules-filles identiques. De plus, en 1976, Paul Nurse identifie le gène *cdc2* (*cdc* pour « cell division cycle ») chez la levure de fission et démontre que ce gène contrôle la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à S et la transition de la phase G2 à la mitose (Nurse et al., 1976). En 1987, il isole le gène homologue chez l'homme, *CDK1*, qui code pour une kinase dépendante des cyclines (Lee et al., 1987). Conjointement à Lee Hartwell et Tim Hunt, il remporta le Prix Nobel de physiologie ou médecine en 2001 pour la découverte de ces régulateurs majeurs du cycle cellulaire.

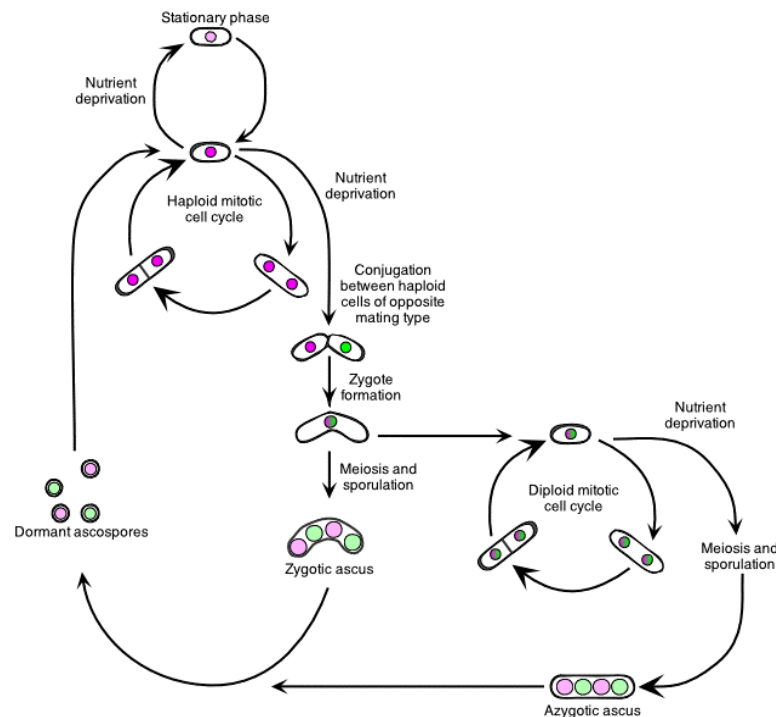
### 2.3 Cycle biologique de *Schizosaccharomyces pombe*

Le cycle biologique est haplodiplobiontique avec une phase haploïde dominante. Du point de vue du généticien, elle constitue donc un outil formidable car les mutations récessives peuvent être facilement étudiées. Les cellules haploïdes se multiplient par division mitotique (cycle asexué). Le cycle cellulaire haploïde est typiquement eucaryotique, c'est-à-dire qu'il est constitué par la succession de 4 phases : G1, S, G2 et M. Néanmoins, le cycle cellulaire de *S. pombe* présente quelques particularités : la phase G1 est extrêmement brève alors que la phase G2 est longue. Les phases G1 et S ont lieu pendant la télophase. Lorsque les deux cellules-filles se séparent, elles sont déjà en phase G2. En outre, en condition de croissance exponentielle, 80% des cellules sont en phase G2 et environ 15% sont en mitose (**figure C**).



**Figure C.** Cycle cellulaire haploïde de *Schizosaccharomyces pombe* (image modifiée à partir d'une figure du site internet The Forsburg Lab *pombe* Pages)

Le cycle cellulaire n'est pas un système fermé et différents facteurs extérieurs peuvent l'influencer. Par exemple, chez *S. pombe*, en condition de carence nutritionnelle, les deux cellules haploïdes de types sexuels opposés ( $h^+$  et  $h^-$ ) vont conjuguer pour enclencher la phase diploïde du cycle cellulaire. Les cellules fusionnent et la caryogamie est réalisée. La méiose est immédiatement enclenchée, puis elle est suivie par la sporulation qui génère un asque contenant quatre spores haploïdes. En conditions nutritives favorables, les spores germent et le cycle cellulaire haploïde recommence. Si le zygote issu de la conjugaison de deux cellules haploïdes est placé en conditions nutritives adéquates avant qu'il n'ait entrepris la méiose, alors un cycle cellulaire diploïde s'établit (**Figure D**).



**Figure D.** Cycle cellulaire complet de *Schizosaccharomyces pombe*. La couleur rose et la couleur verte indiquent les deux types sexuels différents ( $h^+$  et  $h^-$ ). Ces deux couleurs sont ternes quand il y a une inactivité génétique au sein de la cellule comme c'est le cas chez les spores et les cellules en phase stationnaire. (Image modifiée de S. A. MacNeill and P. Nurse, Cell cycle control in fission yeast., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997)

## 2.4 Comparaison entre *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* est une autre levure utilisée comme organisme modèle en biologie cellulaire et en génétique. Son génome de 16 chromosomes est composé de 13 millions de paires de bases et de 6 275 gènes. Elle appartient au groupe des « budding yeast » et se multiplie donc par bourgeonnement (levure bourgeonnante).

Une différence fondamentale entre *S. pombe* et *S. cerevisiae* est le contrôle de leur cycle cellulaire. En effet, *S. cerevisiae* régule principalement son cycle lors de la transition entre la phase G1-S tandis que ce point de contrôle se situe au niveau de la transition G2-M chez *S. pombe*. Une autre différence entre les deux organismes est qu'on note la présence chez *S. cerevisiae*, dès la phase G2, d'un petit fuseau intranucléaire alors que chez *S. pombe*, ce fuseau ne fait son apparition qu'en phase M.

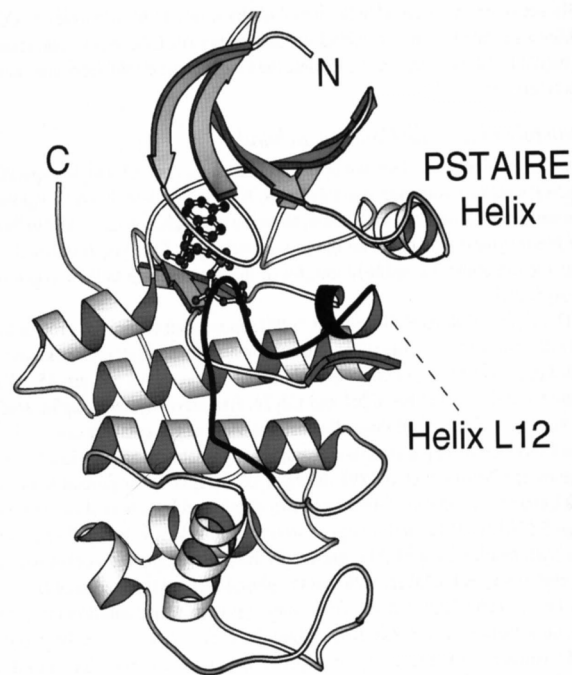
À côté de ces différences, les deux levures présentent également quelques caractéristiques communes qui les séparent des cellules supérieures. Elles préservent, par exemple, leur noyau tout au long de la mitose et elles commencent la phase S avant la fin de la cytokinèse quand elles sont en condition de croissance rapide.

### 3. Les kinases dépendantes des cyclines (CDK)

Les kinases dépendantes des cyclines (CDK = cyclin dependent kinase) constituent une famille de sérine-thréonine kinases dont le membre fondateur, Cdc2 (=Cdk1) a été découvert chez *S. pombe* comme étant le régulateur central du cycle cellulaire (Nurse et *al.*, 1976). Depuis, leur implication dans la régulation de la transcription a également été mise en évidence. Ce sont typiquement des « proline directed kinases », ce qui signifie que leurs substrats sont le plus souvent phosphorylés sur une sérine ou une thréonine suivie d'une proline.

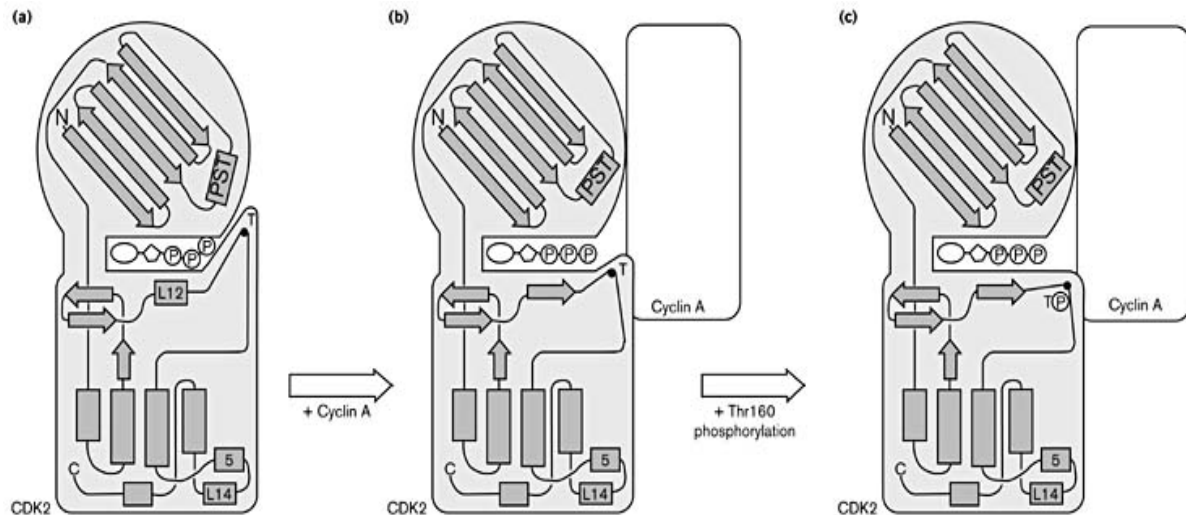
Contrairement aux levures où une seule CDK régule le cycle cellulaire en s'associant à différentes cyclines (Cdc2 chez *S. pombe* (Nurse et *al.*, 1976) et Cdc28 chez *Saccharomyces cerevisiae* (Wittenberg et *al.*, 1988)), chez les eucaryotes supérieurs, le cycle cellulaire est contrôlé par différentes CDK (Cdk1, Cdk2, Cdk4, Cdk6) associées à certaines cyclines à des moments bien particuliers du cycle cellulaire (Meyerson et *al.*, 1992). Les cyclines font partie d'une famille de protéines assez diversifiées de 30 à 90 kDa. L'homologie de séquence entre les membres de cette famille est relativement faible et se concentre sur une région d'une centaine de résidus nommée « cyclin box » (Kobayashi et *al.*, 1992).

Des études cristallographiques ont montré que les CDK comportaient généralement deux domaines (De Bondt et *al.* 1993). La partie N-terminale de la protéine contient un motif PSTAIRE situé sur une grande hélice  $\alpha$  qui joue un rôle capital dans la fixation de la molécule d'ATP. Le substrat se fixe au niveau des hélices  $\alpha$  de la queue C-terminale de la protéine. La molécule d'ATP est introduite dans un sillon situé entre les deux domaines que l'on appelle couramment la poche de fixation de l'ATP (De Bondt et *al.* 1993 ; Morgan et *al.*, 1994, Morgan et *al.*, 1996) (**figure E**).



**Figure E.** Structure de la kinase Cdk2 humaine complexée à l'ATP. L'hélice  $\alpha$  PSTAIRE est retrouvée au niveau du domaine N-terminal. On retrouve beaucoup d'hélices  $\alpha$  dans la section C-terminale de la protéine. Le « T-loop » est représenté en noir et ferme le site catalytique. L'hélice L12 entraînée par le « T-loop » empêche le positionnement correct de la molécule d'ATP dans la poche. (Image de Morgan et *al.*, 1997)

Une conformation optimale de l'enzyme est importante pour que le contact entre le substrat et le phosphate  $\gamma$  de l'ATP puisse se faire. Pour obtenir cette conformation, deux éléments sont nécessaires : la liaison de la cycline partenaire et la phosphorylation d'un résidu sur un large « loop » flexible obstruant la poche de fixation de l'ATP (« T-loop »). En effet, la fixation de la cycline provoque le déplacement du « T-loop » qui expose alors un résidu au solvant. Ce résidu, le plus souvent une thréonine, d'où le nom de « T-loop », doit alors être phosphorylé par une CAK (CDK-activating kinase). Cette phosphorylation stabilise le « T-loop » dans une conformation qui libère l'entrée de la poche de liaison de l'ATP et provoque également la transformation d'une petite hélice (L12) en brin  $\beta$  engendrant la réorientation correcte de l'hélice PSTAIRE. Cet événement a pour conséquence de positionner correctement les résidus importants pour la catalyse et donc de permettre l'orientation du phosphate  $\gamma$  de la molécule d'ATP vers le substrat. La CDK est alors dans sa conformation active et peut transférer le phosphate de l'ATP sur son substrat (**figure F**) (De Bondt et *al.* 1993 ; Morgan et *al.*, 1994, Morgan et *al.*, 1996).



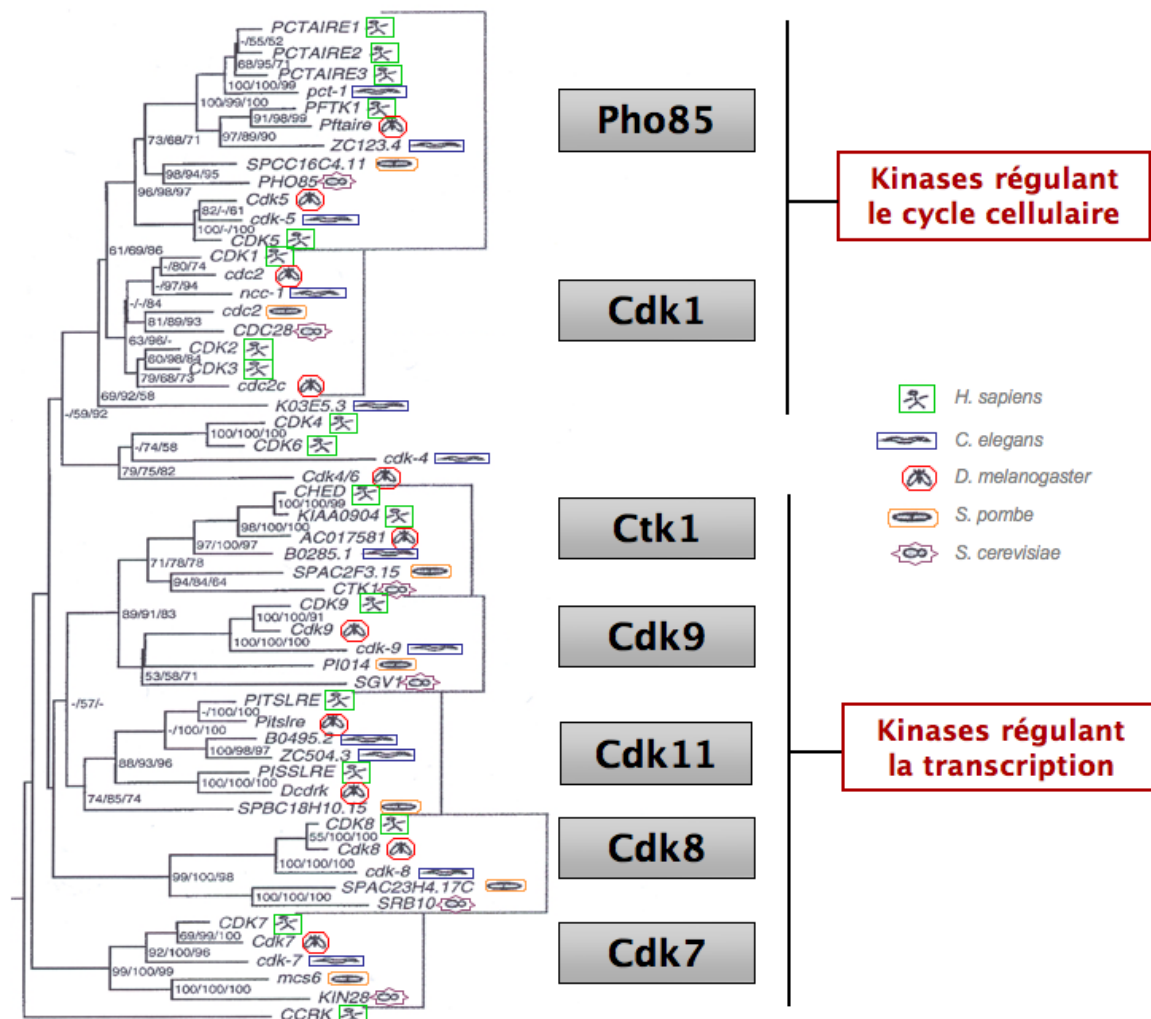
**Figure F.** Représentation schématique de l'activation de Cdk2 par la liaison de la cycline A et la phosphorylation de la thréonine du « T-loop » par la CAK (Image de Morgan et *al.*, 1997)

La structure cristallographique du complexe CDK-cycline indique également que la cycline joue un rôle dans la spécificité de reconnaissance du substrat en participant à la génération du site de fixation de celui-ci (Morgan et *al.*, 1997).

Les complexes CDK-cycline sont principalement régulés par des mécanismes de phosphorylation. Cette régulation peut, comme nous venons de le voir, mener à l'activation de la CDK mais aussi à son inhibition. La dégradation protéolytique (ubiquitine dépendante) de certaines cyclines est également contrôlée par phosphorylation.

#### 4. Implication des CDK dans le cycle cellulaire et la transcription

La **figure G** montre une comparaison exhaustive de la famille des CDK chez des espèces éloignées. Une étude bioinformatique réalisée par l'équipe de Liu et *al.* (2000) a établi un arbre phylogénétique de cette famille qui confirme l'existence de 2 sous-familles. Les CDK régulant directement le cycle cellulaire comme nous venons de le voir mais aussi des CDK ayant un rôle dans le contrôle de la transcription. Ce second aspect sera abordé au point II.1.2



**Figure G.** Arbre phylogénétique de certaines CDK. (Image modifiée de Liu et *al.*, 2000)

La seule CDK impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire chez *S. pombe* est Cdc2 (Stern et *al.*, 1996). L'activité de Cdc2 est faible en phase G1, moyenne pendant les phases S et G2 et finalement très haute durant la phase M. Sa présence est particulièrement critique lors de la transition G1–S et G2–M. L'activité de Cdc2 est requise pour le lancement de la réplication de l'ADN et la mitose (Stern et *al.*, 1996).

## 5. Régulation du complexe Cdc2/Cdc13 de *Schizosaccharomyces pombe*

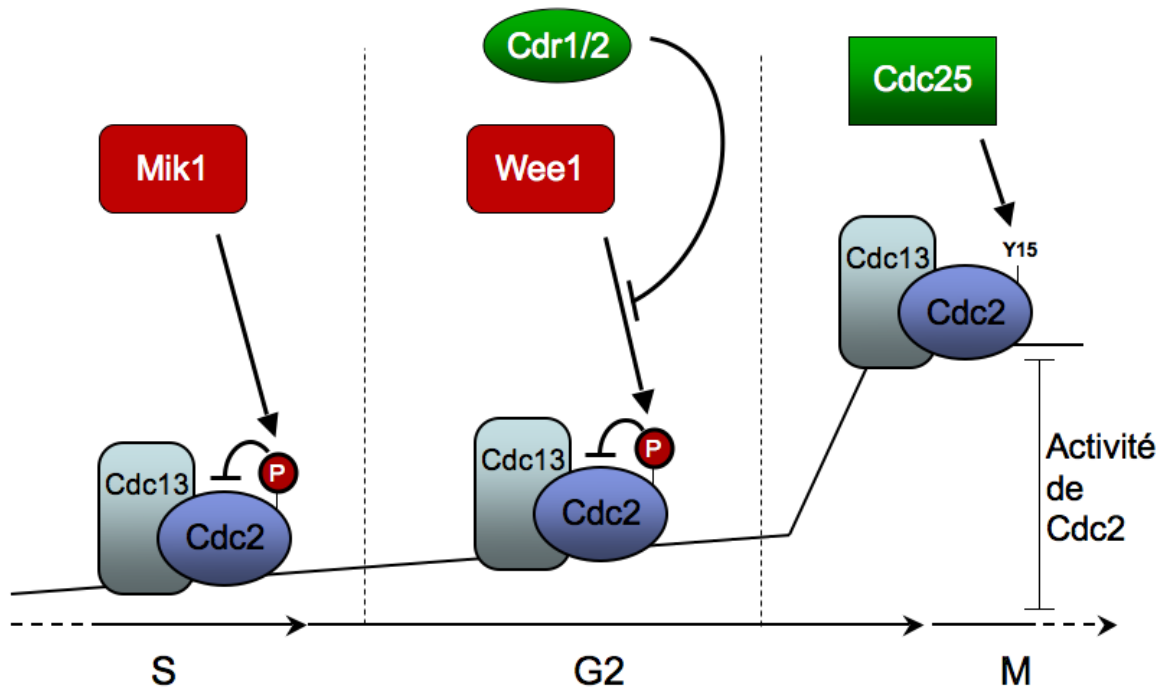
Chez la levure de fission, Cdc2 est la seule CDK directement impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. Cdc2 peut s'associer à quatre cyclines différentes : Cig1 (Connolly et *al.*, 1994), Cig2 (Bueno et *al.*, 1993 ; Connolly et *al.*, 1994), Puc1 (Forsburg et *al.*, 1994) et Cdc13 (Stern et *al.*, 1996). Si la quantité de Cdc2 reste constante tout au long du cycle cellulaire, par contre celle des cyclines fluctue (d'où le nom de cycline). L'activité de Cdc2 pendant le cycle cellulaire est donc modulée par l'expression transitoire de sa cycline

partenaire. La cycline Cdc13 est requise pour le départ de la mitose (Moreno et *al.*, 1989 ; Booher et *al.*, 1989). Son niveau protéique est assez faible dans la phase G1 mais augmente progressivement pendant la phase G2 et se maintient constant durant toute la mitose.

La phosphorylation des substrats des complexes CDK/cycline étant transitoire et réversible, si la cycline disparaît, les substrats sont rapidement déphosphorylés par des phosphatases.

Le complexe Cdc2/Cdc13 joue un rôle clé dans la progression ordonnée dans le cycle cellulaire et doit donc être fortement régulé à chacune des étapes de celui-ci. La cellule peut utiliser diverses stratégies pour réguler l'activité de ce complexe, citons par exemple la dégradation par ubiquitination de la cycline partenaire, la fixation d'un inhibiteur ou encore une phosphorylation inhibitrice sur Cdc2.

Dans les phases S et G2, le complexe Cdc2/Cdc13 est déjà formé mais son activité est régulée négativement par une phosphorylation inhibitrice sur la tyrosine 15 de Cdc2, phosphorylation réalisée par les protéines Mik1 (Fleig et *al.*, 1991) et Wee1 (Nurse et *al.*, 1975). Alors que Mik1 est l'inhibiteur principal en phase S, son niveau protéique chute en phase G2 laissant Wee1 continuer à inhiber Cdc2/Cdc13. La protéine Wee1 est alors inhibée par les protéines kinases Cdr1 (Wu et *al.*, 1993 ; Parker et *al.*, 1993) et Cdr2 (Kano et *al.*, 1998 ; Breeding et *al.*, 1998). Il existe aussi une phosphatase, Cdc25, qui a pour but de contrecarrer les effets de Mik1 et Wee1 en déphosphorylant la tyrosine 15 de Cdc2. Cdc25 s'accumule progressivement durant l'interphase. Le rapport entre l'activité inhibitrice de Wee1 et l'activité activatrice de Cdc25 change au fur et à mesure que la cellule augmente en taille, et une fois une certaine taille obtenue, les déphosphorylations engendrées par Cdc25 l'emportent sur Wee1 permettant ainsi l'activation abrupte du complexe Cdc2/Cdc13 et l'entrée en mitose (Russell et *al.*, 1987 ; Russell et *al.*, 1986). Les mutants de *wee1* et *cdc25* ont permis d'éclairer la relation que ces protéines entretiennent avec Cdc2 bien avant leur caractérisation biochimique. En effet, l'inactivation de *wee1* résulte en des cellules qui entrent en mitose à une taille très réduite tandis que celle de *cdc25* mène à une elongation en l'absence de mitose. Ces phénotypes reflètent directement l'effet négatif de Wee1 et positif de Cdc25 sur le complexe Cdc2-Cdc13 (**figure H**).



**Figure H.** Modèle de la régulation de l'entrée en mitose induite par Cdc2/Cdc13 (image modifiée de Moser et *al.*, 2000)

## **II. Etude de la famille des kinases Cdk7**

### **1. Caractérisation de Cdk7 chez les métazoaires :**

#### **1.1 Découverte de l'activité CAK de Cdk7 (=Mo15) sur les CDK**

Tout commence par l'isolement d'un complexe multi-protéique catalysant la phosphorylation de la protéine Cdk1 (homologue chez les métazoaires de la protéine Cdc2 de *S. pombe* ; Cdk1 est souvent également nommée Cdc2 chez les métazoaires) dans son « T-loop » (Thr161) dans un extrait de cellules d'étoiles de mer (Fesquet et *al.*, 1993) et de Xénopes (Solomon et *al.* 1992). La protéine responsable de cette activité CAK (CDK-activating kinase) chez ces organismes a été identifiée comme étant Mo15, une sérine-thréonine kinase homologue au produit du gène *CDK1* humain qui avait déjà été clonée quelques années auparavant (Shuttleworth et *al.*, 1990). Une expérience similaire chez le Xénope a également montré que Mo15 était responsable de la phosphorylation du résidu de la thréonine 160 du « T-loop » de la protéine Cdk2 (Poon et *al.*, 1993). Pour rappel, contrairement à *S. pombe* où une seule CDK (Cdc2) régule le cycle cellulaire, chez les eucaryotes supérieurs, le cycle cellulaire est contrôlé par différentes CDK (Cdk1 (=Cdc2), Cdk2, Cdk4, Cdk6) (Meyerson et *al.*, 1992). Les CDK Cdk1 et Cdk2 sont donc, chez le Xénope, phosphorylées par la même protéine, Mo15.

L'équipe de Tassan et *al.* (1994) a cloné et séquencé l'ADN complémentaire correspondant à la protéine Mo15 humaine. Cette protéine fusionnée à un tag histidine a été exprimée chez *Escherichia coli* et la protéine de fusion purifiée a été utilisée pour élaborer des anticorps polyclonaux et monoclonaux. Ces outils ont permis de montrer que contrairement à la plupart des kinases impliquées dans la division cellulaire, l'expression et l'activité de Mo15 chez les métazoaires étaient constantes tout au long du cycle cellulaire (Tassan et *al.*, 1994).

Des expériences d'immunoprécipitation ont également montré que la protéine Mo15 humaine interagissait physiquement avec deux autres peptides de 34 et 32 kDa (Tassan et *al.*, 1994). Le clonage de l'ADN complémentaire codant pour la protéine de 34 kDa a permis d'identifier une nouvelle cycline, la cycline H (Fisher et *al.*, 1994 ; Makela et *al.*, 1994).

L'expression de protéines humaines recombinantes pour Mo15 et la cycline H reconstitue l'activité CAK (CDK-activating kinase) *in vitro* sur Cdk1 (Thr161) et Cdk2 (Thr160) prouvant que l'association des deux protéines est suffisante pour avoir une activité CAK fonctionnelle (Fisher et *al.*, 1994). L'interaction entre les deux protéines humaines Mo15 et la cycline H a également été confirmée lors d'un crible double hybride (Makela et *al.*, 1994). Par la suite, l'équipe de Fesquet et *al.* (1997) a montré qu'il y avait une perte d'activité CAK et un arrêt du cycle cellulaire dans des extraits d'œufs de Xénope immunodéplétés en Mo15. Cette

activité CAK peut cependant être restaurée en injectant les ARN messagers de Mo15 et de la cycline H (Fesquet et *al.* 1997). La protéine Mo15 a par la suite été renommée Cdk7 étant donné que son activité est dépendante d'une cycline régulatrice.

Une troisième protéine de 32 kDa a été co-purifiée avec les protéines humaines Cdk7 et cycline H par l'équipe de Tassan et *al.* (1994). Elle a été identifiée comme étant une protéine de la famille « RING finger » (domaine de liaison du Zinc) par son motif caractéristique C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> (Cys<sub>3</sub>HisCys<sub>4</sub>) localisé dans son domaine N-terminal (Tassan et *al.*, 1995). Cette protéine, appelée Mat1 pour « ménage à trois », promeut, chez la souris et les autres métazoaires, l'assemblage *in vitro* de Cdk7 et de sa cycline H en stabilisant le complexe (Fisher et *al.*, 1995). Cependant, la stabilisation et l'activation du complexe Cdk7/Cycline H par Mat1 sont indépendantes de l'état de phosphorylation de la thréonine activatrice du « T-loop » de Cdk7 (Thr170) (Fisher et *al.*, 1995 ; Devault et *al.*, 1995). Ces données semblent indiquer que Mat1 est capable de contourner la nécessité de la phosphorylation du « T-loop » (Thr170). Le complexe Cdk7/Cycline H actif peut donc se former de deux façons différentes : par une association entre la Cycline H et Cdk7 phosphorylée sur son « T-loop » ou par la fixation de Mat1 aux deux autres protéines (Fisher et *al.*, 1995). Une étude récente sur des cellules HeLa ajoute un niveau de complexité supplémentaire en déterminant que les spécificités de reconnaissance entre Cdk7 et ses substrats dépendent aussi bien de l'état de Cdk7 (phosphorylation de son « T-loop », association avec ses partenaires) que de la séquence du substrat (Larochelle et *al.*, 2006). L'utilité du domaine RING finger de Mat1 reste à ce jour inconnue, il est en tout cas dispensable pour l'activité CAK *in vitro* du trimère Cdk7/Cycline H/Mat1 (Tassan et *al.*, 1995).

Le complexe Cdk7/Cycline H est donc considéré comme étant la principale kinase activatrice des CDK (CAK) chez les eucaryotes supérieurs (Fesquet et *al.*, 1993 ; Solomon et *al.* 1992 ; Poon et *al.*, 1993 ; Fisher et *al.*, 1994 ; Fesquet et *al.* 1997).

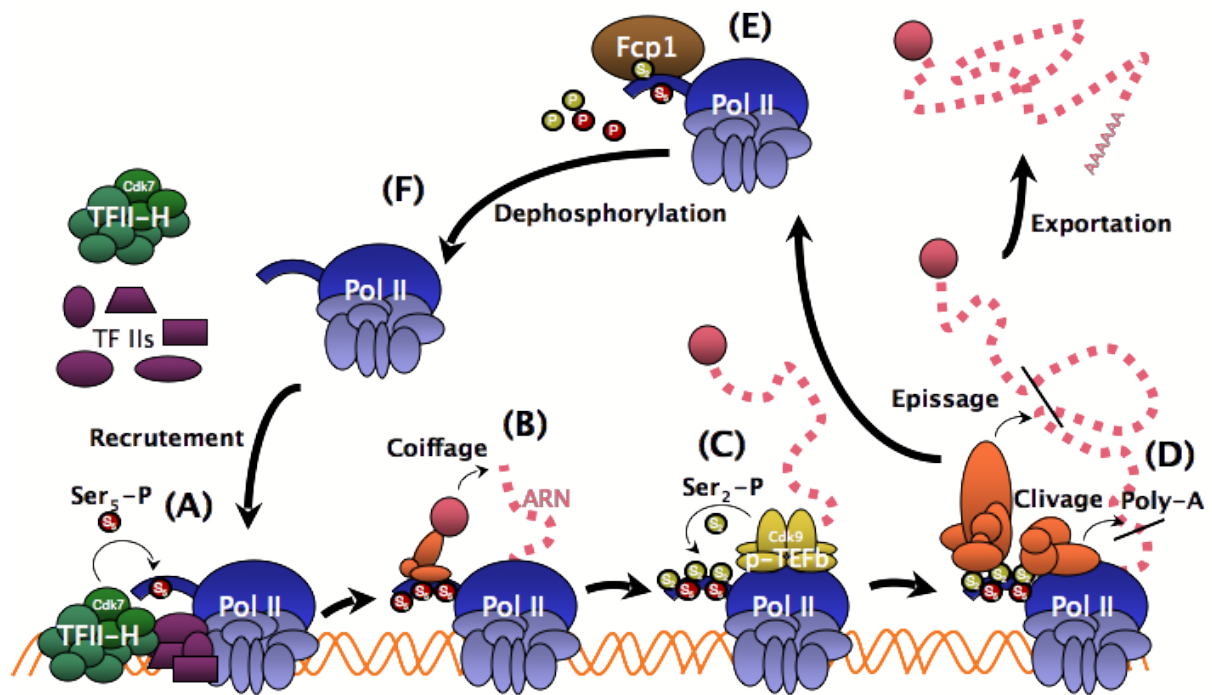
Cependant, la découverte que Cdk7 et ses deux partenaires étaient également capables de former un sous-complexe du facteur de transcription IIH (TFIIH) capable de phosphoryler le domaine C-terminal (CTD) de la plus grosse sous-unité de l'ARN Polymérase II (Roy et *al.*, 1994 ; Serizawa et *al.*, 1995 ; Shiekhatar et *al.*, 1995) a ouvert la perspective d'un lien moléculaire entre le cycle cellulaire et la transcription. Dans un même temps, elle a remis en question l'authenticité de Cdk7 comme CAK *in vivo*, comme nous le verrons au point II.2.

## 1.2 Découverte de l'activité kinase de Cdk7 sur le CTD

En plus de sa fonction CAK, le complexe Cdk7/Cycline H/Mat1 est donc impliqué dans la transcription. Il est un composant essentiel du facteur de transcription IIH (TFIIH), un des six facteurs de transcription généraux. Il possède un rôle essentiel dans l'initiation de la transcription par l'ARN Polymérase II et s'occupe également d'exciser les nucléotides mal appariés. Sept des dix sous-unités du TFIIH (p62 (Fischer et *al.*, 1992), p52 (Marinoni et *al.*,

1997), p44 (Humbert et *al.*, 1994), p34 (Humbert et *al.*, 1994), p8-TTD-A (Ranish et *al.*, 2004), XPD (Schaeffer et *al.*, 1994) et XPB (Schaeffer et *al.*, 1994)) forment le complexe central sur lequel le complexe Cdk7/Cycline H/Mat1 vient se fixer et phosphoryle les sérines en position 5 du domaine C-terminal (CTD) de la large sous-unité l'ARN Polymérase II. L'association de la protéine P8-TTD-A semble se stabiliser lors des mécanismes d'excision de nucléotides (nucleotide excision repair (NER)) mis en place suite à un dommage à l'ADN (Giglia-Mari et *al.*, 2006). XPD et XPB sont deux protéines à activité ADN hélicase (utilisation de l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour catalyser l'ouverture d'acides nucléiques appariés sous forme double brins) responsables du désenroulement de l'ADN à proximité de la lésion (Reardon et *al.*, 2004) et l'activité ubiquitine ligase E3 de p44 est nécessaire pour induire la transcription des gènes liés à la réparation de l'ADN (Takagi et *al.*, 2005).

