HAL
open science

Des microtubules détyrosinés : quelles conséquences pour la cellule?

Fabrice Caudron

To cite this version:

Fabrice Caudron. Des microtubules détyrosinés : quelles conséquences pour la cellule?. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00149555

HAL Id: tel-00149555

https://theses.hal.science/tel-00149555v1

Submitted on 26 May 2007

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

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

THESE
Présentée par
Fabrice Caudron

Pour obtenir le titre le
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1
(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)
Spécialité Biologie

Des microtubules détyrosinés : Quelles conséquences pour la cellule ?

Soutenue le 20 mars 2007 devant le jury composé de :

M. Michel Robert-Nicoud	Président
M. Yves Barral	Rapporteur
M. Franck Perez	Rapporteur
M. Alain Nicolas	Examinateur
M. Didier Job	Examinateur
Mme Cécile Boscheron	Directrice de thèse

Thèse réalisée au sein de l'Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant
Préparée au laboratoire du cytosquelette INSERM U366
Département Réponse et Dynamique Cellulaires
CEA-Grenoble, France

Remerciements

Je tiens à remercier Didier Job et Cécile Boscheron pour leur accueil dans le laboratoire, leur soutien quotidien, et les nombreuses discussions que nous avons pu partager. J'ai pu apprendre la levure, les microtubules et la science en général grâce à ces échanges toujours passionnants.

Je tiens également à remercier Mr Michel Robert-Nicoud pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse, Mr Yves Barral et Mr Franck Perez pour s'être investis dans l'évaluation de ces travaux, et Mr Alain Nicolas pour m'avoir accueilli dans son équipe, suivi au cours de ce travail et pour avoir accepté de juger ce travail.

Un grand merci à Annie Andrieux pour son soutien de tous les jours et longue vie au GPC.

Tous les membres du laboratoire m'ont été d'une grande aide à chaque étape de cette thèse. Je leur adresse un grand merci. Jean-Marc, Manu, Eric, Anne, Cricri pour la vie de tous les jours, et pour avoir accroché très souvent un sourire à mon visage. Un petit coucou aux thésards et post doc, Vinz l'ardéchois, Léti 'chili con carne', Xav 'la gouffa', Alex, Laurent, Stéphanie, Stéfanos…

Ce travail n'aurait pu être possible sans ma famille, qui m'a conduit et soutenu à chaque instant.

Enfin, merci à ma Julie pour tout et puis le reste.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS **1**

SOMMAIRE **3**

LISTE DES ILLUSTRATIONS **6**

LISTE DES TABLEAUX **7**

PREAMBULE **9**

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION **13**

I. LA LEVURE SACCHAROMYCES CEREVISIAE 13
II. LE CYTOSQUELETTE 15
III. LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE 16
III.1 L'actine dans la levure *16*
III.2. Mise en place de la polarité et croissance polarisée *18*
IV. LE CYTOSQUELETTE MICROTUBULAIRE 19
IV.1. Structure d'un microtubule *19*
IV.2. La tubuline *20*
IV.2.1. Tubuline dans la levure 21
IV.3. Dynamique des microtubules *22*
IV.3.1. Dynamique in vitro 22
IV.3.2. Dynamique in vivo 23
IV.4. Organisation cellulaire du cytosquelette microtubulaire *23*
IV.4.1. Centrosome et réseau interphasique 24
IV.4.2. Le SPB et la nucléation des microtubules 24
IV.4.3. Le fuseau mitotique 27
IV.4.4. Attache au kinétochore 28
IV.4.5. Organisation du cytosquelette microtubulaire dans la levure 29
IV.5. Protéines associées aux microtubules (MAPs) *31*
IV.5.1. Les MAPs classiques 31
IV.5.2. Les moteurs moléculaires 31
IV.5.2.1. La dynéine 32
IV.5.2.2. Les kinésines 33
IV.5.3. Les protéines de bouts plus 34
IV.5.3.1. CLIPs et protéines à CAP-Gly 34
IV.5.3.1.1. CLIP-170, découverte et structure 34
IV.5.3.1.2. Les autres CLIPs et les CLIPs dans l'évolution 35
IV.5.3.1.3. Localisation de CLIP-170 36
IV.5.3.1.4. Phosphorylation de CLIP-170 38
IV.5.3.1.5. Les fonctions de CLIP-170 38
IV.5.3.2. Les autres protéines à CAP-Gly 41
IV.5.3.2.1. Facteur de repliement de la tubulineα (Alf1p) 41
IV.5.3.2.2. p150^{GLUED} 41
IV.5.3.4. CLASPs 42
IV.5.3.6. LIS1 43
IV.5.3.3. La famille EB1 44
IV.5.3.5. APC 45
IV.5.3.7. ACF7/BPAG1 47
IV.5.3.8. Moteurs moléculaires 47
IV.5.3.9. Mécanismes de positionnement du fuseau dans *S. cerevisiae* 48
IV.6. Modifications post traductionnelles de la tubuline *52*
IV.6.1. Acétylation, palmitoylation, polyglycylation et polyglutamylation 52
IV.6.1.1. Acétylation 52
IV.6.1.2. Palmitoylation 53
IV.6.1.3. Polyglycylation 53
IV.6.1.4. Polyglutamylation 53
IV.6.2. Phosphorylation de la tubuline β 54
IV.6.3. Le cycle de détyrosination-tyrosination 55

IV.6.3.1. Conservation du C-terminus de la tubuline α ... 55
IV.6.3.2. Le cycle de détyrosination-tyrosination ... 56
IV.6.3.3. Détyrosination et cancer ... 58
IV.6.3.4. Invalidation génique de la TTL dans la souris ... 59
IV.6.3.5. Cibles du cycle : les bouts plus des microtubules ... 60
V. LE MUTANT TUB1-GLU ... 61
VI. OBJECTIFS ET STRATEGIES DE L'ETUDE ... 63

CHAPITRE 2. –MATERIELS ET METHODES ... 67

I. MATERIELS ... 67
I.1. Souches bactériennes ... 67
I.2. Souches de levures ... 67
I.3. Milieux de culture et tampons ... 74
I.4. Anticorps utilisés ... 74
I.5. Plasmides utilisés ... 75
II. METHODES ... 76
II.1. Biologie moléculaire ... 76
II.1.1. Mini-préparation d'ADN plasmidique ... 76
II.1.2. Midi-préparation d'ADN plasmidique ... 77
II.1.3. Amplification de la banque d'ADNc pFL44 ... 77
II.1.4. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose ... 78
II.1.5. Amplification de séquences d'ADN par PCR ... 78
II.2. Biochimie ... 78
II.2.1. Extraction rapide des protéines totales ... 78
II.2.2. Détermination de la concentration protéique ... 79
II.2.3. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes ... 79
II.2.4. Electrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose ... 80
II.2.5. Détection immunologique des protéines transférées sur membrane de nitrocellulose ... 80
II.3. Biologie cellulaire ... 81
II.3.1. Méthodes de cultures ... 81
II.3.1.1. Culture des bactéries ... 81
II.3.1.2. Culture des levures ... 81
II.3.2. Transformation des levures à l'acétate de lithium ... 81
II.3.3. Immunofluorescence indirecte ... 82
II.3.4. Marquage de l'actine ... 83
II.3.5. Microscopie et vidéomicroscopie ... 83
II.4. Méthodes génétiques ... 84
II.4.1. Conjugaison des cellules haploïdes ... 84
II.4.2. Sporulation des cellules diploïdes et dissection des tétrades ... 85
II.4.3. Crible de létalité synthétique ... 86
II.4.4. Invalidation génique et intégration des gènes de fusion ... 91

CHAPITRE 3 – RESULTATS ET DISCUSSION ... 95

I. RECHERCHE DE SUPPRESSEURS DE LA MUTATION TUB1-GLU ... 95
I.1. Les huit plasmides de complémentation ne contenant pas TUB3 ... 98
I.2. Les plasmides sur-exprimant le gène TUB3 ... 99
I.3. Conclusions ... 103
II. RELATIONS ENTRE LES LOCALISATIONS ET LES FONCTIONS DE BIK1P DANS LE MUTANT ITUB1-GLU ... 103
II.1. La localisation de Bik1p aux bouts + des microtubules Glu dépend de Bim1p ... 103
II.2. La dynéine est aux bouts plus des microtubules Glu ... 111
II.3.La kinésine Kip2p sur les microtubules Glu ... 114
II.4. La localisation de la dynéine aux bouts plus des microtubules Glu requiert son transport par Kip2p et Bik1p ... 116
II.5. Invalidation de KIP2 dans la souche itub1-Glu bim1Δ ... 119
II.6. Un mécanisme par défaut de positionnement du noyau dans les souches itub1-Glu bim1Δ kip2Δ ... 123
II.7. Conclusions ... 127
III. RECHERCHE DE SYNTHETIQUES LETAUX ... 129
III.1. Crible de létalité synthétique ... 129
III.2. Recherche de gènes dont l'invalidation supprime l'hypersensibilité au bénomyl de la souche itub1-Glu. ... 133
III.3. Conclusions ... 134
IV. PETITES PROTEINES G ET BOUTS PLUS DES MICROTUBULES ... 136
IV.1. Rho1p contrôle l'association de Bik1p aux bouts plus des microtubules ... 136

IV.2. Contrôle de la taille des cellules itub1-Glu exprimant le mutant rho1-G19V *141*
IV.3. Conclusions..... *144*

CHAPITRE 4 – CONCLUSION GENERALE **149**

BIBLIOGRAPHIE.....**159**

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Représentation schématique des cycles de division cellulaire et de la sexualité de Saccharomyces cerevisiae. 14
Figure 2. Série d'images représentant l'actine pendant le cycle cellulaire. 17
Figure 3. Structure d'un microtubule. 20
Figure 4. Structure et Duplication du SPB. 25
Figure 5. Représentation schématique du fuseau mitotique. 27
Figure 6 Organisation générale d'un kinétochore. 29
Figure 7. Organisation des microtubules pendant le cycle de Saccharomyces cerevisiae. 30
Figure 8. Structure et homologues de CLIP-170 36
Figure 9. Modèle de l'attachement des microtubules au cortex par les CLASPs, LL5β et ELKS. 43
Figure 10. Mécanismes moléculaires de positionnement et migration du noyau. 50
Figure 11. Conservation du site de phosphorylation de la tubuline β par CDK1. 54
Figure 12. Conservation du C-terminus de la tubuline α. 55
Figure 13. Position du C-terminus de la tubuline α dans le dimère de tubuline et le microtubule. 56
Figure 14. Le cycle de détyrosination-tyrosination de la tubuline α. 57
Figure 15. La phénylalanine C-terminale de la tubuline α est essentielle à l'association de Bik1p-GFP aux bouts plus des microtubules. 63
Figure 16. Croisement des cellules haploïdes. 85
Figure 17. Etapes du crible de létalité synthétique. 88
Figure 18. Exemple de boîtes du crible de létalité synthétique. 89
Figure 19. Invalidation génique. 92
Figure 20. Principe du crible de complémentation. 96
Figure 21. Résultats du crible primaire de suppresseurs. 97
Figure 22. Schéma des séquences insérées dans les huit plasmides ne contenant pas TUB3. 98
Figure 23 Schéma des séquences insérées dans les vingt-six plasmides contenant TUB3. 100
Figure 24. Liaison de Bik1p aux bouts plus des microtubules dans les souches tub1-Glu sur-exprimant TUB3. 101
Figure 25. Modèles non exclusifs de localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules. 104
Figure 26. La localisation de Bik1p-3GFP aux bouts plus des microtubules Glu dépend de Bim1p. 105
Figure 27. Vérification de l'expression de Bik1p-3GFP. 106
Figure 28. Un rôle de la phénylalanine C-terminale de Bim1p pour la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules Glu ? 109
Figure 29. Rôle de la Phe C-terminale de Bim1p et sur-expression de Bik1p. 110
Figure 30. Localisation de Dyn1p, la chaîne lourde de la dynéine. 113
Figure 31. Localisation de la kinésine Kip2p. 115
Figure 32. Bik1p et Dyn1p sont transportées vers les bouts plus par Kip2p. 118
Figure 33. Effets de la double invalidation de KIP2 et BIM1 sur la localisation de Bik1p et Dyn1p. 121
Figure 34. Modèle proposé des mécanismes de localisation de Bik1p et Dyn1p. 122
Figure 35. Ségrégation des noyaux dans des cellules sans déterminants corticaux des interactions microtubules-cortex. 124
Figure 36. Analyse de la mitose dans des cellules sans déterminants corticaux des interactions microtubules-cortex. 126
Figure 37. Effet de l'hyper-activation de Rho1p sur la localisation de Bik1p. 137
Figure 38. Contrôle de l'expression de Bik1p-3GFP. 138
Figure 39. Asymétrie de l'enrichissement de Bik1p suite à l'hyperactivation de Rho1p. 139
Figure 40. Effet de Bim1p sur la localisation de Bik1p après l'hyperactivation de Rho1p. 140
Figure 41. Effet de rho1-G19V sur la taille des cellules itub1-Glu. 141
Figure 42. Effet de rho1-G19V sur la taille des cellules itub1-Glu. 142
Figure 43. Comparaison de la taille des cellules iTUB1 et itub1-Glu exprimant ou non Rho1p hyperactive. 142
Figure 44. Effet de l'invalidation de BIK1 sur la taille des cellules suite à l'hyperactivation de Rho1p. 143
Figure 45. Régulations de localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules. 150

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Souches de levure utilisées. *73*
Tableau 2. Liste des plasmides. *76*
Tableau 3. Gènes candidats sélectionnés au cours du crible de létalité synthétique. *91*
Tableau 4. Dynamique des microtubules. *108*
Tableau 5. Viabilité de la combinaison des mutations bim1Δ et kip2Δ. *120*
Tableau 6. Les microtubules astraux sont présents dans la souche itub1-Glu bim1Δ kip2Δ. *121*
Tableau 7. Gènes interagissant génétiquement avec tub3Δ et tub1-Glu. *130*
Tableau 8. Gènes candidats dont l'invalidation supprime l'hypersensibilité au bénomyl de la souche tub1-Glu. *134*

PREAMBULE

Le travail que je présente ici a été réalisé au sein de l'unité INSERM 366. Ce laboratoire s'intéresse à l'organisation fonctionnelle du cytosquelette microtubulaire. Les microtubules assurent un nombre très varié de fonctions dans la cellule. Ils permettent notamment d'organiser la cellule, de séparer le matériel génétique pendant la division cellulaire, participent au transport intracellulaire ou encore à la motilité de la cellule. Des mécanismes permettent de modifier les microtubules ou leurs protéines associées afin de remplir ces diverses fonctions. Une attention toute particulière est apportée à une modification post traductionnelle de la tubuline α, brique de base des microtubules, le cycle de détyrosination-tyrosination. Le laboratoire a déterminé que son action régule une des extrémités des microtubules, les bouts plus, en modulant spécifiquement l'interaction de certaines protéines à ces bouts plus. Pendant la mitose, les bouts plus des microtubules rentrent en contact avec le cortex de la cellule. Ces interactions sont notamment importantes pour positionner correctement le fuseau mitotique. En utilisant comme organisme modèle la levure *Saccharomyces cerevisiae*, je me suis attaché à comprendre les déterminants des interactions des microtubules avec le cortex.

Dans l'introduction, je décris dans un premier temps le modèle expérimental que j'ai utilisé, la levure *Saccharomyces cerevisiae.* Ensuite, je décris les bases moléculaires des microtubules ainsi que les protéines associées aux microtubules, notamment à leurs bouts plus. Je présente après les modifications post traductionnelles de la tubuline, principalement le cycle de détyrosination-tyrosination. Enfin je montre l'originalité de cette étude, les problématiques posées et les stratégies utilisées.

INTRODUCTION

Chapitre 1 – Introduction

I. La levure Saccharomyces cerevisiae

Les levures sont des eucaryotes, champignons monocellulaires ascomycètes.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un champignon hémiascomycète qui se divise par bourgeonnement, d'où son nom de levure bourgeonnante. Elle est utilisée depuis longtemps par l'homme pour ses propriétés de fermentation alcoolique, notamment par les boulangers, les brasseurs et les vignerons.

Le génome de *S. cerevisiae* a été le premier génome eucaryote séquencé intégralement en 1996 par un consortium essentiellement européen (Goffeau et al., 1996). Ce génome contient environ 13 millions de bases, environ 6000 séquences codantes (5500 gènes codant des protéines, 350 gènes d'ARN et presque 200 cadres ouverts de lecture putatifs), et est réparti sur seize chromosomes.

Les études génétiques de *S. cerevisiae* sont très puissantes et portent maintenant sur le génome entier. En effet, depuis le séquençage du génome il a été possible de réaliser l'invalidation de chaque cadre ouvert de lecture.

Les souches de *S. cerevisiae* sont assez diverses. S288C est considérée comme la souche de référence et a été utilisée pour le séquençage du génome et la construction de la banque de délétion. D'autres souches sont utilisées dans les laboratoires, comme W303, SK1 ou encore Σ1278b.

Les souches de laboratoire sont le plus souvent hétérothalliques, c'est-à-dire que le type sexuel (haplotype **a** ou α) est stable. Dans la nature, les levures sont de type homothallique, c'est-à-dire qu'elles changent d'haplotype très fréquemment. Ceci correspond à un changement de génotype au locus *MAT*. Il existe deux copies ectopiques silencieuses (*HMLα* et *HMRa*) qui peuvent être transférées au locus *MAT* par conversion génique. Cette étape met en jeu l'endonucléase Ho. La délétion spontanée du gène *HO* a permis d'isoler les souches hétérothalliques utilisées en laboratoire.

S. cerevisiae a un cycle cellulaire de type haplodiplobiontique, c'est-à-dire que les cellules peuvent être sous forme haploïde (une copie du génome) ou diploïde (deux copies du génome) de façon stable. Les cellules haploïdes peuvent être de type sexuel **a** ou **α**. Deux cellules de types sexuels opposés peuvent conjuguer afin de former une cellule diploïde. Les deux cellules haploïdes forment des 'shmoos', projections particulières qui permettent aux deux cellules de fusionner et former le zygote (figure 1). De ce zygote se fait un premier bourgeonnement qui donnera la première cellule fille diploïde. Les diploïdes sont capables de faire des méioses. Ce phénomène permet de créer quatre spores enfermées dans un asque non ordonné. Chacune de ces spores peut germer et donner une cellule haploïde qui formera une colonie. La micro manipulation de ces asques permet d'isoler chaque spore sur milieu gélosé. Ainsi on peut combiner simplement différentes mutations dans une seule souche et en analyser le phénotype.

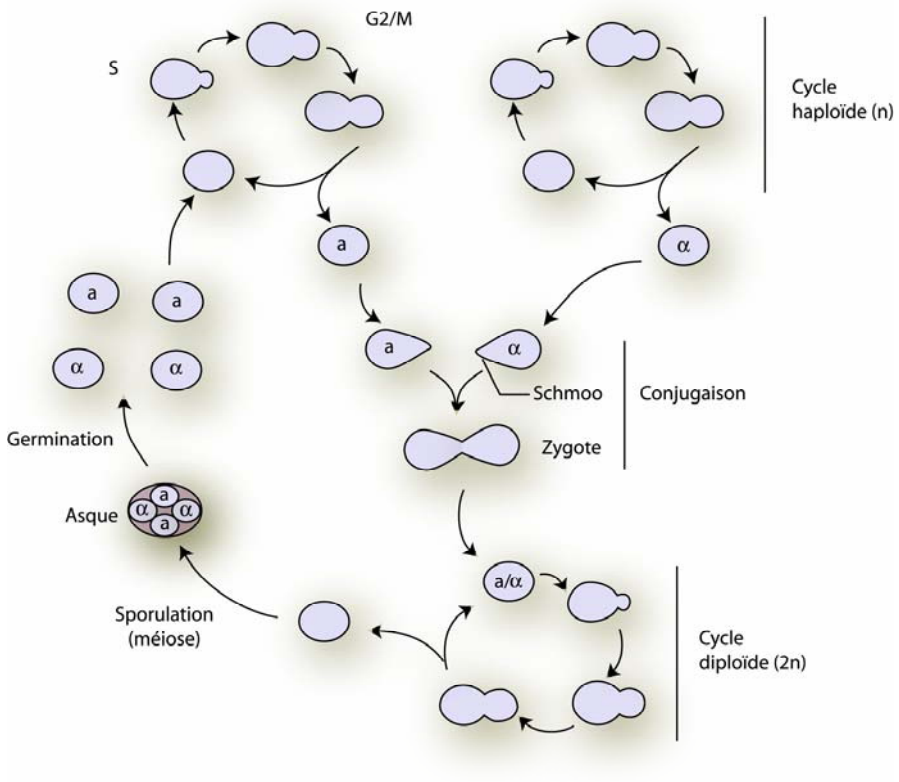


Figure 1. Représentation schématique des cycles de division cellulaire et de la sexualité de *Saccharomyces cerevisiae*.
Le cycle haploïde est représenté en haut avec l'apparition du bourgeon et son grossissement au cours du cycle. Deux haploïdes, d'haplotypes opposés, peuvent conjuguer en formant des schmoos, pour former un zygote diploïde. Les diploïdes peuvent faire une méiose conduisant à la réduction de la ploïdie et à la formation d'asques contenant quatre spores haploïdes pouvant germer et refaire un cycle haploïde.

L'obtention de cellules triploïdes (trois copies du génome) ou bien tétraploïdes (quatre copies du génome) est aussi possible. En manipulant les cellules, on peut obtenir des diploïdes **a**/**a** ou α/α que l'on peut croiser avec des cellules de type sexuel opposé. Ces diploïdes peuvent se former spontanément par recombinaison du locus *MAT*. Bien que peu compris, les cellules triploïdes sont peu stables, des mitoses irrégulières entraînant l'apparition de cellules aneuploïdes. En revanche, les cellules tétraploïdes sont assez stables et couramment rencontrées dans les souches de brasseries (Thuriaux, 2004).

Au début du cycle de division cellulaire, la levure est plus ou moins ovoïde. Au site de croissance prédéterminé (selon la ploïdie), la levure va croître et ainsi commencer à former un petit bourgeon qui sera la cellule fille. Cette croissance polarisée se poursuit au cours du cycle et le bourgeon atteint une taille presque équivalente à celle de la cellule mère. Toutefois, la cellule fille n'atteint jamais la taille de la cellule mère. En laboratoire et dans les conditions optimales le temps d'un cycle de la levure est d'environ 120 min. Toutefois, la cellule fille étant plus petite que la cellule mère, il faut qu'elle compense cela et son cycle est un peu plus long (140 min) que celui de la cellule mère (100 min). Les deux cellules se séparent finalement par contraction au niveau du cou (jonction étroite entre la cellule mère et la cellule fille) par un anneau cytocinétique composé majoritairement de septines.

Le cycle de division cellulaire de la levure reprend le cycle général des cellules eucaryotes avec une phase pré-réplicative (G1), une phase de réplication de l'ADN (S), un phase post-réplicative (G2) et la mitose (M).

S. cerevisiae réalise une mitose fermée, c'est-à-dire que l'enveloppe nucléaire reste présente pendant tout le cycle et donc que le fuseau mitotique se forme dans le noyau.

II. Le cytosquelette

Le cytosquelette est une des caractéristiques des cellules eucaryotes. Il est composé de différents réseaux fibreux identifiés en microscopie électronique par le diamètre des fibres. Il s'agit des microfilaments d'actine (7 nm de diamètre), des filaments intermédiaires (10 nm de diamètre) et des microtubules (25 nm de diamètre).

Les microfilaments d'actine sont des polymères hélicoïdaux formés par l'assemblage de l'actine, une protéine globulaire de 43 kDa. Ils sont importants dans la contraction

musculaire, la motilité cellulaire, les mécanismes d'endocytose, le mouvement d'organites ou encore le positionnement du noyau dans la levure.

A la différence des microfilaments et des microtubules, les protéines constituant les filaments intermédiaires sont extrêmement variées et dépendent du type cellulaire. Ce sont des protéines fibreuses qui forment des filaments non polarisés. On peut citer les lamines, qui servent à l'architecture de l'enveloppe nucléaire, les kératines qui forment un réseau s'ancrant dans les desmosomes et hémi-desmosomes participant ainsi à l'architecture des épithélia ou encore les neurofilaments qui sont déterminants dans le calibre axonal des neurones (Hoffman et al., 1987).

Les microtubules sont des tubes creux formés par l'assemblage d'hétérodimères de tubuline α/β. Ce sont des structures hautement dynamiques qui organisent le cytoplasme, participent au transport intracellulaire, à la morphogenèse, au positionnement du noyau. En mitose les microtubules forment le fuseau mitotique, appareil servant à ségréger fidèlement le matériel génétique.

III. Le cytosquelette d'actine

III.1 L'actine dans la levure

Les microfilaments sont constitués majoritairement d'actine. Ils forment deux structures distinctes, les 'patches' corticaux et les câbles. Récemment, il a été proposé que les patches soient composés d'un réseau d'actine branchée autour d'une invagination formant plus ou moins une pyramide (Rodal et al., 2005). Les câbles sont des paquets longitudinaux de filaments d'actine (Adams and Pringle, 1984). Il semblerait qu'il s'agisse de nombreux petits filaments qui se chevauchent et qui sont orientés avec l'extrémité barbée vers le bout du bourgeon (Kamasaki et al., 2005; Moseley and Goode, 2006). La formation des patches corticaux repose sur la nucléation Arp2/3 dépendante (Evangelista et al., 2002) alors que les câbles sont nucléés par un mécanisme formine dépendant (Evangelista et al., 2002; Sagot et al., 2002a). Les deux formines de *S. cerevisiae* sont Bni1p et Bnr1p. Des études biochimiques ont montré leur capacité à nucléer l'actine *in vitro* (Sagot et al., 2002b).

En début de cycle, les patches corticaux sont distribués dans toute la cellule. Avant l'apparition du bourgeon, les patches se redistribuent au site d'émergence du bourgeon. A ce

moment, les câbles sont orientés vers cette région. Les patches sont ensuite concentrés dans le bourgeon, et les câbles émanent du bourgeon et vont vers la cellule mère. Lorsque le bourgeon atteint une taille critique, les câbles et les patches sont redistribués dans toute la cellule, puis, très rapidement, les patches se concentrent au niveau du cou et les câbles émanent de ce cou vers la cellule mère et le bourgeon ((Amberg, 1998; Kilmartin and Adams, 1984), et figure 2).

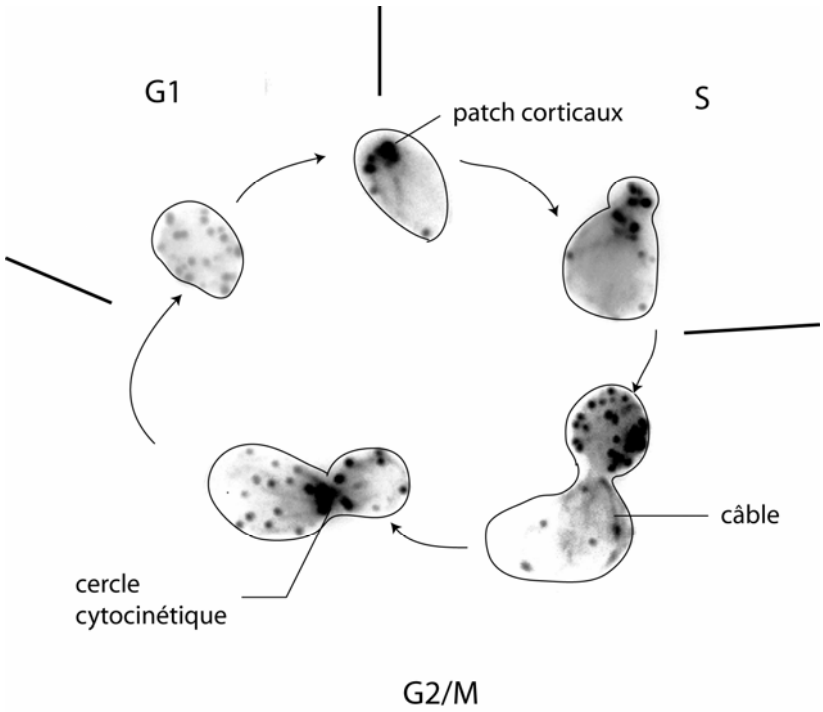


Figure 2. Série d'images représentant l'actine pendant le cycle cellulaire.
En G1, les patches corticaux sont distribués uniformément. Ensuite ils se concentrent au niveau du site d'émergence du bourgeon et les câbles sont nucléés de ce site vers la cellule mère. Quand le bourgeon est présent, les patches sont dans ce bourgeon et les câbles partent du bourgeon vers la cellule mère, structure typique de la polarisation extrême de cette levure. En fin de mitose les patches se concentrent au niveau du cercle cytocinétique et les câbles partent de ce site vers le bourgeon et la cellule mère. Les cellules ont été préparées selon le protocole d'(Amberg, 1998), et l'actine est visualisée au moyen de phalloïdine couplée au fluorophore Rhodamine.

L'actine est codée par un seul gène essentiel, *ACT1* (Novick and Botstein, 1985).

Les patches sont des structures très mobiles (Waddle et al., 1996). Ils sont impliqués dans des phénomènes d'endocytose. Le marqueur fluorescent FM4-64 est internalisé au niveau de ces patches (Huckaba et al., 2004). Des complexes protéiques immobiles ne contenant pas d'actine se forment. Ensuite l'actine polymérise et les patches commencent à

bouger doucement. Enfin, les patches ont des mouvements plus rapides qui dépendent des câbles d'actine (Huckaba et al., 2004; Kaksonen et al., 2003; Kaksonen et al., 2005). Très récemment, l'utilisation de la microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) a permis de visualiser la clathrine au niveau de ces patches et sa participation au phénomène d'endocytose a été établie (Kaksonen et al., 2005; Newpher et al., 2005).

Les câbles d'actine servent de rails au transport d'organites par les myosines vers le bourgeon mais aussi au transport rétrograde des vésicules endocytaires vers les endosomes (Moseley and Goode, 2006). Ils permettent aussi l'orientation du fuseau mitotique.

L'actine est un des premiers effecteurs permettant la mise en place de la polarité dans la levure *S. cerevisiae*. Cette polarité est très importante pour la mitose et le positionnement correct du noyau repose sur une asymétrie entre la cellule mère et le bourgeon. Je présente les bases moléculaires connues de la mise en place de la polarisation de la levure dans le chapitre suivant.

III.2. Mise en place de la polarité et croissance polarisée

Les levures sont des modèles de cellules hautement polarisées. La croissance polarisée de la cellule est mise en place par une séquence d'évènements bien contrôlée. Tout d'abord le site de croissance est déterminé. A ce site, des petites protéines G sont activées permettant la mise en place d'un réseau d'actine polarisé. La sécrétion et l'accroissement de la paroi au niveau du bourgeon permettent la croissance du bourgeon. Finalement le noyau est positionné afin d'achever la mitose et de ségréger correctement les chromosomes.

Le choix du site de croissance dépend de la ploïdie de la cellule. Dans les cellules haploïdes, le mode de bourgeonnement est dit axial, le site de bourgeonnement se situant toujours à proximité de la cicatrice de l'ancien site de bourgeonnement. Ceci favoriserait la proximité de cellules d'haplotype opposé pouvant ainsi conjuguer plus facilement. En l'absence de ce programme axial, les cellules haploïdes adoptent un mode de bourgeonnement bipolaire, comme les cellules diploïdes (Chant and Herskowitz, 1991).

Dans les cellules diploïdes, le mode de bourgeonnement est dit bipolaire, c'est-à-dire que le site de bourgeonnement se situe à proximité de l'ancien site de bourgeonnement ou bien au pôle opposé. Toutefois la cellule fille choisi le plus souvent comme site de

bourgeonnement le pôle opposé à la première cicatrice (pour revue voir (Casamayor and Snyder, 2002).

Des déterminants de la sélection du site de bourgeonnement ont été identifiés. Parmi eux, on peut noter les protéines transmembranaires Bud8p, Bud9p et Rax2p pour le programme bipolaire (Chen et al., 2000; Zahner et al., 1996), ou bien l'anneau de septines et Axl2p pour le programme axial (Lord et al., 2002).

Ces déterminants permettent d'activer localement la petite protéine G Bud1p qui à sont tour active Cdc24p et la petite protéine G Cdc42p (Pruyne et al., 2004).

L'étape suivante est d'assembler un cytosquelette d'actine polarisé, ainsi que le dépôt de septines au niveau du cou. Un complexe appelé polarisome se localise au bout du bourgeon. Il contient les protéines Spa2p, Pea2p et Bud6p (Moseley and Goode, 2006). La localisation du polarisome au bout du bourgeon nécessite Cdc42p (Jaquenoud and Peter, 2000). Cdc42p active aussi les formines Bni1p au bout du bourgeon (Fujiwara et al., 1998; Sheu et al., 1998) et Bnr1p au cou (Kikyo et al., 1999). Ces formines induisent la formation des câbles d'actine qui sont orientés du bourgeon ou du cou vers la cellule mère, les extrémités barbées étant côté bourgeon et les extrémité pointues côté cellule mère. Cette polarité permet un transport vésiculaire médié par la myosine de type V vers le bourgeon. Le transport des vésicules post-golgiennes par la myosine V Myo2p le long des câbles d'actine vers le bourgeon a été observé (Schott et al., 2002). Ces vésicules permettent entre autre de cibler des enzymes de remodelage de la paroi (Shaw et al., 1991), dont la chitine synthase (Utsugi et al., 2002) ainsi que des membranes.

La paroi contient aussi des glucanes. Ceux-ci sont synthétisés par une glucane synthase composée au moins de Fks1p et Fks2p. Ces protéines sont activées par la petite protéine G Rho1p. Rho1p est localisée dans le bourgeon, ainsi l'activation de Fks1p se fait préférentiellement au niveau du bourgeon, permettant le remodelage de la paroi et donc une croissance contrôlée au niveau du bourgeon (Drgonova et al., 1996; Qadota et al., 1996).

IV. Le cytosquelette microtubulaire

IV.1. Structure d'un microtubule

La brique de base des microtubules est l'hétérodimère de tubuline α et β. Les dimères sont capables de s'auto-assembler longitudinalement pour former des protofilaments. En

moyenne treize protofilaments interagissant latéralement forment le tube creux du microtubule (Figure 3). Les interactions entre protofilaments se font entre tubulines de même isotype (α-α, β-β), sauf au niveau de la ligne de suture où l'on observe un décalage des protofilaments et des interactions latérales entre tubuline α et tubuline β.

La structure même du microtubule fait qu'elle est polarisée, exposant des sous-unités de tubuline β d'un côté (bout plus) et des sous-unités de tubuline α de l'autre (bout moins). Cette différence structurale l'est aussi fonctionnellement comme nous le verrons ensuite.

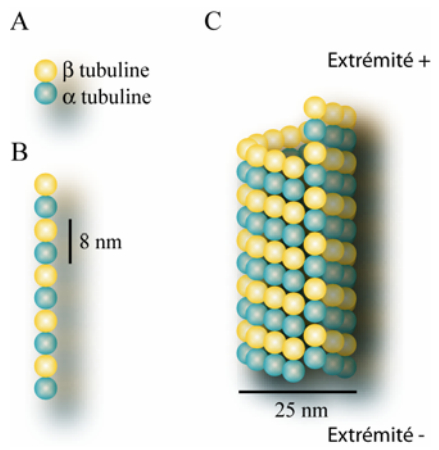


Figure 3. Structure d'un microtubule.

A. Représentation schématique du dimère de tubuline α/β.

B. Représentation schématique d'un protofilament résultant de l'assemblage longitudinal de dimères de tubuline.

C. Représentation schématique d'un microtubule. Le schéma du microtubule met en avant la polarité structurale avec le bout plus en haut exposant des tubulines β et le bout moins en bas exposant des tubulines α. De plus la ligne de suture, qui correspond à un décalage des protofilaments, est visible.

Les caractéristiques d'assemblage des microtubules reposent essentiellement sur les propriétés intrinsèques du dimère de tubuline.

IV.2. La tubuline

La famille des tubulines regroupe différent types de tubulines (α, β, γ, δ, ε et ζ). Les types qui nous intéressent dans ce propos sont les tubulines α et β et je décrirai rapidement la tubuline γ. Les autres tubulines semblent minoritaires ou associées à des structures bien précises comme le flagelle ou la manchette du spermatozoïde.

Les tubulines α et β sont des protéines globulaires d'environ 450 acides aminés et d'un poids moléculaire apparent de 50 kDa. L'hétérodimère de tubuline α et β est le constituant principal des microtubules. Sa structure a été déterminée (Lowe et al., 2001) et classiquement ces protéines sont divisées en trois parties :

Une partie N-terminale contenant le site de liaison au GTP

Une partie intermédiaire qui contient le site de liaison au taxol sur la tubuline β

Une partie C-terminale qui est souvent flottante expose les résidus C-terminaux très conservés de la tubuline α à l'extérieur du dimère et aussi à l'extérieur du microtubule.

La tubuline est une protéine capable de lier le GTP. La sous–unité β d'un dimère peut hydrolyser ce GTP en une molécule de GDP et un phosphate inorganique pendant l'assemblage de la tubuline en microtubule.

La tubuline γ est assez proche des tubulines α et β. Elle peut lier les tubulines α et β (Llanos et al., 1999). Sa localisation aux centres organisateurs des microtubules (MTOCs) dénote son rôle dans la nucléation des microtubules (voir paragraphe IV.4.1.). Ce rôle été initialement mis en évidence par des études de mutants du gène de la tubuline γ (mipA) chez *Aspergillus nidulans* (Oakley et al., 1990).

IV.2.1. Tubuline dans la levure

La tubuline β est codée par un seul gène, *TUB2* (Neff et al., 1983). La tubuline α est codée par deux gènes, *TUB1* et *TUB3* qui possèdent chacun un intron (Schatz et al., 1986a). *TUB4* codant pour la tubuline γ a été identifié plus tard (Marschall et al., 1996; Sobel and Snyder, 1995; Spang et al., 1996).

Les gènes *TUB1* et *TUB2* sont essentiels (Neff et al., 1983; Schatz et al., 1986b). De plus, la sur-expression de la tubuline β est létale (Burke et al., 1989). De façon intéressante, la létalité de la sur-expression de *TUB2* est contrebalancée par la sur-expression de *TUB1* (Weinstein and Solomon, 1990) impliquant des régulations du rapport de quantités de tubuline dans la cellule.

L'invalidation de *TUB3* n'est pas létale, mais entraîne une hyper-sensibilité au bénomyl, une drogue dépolymérisant les microtubules (Schatz et al., 1986b). Cette délétion n'est pas létale car *TUB1* code pour 90% de la tubuline et *TUB3* pour les 10% restants.

TUB3 peut supprimer la létalité des souches invalidées pour *TUB1* s'il est exprimé à un taux suffisamment élevé (Schatz et al., 1986b). Une analyse *in vitro* de la dynamique de

microtubules composés de Tub2p et chacune des deux tubulines α ou bien les deux ensemble a montré des contributions différentes des deux protéines Tub1p et Tub3p. Par exemple, la vitesse de décroissance des microtubules ne contenant que Tub3p est trois à quatre fois plus lente que celle des microtubules ne contenant que Tub1p. Les microtubules ne contenant que Tub3p présentent aussi trois fois moins de catastrophes que les microtubules ne contenant que Tub1p. Les microtubules contenant les deux isotypes de tubuline α ont des paramètres *in vitro* se situant entre les deux situations, plaidant pour une intervention combinée des deux isotypes dans la régulation de la dynamique des microtubules *in vivo* (Bode et al., 2003).

IV.3. Dynamique des microtubules

IV.3.1. Dynamique in vitro

Des hétérodimères de tubuline α et β sont capables de s'auto-assembler en solution si les conditions de concentration en tubuline, de température et de concentration en GTP sont adéquates. Cet assemblage se fait avec une première phase de nucléation lente, puis une phase d'élongation plus rapide avant d'atteindre un plateau. Au plateau, les microtubules ne sont pas inertes, ils sont dynamiques et échangent des sous-unités de tubuline avec le milieu. Les microtubules sont alors caractérisés par deux comportements distincts :

-le phénomène de tapis roulant ('treadmilling'). Alors même que la longueur d'un microtubule peut ne pas changer, il existe un flux de tubuline de l'extrémité plus vers l'extrémité moins (Margolis and Wilson, 1981).

-d'autre part les microtubules présentent une instabilité dynamique (Mitchison and Kirschner, 1984). Ils peuvent passer d'une phase d'assemblage à une phase de désassemblage (transition appelée catastrophe) ou bien inversement d'une phase de désassemblage à une phase d'assemblage (transition appelée sauvetage). Les microtubules ne sont pas non plus tout le temps en train d'assembler ou de désassembler, ils peuvent être en pause.

Ces microtubules peuvent ensuite désassembler après exposition au froid ou dilution de la solution.

En plus de leur polarité structurale, les microtubules présentent une polarité dynamique. L'extrémité plus exposant des sous-unités β a une cinétique d'assemblage nette

élevée alors que l'extrémité exposant des sous-unités α a une cinétique d'assemblage nette faible.

Ainsi des microtubules assemblés à partir de tubuline pure, sans ajout d'autres protéines peuvent avoir un comportement extrêmement dynamique similaire à celui observé dans une cellule, bien que les modalités dans la cellule soient différentes.

IV.3.2. Dynamique in vivo

Dans la cellule les microtubules sont le plus souvent nucléés à partir d'un centre organisateur des microtubules. Il s'agit des centrosomes dans les cellules des eucaryotes supérieurs, et des spindle pole bodies (SPB) dans la levure. Dans le cas des flagelles et cils, les microtubules sont nucléés à partir des corps basaux.

Les bouts moins des microtubules sont ancrés dans ce centre organisateur alors que les bouts plus irradient dans la cellule. Le bout plus est très nettement l'extrémité la plus dynamique. Ceci permet aux bouts plus des microtubules d'interagir avec leurs cibles. Par exemple, dans la cellule mitotique, les microtubules explorent le cytoplasme et peuvent contacter un kinétochore et capturer alors un chromosome. Ce type de mécanisme est très contrôlé dans la cellule. Par exemple les catastrophes dans une cellule en interphase se font le plus souvent à proximité du cortex cellulaire. C'est très clair dans la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Brunner and Nurse, 2000). Dans ces cellules, les catastrophes se font lorsque le microtubule arrive à l'extrémité de la cellule. Ainsi, si les propriétés intrinsèques des microtubules peuvent expliquer leur comportement dans la cellule, ce comportement est régulé. Cette régulation fait intervenir les protéines associées aux microtubules (MAP).