Le CTD joue un rôle crucial dans la synchronisation de la transcription avec les événements cotranscriptionnels comme le coiffage, l'épissage et la polyadénylation de l'ARN messenger (Brickey et *al.*, 1995 ; McCracken et *al.*, 1997 ; Proudfoot et *al.*, 2002). Plusieurs facteurs requis pour ces différentes étapes interagissent de manière séquentielle avec le CTD. Celui-ci est constitué d'un nombre de répétitions variant selon les organismes entre 26 chez la levure et 52 chez les mammifères (Stiller et *al.*, 2002). La séquence consensus répétée est  $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$ . Chez les métazoaires, il y a une dégénérescence significative à certaines positions du CTD, chez les mammifères, c'est particulièrement visible dans la partie la plus terminale du domaine. La signification de cette dégénérescence est inconnue. Le CTD est riche en acides aminés pouvant potentiellement être des phospho-accepteurs (Ser2, Ser5 et Ser7), et subit des phosphorylations réversibles durant le cycle transcriptionnel (Dahmus et *al.*, 1996). L'ARN polymérase II avec un CTD hypophosphorylé sur les sérines 2 et 5 est recrutée pour former le complexe de pré-initiation (complexe PIC) au niveau du promoteur alors que sa forme hyperphosphorylée sur la sérine 2 et la sérine 5 est associée au complexe d'élongation. Les niveaux de phosphorylation du CTD représentent donc un marqueur important pour l'initiation et l'élongation de la transcription. La plupart des kinases phosphorylant le CTD identifiées appartiennent à la famille des CDK. Le complexe Cdk7/Cyclin H/Mat1 phosphoryle le CTD sur la sérine 5 alors qu'une autre CDK, Cdk9 (protéine du facteur de transcription général P-TEF-B) phosphoryle de manière préférentielle la sérine 2 (Zhou et *al.*, 2000). Des immunoprécipitations chromatiniennes *in vivo* chez la levure, montrent que la phosphorylation sur la sérine 5 domine au niveau du site d'initiation de la transcription (Komarnitsky et *al.*, 2000). La phosphorylation de la sérine 2 est, par contre, détectée majoritairement sur la seconde partie de la zone codante et au niveau du site de terminaison de la transcription. (**Figure I**).



**Figure I.** Phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II durant la transcription. L'ARN polymérase II (en bleu), le facteur de transcription TFIID (en vert) et d'autres facteurs de transcription (TFIIs, en mauve) sont assemblés au promoteur pour former un complexe de pré-initiation (PIC) où les sérines 5 du CTD se font phosphoryler par la protéine Cdk7 du TFIID (A). Après l'initiation de la transcription, la machinerie de coiffage (en orange) est recrutée par les phosphorylations des sérines 5 du CTD (B). Juste après le coiffage (cercle rose), le complexe p-TEFb (jaune) est recruté et la protéine Cdk9 réalise la phosphorylation des sérines 2 du CTD (C). La phosphorylation complète du CTD provoque le recrutement des facteurs d'épissage et de clivage (en orange) (D), nécessaires à la production d'un ARN messager mature. L'ARN polymérase dissociée est déphosphorylée par les phosphatases du CTD (par exemple Fcp1) (E) avant de pouvoir être à nouveau recrutée dans un nouveau complexe de pré-initiation (F) (modifié de Palancade et *al.*, 2003)

Comme nous l'avons annoncé, la double fonction potentielle de Cdk7 comme CAK et kinase du CTD (« CTD kinase ») a poussé une partie de la communauté scientifique à remettre en question la fonction CAK de Cdk7 (Nigg et *al.*, 1996). La démonstration génétique que Kin28, l'homologue de Cdk7 chez la levure de bourgeonnement *Saccharomyces cerevisiae*, n'est pas une CAK *in vivo* mais constitue la principale kinase des sérines 5 du CTD a favorisé cette remise en question (Cismowski et *al.*, 1995).

## 2. Caractérisation de Kin28 chez *S. cerevisiae* :

Chez *S. cerevisiae*, les homologues de Cdk7, de la cycline H et de Mat1 sont les protéines Kin28, Ccl1 et Tfb3 respectivement. Le complexe Kin28/Ccl1/Tfb3 est associé au facteur de transcription général TFIIH (phosphorylation du CTD de l'ARN Polymérase II), mais il ne possède donc pas d'activité CAK *in vitro* ou *in vivo* (Cismowski et al., 1995 ; Valay et al., 1995). La perte de la fonction de Kin28 dans des mutants conditionnels *kin28-ts* n'induit pas un arrêt du cycle cellulaire mais mène rapidement à la diminution de la synthèse d'ARN messager et à la diminution de la phosphorylation de la large sous-unité de l'ARN Polymérase II (Cismowski et al., 1995), supportant l'idée que le complexe Kin28/Ccl1/Tfb3 est la kinase physiologique du CTD (Cismowski et al., 1995 ; Feaver et al., 1994 ; Valay et al., 1995).

La découverte de la kinase monomérique Cak1 (Thuret et al., 1996 ; Kaldis et al., 1996 ; Espinoza et al., 1996), et la démonstration qu'elle est l'unique CAK chez *S. cerevisiae* a confirmé que le lien proposé entre cycle cellulaire (fonction CAK) et transcription (fonction « CTD kinase ») était artefactuel, en tous cas chez cet organisme.

## 3. Confirmation de la fonction CAK de Cdk7

Pour confirmer la dualité de fonction de la protéine Cdk7 dans le cycle cellulaire et la transcription chez les métazoaires, des nouveaux outils ont dû être créés. L'utilisation d'une kinase Cdk7 « analogue sensitive » (Cdk7-as, Bishop et al., 1998 ; nous reviendrons sur le principe des kinases -as plus tard dans ce travail) a permis de démontrer que Cdk7 humain fonctionnait *in vivo* comme CAK pour Cdk1 (=Cdc2) et Cdk2 en culture de cellules (cellules HeLa) (Larochelle et al., 2006). Il a également été montré que l'activation des CDK est déficiente dans un mutant thermosensible pour Cdk7 de la drosophile *Drosophila melanogaster* (Larochelle et al., 1998) et du ver *Caenorhabditis elegans* (Wallenfang et al., 2002). Par ailleurs, aucune protéine homologue à Cak1 de *S. cerevisiae* n'a été identifiée chez les eucaryotes supérieurs, suggérant l'existence d'un pathway spécifique d'activation des CDK chez la levure *S. cerevisiae*.

### **III. Etude de la famille des kinases Cak1**

#### **1. Découverte de la CAK de *S. cerevisiae* : Cak1**

Dans des extraits de *S. cerevisiae*, une protéine catalysant *in vitro* la phosphorylation de l'histone H1 (substrat artificiel de nombreuses CDK) et du complexe humain Cdk2/Cycline A a été isolée par chromatographie (Espinoza et al., 1996). Cette protéine, appelée Cak1 (=Civ1) est, comme annoncé précédemment, l'enzyme responsable de l'activité CAK chez la levure de bourgeonnement *S. cerevisiae* (Espinoza et al., 1996). Elle phosphoryle la protéine Cdc28, homologue de Cdc2 chez *S. cerevisiae* (Kaldis et al., 1996 ; Thuret et al., 1996 ; Sutton et al., 1997) et est importante pour la transition G1-S et G2-M (Sutton et al., 1997). C'est une protéine cytoplasmique (Kaldis et al., 1998 (A)) et essentielle (Espinoza et al., 1996). Cak1 n'est pas un constituant d'un facteur général de transcription et n'a aucune activité de phosphorylation sur le CTD de l'ARN polymérase II (Kaldis et al., 1996).

#### **2. Particularités des kinases de la famille Cak1**

Cak1 possède une séquence apparentée aux membres de la famille Cdc2, mais est active sous forme monomérique (Kaldis et al., 1996 ; Thuret et al., 1996) (pas besoin de cycline ou de facteur d'assemblage comme pour Cdk7 et ses homologues) et ne requiert pas de phosphorylation activatrice (Kaldis et al., 1998 (A)).

Cak1 est une protéine kinase non conventionnelle dont la séquence primaire en acides aminés est dépourvue de certaines caractéristiques typiques des kinases. Elle ne possède pas de motif « glycine loop » (GXGXXG) dans le site de liaison au nucléotide (Hanks et al., 1995) et montre des substitutions de résidus normalement fortement conservés (Kaldis et al., 1996). Un autre exemple concerne la non-nécessité d'une lysine hautement conservée du site catalytique des kinases (Hanks et al., 1995 ; De Bondt et al., 1993). Bien qu'elle soit présente dans la séquence de Cak1, cette lysine est dispensable pour l'activité de Cak1 *in vivo* et *in vitro* (Chun et al., 1997 ; Enke et al., 1999 ; Tsakraklides et al., 2002). Dans le même ordre d'idées, la protéine Cak1 est insensible au FSBA (5'-fluorosulfonylbenzoyladénosine), un composé se liant de manière covalente à la lysine et induisant la perte totale d'activité chez la majorité des kinases testées (Enke et al., 1999).

D'un point de vue fonctionnel, alors que Cdk7 fixe préférentiellement les complexes de type cycline/CDK préformés pour les phosphoryler, Cak1 a plus d'affinité pour les CDK monomériques (Kaldis et al., 1998 (B)). Ces différences d'affinité pour les substrats conduisent à des mécanismes d'activation *in vivo* différents : Cdc28, l'homologue de Cdc2 chez *S. cerevisiae* est phosphorylée par Cak1 avant de fixer sa cycline (Ross et al., 2000).

alors que chez les vertébrés, les CDK doivent avoir fixé leur cycline pour être ensuite phosphorylées par Cdk7 (Kaldis et *al.*, 1999).

Comme nous l'avons dit, chez *S. cerevisiae*, le contrôle du cycle cellulaire et la régulation de la transcription sont donc assurés par Cak1 et Kin28 respectivement. Par contre la situation chez la levure de fission *Schizosaccharomyces pombe* est plus contrastée. Le complexe homologue de Cdk7-Cyclin H-Mat1 (appelé Mcs6-Mcs2-Pmh1 chez *S. pombe*) possède une activité CAK *in vitro* (Damagnez et *al.*, 1995 ; Buck et *al.*, 1995), ce qui le rapproche de Cdk7 et du modèle proposé chez les eucaryotes supérieurs. Cependant, chez cet organisme, une protéine homologue à Cak1 de *S. cerevisiae* existe également. Il s'agit de la kinase non essentielle Csk1.

## **IV. Situation chez *Schizosaccharomyces pombe***

### **1. Étude de Mcs6, homologue chez *S. pombe* de Cdk7**

#### **1.1 Découverte des mutants mcs « mitotic catastrophe suppressors »**

Les mutants *mcs6-13* et *mcs2-75* de *S. pombe* ont tous deux été isolés lors d'un crible visant à identifier des inducteurs mitotiques et fonctionnent comme supprimeurs extragéniques du phénotype appelé « catastrophe mitotique » (Molz et al., 1989). Ce phénotype résulte d'une entrée prématurée en mitose avant la fin de la réplication (Russell et al., 1987). Génétiquement, il peut être induit de plusieurs façons et notamment en combinant un allèle hyperactif dominant de *cdc2* (*cdc2-3w*) et une perte de fonction conditionnelle du gène *wee1*, (*wee1-50*, Russell et al., 1987). A température restrictive, les cellules *cdc2-3w wee1-50* activent le complexe Cdc2-Cdc13 de manière prématurée engendrant une « catastrophe mitotique » et la mort cellulaire. Une mutagenèse de cette souche en l'incubant avec le composé mutagène EMS (Ethylmethanesulfonate, molécule engendrant des mutations aléatoires dans le matériel génétique par des substitutions nucléotidiques) a permis d'identifier des supprimeurs de ce phénotype létal, c'est-à-dire des gènes qui, lorsqu'ils sont mutés, restaurent la viabilité. Ces gènes encodent des inducteurs mitotiques dont la mutation diminue le phénotype de « catastrophe mitotique » des cellules *cdc2-3w wee1-50* à température restrictive.

Six gènes ont été identifiés et baptisés gènes *mcs* pour « mitotic catastrophe suppressors ». Le gène *mcs1* code pour la protéine Res2 (Tournier et al., 2000), un constituant du facteur de transcription MBF (ou DSC1) qui contrôle l'expression de gènes critiques comme *cdc18* (Kelly et al., 1993), *cdc22* (Gordon et al., 1986) et *cdt1* (Hofmann et al., 1994) pour l'initiation de la phase de synthèse de la division cellulaire (Lowndes et al., 1992). Les gènes *mcs3* et *mcs5* n'ont pas été caractérisés. Le produit du gène *mcs4* montre une homologie significative avec les membres de la famille des régulateurs de réponse à deux composantes. C'est un senseur pour de nombreux signaux environnementaux qui module l'entrée en mitose en régulant la cascade kinase Wlk1-Wis1-Spc1 (Shiozaki et al. 1997 ; Shieh et al., 1997 ; Cottarel et al., 1997). Les gènes *mcs2* et *mcs6* sont décrits dans la section suivante.

#### **1.2 Interaction allèle-spécifique entre *mcs2/mcs6* et *cdc2***

L'existence d'interactions génétiques allèle-spécifiques reflète souvent un lien direct, mais pas nécessairement une interaction physique stable, entre partenaires. Parmi les mutants *mcs*, seuls les allèles *mcs6-13* et *mcs2-75* montrent une interaction allèle-spécifique avec les différents mutants de *cdc2* (Molz et al., 1989). De plus, ces interactions sont comparables à celles décrites entre *cdc2* et *cdc13* qui encode son partenaire cycline (Molz et al., 1989). Ces

données génétiques soutiennent déjà une relation intime entre les produits des gènes *mcs6*, *mcs2* et *cdc2*.

### 1.3 Identification et caractérisation du gène *mcs2*

Le gène *mcs2* a été cloné par complémentation et identifié comme encodant une cycline essentielle à la progression du cycle cellulaire chez *S. pombe* (Molz et al., 1993). Une activité kinase qui n'est pas due à la protéine Cdc2 peut être co-immunoprécipitée avec Mcs2. La protéine Mcs2 est stable au cours du cycle cellulaire (Molz et al., 1993).

### 1.4 Identification et caractérisation du gène *mcs6*

De manière quasi simultanée les équipes de Damagnez et al. (1995) et Buck et al. (1995) ont cloné et identifié le gène essentiel *mcs6*. Il a été démontré que Mcs6 et Mcs2 forment un complexe apparenté à Cdk7/Cycline H et possèdent les activités CAK (cycle cellulaire) et « CTD kinase » (transcription) *in vitro* (Damagnez et al., 1995 ; Buck et al., 1995). Plus tard, une séquence apparentée structuralement et fonctionnellement à Mat1 a été isolée chez *S. pombe*, il s'agit de la protéine Pmh1, confirmant la parenté avec Cdk7-Cycline H-Mat1 (Bamps et al., 2004). Un modèle simple voudrait donc que la levure *S. pombe* se comporte comme les eucaryotes supérieurs en ce qui concerne l'activité CAK et que la levure *S. cerevisiae* utilise une autre stratégie grâce à la présence de la kinase Cak1. Cependant, la présence chez *S. pombe* d'une kinase apparentée à Cak1 de *S. cerevisiae*, Csk1, complique ce modèle.

## 2. Etude Csk1, homologue chez *S. pombe* de Cak1

### 2.1 Découverte et identification de Csk1

Lors du clonage du gène *mcs2* par complémentation du mutant *mcs2-75 cdc2-3w cdc25-22*, un clone suppresseur encodait une kinase qui fût nommée Csk1 pour cyclin suppressing kinase. Il fut rapidement exclu que Csk1 puisse être la kinase associée à Mcs2 puisque le gène *csk1* n'est pas essentiel, au contraire de *mcs2*.

### 2.2 Activation du complexe Mcs6/Mcs2 par Csk1

Bien que Csk1 ne soit pas essentielle, une diminution d'au moins trois fois de l'activité kinase *in vitro* associée à Mcs2 (immunoprécipitation du complexe Mcs6/Mcs2) est observée quand la protéine Csk1 est absente (Molz et al., 1993). En plus du lien génétique de suppression entre *csk1* et *mcs2*, la délétion de *csk1* (*csk1::sup3-5* ; Molz et al., 1993) est colétale avec l'allèle *mcs6-13* (allèle identifié par Molz et al., 1989) à la température restrictive de 36°C (Hermand et al., 1998). Les données biochimiques et les interactions génétiques suggèrent

que la protéine Csk1 agit en amont de Mcs6/Mcs2. Il fut en effet démontré que Csk1 phosphoryle la sérine 165 du « T-loop » de Mcs6 (site d'activation CDK) (Hermand et *al.*, 1998).

La protéine Csk1 peut donc être considérée comme étant la kinase activatrice *in vitro* et *in vivo* du complexe CAK Mcs6/Mcs2, la définissant ainsi comme une kinase activatrice de CAK (CAKAK). Il a ensuite été montré que Cak1 partage cette fonction chez *S. cerevisiae* et active directement Kin28 par phosphorylation (Espinoza et *al.*, 1998).

Par ailleurs, Cak1 et Csk1 partagent aussi la capacité d'être actives sous forme monomérique (Hermand et *al.*, 1998 ; Tsakraklides et *al.*, 2002).

### 2.3 Existence d'une fonction CAK de Csk1 sur Cdc2 ?

Tout comme Cak1 phosphoryle Cdc28, un test kinase *in vitro* montre que Csk1 est capable de phosphoryler Cdc2 (Lee et *al.*, 1999 ; Saiz et *al.*, 2002). Cependant cette donnée est difficilement conciliable avec le fait que les mutants *mcs6-13* et *mcs2-75* suppriment le phénotype d'hyperactivation de Cdc2 dans le crible de suppresseurs de catastrophe mitotique alors que *csk1* est présent (Molz et *al.*, 1989). Si la fonction CAK sur Cdc2 du complexe Mcs6/Mcs2 est redondante avec la fonction de CAK de Csk1, la suppression du phénotype est difficilement explicable.

La création d'un mutant de *mcs6* supporte l'idée que Csk1 n'est pas redondante avec Mcs6. En combinant le mutant *mcs6-13* avec la mutation de la sérine 165 (le site d'activation de Mcs6 phosphorylé par Csk1) (Hermand et *al.*, 1998), on obtient dans un contexte génétique où *csk1* est sauvage, une souche thermosensible, qui mime la létalité synthétique observée dans la souche *mcs6-13 csk1Δ* à température restrictive (Hermand et *al.*, 1998). Pour ce faire, la mutation dans l'allèle *mcs6-13* a été identifiée par séquençage (L238A) et combinée à la mutation du site d'activation CAK de Mcs6 (S165A) pour générer l'allèle *mcs6-S165A-L238R* (*mcs6-SALR*). La surexpression de *csk1* dans la souche *mcs6-SALR* ne permet pas de restaurer la viabilité à température restrictive. Par contre la surexpression de la protéine Cak1 de *S. cerevisiae* supprime la létalité, ce qui suggère fortement que c'est un déficit d'activité CAK de Mcs6 qui est la cause du phénotype.

## **OBJECTIFS**

La protéine Cdc2 (Cdk1 chez les métazoaires) joue un rôle crucial dans le contrôle du cycle cellulaire (Nurse et *al.*, 1976) en activant la réplication de l'ADN et l'entrée en mitose. Comme pour la majorité des kinases dépendantes des cyclines (CDK), une phosphorylation activatrice par une CAK (CDK-Activating Kinase) est requise pour que le complexe Cdc2-cycline soit pleinement actif.

Deux catégories d'enzymes différentes présentent une activité CAK et sont capables de phosphoryler les CDK *in vitro*. Le complexe Cdk7/Cycline H/Mat1 représente la première classe de CAK avec toutefois l'exception notable de son homologue chez *S. cerevisiae*, Kin28/Ccl1/Tfb3, qui ne possède pas d'activité CAK (Fesquet et *al.*, 1993 ; Solomon et *al.* 1992 ; Poon et *al.*, 1993 ; Fisher et *al.*, 1994 ; Fesquet et *al.* 1997 ; Cismowski et *al.*, 1995 ; Valay et *al.*, 1995). La seconde classe est représentée par la kinase Cak1 chez *S. cerevisiae* et possède une activité CAK *in vivo* sur Cdc28, l'homologue fonctionnel de Cdc2 chez cet organisme (Kaldis et *al.*, 1996 ; Thuret et *al.*, 1996 ; Sutton et *al.*, 1997). Aucun homologue de la protéine Cak1 n'a été identifié chez les eucaryotes supérieurs.

La levure de fission *Schizosaccharomyces pombe* est le seul organisme modèle où les deux types de CAK co-existent: Mcs6/Mcs2/Pmh1 (l'homologue de Cdk7/Cycline H/Mat1) et Csk1 (l'homologue de Cak1) sont tous les deux capables de phosphoryler Cdc2 *in vitro* (Damagnez et *al.*, 1995 ; Buck et *al.*, 1995 ; Lee et *al.*, 1999 ; Saiz et *al.*, 2002).

L'équipe de Robert Fisher (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA) propose que cette redondance existe *in vivo*, impliquant que la double inactivation de Csk1 et Mcs6 soit requise pour affecter la phosphorylation de Cdc2 (Lee et *al.*, 1999). L'argument expérimental principal est que, ni la délétion de *csk1*, ni l'inactivation de *mcs6* ne résultent en un phénotype d'élongation (*cdc*) typique de l'inactivation de Cdc2. Il faut noter qu'aucune donnée n'a démontré que l'abolition *in cis* de la phosphorylation de Cdc2 résultait en un phénotype *cdc*. À l'inverse, notre laboratoire considère que Csk1 n'est pas directement impliquée dans la phosphorylation de Cdc2 *in vivo* mais qu'il existe une cascade d'activation linéaire Csk1 → Mcs6 → Cdc2 (Hermand et *al.* 2001). Une donnée génétique forte montre que le défaut de croissance d'un mutant conditionnel de *mcs6* est supprimé par l'expression de Cak1, et ce malgré la présence de Csk1, rendant hautement improbable l'hypothèse d'une redondance de fonction entre Csk1 et Mcs6.

L'objectif de ce travail est d'étayer notre hypothèse en utilisant une approche de génétique chimique capable de démontrer que la seule inactivation de Mcs6 est suffisante pour abolir la phosphorylation de Cdc2. L'issue dépasse largement le cadre presque anecdotique de l'existence des deux types de CAK chez *S. pombe* puisqu'une double fonction CAK et « CTD kinase » de Mcs6 impliquerait que les études transcriptomiques réalisées chez *S. pombe*, et largement transposées à l'homologue métazoaire Cdk7, doivent tenir compte de l'interférence du pathway CAK.

## **RESULTATS**

## **I. Etude *in vivo* des rôles de Mcs6**

### **1. Rappel des fonctions de Mcs6**

Chez *S. pombe*, Mcs6, l'homologue de la kinase Cdk7 présente deux rôles. Le premier consiste à activer la CDK Cdc2, le régulateur central de la progression des cellules dans le cycle cellulaire, par une phosphorylation de la thréonine 167 localisée dans son « T-loop », il s'agit de la fonction CAK (CDK-activating kinase) de Mcs6. Un second rôle, impliqué dans la transcription, est la phosphorylation des sérines 5 contenues dans le CTD de l'ARN Polymérase II, Mcs6 agit donc également sur la transcription (Buck et *al.*, 1995 ; Damagnez et *al.*, 1995).

Une autre kinase de *S. pombe*, Csk1, possède aussi une activité CAK *in vitro* et il a été montré qu'elle fonctionne *in vivo* comme la kinase activatrice des CDK Mcs6 de *S. pombe* (Hermand et *al.*, 1998) et Cdk9 de *S. pombe* (Pei et *al.*, 2006). Cdk9 est également une kinase dépendante des cyclines associée au facteur de transcription général P-TEF-B. Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, elle effectue la phosphorylation des sérines 2 du CTD de la plus grosse sous-unité l'ARN Polymérase II durant la transcription. L'implication de cette protéine dans la transcription a été étudiée au laboratoire par Allan Guiguen (Guiguen et *al.*, 2007).

Sur cette base, il a été suggéré que Csk1 pourrait aussi activer Cdc2 en partageant cette fonction de manière redondante avec Mcs6. Cependant des données génétiques fortes s'opposent à cette hypothèse (Molz et *al.*, 1989). Pour tenter d'identifier sans ambiguïté la ou les CAK de Cdc2 *in vivo*, nous avons utilisé une stratégie basée sur l'utilisation d'enzymes mutantes dites « analogue sensitive » (-as).

### **2. Création et caractérisation d'un mutant « analogue sensitive » *mcs6-as***

#### **2.1 Création du mutant *mcs6-as***

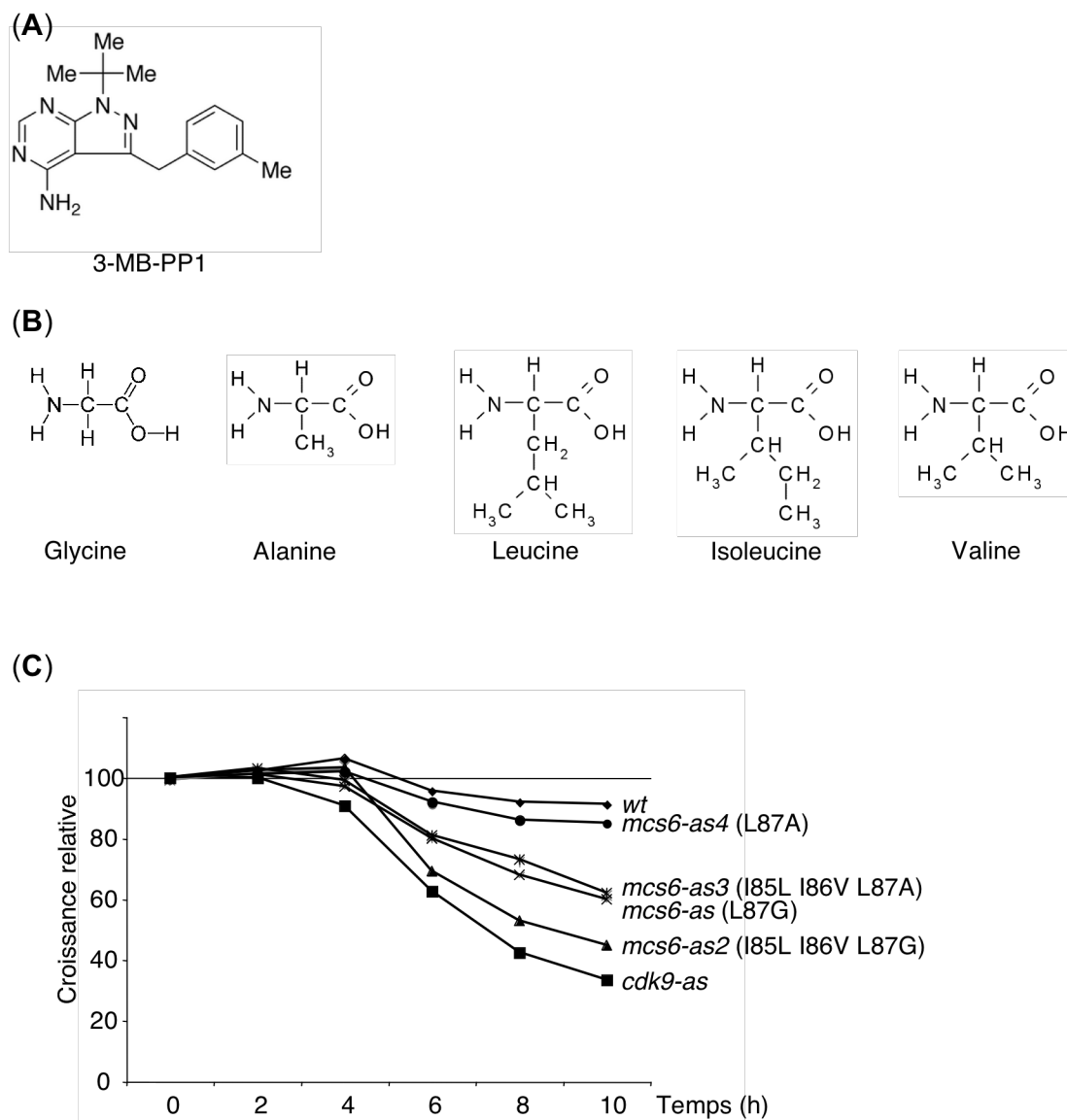
Cette méthode se base sur la modification d'un résidu large et hydrophobe, appelé « gatekeeper », situé au sein de la poche de fixation de l'ATP des sérine-thréonine kinases. Ce résidu, fortement conservé, réalise une liaison avec le groupe N6 de l'ATP. Sa mutation en un acide aminé de petite taille (typiquement la glycine) permet d'agrandir la poche de fixation de l'ATP pour accueillir un inhibiteur trop large pour se lier aux kinases sauvages (Bishop et *al.*, 1998 ; Gregan et *al.*, 2007). L'inhibiteur qui sera utilisé ici est le 3-MB-PP1 (4-Amino-1-tert-butyl-3-(3-methylbenzyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine ; Habelhah et *al.*, 2001 ; Toronto Research Chemicals Inc). Un des grands avantages de cette technique est la rapidité de réponse à l'inhibiteur. En effet, en seulement quelques minutes, il pénètre dans les cellules et débute l'inhibition de la kinase ciblée. Les mutants ainsi générés sont nommés -as pour « analogue-sensitive ».

Figure 1 :

|       |                                                                |     |
|-------|----------------------------------------------------------------|-----|
| Cdc28 | ----MSGELANYKRLEKVGEGTYGVVYKALDLRPGQGQRVVALKKIRLE---SEDEGVPS   | 53  |
| Cdc2  | -----MENYQKVEKIGEGTYGVVYKARHKLSG---RIVAMKKIRLE---DESEGVPS      | 46  |
| Cdk2  | -----MENFQKVEKIGEGTYGVVYKARNKLTG---EVVALKKIRLD---TETEGVPS      | 46  |
| Cdk7  | MALDVKSRAKRYEKLDLFGEGQFATVYKARDKNTN---QIVAIKKIKLGRSEAKDGINR    | 57  |
| Mcs6  | MDIE-KSDKWITYVKERKVGEGTYAVVFLGRQKETN---RRVAIKKIKVG---QFKDGIDI  | 53  |
| Cdc28 | TAIREISLLKELKDDN----IVRLYDIVHSDAHKLYLVFEFLDLDLKRYMEGIPKD--QP   | 107 |
| Cdc2  | TAIREISLLKEVNDENNRSNCVRLLDILHAES-KLYLVFEFLDMDLKKYMDRISETGATS   | 105 |
| Cdk2  | TAIREISLLKELNHPN----IVKLLDVIHTEN-KLYLVFEFLHQDLKKFMDASALTG---   | 98  |
| Cdk7  | TALREIKLLQELSHPN----IIGLLDAFGHKS-NISLVDFMETDLEVIKDNSLV----     | 108 |
| Mcs6  | SALREIKFLRESRHDN----VIELVDVFSTKS-NLNLILEFLDSDELEMLIKDKFIV----  | 104 |
| Cdc28 | LGADIVKKFMMQLCKGIAYCHSHRILHRDLKPQNLLINKDGNLKLGDGFLARAFGVPLRA   | 167 |
| Cdc2  | LDPRLVQKFTYQLVNGVNFCHSRRIHRDLKPQNLLIDKEGNLKLADFGLARAFGVPLRN    | 165 |
| Cdk2  | IPLPLIKSYLFQLLQGLAFCHSHRVLHRDLKPQNLLINTEGAIKLADFGLARAFGVVRT    | 158 |
| Cdk7  | LTPSHIKAYMLMTLQGLEYLHQHWILHRDLKPNNLLDENGVLKLADFGLAKSFGSPNRA    | 168 |
| Mcs6  | FQPAHIKSWMVMLLRGLHHIHSRIFILHRDLKPNNLLISSDGVLLKLADFGLSRDFGTPS-H | 163 |
| Cdc28 | YTHEIVTLWYRAPEVLLGGKQYSTGVDTWSIGCIFAEMCNRKPIFSGDSEIDQIFKIFRV   | 227 |
| Cdc2  | YTHEIVTLWYRAPEVLLGSRHYSTGVDIWSVGCIFAEMIRRSPLFPDSEIDEIFKIFQV    | 225 |
| Cdk2  | YTHEVVTWYRAPEILLGCKYYSTAVDIWSLGCIFAEMVTRRALFPDSEIDQLFRIFRT     | 218 |
| Cdk7  | YTHQVVTRWYRAPELLFGARMYGVGVDMAVGCILAEALLRVFPFLPGSDLDQLTRIFET    | 228 |
| Mcs6  | MSHQVITRWYRPPPELFMGCRSYGTGVDMWSVGCIFAELMLRTPYLPGESDLDQLNVIFRA  | 223 |
| Cdc28 | LGTPNEAIWPDIVYLPDFKPSFPQWRRKD--LSQVVPSLDPRGIDLLDKLLAYDPINRIS   | 285 |
| Cdc2  | LGTPNEEVWPGVTTLLQDYKSTFPRWKRM--LHKVVPNGEEDAIELLSAMLVYDPAHRIS   | 283 |
| Cdk2  | LGTPDEVVWPGVTSMPDYKPSFPKWARQ--FSKVVPPLDEDGRSLLSQMLHYDPNKRIS    | 276 |
| Cdk7  | LGTPTEEQWPDMSLPDY-VTFKSFPGIP--LHHIFSAAGDDLDDLIQGLFLFNPCARIT    | 285 |
| Mcs6  | LGTPEPEVIKSMQQLPNY-VEMKHIPPPNGGMEALFSAAGHEEIDLLKMMLDYNPYRRPT   | 282 |
| Cdc28 | ARRAAIHYPFQES-----                                             | 298 |
| Cdc2  | AKRALQQNYLRDFH-----                                            | 297 |
| Cdk2  | AKAALAHPPFQDVTKPVPHRL-----                                     | 298 |
| Cdk7  | ATQALKMKYFSNRPGPTPGCQLPRPNCPVETLKEQSNPALAIKRRKTEALEQGGLPKKLI   | 345 |
| Mcs6  | AQQALEHHYFSALPKPTHPSLLPR-KGGEEGIKHVSS---DLQRQNNFPMRAN---IKFV   | 335 |
| Cdc28 | -                                                              |     |
| Cdc2  | -                                                              |     |
| Cdk2  | -                                                              |     |
| Cdk7  | F 346                                                          |     |
| Mcs6  | -                                                              |     |

**Figure 1. Identification du résidu « gatekeeper » dans la protéine Mcs6 de *S. pombe*.** Alignement protéique entre Mcs6 (*S. pombe*) et les kinases Cdc28 (*S. cerevisiae*), Cdc2 (*S. pombe*), Cdk2 (*H. sapiens*) et Cdk7 (*H. sapiens*). En bleu, mauve et jaune sont représentés respectivement le résidu « gatekeeper » (caractéristique des sérine-thréonine kinases) et ses deux résidus en amont (alignement réalisé avec ClustalW2).