IV.4. Organisation cellulaire du cytosquelette microtubulaire

Dans ce chapitre, je présente des structures associées aux microtubules. Tout d'abord, le centre organisateur des microtubules (centrosome et SPB). Je décris ensuite rapidement le fuseau mitotique, et l'attache des chromosomes sur les microtubules par les kinétochores. Les protéines auxquelles je me suis intéressé lient les bouts plus des microtubules, mais elles ont

aussi la capacité, pour quelques unes (Bik1p, Bim1p, Dyn1p) de lier ces structures. Enfin, je décris l'organisation des microtubules pendant le cycle de division cellulaire de la levure.

IV.4.1. Centrosome et réseau interphasique

Les centrosomes sont les centres organisateurs des microtubules dans les cellules de mammifères. Ils sont constitués d'une paire de centrioles entourés du matériel péricentriolaire (Bornens, 2002). Les centrioles sont des assemblages de neuf triplets de microtubules. La nucléation des microtubules se fait à proximité des centrioles. La tubuline γ associée dans des complexes (avec les homologues des protéines de levure Spc97p et Spc98p) appelés γTURCs (γ Tubulin Ring Complex) permet de nucléer les microtubules à partir du matériel péricentriolaire (Job et al., 2003). Le réseau interphasique microtubulaire irradie dans toute la cellule.

Dans la levure le centre organisateur des microtubules est le SPB, qui est enchâssé dans la membrane nucléaire. Il permet de nucléer des microtubules astraux dans le cytoplasme et nucléaires dans le noyau.

IV.4.2. Le SPB et la nucléation des microtubules

Le SPB est une structure de 1 à 1,5 GDa enchâssée dans la membrane nucléaire (Adams and Kilmartin, 1999; Bullitt et al., 1997). Sa structure globale est constituée de trois plaques visualisées en microscopie électronique. Une plaque externe associée aux microtubules astraux, une plaque centrale, et une plaque interne associée aux microtubules nucléaires (Jaspersen and Winey, 2004; Moens and Rapport, 1971; Robinow and Marak, 1966). Des observations en cryo-microscopie électronique ont permis d'observer deux couches intermédiaires (1 et 2) entre la plaque externe et la plaque centrale (Bullitt et al., 1997; O'Toole et al., 1999). A la plaque centrale est liée une structure appelée le demi-pont qui est le site d'assemblage du nouveau SPB (Adams and Kilmartin, 1999; Jaspersen and Winey, 2004). La figure 4A présente un schéma de l'organisation du SPB.

Les composants du SPBs sont définis comme les protéines requises pour le maintien de l'intégrité structurale du SPB. Dix-sept composants ont ainsi été déterminés, leur

localisation est schématisée dans la figure 4, adaptée de la revue sur les SPBs de Jaspersen et Winey (Jaspersen and Winey, 2004).

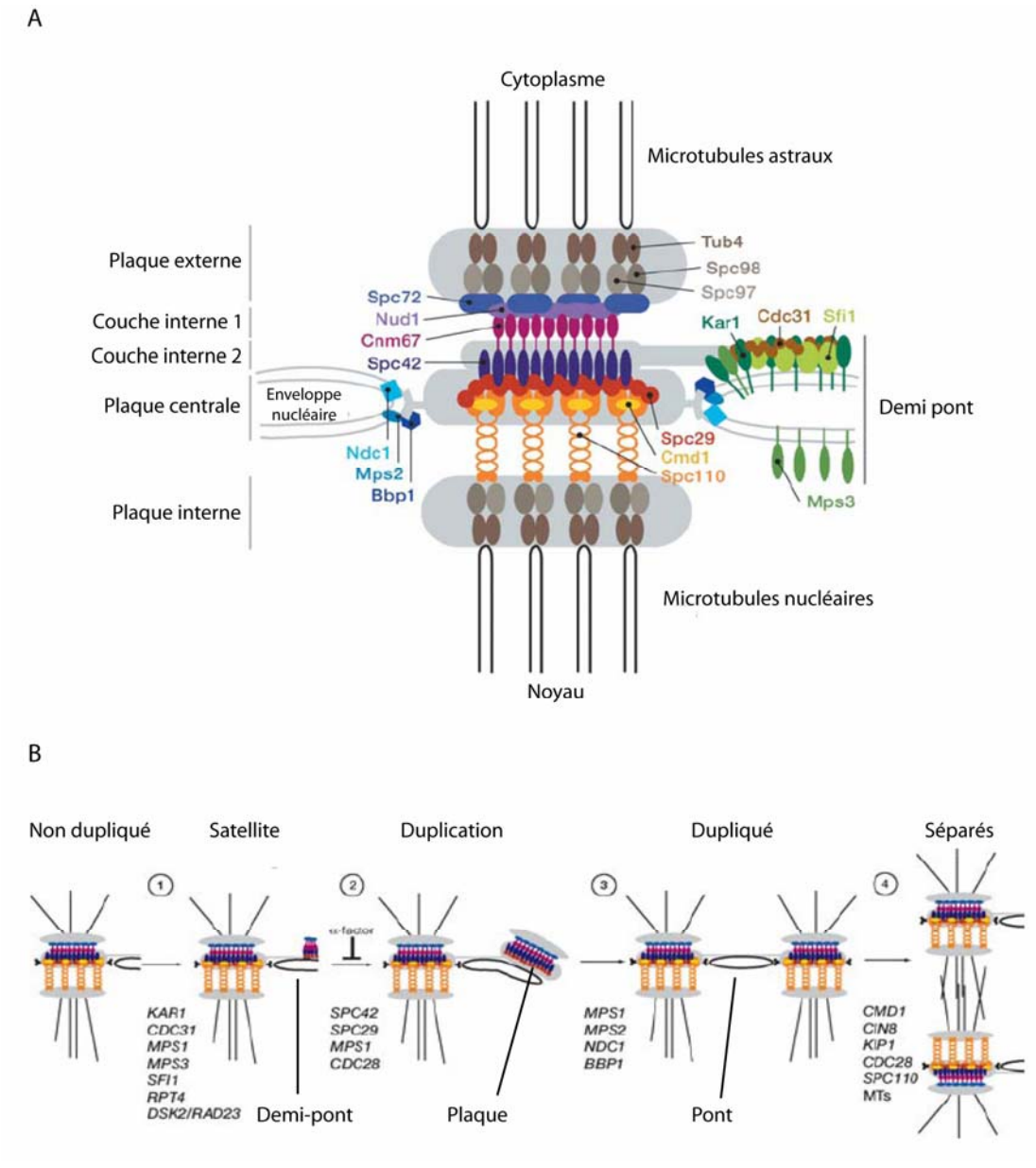


Figure 4. Structure et Duplication du SPB.
A. Structure d'un SPB. Les plaques externe, centrale et interne, les couches internes 1 et 2 ainsi que le demi pont sont représentés. Les composants de chaque sous structure sont notés.
B. Le mécanisme de duplication est schématisé avec le SPB non dupliqué et l'apparition du satellite (1), la formation de la plaque de duplication (2), la duplication complète et la formation du pont complet (3) et finalement la séparation des deux SPBs (4). Les acteurs de chaque étape sont notés. Adapté de (Jaspersen and Winey, 2004).

La duplication du SPB est décrite en trois étapes (schématisées sur la figure 4B, (Jaspersen and Winey, 2004)).

Tout d'abord, en phase G1, le demi-pont s'allonge et un satellite composé de matériel amorphe s'accumule au bout du demi-pont (Byers and Goetsch, 1974; Byers and Goetsch, 1975).

Le satellite s'accroît ensuite en une plaque de duplication, une structure en couches, similaire à la moitié cytoplasmique du SPB mature (Adams and Kilmartin, 1999). Cette étape implique la trimérisation de dimères de la protéine Spc42p pour former la plaque (Bullitt et al., 1997). L'élongation du demi-pont sous la plaque de duplication forme alors un pont complet qui se rétracte ensuite (Adams and Kilmartin, 1999).

La dernière étape est l'insertion de la plaque de duplication dans l'enveloppe nucléaire. Après cette insertion les composants nucléaires *SPC110*, *CMD1* et le complexe de tubuline γ sont assemblés dans le nouveau SPB (Jaspersen and Winey, 2004).

Finalement le pont est clivé par un mécanisme dépendant de *CDC28* et des cyclines *CLB1-4* (Fitch et al., 1992). Les deux SPBs sont alors séparés, cette dernière étape nécessitant les kinésines *CIN8* et *KIP1* ainsi que les microtubules (Jacobs et al., 1988; Roof et al., 1992).

Le rôle le plus évident du SPB est de nucléer les microtubules. Une molécule de Spc97p et une de Spc98p lient deux molécules de tubuline γ. Ce complexe, composant des plaques externes et internes, pourrait nucléer les microtubules cytoplasmiques et nucléaires (Geissler et al., 1996; Knop et al., 1997; Knop and Schiebel, 1997; Nguyen et al., 1998; Spang et al., 1996; Vinh et al., 2002). Le SPB est impliqué dans les fonctions des microtubules, de formation du fuseau mitotique, de fusion des noyaux pendant la karyogamie, de positionnement et d'orientation du fuseau lors de la mitose. Le SPB a aussi été impliqué dans le contrôle de la sortie de mitose. Bub2p, un composant du réseau de sortie de mitose lie Nud1p, et la sortie de mitose est bloquée dans les cellules invalidées pour le gène *NUD1* (Gruneberg et al., 2000).

Enfin, il est intéressant de noter qu'un grand nombre de protéines co-localisent avec les SPBs. Un marqueur du SPB souvent utilisé est Spc42p. Des protéines liant les microtubules co-localisent avec Spc42p, c'est par exemple le cas de Bik1p (Lin et al., 2001).

IV.4.3. Le fuseau mitotique

En mitose, le centrosome se duplique et le réseau microtubulaire se réorganise complètement en un fuseau bipolaire (figure 5). Le fuseau mitotique est composé de microtubules avec leurs bouts moins vers le centrosome et leurs bouts plus attachés aux chromosomes. Ces microtubules, dits kinétochoriens, attachent les chromosomes via les kinétochores, des structures protéiques associées aux centromères. Chez les eucaryotes supérieurs plusieurs microtubules contactent un kinétochore formant un paquet appelé fibres K. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* un seul microtubule s'attache à chaque kinétochore. Le fuseau est aussi composé de microtubules interpolaires, dont les bouts plus ne s'attachent pas à un kinétochore. Les microtubules interpolaires provenant de chaque pôle peuvent se chevaucher et l'action de moteurs moléculaires sur ces parties chevauchantes permet de participer à l'élongation du fuseau en anaphase B (l'anaphase A correspondant aux mouvements des chromosomes vers les pôles après la métaphase, l'anaphase B correspondant à l'élongation du fuseau mitotique précédant la télophase). Enfin des microtubules sont dirigés vers la périphérie (microtubules astraux). Ces derniers sont importants pour positionner le fuseau dans la cellule, en fonction des déterminants corticaux.

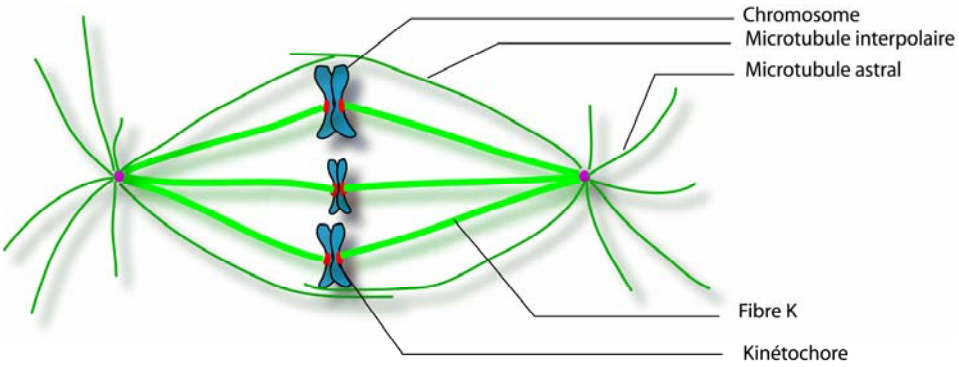


Figure 5. Représentation schématique du fuseau mitotique.
Les chromosomes sont alignés comme pendant la métaphase. En rouge sont schématisés le kinétochores. En violet, de chaque côté les centrosomes forment les deux pôles du fuseau. En vert clair sont représentés les fibres K qui sont des paquets de microtubules attachés à un centrosome par leurs bouts moins et contactant les chromosomes via les kinétochores. En vert foncé sont représentés les microtubules interpolaires se chevauchant au milieu du fuseau et les microtubules astraux irradiant des centrosomes vers la membrane cellulaire.

La nucléation des microtubules kinétochoriens se fait à partir du centrosome mais aussi à partir des chromosomes. Ceci a été bien observé dans le xénope, dont dans des extraits

méiotiques sans centrosomes (Karsenti and Vernos, 2001), mais aussi dans des cellules somatiques (Maiato et al., 2004). La mise en place du fuseau est donc extrêmement contrôlée et implique des moteurs moléculaires, des protéines associées aux microtubules (MAPs) ou encore la petite protéine G Ran (Gadde and Heald, 2004; Heald, 2000).

IV.4.4. Attache au kinétochore

L'analyse des kinétochores dans la levure est facilitée par le fait qu'un seul microtubule contacte un seul centromère par le biais d'un kinétochore. Récemment, l'utilisation de techniques de microscopie avancées a permis de détailler la localisation de protéines aux kinétochores (He et al., 2001; Joglekar et al., 2006; Tytell and Sorger, 2006). Deux critères sont utilisés pour savoir si une protéine est bien au kinétochore. Tout d'abord une localisation bilobée entre les deux SPBs en métaphase et ensuite une immunoprécipitation de la protéine et vérification en PCR que des régions centromériques de la chromatine sont co-immunoprécipitées (He et al., 2001). Dans les deux cas, la pertinence de ces résultats est vérifiée par les mêmes analyses dans des mutants *ndc10-1*. Dans ce cas la localisation et la co-immunoprécipitation doivent être perdues. Ndc10p est une protéine du complexe CBF3 qui, avec les protéines Cbf1p, Mif2p et Cse4p, forme le kinétochore interne (pour revue voir (Cheeseman et al., 2002)). Le kinétochore interne reconnaît et fixe la région centromérique qui est courte dans la levure (125 paires de bases). On distingue un kinétochore central qui contient entre autres les complexes Ctf19 (ou COMA), Ctf3, MIND et Ndc80. Son rôle serait de relier le kinétochore interne au kinétochore externe. Enfin il existe un kinétochore externe représenté majoritairement par le complexe Dam1. Des protéines liant les microtubules pourraient participer au kinétochore externe (Bik1p et peut-être Bim1p, Stu2p, Cin8p, Kip3p et Kar3p). Des études en microscopie électronique ont montré que le complexe Dam1 forme un cercle autour des microtubules (Westermann et al., 2005). Ainsi ce cercle constitue une attache aux microtubules. La dépolymérisation des microtubules pourrait faire glisser ces complexes vers les poles du fuseau, le cercle servant à coupler la force libérée par la dépolymérisation des microtubules en un mouvement de translation. Ce mouvement de translation a d'ailleurs été observé *in vitro* (Westermann et al., 2006).

Une analyse des niveaux de fluorescence de chaque composant du kinétochore a permis de déterminer la quantité de chaque complexe (Joglekar et al., 2006). Ainsi le

complexe Dam1 contiendrait environ seize copies, ce qui correspond aux assemblages *in vitro* de complexes Dam recombinants (Joglekar et al., 2006; Westermann et al., 2006). De ces études, un schéma général de l'organisation du kinétochore a été proposé et est repris simplement dans la figure 6.

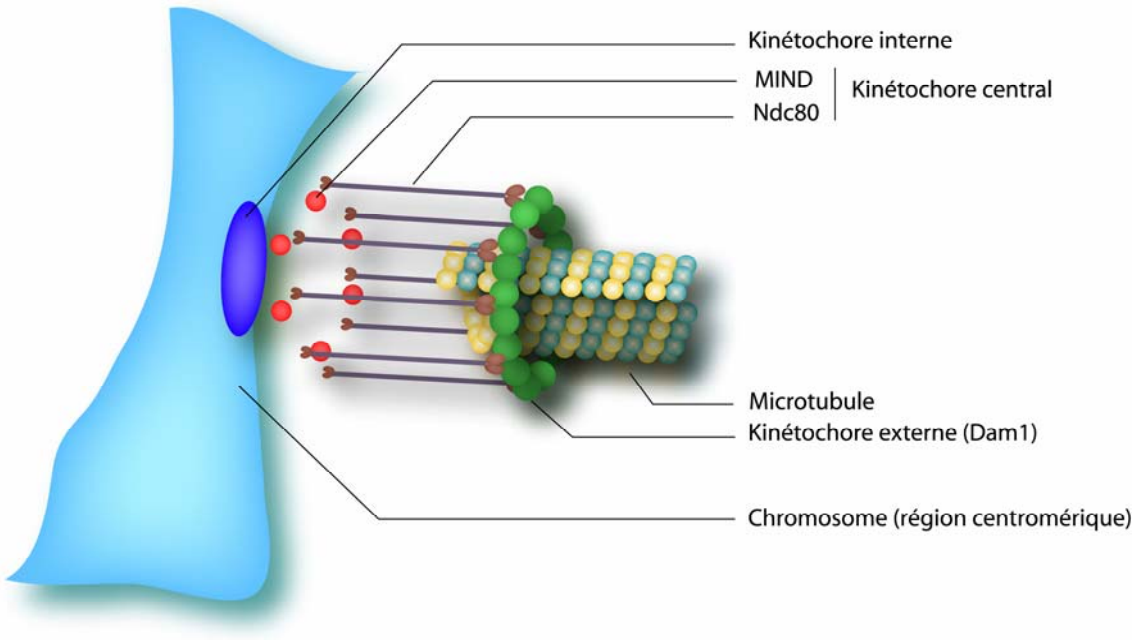


Figure 6 Organisation générale d'un kinétochore.
Le kinétochore interne contient entre autre le complexe CBF3 qui lie la région centromérique du chromosome. Le kinétochore central fait le lien avec le kinétochore externe (ne sont représentés que les complexes MIND et Ndc80). Le kinétochore externe est représenté par l'anneau formé par le complexe Dam1 entourant le bout plus d'un microtubule kinétochorien. Adapté de (Joglekar et al., 2006).

IV.4.5. Organisation du cytosquelette microtubulaire dans la levure

Les microtubules de *S. cerevisiae* sont nucléés à partir des SPBs. Les SPBs sont enchâssés dans l'enveloppe nucléaire. En début de phase G1, il n'y a qu'un SPB et les microtubules astraux irradient dans la cellule. En fin de phase G1, le SPB se duplique, mais les deux SPBs restent liés par un pont. En fin de phase G1 ou début de phase S les deux SPBs se séparent et le fuseau mitotique intranucléaire se forme. Les microtubules astraux émanent des deux SPBs vers la cellule mère et vers le bourgeon. Toutefois, on retrouve plus de microtubules émanant du SPB dirigé vers le bourgeon que de microtubules émanant du SPB

dirigé vers la cellule mère, et ces derniers sont plus courts et plus dynamiques (Liakopoulos et al., 2003). La figure 7 présente les microtubules au cours du cycle de division cellulaire.

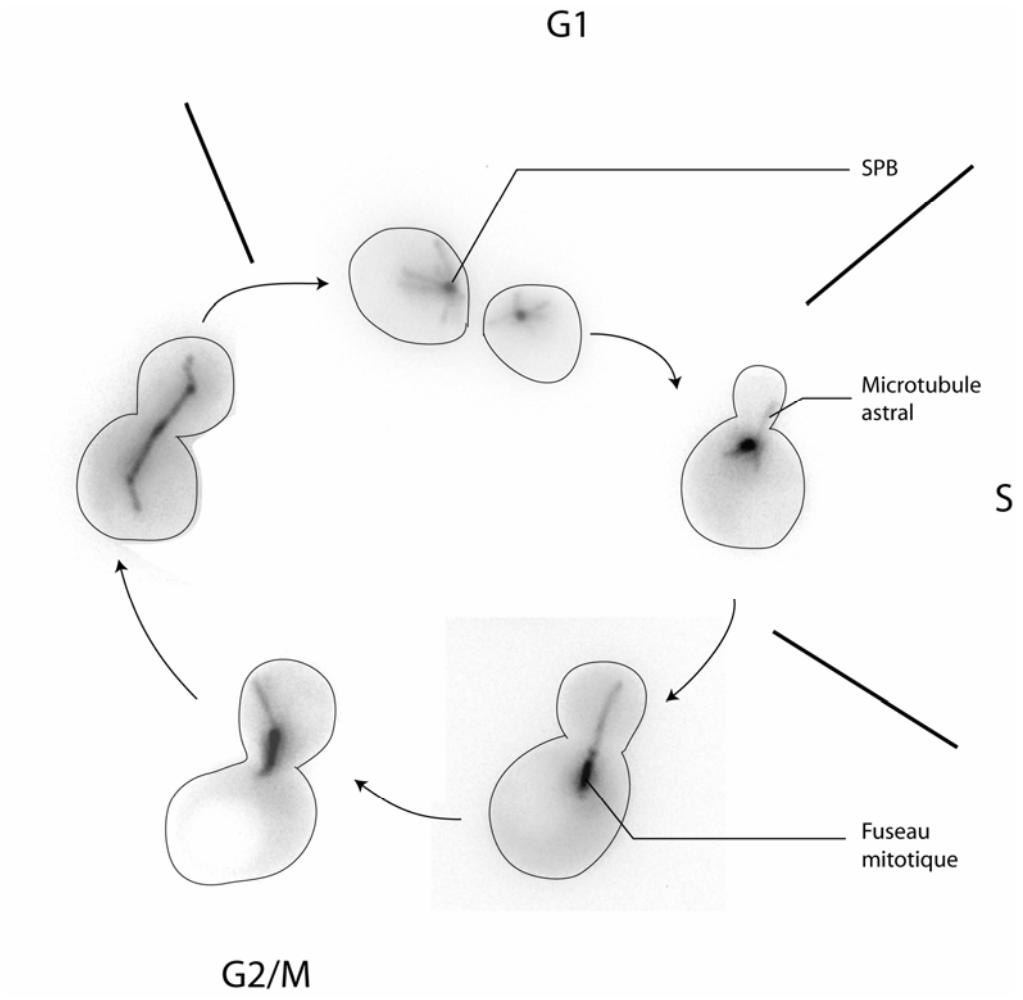


Figure 7. Organisation des microtubules pendant le cycle de *Saccharomyces cerevisiae*.
En G1, les microtubules irradient du SPB (plus foncé). Après duplication du SPB, les microtubules sont préférentiellement orientés vers le bourgeon. Après séparation des SPBs, le fuseau mitotique se forme (plus foncé) et les microtubules cytoplasmiques sont plus longs vers le bourgeon. Le fuseau est d'abord placé vers le cou, puis le SPB dirigé vers le bourgeon est placé au niveau du cou ou bien au travers du cou. Enfin le fuseau s'allonge au travers du cou. Les images sont des projections en deux dimensions d'acquisitions de plusieurs plans focaux. La tubuline est visualisé par l'ajout d'un gène au locus *URA3* exprimant de la tubuline α couplée à la protéine fluorescente GFP.

Le fuseau a été reconstruit à partir d'images prises en microscopie électronique. Il est composé d'environ huit microtubules interpolaires et trente-deux microtubules pouvant lier chacun un kinétochore (Winey et al., 1995). En anaphase B le fuseau s'allonge et contient environ quinze microtubules qui peuvent se chevaucher au milieu du fuseau (Winey et al., 1995).

Alors que les microtubules sont essentiels à la morphogenèse et la mise en place de la croissance polarisée dans la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Hayles and Nurse, 2001), ce n'est pas le cas dans la levure bourgeonnante. Les fonctions essentielles des microtubules sont d'une part de positionner correctement le noyau et d'autre part de former un fuseau mitotique fonctionnel permettant la ségrégation correcte et fidèle des chromosomes. De plus un rôle dans le positionnement du noyau au schmoo pendant la conjugaison et la caryogamie est démontré (Molk et al., 2006).

IV.5. Protéines associées aux microtubules (MAPs)

IV.5.1. Les MAPs classiques

Des protéines s'associent le long des microtubules dans les cellules. Ces protéines ont été initialement identifiées car elles sont co-purifiées avec la tubuline à partir d'extraits de cerveau. Ce sont par exemple les protéines MAP1, MAP2, Tau ou encore STOP. L'interaction de ces protéines avec les microtubules est souvent régulée par phosphorylation. La protéine Tau par exemple est connue pour être phosphorylée (Baudier and Cole, 1987). De plus dans la maladie d'Alzheimer la protéine Tau est hyper phosphorylée et s'agrège (Grundke-Iqbal et al., 1986). La protéine STOP est elle aussi phosphorylée (Baratier et al., 2006; Job et al., 1983). Le KO du gène STOP a montré l'implication de cette MAP dans la plasticité synaptique (Andrieux et al., 2002). L'état phosphorylé de la STOP régule son association avec les microtubules mais aussi l'actine. La phosphorylation de la STOP permettrait de réguler son adressage aux microtubules ou à l'actine entraînant des localisations différentes dans la synapse et *a fortiori* permettant les fonctions de cette protéine (Baratier et al., 2006).

IV.5.2. Les moteurs moléculaires

Un certain nombre de MAP correspond à des moteurs moléculaires. Il s'agit des kinésines et de la dynéine. On peut noter qu'il existe aussi des moteurs moléculaires associés aux microfilaments d'actine, les myosines. Dans les trois cas l'hydrolyse de l'ATP entraîne un changement conformationnel du domaine moteur globulaire qui est ensuite amplifié et traduit en un mouvement avec l'aide de motifs structuraux. Les autres domaines et sous unités sont

responsables de la dimérisation, des régulations et des interactions avec les autres molécules (Schliwa and Woehlke, 2003).

IV.5.2.1. La dynéine

La dynéine a été initialement identifiée dans les axonèmes où elle est responsable du battement des cils et flagelles (Gibbons, 1965). Plus tard, une forme cytoplasmique a été identifiée (Paschal et al., 1987). Il s'agit d'un complexe multi protéique d'un poids moléculaire de 1,2 MDa (Vallee et al., 1988). La structure globale de la dynéine peut se représenter par deux têtes globulaires connectées par deux tiges (Vallee et al., 1988).

La dynéine de mammifères contient deux chaînes lourdes qui possèdent quatre domaines AAA, responsables de l'hydrolyse de l'ATP essentielle au mouvement (Gibbons and Gibbons, 1987). En plus de ces deux chaînes lourdes, la dynéine est composée de trois chaînes intermédiaires, deux chaînes intermédiaires légères et quelques chaînes légères (King, 2000). Leurs rôles respectifs ne sont pas forcément bien définis, toutefois les chaînes intermédiaires participent à l'interaction du moteur avec les organites à déplacer (Paschal et al., 1992; Steffen et al., 1997).

Ces différentes sous-unités peuvent servir à réguler l'activité de la dynéine et il est intéressant que presque toutes ces sous unités puissent aussi être phosphorylées, assurant un autre niveau de régulation (Dillman and Pfister, 1994).

La dynéine intervient dans divers mécanismes. Elle assure le transport rétrograde d'organelles dans les axones (Hirokawa et al., 1990; Vallee et al., 1988). Elle est responsable du transport vésiculaire des endosomes précoces vers les endosomes tardifs *in vitro* (Aniento et al., 1993) et *in vivo* (Valetti et al., 1999). Le maintien de l'intégrité et de la localisation de l'appareil de Golgi et des membranes endosomales dépendent aussi de la dynéine (Burkhardt et al., 1997; Harada et al., 1998).

Chez la levure *S. cerevisiae* (Eshel et al., 1993; Li et al., 1993) mais aussi chez les eucaryotes supérieurs (Reinsch and Gonczy, 1998; Reinsch and Karsenti, 1997) la dynéine cytoplasmique est impliquée dans les phénomènes de migration et positionnement du noyau.

La dynéine joue aussi plusieurs rôles pendant la mitose. Elle serait notamment impliquée dans la rupture de l'enveloppe nucléaire (Salina et al., 2002) ainsi que dans l'assemblage du fuseau mitotique (Heald, 2000).

La dynéine se localise aussi aux kinétochores en pro-métaphase (Echeverri et al., 1996) mais n'est à priori pas nécessaire pour la suite du fonctionnement des kinétochores (Vaisberg et al., 1993). Elle pourrait être requise pour le glissement rapide des chromosomes vers le pôle d'où provient le microtubule (Merdes and De Mey, 1990).

Finalement, la dynéine est impliquée dans des fonctions où le moteur crée du mouvement pour se déplacer lui-même et entraîner avec lui ses cargos. Mais les mécanismes de positionnement et de migration du noyau, par exemple, impliquent que la dynéine soit fixée au cortex. Ainsi, ce sont les microtubules qui sont tirés par l'activité motrice de la dynéine. Son association au cortex pourrait impliquer des protéines corticales (Num1p dans la levure, (Farkasovsky and Kuntzel, 2001)) et un ciblage par les bouts plus de microtubules, mais ces mécanismes ne sont pas clairs chez les eucaryotes supérieurs (Dujardin and Vallee, 2002).

IV.5.2.2. Les kinésines

Il existe un grand nombre de kinésines (Miki et al., 2005). Leur structure générale est le plus souvent une tête globulaire, qui porte l'activité ATPasique, un cou, une tige et une queue. Alors que la tête et le cou varient peu dans une même famille, la tige et la queue varient beaucoup. Généralement lorsque la tête est située au N-terminus, le moteur est dirigé vers le bout plus des microtubules alors que lorsque la tête est au C-terminus, le moteur est dirigé vers le bout moins des microtubules. Quelques kinésines comme KIF2A ou bien les kinésines 13 ont leur tête située au milieu de la protéine.

La nomenclature des kinésines a été récemment harmonisée pour aboutir à quatorze familles de kinésines (1 à 14) plus quelques orphelines (Lawrence et al., 2004).

Les kinésines participent à de nombreuses fonctions dont le transport d'organelles, de complexes protéiques ou d'ARN messagers. Elles interviennent aussi dans les mouvements des chromosomes et du fuseau en mitose et en méiose. Quelques kinésines ont aussi la caractéristique de dépolymériser les microtubules.

IV.5.3. Les protéines de bouts plus

Un nombre croissant de protéines est retrouvé aux bouts plus des microtubules. On peut citer CLIP-170 et la famille des CLIPs, la famille des EB1, les CLASPs, APC, XMAP215, la dynactine p150^{GLUED}, la protéine de lissencéphalie LIS1, des kinésines ou bien encore la dynéine. Leur localisation aux bouts plus des microtubules, et non sur tout le long des microtubules n'est pas encore bien comprise. Plusieurs mécanismes sont proposés. Je discute le cas de CLIP-170 et son homologue Bik1p dans le paragraphe IV.5.3.1.3.

Les bouts plus constituent un site privilégié pour ces protéines. Les microtubules peuvent chercher leurs cibles dans l'espace intracellulaire et contacter les différentes membranes et organelles. Les protéines de bouts plus semblent faire ce lien entre les microtubules et le cortex cellulaire, ou bien en mitose avec les kinétochores.

Certaines de ces protéines ont une propriété intrinsèque de liaison aux bouts plus des microtubules, alors que d'autres suivent ces bouts plus de façon indirecte en liant les premières. De plus, les protéines de bouts plus interagissent souvent entre elles. Ainsi, lorsque l'on enlève une protéine de bouts plus, on modifie la dynamique des microtubules et également la liaison des autres protéines de bouts plus.

IV.5.3.1. CLIPs et protéines à CAP-Gly

IV.5.3.1.1. CLIP-170, découverte et structure

CLIP-170 (Cytoplasmic Linker-170) a été identifiée comme liant spécifiquement des organelles aux microtubules (Pierre et al., 1992), d'où son nom.

Schématiquement, CLIP-170 se structure en un domaine N-terminal qui lie les microtubules, un domaine central en hélices α sur-enroulées et un domaine C-terminal avec un motif en doigt de zinc (figure 8A). Ce dernier domaine est le domaine cargo liant les vésicules endocytaires (Pierre et al., 1992). Le domaine central en hélices α sur-enroulées permet à CLIP-170 de former des dimères parallèles (Lansbergen et al., 2004; Scheel et al., 1999). CLIP-170 contient deux domaines CAP-Gly (Cytoskeletal Associated Protein Glycine rich) en N-ter qui sont responsables de la liaison de CLIP-170 aux microtubules *in vitro* (Pierre et al., 1992; Scheel et al., 1999). Le domaine CAP-Gly est riche en glycine et est

retrouvé dans plusieurs protéines liant les microtubules, telles que CLIP-170, la dynactine ou encore le facteur B de repliement de la tubuline α (Riehemann and Sorg, 1993).

CLIP-170 peut se replier sur elle-même car il existe une interaction entre le N-terminus et les motifs de liaison au zinc ((Lansbergen et al., 2004), et figure 8C). Ce repliement a été observé en 'scanning force microscopy', et mis aussi en évidence par des expériences de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). La YFP (Yellow Fluorescent Protein) a été couplée au N-terminus et la CFP au C-terminus (Cyan Fluorescent Protein). Le transfert d'énergie est mesuré, suggérant une proximité du N-terminus et du C-terminus. De plus ce transfert persiste après dilution, et ne se fait pas entre une protéine YFP-CLIP-170 et une protéine CLIP-170-CFP, démontrant que le FRET observé est dû à un repliement intra moléculaire et non à des interactions entre plusieurs molécules (Lansbergen et al., 2004). Cette auto-inhibition permettrait de réguler les interactions diverses de CLIP-170 avec les microtubules ou ses cargos.

IV.5.3.1.2. Les autres CLIPs et les CLIPs dans l'évolution

Des protéines homologues de CLIP-170 sont présentes dans les levures *S. cerevisiae* (Bik1p) et *S. pombe* (Tip1p). Elles sont différentes de CLIP-170 car elles ne possèdent qu'un domaine CAP-Gly et un motif en doigts de zinc (voir figure 8A). Toutefois la structure générale est la même avec un domaine N-terminal liant les microtubules, un domaine central en hélices sur-enroulées, et un domaine cargo C-terminal (Brunner and Nurse, 2000; Galjart, 2005).

CLIP-115 est une protéine similaire à CLIP-170 mais ne possède pas de motifs en doigt de zinc. Elle est surtout exprimée dans le cerveau chez le rat (De Zeeuw et al., 1997). CLIP-190 est l'homologue de CLIP-170 chez *Drosophila melanogaster* (Dzhindzhev et al., 2005; Lantz and Miller, 1998).

CLIPR59 contient deux domaines CAP-Gly en C-terminus mais ne contient pas de domaine en hélices sur-enroulées ou de motifs en doigts de zinc (Perez et al., 2002). En outre elle contient trois répétitions ankyrine (ankyrin-like repeats). Cette protéine s'associe au réseau trans de l'appareil de Golgi mais n'est pas retrouvée aux bouts plus des microtubules.

CLIPR59 est palmitoylée et cette modification permet son adressage aux rafts lipidiques. Les rafts sont des micro domaines lipidiques riches en cholestérols et sphingolipides (Kurzchalia and Parton, 1999).

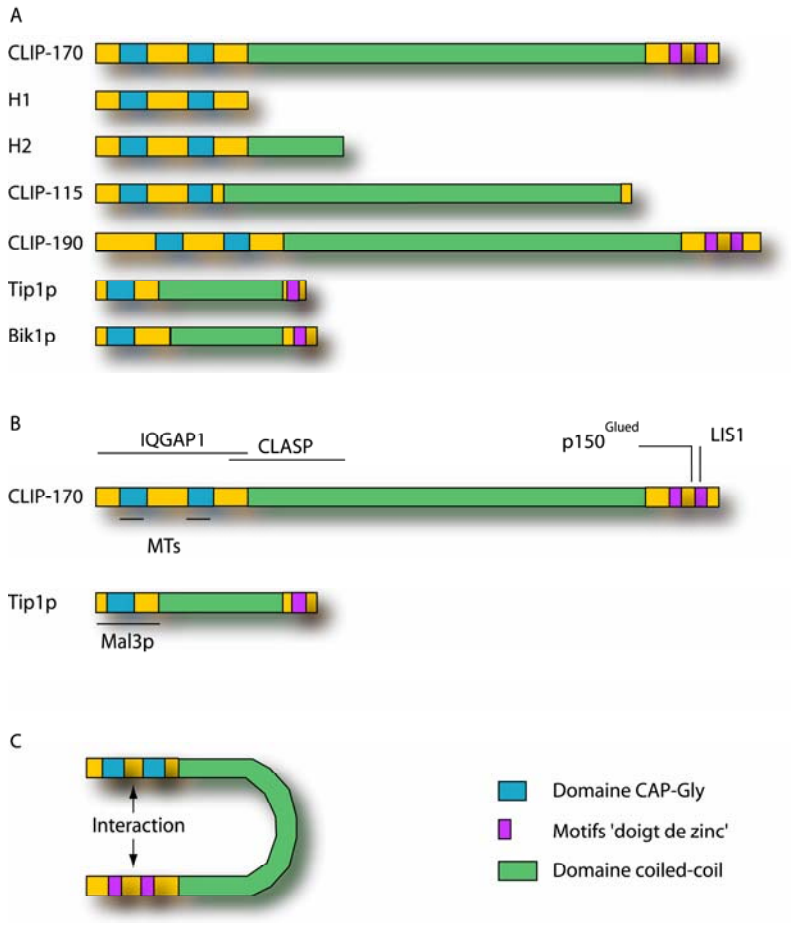


Figure 8. Structure et homologues de CLIP-170
A. Représentation schématique de CLIP-170, de CLIP-115, de leurs homologues CLIP-190 (*Drosophila melanogaster*), Tip1p (*Schizosaccharomyces pombe*), Bik1p (*Saccharomyces cerevisiae*) et des différents domaines H1 et H2 de CLIP-170.
B. Localisation des interactions entre CLIP-170 ou Tip1p et leurs partenaires.
C. Représentation schématique du changement conformationnel de CLIP-170 proposé dans le modèle d'autoinhibition de CLIP-170 (Lansbergen et al., 2004).

IV.5.3.1.3. Localisation de CLIP-170

Dans des cellules en interphase, CLIP-170 se localise aux extrémités plus des microtubules (Pierre et al., 1992; Rickard and Kreis, 1990). L'observation d'une protéine de

fusion GFP-CLIP-170 a permis de montrer que CLIP-170 s'associe en forme de comète aux extrémités plus des microtubules en croissance (Perez et al., 1999).

En pro-métaphase, CLIP-170 est associée aux kinétochores qui lient les chromosomes aux bouts plus des microtubules (Dujardin et al., 1998).

Au moins trois mécanismes permettraient d'expliquer l'association spécifique de CLIP-170 aux bouts plus des microtubules en croissance.

Dans le premier, CLIP-170 pourrait reconnaître les bouts plus et s'y lier spécifiquement. Il peut s'agir d'une conformation spéciale des microtubules, ou bien de la présence de tubuline-GTP. Dans ce cas CLIP-170 peut soit surfer avec les bouts plus, c'est-à-dire que les mêmes protéines suivent la croissance du bout plus, soit rester fixée au microtubule et s'en dissocier lorsque le bout plus s'éloigne. D'autre part, CLIP-170 peut s'assembler avec la tubuline dans le microtubule. Dans ce cas encore, il faut un mécanisme qui enlève CLIP-170 du microtubule. Il peut s'agir d'une différence d'affinité entre CLIP-170 et le bout plus et entre CLIP-170 et la paroi du microtubule formé. On peut aussi penser que CLIP-170 est phosphorylée et que cette phosphorylation soit défavorable ou favorable pour l'interaction.

Le deuxième mécanisme implique que l'interaction spécifique de CLIP-170 avec les bouts plus se fasse via un intermédiaire *in vivo* (autostop ou hitchiking, (Carvalho et al., 2003). Dans ce cas, EB1 est un intermédiaire possible (voir plus loin).

Enfin, un troisième mécanisme a été décrit dans les deux levures *S. cerevisiae* et *S. pombe.* Les homologues de CLIP-170 (Bik1p et Tip1p) sont transportées par des kinésines (Kip2p et Tea2p) vers le bout plus (Busch et al., 2004; Carvalho et al., 2004). Il a donc été proposé que le transport de Bik1p et Tip1p soit déterminant dans leur localisation aux bouts plus des microtubules.

L'importance respective de ces trois mécanismes n'est pas encore définie, et des arguments permettent de penser qu'elles coexistent. Des études *in vitro* on permis de montrer que CLIP-170 co-polymérise avec la tubuline (Arnal et al., 2004; Diamantopoulos et al., 1999; Folker et al., 2005). CLIP-170 semble avoir une affinité beaucoup plus faible pour les microtubules que pour la tubuline libre (Folker et al., 2005) expliquant qu'elle se dissocie des microtubules. Il semble donc que ce mécanisme soit prépondérant. Toutefois Tip1p requiert Mal3p (Busch and Brunner, 2004) et des siRNA dirigés contre EB1 et EB3 réduisent l'association de CLIP-170 aux bouts plus (Komarova et al., 2005). Les comètes CLIP-170

dans les cellules traitées avec des siRNA anti EB1 et EB3 sont plus courtes mais il persiste une localisation aux bouts plus. Ainsi EB1 et EB3 contrôleraient la dissociation de CLIP-170 des bouts plus mais le mécanisme primordial de localisation de CLIP-170 aux bouts plus serait intrinsèque à cette protéine.

Le travail que j'ai réalisé chez *S. cerevisiae* permet de montrer que le transport par Kip2p est un mécanisme d'optimisation, mais qu'il n'est pas le mécanisme prépondérant.

IV.5.3.1.4. Phosphorylation de CLIP-170

CLIP-170 est une protéine phosphorylée (Rickard and Kreis, 1991). L'association de CLIP-170 aux microtubules est réduite lorsque CLIP-170 est phosphorylée (Rickard and Kreis, 1991). Toutefois, CLIP-170 peut aussi être phosphorylée par mTOR (mammalian Target Of Rapamycin, autrement appelée FRAP pour FKBP12-Rapamycin Associated Protein), et dans ce cas sa liaison aux microtubules est favorisée (Choi et al., 2002). Il semble que le même mécanisme s'applique à Bik1p (Choi et al., 2000). Ces données font penser que des phosphorylations différentielles permettent de réguler autant négativement que positivement l'association de CLIP-170 aux microtubules et ainsi réguler finement ses fonctions.