Figure 2 :



**Figure 2. Retard de croissance chez les mutants « analogue sensitive » de Mcs6 en présence de 3-MB-PP1.** (A) Structure de l'inhibiteur 3-MB-PP1 (4-Amino-1-tert-butyl-3-(3-methylbenzyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine). (B) Structure des acides aminés impliqués dans la création des kinases -as de Mcs6. (C) Après intégration chez la levure de fission des allèles *mcs6-as*, *mcs6-as2*, *mcs6-as3*, *mcs6-as4* et *cdk9-as*, la croissance relative (obtenue en comparant les conditions avec/sans inhibiteur) de chaque souche et de la souche sauvage a été suivie pendant 10 h en condition de croissance liquide dans un milieu riche (YES).

Après identification du résidu « gatekeeper » de Msc6 grâce à un alignement de séquence avec d'autres sérine-thréonine kinases (**figure 1**), un mutant -as (*mcs6-as*) a été généré en remplaçant la leucine 87 en glycine. Le mutant a été intégré au locus du gène *mcs6* par recombinaison homologue.

## 2.2 Caractérisation du mutant *mcs6-as*

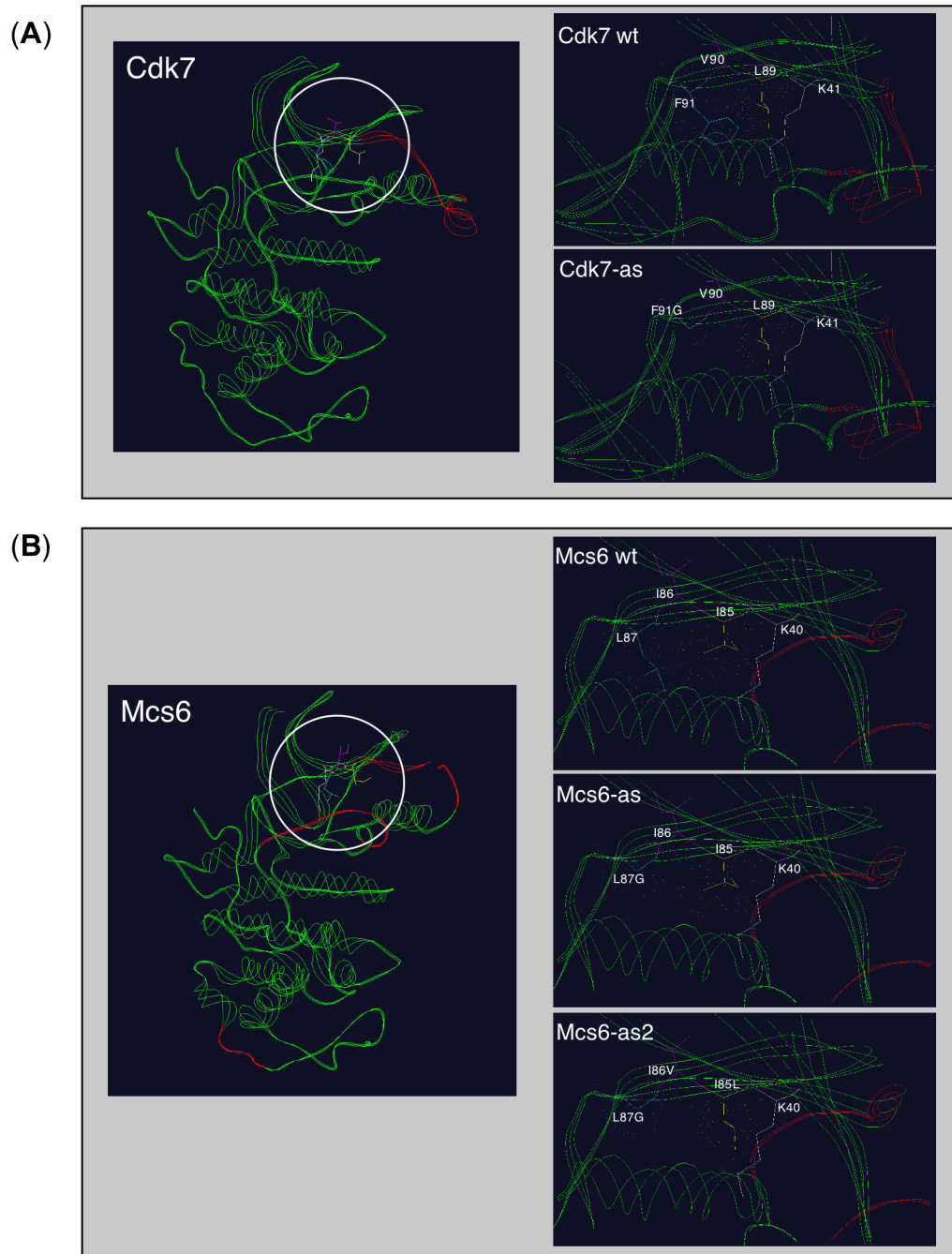
Pour tester la fonctionnalité du mutant *mcs6-as*, une comparaison de croissance de la souche sauvage et du mutant a été réalisée en présence ou en absence de l'inhibiteur 3-MB-PP1. La comparaison, pour chacune des souches, entre la croissance avec et sans l'inhibiteur permet d'établir la croissance relative de chaque souche (**figure 2C**). Il est important de noter qu'il existe plusieurs inhibiteurs différents pouvant interférer avec le fonctionnement des kinases – as. Il est impossible de savoir à l'avance quel inhibiteur sera le plus efficace. Seule l'expérimentation peut apporter cette réponse. Dans notre étude, nous avons utilisé le 3-MB-PP1 car il était disponible au laboratoire et qu'il fonctionnait correctement avec notre contrôle, la protéine Cdk9-as. Il est cependant indispensable de considérer que l'inhibition est fortement dépendante de la dose de l'inhibiteur. Une concentration adéquate permet de mettre en évidence un effet clair chez la kinase –as sans pour autant affecter sensiblement la kinase sauvage.

La souche mutante *mcs6-as* présente un ralentissement de sa croissance spécifique en présence de la drogue. Cependant, cette diminution est deux fois moins importante que celle observée quand le mutant *cdk9-as* est utilisé (Guiguen et *al.*, 2007). Une telle différence de croissance entre Msc6 et Cdk9 est inattendue dans la mesure où les deux kinases sont essentielles à la viabilité cellulaire et possèdent une fonction complémentaire durant les étapes de transcription (Msc6 et Cdk9 phosphorylent respectivement les sérines 5 et les sérines 2 du CTD de l'ARN Polymérase II) (Pei et *al.*, 2006 ; Viladevall et *al.*, 2009). Nous avons posé l'hypothèse que le mutant *mcs6-as* pourrait n'être que partiellement sensible à l'inhibiteur. Une comparaison de séquence de la poche de fixation de l'ATP de kinases apparentées à Msc6 nous a permis de considérer des mutations supplémentaires dans le but d'augmenter la sensibilité de *mcs6-as* à l'inhibiteur.

## 2.3 Amélioration du mutant *mcs6-as*

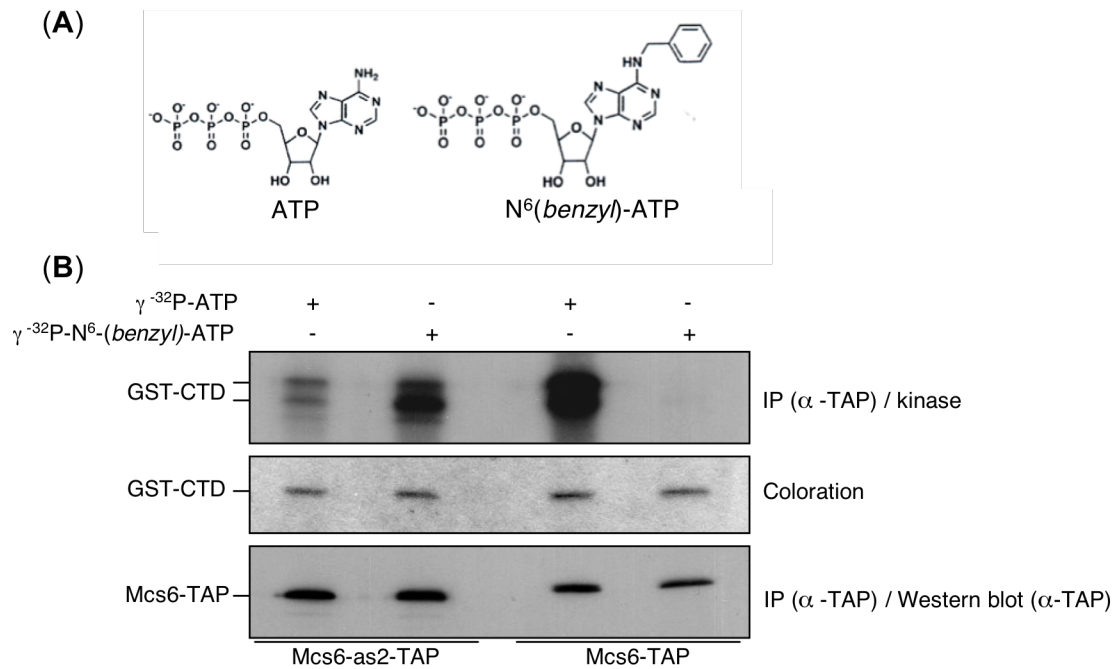
Un alignement de la région entourant la leucine 87 de Msc6 (résidu « gatekeeper ») et des CDK dont la mutation –as rend particulièrement sensibles à la drogue (Cdc2 (Dischinger et *al.*, 2008), Cdc28 (Dischinger et *al.*, 2008), Cdk7 (Larochelle et *al.*, 2007)) a permis de mettre en évidence une particularité de Msc6. En effet, cette dernière possède deux isoleucines (I85 et I86) en amont du résidu « gatekeeper » alors que les autres kinases possèdent toutes une leucine et une valine à cet endroit (**figure 1**).

Figure 3 :



**Figure 3 : Les mutations I85L et I86V dans Mcs6-as miment la configuration du site catalytique de son homologue Cdk7.** Structures tridimensionnelles des kinases Cdk7 (*H. sapiens*) (A) et Mcs6 (*S. pombe*) (B). Les images de gauche proposent une vue globale de la protéine tandis que celles de droite correspondent à une vue approchée de la poche de fixation de l'ATP des kinases sauvages et -as. Le résidu « gatekeeper » est en bleu, les deux résidus en amont de celui-ci sont en mauve et jaune. En gris, on retrouve la lysine fortement conservée dans la poche de fixation de l'ATP (lysine évoquée dans l'introduction et dont on reparlera plus tard dans ce travail) (Modélisation réalisée avec SwissPDBViewer)

Figure 4 :



**Figure 4. Utilisation spécifique du  $^{32}\text{P}$ -N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP par la protéine « analogue sensitive » Mcs6-as2.** (A) L'ajout du groupement *benzyl* en position N6 sur l'adénine de l'ATP augmente la taille de cette molécule et la rend *a priori* inutilisable par les kinases sauvages. (B) Des cellules de *S. pombe* exprimant l'allèle intégratif *mcs6-TAP* ou *mcs6-as2-TAP* ont été lysées pour immunoprécipiter les protéines Mcs6-TAP et Mcs6-as2-TAP en utilisant des billes magnétiques coâtées d'anticorps dirigés contre le tag TAP. L'activité kinase sur le polypeptide GST-CTD a été testée lors d'une réaction kinase *in vitro* utilisant soit le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP ou le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP, suivie d'un gel SDS-PAGE et d'une autoradiographie. Une coloration au bleu de Coomassie et un Western blot utilisant des anticorps anti-TAP ont ensuite été effectués sur le gel SDS-PAGE.

La publication de la structure cristallographique de Cdk2 (De Bondt et *al.*, 1993) permet une modélisation relativement aisée de la structure des CDK que nous étudions, et ce grâce à la conservation de séquence élevée au sein de cette famille. La structure tridimensionnelle de Msc6 et son équivalent chez les eucaryotes supérieurs Cdk7, suggère que la chaîne latérale du résidu situé à la position 85 pointe directement vers l'intérieur de la poche de fixation de l'ATP de la kinase (**figure 3**). La chaîne latérale de l'isoleucine se trouvant en position 85 chez Msc6 pourrait donc participer à l'encombrement stérique par rapport à la leucine qui est retrouvée dans les autres kinases. Le remplacement de la séquence sauvage I85 I86 L87 en L85 V86 G87 a donc été effectué pour mimer celle des kinases qui répondent bien à l'inhibiteur.

Comme observé dans la **figure 2C**, ces deux mutations supplémentaires augmentent effectivement la sensibilité du mutant -as (dénommé *mcs6-as2*) à l'inhibiteur et l'effet sur la croissance s'apparente à celui observé pour le mutant *cdk9-as*. D'autres combinaisons de mutations impliquant le remplacement du résidu « gatekeeper » par une alanine plutôt qu'une glycine ont été également tentées sans conduire à des résultats probants. Nous avons donc utilisé le mutant *mcs6-as2* dans la suite de ce travail.

## 2.4 Utilisation du mutant *mcs6-as2* avec le N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP

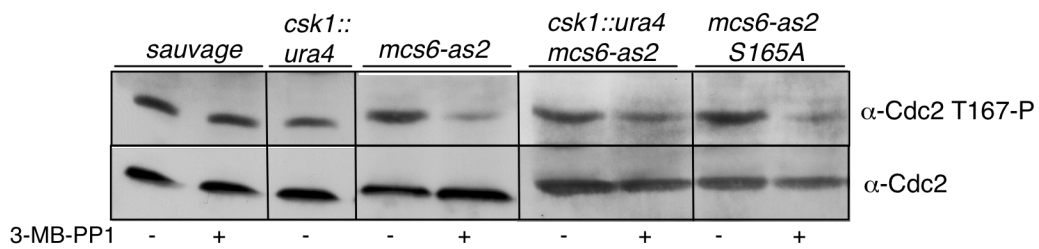
Une alternative intéressante dans l'utilisation des mutants -as est leur combinaison avec un analogue de l'ATP appelé le N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP. Cette molécule possède un groupement *benzyl* volumineux en position N6 de l'adénine et le phosphate en position gamma est radiomarké avec du <sup>32</sup>P (Liu et *al.*, 1998) (**figure 4A**). En effet, seule la kinase modifiée pourra accepter cette molécule et ses substrats phosphorylés pourront être marqués en conséquence.

Le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP n'étant pas commercialisé, nous l'avons synthétisé en suivant les recommandations de Dephoure et *al.* (2005) et Eblen et *al.* (2003). En bref, un phosphate radioactif a été transféré de l'ATP à la Nucleoside 5'-Diphosphate Kinase (NDPK) de *S. cerevisiae*, qui a ensuite été utilisée pour phosphoryler le nucleoside diphosphate N<sup>6</sup>-(benzyl)-ADP.

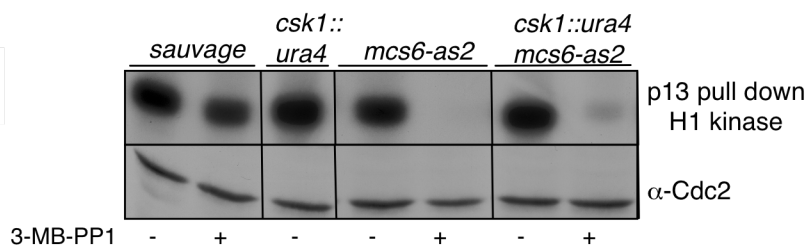
Des souches exprimant les protéines Msc6 ou Msc6-as2 fusionnées au tag TAP ont été construites par recombinaison homologue (Bähler et *al.*, 1998) de manière à permettre leur immunoprécipitation. Un test d'activité kinase en présence d'ATP ou de N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP radiomarkés a ensuite été réalisé sur les billes d'immunoprécipitation avec le polypeptide GST-CTD comme substrat. Comme attendu, le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP peut être utilisé par les deux kinases alors que le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP n'est utilisé que par la kinase Msc6-as2 pour phosphoryler le GST-CTD (**figure 4B**). Nous en concluons que, *in vitro*, le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP est spécifiquement utilisé par la kinase -as. La légère diminution de l'affinité que possède la protéine Msc6-as2-TAP pour l'ATP est certainement due au fait que cette molécule est moins stabilisée dans la poche de fixation de l'ATP de cette kinase modifiée.

Figure 5 :

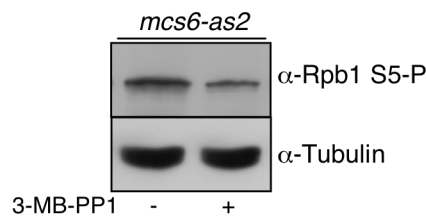
(A)



(B)



(C)



**Figure 5. Inhibition par le 3-MB-PP1 des activités CAK et « CTD kinase » du mutant *mcs6-as2*.** (A) Mesure du niveau de phosphorylation de Cdc2 (*S. pombe*) sur son site d'activation (T167) en présence ou en absence de 3-MB-PP1 dans la souche sauvage, *csk1::ura4*, *mcs6-as2*, *csk1::ura4 mcs6-as2* et *mcs6-as2 S165A* grâce à un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de Cdc2. Un anticorps anti-Cdc2 total a également été utilisé comme contrôle de charge. (B) A l'aide de billes p13-Suc-1, la protéine Cdc2 a été immunoprécipitée à partir d'extraits de cellules de *S. pombe* sauvages, *csk1::ura4*, *mcs6-as2* et *csk1::ura4 mcs6-as2* (en présence ou non de 3-MB-PP1) et son activité kinase *in vitro* a été mesurée sur l'histone H1. (C) Mesure du niveau de phosphorylation des sérines 5 du CTD de l'ARN Polymérase II en présence ou en absence de 3-MB-PP1 dans la souche *mcs6-as2*. Un contrôle de charge en utilisant un anticorps anti-tubuline a également été effectué.

Considérées avec le résultat de la **Figure 2C** qui montre l'inhibition spécifique de la croissance de la souche mutante *mcs6-as2* par le 3-MB-PP1, ces données établissent que le mutant *mcs6-as2* peut être utilisé pour étudier les rôles de Mcs6 *in vivo*, et sa redondance possible avec Csk1 dans l'activation de Cdc2.

### 3. Inhibition de l'activité de Mcs6-as2 *in vivo* avec le 3-MB-PP1

#### 3.1 Effet de l'inhibition sur la fonction CAK de Mcs6

##### 3.1.1 Effet sur la phosphorylation de Cdc2

Le niveau de phosphorylation de Cdc2 sur son site d'activation « T-loop » (T167) a été déterminé grâce à un anticorps spécifique de la forme phosphorylée (voir matériels et méthodes) dans une souche sauvage et dans la souche *mcs6-as2* en présence ou en absence de 3-MB-PP1. Le niveau de phosphorylation a également été déterminé dans une souche délétée pour *csk1*, en combinaison ou non avec *mcs6-as2*. Enfin, la combinaison des mutations présentes dans l'allèle *mcs6-as2* avec la mutation de la sérine 165 en alanine S165A, située dans le site d'activation « T-loop » de Mcs6 par Csk1, a également été testée. Dans tous les cas, un contrôle de chargement a été réalisé en utilisant un anticorps anti-Cdc2 non spécifique de la forme phosphorylée.

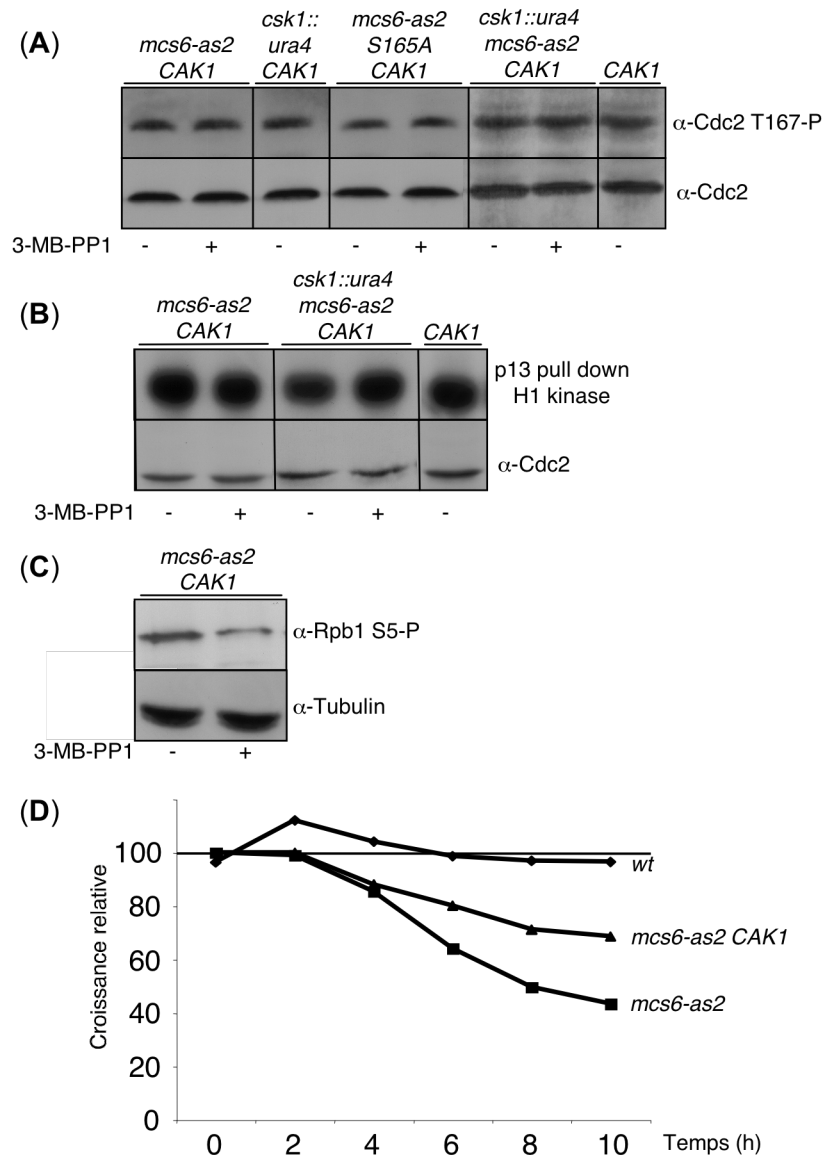
En présence de 3-MB-PP1, une diminution marquée de la phosphorylation de Cdc2 est observée dans la souche *mcs6-as2*. Ni la délétion de *csk1* ni la combinaison avec le mutant S165A n'augmente cet effet (**figure 5A**). Comme rapporté dans la littérature (Hermand *et al.*, 2001), la délétion de *csk1* seule n'a pas d'effet détectable sur la phosphorylation de Cdc2. La quantification de l'intensité des bandes du gel serait intéressante pour confirmer ce résultat.

L'inhibition de Mcs6, en présence de Csk1, entraîne une diminution marquée de la phosphorylation de Cdc2 sur le site CAK (T167). L'activité de Csk1 n'est donc clairement pas redondante avec celle de Mcs6 pour cette fonction. Nous en concluons que Mcs6 est la CAK principale, sinon unique, de Cdc2 *in vivo*. L'activité de Csk1 n'est clairement pas redondante avec Mcs6 pour cette fonction.

##### 3.1.2 Effet sur l'activité kinase de Cdc2

Pour compléter les données présentées ci-dessus, l'activité kinase de Cdc2 sur un substrat artificiel (l'histone H1) a été étudiée en immunoprécipitant la protéine à partir d'extraits cellulaires provenant des différentes souches traitées ou non avec l'inhibiteur. L'utilisation de 3-MB-PP1 avec la souche *mcs6-as2* induit une forte diminution de l'activité kinase de Cdc2 (**figure 5B**) parallèlement à la diminution de phosphorylation observée plus haut. Conformément à ce qui a été observé précédemment, la délétion de *csk1* seule ou en combinaison avec *mcs6-as2* n'a pas d'effet sur l'activité de Cdc2. Ces résultats supportent donc la conclusion établie au point précédent.

Figure 6 :



**Figure 6. Complémentation de la fonction CAK du mutant *mcs6-as2* par la protéine Cak1 de *S. cerevisiae*.** (A) Mesure du niveau de phosphorylation de Cdc2 sur le site d'activation (T167) en présence ou en absence de 3-MB-PP1 dans la souche possédant l'allèle intégratif *ura4::CAK1* seul ou en combinaison avec les allèles *mcs6-as2*, *csk1::ura4*, *mcs6-as2 S165A* et *csk1::ura4 mcs6-as2* grâce à un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de Cdc2. Un anticorps anti-Cdc2 total a également été utilisé comme contrôle de charge. (B) A l'aide de billes p13-Suc-1, la protéine Cdc2 a été immunoprécipitée à partir d'extraits de *S. pombe* possédant l'allèle intégratif *ura4::CAK1* seul ou en combinaison avec les allèles *mcs6-as2* et *csk1::ura4 mcs6-as2* (en présence ou non de 3-MB-PP1) et son activité kinase *in vitro* a été mesurée sur l'histone H1. (C) Mesure du niveau de phosphorylation des sérines 5 du CTD de l'ARN Polymérase II en présence ou en absence de 3-MB-PP1 dans une souche *mcs6-as2 ura4::CAK1*. Un contrôle de charge en utilisant un anticorps anti-tubuline a également été effectué. (D) Les croissances relatives (obtenues en comparant pour chaque souches la condition avec ou sans inhibiteur 3-MB-PP1) des souches sauvage, *mcs6-as2* et *mcs6-as2 ura4::CAK1* ont été suivies pendant 10 h en condition de croissance liquide dans un milieu riche (YES).

### 3.2 Effet de l'inhibition sur la fonction « CTD kinase » de Mcs6

La protéine Mcs6 phosphoryle les sérines 5 du CTD de l'ARN polymérase II. Une diminution de cette phosphorylation est également observée en présence de l'inhibiteur quand le mutant *mcs6-as2* est utilisé (**figure 5C**). Elle n'est pas aussi marquée que pour l'activité CAK sur Cdc2 mais il est important de préciser qu'au moins une autre kinase, Cdk9, est capable de phosphoryler le même résidu.

## 4. Complémentation partielle du mutant *mcs6-as2* par la kinase Cak1 de *S. cerevisiae*

### 4.1 Effet de l'expression de Cak1 sur la fonction CAK de Mcs6

#### 4.1.1 Effet sur la phosphorylation de Cdc2

Nous avons vu précédemment qu'en présence d'inhibiteur, une diminution spécifique de la phosphorylation et de l'activité kinase de Cdc2 est observée dans la souche *mcs6-as2*. Le gène *CAK1*, homologue de *csk1* chez la levure de bourgeonnement, a été intégré au locus du gène *ura4* chez *S. pombe*. L'expérience présentée à la **figure 5** a été répétée en présence de *CAK1*. Les résultats montrent que la protéine Cak1 de *S. cerevisiae* complémente le défaut de phosphorylation de Cdc2 résultant de l'inhibition de Mcs6 quand l'allèle *mcs6-as2* est utilisé avec l'inhibiteur (**figure 6A**).

#### 4.1.2 Effet sur l'activité kinase de Cdc2

La **figure 6B** montre un résultat équivalent au précédent quand l'activité de Cdc2 est testée. La présence de *CAK1* restaure un niveau d'activité normal de Cdc2 dans les souches *mcs6-as2* en présence d'inhibiteur.

### 4.2 Effet de l'expression de Cak1 sur la fonction « CTD kinase » de Mcs6

Parallèlement à l'activité CAK qui est complémentée par la kinase Cak1, Mcs6 possède une activité kinase sur le CTD de l'ARN Polymérase II. La diminution du niveau de phosphorylation des sérines 5 sur le CTD n'est pas complémentée par la présence de Cak1 (**figure 6C**). Ce résultat est attendu puisque Cak1 n'est pas une kinase du CTD. Il confirme, en outre, que la présence de la protéine Cak1 n'interfère pas avec l'inhibition de Mcs6-as2, mais complémente spécifiquement la fonction CAK déficiente quand la souche *mcs6-as2* croit en présence d'inhibiteur.

### 4.3 Complémentation partielle du phénotype de *mcs6-as2* par Cak1

La **figure 2C** montre qu'en présence de l'inhibiteur 3-MB-PP1, la souche *mcs6-as2* souffre d'un retard de croissance marqué par rapport à la souche sauvage. Dans des conditions identiques, l'expression de la protéine Cak1 dans la souche *mcs6-as2* permet de supprimer partiellement ce défaut de croissance (**figure 6D**). La croissance de la souche *mcs6-as2 CAK1* est intermédiaire entre celle de la souche sauvage et de la souche *mcs6-as2*. Cette donnée renforce l'idée que Cak1 complémente une seule des deux fonctions de Msc6, à savoir l'activité CAK sur Cdc2 (le rôle de Msc6 dans la régulation de la transcription n'est pas complétement par Cak1. Elle indique également que le phénotype observé quand Msc6 est inhibée résulte de l'interférence avec les deux pathways régulés par Msc6 *in vivo*.

## 5. Conclusion sur l'étude des rôles de Msc6 *in vivo*

Cette étude indique que Msc6 est la CAK authentique de Cdc2 chez *S. pombe*, et que cette fonction n'est pas partagée par Csk1, en tout cas *in vivo*. Il est intrigant que la kinase Cak1, homologue de Csk1 peut remplir le rôle de CAK pour Cdc2 quand elle est exprimée chez *S. pombe*. Malgré la proximité des deux kinases Cak1 et Csk1, il existe donc de toute évidence, une différence fonctionnelle importante entre elles. Cet aspect a été approfondi dans la suite de ce travail.

Figure 7 :

|        |                                                               |                               |
|--------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Cak1   | -----MKLDSIDITHCQLVKSTRTARIYRSD-----TYAIKCLALDFDIP--PHN       | 43                            |
| KlCak1 | -----MTNKTNTTPIKIQTGCADLELFP-----DIVVKRIDLELQRP--PHN          | 41                            |
| Mcs6   | ---MDIEKSDKWTVYKERVGEPTYAVVFLGRQKETN---RRVAIKKIKVGQFKDGIDIS   | 54                            |
| Kin28  | ---MKVN---MEYTKKKVGEPTYAVVFLGCQHSTG---RKIAIKKIKTSEFKDGLDMS    | 50                            |
| Cdc2   | -----MENYQKVEKIGEGTYGVVYKARHKLGS---RIVAMKKIRLEDESEGVST        | 47                            |
| Cdc28  | MSG-----LANYKRLEKVGEGTYGVVYKALDLRPGQGQRRVVALKKIRLE SEDEGVST   | 54                            |
| Csk1   | ---MKSVDGHFVPLWTDIRHLTDGTISEVFVGERKNSK---KLYVIKVQGLVFKRP--PHD | 52                            |
| CaCak1 | -----MKLSDYYIDKELIYNSAISDIYTAIDKFNN---LPVCLKIVDEDFSLP--PHS    | 48                            |
| Cak1   | AKFEVSILNKLGNKC--KHILPLESKATDNN-DLLL                          | FPFEEMNLYEFMQMHYKRDRR 100     |
| KlCak1 | AHTELEILKTISN---KHVIPLLGSETSPR--YVTFK                         | FKRYQCDLNQFMDQHWKAKYN- 94     |
| Mcs6   | ALREIKFLRESRHDN---VIELVDVFSTKS--NLNII                         | LEFLDSBLEMLIK----- 99         |
| Kin28  | AIRE VKYLQEMQHPN---VIELIDIFMAYD--NLNLV                        | LEFLPTDLEVVIK----- 95         |
| Cdc2   | AIREISLLKEVDENNRSNCVRLLDILHAES--KLYLV                         | FEFLDMDLKKYMDRISE----- 100    |
| Cdc28  | AIREISLLKELKDDN---IVRLYDIVHSDAH-KLYLV                         | FEFLDLDLKRYMEGIPK----- 104    |
| Csk1   | AMRGKILLESIGHPH---IERIVDSFIDNEAGSVYLI                         | TSFKSFVLSVMD----- 99          |
| CaCak1 | IHREVLILKTLKHPH---NIEYFNDLKICD--DIILV                         | TKLYRYDLSQLIEITKYCKRTT 103    |
| Cak1   | KNPYDILLNPSIPVADPPVQKYNQLDVNRYSLS                             | FFRQMVEGIAFLHENKIIHRDIKPQ 160 |
| KlCak1 | -----PYLLDNSTKYSNTIPLD-HSTVIRQIIEGLVYIHNGIIHRDVKPQ            | 141                           |
| Mcs6   | -----DKFIVFPQAHIKSWMMLRLGLHHIHSRFLIHRDLKPN                    | 137                           |
| Kin28  | -----DKSILFTPADIKAWMLMTLRGVYHCHRNFLIHRDLKPN                   | 133                           |
| Cdc2   | -----TGATSLDPLRVQKFTYQLVNGVNFCHSRRIIHRDLKPN                   | 138                           |
| Cdc28  | -----D--QPLGADIVKFMMLCKGIAYCHSHRILHRDLKPN                     | 140                           |
| Csk1   | -----EISIDTKCKIVLQISSALEYLEKHGILHRDIHPN                       | 133                           |
| CaCak1 | RFIYG-----INGNLVSNQYTLANEIEEKDIKLWLKSMSSGLEFIHSQGIHRDIKPI     | 156                           |
| Cak1   | NIMLTNNTSTVSPKLYIIDFGISYDMANNSQTSAPMDSKVTDISTGIYKAPEVLFGVKC   | 220                           |
| KlCak1 | NIMLNSYN---EVVLGDFGISYNRLDN-----EAKTCDSTSIYKAPELLFSVSN        | 189                           |
| Mcs6   | NLLISDGG---VLKLADFGLSRDFGTP-----SHMSHQVITRWYRPPPELFMGCRS      | 184                           |
| Kin28  | NLLFSPDG---QIKVADFGLARAIAPAH-----EILTSNVVTRWYRAPELLFGAKH      | 181                           |
| Cdc2   | NLLIDKEG---NLKLADFGLARSGVPL-----RNYTHEIVTLWYRAPEVLLGSRH       | 186                           |
| Cdc28  | NLLINKDG---NLKLGDGFLARAFGVPL-----RAYTHEIVTLWYRAPEVLLGGKQ      | 188                           |
| Csk1   | NILLDSMNG---PAYLSDFSIAWSKQHPG---EEVQELIPQIGTGHYRAIETLPGCHS    | 185                           |
| CaCak1 | NIFFARDDIT---QPIIGDFDISYDLKSPPKD---EPPMAKYIDVSTGIYKAPELLGTTN  | 211                           |
| Cak1   | YDGGVDVWSLLIIISQWFQR---ETSRMGHVPAMIDGSDMNSDGSDFRLICSIFEKGLI   | 278                           |
| KlCak1 | YKFEIDIWALAVLISQLWND---KTQSKSKSKSVKIDIDF DECS---              | DIKLVLTLFDKFGK 243            |
| Mcs6   | YGTGVDMWSVGCIFAELMLR--TPYLPGES-----DLQNLNVIIFRALGT            | 226                           |
| Kin28  | YTSAIDIWSVGVIFAELMLR--IPYLPQON-----DVDQMEVTFRALGT             | 223                           |
| Cdc2   | YSTGVDIWSVGCIFAEMIRR--SPLFPGDS-----EIDEIFKIFQVLGT             | 228                           |
| Cdc28  | YSTGVDTWSIGCIFAEMCNR--KPIFSGDS-----EIDQIFKIFRVLGT             | 230                           |
| Csk1   | YGHEVDRWTFGILIAELFSN--QALFDDGSSEGWPS-----ELRLTSSIIQTLTG       | 233                           |
| CaCak1 | YEYEDIWISGLIILTGLYSENFQSVLVKDDKELTNDSHVS-----DLYLLNQIFENFGT   | 265                           |
| Cak1   | PSIQKWEEVAQHGSVDAFVG-----MFGADGDGKYVLDQEK-DVQISIVERNMPRLDEI   | 331                           |
| KlCak1 | PSNEDWPQVTKN---ESFNG-----MFGNVSSDNFLHRRPI-DEQLIQVYKWMPLITDN   | 293                           |
| Mcs6   | PEPEVIKSMQQLPNYVEMKH-----IPPPNGG-MEALFSAA-GHEEIDLLKMLLDYNFY   | 278                           |
| Kin28  | PTDRDWPEVSSFMFTYNKLQI-----YPPPSRDELKRKFIAA-SEYALDFMCGMLTMNPF  | 276                           |
| Cdc2   | PNEEVWPGVTLLQDYKST-----FPRWKRMDLHKVVPNG-EEDAIELLSAMLVYDPA     | 279                           |
| Cdc28  | PNEAIWPDIVYL PDFKPS-----FPQWRRKDL SQVVPNSL-DPRGIDLLDKLLAYDPI  | 281                           |
| Csk1   | PNPSMWPELSTFPDWNKF-I-----FHEYPPKPWEILPSV-DTSIQYIVSHLVYTSNR    | 285                           |
| CaCak1 | PNLTFDEDELFCDEYNNENLHFKFNLQYPRKDWIILPRCNDLMLKEIFTMKIRYDRS     | 325                           |
| Cak1   | ADVKKQKFINCILGMVSFSPNERWSCQRILQLEKP-----                      | 368                           |
| KlCak1 | P-----KLAKMWLRMVKFDGNLRISAEQLLVSI-----                        | 321                           |
| Mcs6   | RRPTAQALAEHHYFSALEPKPHTPSLLPRKGEGEIKHVSSDLQRQNN               | FPMRANIKFV 335                |
| Kin28  | KRWTAQCLESDFKELPPSPSSIKIRN-----                               | 306                           |
| Cdc2   | HRISAKRALQQNYLRDFH-----                                       | 297                           |
| Cdc28  | NRISARRAAIHPIYFQES-----                                       | 298                           |
| Csk1   | ASPSFVIESFPKVSARLSQYA-----                                    | 306                           |
| CaCak1 | KRITSKEILQLMLD-----                                           | 339                           |

**Figure 7. Identification du résidu « gatekeeper » des kinases Csk1 (*S. pombe*) et Cak1 (*S. cerevisiae*).** Alignement protéique entre Cak1 de *S. cerevisiae*, Cak1 de *K. lactis*, Mcs6 de *S. pombe*, Kin28 de *S. cerevisiae*, Cdc2 de *S. pombe*, Cdc28 de *S. cerevisiae*, Csk1 de *S. pombe* et Cak1 de *C. albicans*. Le résidu « gatekeeper » (caractéristique des sérine-thréonine kinases) est encadré, c'est la phénylalanine 79 chez Cak1 et la thréonine 87 chez Csk1 (alignement réalisé avec ClustalW2).

## **II. Etude *in vivo* des mutants *CAK1-as* et *csk1-as***

### **1. Rappel de l'ambiguïté de la relation Csk1-Cdc2**

Comme décrit dans l'introduction de ce travail, il a été proposé que Csk1 de *S. pombe* puisse fonctionner comme CAK de Cdc2 de manière redondante à Mcs6. Cette hypothèse repose principalement sur la capacité de Csk1 de phosphoryler Cdc2 *in vitro* (Lee et al., 1999). Comme nous l'avons également vu, les interactions génétiques qui existent entre *mcs6*, *csk1* et *cdc2* ne sont pas en accord avec l'implication de Csk1 dans l'activation de Cdc2 *in vivo*. De plus les résultats que nous avons présentés dans la première partie indiquent clairement que l'inactivation de Mcs6 est à la fois nécessaire et suffisante pour diminuer fortement la phosphorylation et l'activité de Cdc2.

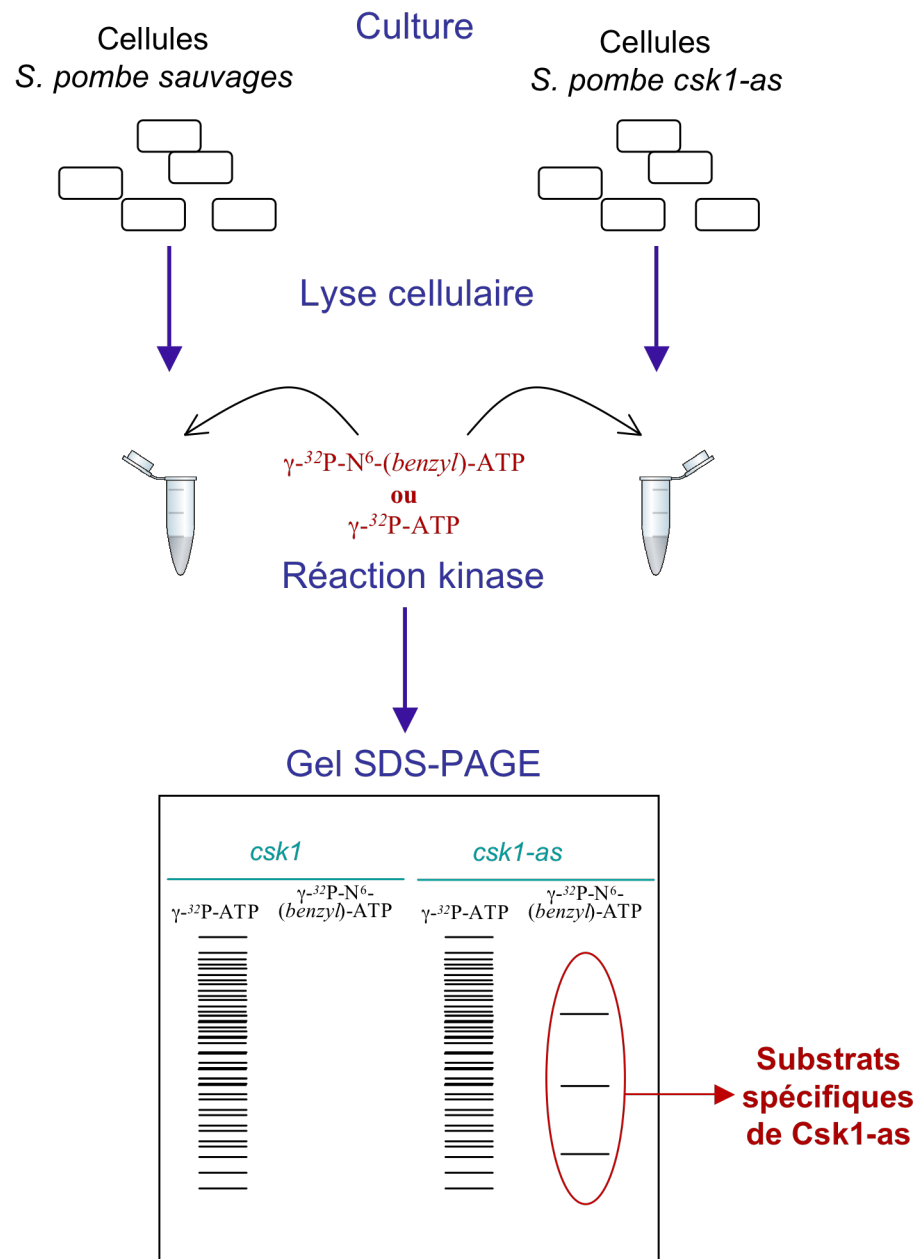
Dans ce contexte, la capacité de Cak1 de *S. cerevisiae*, kinase fortement apparentée à Csk1 de compléter parfaitement l'activité CAK de Mcs6 est surprenante. Dans cette seconde partie, nous avons de nouveau eu recours à l'utilisation de mutants -as pour compléter l'étude du rôle de Csk1 dans l'activation de Cdc2.

### **2. Création des mutants « analogue sensitive » *csk1-as* et *CAK1-as***

Nous avons abordé cette question par la création d'un mutant -as de *csk1* et *CAK1* (voir matériels et méthodes). Comme nous le verrons par la suite, des versions plasmidiques de *csk1-as* et *CAK1-as* ont été utilisées. De la même manière que pour Mcs6, un alignement de séquence a permis de déterminer que le résidu « gatekeeper » de Csk1 et Cak1 était respectivement la thréonine 87 et la phénylalanine 79 (**figure 7**). Ces deux résidus ont été mutés en glycine de manière à créer les mutants *csk1-as* et *CAK1-as*.

La protéine Csk1 n'étant pas essentielle à la viabilité cellulaire, il nous a été difficile de tester la fonctionnalité du mutant *csk1-as* avec des courbes de croissance comme cela avait été effectué pour *mcs6-as2* et *cdk9-as* (**figure 2**). Même si la délétion du gène *csk1* montre un retard de croissance en milieu pauvre (Hermand et al., 1998), celui-ci est cependant trop faible pour une comparaison avec une éventuelle inhibition de notre mutant *csk1-as*. De plus, à ce stade du travail, les tests de phosphorylation *in vitro* du mutant *csk1-as-TAP* avec le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP sur un substrat spécifique ne permettaient pas de savoir avec exactitude si le mutant était fonctionnel et ce, en grande partie, à cause de la faible expression de Csk1-as comme nous pourrions le voir plus tard. Le marquage *in vivo* des substrats de Csk1 a alors été effectué avec le mutant *csk1-as* sachant que nous pouvions toujours contrôler le fonctionnement de ce test avec, d'une part, la recherche de certains substrats connus de Csk1 et, d'autre part, l'utilisation d'autres kinases -as connues pour être fonctionnelles.

Figure 8 :



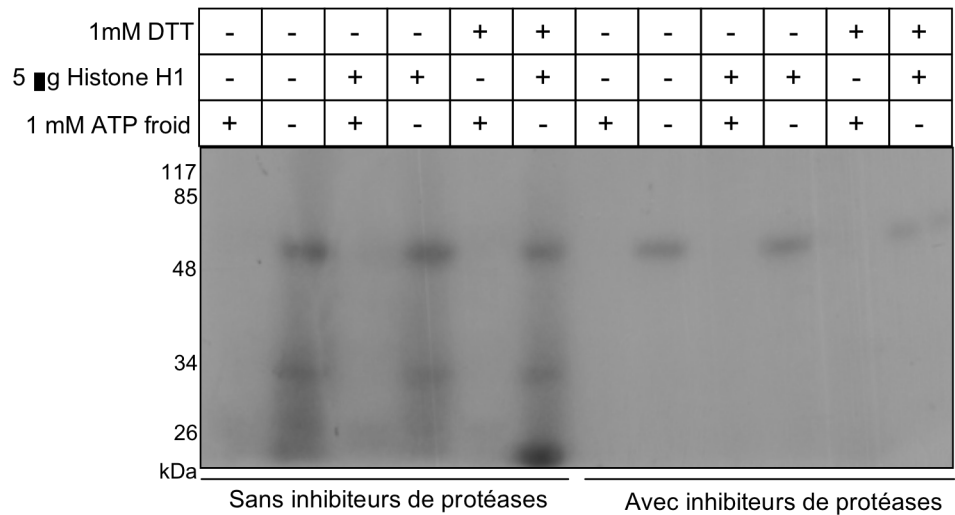
**Figure 8. Marquage *in vivo* des substrats de Csk1 avec l'utilisation du mutant *mcs6-as*.** Une réaction kinase avec le  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$  ou le  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-N}^6\text{-(benzyl)-ATP}$  est réalisée sur des extraits protéiques obtenus à partir d'une souche sauvage et d'une souche *csk1-as*. Une autoradiographie après séparation d'un aliquot de la réaction sur un gel SDS-PAGE permet de localiser les substrats de Csk1-as qui seront alors identifiés par spectrométrie de masse.

Figure 9 :

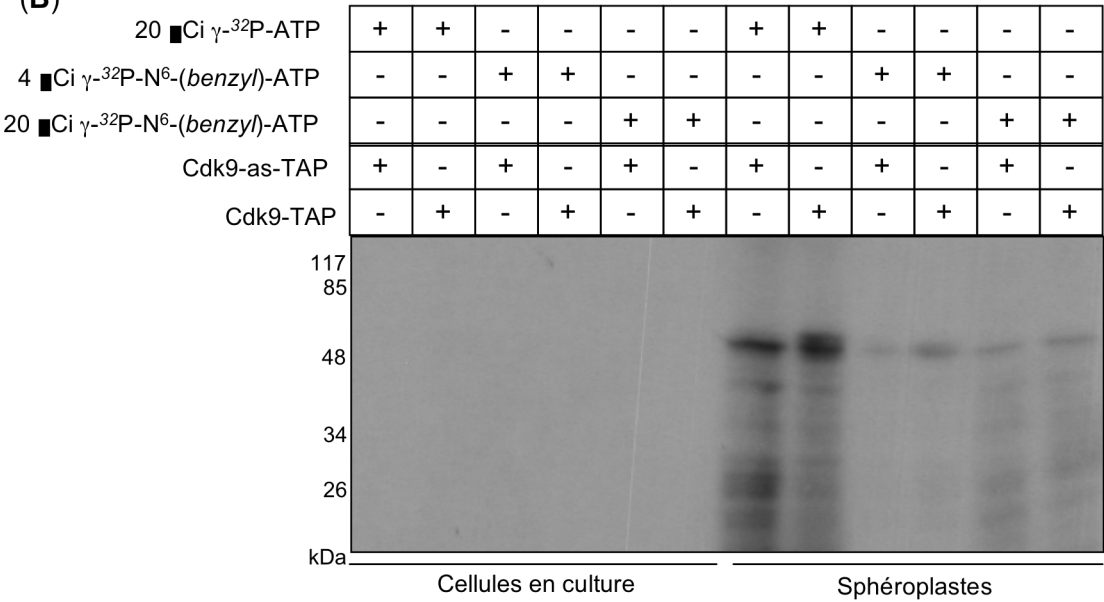
- Utilisation de différentes souches de *S. pombe* : sauvage, *cdk9-as*, *csk1-as*
- Ajout d'ATP froid lors de la réaction kinase
- Réaction kinase sur l'ensemble de l'extrait protéique ou seulement 100 µg de protéine
- Appauvrissement progressif de la quantité de phosphate dans le milieu de culture (culture en milieu pauvre 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> puis 50 µM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- Test de divers tampons de lyse et de réaction kinase (DTT, inhibiteurs de protéases...)
- Test de phosphorylation sur des cellules en culture ou sur des sphéroplast (cellules dont la paroi a été lysée à la zymolyase)
- Ajout de l'histone H1 lors de la réaction kinase comme contrôle de phosphorylation par Cdc2
- Variation du temps d'incubation avec le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP et le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP
- Variation de la concentration en  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP et  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP

**Figure 9. Impossibilité d'augmenter l'efficacité du test kinase *in vivo* sur des extraits cellulaires.**  
 Liste des mises au point testées en vu d'obtenir un marquage spécifique des substrats de Csk1 *in vivo*.

Figure 10 :  
(A)



(B)



**Figure 10. Phosphorylation inexistante ou aspécifique des substrats des kinases -as dans un extrait cellulaire.** (A) Test kinase *in vivo* réalisé avec 10 µCi de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP sur 100 µg d'extrait protéique obtenu à partir d'une souche *S. pombe* sauvage. Variation de la composition du tampon de réaction kinase : présence ou absence d'1 mM d'ATP froid, 1 mM de DTT ou d'inhibiteurs de protéases. L'histone H1 devant *a priori* être phosphorylée par la kinase Cdc2 de l'extrait protéique nous sert de contrôle. La phosphorylation d'une bande aux environs de 50 kDa est détectée dans la majorité de nos tests *in vivo* peu importe les conditions ou les souches utilisées. Elle est considérée comme aspécifique. (B) Test kinase *in vivo* réalisé avec les quantités en  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP et  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP mentionnées dans la figure sur les souches *cdk9-TAP* et *cdk9-as-TAP*. Les cellules ont été cultivées en milieu progressivement appauvri en phosphate (6 h en EMM 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> puis de 20 h en EMM 50 µM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) et le test kinase a été effectué sur des cellules en culture (ajout des sources d'ATP radioactif dans le milieu de culture) ou sur des sphéroplast (ajout des sources d'ATP radioactif après digestion de la paroi des cellules à la zymolyase). Pour ces deux figures, le poids moléculaire des protéines de l'étalon est affiché à gauche.

### 3. Marquage *in vivo* des substrats de Csk1

#### 3.1 Principe du test

Une extraction protéique globale d'une souche sauvage et d'une souche *csk1-as* est réalisée et l'extrait protéique obtenu est ensuite incubé en présence  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP ou  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -N<sup>6</sup>-(*benzyl*)-ATP. Un aliquot est séparé sur SDS-PAGE et le gel est exposé (autoradiographie) pour révéler les bandes éventuellement phosphorylées (**figure 8**).

Le  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP pouvant être utilisé par l'ensemble des kinases de l'extrait cellulaire l'ensemble de la piste du gel est supposé être marquée radioactivement. Aucune kinase de la cellule ne pouvant, *a priori*, fixer et utiliser le  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -N<sup>6</sup>-(*benzyl*)-ATP pour phosphoryler leur substrat, aucune radioactivité ne doit être détectée dans ce contexte sauvage.

Pour ce qui concerne la souche portant l'allèle *csk1-as*, on attend que le résultat avec l'ATP soit similaire à celui obtenu avec la souche sauvage. Par contre, dans le cas où le  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -N<sup>6</sup>-(*benzyl*)-ATP est utilisé, seule Csk1-as est capable de l'accepter et de l'utiliser pour phosphoryler ses substrats. Les bandes radiomarquées sur la piste  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -N<sup>6</sup>-(*benzyl*)-ATP/Csk1-as peuvent être alors analysées et identifiées. La protéine Msc6, qui est une cible établie de Csk1, devrait servir de contrôle positif.

#### 3.2 Résultats obtenus et mises au point

Le principe repose sur une expérience réalisée par Larochelle et collaborateurs (Larochelle et *al.*, 2005) qui consiste à identifier les substrats de la protéine *H. sapiens* Cdk7 dans un extrait de cellules HeLa en utilisant le mutant *cdk7-as*. Le protocole a été adapté à la levure de fission et utilisé avec la protéine Csk1-as. Les premiers résultats étant peu concluants, nous avons donc procédé à des adaptations de ce protocole.

##### 3.2.1 Premiers essais

Diverses mises au point s'inspirant des données de la littérature ont été effectuées. Par exemple, l'utilisation d'ATP non marqué (1 mM ATP), utilisé en combinaison du  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -N<sup>6</sup>-(*benzyl*)-ATP pour atténuer la phosphorylation non spécifique à Csk1-as (Larochelle et *al.*, 2007). Une autre stratégie consiste à travailler avec un milieu progressivement appauvri en phosphate (passage d'un milieu de culture minimum à un milieu contenant 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  puis 50  $\mu\text{M}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) afin de diminuer au maximum l'état de phosphorylation des protéines cellulaires avant le test kinase avec le  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -N<sup>6</sup>-(*benzyl*)-ATP. La table de la **figure 9** reprend l'ensemble de ces mises au point et la **figure 10**, les résultats de deux des expériences réalisées. Aucun signal de phosphorylation spécifique à Csk1-as, ou à Cdk9-as n'a pu être détecté. Lors de ces essais, une bande d'un poids moléculaire d'environ 50 kDa a été détectée indépendamment de la souche ou des conditions utilisées, elle est donc considérée comme aspécifique.



Nous avons postulé que l'absence de signal de phosphorylation des substrats de Csk1-as était peut-être liée à une expression trop faible de la kinase à partir du promoteur natif de *csk1*. La kinase -as étant trop « diluée » dans l'extrait protéique, la phosphorylation de ses substrats avec le  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -N<sup>6</sup>-(*benzyl*)-ATP serait trop faible pour être détectée. L'étape suivante a donc été de déterminer une stratégie pour augmenter la quantité de Csk1-as lors du test *in vivo*. En effet, il a été montré que dans le cas de la kinase Pho81 chez *S. cerevisiae*, l'addition de protéines recombinantes était requise pour un marquage efficace (Dephoure et al., 2005).

### 3.2.2 Ajout de la protéine de fusion GST-Csk1-as purifiée

Une première idée consiste à purifier la protéine Csk1-as dans le but de l'ajouter à l'extrait protéique total lors de la réaction kinase *in vivo*. Pour ce faire, l'ORF de *csk1-as* a été clonée dans un vecteur de surexpression chez *E. coli* (pGEX) où elle est placée en phase en aval de la protéine GST. La surexpression chez *E. coli* est induite par l'IPTG et la protéine est purifiée après passage sur des colonnes d'affinité pour la GST (kit Glutathione S-transferase Gene Fusion System, GE Healthcare, voir matériels et méthodes).

La **figure 11A** montre que la protéine de fusion GST-Csk1-as est insoluble. En effet, après la lyse bactérienne, elle se retrouve dans le culot. Comme contrôle nous avons surexprimé la GST seule qui est effectivement solubilisée après surexpression.

Lorsque la protéine est insoluble, il est recommandé de modifier plusieurs paramètres lors de l'induction de la protéine de fusion chez *E. coli*. Nous avons fait varier la température (25 à 37°C) et le temps d'induction (3h à 20h), ainsi que la concentration en IPTG (0,1 mM à 1 mM) mais aucune amélioration de la stabilité de GST-Csk1-as n'a été observée. La **figure 11B** illustre le résultat obtenu en modifiant le temps d'incubation et la concentration en IPTG.

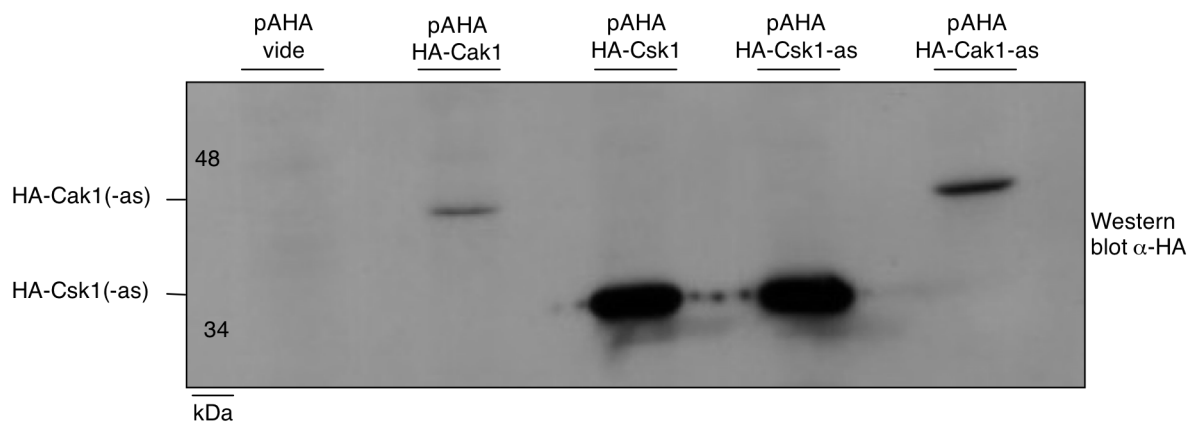
Une alternative consistait à purifier la protéine insoluble et à la resolubiliser ensuite. Sans garantie de préserver l'activité kinase dans ce cas, nous avons alors opté pour une autre stratégie.

### 3.2.3 Surexpression plasmidique des kinases *in vivo*

#### 3.2.3.1 Surexpression des protéines fusionnées au le tag HA

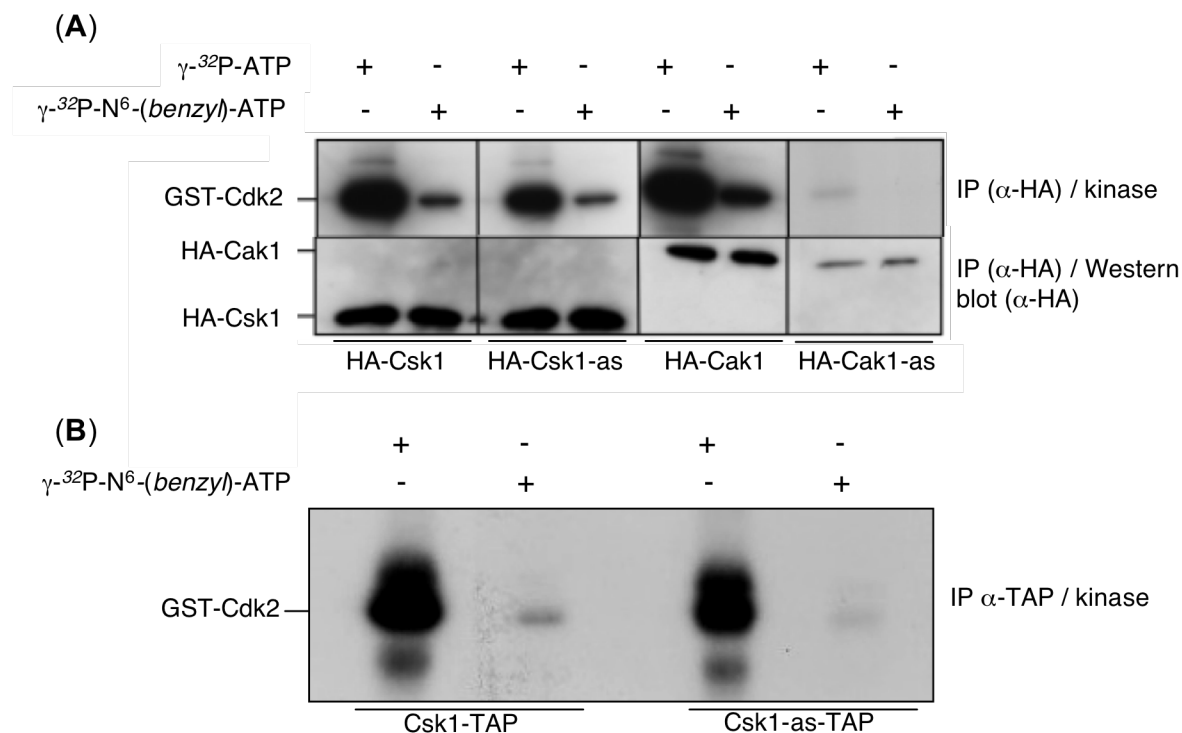
Étant incapable de purifier Csk1-as, une seconde stratégie consiste à surexprimer *in vivo* la kinase Csk1-as dans une souche sauvage de *S. pombe*. Dans ce cas, comme nous disposions au laboratoire de vecteurs permettant d'exprimer *csk1* de *S. pombe* et *CAK1* de *S. cerevisiae* en phase avec le tag HA (dans le vecteur de surexpression pAHA (Xu et al., 1990)). Les deux kinases homologues ont été utilisées, et les vecteurs équivalents contenant les versions -as créés.

Figure 12 :



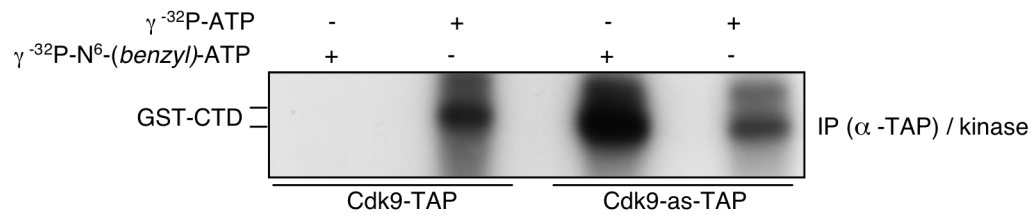
**Figure 12. Les protéines de fusion HA-Cak1, HA-Cak1-as, HA-Csk1 et HA-Csk1-as sont stables et solubles.** Un extrait protéique total d'une souche *S. pombe* sauvage surexprimant sur un plasmide les protéines HA-Cak1, HA-Cak1-as, HA-Csk1 ou HA-Csk1-as a été séparé sur un gel SDS-PAGE et une analyse Western blot en utilisant des anticorps contre HA a été effectuée. Le poids moléculaire des protéines de l'étalon est affiché à gauche.

Figure 13 :



**Figure 13. Utilisation non spécifique du  $^{32}\text{P}$ -N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP par les protéines « analogue sensitive » Csk1-as et Cak1-as.** (A) Des cellules sauvages de *S. pombe* surexprimant à partir d'un plasmide les constructions *HA-CAK1*, *HA-CAK1-as*, *HA-csk1* et *HA-csk1-as* ont été lysées pour immunoprécipiter les protéines de fusion correspondantes à l'aide de billes magnétiques coatées d'anticorps dirigés contre le tag HA. L'activité kinase sur le substrat GST-Cdk2 K33R (Cdk2 incapable de s'autophosphoryler) a été testée lors d'une réaction kinase *in vitro* utilisant soit le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP ou le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP, suivie d'un gel SDS-PAGE et d'une autoradiographie. Un Western blot utilisant des anticorps anti-HA a ensuite été effectué sur le gel SDS-PAGE. (B) Des cellules de *S. pombe* exprimant l'allèle intégratif *csk1-TAP* ou *csk1-as-TAP* ont été lysées pour immunoprécipiter les protéines Csk1-TAP et Csk1-as-TAP à l'aide de billes magnétiques coatées d'anticorps dirigés contre le tag TAP. L'activité kinase sur le substrat GST-Cdk2 K33R a été testée lors d'une réaction kinase *in vitro* utilisant soit le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP ou le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP, suivie d'un gel SDS-PAGE et d'une autoradiographie.

Figure 14 :



**Figure 14. Utilisation spécifique du  $^{32}\text{P}$ -N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP par la protéine « analogue sensible » Cdk9-as.** Des cellules de *S. pombe* exprimant l'allèle intégratif *cdk9-TAP* ou *cdk9-as-TAP* ont été lysées pour immunoprécipiter les protéines Cdk9-TAP et Cdk9-as-TAP en utilisant des billes magnétiques coatées d'anticorps dirigés contre le tag TAP. L'activité kinase sur le substrat GST-CTD a été testée lors d'une réaction kinase *in vitro* utilisant soit le  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP ou le  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP, suivie d'un gel SDS-PAGE et d'une autoradiographie.

Nous avons vérifié que les protéines étaient correctement exprimées en séparant un extrait protéique total obtenu à partir des souches transformées par les plasmides sur un gel SDS-PAGE, combiné à un Western blot où des anticorps dirigés contre le tag HA ont été utilisés. Ceci a permis de vérifier que les protéines fusionnées au tag HA étaient correctement exprimées chez *S. pombe* aux tailles attendues (**figure 12**). Une quantité identique d'extrait étant séparée, nous pouvons conclure que les protéines HA-Csk1, wt ou -as sont exprimées à un niveau plus élevé que les protéines Cak1, wt ou -as (**figure 12**). La différence d'expression entre la protéine HA-Cak1 et la protéine HA-Cak1-as n'a pas pu être expliquée mais est parfaitement reproductible.

### 3.2.3.2. Utilisation du N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP

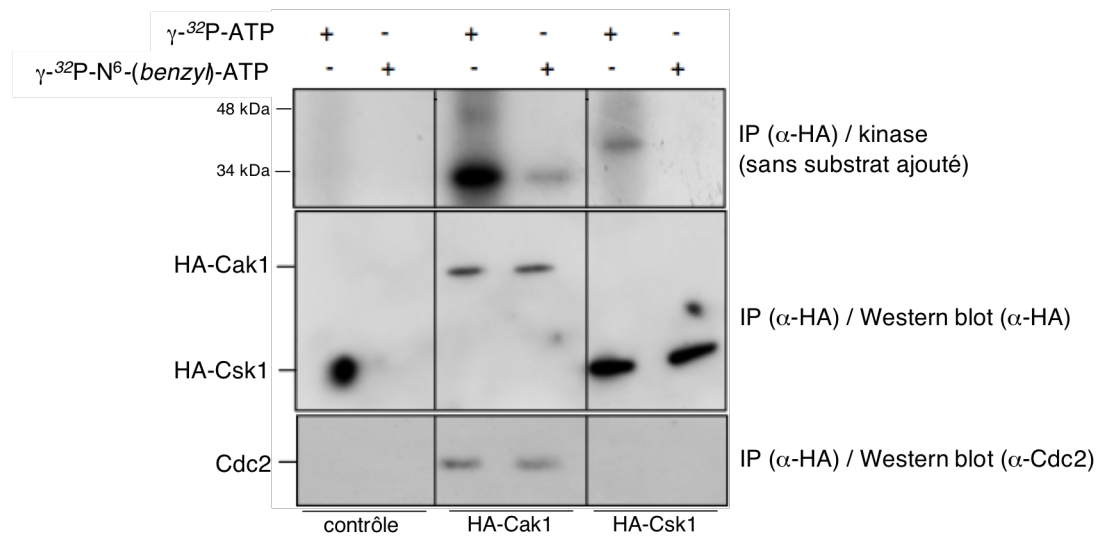
Pour vérifier que, contrairement aux kinases sauvages, le N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP est spécifiquement utilisé par Csk1-as et Cak1-as, un test kinase *in vitro* similaire à celui présenté à la **figure 4B** a été réalisé. Nous avons utilisé dans ce cas la fusion GST-Cdk2 K33R comme substrat *in vitro* de Cak1 et Csk1 puisque ces protéines sont des CDK-activating kinases (CAK) et phosphorylent Cdk2 sur le site d'activation T161 (Kaldis et al., 1996 ; Thuret et al., 1996 pour Cak1 et Hermand et al., 1998 ; Lee et al., 1999 pour Csk1). Une version mutée de Cdk2 (Cdk2 K33R) est utilisée pour éviter son auto-phosphorylation, la lysine 33 étant absolument requise pour l'activité. Les kinases ont été immunoprécipitées à l'aide des billes coatées avec un anticorps anti-HA, et le test kinase est réalisé sur les billes comme précédemment.

Le résultat du test est inattendu à deux niveaux. Csk1-as et Cak1-as montrent une affinité réduite pour la molécule de N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP (**figure 13A**) en comparaison avec les mutants *mcs6-as2* (**figure 4**) et *cdk9-as* (**figure 14**), et les versions sauvages sont capables d'utiliser le N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP à un niveau similaire aux versions -as.

Cette capacité des versions sauvages de Csk1 et Cak1 à utiliser le N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP est réminiscente des propriétés très inhabituelles de leur site de fixation de l'ATP (Enke et al. 1999 ; Tsakraklides et al., 2002). Ce point sera abordé plus tard dans ce manuscrit.