IV.5.3.1.5. Les fonctions de CLIP-170

La localisation de CLIP-170 aux bouts plus des microtubules en fait un régulateur potentiel de la dynamique des microtubules. *In vitro* le domaine H1 de CLIP-170 (figure8A) agit en facteur de sauvetage des microtubules (Arnal et al., 2004).

Ce rôle dans la dynamique microtubulaire est important dans les modèles fongiques. Des données importantes ont été obtenues aussi bien dans *Schizosaccharomyces pombe* que dans *Saccharomyces cerevisiae*.

Schizosaccharomyces pombe

Schizosaccharomyces pombe est un organisme unicellulaire en forme de cylindre. La croissance a lieu aux deux extrémités de ce cylindre (Hayles and Nurse, 2001) et implique les microtubules. Ces microtubules provenant du milieu de la cellule doivent contacter les

extrémités en croissance afin d'y déposer des protéines associées à leurs bouts plus. Dans des cellules *Δtip1* les microtubules croissent jusqu'à toucher le cortex (le plus souvent au milieu de la cellule) et subissent alors une catastrophe. Ils ne sont donc pas capables d'aller jusqu'à l'extrémité de la cellule (Brunner and Nurse, 2000). Tip1p agit comme un facteur anti catastrophe, mais son mode d'action n'est pas bien compris. Le plus étonnant est que dans les cellules *Δtip1* les catastrophes ont toujours lieu au cortex. Il pourrait exister un 'catastropheur' associé au cortex, mais dans les cellules *Δtip1* les catastrophes ont lieu tout le long de la cellule, alors que dans une cellule sauvage, elles ont lieu uniquement aux extrémités cellulaires. Il est possible d'imaginer qu'un facteur va être capable de capter les microtubules aux extrémités cellulaires (où ils font d'ailleurs une pause) et de décharger des protéines dont Tip1p. Les microtubules se retrouvant alors déplétés en Tip1p pourront subir une catastrophe déclenchée ou non par un 'catastropheur'. Il est autrement possible d'imaginer que Tip1p stabilise les microtubules et leur permet de se courber au niveau du cortex, alors que des microtubules sans Tip1p ne seraient pas suffisamment stables pour se courber.

Saccharomyces cerevisiae

Bik1p a été le centre de mon étude, il convient donc de détailler un peu ses caractéristiques. Bik1p exprimée à son niveau endogène et fusionnée à trois GFP se localise aux SPBs, aux kinétochores, ainsi qu'aux bouts plus des microtubules (Carvalho et al., 2003; Lin et al., 2001). Les cellules *bik1Δ* ont des microtubules plus courts que les cellules sauvages (Berlin et al., 1990). Un premier rôle de Bik1p est de positionner la chaîne lourde de la dynéine (Dyn1p) aux bouts plus des microtubules astraux. La dynéine exprimée à son niveau endogène et fusionnée à trois GFP se localise aux SPBs ainsi qu'aux bouts plus des microtubules (Lee et al., 2003; Sheeman et al., 2003). L'invalidation de Bik1p abolie l'association de la dynéine avec les SPBs et les bouts plus des microtubules (Sheeman et al., 2003). De plus, lorsque la partie C-terminale de Bik1p correspondant au domaine cargo est enlevée, la dynéine n'est pas localisée aux bouts plus des microtubules astraux (Sheeman et al., 2003). Plus récemment, le groupe de David Pellman a montré le ciblage de Bik1p vers les bouts plus des microtubules par la kinésine Kip2p (Carvalho et al., 2004). En effet dans des cellules *kip2*Δ, l'association de Bik1p est nettement réduite. Ceci va de paire avec une réduction de l'association de Dyn1p aux bouts plus des microtubules (Carvalho et al., 2004). Sur la base de ces résultats il a été proposé que Kip2p cible la dynéine aux bouts plus des

microtubules, Bik1p servant de lien entre Kip2p et Dyn1p. La capacité de Dyn1p de s'associer avec les bouts plus des microtubules dépend ensuite de Bik1p. Les auteurs proposent que Bik1p ancre directement la dynéine aux bouts plus des microtubules (Sheeman et al., 2003).

Bik1p a aussi été impliqué dans des fonctions du fuseau mitotique. Tout d'abord en anaphase pendant l'élongation du fuseau (Pellman et al., 1995). D'autre part, l'utilisation de mutants ayant une expression réduite de *BIK1* suggère un rôle de Bik1p dans la duplication du SPB, la séparation des SPBs ou bien l'élongation du fuseau (Strawn and True, 2006). Enfin Bik1p participe aux fonctions des kinétochores et est essentielle dans les cellules polyploïdes (Lin et al., 2001).

Mammifères

Le premier rôle décrit pour CLIP-170 est de permettre un lien entre des vésicules d'endocytose et les microtubules (Pierre et al., 1992).

CLIP-170, de la même façon que ses homologues dans les deux levures, est importante pour faire le lien entre les bouts plus des microtubules et leurs cibles.

La capture des microtubules au 'leading edge' (le 'leading edge' correspond au front de migration de la cellule) fait intervenir CLIP-170. D'une part, avec les CLASPs (voir paragraphe IV.5.3.4.), mais aussi par l'intermédiaire d'IQGAP1. IQGAP1 est capable de lier CLIP-170, mais aussi les formes actives (liant du GTP) des petites protéines G Cdc42 et Rac1. Ces petites protéines G sont importantes pour la formation des 'leading edges' qui représentent des structures polarisées dans une cellule. Dans ces structures Cdc42 et Rac1 sont actives et pourraient former des sites d'ancrage pour les bouts plus des microtubules *via* IQGAP1 et CLIP-170 (Fukata et al., 2002).

Enfin, CLIP-170 peut lier d'autres protéines dont LIS1, EB1, CLASP, $p150^{GLUED}$ (la figure 8B représente schématiquement les sites de liaison de ces protéines à CLIP-170). Ces interactions sont certainement importantes fonctionnellement, notamment aux bouts plus des microtubules. Les interrelations entre ces protéines sont complexes, mais à priori elles formeraient un réseau de protéines capables de lier les bouts plus des microtubules et réguler leur association avec des cibles, associations essentielles aux fonctions des microtubules.

IV.5.3.2. Les autres protéines à CAP-Gly

IV.5.3.2.1. Facteur de repliement de la tubuline α (Alf1p)

Les cofacteurs B (Alf1p) et E (Pac2p) de la tubuline α contiennent tout deux un domaine CAP-Gly (Feierbach et al., 1999). Ce domaine CAP-Gly est essentiel à l'interaction de Alf1p avec le monomère de tubuline α. Ce domaine semble donc important pour replier correctement la tubuline α et former ainsi un dimère de tubuline fonctionnel.

IV.5.3.2.2. p150^{GLUED}

p150^{GLUED} appartient au complexe dynactine. La dynactine est un complexe protéique dont l'activité permet des transports longs de vésicules par la dynéine le long des microtubules *in vitro* (Schroer and Sheetz, 1991). Elle est constituée de 11 protéines qui forment un complexe de 1,2 MDa. Sa structure est celle d'un cylindre et d'une extension flexible, dont p150^{GLUED} (Schroer, 2004).

p150^{GLUED} a été le premier constituant de la dynactine cloné et séquencé (Swaroop et al., 1987). Elle lie les microtubules *in vitro* (Waterman-Storer et al., 1995) et *in vivo* (Vaughan et al., 2002). Elle peut aussi lier de nombreux partenaires dont des constituants du complexe dynactine et aussi EB1 et CLIP-170 (Askham et al., 2002; Berrueta et al., 1999; Bu and Su, 2003; Ligon et al., 2003). Elle possède un domaine CAP-Gly en N-terminus et des régions en hélices sur-enroulées (Schroer, 2004).

p150^{GLUED} est localisée aux centrosomes et SPBs (Gill et al., 1991; Kahana et al., 1998; Paschal et al., 1993), aux bouts plus des microtubules (Valetti et al., 1999; Vaughan et al., 1999), au cortex cellulaire (Busson et al., 1998; Gonczy et al., 1999; Skop and White, 1998) ainsi que dans des endomembranes (Habermann et al., 2001). Sa localisation aux centrosomes et SPBs lui confèrerait un rôle dans l'ancrage des microtubules (Quintyne et al., 1999). Son association aux bouts plus des microtubules est un lieu idéal pour contrôler la dynamique des microtubules ou y recruter d'autres structures (des protéines, des endomembranes ou le cortex de la cellule). Son association au cortex a été impliquée dans les mouvements rotationnels du fuseau mitotique, donc dans le positionnement de ce fuseau (Busson et al., 1998; Gonczy et al., 1999; Skop and White, 1998), ou bien dans la motilité de la cellule (Dujardin et al., 2003).

Dans l'ensemble p150^{GLUED} et le complexe dynactine sont impliqués dans la régulation de l'activité motrice de la dynéine et ses fonctions.

IV.5.3.4. CLASPs

Les CLASPs (CLIP Associated Protein, CLASP1 et CLASP2) ont été identifiées dans un crible double hybride avec la région en hélices sur-enroulées de CLIP-115 (Akhmanova et al., 2001). Elles se localisent à l'appareil de Golgi par la palmitoylation de cystéines, aux centrosomes, aux bouts plus des microtubules ainsi qu'au cortex (Akhmanova et al., 2001; Lansbergen et al., 2006; Mimori-Kiyosue et al., 2005). Cette localisation aux bouts plus est régulée par une phosphorylation faisant intervenir la voie de la PI3 kinase et GSK3β. En effet la liaison de CLASP aux microtubules est inhibée *in vitro* par phosphorylation (Akhmanova et al., 2001) et *in vivo* en exprimant une forme constitutivement active de GSK3β (Wittmann and Waterman-Storer, 2005). Les CLASPs sont enrichies aux bouts plus des microtubules présents dans le 'leading edge' des fibroblastes. Elles semblent réguler finement la dynamique des microtubules afin de médier l'interaction des microtubules avec le cortex. C'est dans la région très proche du cortex (1 µm) que les CLASPs, en régulant la dynamique microtubulaire, retiendraient les microtubules afin de favoriser les interactions. Ce mécanisme fait aussi intervenir EB1 et EB3 qui lient les CLASPs (Mimori-Kiyosue et al., 2005).

Les éléments corticaux de cette interaction ont été identifiés, il s'agit de LL5β et ELKS (Lansbergen et al., 2006). LL5β est une protéine corticale qui a un domaine d'homologie avec la pleckstrine. Ce domaine lie le PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate), permettant l'adressage de LL5β à la membrane. LL5β se localise précisément dans les zones corticales du 'leading edge' et des plaques focales d'adhésion. ELKS jouerait plutôt un rôle d'échafaudage pour assembler des sites d'attachement à la membrane. Dans des cellules traitées avec un siRNA dirigé contre ELKS, LL5β est toujours localisée au cortex mais de façon plus diffuse que dans les cellules contrôles (Lansbergen et al., 2006). Le modèle de l'interaction des microtubules avec le cortex proposé par Lansbergen *et al* est repris dans la figure 9.

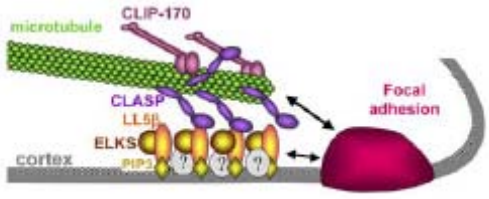


Figure 9. Modèle de l'attachement des microtubules au cortex par les CLASPs, LL5β et ELKS.
Les CLASPs interagissent avec les microtubules en croissance et sont aussi en contact avec le cortex par leur association avec LL5β. ELKS participe à la formation des complexes LL5β à la membrane qui sont recrutés par des PIP3 ainsi que d'autres partenaire (points d'interrogation). Le schéma représente aussi l'association des CLASPs avec CLIP-170 qui n'est pas impliquée dans l'attachement au cortex LL5β dépendant. Tiré de (Lansbergen et al., 2006).

Orbit/Mast (homologue de CLASP chez *Drosophila melanogaster*) a été impliqué dans des phénomènes de polarisation. Pendant l'ovogenèse elle participe à l'organisation des microtubules qui interconnectent l'ovocyte avec les cellules nourricières (Mathe et al., 2003). Pendant la mitose, elle participe au maintien de la bipolarité du fuseau mitotique, à l'attachement des kinétochores aux microtubules et à la congression des chromosomes (Maiato et al., 2003; Maiato et al., 2002). Un autre rôle impliquant des phénomènes de polarisation a été montré dans la guidance axonale au niveau des cônes de croissance (Lee et al., 2004).

IV.5.3.6. LIS1

Le nom donné à cette protéine réfère à son implication dans des dysplasies corticales appelée lissencéphalie. Cette maladie est caractérisée entre autres par un cortex cérébral épais, une réduction de profondeur des scissures et une absence de circonvolutions (donnant un aspect lisse au cerveau). Ceci est lié à un défaut de migration neuronale radiale (Alvarez et al., 1986). LIS1 est localisée aux bouts plus des microtubules dans la cellule. De plus LIS1 et CLIP-170 interagissent aussi bien en double hybride qu'en test *in vitro* avec des protéines recombinantes ou bien en co immunoprécipitation (Coquelle et al., 2002). LIS1 interagit aussi avec le complexe dynéine dynactine (Faulkner et al., 2000; Smith et al., 2000). Elle est aussi localisée aux kinétochores en pré métaphase (Faulkner et al., 2000). La localisation de LIS1 aux kinétochores nécessite le complexe dynéine dynactine et pourrait recruter à son tour CLIP-170 (Coquelle et al., 2002).

L'homologue de LIS1 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* est la protéine Pac1p. Pac1p est retrouvée aux bouts plus des microtubules et participe au positionnement de la dynéine aux bouts plus des microtubules (Lee et al., 2003).

IV.5.3.3. La famille EB1

EB1 a été initialement identifiée en recherchant les partenaires de la partie C-terminale d'APC (Adenomatous Polyposis Coli) en crible double hybride, (Su et al., 1995). APC est une protéine dont le C-terminus est fréquemment tronqué dans les formes familiales et sporadiques des carcinomes coliques (Kinzler and Vogelstein, 1996).

Il existe des homologues de EB1 chez *Saccharomyces cerevisiae* (Bim1p pour Bind to Microtubule, (Schwartz et al., 1997)), chez *Schizosaccharomyces pombe* (Mal3p, (Beinhauer et al., 1997)). *Caenorhabditis elegans* a deux homologues et *Drosophila melanogaster* au moins trois. Chez l'homme il existe au moins EB1, EB2, EB3 et EBF3 ainsi que des protéines similaires RP1, RP2 et RP3.

EB1 et ses homologues se lient aux bouts plus des microtubules en croissance, au centrosome et aux kinétochores (Tirnauer et al., 2002). Chez *Saccharomyces cerevisiae* Bim1p se lie aux bouts plus des microtubules en croissance et en décroissance, au fuseau mitotique et aux SPBs (Schwartz et al., 1997; Tirnauer et al., 1999; Wigge et al., 1998; Wolyniak et al., 2006). Lorsque Bim1p est sur-exprimée, elle est aussi retrouvée le long des microtubules (Schwartz et al., 1997).

Récemment, il a été montré que Mal3p se lie spécifiquement à la suture des microtubules. La suture est le site le plus fragile de la paroi d'un microtubule. La liaison spécifique de Mal3p à la suture pourrait être déterminante pour le contrôle de la stabilité des microtubules (Sandblad et al., 2006).

Les fonctions de EB1 sont variées. Tout d'abord l'invalidation de *BIM1* chez *S. cerevisiae* réduit la dynamique microtubulaire en G1, mais pas en préanaphase ou en anaphase (Tirnauer et al., 1999). Une fonction bien établie de Bim1p est de lier les microtubules à l'actine afin de les orienter vers la cellule fille et participer ainsi au positionnement du fuseau ((Schwartz et al., 1997), détaillé plus loin). Bim1p participe aussi à la fusion des noyaux (caryogamie, (Schwartz et al., 1997)).

Chez les mammifères, la mélanophiline et la myosine Va sont localisées en partie aux bouts plus des microtubules de façon EB1 dépendante (Wu et al., 2005). Les auteurs de cette étude suggèrent que EB1 pourraient servir de liant aux bouts plus des microtubules pour la mélanophiline et la myosine Va afin de cibler ces protéines vers les extensions dendritiques. Dans ces régions les mélanosomes seraient pris en charge grâce à la myosine par l'actine. Les mélanosomes correctement ciblés pourraient alors être transférés vers les kératinocytes, permettant alors une pigmentation normale (Wu et al., 2005).

Récemment les fonctions de EB1 dans le fuseau mitotique ont été testées. Le suivi des chromosomes après interférence ARN de EB1 a mis en évidence un rôle de EB1 dans l'alignement des chromosomes en métaphase et ensuite dans la ségrégation des chromosomes. EB1 ne semble pas participer à l'accrochage des microtubules aux kinétochores mais de façon intéressante les défauts liés à l'interférence ARN de EB1 ne sont pas détectés par les points de contrôle du fuseau mitotique, ce qui pourrait entraîner une aneuploïdie (Draviam et al., 2006). Une autre étude a analysé les conséquences de la microinjection d'anticorps anti EB1 ou bien de formes de EB1 tronquées (pour abolir l'interaction de EB1 avec APC ou $p150^{GLUED}$) dans des œufs d'oursin. Cette étude a révélé un rôle de EB1 dans la stimulation de la cytocinèse et le contrôle de l'élongation des microtubules astraux en anaphase (Strickland et al., 2005).

IV.5.3.5. APC

APC est un gène muté dans 80% des cancers colo-rectaux (Bienz, 2002; Kinzler and Vogelstein, 1996; Nagase and Nakamura, 1993). De plus, APC est muté de façon précoce dans la plupart des tumeurs sporadiques. Globalement, quatre types de localisations sont décrits pour APC. Les deux premières localisations sont dans le cytoplasme et le noyau. Dans ce cas APC est impliqué dans la régulation de la voie Wnt en agissant sur la β caténine (Bienz, 2002). APC est aussi retrouvée associée à la membrane plasmique. Cet adressage à des sites bien précis de la membrane (jonctions adhérentes) est mis en jeu lors du positionnement du noyau dans un épithélium de *Drosophila melanogaster* (Lu et al., 2001). Ce mécanisme permet de maintenir des mitoses symétriques. APC est aussi associé à la migration des cellules. Tout d'abord, APC est localisée au 'leading edge' des cellules en migration et ceci dépend d'un réseau microtubulaire intact (Nathke et al., 1996). Des microtubules sont stabilisés dans le 'leading edge'. Cette stabilisation peut être induite par

l'ajout d'acide lysophosphatidique (LPA) dans le milieu, qui active RhoA et la formine mDIA (Cook et al., 1998; Palazzo et al., 2001). Les protéines APC et EB1 sont requises pour cette stabilisation locale des microtubules, importante dans la migration cellulaire (Wen et al., 2004).

Le suivi d'une protéine de fusion GFP-APC en microscopie a permis de montrer qu'APC est aussi localisé aux bouts plus des microtubules. De plus des grains de fluorescence ont été observés le long des microtubules. Ces grains semblent se mouvoir vers les bouts plus suggérant un ciblage actif d'APC vers les bouts plus (Mimori-Kiyosue et al., 2000).

Finalement APC est impliquée au kinétochore. Des mutations d'APC entraînent une instabilité chromosomique (Fodde et al., 2001). L'interférence ARN d'APC pendant la mitose a les mêmes conséquences que celle de EB1 décrite plus haut, c'est-à-dire dans l'alignement des chromosomes en métaphase et ensuite dans la ségrégation des chromosomes (Draviam et al., 2006).

Chez *Saccharomyces cerevisiae,* l'homologue fonctionnel d'APC est la protéine Kar9p (Barral, 2003). Kar9p est localisée aux bouts plus des microtubules, via Bim1p, ainsi qu'aux SPBs.

Kar9p est localisée de façon asymétrique, s'associant préférentiellement avec le SPB dirigé vers le bourgeon, qui correspond au vieux SPB (Liakopoulos et al., 2003; Maekawa et al., 2003; Pereira et al., 2001),. Cette localisation asymétrique pourrait dépendre de la phosphorylation de Kar9p par le complexe Cdc28p-Clb4p au niveau du SPB dirigé vers la cellule mère (Liakopoulos et al., 2003).

Récemment la tubuline γ (Tub4p) a été impliquée dans l'assemblage des complexes Bim1p-Kar9p au SPB. Le SPB est alors proposé, avec Tub4p, comme une plateforme permettant de former des complexes protéiques adéquats qui ensuite sont ciblés aux bouts plus des microtubules astraux dirigés vers le bourgeon pour établir leurs fonctions (Cuschieri et al., 2006).

D'autre part Kar9p est capable de lier la myosine de type V Myo2p (Yin et al., 2000). Ainsi les bouts plus des microtubules astraux sont reliés aux câbles d'actine par un complexe Bim1p-Kar9p-Myo2p (discuté dans le paragraphe IV.5.3.9.).

IV.5.3.7. ACF7/BPAG1

ACF7 (Actin Crosslinking Family 7) est une protéine appartenant à la famille des spectraplakines liant aussi bien les microtubules que l'actine (Karakesisoglou et al., 2000; Sun et al., 2001). Elle s'accumule aux bouts plus des microtubules, surtout au 'leading egde' des cellules en migration (Kodama et al., 2003). L'invalidation génique de ACF7 entraîne des défauts de la migration cellulaire. Dans ces cellules les microtubules ne s'arrêtent pas lorsqu'ils contactent le cortex mais continuent de croître en se courbant et longeant la membrane (Kodama et al., 2003). ACF7 semble donc importante dans l'interaction des bouts plus des microtubules avec le cortex.

IV.5.3.8. Moteurs moléculaires

Un certain nombre de moteurs moléculaires s'associent spécifiquement avec les bouts plus des microtubules. On peut citer la dynéine, des kinésines 14 dirigées vers le bout moins (Kar3p chez *S. cerevisiae*, ATK chez *Arabidopsis thaliana*), des kinésines 7 dirigées vers le bout plus (Kip2p chez *S. cerevisiae*, Tea2p chez *S. pombe* et KipA chez *A. nidulans*), des kinésines 13 dépolymérisant les microtubules (KLP10A et KLP59C chez *D. melanogaster*, MCAK chez l'homme et le hamster), ou encore des myosines V (Myo2p chez *S. cerevisiae*, myosine Va chez *Mus musculus,* (Wu et al., 2006)).

Les détails de la localisation de la dynéine aux bouts plus seront discutées plus loin. Cet adressage permet de cibler la dynéine vers des sites corticaux afin qu'elle y soit ancrée et puissent être activée afin de tirer sur les microtubules et positionner correctement le fuseau mitotique (Carvalho et al., 2004; Lee et al., 2003; Sheeman et al., 2003). Chez les mammifères, cet adressage aux bouts plus permettrait de favoriser l'interaction de la dynéine et ses partenaires avec des vésicules qui, lorsque la dynéine est activée, seraient transportées vers l'extrémité moins des microtubules (Lansbergen et al., 2004; Vaughan et al., 2002).

Kar3p se localise aux bouts plus des microtubules et permet leur ancrage et leur dépolymérisation à l'extrémité du schmoo (la forme particulière de la levure pendant la conjugaison). Ceci permet de positionner correctement le noyau, afin qu'ensuite, il fusionne avec le noyau de l'autre cellule haploïde (Maddox et al., 2003; Sproul et al., 2005).

Kip2p se localise aux bouts plus et semble importante pour l'adressage de certaines protéines aux bouts plus (Bik1p, Dyn1p, Kar9p, (Carvalho et al., 2004; Maekawa and Schiebel, 2004).

Les bouts plus des microtubules interagissent donc avec plusieurs protéines qui permettent de réguler d'une part le comportement des microtubules, mais de façon plus importante l'interaction des microtubules avec ses cibles, que ce soit au cortex ou bien les kinétochores. Il est intéressant de noter que les mêmes protéines semblent impliquées dans la capture au cortex et la capture des kinétochores. Des régulations spécifiques locales et/ou temporelles doivent certainement intervenir. Des relations complexes entre ces différentes protéines semblent aussi intervenir expliquant les recherches intensives sur les bouts plus des microtubules. Sérier les mécanismes de ciblages aux bouts plus et les fonctions de chaque protéine permettra ensuite d'intégrer ces résultats dans un schéma général des bouts plus des microtubules.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée extensivement afin comprendre ces mécanismes. L'interaction des bouts plus des microtubules avec le cortex sert à positionner le fuseau. Les mécanismes mis en jeux sont maintenant bien décrits et un modèle moléculaire proposé. Pour conclure la présentation des protéines liant les bouts plus, je vais décrire ces mécanismes de positionnement du fuseau, qui ont fait l'objet de mon travail au cours de ma thèse.

IV.5.3.9. Mécanismes de positionnement du fuseau dans *S. cerevisiae*

Des premières observations ont montré que le noyau migre vers le cou avant l'anaphase, qu'un SPB se situe alors au niveau du cou ou bien est passé à travers, et qu'en anaphase le fuseau peut s'allonger (Pringle J.R. et al., 1997). Des mouvements du noyau de la cellule mère vers la cellule fille et inversement avant l'anaphase, appelés alors 'bulk chromosome transition', ont été observés (Palmer et al., 1989). Très vite, les microtubules ont été impliqués dans le positionnement du noyau (Huffaker et al., 1988; Jacobs et al., 1988) et plus précisément les microtubules astraux (Sullivan and Huffaker, 1992). Le cytosquelette d'actine est aussi alors requis dans ce mécanisme (Palmer et al., 1992). Les acteurs

moléculaires de ce mécanisme de positionnement ont alors été recherchés et sont maintenant bien décrits (pour revue récente, voir (Huisman and Segal, 2005)).

Deux voies redondantes génétiquement ont été décrites. L'invalidation d'un des composant d'une voie n'est pas létale. En revanche, l'invalidation d'un élément de chaque voie est létale pour la cellule. On distingue ainsi les voies Kar9 et dynéine dont les mécanismes sont schématisés sur la figure 10. Ce schéma sépare délibérément les deux mécanismes afin de montrer leur séparation génétique.

Le premier mécanisme implique les protéines Bim1p, Kar9p, Myo2p, Kip3p, l'actine, Bni1p et Bud6p. Il permet de positionner le noyau et le fuseau mitotique dans l'axe cellule mère-bourgeon, et à proximité du cou. Bim1p, Kar9p et Myo2p forment un complexe qui permet d'établir un lien entre les bouts plus des microtubules et les câbles d'actine (figure 10B). Les microtubules sont alors ciblés vers le bourgeon par la myosine et ils peuvent interagir avec le cortex (Korinek et al., 2000; Lee et al., 2000). Ce modèle a été clairement argumenté par deux découvertes. La première est qu'une protéine de fusion Bim1p-Myo2p supprime les défauts d'orientation du fuseau des cellules *kar9*Δ. L'autre est le fait que l'utilisation de mutants de la myosine de type V, qui codent pour des versions moins rapides du moteur, entraîne un ralentissement de la progression des microtubules vers le bourgeon (Hwang et al., 2003).

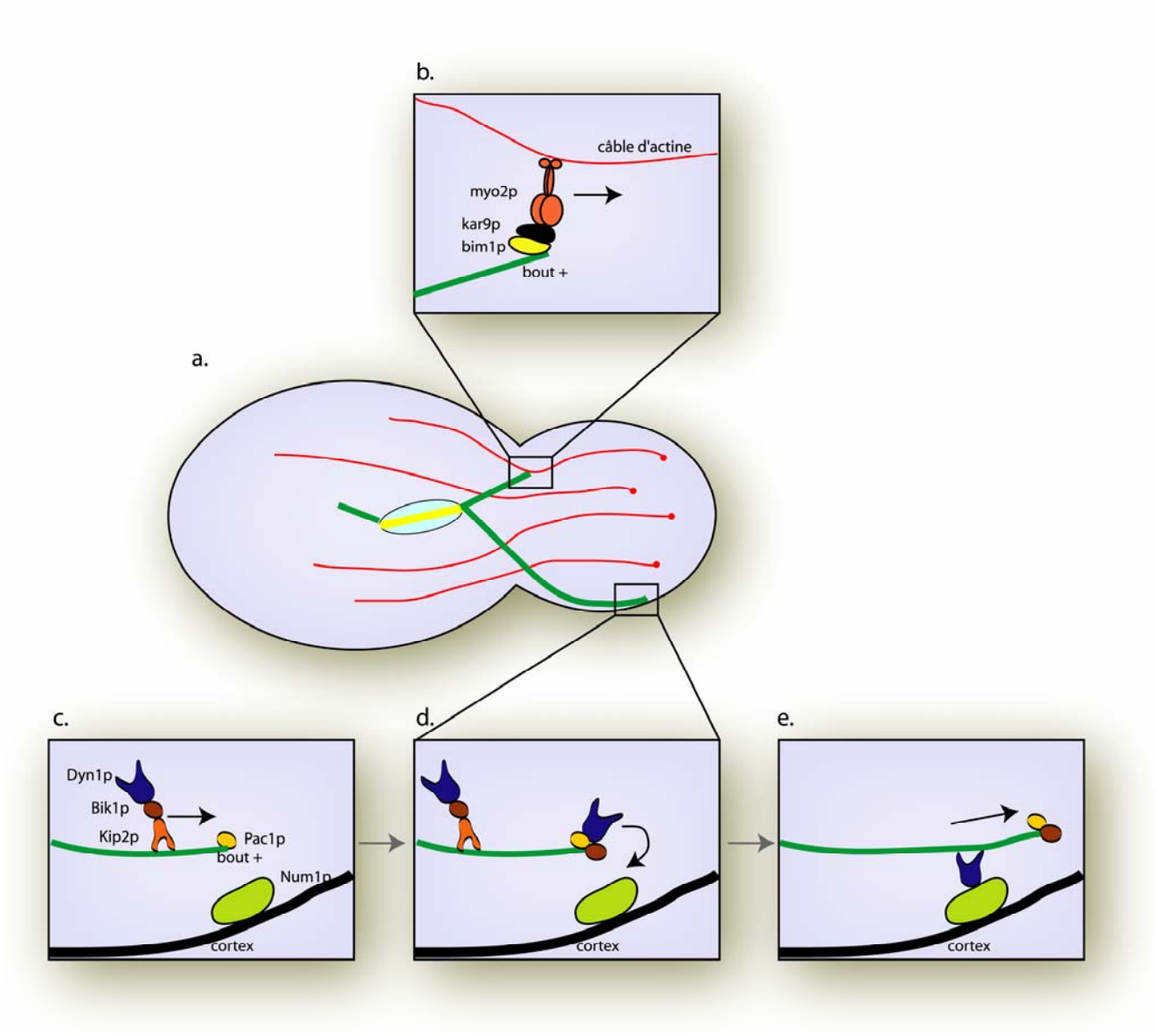


Figure 10. Mécanismes moléculaires de positionnement et migration du noyau.
L'organisation des cytosquelettes d'actine et des microtubules sont repris dans le schéma a. b. L'interaction des bouts plus des microtubules avec les câbles d'actine via le complexe Bim1p-Kar9p-Myo2p appartenant à la voie Kar9p. c, d, e. Etapes de la voie dynéine. La dynéine est ciblée activement aux bouts plus des microtubules par la kinésine Kip2p et Bik1p (c). La dynéine est aux bouts plus et cette étape requière les protéines Pac1p et Bik1p. La dynéine est transférée des bouts plus des microtubules vers le cortex où elle s'ancre via la protéine Num1p (d). Lorsque la dynéine est ancrée au cortex, elle est activée et peut tirer sur les microtubules pour positionner le noyau (e).

Le deuxième mécanisme implique les protéines Bik1p, Kip2p, Dyn1p, Num1p.

La chaîne lourde de la dynéine de levure a été identifiée en 1993 (Eshel et al., 1993; Li et al., 1993). Son invalidation génique conduit à des perturbations du positionnement du noyau et l'apparition fréquente (surtout à 10°C) de cellules en mitose possédant les deux noyaux séparés dans la cellule mère.

La dynéine est tout d'abord ciblée vers les bouts plus des microtubules. Elle est ensuite transférée vers le cortex du bourgeon où elle est activée et peut tirer sur les microtubules qui entraînent alors le noyau vers le bourgeon (Carminati and Stearns, 1997; Lee et al., 2003; Sheeman et al., 2003). Les questions posées par ce modèle sont comment un moteur dirigé vers le bout moins des microtubules est ciblé aux bouts plus des microtubules, comment elle est ensuite ancrée au cortex et les régulations de ces étapes.

Le ciblage de la dynéine aux bouts plus des microtubules fait intervenir plusieurs partenaires. Pac1p est essentielle au ciblage de la dynéine aux bouts plus (Lee et al., 2003). Ndl1p, un homologue de Nudel, qui interagit avec Pac1p semble aussi participer à ce ciblage (Li et al., 2005). Enfin, Bik1p et la kinésine Kip2p sont aussi importantes dans ce mécanisme. Kip2p cible activement Bik1p vers les bouts plus des microtubules (Carvalho et al., 2004). L'invalidation de *Kip2* entraîne une nette diminution de la quantité de Bik1p et Dyn1p aux bouts plus des microtubules. D'autre part Bik1p est absolument requise pour l'interaction de la dynéine avec les bouts plus (Sheeman et al., 2003). En effet dans des cellules *bik1Δ*, Dyn1p est absente des bouts plus des microtubules.

Jusqu'à présent, les modèles proposés sont que Bik1p et Kip2p transportent Dyn1p vers les bouts plus (figure 10C). Aux bouts plus Bik1p et Pac1p (et Ndl1p dans une moindre mesure) ancrent la dynéine (figure 10D). Mon travail a permis de montrer que le ciblage par la kinésine est important, mais que la présence de Bik1p aux bouts plus n'est pas requise. Toutefois la présence de Bik1p dans la cellule est essentielle.

La dynéine est préférentiellement associée aux SPBs et bouts plus des microtubules astraux dirigés vers la cellule fille. Cette asymétrie fait intervenir Cdc28p avec les cyclines Clb1p et Clb2p. De façon intéressante, l'asymétrie de la localisation de la dynéine semble se faire lorsque les microtubules astraux contactent le cou. Ainsi l'activité dynéine serait déterminée par le cou, qui occupe une place centrale dans la cellule et cette régulation apporte un déterminant spatial efficace afin de positionner le fuseau au milieu de la cellule (Grava et al., 2006).

La dernière étape est le transfert de la dynéine vers le cortex (figure 10E). Cette étape n'a pas vraiment été visualisée. Les premières conclusions viennent du fait que le glissement des microtubules astraux le long du cortex nécessite la dynéine (Carminati and Stearns, 1997), ainsi que Num1p (Heil-Chapdelaine et al., 2000). Num1p est une protéine associée au cortex via un domaine d'homologie à la pleckstrine qui lie les phosphatidyl-inositol-4,5-biphosphate

(Farkasovsky and Kuntzel, 1995; Kormanec et al., 1991). Num1p co-immuno précipite avec la chaîne intermédiaire de la dynéine Pac11p, et ceci requière la présence de la chaîne lourde de la dynéine (Farkasovsky and Kuntzel, 2001). Un autre argument, allant dans le sens d'un dépôt de la dynéine aux sites corticaux comprenant Num1p, est le fait que dans les souches *num1*Δ, la dynéine s'accumule davantage aux bouts plus des microtubules que dans les souches sauvages (Lee et al., 2003; Sheeman et al., 2003). Ceci est aussi vrai dans des souches invalidées pour les gènes *JNM1* et *NIP100*, deux sous-unités de la dynactine, et favorise ainsi un transfert de la dynéine des bouts plus des microtubules vers le cortex.

IV.6. Modifications post traductionnelles de la tubuline

Le chapitre précédent permet de montrer que les protéines associées aux microtubules permettent de réguler leurs fonctions. Un autre moyen est de modifier la tubuline elle-même afin d'obtenir différentes populations de microtubules qui pourront avoir des propriétés différentes ou des affinités différentes pour les protéines qui leur sont associées. Ainsi les microtubules peuvent être acétylés, palmitoylés, polyglycylés, polyglutamylés, phosphorylés ou encore détyrosinés.

IV.6.1. Acétylation, palmitoylation, polyglycylation et polyglutamylation

IV.6.1.1. Acétylation

La lysine 40 en N-terminal de la tubuline α peut être acétylée. Ce groupement est greffé par une acétyltransférase inconnue et peut être enlevé par une déacétylase (HDAC6 et SIRT2). Le rôle de cette modification est peu connu, le blocage de l'acétylation n'entraînant pas de phénotype majeur chez *Tetrahymena thermophila* (Gaertig et al., 1995). Toutefois récemment l'acétylation de la tubuline a été impliquée dans l'interaction de la kinésine 1 avec les microtubules *in vitro* et dans les neurites (Reed et al., 2006).

IV.6.1.2. Palmitoylation

La palmitoylation de la tubuline consiste en l'ajout d'un acide palmitique sur la cystéine 376 de la tubuline α (Caron, 1997; Ozols and Caron, 1997). La mutation de cette cystéine dans *S. cerevisiae* entraîne des défauts de positionnement du noyau dû à des microtubules astraux anormalement long (Caron et al., 2001). Cette étude suggère un rôle de la palmitoylation dans l'interaction des microtubules avec le cortex.

IV.6.1.3. Polyglycylation

La polyglycylation consiste en l'ajout de chaînes de Glycine (jusqu'à plus de trente résidus) sur des glutamates situés en C-terminus des tubulines α et β. Cette modification est essentiellement retrouvée dans les axonèmes des ciliés. *Tetrahymena thermophila* constitue ainsi un bon modèle d'étude de la polyglycylation. La mutation des glutamates de la tubuline β en aspartate a montré un rôle critique de cette modification dans l'assemblage des axonèmes (Thazhath et al., 2002).

IV.6.1.4. Polyglutamylation

La polyglutamylation est l'ajout de chaîne de glutamates sur un glutamate situé en C-terminal des tubulines α et β. Elle a été identifiée en spectrométrie de masse de tubuline de cerveau (Edde et al., 1990). Les polyglutamylases appartiennent à la famille des TTLL (Tubulin Tyrosin Ligase Like) (Janke et al., 2005). Cette modification permet de moduler l'interaction de MAPs avec les microtubules (Bonnet et al., 2001; Larcher et al., 1996), joue un rôle dans l'organisation neuronale du réseau microtubulaire (Bonnet et al., 2001), la motilité induite par les cils (Gagnon et al., 1996; Janke et al., 2005), ou encore la mitose et les centrioles (Bobinnec et al., 1998; Regnard et al., 1999).

IV.6.2. Phosphorylation de la tubuline β

Lors de la purification de tubuline de cerveau, de la tubuline β phosphorylée a été identifiée (Eipper, 1972). Depuis la phosphorylation a été associée au moins à deux fonctions cellulaires.

D'une part, la différenciation et la croissance neuritique de cellules de neuroblastomes de souris (N115) s'accompagne d'une augmentation de la phosphorylation de la tubuline βIII (Gard and Kirschner, 1985). Cette phosphorylation dépend de la quantité de tubuline assemblée en microtubules car le taxol (qui stabilise les microtubules) augmente la quantité de tubuline phosphorylée alors que le nocodazole (qui entraîne une dépolymérisation des microtubules) diminue cette quantité.

D'autre part la dynamique microtubulaire pendant la mitose est connue pour dépendre de kinases (Wittmann et al., 2001). Jusqu'à récemment, les cibles connues de ces phosphorylations étaient des protéines liant les microtubules. Anne Fourest-Lieuvin a démontré que la tubuline β est phosphorylée *in vitro* par le complexe CDK1-cycline B1 sur la sérine 172 appartenant au site consensus SPK conservé dans l'évolution (figure 11). Cette phosphorylation pourrait potentiellement gêner la liaison du GTP sur la tubuline β ou les interactions inter-dimères. La tubuline β phosphorylée s'incorpore peu dans les microtubules *in vitro* et *in vivo.* La tubuline β phosphorylée pourrait réguler la dynamique microtubulaire par exemple en empoisonnant les bouts plus des microtubules (Fourest-Lieuvin et al., 2006). D'autre part, la phosphorylation de la tubuline β pourrait moduler son interaction avec des partenaires, ce qui fait l'objet d'études dans la levure à l'heure actuelle.

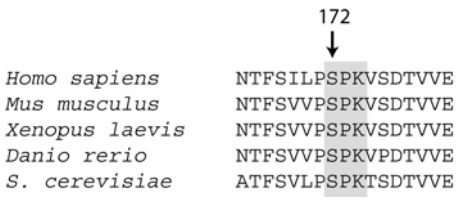


Figure 11. Conservation du site de phosphorylation de la tubuline β par CDK1.
Alignement réalisé avec le logiciel CLUSTAL de portions des séquences protéiques des tubulines β de l'homme, la souris, le xénope, le poisson zèbre et la levure bourgeonnante. La zone grisée souligne la conservation du site consensus SPK de phosphorylation par CDK1.

IV.6.3. Le cycle de détyrosination-tyrosination

IV.6.3.1. Conservation du C-terminus de la tubuline α

L'extrémité C-terminale de la tubuline alpha est extrêmement conservée au cours de l'évolution. Elle expose généralement deux glutamates suivis d'un acide aminé aromatique (tyrosine ou phénylalanine, figure 12). Dans le cas de *Saccharomyces cerevisiae,* il s'agit d'une phénylalanine. Il est intéressant de noter que cette séquence d'acides glutamiques suivis d'un acide aminé aromatique C-terminal est retrouvée dans d'autres protéines, notamment la famille EB1 qui participe aux fonctions microtubulaires (figure 12). Ceci souligne l'importance de la présence de l'aromatique en C-terminal.

```
Tubuline alpha 2(Homo sapiens)   ------DYEEVGV-DSVEAEA-EEGEEY
Tubuline alpha 1(Mus musculus)   -------YEEVGV-DSVEGEGEEEGEEY
Tubuline alpha (Xenopus laevis)  -----KDYEEVGA-DSADAE--DEGEEY
Tubuline alpha (Danio rerio)     -----KDYEEVGA-ESVEGE--DEGEEY
Tubuline alpha 1(S. pombe)       -------YEEVGQ-DSMDNEMYEADEEY
Tubuline alpha 1(S. cerevisiae)  LAALERDYIEVGA-DSYA-------EEF
Tubuline alpha 3(S. cerevisiae)  --ALERDYIEVGA-DSYAEE-----EEF

EB1 (Homo sapiens)               ---TDEGFVIPDE-GGPQEE----QEEY
EB1 (Mus musculus)               ---TDEGFVIPDE-GGPQEE----QEEY
Bim1p (S. cerevisiae)            ----QNDEGEVGVSNNLIID----EETF
Mal3p (S. pombe)                 ------DFVHARL-QSLEVDD-DENITF

Code couleur :
AVFPMILW     petits et hydrophobes
DE           acides
RHK          basiques
STYHCNGQ     hydroxyle et amines (et Q basique)
```

Figure 12. Conservation du C-terminus de la tubuline α.
Alignement réalisé avec le logiciel CLUSTAL des parties C-terminales des tubulines α de l'homme, la souris, le xénope, le poisson zèbre, la levure de fission et la levure bourgeonnante. Sont aussi alignées les séquences C-terminales des EB1 de l'homme, de la souris et des homologues présents chez la levure bourgeonnante et la levure de fission. Dans tous les cas le dernier acide aminé est un aromatique (tyrosine ou phénylalanine).

La structure de l'extrémité C-terminale de la tubuline n'a pu être déterminée, probablement car elle est trop mobile pour être cristallisée. Toutefois, cette extrémité est exposée vers l'extérieur du microtubule, ce qui constitue un site d'interaction avec les protéines associées aux microtubules, et il est possible de replacer les acides aminés C-terminaux sur la structure de la tubuline. Ceci est représenté dans la figure 13 où les acides aminés C-terminaux des tubulines sont indiqués en jaune.

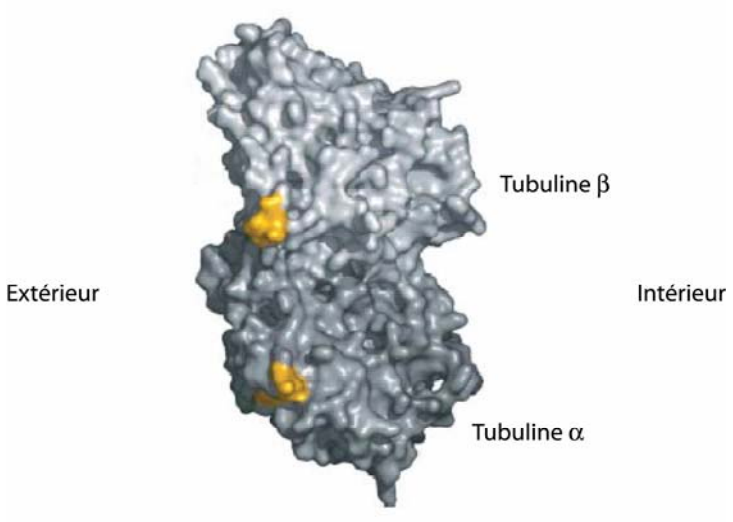


Figure 13. Position du C-terminus de la tubuline α dans le dimère de tubuline et le microtubule.
Position des acides aminés carboxy terminaux des tubulines α et β (en jaune) sur la structure du dimère de tubuline. Leur position a pu être déterminé dans la structure électro-crystallographique. Leur position à l'extérieur du dimère et du microtubule est un site idéal d'interaction avec des partenaires. Tiré de (Westermann and Weber, 2003).

IV.6.3.2. Le cycle de détyrosination-tyrosination

La tubuline α est synthétisée avec son acide aminé aromatique C-terminal. Ce dernier peut être clivé de la séquence protéique par une tubuline carboxy peptidase (TCP) non identifiée conduisant à la formation de tubuline détyrosinée. La tubuline détyrosinée est appelée tubuline Glu car elle expose alors un résidu glutamate en C-terminal. Cette tubuline Glu est le substrat de la tubuline tyrosine ligase (TTL) qui peut greffer à nouveau l'acide aminé aromatique en utilisant de l'ATP (Figure 14). D'autre part, le glutamate C-terminal de la tubuline Glu peut être clivé à son tour par une carboxy peptidase inconnue pour donner de la tubuline nommée Δ2 car ne possédant plus ses deux acides aminés C-terminaux (Paturle-Lafanechere et al., 1991).

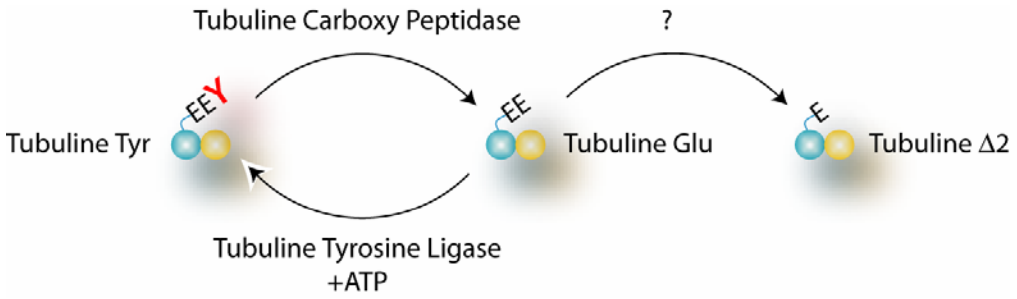


Figure 14. Le cycle de détyrosination-tyrosination de la tubuline α.
La tubuline carboxy peptidase clive la tyrosine C-terminale de la tubuline α produisant ainsi de la tubuline détyrosinée ou tubuline Glu. Cette tubuline Glu peut être substrat de la tubuline tyrosine ligase qui ré-ajoute une tyrosine. La tubuline Glu peut aussi être le substrat d'une carboxy peptidase clivant le glutamate C-terminal de la tubuline Glu et produisant ainsi de la tubuline Δ2.

Le cycle de détyrosination/tyrosination de la tubuline α est connu depuis les années 70. En travaillant sur les ARNt, le groupe de Caputto a montré que de la tyrosine marquée avec le radio-isotope C14 était incorporée dans des préparations solubles de cerveaux de rats (Barra et al., 1973). Ce phénomène a été montré en présence de ribonucléase et suggère donc une action indépendante de la synthèse protéique. La tyrosine marquée n'a été retrouvée que sur une seule bande en séparation de protéines par SDS-PAGE (Barra et al., 1974). Cette protéine à un poids moléculaire apparent de 54 kDa et partage beaucoup d'autres propriétés avec la tubuline (formation d'un dimère de 110 kDa, élution d'une colonne de DEAE-Sephadex similaire à celui du complexe tubuline-cochicine et précipitation par la vinblastine sulfate, (Barra et al., 1974)). La protéine marquée par la tyrosine radioactive a ensuite été dégradée par la méthode d'Edman. Les auteurs ont montré que la tyrosine était précédée de deux glutamates (Arce et al., 1975), ce qui est le cas de la tubuline alpha. La tubuline est finalement montrée comme étant la seule protéine incorporant de la tyrosine (Raybin and Flavin, 1975).

Les enzymes responsables du cycle (TTL et TCP) ont ensuite été recherchées. Une hypothèse possible était que les deux activités résultent de la même enzyme. Toutefois les deux activités ont pu être séparées en 1978 (Argarana et al., 1978).

La TTL a été purifiée à partir de cerveaux de porc (Murofushi, 1980). Des anticorps dirigés contre la TTL ont alors été produits (Schroder et al., 1985), et il a été possible par la suite d'obtenir la séquence protéique de la ligase de porc et ainsi de cloner son ADNc (Ersfeld et al., 1993). Finalement, les gènes murins et humains de la TTL ont pu être clonés et localisés sur les chromosomes 2 (MMU2 pour la souris et HSA2q13 pour l'homme,(Erck et al., 2003).

Ceci a ensuite permis l'invalidation génique de la TTL dans la souris ((Erck et al., 2005), voir paragraphe IV.6.3.4.).

La TCP n'est quant à elle toujours pas identifiée. Des tentatives de purification biochimique ont abouti à un enrichissement de 250 fois (Argarana et al., 1980). Toutefois, la protéine ou le complexe protéique TCP est toujours énigmatique.

Même si la TCP n'est pas connue, un certain nombre de ses propriétés ont été décrites. Notamment, il existe une différence entre la TTL et la TCP. La TCP agit préférentiellement sur les microtubules assemblés alors que la TTL a une action sur le dimère de tubuline libre (Webster et al., 1987; Wehland and Weber, 1987b). D'ailleurs, la TTL lie le dimère de tubuline en se fixant sur la sous-unité β, mais ne lie pas les microtubules assemblés (Wehland and Weber, 1987a).

Classiquement, on associe la détyrosination de la tubuline avec la stabilité des microtubules. Ceci résulte des propriétés des deux enzymes, car il n'y a pas de différence détéctable d'assemblage de la tubuline en microtubules *in vitro* (Paturle et al., 1989), et *in vivo* (Webster et al., 1990). La fonction de cette modification a été extensivement recherchée et a tout d'abord été reliée à la progression tumorale.

IV.6.3.3. Détyrosination et cancer

L'obtention de lignées cellulaires NIH3T3 stables dépourvues d'activité TTL a été la première base d'observation de phénotypes associés à la perturbation du cycle de détyrosination/tyrosination. Ces cellules accumulent de la tubuline Glu et n'ont presque plus de tubuline tyrosinée. De plus, elles accumulent de la tubuline Δ2, qui est normalement présente uniquement dans le cerveau. Transfectées avec un plasmide exprimant la TTL, ces cellules retrouvent un cytosquelette microtubulaire majoritairement composé de tubuline tyrosinée. Cette activité TTL portée par le plasmide est perdue lorsque ces cellules, greffées dans des souris nude, forment des tumeurs. De la même façon, de la tubuline Δ2 est retrouvée dans un certain nombre de tumeurs humaines, indiquant que la perte de l'activité TTL accompagne la progression tumorale (Lafanechere et al., 1998). La TTL a alors été proposée comme un suppresseur de tumeur.

Une étude portant sur des patientes atteintes de cancers du sein a associé l'apparition de tubuline Glu avec l'agressivité tumorale et le pronostic de la patiente (Mialhe et al., 2001). Les tumeurs de critère SBR 3 (critère Scarf-Bloom-Richardson, qui prend en compte le pléïomorphisme nucléaire, la différenciation tubulaire et l'index mitotique), qui sont les plus agressives, accumulent de la tubuline Glu, alors que les moins agressives (grade SBR 1) n'accumulent pas de tubuline Glu. En fait, la quantification de tubuline Glu a permis d'affiner ce critère SBR.

L'analyse de la dérégulation de l'expression de gènes dans des neuroblastomes de mauvais pronostic par rapport à ceux de bon pronostic a identifié, entre autres, la TTL. L'analyse des neuroblastomes de mauvais pronostic a ensuite montré l'accumulation de tubuline Δ2 dans ces tumeurs (Kato et al., 2004).

Globalement, la suppression de la TTL et la détyrosination massive de la tubuline sont d'observation fréquente à la fois lors de la progression tumorale dans des modèles animaux, et dans des tumeurs cancéreuses humaines. Le cycle de détyrosination/tyrosination semble donc fonctionnellement essentiel, l'invalidation de la TTL a permis de mieux comprendre pourquoi.

IV.6.3.4. Invalidation génique de la TTL dans la souris

Le gène encodant la TTL de souris a été invalidé. Ces souris TTL -/- meurent dans les 24 heures après leur naissance (Erck et al., 2005). Elles ne semblent pas avoir de différences anatomiques majeures par rapport aux souris sauvages, toutefois le cortex cérébral est désorganisé. D'autre part, la boucle cortico-thalamique (qui correspond à des projections axonales du thalamus vers le cortex et du cortex vers le thalamus) ne se fait pas dans les souris TTL -/-, et ceci est relié à une différenciation neuronale aberrante. Le fait que cette boucle ne se forme pas a déjà été observé comme létale dans d'autres cas (Lopez-Bendito and Molnar, 2003), et peut expliquer la létalité de l'invalidation génique de la TTL. Les conséquences cellulaires de l'invalidation génique de la TTL ont ensuite été cherchées afin de comprendre ce défaut cortical.

Sur une matrice organisée en L, les fibroblastes en cultures se divisent selon un axe bien défini qui suit l'hypoténuse du triangle (Thery et al., 2005). Les fibroblastes TTL -/-

présentent des défauts de positionnement du noyau sur ces matrices en L. L'axe de division n'est plus alors l'hypoténuse (Peris et al., 2006). D'autre part la morphologie de ces fibroblastes en culture est altérée, avec une forme plus ronde que des fibroblastes sauvages (Peris et al., 2006).

Ce KO a permis de montrer que le cycle de détyrosination/tyrosination de la tubuline α est impliqué dans un grand nombre de processus, ici la différenciation neuronale, le positionnement du noyau et la morphogenèse, en plus d'un rôle dans la progression neuronale. La grande variété des fonctions accomplies par les microtubules en est la cause. Il est toutefois intéressant de noter que si l'activité TTL est perdue dans ces souris, il subsiste une proportion de tubuline tyrosinée, résultant de la néo synthèse de tubuline α.

Les mécanismes moléculaires à la base de ces fonctions ont pu être identifiés grâce aux modèles d'étude que sont la levure et la souris.

IV.6.3.5. Cibles du cycle : les bouts plus des microtubules

Les premières bases moléculaires associées aux cellules possédant essentiellement de la tubuline détyrosinée viennent de l'étude d'un mutant de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ce mutant n'exprime que de la tubuline Glu (souche *itub1-Glu*). Le laboratoire a montré que Bik1p (homologue de CLIP-170) se liait environ trois fois moins aux bouts plus des microtubules que dans des cellules exprimant de la tubuline sauvage (Badin-Larcon et al., 2004), alors même que sa liaison aux centres organisateurs des microtubules (spindle pole bodies, SPB) n'était pas changée. De plus une autre protéine de bouts plus (Bim1p, homologue de EB1) n'est pas perturbée par l'absence de l'acide aromatique C-terminal de la tubuline α.

Ce résultat a été confirmé ensuite dans les cellules de mammifères. CLIP-170 n'est pas présente dans les extensions neuronales alors qu'elle l'est dans le corps cellulaire des neurones issus de souris TTL -/- (Erck et al., 2005). Plus récemment une analyse extensive de la composition des bouts plus des microtubules des cellules TTL -/- a montré que non seulement CLIP-170 ne s'associait pas aux microtubules Glu mais qu'en plus d'autres protéines partageant le domaine d'association de CLIP-170 aux microtubules (domaine CAP-

Gly) ne s'associaient pas aux bouts plus des microtubules Glu (CLIP-115, p150^{GLUED}, (Peris et al., 2006).

Le détail de ce défaut d'interaction est maintenant bien compris. Tout d'abord des tests de co-sédimentation de CLIP-170 et p150^{GLUED} avec des microtubules tyrosinés ou détyrosinés ont été menés. Les deux protéines co-sédimentent avec des microtubules tyrosinés, mais co-sédimentent moins bien avec des microtubules détyrosinés. Dans les mêmes conditions EB1 co-sédimente de la même façon avec les deux types de microtubules (Peris et al., 2006).

Deux études ont détaillé les fondements structuraux de ces résultats. Ces deux études s'intéressaient à l'interaction de EB1 et p150^{GLUED}. EB1 possède son C-terminus semblable à celui de la tubuline α et p150^{GLUED} un domaine CAP-Gly. Les données structurales ont montré l'importance de l'acide aminé aromatique C-terminal dans cette interaction (Hayashi et al., 2005; Honnappa et al., 2006). Ce modèle a été affiné par Honnappa *et al.* qui proposent deux types d'interaction entre EB1 et p150^{GLUED}. La première passe par le domaine EB1 de EB1 et le CAP-Gly de p150^{GLUED}, et la deuxième par le domaine C-terminal avec l'acide aromatique C-terminal de EB1 et le CAP-Gly de p150^{GLUED} (Honnappa et al., 2006).

L'ensemble de ces données a permis de définir les protéines à CAP-Gly comme des cibles du cycle de détyrosination/tyrosination de la tubuline α. Ces protéines jouent un rôle important aux bouts plus des microtubules et participent activement aux interactions des microtubules avec le cortex ou avec les chromosomes via les kinétochores.

J'ai présenté dans un premier temps les données générales porteuses d'une des thématiques du laboratoire, le cycle de détyrosination/tyrosination de la tubuline α. Les données suivantes vont concerner le mutant de *S. cerevisiae itub1-Glu,* afin d'introduire la spécificité de mon travail et l'originalité de celui-ci.

V. Le mutant tub1-Glu

Afin d'étudier la perturbation du cycle de détyrosination-tyrosination de la tubuline α, une étude dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été développée (Badin-Larcon et al., 2004). Le but était d'obtenir une souche qui n'exprime que de la tubuline Glu. Pour cela le gène minoritaire de la tubuline α *TUB3* a été invalidé. Le gène majoritaire a été muté et

exprime de la tubuline Glu (*tub1-Glu*), c'est-à-dire de la tubuline α sans la phénylalanine C-terminale. La souche contrôle utilisée est une souche *tub3Δ*, *TUB1*. Lors de l'analyse du C-terminus de la tubuline α avec des anticorps spécifiques des formes phénylalaninée (YL1/2) et Glu (NS8), il a été montré que toute la tubuline est sous forme Glu dans la souche *tub1-Glu*. Ceci indique qu'il n'existe pas de cycle de détyrosination-tyrosination de la tubuline α dans la levure, en tout cas dans les conditions expérimentales utilisées. La sur-expression d'un gène présentant des homologies de séquences avec la TTL (*TLP1*) ne permet pas non plus la tyrosination de la tubuline α, indiquant que ce gène n'est peut-être pas une tubuline tyrosine ligase.

Les phénotypes associés à cette mutation sont tout d'abord une croissance au froid réduite et une hyper-sensibilité à la drogue dépolymérisant les microtubules, le bénomyl. La sensibilité au froid n'est présente que lorsque le gène *tub1-Glu* est exprimé à partir d'un plasmide, et non lorsqu'il est intégré au génome (*itub1-Glu*).

Les cellules *tub1-Glu* sont bloquées en mitose avant la division nucléaire à 10°C. Ceci a conduit à observer le positionnement du noyau en vidéo microscopie à fluorescence (avec un marquage GFP-Bim1p ou Bik1p-GFP). Cette expérience a montré que les oscillations nucléaires en pré-anaphase sont abolies par la mutation *itub1-Glu*. Or, ces oscillations impliquent les acteurs de la voie dynéine de positionnement et migration du noyau. L'analyse des intensités de fluorescence de Bik1p-GFP et GFP-Bim1p a permis de mettre en évidence que Bik1p se lie trois fois moins aux bouts plus des microtubules Glu qu'aux microtubules avec une phénylalanine (figure 15), alors que Bim1p se lie aussi bien aux bouts plus des deux types de microtubules. De plus Bik1p se lie aussi bien aux SPBs dans les souches *iTUB1* que *itub1-Glu*. Ce défaut d'association de Bik1p aux bouts plus des microtubules Glu permet une explication moléculaire à l'observation de l'absence d'oscillations nucléaires impliquant la voie dynéine.

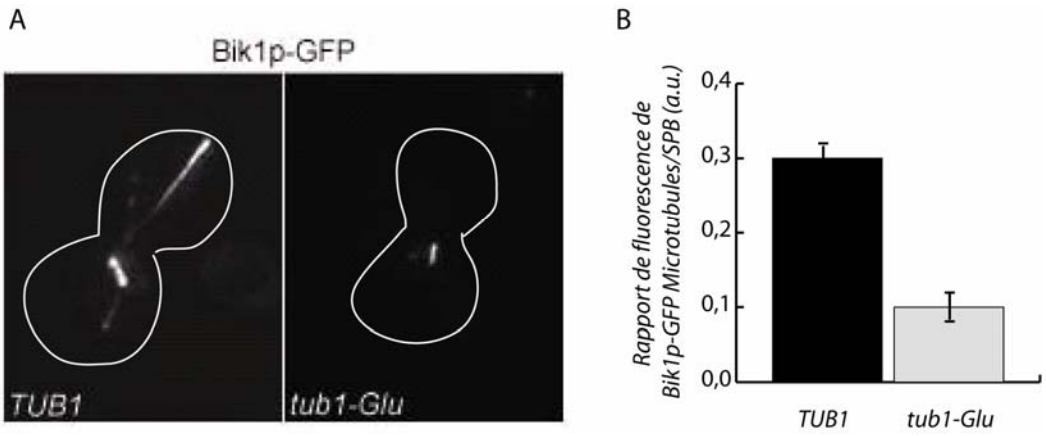


Figure 15. La phénylalanine C-terminale de la tubuline α est essentielle à l'association de Bik1p-GFP aux bouts plus des microtubules.
A. Images de cellules en préanaphase exprimant la protéine de fusion Bik1p-GFP des souches contrôle (*TUB1*) et mutée (*tub1-Glu*). Les SPBs sont toujours marqués dans la souche *tub1-Glu* alors que les bouts plus ne le sont plus.
B. Quantification du rapport de fluorescence associée aux SPB sur celle associée aux bouts plus des microtubules astraux. Ce rapport est diminué d'un facteur trois dans les souches *tub1-Glu* par rapport au contrôle. Adapté de (Badin-Larcon et al., 2004).

Ce mutant *itub1-Glu* a permis d'établir une cible du cycle de détyrosination-tyrosination de la tubuline α.

VI. Objectifs et stratégies de l'étude

A mon arrivée au laboratoire, le fait que Bik1p/CLIP-170 soit une cible du cycle de détyrosination-tyrosination de la tubuline venait d'être établi. Toutefois, le caractère direct ou indirect de cet effet était encore inconnu. Mon analyse dans la levure a consisté à rechercher des facteurs impliqués dans ce phénomène.

Le fait que Bik1p s'associe moins bien aux bouts plus des microtubules, mais que la protéine soit toujours présente, constitue aussi un excellent modèle d'étude des relations entre localisations et fonctions de cette protéine.

J'ai montré que dans la souche *itub1-Glu* la localisation résiduelle de Bik1p/CLIP-170 dépend de Bim1p, l'orthologue de EB1.

Cette constatation m'a permis de comprendre comment Bik1p se localise aux bouts plus des microtubules. J'ai montré que le transport par le moteur moléculaire Kip2p est dissocié de la localisation de Bik1p aux bouts plus. J'ai aussi montré que Bik1p permet

d'activer la localisation de la dynéine aux bouts plus des microtubules. Ces résultats permettent de proposer un nouveau modèle pour la localisation de Bik1p et de la dynéine aux bouts plus des microtubules. Ils m'ont aussi permis d'étudier le cas d'une mitose asymétrique sans déterminants corticaux du positionnement du fuseau.

D'autre part, j'ai utilisé un crible génétique disponible chez la levure (létalité synthétique) afin de rechercher les voies génétiques et, *a fortiori,* les mécanismes et fonctions affectées par la mutation *tub1-Glu.* J'ai ainsi identifié un petit nombre de gènes interagissant génétiquement avec la mutation *itub1-Glu*. Ceci ouvre des perspectives de travail dans la mesure où ces gènes sont impliqués dans la formation de la paroi ou de la membrane.

Finalement, en exploitant des liens génétiques et en intégrant des résultats préliminaires obtenus au laboratoire dans les cellules de mammifères, j'ai établi un lien entre la régulation de l'association de Bik1p aux bouts plus des microtubules et la petite protéine G Rho1p.

MATERIELS ET METHODES

Chapitre 2. –Matériels et Méthodes

I. Matériels

I.1. Souches bactériennes

Les souches utilisées sont des bactéries *Escherichia coli (E.coli*) de type TOP10 chimio-compétentes (Invitogen,), ou XL1-Blue électro-compétentes. J'ai aussi utilisé des souches INV110 (Invitrogen) lorsque le plasmide amplifié ne doit pas être méthylé (pour certaines enzymes de restriction comme *BsaB*I)

I.2. Souches de levures

Toutes les levures utilisées appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae.* Le nom et le génotype des souches sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Nom de la souche	Particularités	Génotype complet
iTUB1 a/α	iTUB1	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2/promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1
iTUB1 a	iTUB1	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1
iTUB1 α	iTUB1	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52,lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1
itub1-Glu a/α	itub1-Glu	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1
itub1-Glu a	itub1-Glu	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1
itub1-Glu α	itub1-Glu	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1
TUB1 a/α	Phe	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, tub3::TRP1/tub3::TRP1, TUB1 LEU2 CEN
TUB1 a	Phe	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, tub3::TRP1, TUB1 LEU2 CEN
TUB1 α	Phe	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, tub3::TRP1, TUB1 LEU2 CEN
tub1-Glu a/α	Glu	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, tub3::TRP1/tub3::TRP1, tub1-Glu LEU2 CEN
tub1-Glu a	Glu	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, tub3::TRP1, tub1-Glu LEU2 CEN
tub1-Glu α	Glu	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, tub3::TRP1, tub1-Glu LEU2 CEN
yFC01	Phe NUM1-GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, tub3::TRP1, TUB1 LEU2 CEN, NUM1-GFP-KanMX6

yFC02	Glu NUM1-GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, tub3::TRP1, tub1-Glu LEU2 CEN, NUM1-GFP-KanMX6
yFC03	Glu NUM1-GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, tub3::TRP1, tub1-Glu LEU2 CEN, NUM1-GFP-KanMX6
yFC04	Phe NUM1-GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, tub3::TRP1, TUB1 LEU2 CEN, NUM1-GFP-kanMX6
yFC05	Glu NUM1-ProtA	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, tub3::TRP1, tub1-Glu LEU2 CEN, NUM1-proteinA-KanMX6
yFC06	Phe NUM1-ProtA	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, tub3::TRP1, TUB1 LEU2 CEN, NUM1-proteinA-KanMX6
yFC07	Phe NUM1-GFP	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, tub3::TRP1/tub3::TRP1, TUB1 LEU2 CEN, NUM1-GFP-KanMX6/NUM1-GFP-KanMX6
yFC08	Glu NUM1-GFP	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, tub3::TRP1/tub3::TRP1, tub1-Glu LEU2 CEN, NUM1-GFP-KanMX6/NUM1-GFP-KanMX6
yFC09	Glu Bik1-3GFP-URA3	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, tub3::TRP1, tub1-Glu LEU2 CEN, BIK1-3GFP-URA3
yFC10	Phe Bik1-3GFP-URA3	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, tub3::TRP1, TUB1 LEU2 CEN, BIK1-3GFP-URA3
yFC11	Glu Bik1-3GFP-URA3	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, tub3::TRP1, tub1-Glu LEU2 CEN, BIK1-3GFP-URA3
yFC12	Phe Bik1-3GFP-URA3	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, tub3::TRP1, TUB1 LEU2 CEN, BIK1-3GFP-URA3
yFC13	Phe Bik1-3GFP-URA3	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, tub3::TRP1/tub3::TRP1, TUB1 LEU2 CEN, BIK1-3GFP-URA3/BIK1-3GFP-URA3
yFC14	Glu Bik1-3GFP-URA3	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, tub3::TRP1/tub3::TRP1, tub1-Glu LEU2 CEN, BIK1-3GFP-URA3/BIK1-3GFP-URA3
yFC15	αP10-LEU2 + tub3	MATα, P10LEU2, arg8Δ0, his3Δ200, leu2Δ0, lys2Δ202, met14Δ0, trp1Δ63, ura3Δ851, tub3::HIS3
yFC16	αP10-LEU2 + tub3 + tub1-Glu	MATα, P10LEU2, arg8Δ0, his3Δ200, leu2Δ0, lys2Δ202, met14Δ0, trp1Δ63, ura3Δ851, tub3::HIS3, tub1-Glu::URA3
yFC17	iTUB1 Dyn1-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, DYN1-3GFP-URA3
yFC18	iTUB1 Dyn1-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, DYN1-3GFP-URA3
yFC19	iTUB1 Dyn1-3GFP	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2/promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, DYN1-3GFP-URA3/DYN1-3GFP-URA3
yFC20	itub1-Glu Dyn1-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, DYN1-3GFP-URA3
yFC21	itub1-Glu Dyn1-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, DYN1-3GFP-URA3
yFC22	itub1-Glu Dyn1-3GFP	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, DYN1-3GFP-URA3/DYN1-3GFP-URA3
yFC23	iTUB1 Kip2-3YFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, KIP2-3YFP-URA3
yFC24	iTUB1 Kip2-3YFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, KIP2-3YFP-URA3
yFC25	iTUB1 Kip2-3YFP	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2/promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, KIP2-3YFP-URA3/KIP2-3YFP-URA3
yFC26	itub1-Glu Kip2-3YFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, KIP2-3YFP-URA3
yFC27	itub1-Glu Kip2-3YFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, KIP2-3YFP-URA3

yFC28	itub1-Glu Kip2-3YFP	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, KIP2-3YFP-URA3/KIP2-3YFP-URA3
yFC29	iTUB1 Bik1-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4
yFC30	iTUB1 Bik1-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4
yFC31	iTUB1 Bik1-3GFP	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2/promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4/BIK1-3GFP-hphMX4
yFC32	itub1-Glu Bik1-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4
yFC33	itub1-Glu Bik1-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4
yFC34	itub1-Glu Bik1-3GFP	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4/BIK1-3GFP-hphMX4
yFC35	iTUB1 bim1 Bik1-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4, bim1::kanMX6
yFC36	iTUB1 bim1 Bik1-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4, bim1::kanMX6
yFC37	iTUB1 bim1 Bik1-3GFP	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2/promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4/BIK1-3GFP-hphMX4, bim1::kanMX6/bim1::kanMX6
yFC38	itub1-Glu bim1 Bik1-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4, bim1::kanMX6
yFC39	itub1-Glu bim1 Bik1-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4, bim1::kanMX6
yFC40	itub1-Glu bim1 Bik1-3GFP	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4/BIK1-3GFP-hphMX4, bim1::kanMX6/bim1::kanMX6
yFC41	iTUB1 bim1 Dyn1-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, DYN1-3GFP-URA3, bim1::kanMX6
yFC42	iTUB1 bim1 Dyn1-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, DYN1-3GFP-URA3, bim1::kanMX6
yFC43	iTUB1 bim1 Dyn1-3GFP	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2/promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, DYN1-3GFP-URA3/DYN1-3GFP-URA3, bim1::kanMX6/bim1::kanMX6
yFC44	itub1-Glu bim1 Dyn1-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, DYN1-3GFP-URA3, bim1::kanMX6
yFC45	itub1-Glu bim1 Dyn1-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, DYN1-3GFP-URA3, bim1::kanMX6
yFC46	itub1-Glu bim1 Dyn1-3GFP	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, DYN1-3GFP-URA3/DYN1-3GFP-URA3, bim1::kanMX6/bim1::kanMX6
yFC47	iTUB1 bim1	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6
yFC48	iTUB1 bim1	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6
yFC49	iTUB1 bim1	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2/promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, bim1::kanMX6/bim1::kanMX6
yFC50	itub1-Glu bim1	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6

yFC51	itub1-Glu bim1	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6
yFC52	itub1-Glu bim1	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, bim1::kanMX6/bim1::kanMX6
yFC53	iTUB1 bim1/BIM1, bik1/BIK1	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2/promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, bim1::kanMX6/BIM1, bik1::hphMX4/BIK1
yFC54	itub1-Glu bim1/BIM1, bik1/BIK1	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, bim1::kanMX6/BIM1, bik1::hphMX4/BIK1
yFC56	iTUB1 bik1	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, bik1::hphMX4
yFC57	iTUB1 bik1/BIK1	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2/promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, bik1::hphMX4/BIK1
yFC59	itub1-Glu bik1	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, bik1::hphMX4
yFC60	itub1-Glu bik1/BIK1	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, bik1::hphMX4/BIK1
yFC61	iTUB1 kip2	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, kip2::hphMX4
yFC62	iTUB1 kip2	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, kip2::hphMX4
yFC63	iTUB1 kip2/KIP2	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2/promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, kip2::hphMX4/KIP2
yFC64	itub1-Glu kip2	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, kip2::hphMX4
yFC65	itub1-Glu kip2	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, kip2::hphMX4
yFC66	itub1-Glu kip2/KIP2	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, kip2::hphMX4/KIP2
yFC67	iTUB1 bim1/bim1, kip2/KIP2	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2/promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, bim1::kanMX6/bim1::kanMX6, kip2::hphMX4/KIP2
yFC68	itub1-Glu bim1/bim1, kip2/KIP2	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, bim1::kanMX6/bim1::kanMX6, kip2::hphMX4/KIP2
yFC69	iTUB1 Pac1-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, PAC1-3GFP-URA3
yFC70	iTUB1 Pac1-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, PAC1-3GFP-URA3
yFC72	itub1-Glu Pac1-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, PAC1-3GFP-URA3
yFC73	itub1-Glu Pac1-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, PAC1-3GFP-URA3
yFC75	iTUB1 Nip100-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, NIP100-3GFP-URA3
yFC76	iTUB1 Nip100-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, NIP100-3GFP-URA3
yFC78	itub1-Glu Nip100-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, NIP100-3GFP-URA3
yFC79	itub1-Glu Nip100-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, NIP100-3GFP-URA3
yFC81	iTUB1 bim1 Pac1-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, PAC1-3GFP-URA3
yFC82	iTUB1 bim1 Pac1-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, PAC1-3GFP-URA3

yFC84	itub1-Glu bim1 Pac1-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, PAC1-3GFP-URA3
yFC85	itub1-Glu bim1 Pac1-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, PAC1-3GFP-URA3
yFC87	iTUB1 bim1 Nip100-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, NIP100-3GFP-URA3
yFC88	iTUB1 bim1 Nip100-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, NIP100-3GFP-URA3
yFC90	itub1-Glu bim1 Nip100-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, NIP100-3GFP-URA3
yFC91	itub1-Glu bim1 Nip100-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, NIP100-3GFP-URA3
yFC93	iTUB1 kip2 Dyn1-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, kip2::hphMX4, DYN1-3GFP-URA3
yFC94	iTUB1 kip2 Dyn1-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, kip2::hphMX4, DYN1-3GFP-URA3
yFC96	itub1-Glu kip2 Dyn1-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, kip2::hphMX4, DYN1-3GFP-URA3
yFC97	itub1-Glu kip2 Dyn1-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, kip2::hphMX4, DYN1-3GFP-URA3
yFC98	iTUB1 bim1 pB681	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, pB681
yFC99	itub1-Glu bim1 pB681	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, pB681
yFC100	iTUB1 pB681	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2/promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, pB681
yFC101	itub1-Glu pB681	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, pB681
yFC102	iTUB bim1 pB681	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2/promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, bim1::kanMX6/bim1::kanMX6, pB681
yFC103	itub1-Glu bim1 pB681	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, bim1::kanMX6/bim1::kanMX6, pB681
yFC105	iTUB1 bim1 GFP-tubulin	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52::GFP-TUB1-URA3, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6
yFC106	itub1-Glu bim1 GFP-tubulin	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52::GFP-tub1-Glu-URA3, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6
yFC107	itub1-Glu bim1 kip2 GFP-tubulin	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52::GFP-tub1-Glu-URA3, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, kip2::hphMX4
yFC108	iTUB1 pEBIK1	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2/promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, pEBIK1
yFC109	itub1-Glu pEBIK1	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, pEBIK1
yFC110	iTUB1 bim1 pEBIK1	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2/promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, bim1::kanMX6/bim1::kanMX6, pEBIK1
yFC111	itub1-Glu bim1 pEBIK1	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, bim1::kanMX6/bim1::kanMX6, pEBIK1

yFC112	itub1-Glu Bik1-3GFP pBIM1	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4/BIK1-3GFP-hphMX4, pBIM1
yFC113	itub1-Glu Bik1-3GFP pbim1-F	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4/BIK1-3GFP-hphMX4, pbim1-F
yFC114	itub1-Glu bim1 Bik1-3GFP pBIM1	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4/BIK1-3GFP-hphMX4, bim1::kanMX6/bim1::kanMX6, pBIM1
yFC115	itub1-Glu bim1 Bik1-3GFP pbim1-F	MATa/α, ade4/ADE4, his3-200/his3-200, leu2-3_112/leu2-3_112, ura3-52/ura3-52, LYS2/lys2-801, tub1::HIS3/tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2/promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1/tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4/BIK1-3GFP-hphMX4, bim1::kanMX6/bim1::kanMX6, pbim1-F
yFC116	iTUB1 kip2 bim1	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, kip2::hphMX4
yFC117	iTUB1 kip2 bim1	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52,lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, kip2::hphMX4
yFC118	itub1-Glu kip2 bim1	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, kip2::hphMX4
yFC119	itub1-Glu kip2 bim1	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, kip2::hphMX4
yFC120	yFC16 x mig3	MATa/α, leu2Δ0/leu2Δ0, P10LEU2, his3Δ/HIS3, ura3Δ851/ura3Δ0, trp1Δ63/TRP1, met14Δ0/MET14, MET15/met15Δ0, ARG8/arg8Δ0, LYS2/lys2Δ202, TUB3/tub3::HIS3, TUB1/tub1-Glu::URA3, mig3::kanMX6/MIG3
yFC121	yFC16 x kip3	MATa/α, leu2Δ0/leu2Δ0, P10LEU2, his3Δ/HIS3, ura3Δ851/ura3Δ0, trp1Δ63/TRP1, met14Δ0/MET14, MET15/met15Δ0, ARG8/arg8Δ0, LYS2/lys2Δ202, TUB3/tub3::HIS3, TUB1/tub1-Glu::URA3, kip3::kanMX6/KIP3
yFC122	yFC16 x fkh2	MATa/α, leu2Δ0/leu2Δ0, P10LEU2, his3Δ/HIS3, ura3Δ851/ura3Δ0, trp1Δ63/TRP1, met14Δ0/MET14, MET15/met15Δ0, ARG8/arg8Δ0, LYS2/lys2Δ202, TUB3/tub3::HIS3, TUB1/tub1-Glu::URA3, fkh2::kanMX6/FKH2
yFC123	yFC16 x cth1	MATa/α, leu2Δ0/leu2Δ0, P10LEU2, his3Δ/HIS3, ura3Δ851/ura3Δ0, trp1Δ63/TRP1, met14Δ0/MET14, MET15/met15Δ0, ARG8/arg8Δ0, LYS2/lys2Δ202, TUB3/tub3::HIS3, TUB1/tub1-Glu::URA3, cth1::kanMX6/CTH1
yFC124	yFC16 x yDL081c	MATa/α, leu2Δ0/leu2Δ0, P10LEU2, his3Δ/HIS3, ura3Δ851/ura3Δ0, trp1Δ63/TRP1, met14Δ0/MET14, MET15/met15Δ0, ARG8/arg8Δ0, LYS2/lys2Δ202, TUB3/tub3::HIS3, TUB1/tub1-Glu::URA3, ydl081c::kanMX6/yDL081c
yFC125	yFC16 x sse1	MATa/α, leu2Δ0/leu2Δ0, P10LEU2, his3Δ/HIS3, ura3Δ851/ura3Δ0, trp1Δ63/TRP1, met14Δ0/MET14, MET15/met15Δ0, ARG8/arg8Δ0, LYS2/lys2Δ202, TUB3/tub3::HIS3, TUB1/tub1-Glu::URA3, sse1::kanMX6/SSE1
yFC126	yFC16 x mbp1	MATa/α, leu2Δ0/leu2Δ0, P10LEU2, his3Δ/HIS3, ura3Δ851/ura3Δ0, trp1Δ63/TRP1, met14Δ0/MET14, MET15/met15Δ0, ARG8/arg8Δ0, LYS2/lys2Δ202, TUB3/tub3::HIS3, TUB1/tub1-Glu::URA3, mbp1::kanMX6/MBP1
yFC127	yFC16 x clb5	MATa/α, leu2Δ0/leu2Δ0, P10LEU2, his3Δ/HIS3, ura3Δ851/ura3Δ0, trp1Δ63/TRP1, met14Δ0/MET14, MET15/met15Δ0, ARG8/arg8Δ0, LYS2/lys2Δ202, TUB3/tub3::HIS3, TUB1/tub1-Glu::URA3, clb5::kanMX6/CLB5
yFC128	yFC16 x cyk3	MATa/α, leu2Δ0/leu2Δ0, P10LEU2, his3Δ/HIS3, ura3Δ851/ura3Δ0, trp1Δ63/TRP1, met14Δ0/MET14, MET15/met15Δ0, ARG8/arg8Δ0, LYS2/lys2Δ202, TUB3/tub3::HIS3, TUB1/tub1-Glu::URA3, cyk3::kanMX6/CYK3
yFC129	yFC16 x rxt2	MATa/α, leu2Δ0/leu2Δ0, P10LEU2, his3Δ/HIS3, ura3Δ851/ura3Δ0, trp1Δ63/TRP1, met14Δ0/MET14, MET15/met15Δ0, ARG8/arg8Δ0, LYS2/lys2Δ202, TUB3/tub3::HIS3, TUB1/tub1-Glu::URA3, rxt2::kanMX6/rxt2
yFC130	yFC16 x mft1	MATa/α, leu2Δ0/leu2Δ0, P10LEU2, his3Δ/HIS3, ura3Δ851/ura3Δ0, trp1Δ63/TRP1, met14Δ0/MET14, MET15/met15Δ0, ARG8/arg8Δ0, LYS2/lys2Δ202, TUB3/tub3::HIS3, TUB1/tub1-Glu::URA3, mft1::kanMX6/MFT1
yFC131	yFC16 x pmr1	MATa/α, leu2Δ0/leu2Δ0, P10LEU2, his3Δ/HIS3, ura3Δ851/ura3Δ0, trp1Δ63/TRP1, met14Δ0/MET14, MET15/met15Δ0, ARG8/arg8Δ0, LYS2/lys2Δ202, TUB3/tub3::HIS3, TUB1/tub1-Glu::URA3, pmr1::kanMX6/PMR1
yFC132	yFC16 x rft1	MATa/α, leu2Δ0/leu2Δ0, P10LEU2, his3Δ/HIS3, ura3Δ851/ura3Δ0, trp1Δ63/TRP1, met14Δ0/MET14, MET15/met15Δ0, ARG8/arg8Δ0, LYS2/lys2Δ202, TUB3/tub3::HIS3, TUB1/tub1-Glu::URA3, rft1::kanMX6/RFT1

yFC133	yFC16 x sin3	MATa/α, leu2Δ0/leu2Δ0, P10LEU2, his3Δ/HIS3, ura3Δ851/ura3Δ0, trp1Δ63/TRP1, met14Δ0/MET14, MET15/met15Δ0, ARG8/arg8Δ0, LYS2/lys2Δ202, TUB3/tub3::HIS3, TUB1/tub1-Glu::URA3, sin3::kanMX6/SIN3
yFC134	BY cdc50	MATa, his3Δ, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, cdc50::KanMX
yFC135	BY cdc50	MATα, his3Δ, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, cdc50::KanMX
yFC136	BY vps15	MATa, his3Δ, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, vps15::KanMX
yFC137	BY vps15	MATα, his3Δ, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, vps15::KanMX
yFC138	BY bts1	MATa, his3Δ, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, bts1::KanMX
yFC139	BY mnn9	MATa, his3Δ, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, mnn9::KanMX
yFC140	BY mnn9	MATα, his3Δ, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, mnn9::KanMX
yFC141	yFC16 x oca1	MATa/α, leu2Δ0/leu2Δ0, P10LEU2, his3Δ/HIS3, ura3Δ851/ura3Δ0, trp1Δ63/TRP1, met14Δ0/MET14, MET15/met15Δ0, ARG8/arg8Δ0, LYS2/lys2Δ202, TUB3/tub3::HIS3, TUB1/tub1-Glu::URA3, oca1::kanMX6/OCA1
yFC142	iTUB1 bim1 kip2 Bik1p-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, kip2::hphMX4, BIK1-3GFP-URA3
yFC143	itub1-Glu bim1 kip2 Bik1p-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, kip2::hphMX4, BIK1-3GFP-URA3
yFC144	iTUB1 kip2 Bik1p-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, kip2::hphMX4, BIK1-3GFP-URA3
yFC145	itub1-Glu kip2 Bik1p-3GFP	MATα, ADE4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, lys2-801, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, kip2::hphMX4, BIK1-3GFP-URA3
yFC146	iTUB1 bik1 Dyn1p-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, DYN1-3GFP-URA3, bik1::kanMX6
yFC147	itub1-Glu bik1 Dyn1p-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, DYN1-3GFP-URA3, bik1::kanMX6
yFC148	iTUB1 bim1 kip2 Dyn1p-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, kip2::hphMX4, DYN1-3GFP-URA3
yFC149	itub1-Glu bim1 kip2 Dyn1p-3GFP	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, bim1::kanMX6, kip2::hphMX4, DYN1-3GFP-URA3
yFC150	BY4741 bim1::HIS3	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3DΔ0; bim1::HIS3
yFC151	iTUB1 Bik1p-3GFP Rho1-G19V	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4, pYO964 (*rho1-G19V)*
yFC152	iTUB1 Bik1p-3GFP Rho1-Q68L	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::TUB1-LEU2, tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4, pYO965 (*rho1-Q68L)*
yFC153	itub1-Glu Bik1p-3GFP Rho1-G19V	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4, pYO964 (rho1-G19V)
yFC154	itub1-Glu Bik1p-3GFP Rho1-Q68L	MATa, ade4, his3-200, leu2-3_112, ura3-52, LYS2, tub1::HIS3, promtub1::tub1-Glu-LEU2, tub3::TRP1, BIK1-3GFP-hphMX4, pYO965 (rho1-Q68L)

Tableau 1. Souches de levure utilisées.