Pour tester que ces données ne résultent pas d'un artefact de surexpression (insolubilité, titration d'un partenaire...), un test kinase *in vitro* où Csk1 et Csk1-as sont exprimés à partir du promoteur natif de *csk1* a également été effectué. Un tag TAP est ajouté pour permettre leur immunoprécipitation. Un test d'activité kinase en présence de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP ou le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP a ensuite été réalisé sur les billes d'immunoprécipitation avec le GST-Cdk2 K33R comme substrat. Il est important de noter qu'une quantité 20x plus importante de cellules a été nécessaire pour faire ce test en comparaison avec les tests kinase *in vitro* réalisés sur *mcs6-as2* (**figure 4**) et *cdk9-as* (**figure 14**) pour contrer le faible niveau d'expression de *csk1* exprimé au locus. Conformément à ce qui a été observé dans le test utilisant la surexpression plasmidique, la protéine Csk1 sauvage est capable d'utiliser le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP pour phosphoryler ses substrats et la protéine -as ne l'utilise pas plus efficacement (**figure 13B**).

Figure 15 :



**Figure 15. Immunoprécipitation et phosphorylation de Cdc2 de *S. pombe* par Cak1 de *S. cerevisiae*.** De cellules sauvages de *S. pombe* surexprimant à partir d'un plasmide les constructions *HA-CAK1* et *HA-csk1* ont été lysées pour immunoprécipiter les protéines de fusion HA-Cak1 et HA-Csk1 à l'aide de billes magnétiques coatées d'anticorps dirigés contre le tag HA. L'activité kinase de ces deux protéines sur leur(s) partenaire(s) immunoprécipité(s) avec elles a été testée lors d'une réaction kinase en utilisant soit le  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP ou le  $\gamma$ - $^{32}$ P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP. Les échantillons sont chargés sur un gel SDS-PAGE et une autoradiographie est effectuée. Deux Western blot utilisant des anticorps anti-HA et anti-Cdc2 ont été réalisés sur le gel SDS-PAGE. Poids moléculaire de Cdc2 : 34,3 kDa ; Mcs6 : 38.5 kDa ; Cak1 : 42.1 kDa ; Csk1 : 34.6 kDa ; tag HA : 4 kDa.

Toutes ces données montrent que l'utilisation d'une version –as de Csk1 et Cak1 pour mettre en évidence une phosphorylation de Cdc2 *in vivo* est compromise. Nous avons donc abordé le problème sous un autre angle.

#### 4. Phosphorylation *in vivo* des protéines associées à Cak1 et Csk1

Il est possible que la capacité de Cak1, contrairement à Csk1, à compléter le déficit d'activité CAK de Mcs6 (**figure 6**) puisse résulter d'une association physique entre Cak1 et Cdc2 qui n'existerait pas entre Csk1 et Cdc2. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé une immunoprécipitation de HA-Csk1 et HA-Cak1 suivie d'un test kinase en présence de  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP ou de  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP sans substrat exogène. Ces échantillons sont ensuite chargés sur un gel SDS-PAGE et une autoradiographie est effectuée (**figure 15**).

Quand Cak1 est immunoprécipitée, une bande phosphorylée d'environ 34 kDa est détectée. Le ratio entre l'utilisation du  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP ou du  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP rappelle ce que nous avons décrit ci-dessus. Comme la taille observée correspond au poids moléculaire prédit de Cdc2, un Western blot anti-Cdc2 a été réalisé et a confirmé la co-immunoprécipitation et la phosphorylation de Cdc2 par Cak1. Une seconde bande de plus faible intensité apparaît également dans la piste HA-Cak1/ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP, elle correspond à la taille prédite de Cak1 et pourrait correspondre à une autophosphorylation.

Bien qu'elle soit correctement immunoprécipitée, la kinase Csk1 ne co-immunoprécipite pas Cdc2 comme le montre le Western blot anti-Cdc2 (**figure 15**). Cependant une bande assez faible apparaît à environ 36 kDa, une taille compatible avec le poids moléculaire de Mcs6, le substrat établi de Csk1. Cependant, des analyses en Western blot n'ont pas permis de confirmer cette hypothèse de façon reproductible. La sensibilité de détection de la bande étant insuffisante pour avoir un document clair.

#### 5. Conclusion sur l'étude *in vivo* de la relation entre Csk1/Cdc2

En conclusion, l'utilisation de mutants –as n'a pas permis de marquer *in vivo* les substrats de Csk1 et Cak1, mais les expériences d'immunoprécipitation couplée à un test d'activité kinase sont en accord avec un pathway linéaire chez *S. pombe* où Csk1 active Mcs6 qui active Cdc2.

L'impossibilité de Csk1 contrairement à Cak1, de phosphoryler Cdc2 *in vivo* pourrait résulter des différences structurales entre les deux kinases qui permettent à Cak1 d'interagir directement avec Cdc2 *in vivo*.

Figure 16 : (A)



**Figure 16. Csk1 et Cak1 appartiennent à la même classe de sérine-thréonine kinases mais possèdent des différences de séquences expliquant leurs différences fonctionnelles.** Cladogramme (A) et alignement protéique (B) entre Cak1 (*K. lactis*), Cak1 (*S. cerevisiae*), Cak1 (*C. albicans*), Csk1 (*S. japonicus*), Csk1 (*S. octosporus*), Csk1 (*S. pombe*), Cdc2 (*S. pombe*), Cdc28 (*S. cerevisiae*), Mcs6 (*S. pombe*) et Kin28 (*S. cerevisiae*). En rouge, on retrouve une lysine fortement conservée. La couleur verte (gras) désigne la position de l'acide aminé qui une fois transformé en valine peut parfois stabiliser une kinase -as non fonctionnelle (Zhang et al., 2005). En mauve est représenté l'extension d'environ 20 acides aminés dans la famille Cak1 et absente dans la famille Csk1 (alignement réalisé avec ClustalW2).

### **III. Étude des particularités des kinases Csk1 de *S. pombe* et Cak1 de *S. cerevisiae***

#### **1. Contexte de ce travail**

Cette dernière section concerne l'étude plus approfondie des mutants *csk1-as* et *CAK1-as*. Même si elle s'écarte légèrement de notre sujet principal, il aurait été dommage de ne pas la réaliser sachant que les outils nécessaires étaient disponibles et qu'elle ne demandait pas une charge de travail importante. Ces kinases –as modifiées n'ayant pas pour but d'être utilisées directement pour rechercher les substrats *in vivo* de Csk1, une analyse assez sommaire de leur fonctionnement a été effectuée et aucune tentative d'amélioration supplémentaire n'a été tentée.

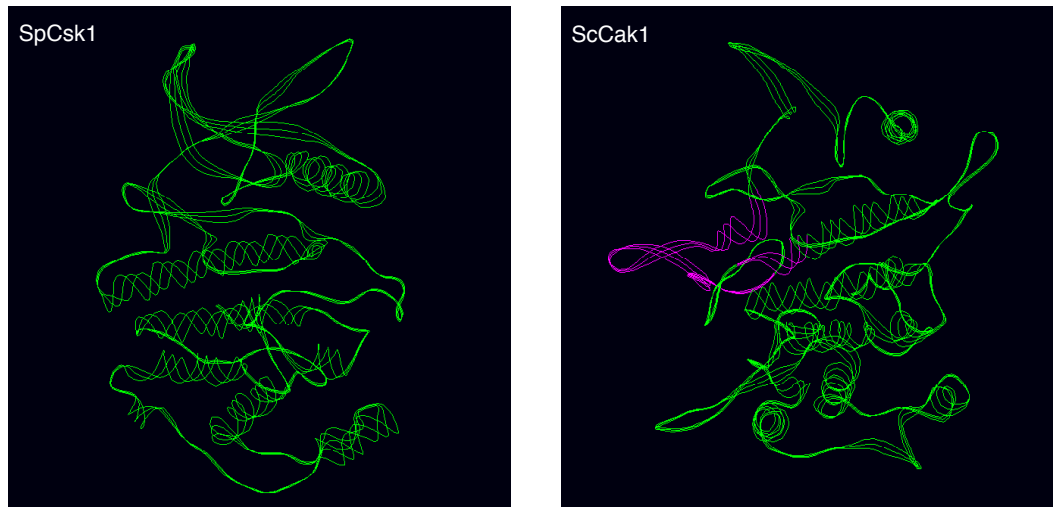
#### **2. Particularités des kinases Csk1 et Cak1**

Les kinases Csk1 de *S. pombe* et Cak1 de *S. cerevisiae* sont des protéines apparentées mais qui possèdent des différences fonctionnelles comme décrit dans la section précédente. La capacité inhabituelle que possèdent ces deux enzymes d'utiliser une version plus volumineuse de l'ATP, le N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP, même en présence du résidu « gatekeeper » concorde avec des études précédentes qui soulignent le caractère inhabituel de leur poche de fixation de l'ATP (Enke et *al.* 1999 ; Tsakraklides et *al.*, 2002).

Particulièrement, il a été démontré que la lysine hautement conservée dans le site catalytique de liaison de l'ATP, et qui joue un rôle indispensable dans l'orientation des groupements phosphate de l'ATP dans la poche catalytique de l'enzyme (De Bondt et *al.*, 1993, Hanks et *al.*, 1995, **figure 16**) est dispensable chez Cak1 et Csk1. Sa mutation ou son inactivation par la fixation covalente du FSBA (5'-fluorosulfonylbenzoyladenosine), un analogue de nucléotide, ne modifient pas l'activité des deux kinases (Enke et *al.* 1999 ; Tsakraklides et *al.*, 2002).

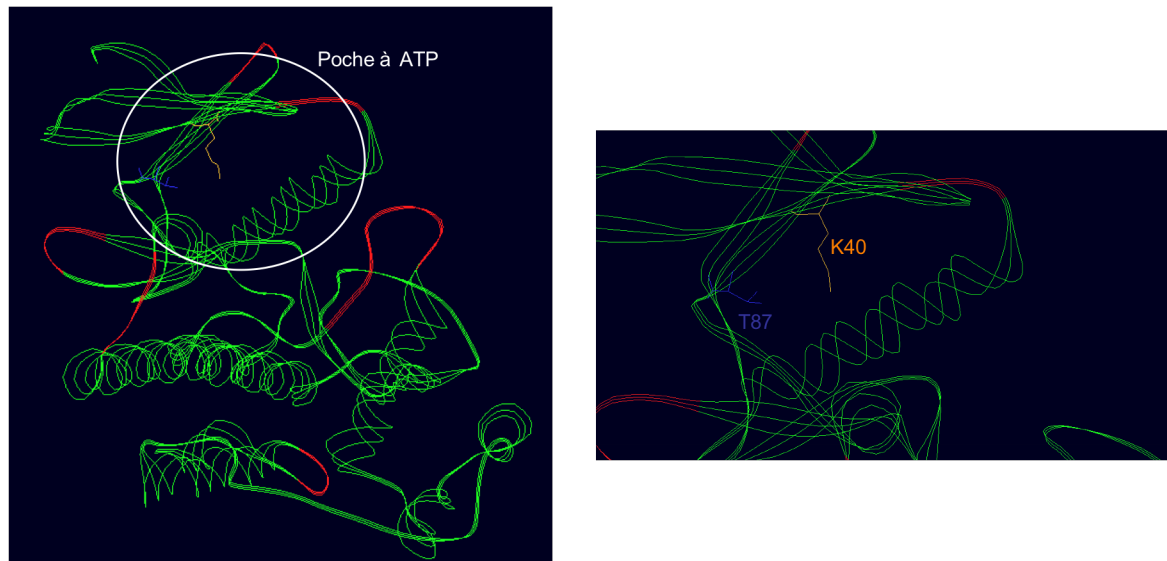
Bien qu'apparentées aux CDK, Csk1 et Cak1 sont actives sous forme monomérique (Cak1 : Kaldis et *al.*, 1996 ; Csk1 : Tsakraklides et *al.*, 2002). Un alignement de trois homologues de Cak1 chez les levures bourgeonnantes (*Candida albicans*, *Kluyveromyces lactis*, *S. cerevisiae*), de Csk1 chez les levures de fission (*Schizosaccharomyces japonicus*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *S. pombe*) et de deux homologues des CDK Cdk1 (Cdc2 de *S. pombe* et Cdc28 de *S. cerevisiae*) et Cdk7 (Mcs6 de *S. pombe* et Kin28 de *S. cerevisiae*) révèle la proximité plus marquée entre Csk1 et Cak1 par rapport aux CDKs (**figure 16**).

Figure 17 :



**Figure 17 : Présence chez Cak1 de *S. cerevisiae* d'une boucle absente chez Csk1 de *S. pombe*.** Structures tridimensionnelles des kinases Csk1 (*S. pombe*) et Cak1 (*S. cerevisiae*). La séquence retrouvée uniquement chez Cak1 est représentée en mauve. (Modélisation réalisée avec SwissPDBViewer)

Figure 18 :



**Figure 18. La mutation K40G dans le site catalytique de Csk1 diminue l'encombrement stérique.** Structure tridimensionnelle de la kinase Csk1 de *S. pombe*. L'image de gauche propose une vue globale de la protéine tandis que celle de droite correspond à une vue approchée de la poche de fixation de l'ATP. Le résidu « gatekeeper » est en bleu, et la lysine fortement conservée dans l'ensemble des sérine-thréonine kinases mais dispensable chez Csk1 est en orange. (Modélisation réalisée avec SwissPDBViewer).

Les structures des kinases Csk1 et Cak1 sont modélisables sur base de la structure cristallographique de Cdk2. Ces modèles et les alignements mettent en évidence une extension d'environ 20 acides aminés dans la famille Cak1 qui est non retrouvée dans la famille Csk1. Celle-ci est localisée à proximité du site actif et pourrait constituer la base structurale de la différence de spécificité de substrat évoquée plus haut (**Figure 17**).

Dans la suite de ce travail, les spécificités des kinases Csk1 et Cak1 ont été explorées pour tenter d'améliorer l'efficacité des mutants –as correspondants.

### 3. Optimisation de *csk1-as* et *CAK1-as*

#### 3.1 Mutation K40G dans Csk1-as

La **figure 13** montre que la version –as de la kinase Csk1 a une affinité beaucoup plus faible pour le  $\gamma$ -N<sup>6</sup>-(*benzyl*)-ATP que pour l'ATP. Ceci indique que, malgré la mutation du résidu « gatekeeper », la poche de liaison de l'ATP reste probablement trop étroite pour accueillir le N<sup>6</sup>-(*benzyl*)-ATP. Le modèle de Csk1 montre que la lysine 40, qui n'est pas essentielle à la catalyse, possède une chaîne latérale qui pointe vers l'intérieur du site catalytique de l'enzyme (**Figure 18**). Postulant que sa mutation en glycine (K40G) pourrait diminuer l'encombrement stérique au sein de la poche de fixation de l'ATP, nous avons introduit la mutation K40G dans les protéines Csk1 et Csk1-as en mutant les ORF correspondantes dans le plasmide de surexpression pAHA.

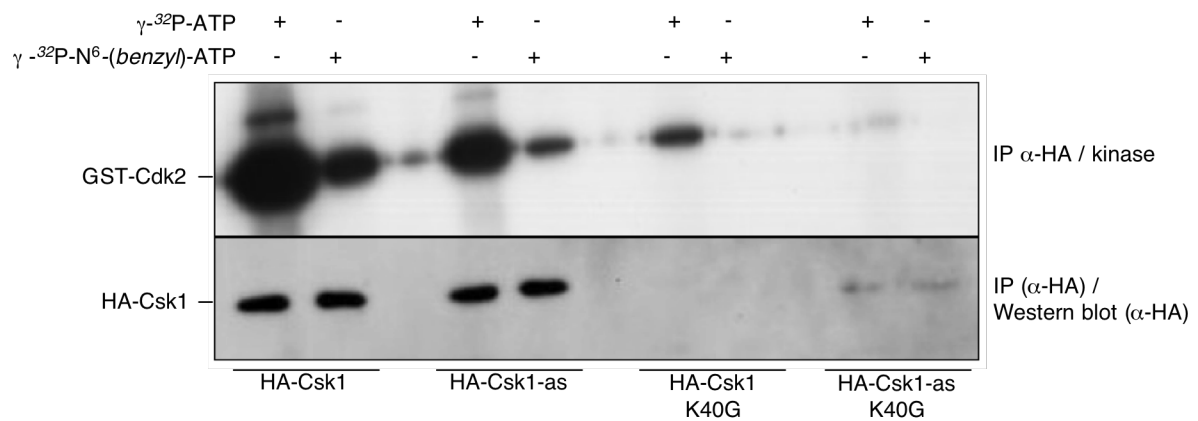
#### 3.2 Mutation S16V dans Cak1-as

Le remplacement du résidu « gatekeeper » (F79G) chez Cak1 engendre une perte importante de l'activité kinase et de la stabilité de cette protéine. L'équipe de Shokat, à l'origine de la stratégie des kinases « analogue sensitive », a récemment rapporté que la présence d'une valine dans une zone de la protéine influant sur la stabilité globale de l'enzyme permettait, dans certains cas, de restaurer l'activité des kinases –as non fonctionnelles (Zhang et *al.*, 2005). Chez Cak1 de *S. cerevisiae*, le résidu concerné est la sérine 16 que nous avons donc muté en valine (**figure 16**). La mutation S16V a été effectuée dans les protéines Cak1 et Cak1-as en mutant les ORF correspondantes dans le plasmide de surexpression pAHA.

### 4. Effet des mutations K40G et S16V sur l'activité kinase *in vitro*

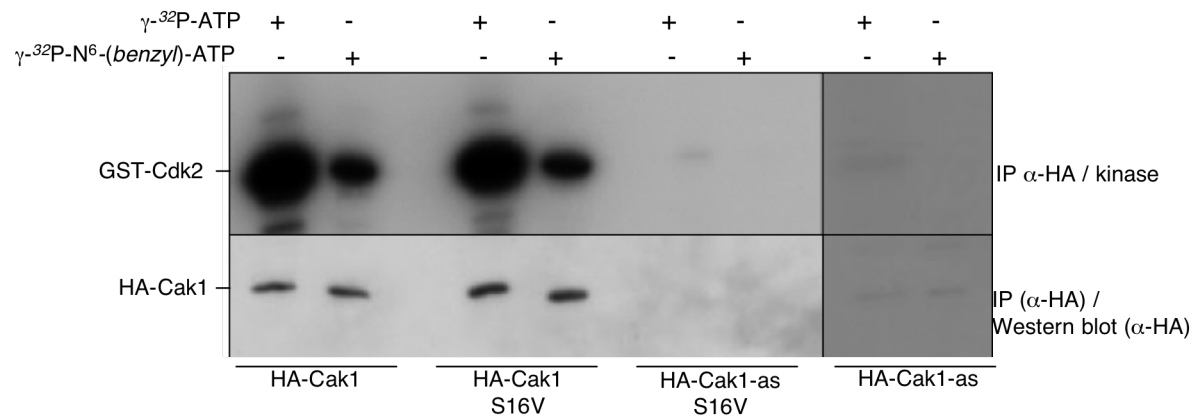
Des cellules sauvages de *S. pombe* surexprimant à partir du plasmide pAHA les kinases Csk1, Csk1-as, Csk1 K40G, Csk1-as K40G, Cak1, Cak1-as, Cak1 S16V ou Cak1-as S16V ont été utilisées pour immunoprécipiter ces fusions protéiques en utilisant des billes magnétiques coatées d'anticorps dirigés contre le tag HA. L'activité kinase sur le GST-Cdk2 K33R a été testée lors d'une réaction kinase *in vitro* utilisant soit le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP ou le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(*benzyl*)-ATP, suivie d'un gel SDS-PAGE et d'une autoradiographie.

Figure 19 :



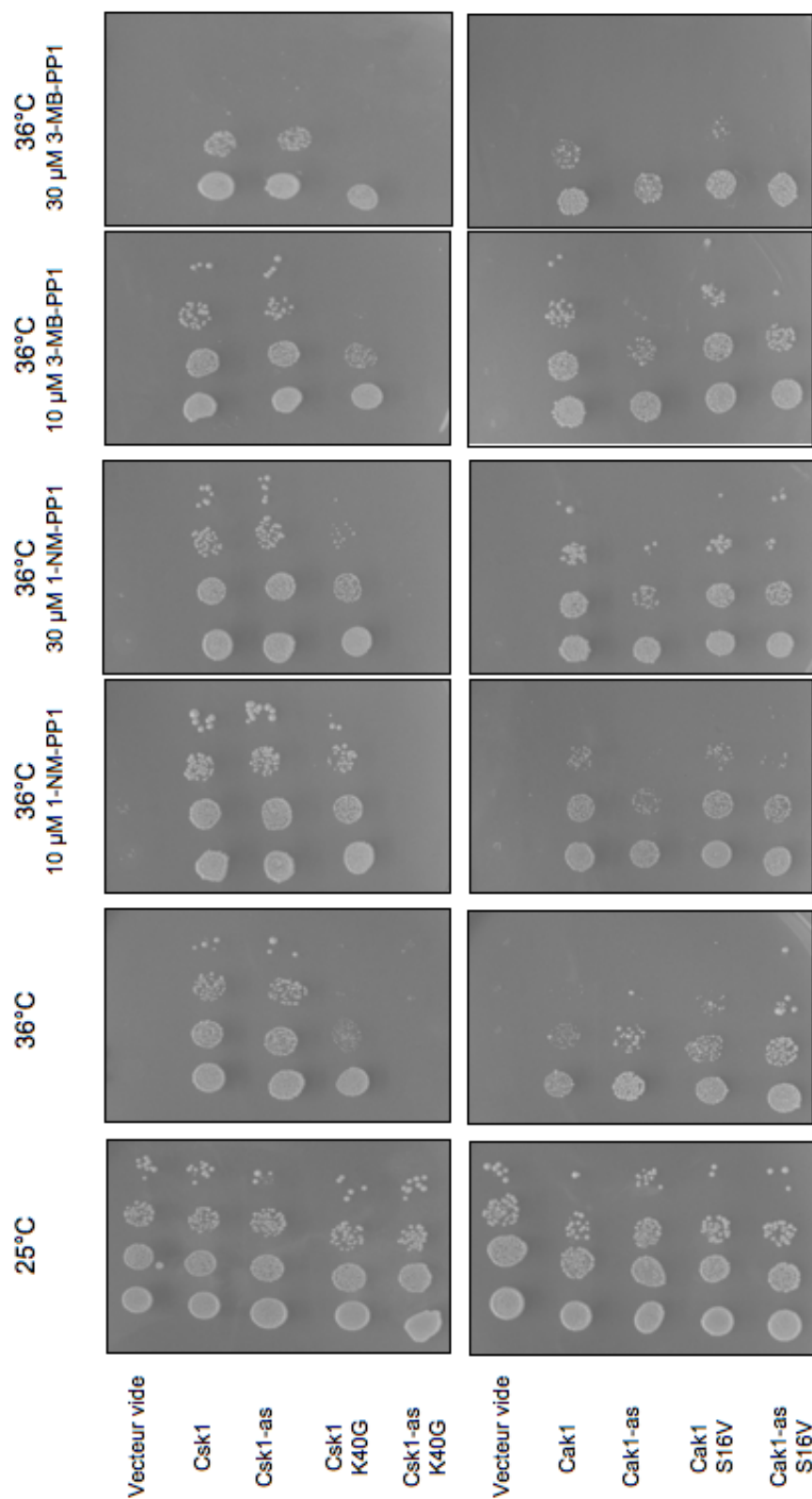
**Figure 19. La mutation K40G chez Csk1-as cause une perte totale d'activité kinase.** De cellules sauvages de *S. pombe* surexprimant à partir d'un plasmide les constructions *HA-csk1*, *HA-csk1-as*, *HA-csk1 K40G* et *HA-csk1-as K40G* ont été lysées pour immunoprécipiter les protéines de fusion correspondantes en utilisant des billes magnétiques coatées d'anticorps dirigés contre le tag HA. L'activité kinase sur le substrat GST-Cdk2 K33R (Cdk2 incapable de s'autophosphoryler) a été testée lors d'une réaction kinase *in vitro* utilisant soit le  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP ou le  $\gamma$ - $^{32}$ P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP, suivie d'un gel SDS-PAGE et d'une autoradiographie. Un Western blot utilisant des anticorps anti-HA a ensuite été effectué sur le gel SDS-PAGE.

Figure 20 :



**Figure 20. La mutation S16V chez Cak1-as ne stabilise pas la protéine.** De cellules sauvages de *S. pombe* surexprimant à partir d'un plasmide les constructions *HA-CAK1*, *HA-CAK1-as*, *HA-CAK1 S16V* et *HA-CAK1-as S16V* ont été lysées pour immunoprécipiter les protéines de fusion correspondantes à l'aide de billes magnétiques coatées d'anticorps dirigés contre le tag HA. L'activité kinase sur le substrat GST-Cdk2 K33R (Cdk2 incapable de s'autophosphoryler) a été testée lors d'une réaction kinase *in vitro* utilisant soit le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP ou le  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP, suivie d'un gel SDS-PAGE et d'une autoradiographie. Un Western blot utilisant des anticorps anti-HA a ensuite été effectué sur le gel SDS-PAGE.

Figure 21 :



**Figure 21. Complémentation chez *S. cerevisiae* de l'allèle thermosensible *civI-4* par Csk1, Cak1 et les kinases dérivées.** La souche *CAK1-ts (civI-4)* a été transformée avec des plasmides surexprimant les protéines HA-Csk1, HA-Csk1-as, HA-Csk1 K40G, HA-Csk1-as K40G, HA-Cak1, HA-Cak1-as, HA-Cak1 S16V et HA-Cak1-as S16V. Des dilutions de 10 en 10 ont été étalées sur des boîtes adéquates et la croissance a été observée après 4 jours.

#### 4.1 Test kinase *in vitro* avec la kinase Csk1-as K40G

Le test kinase confirme que la mutation K40G seule n'abolit pas l'activité kinase de Csk1 comme rapporté récemment (Enke et *al.* 1999 ; Tsakraklides et *al.*, 2002), ce qui contraste avec la perte d'activité totale observée pour d'autres kinases (Hanks et *al.*, 1995). La stabilité de la protéine est cependant affectée, ce qui pourrait expliquer pourquoi la protéine Csk1 K40G montre une plus faible activité kinase que les protéines Csk1 et Csk1-as (**figure 19**).

Contrairement au postulat de départ, la combinaison de la mutation -as (T87G) et de la lysine en position 40 (K40G) provoque une perte quasi totale de l'activité kinase de la protéine. De plus, seule, ou combinée à la mutation T87G, la mutation K40G entraîne une forte déstabilisation de la protéine qui devient difficilement détectable en Western blot. Enfin, en se basant sur le faible niveau d'activité résiduel, la mutation K40G dans la kinase Csk1-as ne semble pas permettre d'augmenter la sélectivité de la protéine pour le N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP.

#### 4.2 Test kinase *in vitro* avec la kinase Cak1-as S16V

Le test d'activité révèle que la présence de la mutation S16V est neutre dans la kinase sauvage ou le mutant Cak1-as (F79G) (**figure 20**). Elle n'altère en rien les résultats obtenus précédemment, ni du point de vue de l'activité, ni de celui de la stabilité. Contrairement à ce qui a été observé chez quelques kinases par l'équipe de Shokat, cette mutation n'est pas suffisante pour rendre la kinase Cak1 « analogue sensitive » fonctionnelle.

### 5. Effet des mutations K40G et S16V sur la complémentation *in vivo* de la mutation *civ1-4* chez *S. cerevisiae*

Nous avons souhaité comparer les données obtenues *in vitro* avec une expérience de complémentation. Contrairement à *csk1*, chez *S. pombe*, le gène *CAK1* est essentiel chez *S. cerevisiae* et le mutant *civ1-4* est un allèle thermosensible de *CAK1* (Thuret et *al.*, 1996). Les différents mutants de *csk1* et *CAK1* construits ont été clonés dans un vecteur d'expression de *S. cerevisiae* et transformés dans la souche *civ1-4*. La croissance a été comparée à 25°C et 36°C pour tester la complémentation en présence de différentes concentrations des deux inhibiteurs (3-MB-PP1 et 1-NM-PP1) (**figure 21**).

#### 5.1 Complémentation de *civ1-4* par Csk1 et ses dérivés

L'expression plasmidique de *csk1* ou *csk1-as* dans la souche *civ1-4* complémente l'inactivation de Cak1 à la température restrictive de 36°C. La présence des inhibiteurs n'entrave en rien la complémentation, ce qui pourrait s'accorder avec l'idée que la mutation -as ne rend pas la kinase sensible à l'analogue *in vivo*. Le mutant K40G restaure la croissance à 36°C et montre une sensibilité faible aux inhibiteurs. Ceci indique que la mutation de la lysine

pourrait faciliter l'accès des inhibiteurs *in vivo*. Cette donnée demande cependant à être confirmée car il est difficile d'expliquer que, à température restrictive, l'expression de Csk1-as complémente plus faiblement la souche *civI-4* sans inhibiteur qu'avec inhibiteur.

Enfin, en accord avec les données *in vitro*, le double mutant K40G T87G ne complémente pas le mutant *civI-4* à 36°C.

## 5.2 Complémentation de *civI-4* par Cak1 et ses dérivés

L'expression de Cak1 ou Cak1-as permet de restaurer la croissance de la souche *civI-4* en condition de croissance restrictive. Ceci contraste avec les données *in vitro* qui montrent que le mutant Cak1-as possède une activité presque indétectable et une faible stabilité. Nous pouvons postuler que *in vivo*, le mutant -as conserve suffisamment d'activité pour assurer la croissance. De plus, contrairement à la version sauvage, Cak1-as possède une faible sensibilité aux deux inhibiteurs 3-MB-PP1 et 1-NM-PP1 aux deux concentrations testées. Cette donnée est cependant à prendre avec une grande précaution car il est difficile d'expliquer pourquoi l'ensemble des souches, et particulièrement la souche exprimant *CAK1* (dont la croissance est ici inférieure à la souche *CAK1-as*), possède une croissance ralentie à 36°C sans inhibiteur par rapport aux autres conditions.

En accord avec les données *in vitro*, la mutation S16V ne modifie pas le profil de complémentation de l'allèle thermosensible *civI-4* de Cak1 et Cak1-as.

## 6. Conclusion sur les tentatives d'amélioration de la kinase Csk1-as et Cak1

Ces résultats confirment que les deux kinases Csk1 et Cak1 possèdent des caractéristiques inhabituelles. La mutation de la lysine conservée chez Csk1 (K40G) engendre une diminution d'activité mais la protéine reste active, contrairement à la plupart des kinases. La mutation S16V chez Cak1-as ne permet pas de rétablir la stabilité de la protéine. La faible sensibilité de Cak1-as et l'absence de sensibilité de Csk1-as aux inhibiteurs 3-MB-PP1 et 1NM-PP1 confirment que ces kinases possèdent une poche de fixation de l'ATP particulière.

## **DISCUSSION**

## **I. Discussion et conclusion**

Historiquement, le gène *Csk1* de *Schizosaccharomyces pombe* a été identifié comme un suppresseur multi-copie d'un l'allèle mutant de la cycline *Mcs2* et il a été suggéré qu'il codait pour la sous-unité catalytique de *Mcs2* (Molz et *al.*, 1993). Plus tard, la protéine *Mcs6* a été identifiée comme étant le partenaire de *Mcs2*, *Csk1* comme activateur du complexe *Mcs6-Mcs2*. Se basant sur des tests de phosphorylation *in vitro*, le groupe de Robert Fisher considère que les deux kinases *Csk1* et *Mcs6* sont toutes les deux impliquées dans la phosphorylation de *Cdc2* (Lee et *al.*, 1999 ; Saiz et *al.*, 2002). Notre équipe propose que *Csk1* n'est pas directement impliquée dans la phosphorylation de *Cdc2* mais contrôle une cascade linéaire  $Csk1 \rightarrow Mcs6 \rightarrow Cdc2$  (Hermant et *al.* 2001). Cette hypothèse est renforcée par les données génétiques obtenues par différentes équipes (Molz et *al.*, 1989 ; Hermant et *al.* 2001). C'est dans ce contexte, que nous avons entamé l'étude *in vivo* du rôle de *Mcs6* et *Csk1* dans l'activation de *Cdc2* dans la levure de fission.

Dans une première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la possible redondance entre les protéines *Mcs6* et *Csk1* en analysant les conséquences de l'inhibition de *Mcs6* sur ses deux substrats connus, la protéine *Cdc2* (Thr167 ; Hermant et *al.*, 2001) et le CTD (sérines 5) de l'ARN Polymérase II (Buck et *al.*, 1995 ; Damagnez et *al.*, 1995). Nous avons postulé que si *Csk1* est également une CAK de *Cdc2*, l'inhibition de *Mcs6* devrait être sans conséquence sur la phosphorylation de la thréonine 167 de *Cdc2*. Puisque *Mcs6* est une protéine essentielle, nous avons développé un mutant chimique : une kinase « analogue sensitive » de *Mcs6* (*Mcs6-as2*) qui, en présence d'un inhibiteur diffusible, peut spécifiquement être inactivée *in vivo*. Une diminution marquée de la phosphorylation de *Cdc2* est observée quand *Mcs6-as2* est neutralisée par le 3-MB-PP1, la présence ou l'absence de *Csk1* ne modifie en rien ce résultat, ce qui nous amène à conclure que l'activité CAK de *Csk1* n'est pas redondante avec celle de *Mcs6* (**figure 5**). Nous proposons que *Mcs6* est la CAK unique de *Cdc2* *in vivo*, et phosphoryle également les sérines 5 du CTD de l'ARN polymérase II. *Csk1* fonctionne comme CAK de *Mcs6*, et sans doute d'autres CDK comme *Cdk9* et *Lsk1*.

La **figure 6D** montre que la protéine *Cak1* de *S. cerevisiae* restaure partiellement la croissance sauvage du mutant *mcs6-as2* quand il y a inhibition par le 3-MB-PP1. De plus, les **figures 6A, B et C** montrent que l'expression de *Cak1* rétablit la phosphorylation et l'activation de *Cdc2* mais pas la phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase. Ces informations renforcent la conclusion qu'en inactivant *Mcs6*, on abolit ses deux fonctions et que seule la fonction CAK peut-être complémentée par *Cak1*.