I.3. Milieux de culture et tampons

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 15 min. Les milieux gélosés sont les mêmes que les milieux indiqués avec addition de 2% d'agarose (Gibco) pour les milieux de bactéries et 1,7% d'agarose pour les milieux de levure.

Les milieux de levure sont des milieux riches (YPD, BD Biosciences), composés d'extrait de levure, de dextrose et de peptone. On peut y ajouter des antibiotiques comme le G418 (Sigma) à 200 µg/ml ou de l'hygromycine B (Sigma) à 300 µg/ml. Pour ajouter le bénomyl, on prépare une solution mère de bénomyl dans du DMSO (Diméthyl sulfoxyde, Sigma) que l'on ajoute après stérilisation du milieu, tant que le milieu est encore chaud pour éviter la précipitation du bénomyl. J'ai aussi utilisé des milieux synthétiques complets sans un ou plusieurs acides aminés. Pour cela, à un milieu synthétique déplété (BD Biosciences) on ajoute un mélange d'acides aminés sans ceux désirés (sans histidine par exemple, CSM, complete supplement mixture, QBioGene).

Enfin, lors du crible de synthétiques létaux, j'ai utilisé des milieux synthétiques complets avec du G418. Pour 2,5 l de milieu on ajoute 4,25 g de YNB sans ammonium de sulfate (Yeast Nitrogen Base, QBioGene), 1,775 g de CSM-His-Ura-Leu (QBioGene), 50 g de Dextrose (Merck), 10 g de Bactoagar (Gibco BRL) et une pastille de soude (SIGMA). Selon les milieux voulus, on peut ajouter 50 mg d'uracile et 50 mg d'histidine. Après autoclave, on ajoute 12 ml d'urée (100 g/l) pour 500 ml de milieu avec le G418 et le bénomyl, selon le milieu voulu.

I.4. Anticorps utilisés

J'ai utilisé comme anticorps primaires :

NS8 : c'est un anticorps polyclonal de lapin qui reconnaît la tubuline α Glu. Il est utilisé en western blot à la dilution 1/4000.

YOL1/34 : c'est un anticorps monoclonal de rat qui reconnaît la tubuline α. Il est utilisé en western blot à la dilution 1/2000.

Anti-GFP (molecular probes) : c'est un anticorps polyclonal de lapin qui reconnaît la GFP (Green Fluorescent Protein). Il est utilisé en western blot à la dilution 1/5000.

J'ai utilisé comme anticorps secondaires :

Un anticorps anti IgG de rat produit chez l'âne et couplé à l'HRP (Jackson Immunoresearch). Il est utilisé en western blot à la dilution 1/5000.

Un anticorps anti IgG de lapin produit chez la chèvre et couplé à l'HRP (Jackson Immunoresearch). Il est utilisé en western blot à la dilution 1/5000.

I.5. Plasmides utilisés

Les plasmides sont listés dans le tableau suivant.

Nom	Caractéristiques	Origine
2µBik1-GFP (*pB681*)	Plasmide à origine de réplication 2µ Fusion *BIK1-GFP; URA3*	Don du Dr David Pellman
2µTUB3	Plasmide à origine de réplication 2µ *TUB3; URA3*	Laboratoire
pB1225	Plasmide centromérique Fusion *GFP-BIM1; URA3*	Don du Dr David Pellman
pBIM1	Plasmide centromérique *BIM1; URA3* Obtenu par digestion *EcoR*I/*BamH*I de *pB1225* pour exciser la GFP et circularisation du plasmide	Ce travail
pbim1-FΔ	Plasmide centromérique *BIM1; URA3* Ligature d'un fragment PCR contenant *bim1-FΔ* digéré *XhoI* et ligaturé dans *pB1225* digéré *Xho*I	Ce travail
pAG32	Plasmide intégratif cassette hphMX4 (résistance à l'hygromycine)	Laboratoire
pRS406	Plasmide intégratif Sélection par *URA3*	Laboratoire
pB1587	Plasmide intégratif Fusion *BIK1-3GFP; TRP1* Linéarisation par *Nsi*I	Don du Dr David Pellman
Bik1-3GFP URA3	Plasmide intégratif Fusion *BIK1-3GFP; URA3* Linéarisation par *Nsi*I Obtenu par digestion *Not*I/*Xho*I de *pB1587* et ligature dans *pRS406* digéré *Not*I/*Xho*I	Ce travail
Bik1-3GFP hphMX4	Plasmide intégratif Fusion *BIK1-3GFP; TRP1* Linéarisation par *Nsi*I Obtenu par digestion *Acc*I/*Not*I de *pAG32* (fragment contenant le gène de résistance à l'hydromycine) et ligature dans *pB1587* digéré *Acc*I/*Not*I	Ce travail

pB1761	Plasmide intégratif Fusion *DYN1-3GFP; HIS3* Linéarisation par *Mun*I	Don du Dr David Pellman
Dyn1-3GFP URA3	Plasmide intégratif Fusion *DYN1-3GFP; URA3* Linéarisation par *Mun*I Obtenu par digestion *EcoR*I/*Not*I de *pB1761* et ligature dans *pRS406* digéré *Ecor*I/*Not*I	Ce travail
pMG108	Plasmide intégratif Fusion *KIP2-3YFP*; *HIS3* Linéarisation par *BsaB*I	Don du Dr David Pellman
Kip2-3YFP URA3	Plasmide intégratif Fusion *KIP2-3YFP; URA3* Linéarisation par *BsaB*I Obtenu par digestion *Sal*I/*Not*I de *pMG108* et ligature dans *pRS406* digéré *Sal*I/*Not*I	Ce travail
pYO964	Plasmide centromérique *rho1-G19V; URA3*	Don du Dr Yoshikazu Ohya
pYO965	Plasmide centromérique *rho1-Q68L; URA3*	Don du Dr Yoshikazu Ohya
GFP-TUB1	Plasmide intégratif Fusion *GFP-TUB1; URA3* Linéarisation par *Stu*I	Cécile Boscheron
GFP-tub1-Glu	Plasmide intégratif Fusion *GFP-tub1-Glu; URA3* Linéarisation par *Stu*I	Cécile Boscheron
Banque *pFL44*	Banque d'ADN génomique de levure contenue dans un plasmide 2µ Digestion *Sau3*A d'ADN génomique insérée dans le vecteur *pFL44*	Don du Dr François Lacroute

Tableau 2. Liste des plasmides

II. Méthodes

II.1. Biologie moléculaire

II.1.1. Mini-préparation d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est extrait des bactéries avec le kit RPM (BIO 101). Des bactéries transformées sont ensemencées dans 2 ml de milieu LB (complémenté en antibiotique adéquat pour sélectionner les transformants) à 37°C pendant la nuit. Les bactéries sont soumises à une lyse alcaline modérée. Cette réaction est neutralisée avec de l'acétate de potassium (5 M, pH 4,8). Ceci permet de précipiter les membranes cellulaires, l'ADN chromosomique et les

protéines. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est déposé sur une colonne de billes de silice. Après lavage, l'ADN plasmidique est élué de la colonne avec 50 µl d'eau stérile.

II.1.2. Midi-préparation d'ADN plasmidique

Des bactéries transformées sont ensemencées dans 50 ml de milieu (complémenté en antibiotique adéquat pour sélectionner les transformants) à 37°C pendant la nuit. Les bactéries sont récupérées par centrifugation (3000 g/20 min/4°C). J'ai utilisé le kit de Qiagen pour purifier l'ADN plasmidique. De la même façon que pour les mini-préparations, on réalise un lyse alcaline neutralisée par de l'acétate de potassium. Cette solution est centrifugée à 8000 g/30 min/4°C. Le surnageant est déposé sur une colonne. Après trois lavages, l'ADN plasmidique est élué de la colonne, puis précipité à l'isopropanol (0,6 à 0,7 volumes de l'éluat). Le précipité est centrifugé à 8000 g/30 min/4°C, lavé dans de l'éthanol 70% et séché afin d'éliminer l'alcool. Le culot est enfin repris dans 200µl d'eau stérile, ce qui permet d'obtenir environ 200 à 400 µg d'ADN plasmidique.

II.1.3. Amplification de la banque d'ADNc pFL44

La banque d'ADNc a été construite à l'origine par le laboratoire de François Lacroute. Des digestions partielles par *Sau3*A d'ADN génomique de levure ont été introduites dans un vecteur de sur-expression (plasmide 2µ). Pour amplifier la banque, j'ai électroporé 1 µl de la banque dans 50 µl de bactéries XL1 blue. Après l'électroporation, les bactéries sont reprises dans 1 ml de milieu LB et incubées 1 h à 37°C. J'ai ensuite étalé 10 µl, 100 µl et 890 µl de cette culture sur trois grandes boîtes de Pétri carrées contenant du LB agar contenant 50 µg/ml de carbénicilline. Les bactéries sont incubées sur la nuit à 37°C. Afin d'être sûr de recouvrir toute la banque, il faut avoir au moins 30000 colonies sur la boîte la plus concentrée. Lors de mon amplification j'ai obtenu environ 42000 colonies sur la boîte la plus concentrée.

Les colonies présentes sur les trois boîtes sont alors raclées avec un râteau et groupées dans le même tube. Les bactéries sont centrifugées 10 min/2500 g/4°C. L'ADN est extrait en utilisant le kit de maxiprep de Qiagen, selon les instructions du manuel. Dans ces conditions, la colonne n'est pas saturée.

L'ADN est finalement élué de la colonne dans 250 µl de Tris-EDTA, la concentration obtenue est de 1 µg/µl.

II.1.4. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

Les différents fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse. Les solutions contenant de l'ADN sont complémentées en glycérol et bleu de bromophénol (DNA 5X loading buffer, Amresco) afin de faciliter et visualiser le dépôt. Ces échantillons sont déposés sur gel d'agarose (0,8 à 1%) additionné de bromure d'éthidium (0,1 µg/µl). La migration se réalise à 100V dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA, Invitrogen). Le bromure d'éthidium fixé à l'ADN est visualisé sous rayons ultraviolets.

II.1.5. Amplification de séquences d'ADN par PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'amplifier spécifiquement des régions d'ADN d'intérêt et de les cloner par la suite. J'ai utilisé le kit de Roche Expand High fidelity. La solution contient déjà les nucléotides et la polymérase. On rajoute 1 µl de chaque amorce PCR à 10 µM et la matrice.

Le thermo-cycleur est réglé, par exemple, pour effectuer le programme suivant :

Dénaturation	95°C	10min	
Dénaturation	95°C	1min	↑
Hybridation	60°C	1min	30 cycles
Elongation	72°C	3min	↓
Elongation	72°C	10min	

II.2. Biochimie

II.2.1. Extraction rapide des protéines totales

Les cellules sont ensemencées la veille au soir dans 2 ml d'YPD, et mises à pousser sur la nuit à 30°C sous agitation. Le lendemain, 250 µl de la préculture sont ensemencées dans 10 ml d'YPD. Après 4h à 30°C sous agitation, 10^8 cellules sont récupérées par centrifugation

3500 g/20 min/4°C. Le culot de cellules est repris dans 250 µl de tampon (125 mM de Tris-HCl pH6,8 / 2% SDS / 10% Glycérol / 1% β-mercaptoéthanol / 1% bleu de bromophénol), et 100 µl de billes sont ajoutés. Les billes et le tampon dénaturant permettent la lyse des cellules et l'extraction des protéines. Les tubes sont mis à vortexer pendant 30 min à 4°C. Les échantillons sont ensuite portés à ébullition pendant 5 min. Les débris cellulaires et membranes sont éliminés par centrifugation à 3000 g/5 min/4°C. Ces échantillons sont conservés à -20°C.

II.2.2. Détermination de la concentration protéique

Afin de déterminer la concentration protéique des extraits totaux, j'ai utilisé le kit *RC DC* Protein Assay (BioRad). Il s'agit d'un test colorimétrique basé sur la méthode de Lowry, qui a été adapté pour être compatible avec les agents réducteurs et les détergents. La méthode d'extraction rapide que j'ai utilisée aboutit à des échantillons en solution dans du tampon contenant du SDS et du β-mercaptoéthanol. Ce kit permet donc de mesurer la concentration protéique de ces solutions. Le principe reprend la méthode de Lowry au cours de laquelle les réactifs réagissent avec les tyrosines et les tryptophanes des protéines. Les produits de ces réactions ont une couleur bleue, mesurée par absorbance à 750 nm. La concentration des échantillons est déterminée en comparant les valeurs avec celles d'une courbe étalon. La protéine standard utilisée est l'albumine de sérum bovin (Sigma).

II.2.3. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, selon leur poids moléculaire. Il existe une relation linéaire entre le logarithme des poids moléculaires des protéines et leur mobilité électrophorétique. Le poids moléculaire apparent des protéines étudiées peut être déterminé par référence avec des protéines de poids moléculaire connu (Standards Sigma).

Avant d'être déposés sur gel, les échantillons sont additionnés d'une solution de tampon dénaturant contenant 125 mM de Tris-HCl pH 6,8 / 2% SDS / 10% Glycérol / 1% β-mercaptoéthanol / 1% bleu de bromophénol, et portés à ébullition pendant 3 min. Ce tampon

contient du SDS, détergent fortement anionique qui dénature les protéines et les charge négativement, ainsi que du β-mercaptoéthanol, agent réducteur qui rompt les ponts disulfures des protéines. La température élevée favorise la désagrégation et la dénaturation des protéines. Lors de la migration, les protéines sont séparées sur un gel contenant 7,5 à 12% d'une solution d'acrylamide/bis-acrylamide (Bio-Rad). La migration est réalisée à 120 V dans un tampon Tris 50 mM pH 8,6 / glycine 384 mM / SDS 1%, et est arrêtée lorsque le front de migration (visualisé par le bleu de bromophénol) atteint la limite inférieure du gel. Le gel peut être alors coloré et séché pour révéler les protéines ou soumis à un électrotransfert pour une analyse des protéines par immunodétection.

II.2.4. Electrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Les protéines séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide peuvent être transférées sur membrane de nitrocellulose. Le transfert est effectué pendant une heure à 100 V dans un tampon Tris 25 mM pH 8,3 / glycine 192 mM / méthanol 20% dans une cuve Mini Transblot (Bio-Rad). Le transfert est contrôlé par une coloration réversible des protéines dans un solution de rouge Ponceau (rouge Ponceau S 1% / acide trichloroacétique 0,3% / méthanol 50%). Cette coloration disparaît par lavage de la membrane dans de l'eau distillée.

II.2.5. Détection immunologique des protéines transférées sur membrane de nitrocellulose

Les sites aspécifiques présents sur la membrane sont saturés par incubation d'une heure dans un tampon PBS (NaCl 136 mM / Na_2HPO_4 8 mM / KH_2PO_4 1,5 mM / KCl 2,7 mM pH 7,4) contenant 0,1% de Tween (PBS-T).

La membrane est incubée pendant 1 heure avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-T contenant de l'héparine (100 µg/ml). L'héparine, composé anionique, empêche les anticorps de se fixer de façon aspécifique aux histones présentes dans les extraits cellulaires.

Après trois lavages de 10 min dans du PBS-T, la membrane est incubée pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort. Elle est ensuite lavée trois fois pendant 5 min dans du PBS-T.

La peroxydase, révélée grâce au kit ECL (Enhanced Chemi-Luminescence ; Amersham Life Science), catalyse l'oxydation du luminol en présence d'eau oxygénée. Le luminol retourne ensuite à son état réduit en émettant une lumière détectée sur un film photographique. Le film est ensuite révélé et fixé (produits Kodak).

II.3. Biologie cellulaire

II.3.1. Méthodes de cultures

II.3.1.1. Culture des bactéries

Les bactéries sont cultivées à 37°C sur boîte de Petri ou sous agitation constante de 250 rpm dans des tubes à essai ou dans des Erlenmeyer**.**

II.3.1.2. Culture des levures

Les levures sont cultivées à 30°C sur boîte de Petri ou sous agitation constante de 250 rpm dans des tubes à essai ou dans des Erlenmeyer.

II.3.2. Transformation des levures à l'acétate de lithium

Culture des cellules :

La veille au soir, la souche à transformer est inoculée dans 5 ml de milieu et mise en culture sous agitation à 30°C pendant la nuit. Le lendemain matin, les cellules sont diluées à 5.10^6 cellules/ml dans 50 ml de milieu frais et remises en culture pendant 2 à 3 générations (4 h) à 30°C.

Récupération des cellules :

La culture est centrifugée à 1000g/5min/ 25°C. Le culot contenant les cellules est repris dans 5 ml de Li-TE-sorbitol (Sorbitol 1 M, Tris 10 mM, LiOAc 50 mM, EDTA 0,5 mM, $CaCl_2$ 0,2 mM).

Cellules compétentes :

Les cellules sont à nouveau centrifugées à 1000 g/5 min/25°C, le culot est repris dans 400 µl de Li-TE-sorbitol et incubé 30 min sous agitation puis 10 min sur de la glace.

Transformation :

Le mélange réactionnel est le suivant (réactifs à ajouter dans l'ordre indiqué) :

2 µl ADN de sperme de saumon simple brin à 10 mg/ml (Clontech) qui facilite l'entrée de l'ADN d'intérêt dans la levure, 500 ng à 1 µg d'ADN, 100 µl de cellules compétentes, 30 µl Glycérol 50%, et 100 µl PEG 3350 50%. Ce mélange est incubé de 30 min à 1 h sous agitation à 30°C. Un choc thermique est ensuite réalisé par une incubation de 15 min à 42°C.

Stimulation des cellules :

Les cellules sont récupérées par une brève centrifugation. Le culot est repris dans 800 µl de YPD et la croissance cellulaire est stimulée par incubation de 2 h à 30°C sur une roue. Les cellules sont ensuite récupérées par une brève incubation et le culot est repris dans 200 µl d'eau. 100 µl sont étalés sur milieu de sélection adéquat et mis en culture à 30°C pendant 3 jours. Les colonies qui poussent sont repiquées sur milieu frais afin d'éliminer les faux positifs.

II.3.3. Immunofluorescence indirecte

La veille au soir de l'immunofluorescence, les cellules sont inoculées dans 10 ml de milieu et mises en culture sous agitation à 30°C. Le lendemain matin, les cellules sont diluées à 5.10^6 cellules/ml dans 50 ml de milieu neuf et remises en culture pendant 2 à 3 générations (4 h) à 30°C.

Les cellules sont récupérées par centrifugation à 1000 g/3 min/25°C. Le culot est repris dans 15 ml de PBS puis centrifugé à 1000 g/3 min/25°C.

Les cellules sont ensuite fixées. Le culot est repris dans 5 ml de PBS paraformaldéhyde 4% préchauffé à 30°C et incubé 1 h à 30°C.

Après avoir fixé les cellules afin qu'elles conservent leur forme, la paroi est digérée. Les cellules fixées sont centrifugées à 1000 g/5 min/25°C. Le culot est repris dans 1 ml de solution B (K_2HPO_4/KH_2PO_4 100 mM, sorbitol 1.2 M) à 30°C. La suspension est centrifugée à 700 g/3 min/RT, et le culot est repris dans 1 ml de solution B + 2 µl de β-mercaptoéthanol + 40 µl de zymoliase à 6 mg/ml (ICN). La digestion de la paroi s'effectue pendant environ 40 min à 30°C.

Les cellules sont récupérées par centrifugation à 700 g/3 min/RT et reprises dans 1 ml de solution B. Cette étape de lavage est réalisée deux fois. Les cellules sont ensuite déposées sur des lames de polylysine (Hycor), dans des puits dessinés au Dakopen, à raison de 40 µl

par puit. Après 10 min de contact, l'excédent de liquide est aspiré à l'aide d'une trompe à vide. Les cellules sont perméabilisées en ajoutant du PBS-Triton X100 0.1% à 30°C pendant 5 min. L'excédent est enlevé.

L'anticorps primaire, dilué à la concentration adéquate dans du PBS BSA 0.1%, est déposé et laissé en contact pendant 15 min. Après trois rinçages au PBS Triton 0.1%, l'anticorps secondaire, dilué à la concentration adéquate dans du PBS BSA 0.1%, est déposé et laissé en contact pendant 15 min. Après trois rinçages au PBS Triton 0.1%, les noyaux peuvent être colorés par dépôt de Hoechst 33258 à 1 µg/ml. L'excédent est enlevé et une lamelle est fixée sur la lame avec du fluorsave.

II.3.4. Marquage de l'actine

Afin de visualiser l'actine à l'aide de phalloïdine rhodaminée, j'ai repris le protocole proposé par (Amberg, 1998).

Les cellules sont ensemencées dans 25 ml de milieu et poussent à 30°C jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cellules sont fixées dans le milieu par ajout de 2,5 ml de formaldéhyde à 37,7% pendant 10 min. Les cellules sont reprises dans 25 ml de PBS / formaldéhyde 4% et incubées 1 heure à 25°C sur une roue. Les cellules sont lavées deux fois dans du PBS et reprises dans 500 µl de PBS. A 100 µl de suspension cellulaire est ajouté 10 µl de phalloïdine rhodaminée (Molecular Probes). Les cellules sont incubées 1 heure dans le noir, puis lavées cinq fois dans 1 ml de PBS. Finalement les cellules sont reprises dans 100 µl de solution de montage (90% glycérol / 0,1X PBS / 92,5 µM *p*-phénylènediamine, Sigma / pH ajusté à 8,0 avec du carbonate de sodium 0,5 M pH 9,0). Les cellules sont conservés à -20°C jusqu'à observation.

II.3.5. Microscopie et vidéomicroscopie

Afin de visualiser les cellules exprimant des protéines fluorescentes ou bien les lames d'immunofluorescence indirecte, le laboratoire dispose de microscopes droits Zeiss (Axioskop) equipé d'une caméra CCD (CollSnap ES, Ropper Scientific) et d'un montage piezo électrique (Ropper Scientific) pour faire des acquisitions sur différents plans focaux (en Z). Les microscopes sont équipés d'objectifs x100 à immersion dans l'huile (Neofluar, Zeiss),

permettant d'observer les levures à un grossissement acceptable. Enfin tout l'équipement est commandé par le logiciel Metavue (Universal Imaging Corporation).

Classiquement des cellules en phase exponentielle de croissance sont montées entre lames et lamelles, dans du milieu frais (du milieu synthétique complet, complémenté en acides aminés nécessaires). J'ai le plus souvent réalisé des acquisitions de 17 plans focaux espacés de 0,3 µm, permettant d'observer ainsi le volume cellulaire entier. Le temps d'acquisition varie selon la protéine observée, il est par exemple de 1500 ms pour la protéine de fusion Bik1p-3GFP.

Les stacks sont ensuite projetés en deux dimensions par le logiciel Metamorph (Universal Imaging Corporation), et l'analyse de l'intensité de fluorescence est effectuée. Je mesure l'intensité intégrée (fonction de Metamorph) en entourant les différentes zones fluorescentes. Cette intensité est moyennée en analysant au moins trente cellules afin de pouvoir faire une analyse statistique fiable, et le bruit de fond de fluorescence est soustrait.

Dans le cas de la vidéo microscopie, j'ai utilisé un microscope inversé Zeiss (Axiovert 200M) équipé d'une caméra CCD (CoolSnap HQ, Ropper Scientific), d'un montage piezo électrique (Ropper Scientific) et d'objectif x100 à immersion d'huile (Neofluar, Zeiss).

4,8 µl de cellules en phase exponentielle de croissance dans du milieu sont déposés au fond d'une boîte IWAKI (le fond est en verre). La goutte est cerclée de 4,8 µl d'huile minérale. Une lamelle est déposée par-dessus, et je dépose de l'huile minérale autour. L'huile minérale sert à sceller le montage.

Les acquisitions se font en mettant un filtre neutre et la lampe 100W à 100% d'illumination. Ceci permet à l'échantillon de ne pas perdre trop vite d'intensité de fluorescence. Selon les cas, je faisais des acquisitions toutes les 2 s, 5 s, 10 s ou bien plus long, toutes les 40 s ou encore 1 min.

La plupart du temps, les niveaux de fluorescence ne permettent pas de faire beaucoup de plans focaux si l'on veut suivre les cellules suffisamment longtemps. J'ai donc acquis 7 plans focaux espacés de 0,5 µm.

II.4. Méthodes génétiques

II.4.1. Conjugaison des cellules haploïdes

Afin d'obtenir des cellules diploïdes, on croise deux souches haploïdes d'haplotype opposé (**a** et **α**). Dans les situations que j'ai rencontré, les deux haplotypes ont un marqueur

de sélection différent. Chaque souche a un seul marqueur (*ADE4* requis sur un milieu sans adénine, et *LEU2* requis sur un milieu sans leucine). Dans ce cas seul les diploïdes possèdent les deux marqueurs. Sur milieu sélectif sans leucine, ni adénine, seuls les diploïdes obtenus pousseront. A partir de cultures fraîches sur boîte de pétri en milieu riche des haploïdes, on fait des stries sur le milieu de sélection en forme d'épée comme montré sur la figure 16. Dans la partie droite, les cellules des deux sexes sont présentes et conjuguent. Seules les diploïdes vont former des colonies.

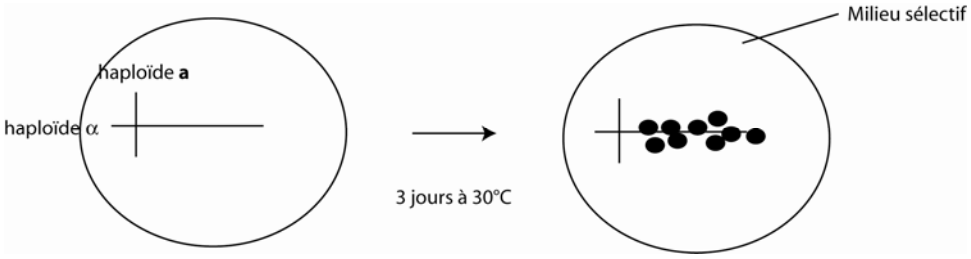


Figure 16. Croisement des cellules haploïdes.

II.4.2. Sporulation des cellules diploïdes et dissection des tétrades

Afin d'obtenir des cellules haploïdes à partir de cellules diploïdes, on les fait sporuler. Pour cela on strie des cultures fraîches de diploïdes sur un milieu de présporulation (QBiogene). Après une nuit à 30°C, ces cellules sont striées sur milieu de sporulation (QBiogene). Après environ cinq à sept jours pour les souches que j'ai utilisées, on obtient suffisamment de tétrades pour les disséquer.

La dissection des tétrades permet d'obtenir des combinaisons de mutations, de gènes exprimant des protéines de fusion… Chaque tétrade contient quatre spores enfermées dans un asque. Les cellules sont traitées avec une enzyme qui va digérer cet asque (β-glucuronidase d'*Helix pomatia*, Sigma). Dans 200 µl d'eau, on ajoute 4 µl de β-glucuronidase et des cellules récupérées avec une anse sur les stries réalisées pour faire sporuler les diploïdes. L'asque est digéré à 37°C pendant 8 à 20 min selon la souche.

8 µl de cette solution sont déposés sur une boîte de Pétri contenant du milieu riche gélosé complémenté de Sorbitol (1 M) afin de faciliter la germination des spores. A l'aide d'un microscope équipé d'un micromanipulateur (Axiolab, Zeiss) chaque spore est séparée des autres et déposée de façon à ce que chaque tétrade soit identifiée et que chaque spore

forme une colonie bien séparée des autres. La germination se fait à 30°C pendant trois jours. Afin de déterminer les génotypes de chaque colonie obtenue, des répliques de la boîte de germination sont faîtes sur les différents milieux de sélections adaptés à l'étude. On connaît alors la ségrégation de chaque gène d'intérêt.

II.4.3. Crible de létalité synthétique

La co-létalité synthétique peut se définir comme la conjonction létale de deux mutations qui ne sont pas létales par elles-mêmes. De plus en plus d'études génétiques dans la levure permettent de définir ainsi des réseaux d'interactions entre les différents gènes et à fortiori les différents mécanismes (Tong et al., 2001; Tong et al., 2004). Nous avons choisi de rechercher l'ensemble des gènes non essentiels dont la délétion est létale en conjonction avec la mutation *tub1-Glu*. Classiquement deux mutants de sexes opposés sont croisés puis le diploïde résultant est mis à sporuler. Des asques renfermant quatre spores haploïdes sont ainsi obtenues. La ségrégation des gènes permet alors d'obtenir des doubles mutants et l'on isole chacune des spores afin de déterminer si le double mutant est viable ou bien létal. Ceci requiert une étape fastidieuse de dissection de tétrades qui est difficile lors de l'étude sur tout le génome. L'équipe d'Alain Nicolas (Institut Curie, Paris) a développé un crible primaire qui permet de sélectionner des candidats, qui sont ensuite vérifiés en dissection de tétrade.

Le principe de ce crible repose sur le croisement d'une collection de mutants avec une souche *itub1-Glu.* Les diploïdes résultants de ce croisement sont sélectionnés sur un milieu adéquat et mis à sporuler. Enfin on étale les spores sur des milieux qui permettent de contrôler la germination et d'autres qui permettent de sélectionner les doubles mutants. Si rien ne pousse sur ce dernier milieu, c'est que le gène questionné est synthétique létal avec la mutation *tub1-Glu.* Les marqueurs utilisés sont le gène *LEU2* sous le contrôle du promoteur αP10. Les cellules poussant sur du milieu Sc-Leu sont alors haploïdes, car le promoteur αP10 ne fonctionne que dans les cellules haploïdes α. Les invalidations géniques de la collection de mutants sont marquées par le gène de résistance au G418, *KanMX*. L'invalidation de *TUB3* est marquée par *HIS3*, et la mutation *itub1-Glu* par *URA3*. Les souches sont les BY4741 de la collection Euroscarf (*MATα, his3Δ, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, gèneX::KanMX*) et la souche *itub1-Glu* yFC16 (*MATα, P10LEU2, arg8Δ0, his3Δ200, leu2Δ0, lys2Δ202, met14Δ0, trp1Δ63, ura3Δ851, tub3::HIS3, tub1-Glu::URA3*).

La collection de mutants de délétion est conservée congelée dans des microplaques. Elles sont répliquées à l'aide d'un peigne à 96 pointes dans des microplaques contenant 100 µl de milieu riche (YPD).

La souche *itub1-Glu* est aussi formatée en microplaques 96 puits.

A l'aide du peigne des microplaques sont ensemencées avec la collection de mutants et la souche *itub1-Glu* dans 100 µl de milieu riche. Chaque puit contient alors un croisement. La conjugaison se fait pendant 3 jours à 30°C. Les diploïdes hétérozygotes pour les mutations sont alors sélectionnés. On ensemence une plaque 96 puits avec les croisements dans 1 ml de milieu de sélection des diploïdes (Drop out + Leucine). L'élimination de haploïdes qui ne peuvent pas pousser dans ce milieu se fait pendant 4 jours à 30°C.

Les diploïdes sont alors mis à sporuler. On élimine le milieu de sélection des diploïdes par centrifugation 2000 g/1 min/RT. Les cellules sont lavées dans 400 µl d'eau et centrifugées à 2000 g/1 min/RT. Le milieu de sporulation (KAc + Leucine) est alors ajouté (600 µl). La sporulation se fait pendant 6 jours à 30°C sous agitation sur des plans inclinés.

Les cellules sont ensuite traitées à la zymoliase 20T afin d'éliminer les diploïdes et de ne sélectionner que les spores. A 50 µl de cellules sont ajoutés 1 µl de β-mercaptoéthanol, 5 µg de zymoliase et 450 µl d'eau. Ce traitement se fait sur la nuit à 30°C.

Le lendemain matin, les microplaques sont centrifugées à 2000 g/1 min/RT. Les cellules sont lavées deux fois dans de l'eau et reprises dans 500 µl d'eau.

Les cellules sont ensuite déposées sur les différents milieux à l'aide d'un robot disposant de huit embouts pipeteurs. Ceci permet d'obtenir des dépôts constants et bien ordonnés. Les milieux sont du Sc –Leu (pour vérifier la croissance des haploïdes α), du Sc-Leu +G418 (pour vérifier la croissance des haploïdes α invalidés pour le gène *X*), du Sc-Leu –His +G418 (pour vérifier la croissance des haploïdes α invalidés pour *TUB3* et le gène *X*), du Sc-Leu –His –Ura +G418 (pour vérifier la croissance des haploïdes α invalidés pour *TUB3* et le gène *X*, et portant la mutation *itub1-Glu*). J'ai aussi déposé les spores sur du milieu Sc-Leu –His –Ura +G418 +Bénomyl (50 µg/ml).

La germination des spores se fait à 30°C pendant 3 jours et l'on procède alors à la lecture des boîtes.

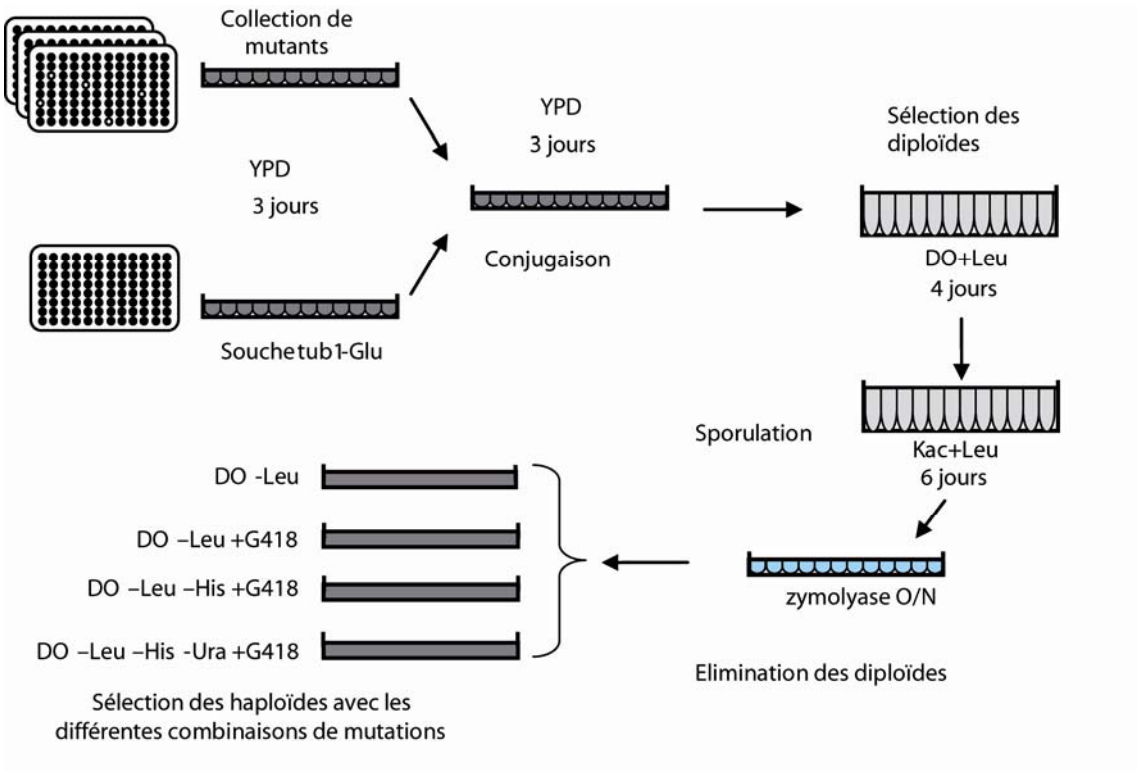


Figure 17. Etapes du crible de létalité synthétique.

Un exemple de boîtes issues du crible est présenté dans la figure 18. Cette série montre les différents cas possibles. Dans le cas 1, les cellules ont germé sur tous les milieux sauf sur le milieu contenant du bénomyl. La combinaison des trois mutations n'est pas létale et ne supprime pas la sensibilité au bénomyl. Dans le cas 2, les cellules ont germé sur les milieux -Leu et –Leu +G418, mais pas sur les autres. La combinaison des mutations *gène x* et *tub3Δ* (+/- la mutation *tub1-Glu*) est létale. Dans le cas 3, les cellules ont germé sur les milieux -Leu, -Leu+G418 et -Leu-His+G418, mais pas sur les autres. La combinaison des trois mutations (*gène x*, *tub3Δ* et *tub1-Glu*) est alors létale, mais pas la combinaison *gène x, tub3Δ*. Enfin dans le quatrième cas, les cellules ont germé sur tous les milieux. L'invalidation du *gène x* supprime la sensibilité de la souche *tub1-Glu* au bénomyl.

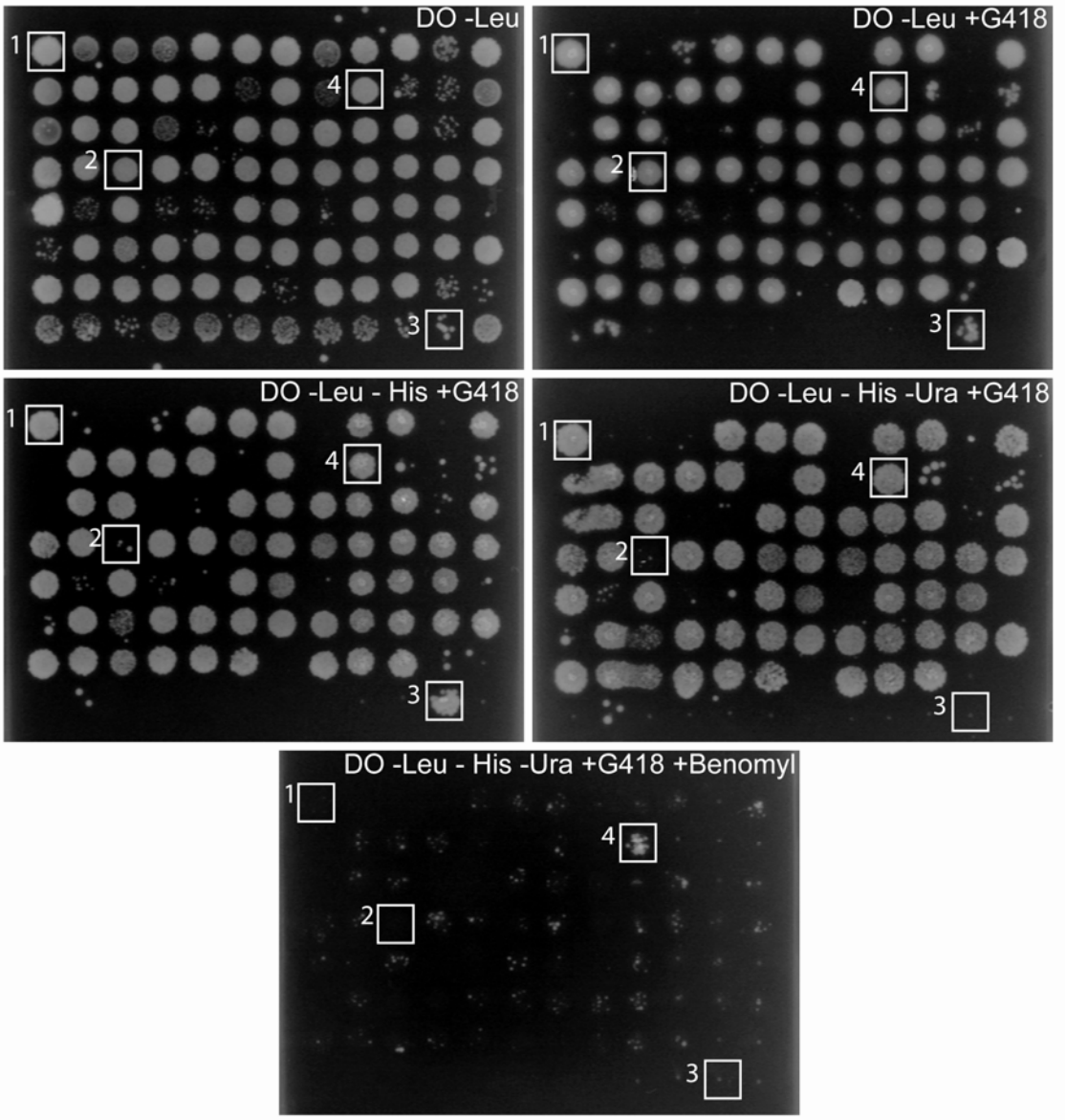


Figure 18. Exemple de boîtes du crible de létalité synthétique.

Une fois ce crible primaire effectué, j'ai obtenu vingt-deux gènes candidats synthétiques létaux avec *tub3Δ*, et cinquante et un gènes candidats synthétiques létaux avec la combinaison *tub3Δ, tub1-Glu* (tableau 3).

	Candidats SL avec *TUB3*
FUN12	petite GTPase
ROX3	Composant de l'ARN Polymérase II
YDR278c	ORF douteuse
PEX10	Protéine membranaire du peroxysome
VPS34	phosphatidylinositol 3 kinase
NPL4	Protéine de la membrane nucléaire et du réticulum endoplasmique. Impliqué dans la reconnaissance des protéines ubiquitinées et leur adressage au protéasome.
SWR1	Protéine requise pour l'incorporation de Htz1p dans la chromatine.
DEP1	Protéine impliquée dans la biosynthèse de lipides.

FMP37	Fonction inconnue
YHL013c	ORF douteuse
GOS1	v-SNARE du Golgi
PEP7	Protéine impliquée dans la ségrégation de la vacuole.Adaptateur multivalent qui facilite le tri des protéines à la vacuole.
SFP1	Activité de facteur de transcription. Régule la taille de la cellule.
NUP133	Protéine des pores nucléaires.
STO1	Activateur transcriptionnel
CTK3	Sous-unité gamma de la kinase du domaine C-terminal 1. Phosphoryle l'ARN polymérase II. Régule la transcription et le processing des pré-ARNm.
LPD1	Lipoamide déhydrogénase
LOC1	Protéine impliquée dans la localisation asymétrique de ASH1.
CDC50	Protéine endosomale régulant la polarité cellulaire.
SRB5	Sous-unité de l'ARN polymérase II.
GSH1	Gamma glutamylcystéine synthase.
LIP5	Protéine impliquée dans la biosynthèse de l'acide lipoïque.

Candidats SL avec *TUB3* et *tub1-Glu*	
BTS1	Géranylgéranyl diphosphate synthase.
YKL031w	ORF douteuse
IXR1	Protein de reconnaissance des pontages intra brin
YKL043w	Facteur de transcription putatif.
VPS1	Protéine impliquée dans le tri des protéines à la vacuole et l'organisation des membranes intracellulaires.
DUN1	Sérine-thréonine kinase.
KEX2	Sérine protéase dépendant du calcium.
MNN9	Sous-unité d'une mannosyltransférase du Golgi.
HTZ1	Variant d'histone H2A.Z.
YNL296w	ORF hypothétique
YBR122c	Protéine ribosomale de la mitochondrie.
YDL206w	Fonction inconnue.
FUN19	Fonction inconnue.
YEL033w	ORF douteuse.
ANP1	Sous-unité d'une mannosyltransférase du Golgi.
CIN8	Kinésine mitotique.
YGL081w	ORF douteuse.
MNN10	Sous-unité d'une mannosyltransférase du Golgi.
HXT17	Transporteur d'hexoses.
SUR4	Protéine impliquée dans la biosynthèse d'acides gras.
IKI3	Sous-unité du complexe d'élongation.
VPS33	Protéine impliquée dans le tri des protéines à la vacuole.
FKS1	Sous-unité catalytique de la 1-3 β-glucane synthase.
RSC2	Protéine impliquée dans le remodelage de la chromatine.
NCE4	Protéine impliquée dans la séparation des cellules.
VPS16	Protéine impliquée dans le tri des protéines à la vacuole.
CTR1	Activité de transport de cuivre.
YPR123c	ORF douteuse.
AAT2	Aspartate amino-transférase cytosolique.
YCL060c	ORF douteuse.
DOT1	Histone H3 méthylase.
VMA21	Protéine impliquée dans l'assemblage de l'ATPase à protons vacuolaire.
SPT10	Histone acétylase putative.
ARG2	Acétyl-glutamate synthase.
YJL046w	Fonction inconnue.

SWS2	Protéine ribosomale de la mitochondrie.
RPL16B	Protéine ribosomale.
TSR2	Protéine avec un rôle potentiel dans le processing des pré-ARNr.
YIR013w	ORF hypothétique
MED1	Sous-unité du complexe Médiateur, régulant l'activité de transcription de l'ARN polymérase II.
YPR099c	ORF hypothétique
KHA1	K+/H+ antiporteur putatif.
MGS1	Protéine impliquée dans la maintenance de la stabilité du génome.
YNL080c	Fonction inconnue.
TUP1	Répresseur général de la transcription. Montre des similarités avec les sous unités bêta des protéines G. Médie la répression au glucose.
ARC18	Sous-unité du complexe Arp2/3.
PMR1	ATPase requise pour le transport du calcium et du magnésium dans le Golgi.
HUR1	Protéine impliquée dans la réparation de l'ADN.
TLG2	Membre de la famille syntaxine des t-SNAREs.
YDR090c	ORF hypothétique
VPS15	Sérine/thréonine protéine kinase impliquée dans le tri des protéines vacuolaires

	Contrôles internes au crible
HIS1 (2x)	Biosynthèse de l'histidine
HIS2	Biosynthèse de l'histidine
HIS5	Biosynthèse de l'histidine
HIS6	Biosynthèse de l'histidine
HIS7	Biosynthèse de l'histidine
URA1	Biosynthèse des pyrimidines
URA2	Biosynthèse des pyrimidines
URA4	Biosynthèse des pyrimidines

Tableau 3. Gènes candidats sélectionnés au cours du crible de létalité synthétique.
La liste comprend une brève description de leur fonction connue (source SGD)

Les gènes de synthèse de l'histidine et des pyrimidines ont été retrouvés et constituent un contrôle interne au crible. En effet les mutants *his* ou *ura* ne peuvent pas pousser sur les milieux de sélection choisis.

J'ai alors vérifié chacun de ces candidats par dissection de tétrades et analyse de la ségrégation des différents gènes. Les candidats confirmés sont présentés dans le chapitre III.1.

II.4.4. Invalidation génique et intégration des gènes de fusion

L'invalidation génique et l'intégration de gènes de fusion repose sur la recombinaison homologue. Dans le cas d'une invalidation génique, le cadre ouvert de lecture est remplacé par un gène de sélection. Cette étape est ensuite vérifiée par PCR avec une amorce dans la région adjacente à la région invalidée et une amorce sur le gène de sélection (voir figure 19). Cette PCR est faîte en 5' et en 3'. Si un fragment d'ADN est amplifié par PCR en 5' et en 3',

c'est que l'invalidation s'est réalisée. On peut ensuite vérifier le fragment PCR par digestion avec une enzyme de restriction et vérification de la taille des fragments obtenus. Afin de cibler correctement le gène de sélection, ce dernier est flanqué par des régions homologues à la région ciblée. J'ai utilisé trois méthodes :

La première est de construire un plasmide avec les séquences désirées, puis de digérer le plasmide afin d'obtenir le fragment d'intérêt

La deuxième consiste à utiliser de longues amorces PCR avec 40-50 paires de base d'homologie avec la séquence cible. En 3' de ces séquences on trouve la séquence (environ 15-20 paires de bases) qui sert vraiment d'amorce pour amplifier le gène de sélection.

La troisième consiste à utiliser une souche qui a déjà l'invalidation et à amplifier la région invalidée contenant le marqueur de sélection. Ceci permet en prenant les amorces PCR adéquates d'amplifier un fragment avec des régions d'homologie avec la région ciblée très larges, ce qui favorise la recombinaison homologue.

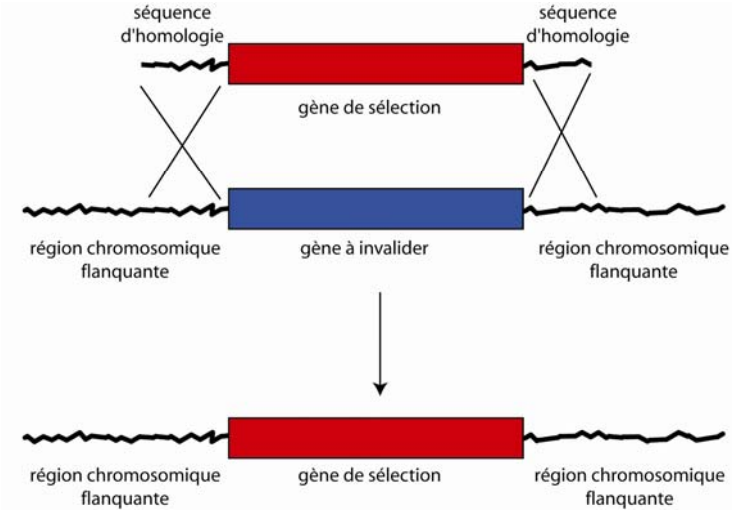


Figure 19. Invalidation génique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 3 – Résultats et Discussion

I. Recherche de suppresseurs de la mutation tub1-Glu

Bik1p se lie moins bien aux bouts plus des microtubules Glu. Toutefois, sa liaison aux SPBs est conservée. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette observation. Il peut s'agir d'un problème d'interaction directe impliquant que Bik1p se lie aux bouts plus et aux SPB de façon différente. A l'inverse, il peut s'agir d'un phénomène indirect régulant l'association de Bik1p aux bouts plus. On peut penser par exemple à des phosphorylations. Dans ce cas, il est attrayant de penser que la tubuline pourrait faire partie d'une voie de signalisation intervenant dans la constitution des bouts plus. La phénylalanine C-terminale de la tubuline α pourrait alors être d'importance majeure. Nous avons donc décidé de rechercher des suppresseurs de la mutation *tub1-Glu.* Ce faisant, nous espérons pouvoir discriminer les différentes possibilités et déterminer les effecteurs le cas échéant.

La souche *tub1-Glu* présente deux caractéristiques que nous utilisons dans ce test. D'une part, les levures *tub1-Glu* sont hypersensibles au bénomyl, une drogue qui dépolymérise les microtubules. D'autre part, ces mêmes levures sont sensibles au froid, leur croissance à 10°C étant nettement réduite par rapport à une souche sauvage. Il s'agit donc de deux caractéristiques associées à la mutation *tub1-Glu* permettant de cribler aisément les gènes sauvant ce phénotype. Une fois ces gènes identifiés, nous pouvons alors analyser les bouts plus des microtubules en microscopie.

Les phénotypes observés pourraient être reliés au défaut d'association de Bik1p aux bouts plus des microtubules. En effet, les souches invalidées pour *BIK1* sont hyper sensibles au bénomyl, comme c'est le cas pour la souche *tub1-Glu*. Nous espérons cibler directement le défaut d'association de Bik1p aux bouts plus par ce crible.

Le principe de cette expérience est de transformer la souche *tub1-Glu* par une banque d'ADN génomique insérée dans un vecteur de sur-expression, et de sélectionner les clones qui deviennent alors résistants au bénomyl et au froid. Une fois cette étape réalisée, nous pouvons identifier les gènes candidats et les analyser. Le principe du crible est schématisé dans la figure 20.

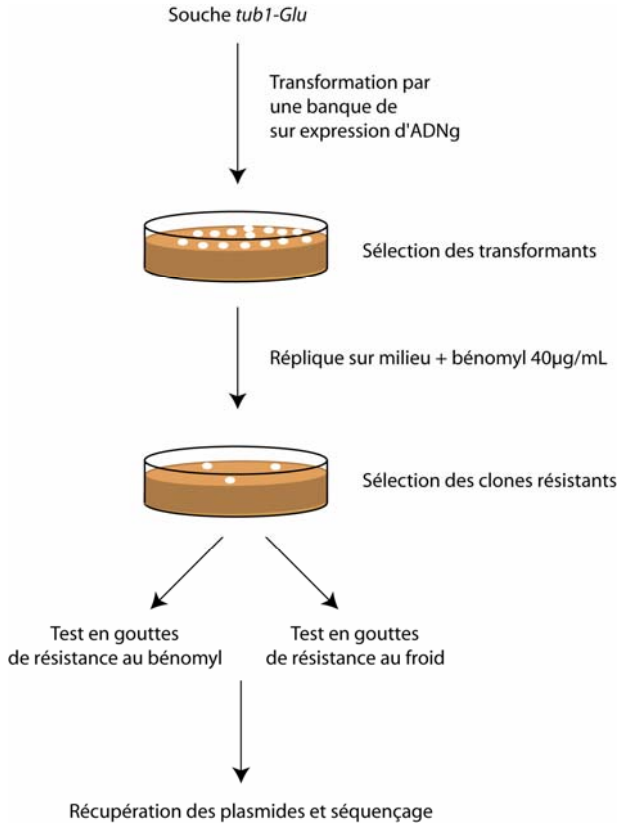
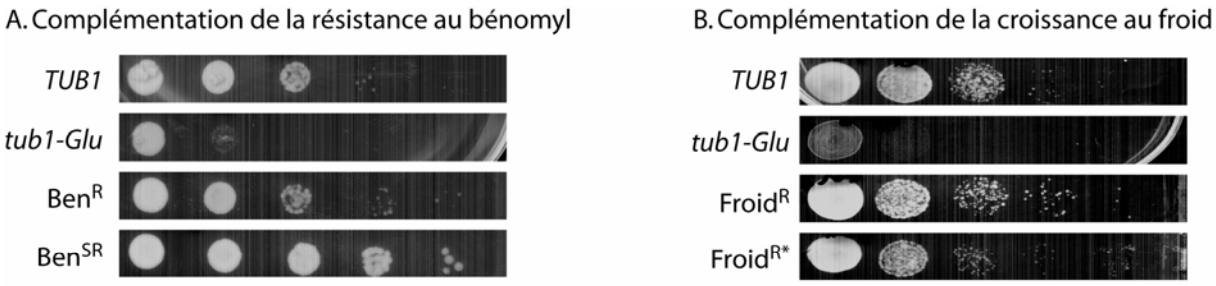


Figure 20. Principe du crible de complémentation.
La souche *tub1-Glu* est transformée par une banque d'ADNg. Tous les transformants sont sélectionnés sur milieu Sc-Ura. Une réplique de chaque boîte est réalisée sur YPD + bénomyl (40 µg/ml). Les clones qui poussent sur bénomyl sont sélectionnés et ensuite testés en gouttes, puis les plasmides isolés et les séquences sur-exprimées identifiées.

Après transformation de la souche *tub1-Glu* par la banque de complémentation, j'ai obtenu 60000 clones contenant un de ces plasmides. Ces clones ont alors été répliqués sur des milieux contenant du bénomyl (40 µg/ml), la souche *tub1-Glu* étant sensible au bénomyl à cette concentration. J'ai obtenu cent six colonies poussant dans ces conditions. Elles ont été repiquées pour une analyse plus complète du phénotype.

J'ai alors testé ces clones pour leur sensibilité au bénomyl et leur croissance au froid (10°C) par un test en 'gouttes'. Des dilutions sériées de 10^{-1} à 10^{-5} de pré-cultures de chaque clone sont déposées sur une boîte de Pétri contenant du bénomyl et une autre placée à 10°C. Ceci permet de suivre la viabilité des cellules, en en déposant plus ou moins. Ces résultats sont résumés dans la figure 21. Nous avons distingué deux classes de complémentation concernant la sensibilité au bénomyl. D'une part, des clones qui ont la même sensibilité au bénomyl que la souche contrôle (Ben^{R}) et, d'autre part, des clones qui sont super-résistants au bénomyl (Ben^{SR}). Le test de croissance au froid nous a également permis de distinguer deux

classes de complémentation : des clones qui ont la même résistance au froid que la souche non mutée (Froid^{R}) et d'autres qui ont une croissance un peu moins bonne que la souche non mutée, mais tout de même supérieure à la souche *tub1-Glu* (Froid^{R*}). Sur les cent six clones résistants au bénomyl obtenus dans un premier temps, trente quatre sont aussi résistants au froid. Nous avons donc continué l'analyse de ces trente quatre clones.



C. Répartition des clones dans les différentes classes de complémentation

		Froid^{R}	Froid^{R*}	Froid^{R} et Froid^{R*}
Ben^{R} et Ben^{SR}	106	23	11	34
Ben^{R}	18	9	4	13
Ben^{SR}	88	14	7	21

Figure 21. Résultats du crible primaire de suppresseurs
A. Exemple de clones résistants (Ben^{R}) ou super-résistants (Ben^{SR}) au benomyl et comparés aux souches *TUB1* et *tub1-Glu*. Des dilutions sériées de 10^{-1} à 10^{-5} de pré-cultures (de gauche à droite) ont été déposées sur YPD + bénomyl (40 µg/ml) et incubées 3jours à 30°C.
B. Exemple de clones plus ou moins résistants au froid (Froid^{R} et Froid^{R*}) et comparés aux souches *TUB1* et *tub1-Glu*. Des dilutions sériées de 10^{-1} à 10^{-5} de pré-cultures (de gauche à droite) ont été déposées sur Sc-Ura et incubées 10jours à 10°C.
C. Tableau récapitulatif des clones sélectionnés au cours du crible.

Le séquençage des plasmides contenus dans ces trente quatre clones nous a permis de distinguer deux groupes de plasmides. Pour vingt-six d'entre eux, la séquence potentiellement sur-exprimée contient entre autres le gène *TUB3*. Dans les huit autres cas, il s'agit de régions chromosomiques différentes.

I.1. Les huit plasmides de complémentation ne contenant pas *TUB3*

Ces plasmides présentent tous des séquences différentes (figure 22). Deux d'entre eux (CN1 et AN4) sont de très petites séquences (d'une dizaine de paires de bases) dont l'effet est peut-être artéfactuel. Pour les autres plasmides, différents gènes candidats apparaissent. Les gènes identifiés sont connus pour être principalement reliés à des évènements de transcription/traduction ou de synthèse de composants de la membrane plasmique et en particulier d'ergostérol ou de sphingolipides.

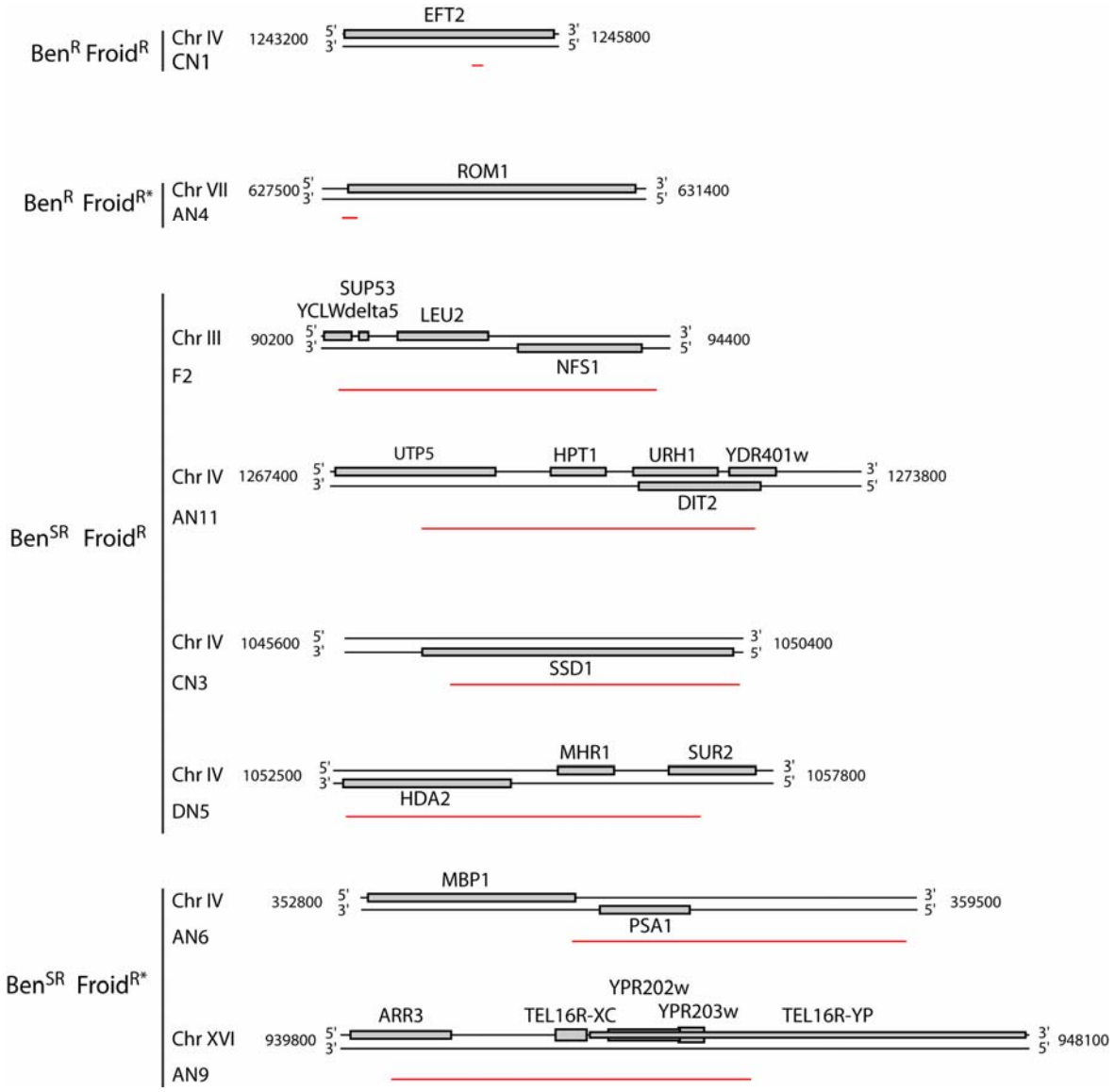


Figure 22. Schéma des séquences insérées dans les huit plasmides ne contenant pas *TUB3*.
Les régions grisées correspondent aux régions chromosomiques, les régions en rouge sont les inserts présents dans les plasmides.

Afin de savoir si ce sont vraiment ces plasmides qui entraînent la suppression de la sensibilité au froid et au bénomyl, j'ai isolé ces huit plasmides et les ai transformé de nouveau dans la souche *tub1-Glu*. J'ai alors analysé la résistance au froid et au bénomyl par un test en gouttes. De façon surprenante, aucun de ces plasmides n'a été capable de supprimer les sensibilités de la souche *tub1-Glu*. L'explication la plus probable est que les souches sélectionnées dans un premier temps sur bénomyl possèdent des mutations qui leur confèrent un phénotype sauvage.

Le bénomyl est un mutagène léger, mais il est probable que dans ces huit cas, une mutation soit apparue dans les souches sélectionnées. Je n'ai donc pas continué leur analyse. De plus, chaque plasmide n'est apparu qu'une fois, alors que nous avons recouvert la banque plusieurs fois (voir le paragraphe suivant), argumentant en faveur d'un effet autre que celui des plasmides.

I.2. Les plasmides sur-exprimant le gène *TUB3*

Les séquences de ces vingt-six plasmides sont représentées dans la figure 23. Le gène *TUB3* est toujours entier. D'autres gènes sont présents, *YML125c* par exemple. Afin de savoir si *TUB3* seul pouvait supprimer la sensibilité au bénomyl et au froid, nous avons transformé un plasmide ne sur-exprimant que *TUB3* (*2µTUB3*) dans la souche *tub1-Glu* et analysé le transformant. Nous avons pu conclure que la sur-expression du seul gène *TUB3* pouvait supprimer la sensibilité au bénomyl et au froid de la souche *tub1-Glu*. Ceci nous conforte dans la spécificité du phénotype associé à la mutation *tub1-Glu* et constitue un bon contrôle de complémentation, en ce sens que la présence de tubuline sauvage restaure un phénotype sauvage.

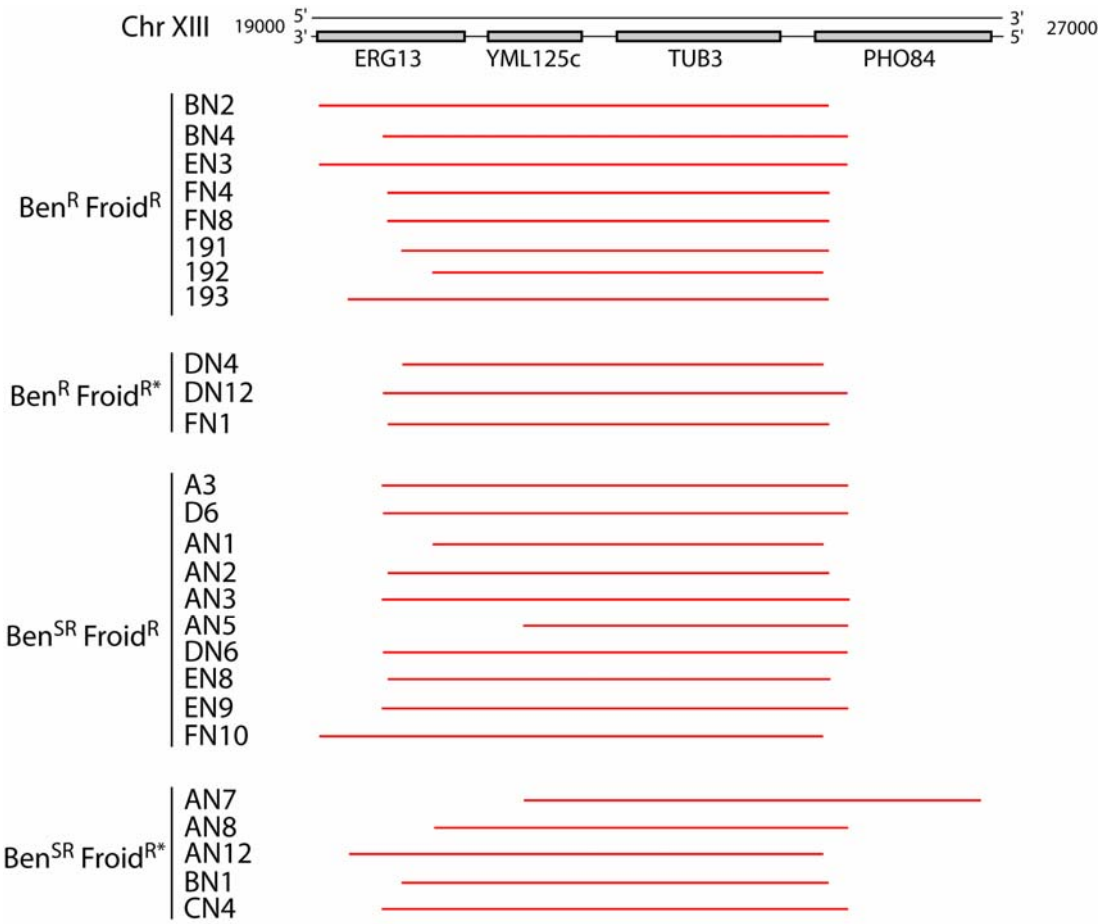


Figure 23 Schéma des séquences insérées dans les vingt-six plasmides contenant *TUB3*.
Les régions grisées correspondent aux régions chromosomiques, les régions en rouge sont les inserts présents dans les plasmides.

Le fait que le gène *TUB3* soit retrouvé dans vingt-six clones différents nous indique que nous avons certainement largement recouvert la banque d'ADN génomique. Ceci nous suggère que le crible s'est passé dans des conditions permettant de tester tous les fragments sur-exprimés de la banque.

J'ai ensuite analysé la liaison de Bik1p aux bouts plus des microtubules dans la souche *tub1-Glu* sur-exprimant *TUB3*. J'ai transformé cette souche par un plasmide sur-exprimant la protéine de fusion 2µBik1p-GFP, et j'ai comparé son niveau de fluorescence avec ceux des souches contrôles (*TUB1* et *tub1-Glu*). Ces résultats sont présentés dans la figure 24.

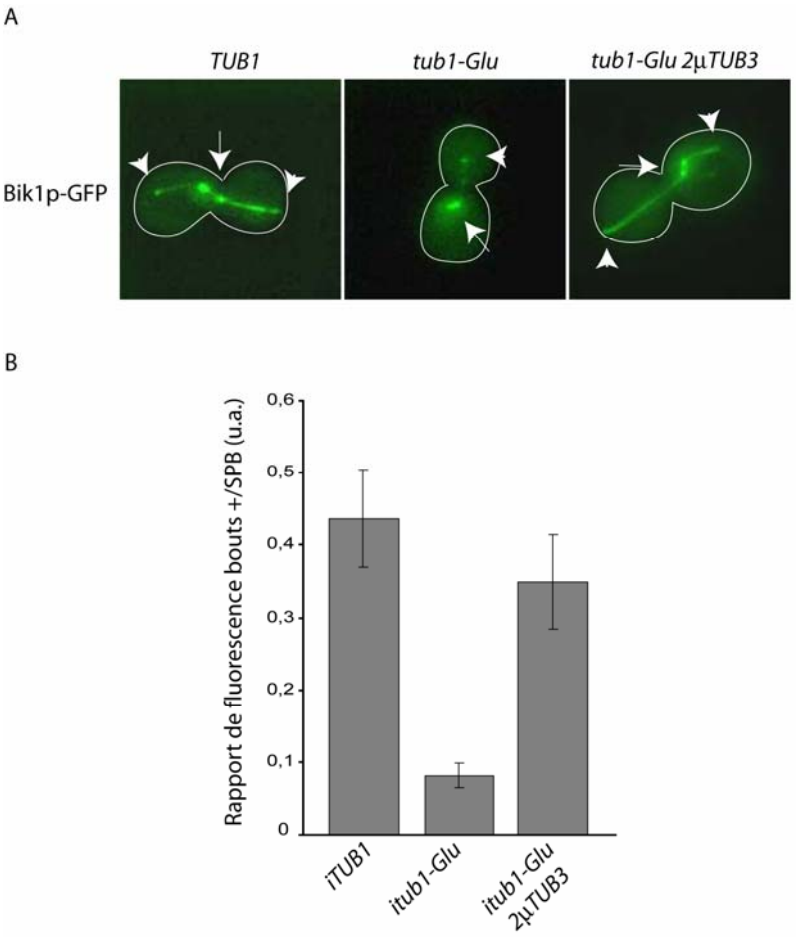


Figure 24. Liaison de Bik1p aux bouts plus des microtubules dans les souches *tub1-Glu* sur-exprimant *TUB3*.
A. Localisation de 2µBik1p-GFP dans les souches *TUB1* (gauche), *tub1-Glu* (milieu) et *tub1-Glu* sur-exprimant *TUB3* (droite). Les flèches montrent le fuseau mitotique, les têtes de flèche les bouts plus des microtubules astraux.
B. Quantification du rapport de l'intensité de fluorescence de 2µBik1p-GFP aux bouts plus des microtubules sur celle des SPBs. Les barres d'erreurs représentent les s.e.m.

Dans la souche *TUB1*, 2µBik1p-GFP est associée aux SPBs, aux bouts plus des microtubules, ainsi que le long des microtubules. Dans la souche *tub1-Glu*, 2µBik1p-GFP est associée de la même façon aux SPBs, mais l'association aux bouts plus est faible, et on ne l'observe pas le long des microtubules comme cela a déjà été décrit (Badin-Larcon et al., 2004). Finalement, lorsque l'on rajoute le plasmide *2µTUB3* dans cette souche, la localisation de 2µBik1p-GFP est similaire à la souche sauvage (figure 24A). On supprime ainsi les conséquences de la mutation *tub1-Glu*. J'ai ensuite analysé les niveaux de fluorescence de 2µBik1p-GFP dans ces trois souches. La figure 24B montre le rapport du niveau fluorescence des bouts plus sur celui des SPBs. J'ai par ailleurs vérifié que le niveau de fluorescence des SPBs est le même dans les trois souches. Comparé au rapport de la souche contrôle, le rapport

de fluorescence de la souche *tub1-Glu* est trois à quatre fois plus faible. Lorsque l'on rajoute *2µTUB3* dans la souche *tub1-Glu*, ce rapport de fluorescence redevient équivalent à celui de la souche exprimant de la tubuline sauvage.

Finalement, j'ai aussi analysé quelques plasmides que j'avais sélectionnés dans la première sélection au bénomyl, mais qui étaient sensibles au froid. Des candidats ne passant que la sélection du bénomyl sont potentiellement intéressant. Ils pourraient permettre de cibler des gènes régulant les microtubules Glu. Ces plasmides sont au nombre de quatre-vingt. Le crible nous a montré que nous avions certainement recouvert la banque plus de vingt fois. Ainsi, si un des plasmides est significatif, il devrait être retrouvé plusieurs fois. Sur les quatre-vingt plasmides, pas plus de trois à cinq plasmides doivent être significatifs. J'en ai donc séquencé neuf. Pour un de ces plasmide, il s'agit d'une séquence contenant *TUB3*. Pour trois autres, la séquence sur-exprimée contient le gène *YAP1*. Un plasmide ne contient pas de séquence insérée, un autre les gènes *YHL029c* /*WSC4*, un autre les gènes *YDC1* / *ELP3* et le dernier le gène *ZRG8*.

Le seul gène présent en plusieurs copies est *YAP1*. Ce gène code pour un facteur de transcription de la famille Jun. Sa sur-expression est impliquée dans des phénomènes de résistance à des drogues (Hussain and Lenard, 1991). Cette fonction explique la résistance au bénomyl. Il a été retrouvé trois fois sur neuf plasmides, donc il doit être présent environ vingt à trente fois dans les quatre vingt plasmides, ce qui correspond au recouvrement de la banque. Ceci constitue encore une fois un contrôle du crible.

Au final, ce crible nous permet de dire que seule la tubuline sauvage est capable de supprimer la sensibilité au froid et au bénomyl de la mutation *tub1-Glu*. Il est étonnant que seul *TUB3* ait été retrouvé. En effet *TUB1*, le gène codant majoritairement pour la tubuline n'a pas été identifié. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées. Tout d'abord, il a été rapporté que *TUB1* peut être sur-exprimé sans avoir de conséquences dramatiques (Weinstein and Solomon, 1990). Toutefois, dans le système *tub1-Glu* la tubuline α est exprimée sur un plasmide centromérique dont l'expression peut varier. La sur-expression de *TUB1* est alors peut-être létale. Enfin, une autre hypothèse peut venir du fait que *TUB1* et *TUB3* ont des propriétés différentes sur la dynamique des microtubules *in vitro* (Bode et al., 2003). Ainsi la sur-expression de *TUB1* n'a peut-être pas les propriétés nécessaires pour supprimer les sensibilités de la souche *tub1-Glu*.

I.3. Conclusions

Le but de ce crible était d'essayer de discriminer entre un défaut d'interaction directe de Bik1p avec les bouts plus des microtubules, et un défaut de régulation de cette interaction. Le résultat de ce crible plaide en faveur d'un défaut d'interaction directe. Ainsi ces résultats rejoignent ceux obtenus dans les systèmes eucaryotes supérieurs dans lesquels la tyrosine C-terminale de la tubuline α est nécessaire à l'interaction avec le domaine CAP-Gly (Peris et al., 2006). La levure est donc un bon modèle d'étude, puisque les règles semblent les mêmes que dans les autres systèmes.

II. Relations entre les localisations et les fonctions de Bik1p dans le mutant itub1-Glu

Dans ce travail, je me suis intéressé aux mécanismes de positionnement de Bik1p aux bouts plus des microtubules. De plus, la localisation de la dynéine dépend de Bik1p. Je me suis aussi intéressé à son positionnement, lorsque Bik1p a peu d'affinité pour les bouts plus des microtubules (sur les microtubules Glu). Lors de cette étude, j'ai obtenu des souches sans intermédiaires des interactions des microtubules avec le cortex. Je me suis alors intéressé au mécanisme permettant le positionnement et la migration du noyau dans ces souches.

II.1. La localisation de Bik1p aux bouts + des microtubules Glu dépend de Bim1p

Trois mécanismes non exclusifs permettent d'expliquer la capacité de Bik1p à s'associer spécifiquement aux bouts plus des microtubules (voir paragraphe IV.5.3.1.3. de l'introduction et la figure 25). Tout d'abord, Bik1p pourrait reconnaître spécifiquement la structure des bouts plus des microtubules. D'autre part, Bik1p pourrait faire de l'autostop, c'est-à-dire interagir avec une autre protéine liant elle même les bouts plus. Bim1p, l'homologue de EB1, pourrait participer à la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules. Enfin, chez *S. cerevisiae,* le ciblage par la kinésine Kip2p semble être déterminant pour la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules.

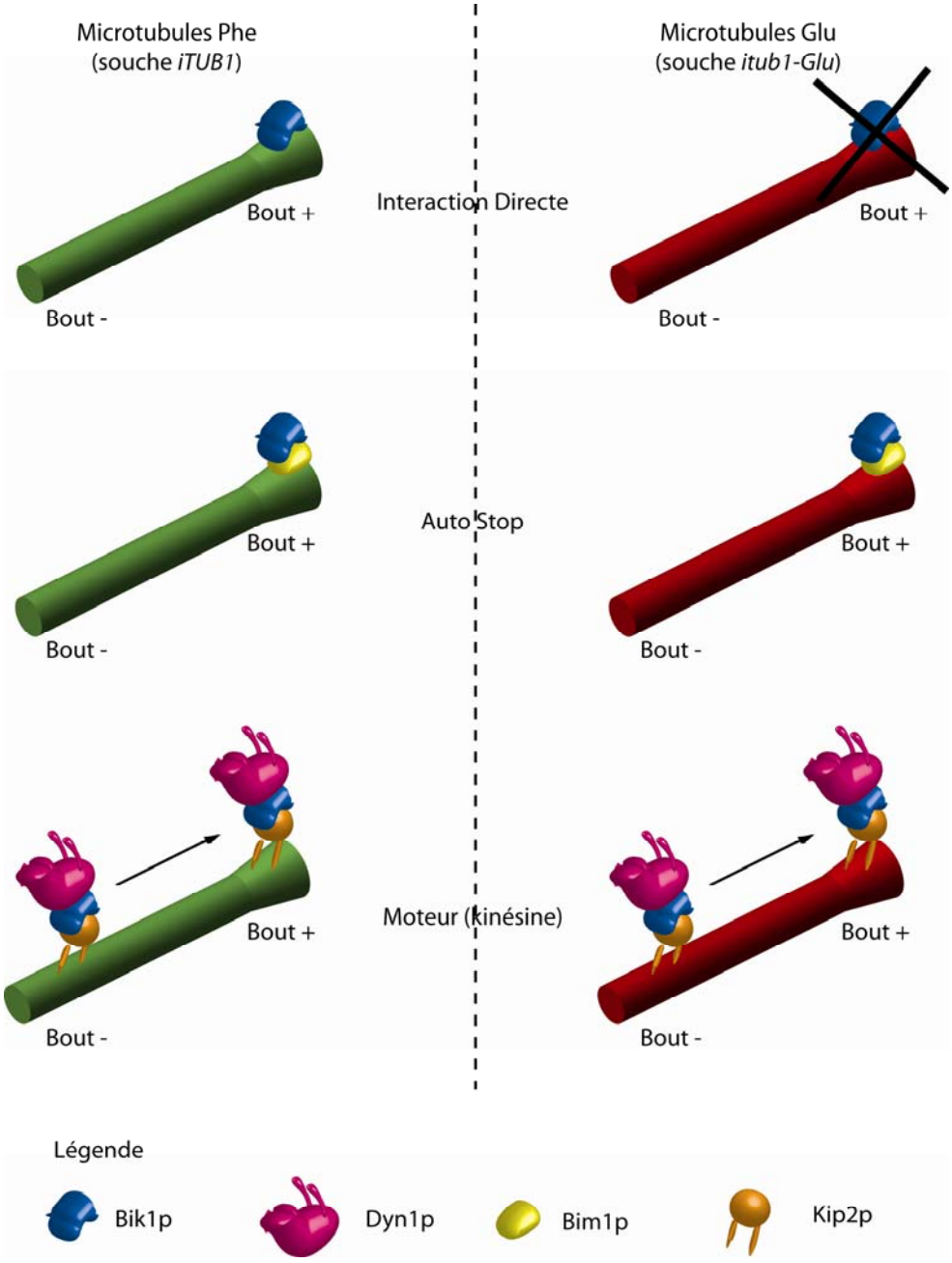


Figure 25. Modèles non exclusifs de localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules.
Les trois modèles proposés sont une interaction directe de Bik1p avec les bouts plus des microtubules (en haut), le modèle d'autostop, ici via Bim1p (au milieu), et le ciblage par la kinésine Kip2p (en bas). Sur ce dernier modèle, j'ai aussi intégré la chaîne lourde de la dynéine. A gauche sont les modèles possible sur des microtubules sauvages (Phe) et à droite les modèles possibles sur des microtubules Glu. L'interaction directe de Bik1p avec les bouts plus des microtubules Glu est perturbée (croix).

J'ai utilisé le modèle *itub1-Glu* afin de déterminer le mécanisme prépondérant de localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules.

La première analyse de la localisation de Bik1p a été menée en observant une protéine de fusion 2µBik1p-GFP sur-exprimée (Badin-Larcon et al., 2004). J'ai ré-examiné cette localisation en construisant des souches exprimant une protéine de fusion Bik1p-3GFP. La fusion avec les trois GFP est réalisée au locus *BIK1.* Ainsi la protéine observée est exprimée à son niveau endogène. Cette stratégie avait été utilisée par (Lin et al., 2001), qui avait déterminé que cette protéine de fusion est fonctionnelle.

Dans la souche *iTUB1,* Bik1p-3GFP est localisée aux SPBs et aux bouts plus des microtubules (Figure 26A). On observe la même localisation dans la souche *itub1-Glu* bien que les points correspondant aux bouts plus des microtubules soient moins intenses. L'analyse de l'intensité de fluorescence de Bik1p-3GFP aux bouts plus des microtubules montre que cette intensité est environ réduite d'un facteur trois dans la souche *itub1-Glu* en comparaison avec la souche *iTUB1* (figure 26B).