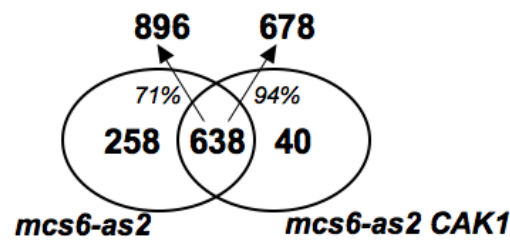
Quand *Cdc2* est inactivée, le cycle cellulaire ne peut se poursuivre et les cellules s'accumulent principalement à la transition G2-M. Toutefois, le métabolisme n'est pas perturbé et la croissance cellulaire continue. Pourquoi dans ce cas l'inactivation de *Mcs6* dans le mutant *mcs6-as2* ne résulte-t-elle pas en un phénotype d'élongation (*cdc*) typique des

mutants *cdc2* ? Une hypothèse est que le défaut de transcription qui découle de l'inactivation de *mcs6* empêche l'élongation d'être observée car des transcripts importants ne sont plus synthétisés. Si à moyen terme, le défaut transcriptionnel doit affecter la vie cellulaire, il semble peu probable que la demi-vie du transcriptome et du protéome soit assez courte pour stopper le métabolisme aussi rapidement. Une hypothèse alternative est que les conséquences de l'absence de phosphorylation de Cdc2 par la CAK ne sont pas identiques à l'inactivation pure et simple de Cdc2. Une expérience récente réalisée au laboratoire soutient fortement cette hypothèse. Le gène *cdc2* a été délété dans une souche diploïde. Après sporulation et dissection des tétrades, une ségrégation 2:2 (2 spores viables, 2 spores non viables) est observée et témoigne du caractère essentiel de *cdc2*, les spores non viables générant une cellule unique très allongée. Quand la même expérience est réalisée avec une souche diploïde possédant une copie du gène *cdc2* encodant le mutant du site d'activation T167A, la même ségrégation est observée mais le phénotype terminal est très différent : une ou deux cellules de petite taille sont observées après germination, avec parfois un septum. Cette expérience démontre que le mutant T167A a un phénotype spécifique, très différent du phénotype classique des mutants de *cdc2*. Il n'est donc pas surprenant que les mutants de *mcs6* ne montrent peu ou pas d'élongation cellulaire.

Une autre question importante est de savoir comment la double fonction de *mcs6* se traduit dans une analyse du transcriptome. Le rôle de Mcs6 dans la transcription a été inféré de ce type d'analyse par le groupe de Fisher avec comme postulat que la fonction CAK était assurée par Csk1 dans les mutants *mcs6*. À la lumière de nos données, cette question mérite une seconde analyse.

Une étude transcriptomique sur micro-arrays a été menée au laboratoire sur la souche *mcs6-as2*. En parallèle, la même souche dans laquelle le gène *CAK1*, qui complémente le défaut d'activation de Cdc2, a été intégré ; et une souche *cdk9-as*, qui affecte seulement la transcription, ont été utilisées. L'expression du transcriptome a été analysée après croissance en présence de 3-MB-PP1 et comparée à une souche sauvage cultivée dans les mêmes conditions. Cette expérience montre que quand le mutant *mcs6-as2* est inhibé par le 3-MB-PP1, environ 20% des gènes (896 gènes) de *S. pombe* subissent une modification d'expression par rapport à la condition sans inhibiteur. Quand l'expérience est répétée avec la souche *mcs6-as2 CAK1*, seulement 678 gènes, dont la majorité appartient au groupe des 896 précédents, voient leur expression modifiée.

La présence de Cak1 dans le mutant *mcs6-as2*, et par extension la complémentation du défaut d'activation de Cdc2 qui en résulte, a donc permis de réduire d'environ 25% le nombre de gènes différentiellement exprimés quand Mcs6 est inactivée. L'interprétation la plus directe de ces résultats est que près d'un quart des gènes dont l'expression varie quand Mcs6 est inactivée dépend de la fonction CAK de Mcs6 et pas de la fonction « CTD kinase ».



Le diagramme ci-dessus montre le nombre de gènes dont l'expression est affectée ( $p$ -value  $\leq 0,01$  et  $\geq 1,5$  fold change) dans les souches *mcs6-as2* et *mcs6-as2 CAK1* cultivées en présence d'inhibiteur et l'intersection. Le pourcentage du nombre de gènes retrouvés dans l'intersection par rapport au total est également indiqué pour chaque souche.

L'analyse du set d'environ 200 gènes liés à la phosphorylation activatrice de Cdc2 révèle un fort enrichissement dans la catégorie de gènes impliqués dans la synthèse ribosomale et donc la croissance. Il est tentant, bien que spéculatif, de relier cette donnée à l'absence d'élongation observée quand la phosphorylation de Cdc2 est empêchée dans le mutant T167A. La létalité du mutant T167A rend très difficile, voire impossible, une analyse transcriptomique qui permettrait de tester cette possibilité.

Une analyse plus élaborée des transcriptomes révèle également que le recouvrement des gènes différenciellement exprimés en présence d'inhibiteur entre les mutants *mcs6-as2* et *cdk9-as* est plus important quand Cak1 est exprimée dans la souche *mcs6-as2* (souche *mcs6-as2 CAK1*). Comme Cdk9 est impliquée uniquement dans la transcription, ceci est attendu puisque la présence de Cak1 gomme les effets de l'inactivation de Msc6 qui sont indépendants du CTD.

Pour confirmer l'incapacité de Csk1 à phosphoryler Cdc2, nous avons voulu identifier les substrats de Csk1 en effectuant un mutant chimique de cette protéine. Cette kinase « analogue sensitive » de Csk1 devait être la seule kinase à pouvoir accepter et utiliser comme donneur de phosphate radioactif le  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP dans un extrait protéique pour marquer ses substrats préférentiels. Cependant, l'expression insuffisante et les propriétés inhabituelles de la kinase Csk1-as ont rendu ce marquage *in vivo* non fonctionnel. Une alternative a été de surexprimer *in vivo* les kinases Csk1 (*S. pombe*) et Cak1 (*S. cerevisiae*) et de réaliser un test de phosphorylation sur les protéines immunoprécipitées avec ces deux kinases. Conformément à ce qui avait été observé lors de l'étude de l'inhibition du mutant *mcs6-as2*, seule Cak1 possède une fonction CAK et peut donc fixer la protéine Cdc2 de *S. pombe* à partir d'un extrait protéique et la phosphoryler (**figure 15**). Malgré la forte homologie entre Csk1 et Cak1, Csk1 est incapable de fixer Cdc2 et nous avons recherché si une différence de séquence ou de structure pourrait être à l'origine de cette différence fonctionnelle. Un alignement des trois protéines de la famille Cak1 avec deux autres protéines fortement apparentées à Csk1 de *S. pombe* montre que les protéines de type « Cak1 » possèdent une vingtaine d'acides aminés supplémentaires à proximité du site actif de l'enzyme (**figure 16**). Sur le modèle structural de Cak1, cette extension forme une boucle qui pourrait être directement impliquée dans la fixation de Cdc2 (**figure 17**). Pour confirmer cette hypothèse, il

serait intéressant de retirer ou en tout cas de modifier cette extension chez Cak1 et d'observer si celle-ci est toujours capable de fixer Cdc2. Une autre possibilité serait également l'ajout de la boucle de Cak1 à la protéine Csk1. Cette dernière expérience vient d'être réalisée mais la protéine Csk1 recombinante est exprimée faiblement et présente très peu d'activité. Il est donc possible que la capacité spécifique de Cak1 à lier Cdc2 implique des caractéristiques plus subtiles.

## **II. Discussion générale et perspectives**

Les kinases dépendantes des cyclines sont des composants essentiels du cycle de division cellulaire eucaryote. Chez les métazoaires, le trimère Cdk7/Cycline H/Mat1 est considéré comme l'unique CAK des CDK cellulaires. Un homologue de ce complexe CAK trimérique a d'ailleurs été identifié chez tous les eucaryotes supérieurs. Cependant la découverte d'une protéine comme Cak1 chez *S. cerevisiae* ou Csk1 chez *S. pombe* suggère qu'il existe une alternative monomérique à ce complexe CAK trimérique. Le fait que le complexe Cdk7/Cycline H/Mat1 soit également associé au TFIIF, un facteur de transcription général de l'ARN Polymérase II (Kaldis et al., 1999) suggère la possibilité d'une intégration des contrôles transcriptionnels et de division cellulaire par la CAK.

Chez les CDK inactives sous forme monomérique comme Cdk7, le segment protéique « T-loop » bloque le site actif de la protéine et inhibe ainsi son activité. La fixation d'une cycline provoque une modification conformationnelle qui inclut le repositionnement du « T-loop » et l'activation de la CDK partenaire (Jeffrey et al., 1995). Il serait intéressant d'étudier l'implication du « T-loop » et de sa phosphorylation chez les CAK monomériques. La recherche d'une différence structurale pourrait peut-être expliquer pourquoi ces protéines ne nécessitent pas la liaison d'une cycline pour être active. De plus, si les études sur l'activation du « T-loop » chez les CDK sont abondantes, très peu de choses sont connues concernant les mécanismes de déphosphorylation de celui-ci. En effet, l'expression régulée de certaines phosphatases du « T-loop » lors du cycle cellulaire pourrait constituer un niveau de régulation important. Certaines protéines comme la protéine métazoaire KAP possèdent une activité phosphatase pour des substrats possédant des résidus phosphothréonines et phosphosérines. Cette protéine a été découverte lors d'un test d'interaction protéique double hybride et s'associe en levure avec Cdk1 et Cdk2. Sa capacité à lier plusieurs CDK différentes pourrait suggérer qu'elle possède un rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire (Hannon et al., 1994).

L'ensemble de notre travail concerne l'étude des CDK chez des organismes de type eucaryotes donc des organismes compartimentalisés. L'analyse de la localisation des complexes CDK/Cycline d'intérêt et la régulation spatiale qui en découle est également une perspective intéressante de travail. S'il est clair que le complexe Mcs6/Mcs2/Phm1 est stable tout au long du cycle cellulaire (Hermand et al., 1998) et se localise principalement au niveau du noyau (rôle dans la transcription), il serait intéressant de savoir où et quand Cdc2 est phosphorylée sur son « T-loop » par celui-ci.

En plus de fonctionner sous forme monomérique, nous avons pu observer que les divers mutants –as générés des kinases Csk1 et Cak1 possédaient une poche de fixation de l'ATP atypique (liaison du N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP chez la kinase sauvage (**figure 13**) et mutation de la lysine conservée du site actif sans effet dramatique sur l'activité (**figure 19**)). Ces données

confirment que ces kinases monomériques appartiennent à une classe de kinases différentes des CDK « classiques ». Si elles possèdent un ancêtre commun avec ces dernières, celui-ci doit être très éloigné.

Chez les métazoaires possédant un homologue de Cdk7, aucune kinase homologue à Csk1 (ou Cak1) n'a été identifiée. Notre travail démontre que le complexe Mcs6/Mcs2/Mat1 est suffisant pour l'activation de Cdc2 et que le seul rôle de Csk1 dans ce mécanisme est l'activation de Mcs6, la CAK phosphorylant Cdc2, Csk1 peut être donc définie comme étant une CAKAK. Cdk7 tout comme Mcs6 est cependant retrouvée phosphorylée *in vivo* et *in vitro*. Si, chez *S. pombe*, il a été prouvé que Csk1 phosphoryle Mcs6, chez les métazoaires, l'existence d'une kinase CAKAK homologue n'a pas été rapportée. À défaut d'identifier cette protéine chez les métazoaires, on suppose que Cdk7 est capable de s'auto-phosphoryler. Il est cependant intéressant de noter que l'équipe de Kaldis (Kaldis et *al.*, 2000) a réussi à détecter, lors de purifications anti-Cdk2 (par chromatographie), une seconde activité CAK différente de celle du complexe Cdk7/Cycline H/Mcs6. Cette activité est capable de phosphoryler et d'activer les protéines Cdk2 et Cdk6. De plus, il semblerait qu'en termes de spécificité de substrat, cette nouvelle activité CAK soit plus proche de la protéine Cak1 que de Cdk7. Même si ces données suggèrent l'existence d'une seconde activité CAK chez les métazoaires, la protéine qui en est à l'origine n'a pas été identifiée et il est difficile de savoir si elle phosphoryle Cdk7 comme le voudrait le modèle retrouvé chez *S. pombe*.

L'avantage d'une activation via une CAK monomérique ou trimérique reste inconnu et sachant qu'elles mènent toutes les deux au même objectif, l'activation des CDK (en particulier Cdc2 dans notre cas), il est difficile d'expliquer pourquoi les deux types de CAK ont été conservés chez certains organismes comme *S. pombe*. On suppose que la présence des CAK monomériques signifie que chez les organismes où elles sont retrouvées, l'homologue de Cdk7 ne peut assurer une fonction essentielle. Chez la levure de bourgeonnement, il y a des évidences qui montrent que Cak1 est impliquée dans la méiose et dans la formation des spores (Schaber et *al.*, 2002 ; Wagner et *al.* 1997). En effet, la protéine *SMK1* code pour une MAP (mitogen-activated protein) kinase spécifique de la sporulation. Cette kinase est nécessaire pour la régulation des événements post-méiotiques, en particulier pour l'assemblage de la paroi des spores (Krisak et *al.*, 1994). Le gène *CAK1* a été identifié comme étant un suppresseur multi-copie d'un mutant *SMK1*. L'équipe de Schaber a montré que Cak1 agissait en amont de Smk1 via un pathway indépendant de l'activation de la CDK Cdc28 (Schaber et *al.*, 2002). Il est probable que Cak1 active par phosphorylation une kinase intermédiaire qui à son tour active Smk1. L'activation de la CDK Cdc28 et de la MAP kinase Smk1 par une seule enzyme, Cak1, fournit potentiellement aux cellules méiotiques un mécanisme de régulation leur permettant de coupler les divisions nucléaires (via l'activation de Cdc28) et de la genèse de gamètes (morphogénèse des spores, via l'activation de Smk1). La conservation d'un mécanisme impliquant les CAK monomériques chez les levures (*S. cerevisiae*, *C. albicans* et *S. pombe*) pourrait donc être une conséquence de la nécessité de ces protéines dans de tels mécanismes. Il est finalement intéressant de noter que l'étude des CAK

monomériques et de leurs particularités pourrait s'avérer utile pour générer des agents antifongiques qui n'affecteraient que les levures et non les métazoaires.

## **MATERIELS ET METHODES**

## **I. Outils utilisés**

### **1. La levure de fission *Schizosaccharomyces pombe* :**

La table à la page suivante reprend l'ensemble des souches *S. pombe* utilisées lors de cette étude.

### **2. Vecteurs d'expression utilisés :**

Voici la liste des vecteurs utilisés dans ce travail. Plus d'informations sur ces vecteurs seront apportées au cours de ce matériel et méthodes.

- Vecteur pAHA : plasmide de surexpression chez *S. pombe* modifiés à partir du plasmide pAAUN (Xu et *al.*, 1990) où un tag HA est placé en amont du site multiple de clonage.
- Vecteur pFA6a-TAP(2x)-kanMX6 : plasmide dont l'insert est utilisé pour tagguer une protéine avec le tag TAP(2x) (Bähler et *al.* 1998)
- Vecteur pGEX4T-1 : plasmide de surexpression dans *E. coli* (GE Healthcare)
- Vecteur p424-MET25 : plasmide de *S. cerevisiae* utilisé pour exprimer Cak1 et ses formes -as dérivées dans la souche *S. cerevisiae civ1-4* (Mumberg et *al.*, 1998)
- Vecteur p426-MET25 : plasmide de *S. cerevisiae* utilisé pour exprimer Csk1 et ses formes -as dérivées dans la souche *S. cerevisiae civ1-4* (Mumberg et *al.*, 1998)

| Nom                              | <i>h<sup>+</sup>/-</i> | Intégration/Disruption/Mutation                           | Marqueurs                        | Origine                     |
|----------------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| « Sauvage »                      | <i>h<sup>+</sup></i>   | /                                                         | <i>ade6-216 ura4-D18 leu1-32</i> | Reque de Grallert           |
| <i>mcs6-as</i>                   | <i>h<sup>-</sup></i>   | <i>mcs6::mcs6-L87G-KanR</i>                               | <i>ade6-216</i>                  | Reque de Makela             |
| <i>mcs6-as2</i>                  | <i>h<sup>+</sup></i>   | <i>mcs6::mcs6-I85L-I86V-L87G</i>                          | <i>ade6-216 ura4-D18 leu1-32</i> | Construite pour cette étude |
| <i>mcs6-as3</i>                  | <i>h<sup>+</sup></i>   | <i>mcs6::mcs6-I85L-I86V-L87A</i>                          | <i>ade6-216 ura4-D18 leu1-32</i> | Construite pour cette étude |
| <i>mcs6-as4</i>                  | <i>h<sup>+</sup></i>   | <i>mcs6::mcs6-L87A</i>                                    | <i>ade6-216 ura4-D18 leu1-32</i> | Construite pour cette étude |
| <i>cdk9-TAP</i>                  | <i>h<sup>-</sup></i>   | <i>cdk9-TAP-kanR</i>                                      | <i>ade6-210 ura4-D18 leu1-32</i> | Construite pour cette étude |
| <i>cdk9-as-TAP</i>               | <i>h<sup>-</sup></i>   | <i>natR-pcdk9-cdk9-as-TAP-kanR</i>                        | <i>ade6-210 ura4-D18 leu1-32</i> | Construite pour cette étude |
| <i>csk1-TAP</i>                  | <i>h<sup>-</sup></i>   | <i>csk1-TAP-kanR</i>                                      | <i>ade6-210 ura4-D18 leu1-32</i> | Construite pour cette étude |
| <i>csk1-as-TAP</i>               | <i>h<sup>-</sup></i>   | <i>csk1::csk1-T87G-TAP-kanR</i>                           | <i>ade6-210 ura4-D18 leu1-32</i> | Construite pour cette étude |
| <i>mcs6-as2-TAP</i>              | <i>h<sup>+</sup></i>   | <i>mcs6::mcs6-I85L-I86V-L87G-TAP-kanR</i>                 | <i>ade6-216 ura4-D18 leu1-32</i> | Construite pour cette étude |
| <i>mcs6-TAP</i>                  | <i>h<sup>+</sup></i>   | <i>mcs6-TAP-kanR</i>                                      | <i>ade6-216 ura4-D18 leu1-32</i> | Construite pour cette étude |
| <i>csk1::ura4</i>                | <i>h<sup>-</sup></i>   | <i>csk1::ura4</i>                                         | <i>ade6-216 ura4-D18 leu1-32</i> | Hernand et al. 1998         |
| <i>csk1::ura4 mcs6-as2</i>       | <i>h<sup>-</sup></i>   | <i>csk1::ura4 mcs6::mcs6-I85L-I86V-L87G</i>               | <i>ade6-216 ura4-D18 leu1-32</i> | Construite pour cette étude |
| <i>csk1::ura4 mcs6-as2 S165A</i> | <i>h<sup>+</sup></i>   | <i>csk1::ura4 mcs6::mcs6-I85L-I86V-L87G-S165A</i>         | <i>ade6-216 ura4-D18 leu1-32</i> | Construite pour cette étude |
| <i>mcs6-as2 S165A</i>            | <i>h<sup>+</sup></i>   | <i>mcs6::mcs6-I85L-I86V-L87G-S165A</i>                    | <i>ade6-216 ura4-D18 leu1-32</i> | Construite pour cette étude |
| <i>mcs6-as2 CAK1</i>             | <i>h<sup>+</sup></i>   | <i>mcs6::mcs6-I85L-I86V-L87G ura4::HA-CAK1</i>            | <i>ura4<sup>-</sup></i>          | Construite pour cette étude |
| <i>csk1::ura4 CAK1</i>           | ND                     | <i>csk1::ura4 ura4::HA-CAK1</i>                           | /                                | Construite pour cette étude |
| <i>mcs6-as2 S165A CAK1</i>       | <i>h<sup>+</sup></i>   | <i>mcs6::mcs6-I85L-I86V-L87G-S165A ura4::HA-CAK1</i>      | <i>ura4<sup>-</sup></i>          | Construite pour cette étude |
| <i>csk1::ura4 mcs6-as2 CAK1</i>  | <i>h<sup>+</sup></i>   | <i>csk1::ura4 mcs6::mcs6-I85L-I86V-L87G ura4::HA-CAK1</i> | /                                | Construite pour cette étude |
| <i>CAK1</i>                      | <i>h<sup>-</sup></i>   | <i>ura4::HA-CAK1</i>                                      | <i>ura4<sup>-</sup></i>          | Construite pour cette étude |

### 3. Milieux pour cultiver pour *S. pombe* :

#### Milieu pauvre : EMM Broth (Formedium)

| <u>Source de carbone :</u> | <u>Minéraux :</u>                    | <u>Vitamines :</u> | <u>Éléments en trace :</u>                          |
|----------------------------|--------------------------------------|--------------------|-----------------------------------------------------|
| Dextrose                   | Phtalic Acid K <sup>+</sup>          | Panhotenic acid    | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      |
|                            | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>     | Nicotinic acid     | MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                 |
|                            | NH <sub>4</sub> Cl                   | Inositol           | ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                |
|                            | MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O | Biotin             | FeCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                |
|                            | CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O |                    | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O |
|                            | KCl                                  |                    | KI                                                  |
|                            | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      |                    | CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                |
|                            |                                      |                    | Citric Acid                                         |

#### Milieu riche : YES Broth (Formedium)

Extraits de levures

Glucose

Suppléments d'acides aminés

### 4. Marquage du N<sup>6</sup>-(benzyl)-ADP

Un mélange comprenant 200 U de Nucleoside 5'-Diphosphate Kinase (stock NDPK 10 U/μl ; Sigma), 800 μCi de γ-<sup>32</sup>P-ATP 10 mCi/ml (Perkinelmer) et 20 μl de tampon HBS (150 mM NaCl, 20 mM Hepes pH 7,4 ; 5 mM MgCl<sub>2</sub>) a été réalisé et incubé pendant 5 min à 30°C. La Nucleoside DiPhosphate Kinase phosphorylée a été purifiée par deux passages sur des colonnes ProbeQuant G-50 Micro (GE Healthcare) et incubée pendant 20 min à 30°C avec 1 nmol de N<sup>6</sup>-(benzyl)-ADP (0,5 nmol/μl ; Biolog). La réaction a ensuite été transférée sur une colonne Microcon Utracel YM-30 (Amicon) et centrifugée à 15000 g pendant 15 min. Le γ-<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP est récupéré et dosé avec un compteur à scintillation.

## **II. Techniques utilisées**

### **1. Transformation de *S. pombe* :**

La levure de fission *Schizosaccharomyces pombe* est rendue compétente et transformée en utilisant l'acétate de lithium (adaptation du protocole de Moreno et *al.*, 1991). Une culture de *S. pombe* est cultivée en phase de culture exponentielle de croissance jusqu'à une densité de  $5,5 \times 10^6$  cellules/ml. Par transformation,  $10^8$  cellules sont nécessaires. Elles sont lavées avec 15 ml d'eau stérile puis transférées dans un volume de 1 ml d'eau (passage en eppendorf). Après un lavage avec 1 ml de LiAc-TE (0.1 M lithium acétate, 10 mM Tris pH 7,5 ; 1 mM EDTA), les cellules sont resuspendues dans du LiAc-TE à une concentration de  $10^9$  cellules/ml. Pour chaque transformation, 2,5 µl d'ADN « carrier » à 10 mg/ml (ADN de sperme de saumon, préchauffé pendant 5 min à 100°C) et jusqu'à 15 µl d'ADN sont utilisés. Après ajout de l'ADN, les cellules sont incubées à température ambiante pendant 10 min. Un volume de 260 µl de 40% PEG/LiAc-TE (0.1 M lithium acetate, 10 mM Tris pH 7,5 ; 1 mM EDTA, 40% PEG4000) est ajouté, et la réaction est incubée pendant 30 min à 32°C. Après ajout de 43 µl de DMSO, les cellules subissent un choc thermique à 42°C pendant 5 min. Elles sont ensuite centrifugées et lavées dans 1 mL d'eau avant d'être resuspendues dans 300 µl d'eau et étalées sur trois boîtes contenant le milieu adéquat (3x 100 µl). Les transformants apparaissent après deux ou trois jours à 32°C.

### **2. Contrôle de l'expression protéique par Western Blot**

Protocole adapté de Matsuo et *al.*, 2006. La souche est inoculée dans 10 ml et cultivée en phase exponentielle de croissance jusqu'à la densité de  $5,5 \times 10^6$  cellules/ml. Après une centrifugation à température ambiante, le culot de cellules est lavé avec 1 ml d'eau et resuspendu dans 300 µl d'eau. Un volume de 300 µl de NaOH 0,6 M est ajouté, et l'ensemble est incubé pendant 10 min à température ambiante. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 70 µl de tampon de chargement (60 mM Tris-HCl, pH 6,8 ; 4% β-mercaptoethanol, 4% SDS, 0,01% Bromophenol blue, 5% glycerol). Après une incubation de 3 min à 100°C, 15 µl est chargé et migre sur un gel SDS-PAGE. Un transfert sur membranes PVDF est réalisé et les membranes sont incubées avec l'anticorps adéquat dilué dans du tampon PBS + Tween 0,5% + 5% lait : anti-HA (HA.11 clone 16B12 ; Covance) ; anti-Cdc2 (Y63/2 ; donné par P. Nurse), anti-Phospho-Cdc2 Thr161 (réaction croisée avec *S. pombe* Phospho-Cdc2 Thr167 ; Cell Signaling Technology), anti-Rpb1 S5-P (CTD H14 ; Covance) et anti-PAP (Peroxydase anti-péroxydase ; Sigma). Pour la détection, des films Fuji et de l'ECL<sup>+</sup> (Amersham) ont été utilisés comme décrit par Hermand et *al.*, 1998.

### 3. Mutagenèse dirigée :

#### 3.1 Création des mutants « analogue sensitive »

Un alignement de séquence protéique de Cak1 de *S. cerevisiae*, Csk1 de *S. pombe* et plusieurs de leurs homologues a permis de déterminer que le résidu « gatekeeper » de Cak1 et Csk1 était la phénylalanine 79 et la thréonine 87 respectivement ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)). Les mutants « analogue sensitive » pour les allèles *csk1* et *CAK1* ont été générés *in vitro* en utilisant le kit de mutagenèse dirigée « Quickchange » (Stratagen). Les vecteurs contenant *CAK1* (pAHA-*CAK1* et p424-MET25-*CAK1*) et *csk1* (pAHA-*csk1* et p426-MET25-*csk1*) ont été utilisés comme matrice avec une paire d'amorces oligonucléotidiques possédant la mutation F79G et T87G pour *CAK1* et *csk1* respectivement. Pour faciliter les futures étapes de criblages, une mutation silencieuse a également été introduite, elle engendre l'ajout d'un site de restriction ApaI chez *CAK1* et la perte d'un site de restriction BamHI chez *csk1*. Les amorces utilisées sont 5' GAC-CTA-TTG-TTG-TTG-ggc-CCC-TTT-GAA-GAG-ATG-AAC-C 3' et 5' G-GTT-CAT-CTC-TTC-AAA-GGG-gcc-CAA-CAA-CAA-TAG-GTC 3' (TTT>GGC + gain ApaI) pour *CAK1* et 5' GAA-GCA-GGA-TCg-GTT-TAC-CTT-ATA-ggG-AGT-TTT-AAA-TCG 3' et 5' CGA-TTT-AAA-ACT-Ccc-TAT-AAG-GTA-AAC-cGA-TCC-TGC-TTC 3' (ACG>GGG + perte BamHI) pour *csk1*. Ces amorces, complémentaires de chacun des brins du vecteur, sont utilisées lors d'une réaction PCR avec l'ADN Polymérase Pfu Turbo générant ainsi des plasmides contenant les mutations adéquates. DpnI est une endonucléase (séquence cible : 5'-Gm<sub>6</sub>ATC-3') qui va spécifiquement digérer les plasmides parentaux méthylés (ADN plasmidique préparé à partir d'une souche *E. coli* dam<sup>+</sup>) et donc sélectionner les plasmides néo-synthétisés (sans méthylation) contenant les mutations souhaitées. Les plasmides sont alors transformés dans des cellules *E. Coli* compétentes. La présence de la mutation -as est vérifiée par restriction (restriction ApaI et BamHI pour *CAK1* et *csk1* respectivement) et par séquençage. L'allèle *csk1-as* (*csk1-T87G*) a été intégré par recombinaison homologue au locus *csk1* chez *S. pombe* en transformant une souche dans laquelle *csk1* est disrupté par *ura4* (*csk1::ura4* ; Hermand et al. 1998) avec un produit PCR linéaire obtenu à partir d'une PCR sur l'insert du plasmide pAHA-*csk1-as*.

La souche *S. pombe mcs6-as* (*mcs6::mcs6-L87G*) a été reçue de T. Makela. Suivant la même procédure que pour *CAK1-as* et *csk1-as*, les mutants *mcs6-as2* (*mcs6::mcs6-I85L-I86V-L87G*), *mcs6-as3* (*mcs6::mcs6-I85L-I86V-L87A*) et *mcs6-as4* (*mcs6::mcs6-L87A*) ont été générés. Les couples d'amorces utilisés pour générer les différentes versions de *mcs6* sont : 5'-CC-ACA-AAG-TCC-AAC-CTC-AAC-CTC-GTC-GGG-GAA-TTC-CTG-GAC-AGT-GAT-TTG-G-3' et 5'-C-CAA-ATC-ACT-GTC-CAG-GAA-TTC-CCC-GAC-GAG-GTT-GAG-GTT-GGA-CTT-TGT-GG-3' pour *mcs6-as2* ; 5'-CC-ACA-AAG-TCC-AAC-CTC-AAC-CTC-GTC-GCG-GAA-TTC-CTG-GAC-AGT-GAT-TTG-G-3' et 5'-C-CAA-ATC-ACT-GTC-CAG-GAA-TTC-CGC-GAC-GAG-GTT-GAG-GTT-GGA-CTT-TGT-GG-3' pour *mcs6-as3* et enfin 5'-CC-ACA-AAG-TCC-AAC-CTC-AAC-ATC-ATC-GCG-GAA-

TTC-CTG-GAC-AGT-GAT-TTG-G-3' et 5'-CC-AAA-TCA-CTG-TCC-AGG-AAT-TCC-GCG-ATG-ATG-TTG-AGG-TTG-GAC-TTT-GTG-G-3' pour *mcs6-as4*. Les analyses de structures ont été réalisées avec le logiciel Swiss-PdbViewer (The Swiss Institute of Bioinformatics ; <http://www.expasy.org/spdbv/>)

### 3.2 Ajout des mutations K40G dans Csk1, S16V dans Cak1 et S165A dans Mcs6

La mutation K40G dans les protéines Csk1 et Csk1-as et la mutation S16V dans les protéines Cak1 et Cak1-as ont également été introduites en utilisant le kit de mutagenèse dirigée QuickChange. Les amorces utilisées pour la mutation K40G sont 5'-CTA-TAT-GTT-ATT-ggA-GTT-CAA-GGT-TTA-GTA-TTc-AAA-AGG-CC-3' et 5'-GG-CCT-TTT-gAA-TAC-TAA-ACC-TTG-AAC-Tcc-AAT-AAC-ATA-TAG-3' (AAA>GGA + perte du site DraI) et les amorces utilisées pour la mutation S16V sont 5'-C-TGT-CAG-TTG-GTC-AAA-gtT-ACg-cGt-ACT-GCT-AGG-ATT-TAT-AG-3' et 5'-CT-ATA-AAT-CCT-AGC-AGT-aCg-cGT-Aac-TTT-GAC-CAA-CTG-ACA-G-3' (TCT>GTT + gain d'un site MluI). La réaction PCR QuickChange a été effectuée sur les plasmides pAHA-*CAK1* et pAHA-*CAK1-as* pour Cak1 et pAHA-*csk1* et pAHA-*csk1-as* pour Csk1.

La mutation S165A dans la protéine Mcs6-as2 a été introduite de la même manière. Les amorces 5'-GGC-ACC-CCA-AGC-CAt-ATG-gcT-CAT-CAG-GTC-3' et 5'-GAC-CTG-ATG-Agc-CAT-aTG-GCT-TGG-GGT-GCC-3' (AGT>GCT + gain d'un site NdeI) ont été utilisées sur un plasmide contenant la construction *mcs6-as2*. Les produits PCR ont ensuite été transformés chez *S. pombe* et intégrés au locus par recombinaison homologue.

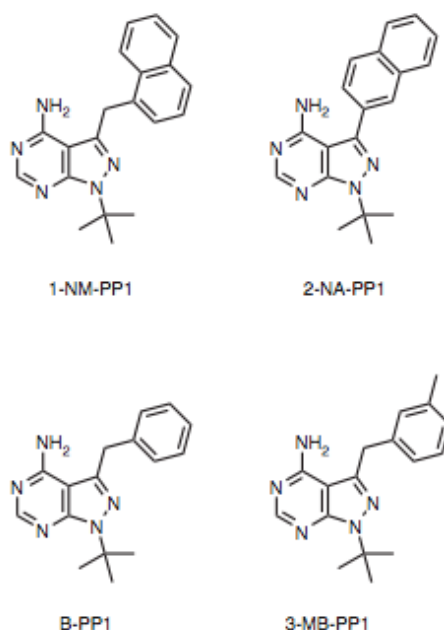
## 4. Ajout de l'épitope carboxy-terminal TAP(2x)

Pour introduire l'épitope carboxy-terminal TAP(2x) par recombinaison homologue aux locus *csk1* ou *csk1::csk1-as*, nous avons généré un long fragment linéaire composé : d'environ 80 paires de bases de la séquence codante 3'-terminal de *csk1*, fusionnées en phase avec l'ADN codant pour le tag TAP(2x), le gène de résistance kanMX, et enfin d'une autre séquence d'environ 80 paires de bases correspondant à la séquence en aval de *csk1* (Bähler et al., 1998 heterologous ; Van Driessche et al., 2005). La cassette du tag TAP(2x) a été amplifiée à partir du plasmide pFA6a-TAP(2x)-kanMX6 avec les amorces suivantes : 5'-TCA-CCA-TCC-TTC-GTG-ATT-GAG-TCA-TTC-CCT-AAA-GTA-TCT-GCT-AGG-CTT-TCA-CAA-TAT-GCA-CGG-ATC-CCC-GGG-TTA-ATT-AA-3' (forward) et 5'-CTA-AGA-TAA-TTA-ATT-CCT-ACG-GTA-GTA-TTG-CCT-ACC-TGT-TTA-TTT-CTA-CTG-TCC-TTT-AAA-GAA-TTC-GAG-CTC-GTT-TAA-AC-3' (reverse). La transformation de ce long fragment nucléique dans une souche *S. pombe csk1* ou *csk1::csk1-as* et la sélection sur milieu riche YES + 100 mg/ml de G418 (Gibco) ont permis l'obtention d'intégrants *csk1-TAP* et *csk1::csk1-as-TAP*.

Suivant une procédure similaire à celle utilisée pour *csk1*, la souche sauvage pour *mcs6* et la souche *mcs6::mcs6-as2* ont été tagguées avec l'épitope carboxy-terminal TAP(2x).

## 5. Utilisation des inhibiteurs de kinases -as

Un crible pour mettre en évidence des inhibiteurs susceptibles de diminuer l'activité d'une kinase -as par rapport à une sauvage a montré que les inhibiteurs, analogues de l'adénosine fonctionnaient bien (Bishop et al., 1998). Mais ces molécules pouvant interférer avec de nombreuses fonctions cellulaires, les chercheurs se sont tournés vers la classe connue des inhibiteurs de tyrosine kinase. La molécule PP1 (4-amino-1-tert-butyl-3-(p-methylphenyl)pyrazolo[3,4-d] pyrimidine), connue pour être un inhibiteur potentiel des kinases de la famille des Scr (Hanke et al., 1996), a été utilisée comme structure de base sur laquelle différents groupements ont été greffés pour créer des inhibiteurs spécifiques des kinases « as ». L'inhibiteur utilisé durant ce travail est le 3-MB-PP1 (4-Amino-1-tert-butyl-3-(3-methylbenzyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine ; Toronto Research Chemicals Inc.). Il existe également d'autres variantes de l'inhibiteur PP1. Citons par exemple le 1-NM-PP1, le 2-NA-PP1 ou encore le B-PP1. Il est impossible de savoir à l'avance quel inhibiteur sera le plus efficace contre une kinase -as particulière. Pour le déterminer, des dilutions sériees des cellules contenant la kinase sauvage et la kinase -as sont réalisées et déposées en goutte sur du milieu contenant 30  $\mu$ M des différents inhibiteurs.



*Structures chimiques des inhibiteurs de kinases -as couramment utilisés  
(Gegan et al., 2007)*

Il est également possible de mesurer l'impact de l'inhibiteur sur une souche sauvage ou -as en réalisant des courbes de croissance. Les souches *S. pombe* adéquates sont inoculées en milieu riche (YES) à 32°C et croissent jusqu'à  $1,1 \times 10^6$  cellules/ml. Une culture en parallèle de la

souche traitée avec l'inhibiteur (30  $\mu$ M de 3-MB-PP1) et la même souche non traitée est effectuée. La densité des cultures est relevée toutes les deux heures pendant 10 h. Pour chaque souche, la croissance relative est obtenue en comparant la condition avec et sans inhibiteur.

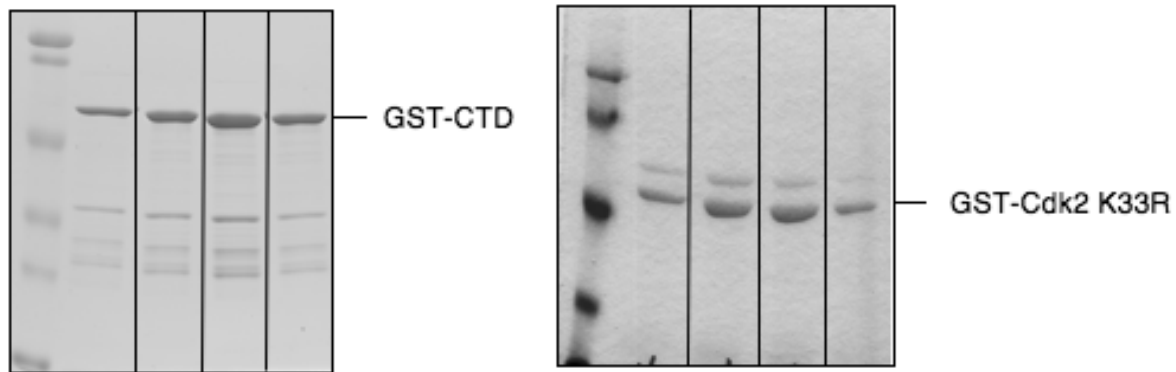
L'impact d'un inhibiteur sur une souche possédant une kinase -as peut également être observé en contrôlant la phosphorylation des substrats de cette kinase. Les souches adéquates sont cultivées en milieu riche (YES) jusqu'à une densité de  $5,5 \times 10^6$  cellules/ml. Les cultures sont alors divisées en deux pour tester les conditions avec/sans inhibiteur. Après une incubation avec 30  $\mu$ M de 3-MB-PP1 pendant 4h, une extraction protéique totale est effectuée et les protéines sont chargées sur un gel SDS-PAGE 10%. Après un transfert sur une membrane PVDF, les anticorps anti-Cdc2 (Y63/2 ; donnés par P. Nurse) et anti-Phospho-Cdc2 Thr161 (réaction croisée avec *S. pombe* Phospho-Cdc2 Thr167 ; Cell Signaling Technology) sont respectivement utilisés pour mesurer le niveau d'expression de Cdc2 et le niveau de phosphorylation sur la Thr167 de Cdc2. Un anticorps anti-Rpb1 S5-P (CTD H14 ; Covance) a également été utilisé pour mesurer l'état de phosphorylation des sérines 5 de la plus grosses sous-unités de l'ARN polymérase II. Pour la détection, des films Fuji et de l'ECL<sup>+</sup> ont été utilisés comme décrit par Hermand et *al.*, 1998. L'effet des inhibiteurs a été mesuré sur l'activité kinase de Cdc2. Le protocole utilisé à cet effet se situe dans la section « immunoprécipitation » de ce matériels et méthodes.

## 6. Marquage *in vivo* des substrats de Csk1 sur des extraits totaux

Ce protocole est une adaptation du protocole utilisé par l'équipe de Larochelle et *al.*, 2005. La souche sauvage pour *csk1* et la souche *csk1::csk1-as* ont été inoculées dans 50 ml de milieu riche (YES) et cultivées jusqu'à une densité de  $5 \times 10^6$  cellules/ml. Après centrifugation, elles ont été lavées dans 1 ml d'un tampon contenant 25 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> et des inhibiteurs de protéases puis resuspendues dans 200  $\mu$ l de ce même tampon. L'équivalent de 1 ml de billes de Zirconium (BioSpec) a été ajouté et les cellules ont été lysées au Fast Prep (MP) avec deux rounds de 20 sec à puissance 6. Le lysat protéique a été récupéré (filtration des billes, puis rinçage avec 800  $\mu$ l de tampon) et les débris cellulaires ont été éliminés par deux centrifugations de 5 min à 9500 g et 10 min à 18500 g à 4°C. Après un dosage protéique au Bradford, 100  $\mu$ g de protéines a été utilisé pour la réaction kinase dans un tampon kinase (20 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) contenant 10  $\mu$ Ci de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP ou 10  $\mu$ Ci  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP pendant 30 min à 30°C. La réaction est arrêtée avec l'ajout de bleu de chargement (60 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 4%  $\beta$ -mercaptoethanol, 4% SDS, 0,01% bleu de Bromophenol, 5% glycérol) et chargée intégralement sur un gel SDS PAGE 10% . Une autoradiographie est effectuée après une exposition de 1 h à 24 h sur des films Fuji. Ce protocole n'apportant pas de signaux spécifiques, des adaptations ont été tentées et sont expliquées dans la section « Résultats » de ce travail.

## 7. Expression et purification des protéines recombinantes

Le système de Glutathione S-transferase (GST\*) Gene Fusion (GE Healthcare) est un système intégré pour l'expression, la purification et la détection de protéines produites en *E. coli*. La protéine de fusion GST-Csk1-as a été construite en ajoutant la mutation -as (T87G) dans l'insert *csk1* du plasmide pGEX4T-1-*csk1* avec les amorces 5'-GAA-GCA-GGA-TCg-GTT-TAC-CTT-ATA-ggG-AGT-TTT-AAA-TCG-3' et 5'-CGA-TTT-AAA-ACT-Ccc-TAT-AAG-GTA-AAC-cGA-TCC-TGC-TTC-3' (utilisation kit « Quickchange », Stratagene). Les protéines de fusion GST-CTD et GST-Cdk2 K33R ont été construites en insérant le CTD ou Cdk2 K33R (mutation du site d'auto-phosphorylation de Cdc2) dans le site multiple de clonage du vecteur pGEX4T-1 (GE Healthcare). L'expression des protéines de fusion est sous le contrôle du promoteur *tac*, qui est induit par un analogue du lactose appelé IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside). Tous les vecteurs pGEX sont également dotés d'un gène *lacI<sup>q</sup>*. Le produit de ce gène est une protéine répressive qui lie la région opératrice du promoteur *tac*, empêchant et contrôlant ainsi l'expression de la protéine de fusion tant que l'induction à l'IPTG n'a pas eu lieu. Le protocole proposé par GE Healthcare a été suivi à la lettre. Voici en quelques lignes les grandes étapes de celui-ci. Les plasmides contenant les protéines de fusion sont transformés dans la souche *E. coli* BL21. Une culture liquide de ces bactéries est effectuée à 37°C jusqu'à ce que la densité optique soit aux environs de 0,6. La surexpression de la protéine de fusion est alors induite en ajoutant 1 mM d'IPTG dans le milieu. Après 3h, les cellules sont récoltées, rincées dans du PBS et lysées par sonication (4x 15 sec, puissance 3). Le culot est alors éliminé via deux centrifugations de 10 min à 6000 g et 5 min à 9500 g. Les protéines de fusion sont alors facilement purifiées par chromatographie d'affinité utilisant du glutathion immobilisé à une matrice de Sepharose. Elles fixent le ligand alors que les impuretés sont éliminées en lavant avec du PBS. Elles sont ensuite éluées de la colonne avec un tampon d'élution contenant du glutathione dans des conditions non dénaturantes pour préserver la fonction de la protéine. L'étape d'élution est répétée 4x de manière à récupérer un maximum de protéines de fusion, quatre fractions sont donc récupérées. Elles sont dosées par Bradford et un échantillon est déposé et mis à migrer sur un gel SDS-PAGE qui sera coloré au bleu de Coomassie. Afin de tenter d'améliorer la solubilité de la protéine GST-Cdk2 K33R, des variantes du protocole d'induction ont été réalisées (voir la section « Résultats »).



1  $\mu$ l de chacune des quatre fractions d'élution des purifications GST-CTD et GST-Cdk2 K33R a été séparé sur gel SDS-PAGE. Le gel a ensuite été coloré au bleu de Coomassie.

## 8. Immunoprécipitation et test kinase *in vitro* et *in vivo*

Les souches *cdk9::cdk9-TAP*, *cdk9::cdk9-as-TAP*, *mcs6::mcs6-as2-TAP* et *mcs6::mcs6-TAP* ont été inoculées dans 50 ml de milieu riche et ont été cultivées jusqu'à la densité de  $5,5 \times 10^6$  cellules/ml. Après rinçage avec 1 ml de NP40+Pi (6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 4 mM  $\text{NaHPO}_4$ , 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, inhibiteurs de protéases), elles ont été resuspendues dans 200  $\mu$ l de NP40+Pi. L'équivalent de 1 ml de billes de Zirconium (BioSpec) a été ajouté et les cellules ont été lysées au Fast Prep (MP) avec deux rounds de 20 sec à puissance 6. Le lysat protéique a été récupéré (filtration des billes, puis rinçage avec 800  $\mu$ l de NP40+Pi) et les débris cellulaires ont été éliminés par deux centrifugations de 5 min à 10 000 rpm et 10 min à 14 000 rpm à 4°C. Pour l'immunoprécipitation, 800  $\mu$ l de surnageant protéique ont été ajoutés à 50  $\mu$ l de billes magnétiques préparées (Dynabeads® Pan Mouse IgG) et 150  $\mu$ l de NP40+Pi. La réaction a été incubée pendant deux heures sur une roue à 4°C. Les billes utilisées (50  $\mu$ l de billes/IP) ont été préparées en les lavant trois fois avec 1 ml de PBS et une fois avec 1 ml de NP40+Pi. Après l'incubation de deux heures, les billes ont été lavées avec 3x 1 ml de IPP150 (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40) et finalement resuspendues dans 1 ml de tampon kinase (20 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 mM  $\text{MnCl}_2$ , 1 mM DTT). Pour chaque souche, deux réactions kinase ont été réalisées (2x 500  $\mu$ l), la première avec du  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP et la seconde avec du  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP. Les billes sont finalement resuspendues dans 15  $\mu$ l de tampon kinase où la source radioactive d'ATP et le substrat GST-CTD (1,8  $\mu$ g) ont été ajoutés. La réaction est incubée pendant 10 min à 30°C et est arrêtée par l'ajout de 15  $\mu$ l de bleu de chargement (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 4%  $\beta$ -mercaptoethanol, 4% SDS, 0,01 % bleu de Bromophenol, 5% glycerol). La moitié de la réaction kinase est chargée sur un gel SDS-PAGE 10% et une autoradiographie est effectuée après 1h. Une coloration au bleu de Coomassie et un Western blot utilisant des anticorps anti-TAP ont ensuite été effectués sur le gel SDS-PAGE.

Les souches *cskl::cskl-TAP* et *cskl::cskl-as-TAP* expriment faiblement la protéine taguée. Pour obtenir un signal de phosphorylation correct, ce protocole a été adapté et au lieu de

travailler avec une culture cellulaire de 50 ml, nous sommes partis d'une culture de 1000 ml de cellules à densité de  $5,5 \times 10^6$  cellules/ml. La réaction kinase a été effectuée avec GST-Cdk2 K33R.

Dans le cas des cellules sauvages *S. pombe* surexprimant, à partir d'un plasmide, les constructions *HA-CAK1*, *HA-CAK1-as*, *HA-CAK1 S16V*, *HA-CAK1-as S16V*, *HA-csk1*, *HA-csk1-as*, *HA-csk1 K40G* et *HA-csk1-as K40G*, une culture de 100 ml de cellules en phase exponentielle de croissance a été utilisée. La préparation des protéines, l'immunoprécipitation et le test kinase sont similaires à ce qui a été présenté précédemment. Nous reviendrons ici sur les différences et adaptations du protocole. Les billes magnétiques ont été préparées de manière à les coater avec des anticorps dirigés contre le tag HA. 30  $\mu$ l de billes (Dynabeads® Pan Mouse IgG)/IP a été lavé 4x avec du PBS contenant 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de BSA (tampon PBS/BSA) et incubé dans 100  $\mu$ l de PBS/BSA avec les anticorps anti-HA (dilution 50x, HA.11 clone 16B12 ; Covance) et anti-HA (dilution 50x, F-7 ; Santa Cruz Biotechnology) à 30°C pendant 30 min sous agitation. Après trois lavages au PBS/BSA, les billes ont été une seconde fois incubées à 30°C pendant 10 min puis relavées avec du NP40+Pi et finalement resuspendues dans 100  $\mu$ l de NP40+Pi. Après l'immunoprécipitation de 2h à 4°C, les billes ont été rincées dans 6x 1 ml d'IPP150 puis 2x dans 1 ml de tampon kinase. Dans le cas de la réaction kinase *in vitro*, le GST-Cdk2 K33R a été ajouté et la réaction a été incubée avec le  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP ou le  $\gamma$ - $^{32}$ P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP pendant 20 min à 30°C. Aucun substrat n'a été ajouté dans le test *in vivo* et l'incubation avec le  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP ou le  $\gamma$ - $^{32}$ P-N<sup>6</sup>-(benzyl)-ATP a duré 30 min à 30°C.

Suivant un protocole similaire, la protéine Cdc2 a été immunoprécipitée à partir d'extraits de différentes souches de *S. pombe* traitées ou non avec l'inhibiteur 3-MB-PP1. Pour ce faire, des billes p13-Suc-1 ont été utilisées et l'activité kinase a été mesurée en ajoutant du  $\gamma$ - $^{32}$ P ATP (Perkinelmer) et 4  $\mu$ g d'histone H1 comme substrat.

## 9. Test de complémentation du mutant *civ1-4* chez *S. cerevisiae*

La souche de *S. cerevisiae* utilisée dans cette étude est *MAT $\alpha$  civ1-4 ura3 leu2 trp1 lys2 ade2 ade3* (Thuret et al., 1996). Elle contient un allèle thermosensible de *CAK1* (*civ1-4*), la protéine Cak1 étant essentielle chez *S. cerevisiae*, la souche *civ1-4* ne peut pas croître à la température restrictive de 36°C. Les plasmides p426-MET25, P426-MET25-*csk1*, P426-MET25-*csk1-as*, p426-MET25-*csk1 K40G*, p426-MET25-*csk1-as K40G*, p424-MET25, p424-MET25-*CAK1*, p424-MET25-*CAK1-as*, p424-MET25-*CAK1 S16V* et p424-MET25-*CAK1-as S16V* ont été individuellement transformés dans la souche *civ1-4* suivant le protocole de transformation utilisé pour la levure de fission *S. pombe*. Des dilutions 10 en 10 de ces souches sont effectuées sur des boîtes contenant le milieu adéquat et la croissance de ces souches à 25°C (température permissive) et 36°C (température restrictive) est suivie pendant 4 jours.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Bahler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R. (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **14**, 943-951.
- Bamps, S., Westerling, T., Pihlak, A., Tafforeau, L., Vandenhaute, J., Makela, T.P. and Hermand, D. (2004) Mcs2 and a novel CAK subunit Pmh1 associate with Skp1 in fission yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, **325**, 1424-1432.
- Bishop, A.C., Shah, K., Liu, Y., Witucki, L., Kung, C. and Shokat, K.M. (1998) Design of allele-specific inhibitors to probe protein kinase signaling. *Curr Biol*, **8**, 257-266.
- Booher, R.N., Alfa, C.E., Hyams, J.S. and Beach, D.H. (1989) The fission yeast *cdc2/cdc13/suc1* protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell*, **58**, 485-497.
- Breeding, C.S., Hudson, J., Balasubramanian, M.K., Hemmingsen, S.M., Young, P.G. and Gould, K.L. (1998) The *cdr2(+)* gene encodes a regulator of G2/M progression and cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, **9**, 3399-3415.
- Brickey, W.J. and Greenleaf, A.L. (1995) Functional studies of the carboxy-terminal repeat domain of *Drosophila* RNA polymerase II in vivo. *Genetics*, **140**, 599-613.
- Buck, V., Russell, P. and Millar, J.B. (1995) Identification of a cdk-activating kinase in fission yeast. *Embo J*, **14**, 6173-6183.
- Bueno, A. and Russell, P. (1993) Two fission yeast B-type cyclins, *cig2* and *Cdc13*, have different functions in mitosis. *Mol Cell Biol*, **13**, 2286-2297.
- Chun, K.T. and Goebel, M.G. (1997) Mutational analysis of *Cak1p*, an essential protein kinase that regulates cell cycle progression. *Mol Gen Genet*, **256**, 365-375.
- Cismowski, M.J., Laff, G.M., Solomon, M.J. and Reed, S.I. (1995) KIN28 encodes a C-terminal domain kinase that controls mRNA transcription in *Saccharomyces cerevisiae* but lacks cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) activity. *Mol Cell Biol*, **15**, 2983-2992.
- Connolly, T. and Beach, D. (1994) Interaction between the *Cig1* and *Cig2* B-type cyclins in the fission yeast cell cycle. *Mol Cell Biol*, **14**, 768-776.
- Cottarel, G. (1997) *Mcs4*, a two-component system response regulator homologue, regulates the *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle control. *Genetics*, **147**, 1043-1051.
- Dahmus, M.E. (1996) Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **271**, 19009-19012.
- Damagnez, V., Makela, T.P. and Cottarel, G. (1995) *Schizosaccharomyces pombe* *Mop1-Mcs2* is related to mammalian CAK. *Embo J*, **14**, 6164-6172.

- De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O. and Kim, S.H. (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, **363**, 595-602.
- Dephoure, N., Howson, R.W., Blethrow, J.D., Shokat, K.M. and O'Shea, E.K. (2005) Combining chemical genetics and proteomics to identify protein kinase substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 17940-17945.
- Devault, A., Martinez, A.M., Fesquet, D., Labbe, J.C., Morin, N., Tassan, J.P., Nigg, E.A., Cavadore, J.C. and Doree, M. (1995) MAT1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and Xenopus CAK. *Embo J*, **14**, 5027-5036.
- Dischinger, S., Krapp, A., Xie, L., Paulson, J.R. and Simanis, V. (2008) Chemical genetic analysis of the regulatory role of Cdc2p in the *S. pombe* septation initiation network. *J Cell Sci*, **121**, 843-853.
- Eblen, S.T., Kumar, N.V., Shah, K., Henderson, M.J., Watts, C.K., Shokat, K.M. and Weber, M.J. (2003) Identification of novel ERK2 substrates through use of an engineered kinase and ATP analogs. *J Biol Chem*, **278**, 14926-14935.
- Enke, D.A., Kaldis, P., Holmes, J.K. and Solomon, M.J. (1999) The CDK-activating kinase (Cak1p) from budding yeast has an unusual ATP-binding pocket. *J Biol Chem*, **274**, 1949-1956.
- Espinoza, F.H., Farrell, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Morgan, D.O. (1996) A cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK. *Science*, **273**, 1714-1717.
- Espinoza, F.H., Farrell, A., Nourse, J.L., Chamberlin, H.M., Gileadi, O. and Morgan, D.O. (1998) Cak1 is required for Kin28 phosphorylation and activation in vivo. *Mol Cell Biol*, **18**, 6365-6373.
- Feaver, W.J., Svejstrup, J.Q., Henry, N.L. and Kornberg, R.D. (1994) Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIF/TFIIK. *Cell*, **79**, 1103-1109.
- Fesquet, D., Labbe, J.C., Derancourt, J., Capony, J.P., Galas, S., Girard, F., Lorca, T., Shuttleworth, J., Doree, M. and Cavadore, J.C. (1993) The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *Embo J*, **12**, 3111-3121.
- Fesquet, D., Morin, N., Doree, M. and Devault, A. (1997) Is Cdk7/cyclin H/MAT1 the genuine cdk activating kinase in cycling Xenopus egg extracts? *Oncogene*, **15**, 1303-1307.
- Fischer, L., Gerard, M., Chalut, C., Lutz, Y., Humbert, S., Kanno, M., Chambon, P. and Egly, J.M. (1992) Cloning of the 62-kilodalton component of basic transcription factor BTF2. *Science*, **257**, 1392-1395.

- Fisher, D.L. and Nurse, P. (1996) A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *Embo J*, **15**, 850-860.
- Fisher, R.P., Jin, P., Chamberlin, H.M. and Morgan, D.O. (1995) Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase. *Cell*, **83**, 47-57.
- Fisher, R.P. and Morgan, D.O. (1994) A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*, **78**, 713-724.
- Fleig, U.N. and Gould, K.L. (1991) Regulation of cdc2 activity in *Schizosaccharomyces pombe*: the role of phosphorylation. *Semin Cell Biol*, **2**, 195-204.
- Forsburg, S.L. and Nurse, P. (1994) Analysis of the *Schizosaccharomyces pombe* cyclin puc1: evidence for a role in cell cycle exit. *J Cell Sci*, **107** ( Pt 3), 601-613.
- Giglia-Mari, G., Coin, F., Ranish, J.A., Hoogstraten, D., Theil, A., Wijgers, N., Jaspers, N.G., Raams, A., Argentini, M., van der Spek, P.J., Botta, E., Stefanini, M., Egly, J.M., Aebersold, R., Hoeijmakers, J.H. and Vermeulen, W. (2004) A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat Genet*, **36**, 714-719.
- Giglia-Mari, G., Miquel, C., Theil, A.F., Mari, P.O., Hoogstraten, D., Ng, J.M., Dinant, C., Hoeijmakers, J.H. and Vermeulen, W. (2006) Dynamic interaction of TTDA with TFIIH is stabilized by nucleotide excision repair in living cells. *PLoS Biol*, **4**, e156.
- Gordon, C.B. and Fantes, P.A. (1986) The cdc22 gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a cell cycle-regulated transcript. *Embo J*, **5**, 2981-2985.
- Gregan, J., Zhang, C., Rumpf, C., Cipak, L., Li, Z., Uluocak, P., Nasmyth, K. and Shokat, K.M. (2007) Construction of conditional analog-sensitive kinase alleles in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Protoc*, **2**, 2996-3000.
- Guiguen, A., Soutourina, J., Dewez, M., Tafforeau, L., Dieu, M., Raes, M., Vandenhoute, J., Werner, M. and Hermand, D. (2007) Recruitment of P-TEFb (Cdk9-Pch1) to chromatin by the cap-methyl transferase Pcm1 in fission yeast. *Embo J*, **26**, 1552-1559.
- Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Burlingame, A.L., Shokat, K.M. and Ronai, Z. (2001) Identification of new JNK substrate using ATP pocket mutant JNK and a corresponding ATP analogue. *J Biol Chem*, **276**, 18090-18095.
- Hanke, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changelian, P.S., Brissette, W.H., Weringer, E.J., Pollok, B.A. and Connelly, P.A. (1996) Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem*, **271**, 695-701.
- Hanks, S.K. and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J*, **9**, 576-596.

- Hannon, G.J., Casso, D. and Beach, D. (1994) KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1731-1735.
- Hermant, D., Pihlak, A., Westerling, T., Damagnez, V., Vandenhaute, J., Cottarel, G. and Makela, T.P. (1998) Fission yeast Csk1 is a CAK-activating kinase (CAKAK). *Embo J*, **17**, 7230-7238.
- Hermant, D., Westerling, T., Pihlak, A., Thuret, J.Y., Vallenius, T., Tiainen, M., Vandenhaute, J., Cottarel, G., Mann, C. and Makela, T.P. (2001) Specificity of Cdk activation in vivo by the two Caks Mcs6 and Csk1 in fission yeast. *Embo J*, **20**, 82-90.
- Hofmann, J.F. and Beach, D. (1994) cdt1 is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis. *Embo J*, **13**, 425-434.
- Humbert, S., van Vuuren, H., Lutz, Y., Hoeijmakers, J.H., Egly, J.M. and Moncollin, V. (1994) p44 and p34 subunits of the BTF2/TFIIH transcription factor have homologies with SSL1, a yeast protein involved in DNA repair. *Embo J*, **13**, 2393-2398.
- Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J. and Pavletich, N.P. (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*, **376**, 313-320.
- Kaldis, P. (1999) The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 284-296.
- Kaldis, P., Pitluk, Z.W., Bany, I.A., Enke, D.A., Wagner, M., Winter, E. and Solomon, M.J. (1998) Localization and regulation of the cdk-activating kinase (Cak1p) from budding yeast. *J Cell Sci*, **111** ( Pt 24), 3585-3596. (A)
- Kaldis, P., Russo, A.A., Chou, H.S., Pavletich, N.P. and Solomon, M.J. (1998) Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities. *Mol Biol Cell*, **9**, 2545-2560. (B)
- Kaldis, P. and Solomon, M.J. (2000) Analysis of CAK activities from human cells. *Eur J Biochem*, **267**, 4213-4221.
- Kaldis, P., Sutton, A. and Solomon, M.J. (1996) The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell*, **86**, 553-564.
- Kanoh, J. and Russell, P. (1998) The protein kinase Cdr2, related to Nim1/Cdr1 mitotic inducer, regulates the onset of mitosis in fission yeast. *Mol Biol Cell*, **9**, 3321-3334.
- Kelly, T.J., Martin, G.S., Forsburg, S.L., Stephen, R.J., Russo, A. and Nurse, P. (1993) The fission yeast cdc18+ gene product couples S phase to START and mitosis. *Cell*, **74**, 371-382.
- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J.P., Gannon, J. and Hunt, T. (1992) Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdc2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell*, **3**, 1279-1294.

- Komarnitsky, P., Cho, E.J. and Buratowski, S. (2000) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev*, **14**, 2452-2460.
- Krisak, L., Strich, R., Winters, R.S., Hall, J.P., Mallory, M.J., Kreitzer, D., Tuan, R.S. and Winter, E. (1994) SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **8**, 2151-2161.
- Larochelle, S., Batliner, J., Gamble, M.J., Barboza, N.M., Kraybill, B.C., Blethrow, J.D., Shokat, K.M. and Fisher, R.P. (2006) Dichotomous but stringent substrate selection by the dual-function Cdk7 complex revealed by chemical genetics. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 55-62.
- Larochelle, S., Merrick, K.A., Terret, M.E., Wohlbold, L., Barboza, N.M., Zhang, C., Shokat, K.M., Jallepalli, P.V. and Fisher, R.P. (2007) Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells. *Mol Cell*, **25**, 839-850.
- Larochelle, S., Pandur, J., Fisher, R.P., Salz, H.K. and Suter, B. (1998) Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity. *Genes Dev*, **12**, 370-381.
- Lee, K.M., Saiz, J.E., Barton, W.A. and Fisher, R.P. (1999) Cdc2 activation in fission yeast depends on Mcs6 and Csk1, two partially redundant Cdk-activating kinases (CAKs). *Curr Biol*, **9**, 441-444.
- Lee, M.G. and Nurse, P. (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, **327**, 31-35.
- Liu, J. and Kipreos, E.T. (2000) Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. *Mol Biol Evol*, **17**, 1061-1074.
- Liu, Y., Shah, K., Yang, F., Witucki, L. and Shokat, K.M. (1998) A molecular gate which controls unnatural ATP analogue recognition by the tyrosine kinase v-Src. *Bioorg Med Chem*, **6**, 1219-1226.
- Lowndes, N.F., Johnson, A.L., Breeden, L. and Johnston, L.H. (1992) SWI6 protein is required for transcription of the periodically expressed DNA synthesis genes in budding yeast. *Nature*, **357**, 505-508.
- Makela, T.P., Tassan, J.P., Nigg, E.A., Frutiger, S., Hughes, G.J. and Weinberg, R.A. (1994) A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature*, **371**, 254-257.
- Marinoni, J.C., Roy, R., Vermeulen, W., Miniou, P., Lutz, Y., Weeda, G., Seroz, T., Gomez, D.M., Hoeijmakers, J.H. and Egly, J.M. (1997) Cloning and characterization of p52, the fifth subunit of the core of the transcription/DNA repair factor TFIIH. *Embo J*, **16**, 1093-1102.
- Martin-Castellanos, C., Labib, K. and Moreno, S. (1996) B-type cyclins regulate G1 progression in fission yeast in opposition to the p25<sup>rum1</sup> cdk inhibitor. *Embo J*, **15**,

839-849.

- Matsuo, Y., Asakawa, K., Toda, T. and Katayama, S. (2006) A rapid method for protein extraction from fission yeast. *Biosci Biotechnol Biochem*, **70**, 1992-1994.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M. and Bentley, D.L. (1997) The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature*, **385**, 357-361.
- 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**, 2909-2917.
- Molz, L. and Beach, D. (1993) Characterization of the fission yeast mcs2 cyclin and its associated protein kinase activity. *Embo J*, **12**, 1723-1732.
- Molz, L., Booher, R., Young, P. and Beach, D. (1989) cdc2 and the regulation of mitosis: six interacting mcs genes. *Genetics*, **122**, 773-782.
- Mondesert, O., McGowan, C.H. and Russell, P. (1996) Cig2, a B-type cyclin, promotes the onset of S in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **16**, 1527-1533.
- Moreno, S., Hayles, J. and Nurse, P. (1989) Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis. *Cell*, **58**, 361-372.
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol*, **194**, 795-823.
- Morgan, D.O. (1996) The dynamics of cyclin dependent kinase structure. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 767-772.
- Morgan, D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 261-291.
- Morgan, D.O. and De Bondt, H.L. (1994) Protein kinase regulation: insights from crystal structure analysis. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 239-246.
- Moser, B.A. and Russell, P. (2000) Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 631-636.
- Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5767-5768.
- Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1989) Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science*, **246**, 614-621.
- Nigg, E.A. (1996) Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 312-317.
- Nurse, P. (1975) Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*, **256**, 547-551.
- Nurse, P. (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, **344**, 503-508.

- Nurse, P., Thuriaux, P. and Nasmyth, K. (1976) Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet*, **146**, 167-178.
- Palancade, B. and Bensaude, O. (2003) Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur J Biochem*, **270**, 3859-3870.
- Parker, L.L., Walter, S.A., Young, P.G. and Piwnica-Worms, H. (1993) Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Wee1 by the nim1/cdr1 kinase. *Nature*, **363**, 736-738.
- Pei, Y., Du, H., Singer, J., Stamour, C., Granitto, S., Shuman, S. and Fisher, R.P. (2006) Cyclin-dependent kinase 9 (Cdk9) of fission yeast is activated by the CDK-activating kinase Csk1, overlaps functionally with the TFIIH-associated kinase Mcs6, and associates with the mRNA cap methyltransferase Pcm1 in vivo. *Mol Cell Biol*, **26**, 777-788.
- Poon, R.Y., Yamashita, K., Adamczewski, J.P., Hunt, T. and Shuttleworth, J. (1993) The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *Embo J*, **12**, 3123-3132.
- Proudfoot, N.J., Furger, A. and Dye, M.J. (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, **108**, 501-512.
- Ranish, J.A., Hahn, S., Lu, Y., Yi, E.C., Li, X.J., Eng, J. and Aebersold, R. (2004) Identification of TFB5, a new component of general transcription and DNA repair factor IIH. *Nat Genet*, **36**, 707-713.
- Reardon, J.T. and Sancar, A. (2004) Thermodynamic cooperativity and kinetic proofreading in DNA damage recognition and repair. *Cell Cycle*, **3**, 141-144.
- Ross, K.E., Kaldis, P. and Solomon, M.J. (2000) Activating phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclin-dependent kinase, cdc28p, precedes cyclin binding. *Mol Biol Cell*, **11**, 1597-1609.
- Roy, R., Adamczewski, J.P., Seroz, T., Vermeulen, W., Tassan, J.P., Schaeffer, L., Nigg, E.A., Hoeijmakers, J.H. and Egly, J.M. (1994) The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell*, **79**, 1093-1101.
- Russell, P. and Nurse, P. (1986) cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*, **45**, 145-153.
- Russell, P. and Nurse, P. (1987) Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*, **49**, 559-567.
- Saiz, J.E. and Fisher, R.P. (2002) A CDK-activating kinase network is required in cell cycle control and transcription in fission yeast. *Curr Biol*, **12**, 1100-1105.
- Schaber, M., Lindgren, A., Schindler, K., Bungard, D., Kaldis, P. and Winter, E. (2002) CAK1 promotes meiosis and spore formation in *Saccharomyces cerevisiae* in a CDC28-independent fashion. *Mol Cell Biol*, **22**, 57-68.

- Schaeffer, L., Moncollin, V., Roy, R., Staub, A., Mezzina, M., Sarasin, A., Weeda, G., Hoeijmakers, J.H. and Egly, J.M. (1994) The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *Embo J*, **13**, 2388-2392.
- Serizawa, H., Makela, T.P., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Weinberg, R.A. and Young, R.A. (1995) Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIIH. *Nature*, **374**, 280-282.
- Shieh, J.C., Wilkinson, M.G., Buck, V., Morgan, B.A., Makino, K. and Millar, J.B. (1997) The Msc4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes Dev*, **11**, 1008-1022.
- Shiekhatar, R., Mermelstein, F., Fisher, R.P., Drapkin, R., Dynlacht, B., Wessling, H.C., Morgan, D.O. and Reinberg, D. (1995) Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIIH. *Nature*, **374**, 283-287.
- Shiozaki, K., Shiozaki, M. and Russell, P. (1997) Msc4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 kinase cascade. *Mol Biol Cell*, **8**, 409-419.
- Shuttleworth, J., Godfrey, R. and Colman, A. (1990) p40MO15, a cdc2-related protein kinase involved in negative regulation of meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Embo J*, **9**, 3233-3240.
- Solomon, M.J., Lee, T. and Kirschner, M.W. (1992) Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell*, **3**, 13-27.
- Stern, B. and Nurse, P. (1996) A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet*, **12**, 345-350.
- Stiller, J.W. and Hall, B.D. (2002) Evolution of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6091-6096.
- Sutton, A. and Freiman, R. (1997) The Cak1p protein kinase is required at G1/S and G2/M in the budding yeast cell cycle. *Genetics*, **147**, 57-71.
- Takagi, Y., Masuda, C.A., Chang, W.H., Komori, H., Wang, D., Hunter, T., Joazeiro, C.A. and Kornberg, R.D. (2005) Ubiquitin ligase activity of TFIIH and the transcriptional response to DNA damage. *Mol Cell*, **18**, 237-243.
- Tassan, J.P., Jaquenoud, M., Fry, A.M., Frutiger, S., Hughes, G.J. and Nigg, E.A. (1995) In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. *Embo J*, **14**, 5608-5617.
- Tassan, J.P., Schultz, S.J., Bartek, J. and Nigg, E.A. (1994) Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J Cell Biol*, **127**, 467-478.
- Thomas, M.C. and Chiang, C.M. (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **41**, 105-178.