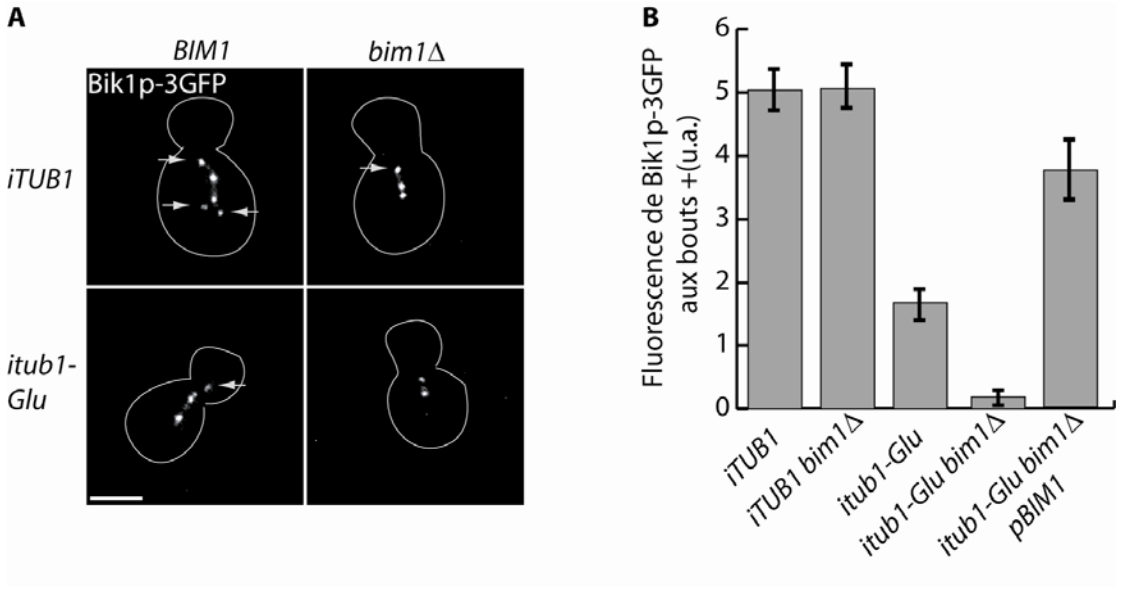


Figure 26. La localisation de Bik1p-3GFP aux bouts plus des microtubules Glu dépend de Bim1p.
A. Exemples de localisations de Bik1p-3GFP dans les souches *iTUB1* (en haut à gauche), *iTUB1 bim1Δ* (en haut à droite), *itub1-Glu* (en bas à gauche), et *itub1-Glu bim1Δ* (en bas à droite). Barre = 3 µm.
B. Quantification de l'intensité de fluorescence de Bik1p-3GFP dans les souches *iTUB1*, *iTUB1 bim1Δ*, *itub1-Glu*, *itub1-Glu bim1Δ*, et *itub1-Glu bim1Δ pBIM1*. Les barres d'erreurs représentent les s.e.m.

J'ai ensuite analysé les conséquences de l'invalidation de *BIM1* sur la localisation de Bik1p-3GFP dans les souches *iTUB1* et *itub1-Glu*, afin de tester l'hypothèse de l'autostop.

Tout d'abord, la délétion de *BIM1* n'est pas létale dans les deux souches. Ensuite, j'ai vérifié l'expression de Bik1p-3GFP par une analyse en western blot. J'ai pu vérifier que l'expression de Bik1p-3GFP est similaire dans les quatre souches (Figure 27).

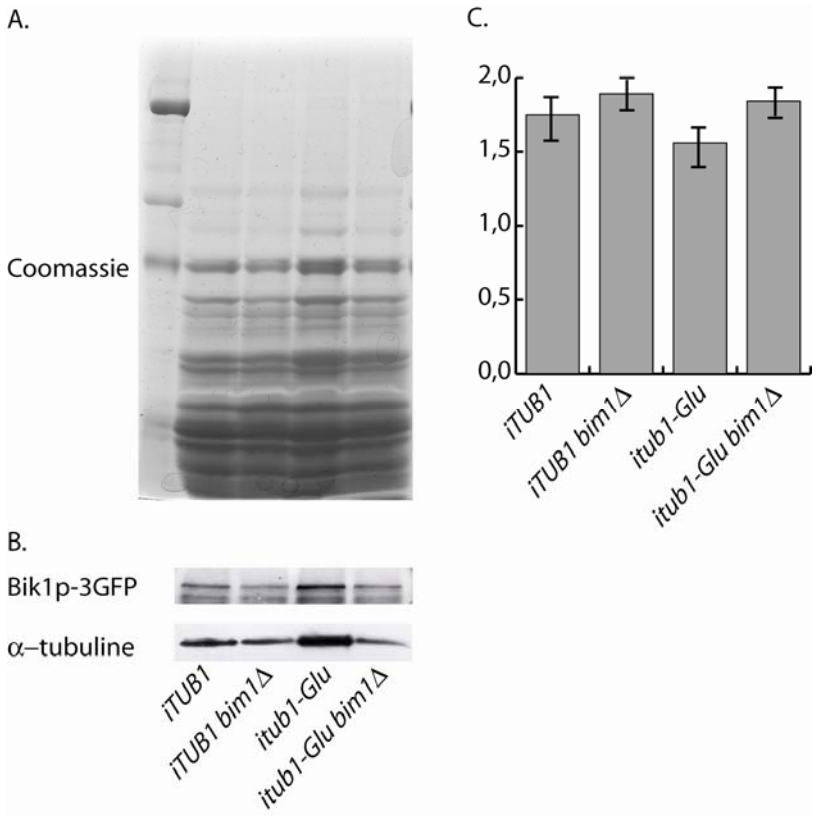


Figure 27. Vérification de l'expression de Bik1p-3GFP.
A. Gel coloré en bleu de Coomassie des dépôts des extraits totaux de protéines des souches *iTUB1, iTUB1 bim1Δ, itub1-Glu,* et *itub1-Glu bim1Δ.*
B. Western-Blot anti-GFP (en haut) et anti-α-tubuline (en bas).
C. Quantification des western-blots (rapport d'intensité de Bik1p-3GFP sur α-tubuline).

L'invalidation de *BIM1* n'a pas d'effet sur la localisation de Bik1p-3GFP dans la souche *iTUB1*. En revanche, dans la souche *itub1-Glu bim1*Δ, Bik1p-3GFP n'est plus ou peu détectée aux bouts plus des microtubules, mais est toujours présente aux SPBs (Figure 26A). La quantification des intensités de fluorescence de Bik1p-3GFP aux bouts plus montre que Bik1p-3GFP est pratiquement absente des bouts plus des microtubules des cellules *itub1-Glu bim1*Δ (Figure 26B).

J'ai alors transformé les souches *itub1-Glu bim1* par un plasmide exprimant le gène *BIM1* pour déterminer si ce phénotype est réversible. Dans ces souches, l'association de Bik1p-3GFP avec les bouts plus des microtubules est restaurée. L'intensité de fluorescence de

Bik1p-3GFP aux bouts plus des microtubules est supérieure à celle de la souche *itub1-Glu,* mais inférieure à celle des souches *iTUB1* et *iTUB1 bim1*Δ (Figure 26B). Cet effet pourrait correspondre à un effet de dosage de Bim1p. En effet, le plasmide *pBIM1* est un plasmide centromérique dont le nombre de copies dans la cellule peut varier de zéro à cinq. L'effet de *pBIM1* correspond vraisemblablement à une légère sur-expression de Bim1p.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, Bim1p a un effet sur la dynamique microtubulaire. La capacité des protéines à lier les bouts plus des microtubules pourrait dépendre de cette dynamique. Il est possible que l'invalidation de *BIM1* n'ait pas les mêmes conséquences dans les souches *iTUB1* et *itub1-Glu*.

Pour étudier la dynamique des microtubules, j'ai utilisé des souches exprimant Kip2p-3YFP à son niveau endogène. Dans ces souches, Kip2p-3YFP est associée aux bouts plus des microtubules et permet donc de mesurer leur dynamique en vidéo microscopie à fluorescence. Les résultats de cette analyse sont résumés dans le tableau 4. Ces données montrent que dans les souches *iTUB1* et *itub1-Glu,* les paramètres de dynamique sont comparables. L'invalidation de *BIM1* induit les mêmes changements, que la tubuline soit Phe ou Glu, c'est-à-dire une légère diminution de la vitesse de croissance, une grande diminution de la vitesse de décroissance et des microtubules qui passent plus de temps en pause. Les effets de l'invalidation de *BIM1* observés sont comparables à ceux décrits précédemment (Tirnauer et al., 1999).

		iTUB1	*iTUB1 bim1Δ*	*itub1-Glu*	*itub1-Glu bim1Δ*
Vitesse de croissance (µm/min)		2,26 +/-0,42 (n=30)	1,97 +/-0,26 (n=55)	2,38 +/-0,19 (n=34)	1,92 +/-0,77 (n=54)
Vitesse de décroissance (µm/min)		3,45 +/- 0,31 (n=29)	1,84 +/-0,23 (n=61)	3,26 +/-0,51 (n=29)	1,81 +/-0,40 (n=50)
Fréquence de catastrophe (évènement/s)		0,015	0,012	0,014	0,012
Fréquence de sauvetage (évènement/s)		0,011	0,009	0,017	0,013
Temps passé en (%)	Croissance	38,99	27,11	42,89	29,11
	Décroissance	25,05	30,26	23,38	28,77
	Pause	29,61	39,29	26,94	39,21
Temps total (s)		2675	5090	2502	5840

Tableau 4. Dynamique des microtubules.
La dynamique a été mesurée sur des films, dans des souches exprimant Kip2p-3YFP. Les acquisitions ont été faites toutes les 5s. n représente le nombre de microtubules suivis.

L'ensemble de ces données montre que Bim1p est requise pour la localisation résiduelle de Bik1p aux bouts plus des microtubules Glu. Cet effet spécifique sur les microtubules Glu n'est pas relié à un changement d'expression de Bik1p et est indépendant de la dynamique des microtubules.

De ces premiers résultats, nous pouvons conclure que lorsque la tubuline possède sa phénylalanine C-terminale, Bim1p ne participe pas de façon détectable à la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules. En revanche, lorsque Bik1p a une affinité réduite pour la tubuline, Bim1p devient importante.

Au moins deux hypothèses s'offrent maintenant à nous :

-soit Bim1p agit de façon directe, en interagissant avec Bik1p et la localisant aux bouts plus.

-soit Bim1p agit de façon indirecte, par exemple en modifiant la structure des bouts plus des microtubules.

En faveur de la première hypothèse, plusieurs données sont importantes. L'interaction de Bim1p et Bik1p a été décrite en double hybride (Wolyniak et al., 2006). De plus les

fondements structuraux de l'interaction de EB1 avec le domaine CAP-Gly sont détaillés (Hayashi et al., 2005; Honnappa et al., 2006). Cette interaction se fait par deux contacts : un premier entre la queue C-terminale de EB1 qui est similaire à celui de la tubuline α (les tous derniers acides aminés sont EEY) et un deuxième entre la partie C-terminale de EB1 conservée dans la famille EB1 (EB like domain). L'interaction EB1-CAP-Gly est assez forte, avec un Kd de l'ordre du micromolaire. Le fait d'empêcher un seul des deux contacts (en supprimant la queue C-terminale) défavorise fortement cette interaction qui a, alors, un Kd de l'ordre du millimolaire (Honnappa et al., 2006).

Bik1p a une affinité plus forte pour la tubuline possédant une phénylalanine. La queue C-terminale de Bim1p pourrait offrir un site de liaison pour Bik1p, qui ne serait révélé que dans la souche *itub1-Glu*, situation dans laquelle Bik1p a une affinité plus faible pour la tubuline. De plus, aux bouts plus des microtubules, la quantité de tubuline est supérieure à la quantité de Bim1p. L'interaction Bik1p-tubuline est donc favorisée, dans le cas de la souche *iTUB1* (figure 28).

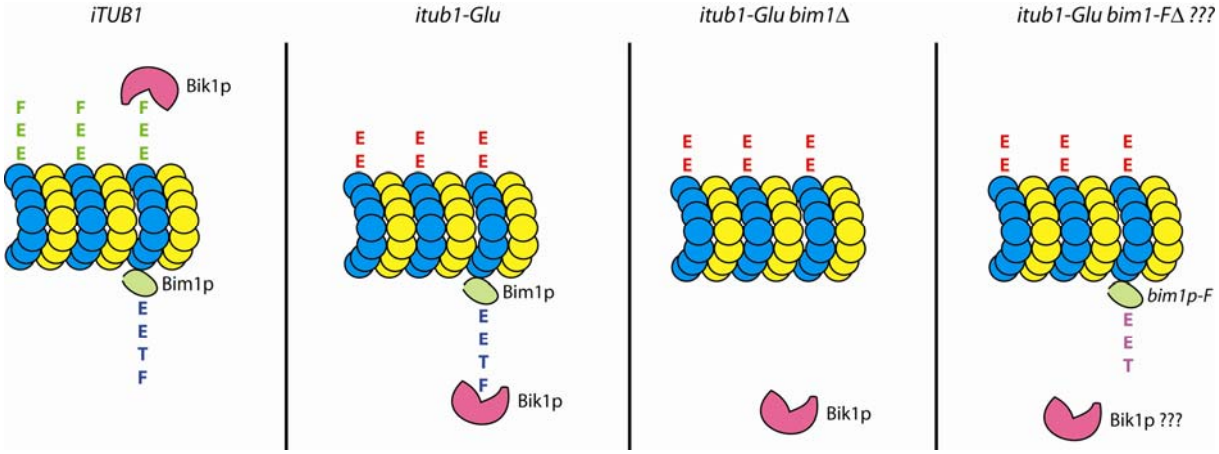


Figure 28. Un rôle de la phénylalanine C-terminale de Bim1p pour la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules Glu ?
Dans une souche sauvage, Bik1p lie les bouts plus entre autres via la phénylalanine C-terminale de la tubuline α (à gauche). Dans la souche *itub1-Glu*, Bik1p pourrait se lier au C-terminus de Bim1p (via la phénylalanine C-terminale, au milieu à gauche). Dans la souche *itub1-Glu bim1Δ*, Bik1p ne peut plus se lier ni à la tubuline α, ni à Bim1p (au milieu à droite). Le moyen de tester ces hypothèses est d'exprimer Bim1p sans sa phénylalanine C-terminale (*bim1p-F*) dans une souche *itub1-Glu bim1Δ* et d'observer la localisation de Bik1p (à droite).

J'ai testé l'influence de l'interaction entre Bik1p et Bim1p en supprimant la phénylalanine C-terminale de Bim1p (*bim1-FΔ*). J'ai intégré ce mutant dans un plasmide que

j'ai transformé dans la souche *itub1-Glu bim1Δ*. J'ai alors analysé la localisation de Bik1p-3GFP, et l'intensité de sa fluorescence aux bouts plus des microtubules. Les plasmides *pBIM1* et *pbim1-FΔ* permettent une localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules avec des intensités de fluorescence comparables (figure 29A). Ce résultat montre que la phénylalanine de Bim1p n'est pas requise pour l'effet de Bim1p sur la localisation aux bouts plus de Bik1p. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure le fait qu'une phénylalanine soit ajoutée de façon post traductionnelle au C-terminus de Bim1p, bien que cela soit peu probable du fait de l'inexistence de cycle de détyrosination de la tubuline α dans la levure.

Nous ne pouvons pas non plus exclure un rôle direct de Bim1p par d'autres domaines que le résidu C-terminal.

Une autre expérience nous permet de pencher vers le fait que Bim1p agisse de façon indirecte. Si on imagine que Bim1p ait un effet favorable sur les paramètres biochimiques de l'interaction entre Bik1p et les microtubules, on peut penser que modifier d'une autre façon ces mêmes paramètres fera varier la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules. J'ai donc caractérisé les conséquences de la sur-expression de Bik1p. Cette sur-expression doit avoir un effet favorable sur la liaison de Bik1p aux bouts plus des microtubules.

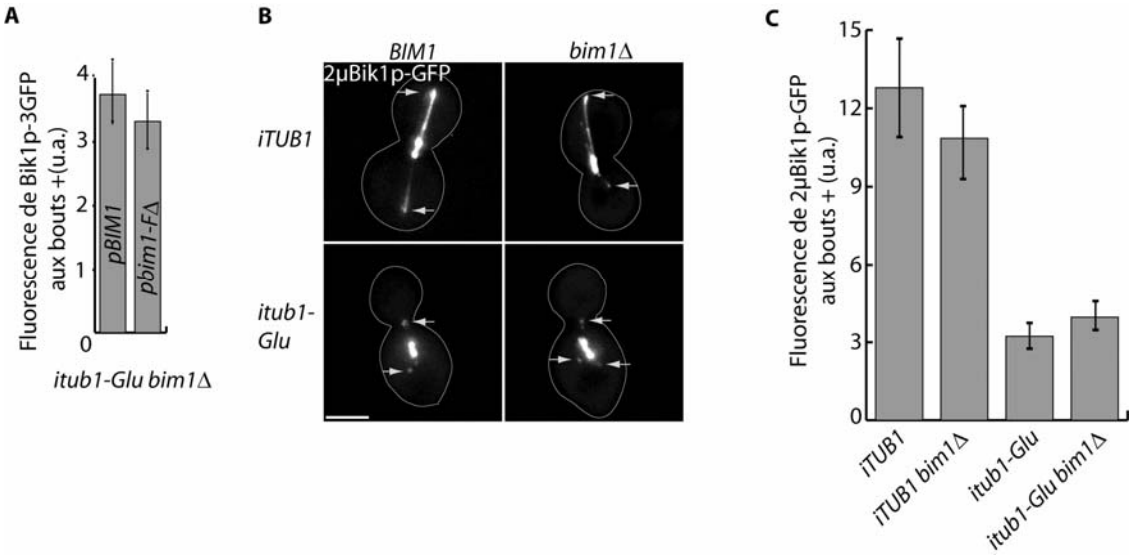


Figure 29. Rôle de la Phe C-terminale de Bim1p et sur-expression de Bik1p.
A. Effet de *bim1p-FΔ* sur la localisation de Bik1p-3GFP**.** Quantification de la fluorescence de Bik1p-3GFP aux bouts plus des microtubules dans des souches *itub1-Glu bim1Δ* exprimant *BIM* ou *bim1-FΔ*. Les barres d'erreurs représentent les s.e.m.
B. Effet de Bim1p lorsque Bik1p est sur-exprimé. Localisation de Bik1p-GFP sur-exprimée dans des souches *iTUB1* (en haut à gauche), *iTUB1 bim1Δ* (en haut à droite), *itub1-Glu* (en bas à gauche), et *itub1-Glu bim1Δ* (en bas à droite). Les flèches montrent les bouts plus des microtubules.
C. Quantification de l'intensité de fluorescence de Bik1p-GFP sur-exprimée aux bouts plus des microtubules. Les barres d'erreur représentent les s.e.m.

J'ai utilisé un plasmide sur-exprimant la protéine de fusion 2µBik1p-GFP. Cette sur-expression conduit Bik1p à se localiser aux bouts plus des microtubules mais aussi le long des microtubules dans la souche *iTUB1* (figure 29B). Dans ce contexte, l'invalidation de Bim1p n'a pas d'effet. L'analyse de l'intensité de 2µBik1p-GFP aux bouts plus des microtubules montre qu'elle est comparable dans les souches *iTUB1* et *iTUB1 bim1Δ* (figure 29C). Dans la souche *itub1-Glu*, 2µBik1p-GFP est localisée aux bouts plus mais son intensité est réduite d'un facteur trois par rapport au contrôle. De plus, 2µBik1p-GFP ne s'associe pas le long des microtubules. L'invalidation de *BIM1* dans la souche *itub1-Glu* n'a pas d'effet sur la localisation résiduelle de Bik1p aux bouts plus. L'intensité de fluorescence mesurée est similaire à celle de la souche *itub1-Glu* (figure 29C).

Encore une fois plusieurs interprétations sont possibles. Tout d'abord l'effet cinétique que nous avons testé. Bim1p n'est plus requise car l'effet de sa délétion est compensé par la sur-expression de Bik1p. Une alternative viendrait du fait que Bik1p se lie à la tubuline par plusieurs contacts de faible affinité. La somme de ces contacts permet une interaction efficace. Dans le cas de la tubuline Glu, un contact entre la tubuline alpha et Bik1p est perturbé et l'interaction globale est réduite. La sur-expression de Bik1p pourrait compenser cela en favorisant par exemple les autres contacts. Ceci pourrait fournir une explication au fait que Bim1p ne soit pas requise à la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules Glu lorsque Bik1p est sur-exprimée.

Le travail présenté ne permet pas encore de comprendre de façon détaillée la contribution de Bim1p à la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules Glu. Toutefois, ces expériences m'ont permis d'obtenir des souches de levure avec différentes quantités de Bik1p aux bouts plus des microtubules. La souche *iTUB1* accumule Bik1p aux bouts plus comme une cellule sauvage, la souche *itub1-Glu* en accumule trois fois moins, et la souche *itub1-Glu bim1Δ* n'en accumule presque pas.

II.2. La dynéine est aux bouts plus des microtubules Glu

La localisation de la chaîne lourde de la dynéine aux bouts plus des microtubules dépend de la protéine Bik1p. En effet, la délétion de *BIK1* ou bien la délétion de la partie C-terminale de Bik1p (domaine cargo) entraînent la disparition de Dyn1p des bouts plus des

microtubules (Sheeman et al., 2003). Dans les souches *itub1-Glu* et *itub1-Glu bim1Δ,* Bik1p est peu ou très peu présente aux bouts plus des microtubules. Je me suis intéressé aux conséquences que cela avait pour la localisation de Dyn1p. Pour cela, j'ai utilisé des souches exprimant la protéine de fusion Dyn1p-3GFP, à son niveau endogène.

Dans les souches contrôles (*iTUB1* et *iTUB1 bim1Δ*) et dans les souches *itub1-Glu* et *itub1-Glu bim1Δ* observées, Dyn1p est localisée aux SPBs et aux bouts plus des microtubules astraux (figure 30A). L'analyse des niveaux de fluorescence de Dyn1p-3GFP aux bouts plus des microtubules montre qu'elle est comparable dans les quatre souches (Figure 30B). J'ai vérifié que la dynéine observée était présente sur des microtubules dynamiques. Les figures 30C et 30D montrent la dynéine se déplaçant avec des bouts plus de microtubules respectivement en croissance et en décroissance. Ainsi, Dyn1p a le même comportement que celui décrit dans des souches sauvages par d'autres groupes (Sheeman et al., 2003).

Bien que Bik1p soit peu ou très peu présente aux bouts plus des microtubules, la localisation de la dynéine aux bouts plus est conservée. Plusieurs possibilités s'offrent à nous afin d'expliquer ces résultats. Tout d'abord, la dynéine peut lier différemment les bouts plus des microtubules Glu et les bouts plus des microtubules sauvages. D'autre part, la dynéine ne nécessite peut-être pas l'accumulation de Bik1p aux bouts plus des microtubules. Cette deuxième explication implique que Bik1p et Dyn1p lient les bouts plus des microtubules de façon indépendante.

Afin de répondre à ces questions je me suis intéressé à la protéine Kip2p, la kinésine qui participe à la localisation de Bik1p et Dyn1p.

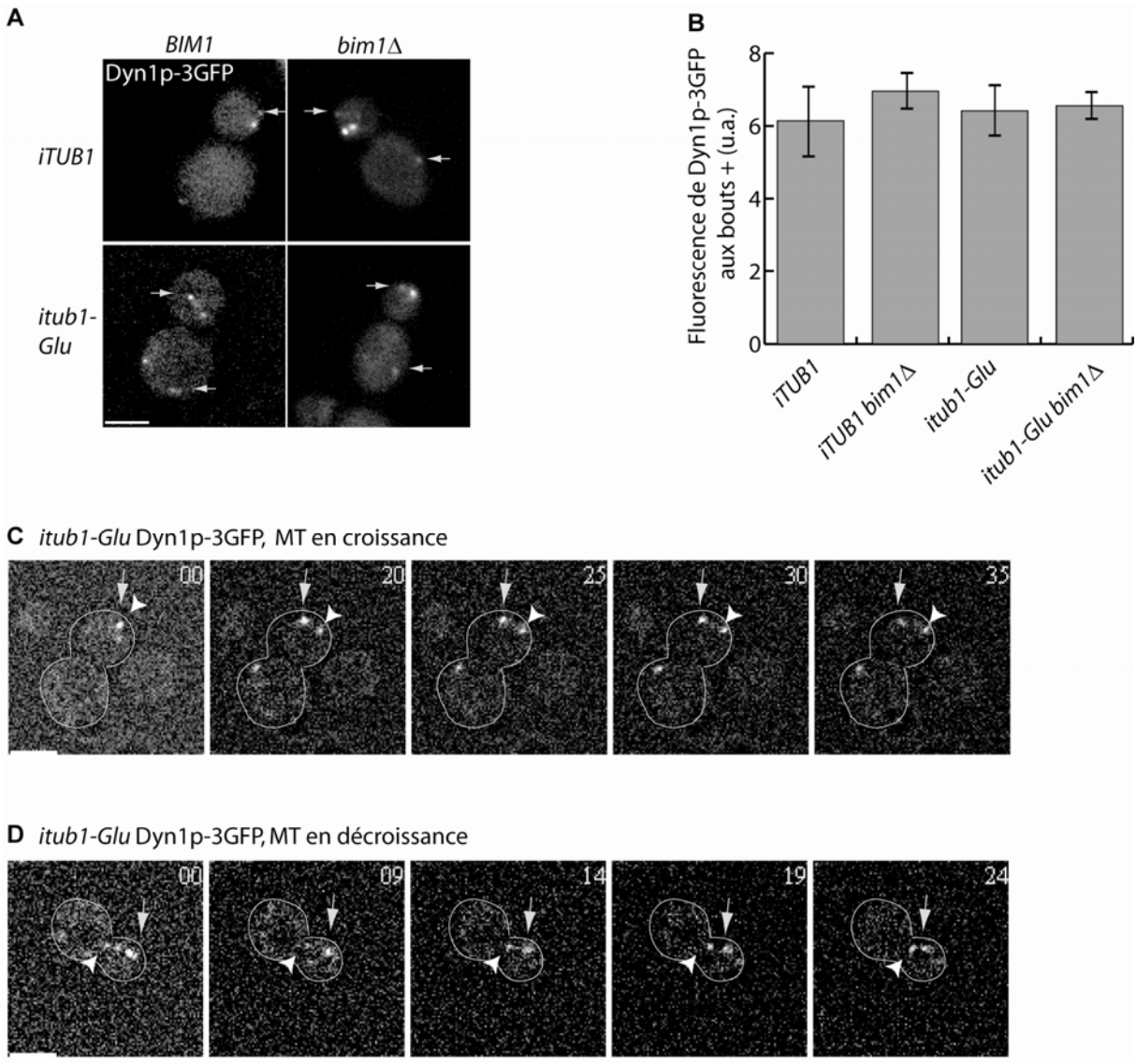


Figure 30. Localisation de Dyn1p, la chaîne lourde de la dynéine.
A. Localisation de Dyn1p-3GFP dans les souches *iTUB1* (en haut à gauche), *iTUB1 bim1Δ* (en haut à droite), *itub1-Glu* (en bas à gauche), et *itub1-Glu bim1Δ* (en bas à droite). Les flèches montrent les bouts plus des microtubules.
B. Quantification de l'intensité de fluorescence de Dyn1p-3GFP aux bouts plus des microtubules. Les barres d'erreur représentent les s.e.m.
C. Dyn1p s'associe aux bouts plus des microtubules en croissance. Séquence d'images tirées d'un film. Dyn1p-3GFP est aux bouts plus d'un microtubule en croissance. Le temps est en secondes, la tête de flèche indique le SPB, et la flèche indique le bout plus d'un microtubule.
D. Dyn1p s'associe aux bouts plus des microtubules en décroissance. Séquence d'images tirées d'un film. Dyn1p-3GFP est aux bouts plus d'un microtubule en décroissance. Le temps est en secondes, la tête de flèche indique le SPB, et la flèche indique le bout plus d'un microtubule.

II.3.La kinésine Kip2p sur les microtubules Glu

J'ai observé le comportement de la kinésine Kip2p dans la souche *itub1-Glu*. Pour cela, j'ai utilisé une protéine de fusion Kip2p-3YFP intégrée au locus endogène de *KIP2*. Dans la souche *itub1-Glu*, Kip2p-3YFP est associée aux bouts plus des microtubules en croissance (figure 31A) et en décroissance (figure 31B), comme cela a été déjà décrit précédemment (Carvalho et al., 2004). D'autre part des points de faible intensité de fluorescence sont observés le long des microtubules, se mouvant vers les bouts plus des microtubules rapidement (à une vitesse compatible avec celle d'un moteur moléculaire et plus élevée que la vitesse des microtubules en croissance). Ces points sont aussi visibles dans la souche *itub1-Glu* (figure 31C). J'ai ensuite mesuré l'intensité de fluorescence de Kip2p-3YFP aux bouts plus des microtubules (figures 31D et 31E). Cette intensité est comparable dans les souches *iTUB1* et *itub1-Glu*.

Dans des souches invalidées pour *BIM1*, Kip2p-3YFP s'accumule encore plus aux bouts plus des microtubules que dans les souches sauvages (Carvalho et al., 2004). C'est aussi le cas dans les souches *iTUB1 bim1Δ* et *itub1-Glu bim1Δ,* dans lesquelles les niveaux de fluorescence sont comparables, et presque deux fois plus élevés que dans les souches exprimant *BIM1* (figure 31E).

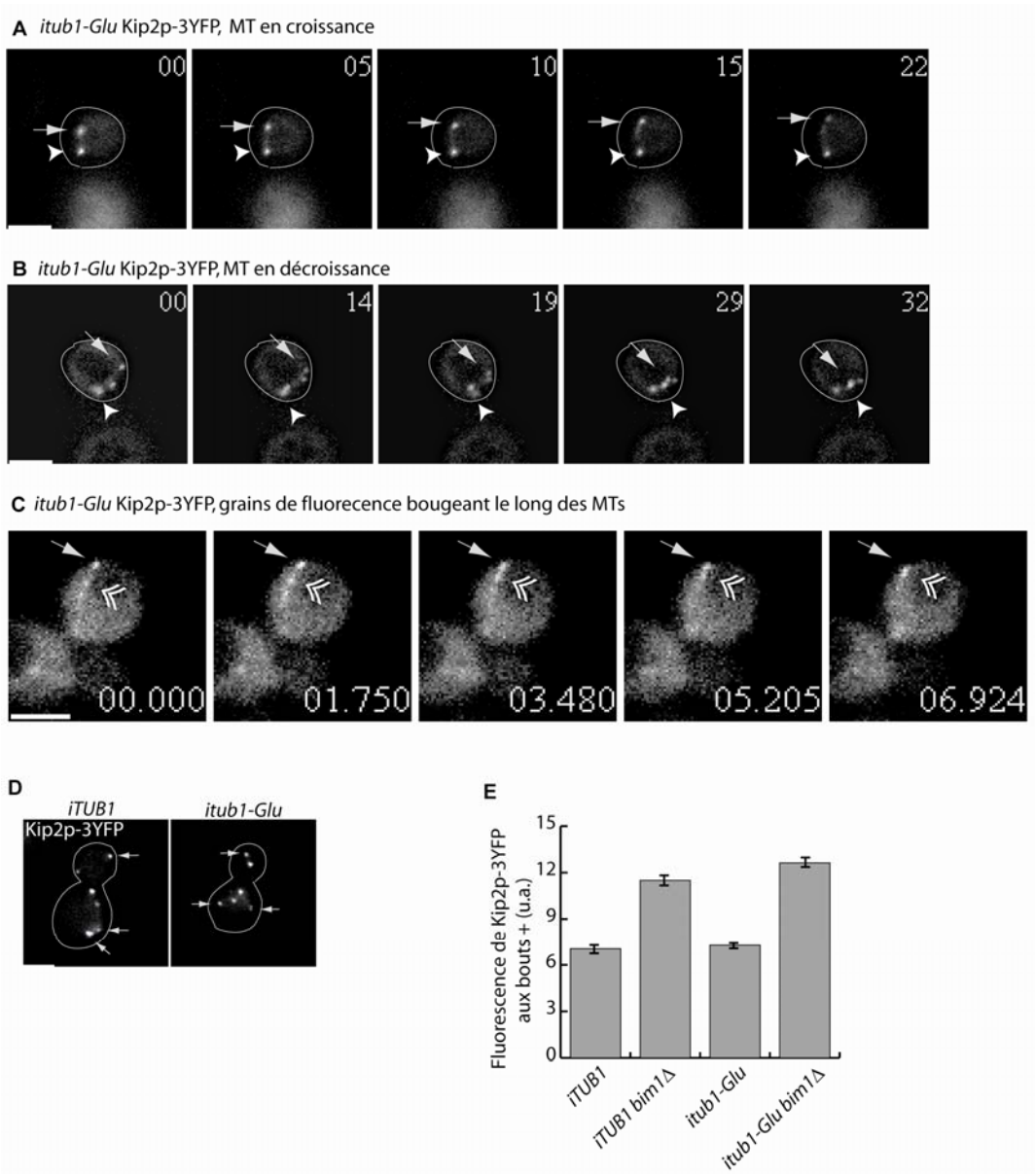


Figure 31. Localisation de la kinésine Kip2p.
A. Kip2p-3YFP s'associe aux bouts plus des microtubules en croissance. Séquence d'images tirées d'un film. Kip2p-3YFP est aux bouts plus d'un microtubule en croissance. Le temps est en secondes, la tête de flèche indique le SPB, et la flèche indique le bout plus d'un microtubule.
B. Kip2p-3YFP s'associe aux bouts plus des microtubules en décroissance. Séquence d'images tirées d'un film. Kip2p-3YFP est aux bouts plus d'un microtubule en décroissance. Le temps est en secondes, la tête de flèche indique le SPB, et la flèche indique le bout plus d'un microtubule.
C. Kip2p-3YFP se déplace le long des microtubules Glu vers les bouts plus. Série d'images tirées d'un film. Le bout plus est marqué d'une flèche, et un point fluorescent de faible intensité se déplace rapidement vers le bout plus (double chevron). Le temps est en secondes et millisecondes.
D. Localisation de Kip2p-3YFP dans les souches *iTUB1* (à gauche) et *itub1-Glu* (à droite). Les flèches montrent les bouts plus des microtubules.
E. Quantification de l'intensité de fluorescence de Kip2p-3YFP aux bouts plus des microtubules. Les barres d'erreur représentent les s.e.m.

Globalement, ces résultats nous permettent de conclure que Kip2p a la même localisation et le même comportement dans la souche *itub1-Glu* que dans les souches contrôles. Kip2p s'associe le long des microtubules, 'court' vers les bouts plus des microtubules, et enfin, son association aux bouts plus est accrue lorsque *BIM1* est délétée.

Nous pouvons déduire de l'ensemble de nos résultats le fait que les quantités de Bik1p, Dyn1p et Kip2p sont indépendantes aux bouts plus des microtubules. En effet, dans la souche *itub1-Glu bim1Δ* les niveaux de fluorescence de Kip2p sont très élevés par rapport à ceux des souches contrôles, ceux de la dynéine sont comparables, et ceux de Bik1p sont très faibles.

Dès lors, nous pouvons poser comme hypothèse que Dyn1p et Bik1p sont transportées vers les bouts plus des microtubules par la kinésine Kip2p, mais que ce complexe se dissocie aux bouts plus des microtubules, et que les trois protéines suivent les bouts plus des microtubules de façon indépendante. Ceci implique que nous devons pouvoir observer le transport de Bik1p et Dyn1p, et que nous pouvons abolir ce transport et observer les conséquences pour Dyn1p et Bik1p.

II.4. La localisation de la dynéine aux bouts plus des microtubules Glu requiert son transport par Kip2p et Bik1p

J'ai essayé de visualiser le transport de Bik1p et Dyn1p le long des microtubules vers les bouts plus dans la souche *itub1-Glu*. S'il existe, nous devrions observer des points de faible intensité de fluorescence se déplacer vers les bouts plus des microtubules à une vitesse comparable à celle d'une kinésine. J'ai pu observer de tels points pour les deux protéines, Bik1p (figure 32A) et Dyn1p (figure 32B). Ainsi, le transport de Bik1p et Dyn1p par la kinésine Kip2p semble se faire correctement sur les microtubules Glu.

J'ai ensuite essayé d'abolir ce transport en invalidant *KIP2* et ai observé les conséquences pour la localisation de Dyn1p et Bik1p aux bouts plus des microtubules.

Lorsque *KIP2* est invalidé dans la souche *iTUB1*, l'intensité de fluorescence de Dyn1p aux bouts plus est réduite de moitié par rapport au contrôle (figure 32C). Ce résultat est

comparable à ceux décrit par une autre étude (Carvalho et al., 2004). Dans la souche *itub1-Glu,* l'invalidation de *KIP2* conduit à une réduction encore plus importante de l'intensité de fluorescence de Dyn1p aux bouts plus (figure 32C). J'ai par ailleurs vérifié que Bik1p est absolument requise pour la localisation de Dyn1p aux bouts plus des microtubules. Dans les souches *iTUB1* et *itub1-Glu*, Dyn1p n'est plus détectable aux bouts plus des microtubules lorsque *BIK1* est invalidée (figure 32C), rejoignant les résultats décrits précédemment (Sheeman et al., 2003).

J'ai alors analysé les conséquences de l'invalidation de *KIP2* pour Bik1p. Dans une souche *iTUB1 kip2Δ,* l'intensité de fluorescence de Bik1p est réduite de moitié par rapport au contrôle comme cela a déjà été décrit (Carvalho et al., 2004), et comme c'est le cas pour Dyn1p. Dans la souche *itub1-Glu kip2Δ* cette réduction est encore plus prononcée (figure 32D).

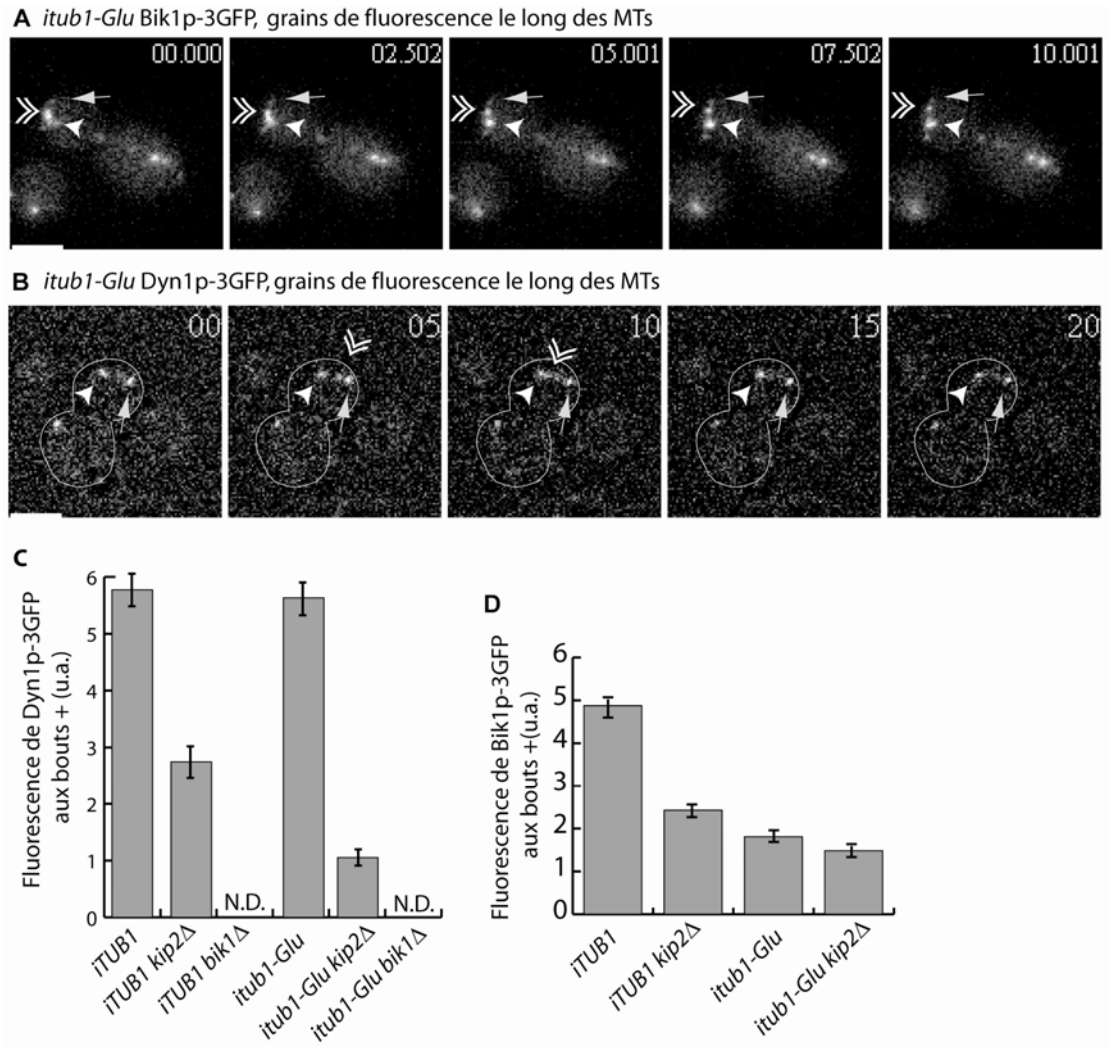


Figure 32. Bik1p et Dyn1p sont transportées vers les bouts plus par Kip2p.
A. Bik1p se déplace le long des microtubules Glu vers les bouts plus. Série d'images tirées d'un film. La tête de flèche montre le SPB, la flèche le bout plus d'un microtubule et le double chevron un point fluorescent se déplaçant vers le bout plus. Le temps est en secondes et millisecondes.
B. Dyn1p se déplace le long des microtubules Glu vers les bouts plus. Série d'images tirées d'un film. La tête de flèche montre le SPB, la flèche le bout plus d'un microtubule et le double chevron un point fluorescent se déplaçant vers le bout plus. Le temps est en secondes et millisecondes.
C. Effets de l'invalidation de *KIP2* sur la localisation de Dyn1p-3GFP. Quantification de l'intensité de fluorescence de Dyn1p-3GFP aux bouts plus des microtubules dans des souches *iTUB1* et *itub1-Glu* invalidées pour *KIP2* ou bien *BIK1*. Les barres d'erreur représentent les s.e.m. N.D. = Non détectable.
D. Effets de l'invalidation de *KIP2* sur la localisation de Bik1p-3GFP. Quantification de l'intensité de fluorescence de Bik1p-3GFP aux bouts plus des microtubules dans des souches *iTUB1* et *itub1-Glu* invalidées pour *KIP2*. Les barres d'erreur représentent les s.e.m.