- Thuret, J.Y., Valay, J.G., Faye, G. and Mann, C. (1996) Cdc15 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase. *Cell*, **86**, 565-576.
- Tournier, S. and Millar, J.B. (2000) A role for the START gene-specific transcription factor complex in the inactivation of cyclin B and Cdc2 destruction. *Mol Biol Cell*, **11**, 3411-3424.
- Tsakraklides, V. and Solomon, M.J. (2002) Comparison of Cdk1-like cyclin-dependent kinase-activating kinases. *J Biol Chem*, **277**, 33482-33489.
- Valay, J.G., Simon, M., Dubois, M.F., Bensaude, O., Facca, C. and Faye, G. (1995) The KIN28 gene is required both for RNA polymerase II mediated transcription and phosphorylation of the Rpb1p CTD. *J Mol Biol*, **249**, 535-544.
- Van Driessche, B., Tafforeau, L., Hentges, P., Carr, A.M. and Vandenhaute, J. (2005) Additional vectors for PCR-based gene tagging in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* using nourseothricin resistance. *Yeast*, **22**, 1061-1068.
- Viladevall, L., St Amour, C.V., Rosebrock, A., Schneider, S., Zhang, C., Allen, J.J., Shokat, K.M., Schwer, B., Leatherwood, J.K. and Fisher, R.P. (2009) TFIIH and P-TEFb coordinate transcription with capping enzyme recruitment at specific genes in fission yeast. *Mol Cell*, **33**, 738-751.
- Wagner, M., Pierce, M. and Winter, E. (1997) The CDK-activating kinase CAK1 can dosage suppress sporulation defects of *smk1* MAP kinase mutants and is required for spore wall morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **16**, 1305-1317.
- Wallenfang, M.R. and Seydoux, G. (2002) *cdk-7* is required for mRNA transcription and cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5527-5532.
- Wittenberg, C. and Reed, S.I. (1988) Control of the yeast cell cycle is associated with assembly/disassembly of the Cdc28 protein kinase complex. *Cell*, **54**, 1061-1072.
- Wu, L. and Russell, P. (1993) Nim1 kinase promotes mitosis by inactivating Wee1 tyrosine kinase. *Nature*, **363**, 738-741.
- Xu, H.P., Wang, Y., Riggs, M., Rodgers, L. and Wigler, M. (1990) Biological activity of the mammalian RAP genes in yeast. *Cell Regul*, **1**, 763-769.
- Zhang, C., Kenski, D.M., Paulson, J.L., Bonshtien, A., Sessa, G., Cross, J.V., Templeton, D.J. and Shokat, K.M. (2005) A second-site suppressor strategy for chemical genetic analysis of diverse protein kinases. *Nat Methods*, **2**, 435-441.
- Zhou, M., Halanski, M.A., Radonovich, M.F., Kashanchi, F., Peng, J., Price, D.H. and Brady, J.N. (2000) Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol Cell Biol*, **20**, 5077-5086.

## **ANNEXE : ETUDE DE Spp40**

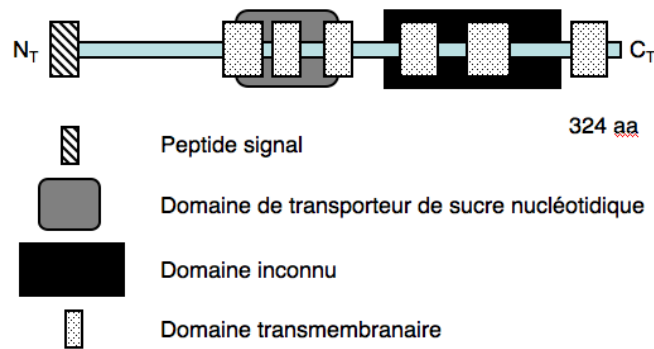
**ETUDE PAR UNE APPROCHE GENETIQUE ET BIOCHIMIQUE  
D'UNE PROTEINE DE MEMBRANE LYSOSOMALE CHEZ  
L'ORGANISME MODELE *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE***

## **I. Introduction du sujet**

Le lysosome est un organite contenant un grand nombre d'enzymes hydrolytiques qui digèrent les protéines, les polysaccharides, les lipides et les acides nucléiques. Il met la cellule à l'abri des dommages que causeraient ces hydrolases si elles circulaient librement dans le cytosol. Très peu de protéines lysosomales membranaires ont été caractérisées à l'exception des protéines comme les LAMPS et les LIMPS (Eskelinen et *al.*, 2003). Elles interviennent dans des mécanismes comme la reconnaissance et la fusion de lysosomes ou encore dans le transport macromoléculaire. Une déficience en un transporteur membranaire de lysosome peut aboutir à des surcharges lysosomales ayant des conséquences souvent graves (Town et *al.*, 1998 ; Verheijen et *al.*, 1999). Il reste un bon nombre de protéines lysosomales transmembranaires à caractériser et l'étude de leurs fonctions devrait permettre de mieux comprendre la biologie complexe du lysosome.

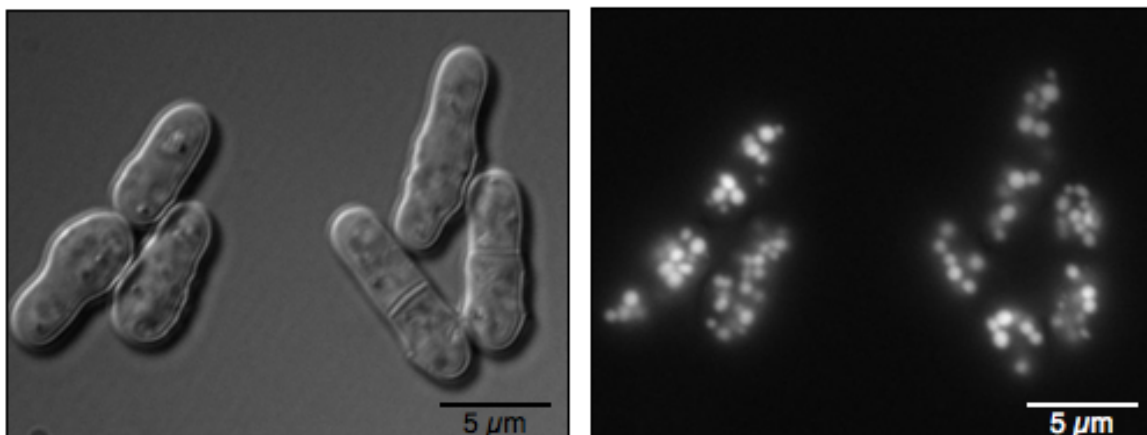
Des analyses protéomiques de membranes de lysosomes de rat, effectuées par Marielle Boonen (FUNDP-URPHYM, laboratoire de chimie physiologique du Professeur Michel Jadot), ont permis d'identifier par spectroscopie de masse une protéine conservée chez tous les eucaryotes (sauf la levure *Saccharomyces cerevisiae*), de fonction inconnue, et d'un poids moléculaire théorique de 40,1 kDa (baptisée p40). Des analyses *in silico* et de localisation cellulaire sur des cellules HeLa transfectées permettent de postuler que p40 est une protéine lysosomale localisée dans la membrane. Cette donnée est confirmée par le fait que p40 possède un profil de distribution similaire à celui des protéines lysosomales dans différentes expériences de fractionnement subcellulaire de foie de souris (centrifugations différentielles et isopycniques). Finalement, un motif di-leucine impliqué dans l'adressage aux lysosomes a été mis en évidence par des mutations ponctuelles dans la queue C-terminale de p40 (Boonen et *al.*, 2006).

La conservation de p40 permet d'utiliser une palette d'organismes modèles pour élucider sa fonction. L'inactivation du gène chez la souris est en cours dans le laboratoire partenaire (FUNDP-URPHYM, laboratoire de chimie physiologique du Professeur Michel Jadot) et le but du projet original était d'utiliser un organisme modèle moins complexe comme la levure de fission *Schizosaccharomyces pombe* combinant la simplicité d'utilisation et la puissance de l'approche génétique. La **figure A** montre la prédiction des domaines de la protéine Spp40.



**Figure A :** Prédiction des domaines de la protéine Spp40 chez *S. pombe*. Prédiction réalisée avec Pfam (Wellcome Trust Sanger Institute)

Les levures ne possèdent pas de lysosomes mais des vacuoles qui sont des organites fonctionnellement équivalents (Takegawa et *al.*, 2003). Les cellules *S. pombe* sauvages contiennent un nombre important de vacuoles de petite taille qui sont fragmentées et distribuées de manière aléatoire dans la cellule (**figure B**). Ces organites acides possèdent un pH interne maintenu aux environs de 6,2 par une pompe ATPase de type vacuolaire. Elles sont aussi utilisées comme réservoir pour les acides aminés, les petits ions et jouent un rôle essentiel dans l'osmorégulation et l'homéostasie ionique des cellules.



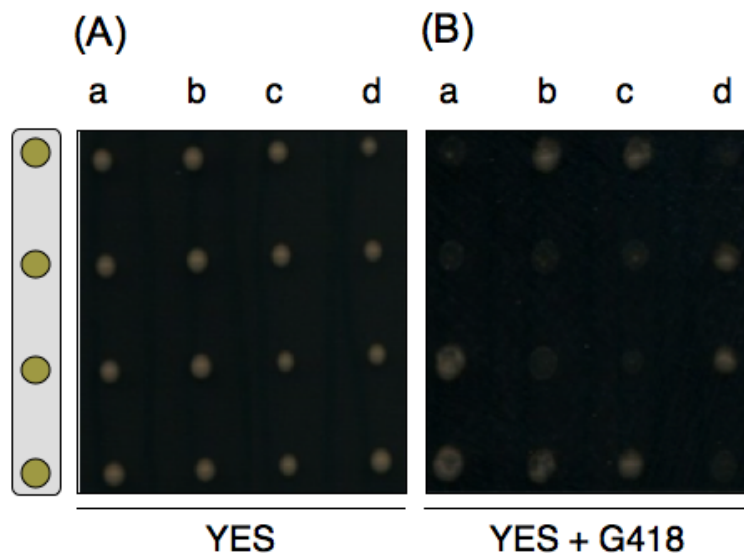
**Figure B :** Marquage des vacuoles de *S. pombe* à l'aide de la molécule fluorescente CDCFDA (Invitrogen)

## **II. Résultats du projet**

### **1. Caractérisation de Spp40**

#### **1.1 Le gène codant Spp40 chez *S. pombe* n'est pas essentiel**

Pour déterminer si le gène *Spp40* est essentiel chez *S. pombe*, la stratégie utilisée consiste à transformer une souche diploïde de *S. pombe* avec une cassette de délétion contenant le gène de résistance à la généticine bordé de zones d'homologie permettant un événement de recombinaison homologue au sein même du locus *Spp40*. Les colonies ayant subi l'événement de recombinaison homologue (possédant alors une copie délétée et une copie sauvage du gène) sont alors récupérées et la sporulation de ces diploïdes hétérozygotes est analysée. L'isolement, la dissection et la ségrégation des tétrades permettent de déterminer si la perte de *Spp40* provoque un phénotype létal chez la levure. Si seules deux des quatre spores haploïdes de l'asque sont capables de pousser sur milieu de croissance standard, le gène est considéré comme essentiel vu que les deux spores contenant la copie délétée sont incapables de former des colonies. Si par contre, comme c'est le cas dans notre étude, les quatre spores sont parfaitement viables et engendrent des colonies, le gène est considéré comme non essentiel (**figure C**). Le caractère non essentiel de *Spp40* a été démontré de la sorte.

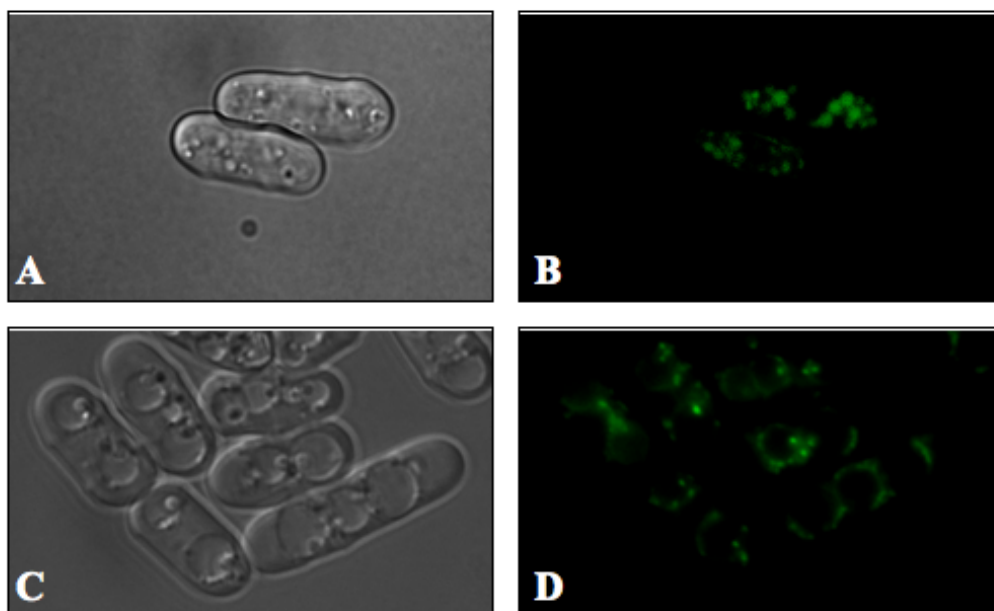


**Figure C :** La protéine Spp40 de *S. pombe* n'est pas essentielle. (A) Analyse de quatre tétrades (a à d) provenant de la sporulation de diploïdes hétérozygotes sur milieu complet (p40/p40::KanR) (B) Réplique des quatre tétrades sur milieu sélectif contenant de la généticine (G418) où seuls les délétants peuvent croître.

## 1.2 Localisation subcellulaire de Spp40-GFP

Les vacuoles des levures sont des organites fonctionnellement équivalents aux lysosomes des cellules animales (Takegawa et *al.*, 2003). Dans les cellules eucaryotiques supérieures, la protéine Spp40 possède une localisation lysosomale membranaire (Boonen et *al.*, 2006). Connaissant l'analogie fonctionnelle entre les lysosomes et les vacuoles, la localisation de la protéine chez *S. pombe* a été vérifiée en la fusionnant en C-terminal avec la protéine GFP (intégration génomique par recombinaison homologue). La protéine de fusion Spp40-GFP étant sous le contrôle du promoteur natif de Spp40, les niveaux transcriptionnels de la protéine de fusion sont donc du même ordre que ceux de la protéine native. L'observation au microscope à fluorescence confirme la localisation vacuolaire de la protéine de fusion (**Figure D**).

Les cellules *S. pombe* sauvages contiennent un nombre important de vacuoles de petite taille fragmentées et distribuées de manière aléatoire dans la cellule. Cette morphologie vacuolaire peut rapidement être modifiée si les cellules sont soumises à divers stress. Les resuspendre, par exemple, dans un milieu hypotonique (comme de l'eau) cause la fusion rapide de ces petites vacuoles en deux ou trois vacuoles de grande taille. Cette caractéristique a été exploitée pour mettre en évidence la localisation de la protéine de fusion Spp40-GFP dans les membranes des vacuoles.



**Figure D :** Localisation subcellulaire de Spp40-GFP chez *S. pombe*. (A) et (B) Observation de la fluorescence de la protéine de fusion Spp40-GFP en milieu de culture standard. (C) et (D) Observation de la fluorescence de la protéine de fusion Spp40-GFP dans un milieu hypotonique tel que l'eau.

### 1.3 Phénotypage du délétant de la protéine Spp40

La recherche d'un phénotype caractéristique du délétant *Spp40* a été entreprise. La croissance comparée entre la souche sauvage et la souche délétante a été étudiée après une incubation à trois niveaux de température différents (25, 32 et 36°C) et une série de milieux contenant des concentrations ioniques variables (100 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 5 mM ZnCl<sub>2</sub>, 300 mM MgCl<sub>2</sub>...). Ces conditions, couramment utilisées dans la littérature (Iwaki et al., 2003), n'ont pas permis de mettre en évidence des différences de croissance entre la souche sauvage et délétée.

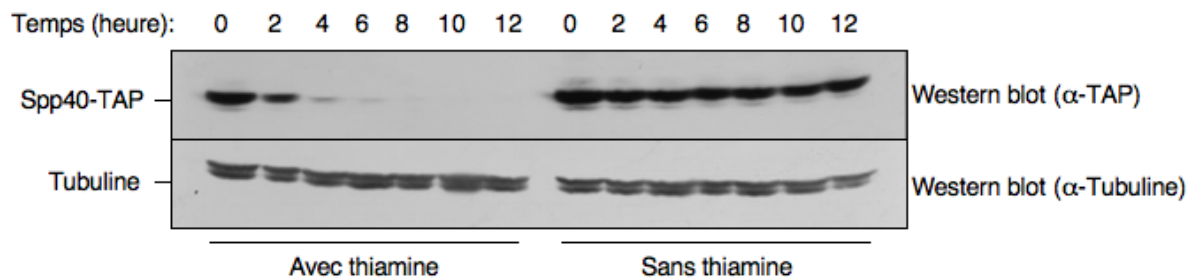
## 2. Recherche de partenaires via crible co-létalité

La souche de *S. pombe* pour laquelle *Spp40* a été délété ne présentant pas de phénotype facilement identifiable, une autre stratégie a été utilisée pour définir la fonction de Spp40, elle est basée sur la recherche de ses partenaires génétiques.

Pour trouver des protéines partenaires ou redondantes de Spp40 un crible synthétique co-létal a été entrepris. On sait que Spp40 n'est pas essentiel, l'idée est de découvrir certaines de ses protéines partenaires (physiques, ou plus généralement appartenant à la même voie métabolique) qui, mutées en même temps qu'elle, induisent un phénotype létal pour la levure. On parle donc de co-létalité. Pour mettre en place un tel crible, nous avons utilisé une stratégie inspirée par le travail de Berry et al., 1999.

Pour effectuer une mutagenèse aléatoire, une drogue a été choisie. Après diverses mises au point pour déterminer le type de drogue, son temps d'incubation ou sa concentration, l'EMS (Ethyl MethaneSulfonate) a été retenu pour sa grande reproductibilité (taux de survie maintenu aux environs de 50%).

Muter aléatoirement une souche où le gène *Spp40* est délété pour rechercher des partenaires co-létaux pose un problème évident de criblage : l'incapacité de voir pousser et donc de sélectionner des cellules présentant la co-létalité. Une alternative consiste à mettre le gène *Spp40* sous le contrôle d'un promoteur dont on contrôle l'activité. Le promoteur natif de *Spp40* est remplacé au locus par le promoteur régulable *nmt81* fortement réprimé en présence de la vitamine thiamine (**figure E**). Après mutagenèse, ces cellules sont étalées sur des boîtes ne contenant pas de thiamine (expression de Spp40) puis répliquées sur des boîtes supplémentées de thiamine (expression de Spp40 inhibée). Les clones poussant sur milieu sans thiamine mais qui sont incapables de croître en présence de thiamine sont considérés comme co-létaux.



**Figure E.** Inhibition dépendante de la thiamine de l'expression de la protéine Spp40. Des extraits protéiques globaux de *S. pombe* exprimant l'allèle intégratif *nmt81-Spp40-TAP* ont été séparés sur un gel SDS-PAGE et une analyse Western blot en utilisant des anticorps contre le tag TAP a été effectuée. Des extraits protéiques ont été récoltés pendant 12 h après l'ajout de la thiamine (t=0 h).

Le crible est rendu plus aisé par l'utilisation d'un colorant vital, la Phloxine B, pour visualiser plus facilement la mortalité cellulaire. La Phloxine B pénètre dans toutes les cellules mais est activement excrétée par les cellules vivantes. Dans le cas de cellules mortes, le colorant (couleur rose) s'y accumule les rendant facilement identifiable.

33 000 cellules ont été mutagénisées à l'EMS et étalées sur des boîtes sans thiamine. Après réplique de ces boîtes sur un milieu contenant de la thiamine et de la Phloxine B, 360 clones possédaient une coloration rosée. Pour déterminer si la mort cellulaire est dépendante de l'inhibition transcriptionnelle de *Spp40* (milieu avec thiamine) ces clones ont été répliqués, en parallèle, sur un milieu avec/sans thiamine. Seulement 11 clones présentent le phénotype blanc sans thiamine/rose avec thiamine.

Pour contrôler le génotype des mutants identifiés et s'assurer que leur phénotype ne résulte pas d'une mutation supplémentaire, ils ont été croisés à deux reprises avec une souche non mutée. Après dissection, la ségrégation mendélienne des allèles a été vérifiée. Cette étape de « nettoyage génotypique », a réduit les candidats potentiels de 11 à 3.

L'étape suivante consiste à identifier le gène muté dans chacun des trois mutants en le compléquant avec de l'ADN génomique. Concrètement, les mutants ont été transformés avec une banque génomique de *S. pombe* de sorte que si le plasmide transformé contient le gène compléquant la mutation, la co-létalité est perdue et la levure devient blanche même en présence de thiamine.

Les premiers résultats de cette transformation ont permis d'isoler une dizaine de clones compléquant le phénotype de co-létalité. Le séquençage de ces inserts a montré des résultats assez étranges dans la mesure où uniquement des séquences d'ADN mitochondrial de *S. pombe* ont pu être identifiées. Ces séquences dispersées un peu partout dans les 19430 pb du génome mitochondrial ne présentent aucun recouvrement conservé entre elles laissant penser que cette donnée est un artefact. Il est à noter que la transformation des trois candidats avec l'ADN génomique était non saturante, en effet seulement 4300 clones ont été criblés

alors que le génome de *S. pombe* contient un peu plus de 5000 gènes codants pour des protéines. D'ailleurs le sauvetage par le gène *Spp40* exprimé sur l'un des plasmides de la banque d'ADN génomique n'a jamais pu être mis en évidence. Malgré diverses tentatives de mise au point, la saturation n'a pas pu être augmentée. Comme contrôle du système nous avons décidé d'exprimer chez ces trois candidats un plasmide contenant p40. En présence de thiamine, les mutants candidats ne doivent donc plus montrer de co-létalité vu qu'une copie plasmidique de *Spp40* vient compléter le gène *Spp40* génomique donc l'expression est inhibée. Un des trois mutants présentait effectivement une différence de viabilité entre la condition avec/sans expression de *Spp40* plasmidique mais cette différence était relativement faible dans le sens où elle se marquait sous forme d'un léger retard de croissance à 36°C (visible en réalisant des gouttes de dilution 10 en 10 des deux souches). Dans le contrôle positif, la différence entre la condition de co-létalité et la condition de sauvetage est donc faible. Il semble donc illusoire de vouloir mettre en évidence une perte de co-létalité dans les conditions d'un crible avec l'ensemble de la banque d'ADN génomique. Cette stratégie a donc dû être abandonnée.

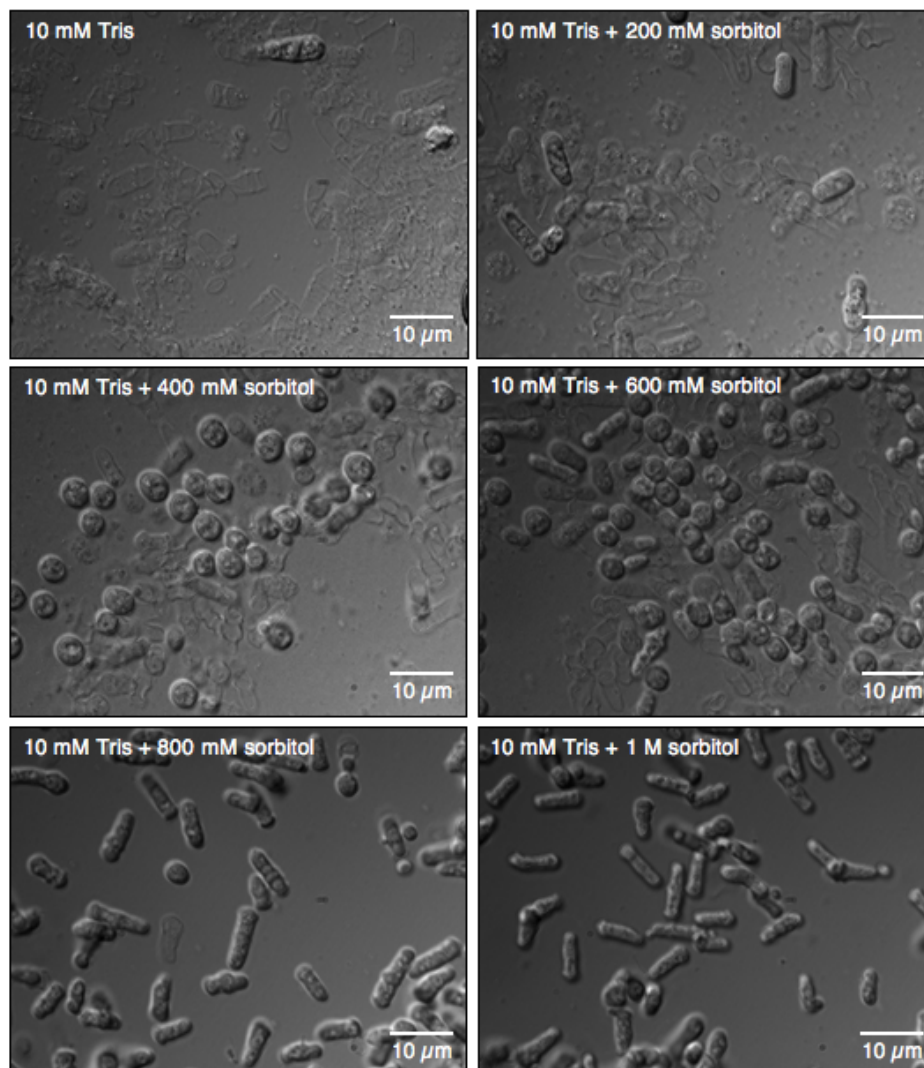
### **3. Etude comparative du métabolome vacuolaire d'une souche délétée pour *Spp40***

L'homologie de séquence et les études de localisation cellulaire indiquent que *Spp40* est probablement un transporteur vacuolaire. *S. pombe* constitue le seul organisme où un mutant de délétion du gène codant pour ce récepteur hypothétique peut être étudié. Nous avons donc tenté une étude métabolomique comparative du mutant. Pour se faire, il est nécessaire de pouvoir extraire et purifier des vacuoles intactes, cette pratique est assez courante chez la levure *S. cerevisiae*, mais très peu utilisée chez *S. pombe*. L'idée est d'étudier et de comparer le contenu métabolique d'une souche sauvage ou délétée pour *Spp40* et d'en déduire le ou les composés transportés par la protéine *Spp40*. L'analyse du "métabolome" vacuolaire pouvant se faire par la suite grâce à un spectromètre de masse.

La purification est une étape critique et demande de nombreuses étapes de mise au point. Le protocole utilisé dans la publication de Sarry et *al.*, 2007 concernant une purification vacuolaire chez *S. cerevisiae* a été adapté à *S. pombe*. Cette purification peut être résumée de la sorte : i) une étape de digestion et fragilisation de la paroi des levures; ii) une étape d'homogénéisation physique pour libérer les vacuoles; et iii) une étape de centrifugation pour isoler la fraction vacuolaire sur un gradient de Ficoll (un polymère de sucrose modifié).

La digestion consiste en une suppression par voie enzymatique de la paroi cellulaire. Les cellules de levure sans paroi sont très fragiles et sont appelées sphéropastes. Divers cocktails enzymatiques ont été testés et nous avons pu déterminer que la combinaison de deux enzymes (Zymolyase 100T et Novozyme 234) donnait une fragilisation optimale de la paroi.

Pour ce qui concerne la rupture de la membrane plasmique avec un minimum de dommage aux organites subcellulaires, l'utilisation d'une solution hypo-osmotique et une homogénéisation physique (tests et optimisations réalisées via un potter, un douncer, un cell cracker, billes de verre...) ont été nécessaires. Pour tester les conditions osmotiques idéales capables de détruire délicatement la paroi cellulaire sans altérer les vacuoles, nous avons placé des cellules de *S. pombe*, dont la paroi a été préalablement digérée par la Zymolyase et le Novozyme, dans des tampons de différentes concentrations osmotiques (**figure F**). Il est possible de remarquer qu'à une concentration de 400 mM en sorbitol, la pression osmotique (entrée massive d'eau dans la cellule) dans la cellule est telle que la paroi de *S. pombe* cède sans rompre la membrane plasmique de la cellule. Ces cellules perdent alors leur forme cylindrique caractéristique qui était imposée par la paroi. A plus faible concentration en sorbitol, la pression osmotique est telle que l'ensemble de la cellule éclate (organites inclus) tandis qu'à plus forte concentration, la pression est insuffisante pour détruire la paroi. La concentration de 400 mM en sorbitol a donc été choisie et l'homogénéisation physique à l'aide d'un potter a permis de libérer les vacuoles.



**Figure F :** Effet de la pression osmotique sur des cellules de *S. pombe* dont la paroi a été préalablement digérée.

Afin de connaître les influences de ces différentes techniques sur notre échantillon, un fractionnement cellulaire a été effectué. Après plusieurs centrifugations, l'activité d'une enzyme vacuolaire, la carboxypeptidase Y (CPY) a été mesurée dans les fractions suivantes : la fraction N (cellules non-homogénéisées, noyaux et autres débris cellulaires), la fraction MLP contenant normalement les vacuoles intactes et enfin la fraction S correspondant à tout ce qui reste dans le surnageant (protéines en suspension, ribosomes...). Trois cas de figure peuvent alors se présenter. Le cas idéal est de retrouver l'ensemble de l'activité CPY dans la fraction MLP. Si l'homogénéisation n'est pas suffisante, l'activité CPY se retrouve dans la fraction N et au contraire si elle est trop violente dans la fraction S. Les contrôles étant tous corrects, les différentes stratégies d'homogénéisation ont été testées. Au mieux, il nous a été possible de récupérer en moyenne 33% de l'activité CPY totale dans la fraction MLP (33% dans N ainsi que dans S).

Sous ces conditions, la fraction MLP a été déposée sur un gradient de Ficoll et une centrifugation à haute vitesse a été effectuée. Le gradient présente des concentrations de Ficoll allant de 15 à 0%. Il a ensuite été découpé et chacune des fractions a subi un test CPY afin de déterminer la position des vacuoles sur le gradient (chez *S. cerevisiae*, les vacuoles se positionnent dans les faibles pourcentages en Ficoll : entre 4 et 0%). Les analyses préliminaires de ce gradient ont bien montré une augmentation de l'activité CPY dans les fractions à faible concentration en Ficoll. Cependant, la somme des activités CPY de l'ensemble des fractions du gradient n'atteint à peine que 25% de l'activité CPY totale déposée au départ sur le gradient. Cette perte importante d'activité n'a pas pu être expliquée même après concertation avec notre équipe partenaire. Vu les pertes d'activité CPY durant l'homogénéisation et le gradient, on considère que le matériel vacuolaire récupéré après ces étapes est de mauvaise qualité et ne pourra en aucun cas être utilisé pour la suite des opérations.

En conséquence, et vu les échéances associées à ma thèse, une réunion de recherche a été organisée avec mon promoteur et notre équipe partenaire dirigée par le Professeur M. Jadot. Il a été décidé que les recherches actuelles sur *Spp40* n'apporteraient pas des résultats suffisamment concluants durant les douze derniers mois de ma thèse. Un changement de sujet a donc été effectué et ma thèse a dès lors été réorientée vers l'étude de l'activation des kinases dépendantes de cyclines.

### **III. Conclusion**

Ce travail a tenté de définir la fonction d'une des protéines de membranes lysosomales inconnues et identifiées chez le rat en utilisant son homologue de séquence chez la levure *S. pombe*. Ces protéines codant souvent pour des systèmes d'accrochage membranaire ou autres transporteurs sont particulièrement intéressantes étant donné que leur dysfonctionnement résulte généralement en des pathologies graves liées à des surcharges lysosomales. Si les programmes d'analyse de séquences semblent indiquer que Spp40 est un transporteur de sucres nucléotidiques, aucune preuve évidente n'a pu être apportée, que cela soit par notre équipe ou celle du laboratoire partenaire chez le Professeur M. Jadot. La fonction de cette protéine reste donc inconnue à ce jour.

Nous avons toutefois pu montrer que le gène *Spp40* n'est pas essentiel chez *S. pombe* et que la protéine est localisée en membrane vacuolaire chez la levure.

## **IV. Bibliographie**

- Berry, L.D., Feoktistova, A., Wright, M.D. and Gould, K.L. (1999) The schizosaccharomyces pombe dim1(+) gene interacts with the anaphase-promoting complex or cyclosome (APC/C) component lid1(+) and is required for APC/C function. *Mol Cell Biol*, **19**, 2535-2546.
- Boonen, M., Hamer, I., Boussac, M., Delsaute, A.F., Flamion, B., Garin, J. and Jadot, M. (2006) Intracellular localization of p40, a protein identified in a preparation of lysosomal membranes. *Biochem J*, **395**, 39-47.
- Eskelinen, E.L., Tanaka, Y. and Saftig, P. (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol*, **13**, 137-145.
- Iwaki, T., Osawa, F., Onishi, M., Koga, T., Fujita, Y., Hosomi, A., Tanaka, N., Fukui, Y. and Takegawa, K. (2003) Characterization of vps33+, a gene required for vacuolar biogenesis and protein sorting in Schizosaccharomyces pombe. *Yeast*, **20**, 845-855.
- Takegawa, K., Iwaki, T., Fujita, Y., Morita, T., Hosomi, A. and Tanaka, N. (2003) Vesicle-mediated protein transport pathways to the vacuole in Schizosaccharomyces pombe. *Cell Struct Funct*, **28**, 399-417.
- Town, M., Jean, G., Cherqui, S., Attard, M., Forestier, L., Whitmore, S.A., Callen, D.F., Gribouval, O., Broyer, M., Bates, G.P., van't Hoff, W. and Antignac, C. (1998) A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet*, **18**, 319-324.
- Verheijen, F.W., Verbeek, E., Aula, N., Beerens, C.E., Havelaar, A.C., Joosse, M., Peltonen, L., Aula, P., Galjaard, H., van der Spek, P.J. and Mancini, G.M. (1999) A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat Genet*, **23**, 462-465.