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que le transport par Kip2p est effectif sur les microtubules Glu. Même si la dynéine interagit différemment avec les microtubules Glu, elle est transportée le long des microtubules Glu, et ce transport dépend de Kip2p. Lorsque ce transport est supprimé, les quantités de Dyn1p aux bouts plus des microtubules semblent directement reliés aux quantités de Bik1p.

Nous avons alors deux situations :

-lorsque le transport par Kip2p est présent, Dyn1p est amenée aux bouts plus des microtubules, mais l'association de Bik1p aux bouts plus des microtubules n'est pas nécessaire (souche *itub1-Glu bim1Δ*). Toutefois, Bik1p doit être exprimée.

-lorsque le transport par Kip2p est aboli, l'accumulation de Dyn1p aux bouts plus des microtubules semble dépendre directement de la quantité de Bik1p aux bouts plus des microtubules.

Afin de tester ce modèle, j'ai supprimé ces deux modes de localisation de la dynéine aux bouts plus des microtubules. Pour cela, j'ai construit des souches dans lesquelles Bik1p ne s'accumule presque pas aux bouts plus des microtubules (*itub1-Glu bim1Δ*) et dans lesquelles le transport est aboli (*kip2Δ*).

II.5. Invalidation de *KIP2* dans la souche *itub1-Glu bim1Δ*

J'ai construit des souches homozygotes pour la délétion de *BIM1* et hétérozygotes pour la délétion de *KIP2*. J'ai fait sporuler ces souches et analysé la viabilité des différentes combinaisons de mutations. Les résultats sont présentés dans le tableau 5. Dans la souche *iTUB1,* la double mutation *bim1Δ kip2Δ* est viable, de la même façon que les simples mutations *bim1Δ* ou *kip2Δ.* Dans la souche *itub1-Glu,* environ la moitié des doubles mutants *bim1Δ kip2Δ* ne donne aucune colonie.

Enfin, j'ai vérifié que dans les souches *iTUB1* et *itub1-Glu* la double mutation *bim1Δ bik1Δ* est létale, comme cela a été décrit (Schwartz et al., 1997).

Combinaisons de mutations		Tétrades analysées	% de létalité	Viabilité
iTUB1	*kip2Δ*	18	27.8%	Viable
iTUB1	*bik1Δ*	22	13.6%	Viable
iTUB1	*bim1Δ kip2Δ*	120	11.7%	Viable
iTUB1	*bim1Δ bik1Δ*	13	92.3%	Létal
itub1-Glu	*kip2Δ*	48	18.7%	Viable
itub1-Glu	*bik1Δ*	40	10%	Viable
itub1-Glu	*bim1Δ kip2Δ*	146	56.2%	1/2 Létal
itub1-Glu	*bim1Δ bik1Δ*	15	93.3%	Létal

Tableau 5. Viabilité de la combinaison des mutations *bim1Δ* et *kip2Δ*.
La viabilité des différentes combinaisons de mutations a été mesurée par analyse de tétrades.

J'ai analysé la localisation de la dynéine et de Bik1p dans les doubles mutants *bim1Δ kip2Δ*. Dans la souche *iTUB1 bim1Δ kip2Δ*, les niveaux de fluorescence de Bik1p-3GFP et Dyn1p-3GFP aux bouts plus des microtubules sont diminués de moitié par rapport aux niveaux mesurés dans la souche *iTUB1* (figure 33). Ces niveaux sont comparables à ceux observés dans le simple mutant *iTUB1 kip2Δ* (comparer les figures 27 et 28). Ceci montre encore une fois que dans le cas des microtubules phénylalaninés, Bim1p n'est pas nécessaire pour les localisations de Bik1p et Dyn1p aux bouts plus des microtubules.

Dans la souche *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ*, Bik1p-3GFP et Dyn1p-3GFP ne sont pas détectables aux bouts plus des microtubules (figure 33).

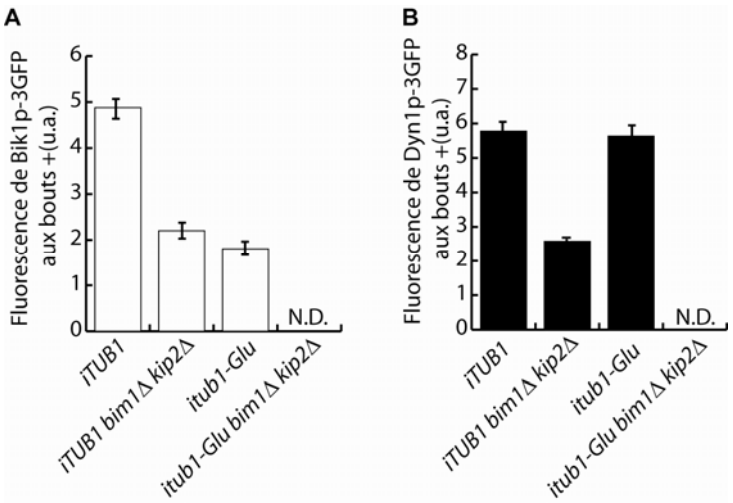


Figure 33. Effets de la double invalidation de *KIP2 et BIM1* sur la localisation de Bik1p et Dyn1p.
A. Quantification de l'intensité de fluorescence de Bik1p-3GFP aux bouts plus des microtubules dans des souches *iTUB1* et *itub1-Glu* invalidées pour *KIP2 et BIM1*. Les barres d'erreur représentent les s.e.m. N.D. = non détectable
B. Quantification de l'intensité de fluorescence de Dyn1p-3GFP aux bouts plus des microtubules dans des souches *iTUB1* et *itub1-Glu* invalidées pour *KIP2 et BIM1*. Les barres d'erreur représentent les s.e.m. N.D. = non détectable.

L'absence de détection de Bik1p et Dyn1p pourrait être reliée au fait que les microtubules astraux sont très courts. Afin de répondre à cette question, nous avons mesuré la longueur moyenne des microtubules dans les différents fonds génétiques exprimant de la tubuline α couplée à la GFP. L'invalidation de *BIM1*, *KIP2* ou bien la double invalidation de *BIM1* et *KIP2* entraînent une diminution de la longueur moyenne des microtubules (tableau 6). Toutefois les microtubules astraux sont toujours présents.

	iTUB1	*itub1-Glu*
wt	1,892 +/–0,071	1,724 +/–0,048
bim1Δ	1,624 +/–0,044	1,571 +/–0,043
kip2Δ	1,615 +/–0,043	1,524 +/–0,038
bim1Δ kip2Δ	1,723 +/–0,038	1,672 +/–0,038

Tableau 6. Les microtubules astraux sont présents dans la souche *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ*.
Mesure de la longueur moyenne des microtubules astraux dans les souches indiquées. Les valeurs sont en µm +/- s.e.m.

Ces résultats nous permettent de proposer le modèle suivant. Dans une souche avec des microtubules sauvages, la kinésine Kip2p transporte Bik1p et Dyn1p vers les bouts plus des microtubules. Aux bouts plus, ce complexe se dissocie et les trois protéines suivent les bouts plus de façon indépendante (figure 34 gauche). Lorsque la kinésine est absente, Bik1p peut assurer le ciblage de la dynéine aux bouts plus.

Dans des souches avec des microtubules Glu, Bik1p s'associe beaucoup moins bien aux bouts plus des microtubules. Toutefois le transport par la kinésine est conservé, et la dynéine est correctement ciblée aux bouts plus. En l'absence de Kip2p et de Bim1p, Bik1p n'est plus détectée aux bouts plus et la dynéine n'y est alors plus ciblée (figure 34 droite).

Ce modèle (figure 34) permet de comprendre les résultats que nous obtenons et aussi la stricte dépendance de Bik1p pour la localisation de Dyn1p.

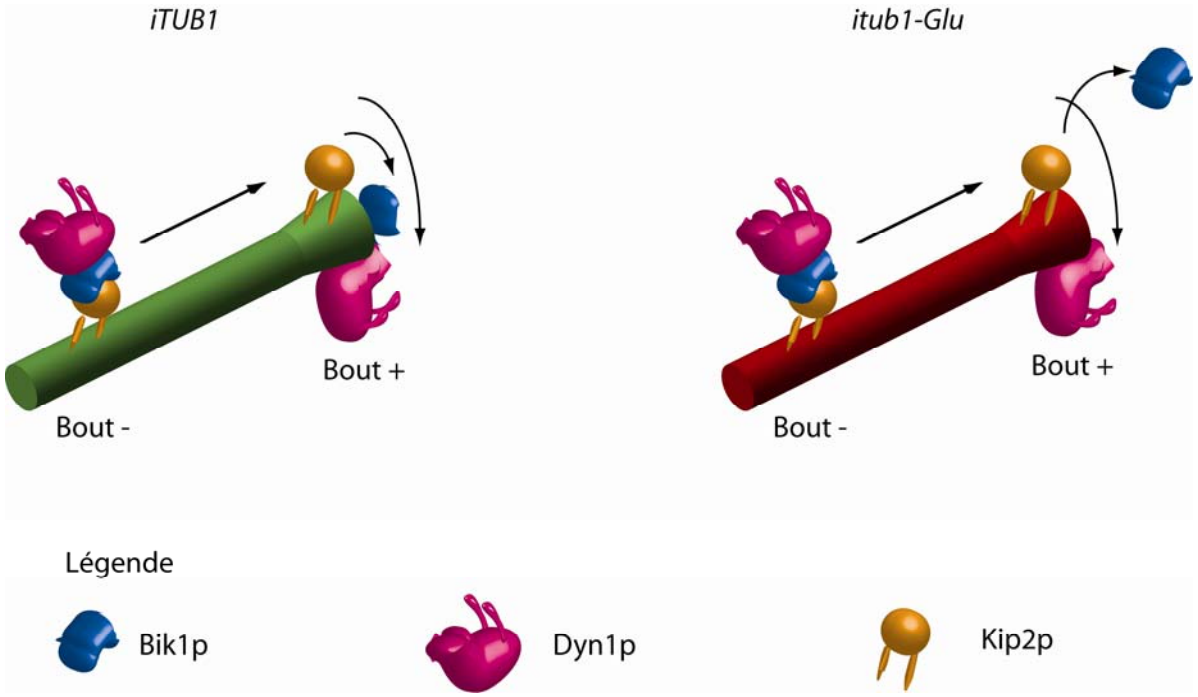


Figure 34. Modèle proposé des mécanismes de localisation de Bik1p et Dyn1p.
Dans une cellule sauvage la kinésine Kip2p cible Bik1p et Dyn1p vers les bouts plus des microtubules. Aux bouts plus des microtubules ce complexe se dissocie, et Dyn1p, Bik1p et Kip2p suivent les bouts plus de façon indépendante (à gauche). Dans une cellule *itub1-Glu*, la kinésine Kip2p cible Bik1p et Dyn1p vers les bouts plus des microtubules. Aux bouts plus des microtubules ce complexe se dissocie, et Dyn1p et Kip2p suivent les bouts plus de façon indépendante. Bik1p, qui a peu d'affinité pour les microtubules Glu ne suit presque pas les bouts plus (à droite).

II.6. Un mécanisme par défaut de positionnement du noyau dans les souches *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ*

Bien que la moitié des spores *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ* ne germe pas, l'autre moitié a une croissance normale. Pourtant, dans ces souches, les intermédiaires des interactions entre les microtubules astraux et le cortex, qui sont Bim1p, Bik1p et Dyn1p, sont soit invalidés, soit indétectables aux bouts plus des microtubules. Les deux mécanismes de positionnement du noyau sont abolis, ce qui devrait être létal.

Il est possible que la ségrégation du matériel génétique se fasse mal et que l'on obtienne fréquemment des cellules anucléées, aneuploïdes ou bien polyploïdes. Afin de visualiser cela, on peut marquer les noyaux avec un colorant fluorescent (Hoechst) et observer la ségrégation nucléaire. On peut alors observer la répartition et la localisation des noyaux dans les cellules avec un gros bourgeon (en mitose).

Les résultats de cette analyse sont présentés dans la figure 35. A 30°C, environ 80% des cellules *iTUB1 bim1Δ kip2Δ* ou *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ* ont un noyau dans la cellule mère et un dans le bourgeon (situation normale). Le reste des cellules présente essentiellement un noyau dans la cellule mère.

L'analyse a également été réalisée à 10°C, une température qui révèle les défauts de migration nucléaire dynéine dépendant. Dans les deux souches *iTUB1 bim1Δ kip2Δ* et *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ*, environ 80% des cellules ont un noyau dans la cellule mère et un dans le bourgeon. Le reste des cellules présente deux noyaux dans la cellule mère. Ceci indique qu'il y a bien un défaut du mécanisme de la dynéine à 10°C. Toutefois, la grande majorité des cellules a une ségrégation nucléaire correcte.

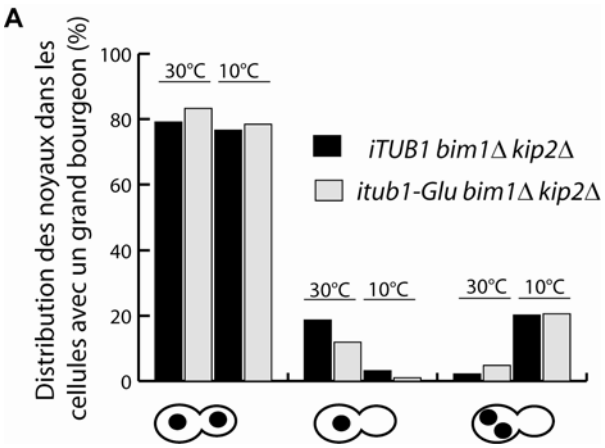


Figure 35. Ségrégation des noyaux dans des cellules sans déterminants corticaux des interactions microtubules-cortex.
Pourcentage des cellules en mitose avec un noyau dans la cellule mère et un dans la cellule fille (à gauche), un noyau dans la cellule mère (au milieu), et deux noyaux dans la cellule mère (à droite). Les quantifications ont été faîtes après pousse des cellules à 30°C ou 10°C.

Je me suis alors intéressé au mécanisme de positionnement et migration du noyau dans la souche *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ*. Pour cela, j'ai utilisé des souches exprimant de la tubuline fusionnée à la GFP afin de suivre le fuseau mitotique en mitose.

Dans la souche *iTUB1 bim1Δ kip2Δ*, le fuseau mitotique s'allonge le plus souvent dans la cellule mère et pénètre rapidement dans le bourgeon (figure 36A). J'ai pu observer une ré-orientation rapide de fuseaux mal positionnés. C'est le cas dans la figure 36B, où le fuseau est au départ perpendiculaire à l'axe cellule mère/bourgeon. Un microtubule astral, clairement visible, semble contacter le cortex, ce qui entraîne la réorientation du fuseau. Dans ces souches, on observe toujours de la dynéine et Bik1p aux bouts plus des microtubules. Ainsi, les interactions des microtubules avec le cortex sont toujours possibles, bien que leur efficacité soit réduite.

Dans la souche *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ,* le fuseau s'allonge dans la cellule mère jusqu'à ce que les pôles du fuseau soient en contact avec le cortex de la cellule mère. Les poles semblent ensuite glisser le long du cortex avant qu'un des pôles trouve le cou et pénètre dans le bourgeon (figure 36C). Ce mécanisme de positionnement du fuseau prend plus de temps que celui qui a lieu dans les cellules contrôles. Le temps écoulé entre le début de l'élongation du fuseau et le passage d'un SPB à travers le cou est de 8 minutes en moyenne

pour la souche *iTUB1 bim1Δ kip2Δ,* et de 20 minutes en moyenne pour la souche *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ* (figure 36F). D'autre part, la position du fuseau avant la pénétration dans le cou est différente dans la souche *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ.* Dans les cellules contrôles, le fuseau est le plus souvent aligné avec l'axe cellule mère-bourgeon et les pôles ne touchent pas le cortex. Dans la souche *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ*, les pôles du fuseau sont le plus souvent en contact avec le cortex (figure 36E).

Ces résultats font penser que les interactions entre les microtubules cytoplasmiques et le cortex sont supprimées dans les cellules *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ.* Dans ce cas, le fuseau s'allonge et semble pénétrer dans le bourgeon s'appuyant sur le cortex. La forme oblongue de la cellule participe alors au positionnement. Nous avons ainsi pu observer, dans 10% des cellules *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ*, le fuseau se courber (figure 36D), alors que ce n'est pas observé dans les cellules contrôles. Nous pouvons expliquer cela si le fuseau est bloqué au cortex (s'il ne peut pas glisser) et qu'il continue tout de même à s'allonger. Les forces exercées le conduisent alors à se courber.

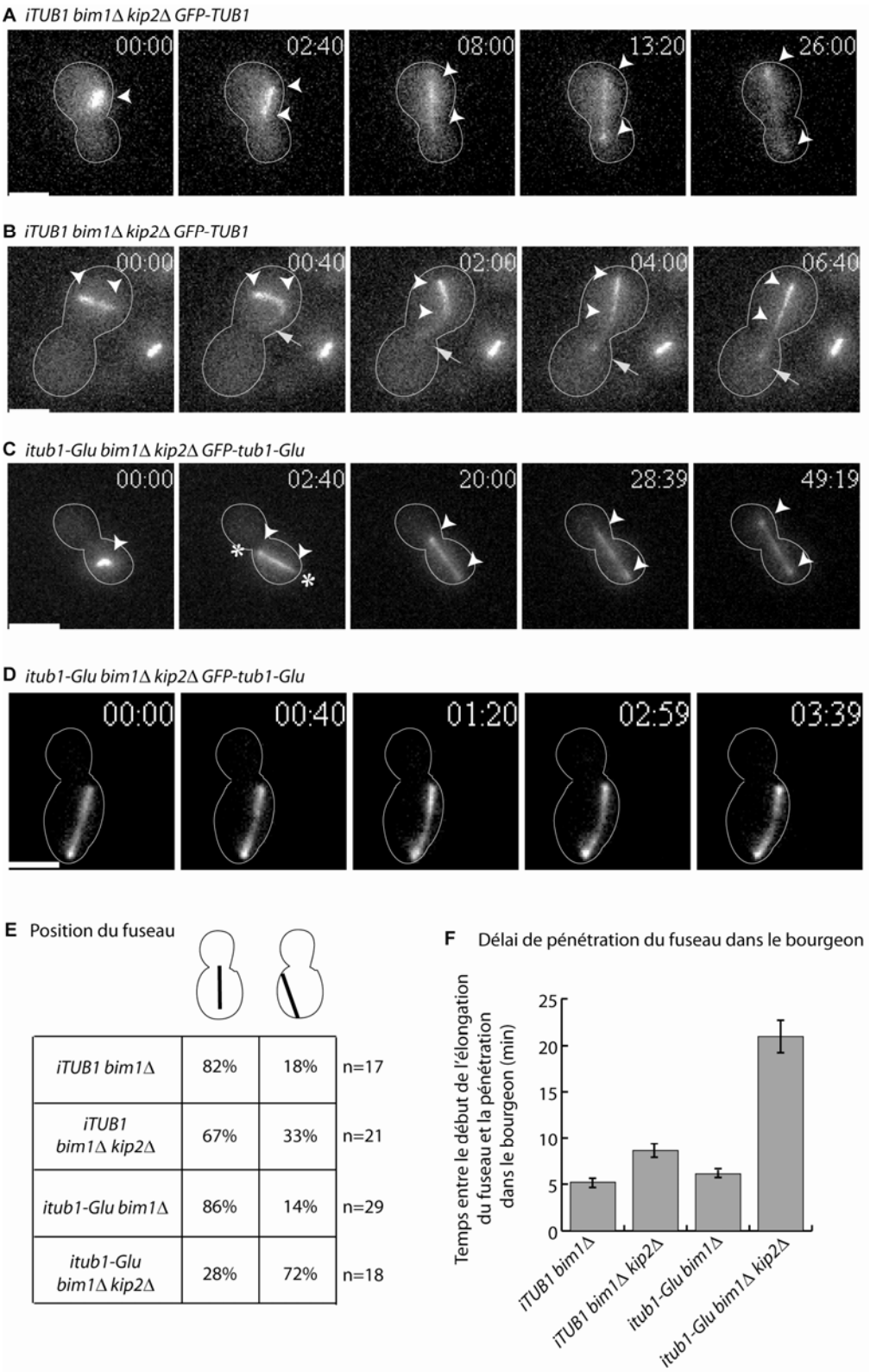


Figure 36. Analyse de la mitose dans des cellules sans déterminants corticaux des interactions microtubules-cortex.

A. Mitose dans une cellule *iTUB1 bim1Δ kip2Δ*. Série d'images tirées d'un film. Cellule *iTUB1 bim1Δ kip2Δ* exprimant GFP-Tub1p. Les têtes de flèche montrent les extrémités du fuseau mitotique. Dans ce film les microtubules astraux sont peu visibles. Le temps est en minutes et secondes.

B. Réorientation d'un fuseau mal orienté par les microtubules astraux. Série d'images tirées d'un film. Cellule *iTUB1 bim1Δ kip2Δ* exprimant GFP-Tub1p. Les têtes de flèche montrent les extrémités du fuseau mitotique, la flèche le bout plus d'un microtubule. Le temps est en minutes et secondes.
C. Mitose dans une cellule *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ*. Série d'images tirées d'un film. Cellule *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ* exprimant GFP-*tub1p-Glu*. Les têtes de flèche montrent les extrémités du fuseau mitotique. Dans ce film les microtubules astraux sont peu visibles. Les étoiles montrent les extrémités du fuseau s'appuyant contre le cortex. Le temps est en minutes et secondes.
D. Fuseau se courbant dans une cellule *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ*. Série d'images tirées d'un film. Cellule *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ* exprimant GFP-*tub1p-Glu*. Le temps est en minutes et secondes.
E. Position du fuseau avant son passage au travers du cou. Pourcentage de cellules avec un fuseau correctement positionné ou avec les SPBs en contact avec le cortex avant le passage du fuseau au travers du cou.
F. Délai entre l'élongation du fuseau et son passage au travers du cou. Temps moyen en minutes entre le début d'élongation du fuseau et le passage d'un SPB au travers du cou. Les barres d'erreur représentent les s.e.m.

II.7. Conclusions

Le travail présenté permet d'apporter plusieurs conclusions sur les mécanismes de positionnement des protéines aux bouts plus des microtubules.

Tout d'abord, j'ai montré que dans une souche sauvage, la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules est indépendante de Bim1p. En revanche, la localisation résiduelle de Bik1p aux bouts plus des microtubules Glu dépend de Bim1p. J'ai testé la possibilité que le C-terminus de Bim1p offre un site d'ancrage alternatif à celui de la tubuline α. Toutefois, enlever la phénylalanine C-terminale de Bim1p n'a pas eu d'effet sur la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules. Ce travail n'apporte pas de conclusions fermes sur le mode de contribution de Bim1p à la localisation résiduelle de Bik1p aux bouts plus des microtubules Glu. Deux alternatives sont possibles :

-enlever la phénylalanine C-terminale de Bim1p a suffit à diminuer l'interaction Bim1p-Bik1p. L'interaction Bim1p-Bik1p n'est pas indispensable pour la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules. Dans ce cas, Bim1p jouerait un rôle indirect. On peut penser que Bim1p joue un rôle important dans la conformation ou la dynamique des bouts plus des microtubules, comme cela a été récemment montré pour son homologue chez *S. pombe*, Mal3p (Sandblad et al., 2006).

-alternativement, enlever la phénylalanine C-terminale de Bim1p n'a pas diminué l'interaction Bim1p-Bik1p. L'utilisation du mutant *bim1-FΔ* ne permet pas d'apporter de précisions sur la contribution de Bim1p à la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules. L'effet de Bim1p peut alors être direct, ou indirect.

Afin de tester cela, nous pouvons étudier l'interaction entre Bim1p et Bik1p *in vitro* par dispersion de lumière (light scattering). Cette étude nous permettrait de savoir si l'interaction Bim1p-Bik1p est perdue ou diminuée lorsque Bim1p ne possède plus sa phénylalanine C-terminale. Si elle n'est pas perdue, des mutations perturbant cette interaction pourraient être obtenues. L'utilisation de ces mutants dans la levure permettrait d'apporter des précisions sur la signification fonctionnelle de l'interaction Bim1p-Bik1p. Il sera intéressant de savoir si cette interaction est importante aux bouts plus des microtubules, ou bien à d'autres sites comme le SPB ou encore dans le fuseau mitotique.

Si la contribution de Bim1p à la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules n'est pas complètement comprise, nous avons pu utiliser le fait que Bik1p ne se lie que très faiblement aux bouts plus des microtubules dans le mutant *itub1-Glu bim1Δ.* Dans ce mutant, Kip2p s'accumule beaucoup aux bouts plus des microtubules, contrairement à Bik1p. Ceci implique que si Kip2p transporte bien Bik1p vers les bouts plus des microtubules, ces deux protéines s'accumulent aux bouts plus des microtubules et suivent les bouts plus de façon indépendante. Une deuxième implication est que Bik1p est aux bouts plus des microtubules car elle a une propriété intrinsèque à s'y lier. Cette propriété repose principalement sur l'acide aminé C-terminal de la tubuline α. Le transport par la kinésine est un mécanisme indépendant qui permet d'optimiser le ciblage de Bik1p vers les bouts plus des microtubules, par exemple en augmentant la concentration locale de Bik1p.

La dynéine est toujours présente aux bouts plus des microtubules Glu, même lorsque *BIM1* est invalidé. Or, lorsque *BIK1* est invalidé, la dynéine n'est pas retrouvée aux bouts plus des microtubules. Ces résultats impliquent que la protéine Bik1p doit être présente, mais que sa liaison aux bouts plus des microtubules n'est pas indispensable à la liaison de Dyn1p aux bouts plus des microtubules. Le transport par Kip2p, impliquant Bik1p, est suffisant pour cibler la dynéine aux bouts plus des microtubules. Toutefois, lorsque *KIP2* est invalidé, la liaison de Bik1p aux bouts plus des microtubules semble conditionner le ciblage de la dynéine aux bouts plus des microtubules. Dyn1p doit donc interagir avec Bik1p afin d'acquérir sa capacité à lier les bouts plus des microtubules. Bik1p sert peut-être à charger la dynéine sur les bouts plus des microtubules, par exemple sur Pac1p, l'homologue de LIS1, impliqué dans la localisation de la dynéine aux bouts plus des microtubules (Lee et al., 2003).

Lors de cette étude, j'ai obtenu des cellules n'ayant plus d'intermédiaires des interactions des microtubules avec le cortex. Dans ces cellules, le fuseau semble se positionner selon un mécanisme par défaut. Le fuseau s'allonge suivant le grand axe de la cellule. Ceci semble être permis par la forme oblongue de la levure. Ce mécanisme permet, dans la majorité des cas, une ségrégation fidèle du matériel génétique.

Enfin, il est connu que la double mutation *bik1Δ bim1Δ* est synthétique létale (Schwartz et al., 1997). J'ai pu obtenir des souches de levure n'exprimant pas *BIM1* et n'ayant que très peu de Bik1p aux bouts plus des microtubules. Le fait que, dans ces souches, la dynéine soit toujours présente aux bouts plus des microtubules pourrait expliquer leur viabilité. Toutefois, lorsque l'accumulation de la dynéine aux bouts plus des microtubules est aussi supprimée, la moitié des spores germent et forment des colonies. On peut imaginer que des compensations se font dans ces cellules alors qu'elles ne pourraient pas se faire dans les doubles mutants *bim1Δ bik1Δ* ou *bim1Δ dyn1Δ.* Alternativement, Bik1p et Dyn1p ont peut-être des fonctions autres que celles aux bouts plus des microtubules astraux. Bik1p et Dyn1p sont associées aux bouts plus des microtubules et semblent importantes pour les fonctions du fuseau mitotique. La viabilité des souches *itub1-Glu bim1Δ kip2Δ* repose peut-être sur la conservation de ces fonctions. Ceci pourrait impliquer que les fonctions vitales de Bik1p dans des cellules *bim1Δ* ne reposent pas sur sa capacité à lier les bouts plus des microtubules astraux.

III. Recherche de synthétiques létaux

III.1. Crible de létalité synthétique

Afin de connaître l'ensemble des conséquences de la mutation *tub1-Glu* pour la cellule, nous avons développé un crible de létalité synthétique. Il consiste en la recherche de mutations non létales par elles-mêmes, mais dont la combinaison avec la mutation *tub1-Glu* est létale. Ceci permet d'établir des liens génétiques et, le cas échéant, d'avoir une meilleure compréhension de la mutation d'intérêt. Cette approche est plus large que la recherche de suppresseurs de la mutation *tub1-Glu,* car elle n'est pas basée sur un phénotype comme la sensibilité au bénomyl, mais sur l'interaction génétique.

Dans notre cas, la souche *tub1-Glu* est mutée sur le gène *TUB1*, et le gène *TUB3* est invalidé. Or il a été montré que l'invalidation de *tub3* peut être synthétique létale avec d'autres gènes (Tong et al., 2001; Tong et al., 2004). Nous avons réalisé deux cribles dans le fond génétique utilisé, un pour l'invalidation de *tub3* et un pour l'invalidation de *tub3* combinée à la mutation *tub1-Glu.* L'utilisation de milieux de sélection adéquats nous a permis de faire ces deux cribles en parallèle.

Lors de ce crible nous avons sélectionné comme candidats vintg-deux gènes pour *tub3Δ*, et cinquante et un gènes pour *tub3Δ/tub1-Glu*. Chacun de ces candidats a été vérifié en dissection de tétrades, les résultats étant synthétisés dans le tableau 7.

Gène/ORF	Interaction Génétique	Description
CIN8	SL avec *tub3Δ*	Kinésine mitotique
TUP1	SL faible avec *tub3Δ/tub1-Glu*	Répresseur général de la transcription. Montre des similarités avec les sous unités bêta des protéines G. Médie la répression au glucose.
CDC50	SL faible avec *tub3Δ/tub1-Glu*	Protéine endosomale qui régule la polarité cellulaire
MNN9	SL faible avec *tub3Δ/tub1-Glu*	Sous unité d'une mannosyltransférase du Golgi qui sert à l'élongation du squelette de mannanes
HTZ1	SL faible avec *tub3Δ/tub1-Glu*	Lie la chromatine, impliqué dans la régulation de la transcription
FKS1	SG avec *tub3Δ/tub1-Glu*	Sous unité catalytique d'une 1-3 bêtaglucane synthase impliquée dans la synthèse et le maintien de la paroi cellulaire
YCL060c	SL avec *tub3Δ/tub1-Glu*	ORF hypothétique
YKL031w	SL avec *tub3Δ/tub1-Glu*	ORF hypothétique
BTS1	SL avec *tub3Δ/tub1-Glu*	Géranylgéranyl diphosphate synthase requise pour l'attachement de protéines à la membrane
VPS15	SL avec *tub1-Glu*	Sérine/thréonine protéine kinase impliquée dans le tri des protéines vacuolaires

Tableau 7. Gènes interagissant génétiquement avec *tub3Δ* et *tub1-Glu*.
Les candidats confirmés en dissection de tétrades sont repris dans ce tableau avec une brève description de leur fonction connue (source SGD). Interactions génétiques : SL, létalité synthétique ; SG, croissance réduite. La létalité synthétique est décrite comme faible, lorsque quelques triples mutants ont été retrouvés mais dans la majorité des cas la combinaison des trois mutations est létale.

En ce qui concerne les synthétiques létaux avec *tub3Δ*, nous retrouvons *cin8* qui avait déjà été décrit comme interagissant génétiquement par *(Tong et al., 2001).* Cin8p est une

kinésine mitotique requise pour la séparation des pôles pendant l'assemblage du fuseau mitotique.

Les gènes interagissant avec la mutation *itub1-Glu* peuvent être classé en trois groupes.

Tout d'abord, deux cadres ouverts de lecture (*YCL060c* et *YKL031w*) qui sont annotés comme douteux dans SGD (Saccharomyces Genome Database).

Ensuite, nous pouvons regrouper *HTZ1* et *TUP1*, qui sont peut-être impliqués dans des régulations assez générales dont la suppression est létale dans le fond *itub1-Glu*.

HTZ1 est un variant d'histone H2A.Z impliqué dans la régulation de la transcription, la ségrégation des chromosomes et l'intégrité du génome. Environ 5% des gènes de *Saccharomyces cerevisiae* sont mal régulés dans le mutant *htz1Δ* (Meneghini et al., 2003). De plus, les cellules *htz1Δ* présentent des défauts de progression dans la phase S, et des délais dans la réplication (Dhillon et al., 2006). Le début de phase S (point START) est décalé dans ces cellules, par rapport aux cellules sauvages, et ceci semble relié à un délai dans l'activation de la transcription des cyclines *CLN2* et *CLB5* (Dhillon et al., 2006).

TUP1 est un répresseur général de la transcription (Courey and Jia, 2001; Smith and Johnson, 2000). Tup1p peut recruter des histones déacétylases induisant la répression. D'autre part, Tup1p peut interagir avec des histones H3 et H4 hypoacétylées afin de médier la répression (Edmondson et al., 1996). Enfin, Tup1p peut agir sur la machinerie de transcription en interagissant avec des facteurs réprimant l'ARN polymérase II (Papamichos-Chronakis et al., 2000). *TUP1* a aussi été impliqué dans la dé-répression de certains gènes (Mennella et al., 2003; Papamichos-Chronakis et al., 2002).

Enfin les autres gènes peuvent être reliés aux membranes et à la paroi.

CDC50 est décrite comme une protéine endosomale régulant la polarité cellulaire. Elle est associée aux endosomes tardifs et au compartiment pré-vacuolaire (Misu et al., 2003). Dans les cellules *cdc50Δ* exposées au froid (18°C), les déterminants de la polarité cellulaire sont mal localisés (par exemple, les patchs d'actine ou encore Bni1p). Ils ne sont plus au bourgeon mais dans toute la cellule mère (Misu et al., 2003).

MNN9 est une protéine du Golgi qui sert à l'élongation du squelette de mannanes. Avec Van1p, elle forme le complexe appelé mannane polymérase I. Les mannanes

représentent 40% du poids sec de la paroi des levures (Stolz and Munro, 2002). Toutefois, ce squelette de mannanes n'est pas essentiel pour la viabilité des cellules (Nakanishi-Shindo et al., 1993). Dans ce cas, les cellules s'adaptent et produisent plus de chitine et de protéines de la paroi. Ceci nécessite les voies de signalisation de réponse au stress (de Nobel et al., 2000; Osmond et al., 1999).

BTS1 est une géranylgéranyl diphosphate synthase requise pour l'attachement de certaines protéines à la membrane. *BTS1* a été identifié comme un suppresseur de la mutation *bet2-1*. *BET2* code pour la sous unité bêta de la géranylgéranyl transférase de type II et *BTS1* pour la géranylgéranyl diphosphate synthase (Jiang et al., 1995). Les groupes géranylgéranyl sont des isoprénoïdes greffés sur des cystéines C-terminales de protéines afin d'adresser ces dernières à la membrane. C'est notamment le cas des petites protéines G. Ainsi *BTS1* est impliqué dans l'adressage à la membrane de deux protéines G essentielles (Ypt1p et Sec4p) jouant un rôle dans l'exocytose.

FKS1 est une 1-3β glucane synthase impliquée dans la synthèse et le maintien de la paroi cellulaire. Elle est régulée par la petite protéine G, Rho1p (Drgonova et al., 1996; Qadota et al., 1996). Rho1p peut activer d'une part le remodelage de la paroi par Fks1p, activer la voie de signalisation de la Pkc1p d'autre part, mais aussi participe à la polarisation de la cellule en modulant le cytosquelette d'actine. Je me suis particulièrement intéressé à Rho1p grâce au lien génétique établit avec *FKS1* (voir le chapitre III.4.).

Nous avons identifié *VPS15* comme étant synthétique létal avec la seule mutation *tub1-Glu*. La présence de *TUB3* sauvage ne semble pas sauver cette interaction génétique. Il s'agit donc d'une interaction très forte. Vps15p est une sérine/thréonine kinase. Elle est connue pour phosphoryler et activer Vps34p, une phosphatidylinositol 3-kinase. Ces deux protéines sont requises pour le tri d'hydrolases solubles à la vacuole (Stack et al., 1995; Stack et al., 1993). La vacuole est essentielle à la survie des levures. Elle est un analogue du lysosome des mammifères mais elle a aussi des propriétés de stockage (phosphates, acides aminés, métaux…), de régulation du pH, d'homéostasie de l'eau et des ions. Enfin, la ségrégation de la vacuole se fait juste avant la migration nucléaire et via un mécanisme impliquant l'actine et la myosine de type V Myo2p (Myo2p est requise aussi pour le positionnement du noyau en interagissant avec Bim1p via Kar9p (Hwang et al., 2003; Yin et al., 2000). L'ensemble de ces données font de *VPS15* un inter-actant très intéressant.

En première analyse, j'ai observé la morphologie de la vacuole dans la souche *tub1-Glu*. Ceci se fait à l'aide d'un colorant vital fluorescent (FM4-64, (Weisman, 2003)). J'ai

suivi l'incorporation de FM4-64 et la morphologie de la vacuole dans la souche contrôle et la souche *itub1-Glu.* Dans les deux cas, le FM4-64 est incorporé et adressé à la vacuole. L'endocytose semble donc correcte. La vacuole présente aussi dans les deux cas une morphologie correcte. Elle n'est ni fragmentée, ni unique et plus grosse que dans les souches sauvages, comme cela a été décrit pour les mutants affectant les vacuoles (Weisman, 2003).

III.2. Recherche de gènes dont l'invalidation supprime l'hypersensibilité au bénomyl de la souche *itub1-Glu.*

Au cours du crible de létalité synthétique, il nous est apparu intéressant de rechercher les gènes dont l'invalidation supprime l'hypersensibilité au bénomyl du mutant *tub1-Glu*. En effet, au cours du crible, il nous suffisait d'étaler les spores combinant les mutations d'intérêt sur un milieu de sélection adéquat contenant du bénomyl (40µg/mL) afin de les isoler. A cette concentration les spores *tub1-Glu* ne poussent pas alors qu'une souche sauvage peut pousser. Comme nous l'avons vu précédemment la sensibilité de la souche *tub1-Glu* au bénomyl pourrait être reliée à la délocalisation de Bik1p des bouts plus des microtubules. Cette approche pourrait identifier des gènes participant aux fonctions microtubulaires dans la souche *itub1-Glu*.

Ce crible s'est avéré très stringeant puisque nous avons isolé quinze candidats (tableau 8).

Gène/ORF	Description
RXT2	Fonction inconnue
CTH1	Facteur de transcription putatif (gène proche de *NUM1*)
SSE1	Membre de la famille de HSP70
MBP1	Facteur de transcription impliqué dans la progression G1/S
YDL081c	Protéine ribosomale P1 alpha
CYK3	Protéine à domaine SH3 localisée au niveau du cou et de l'anneau cytocinétique d'actine
CLB5	Cycline B5
MFT1	Protéine impliquée dans l'import à la mitochondrie de protéines de fusion
KIP3	Kinésine impliquée dans le positionnement du fuseau mitotique
YGL217c	ORF chevauchant *KIP3*

RFT1	Sous unité du complexe Paf1 associé à l'ARN polymérase II
FKH2	Facteur de transcription de type forkhead impliqué dans la régulation du cycle cellulaire
OCA1	Protéine tyrosine phosphatase putative
MIG3	Répresseur de la transcription en réponse à des agents toxiques
SIN3	Protéine liant l'ADN

Tableau 8. Gènes candidats dont l'invalidation supprime l'hypersensibilité au bénomyl de la souche *tub1-Glu.*

Les gènes candidats sont listés ainsi qu'une brève description de leur fonction (source SGD).

La première chose à faire va être de tester chacun des candidats et de les confirmer. Le but sera en premier lieu de savoir si l'invalidation de chaque gène entraîne une résistance au bénomyl, ou bien si l'invalidation de chaque gène supprime spécifiquement la sensibilité de la souche *itub1-Glu* au bénomyl. Par exemple, l'invalidation de *KIP3* est connue pour entraîner une résistance au bénomyl (Cottingham and Hoyt, 1997). Ensuite, nous essaierons de déterminer pourquoi ces invalidations entraînent la suppression de l'hypersensibilité au bénomyl.

III.3. Conclusions

La recherche de gènes synthétique létaux avec la mutation *itub1-Glu* nous a permis d'identifier un nombre restreint de gènes. Etonnamment, nous n'avons pas identifié de composants connus des mécanismes microtubulaires. Ceci peut s'expliquer par le travail que j'ai réalisé sur les localisations et fonctions des protéines de bouts plus des microtubules. Soit le système n'est pas assez déstabilisé pour les mécanismes de positionnement du noyau dans la souche *itub1-Glu* (il reste un peu de Bik1p aux bouts plus et la dynéine est positionnée correctement), soit les fonctions importantes de Bik1p au SPB et au noyau ne sont pas perturbées.

Toutefois, j'ai identifié quelques gènes dont les fonctions connues convergent vers un rôle dans les membranes et la paroi de la levure. Une hypothèse que nous testerons est que, dans le mutant *itub1-Glu*, les interactions des microtubules avec le cortex sont déstabilisées en affectant directement les protéines se liant aux bouts plus des microtubules. Dans les interactants identifiés, c'est peut-être le côté membranaire de ces interactions qui est affecté.

Afin de tester cela, une analyse du positionnement des noyaux, du comportement des microtubules ou encore des protéines corticales jouant dans l'établissement de la polarité cellulaire sera menée. Chaque simple mutant pourra être analysé dans cette optique.

Vps15p est une sous-unité régulatrice de la phosphatidyl inositol 3 kinase. Les phosphatidyl inositol phosphates sont impliqués dans la signalisation membranaire, ainsi que dans l'ancrage de protéines à la membrane. Les domaines d'homologie à la pleckstrine (domaine PH) reconnaissent spécifiquement des phosphatidyl inositol phosphates. C'est notamment le cas pour le domaine PH de Num1p, la protéine corticale ancrant la dynéine au cortex. Nous pourrons analyser la composition des cellules en phosphatidyl inositol phosphates et savoir si elle est modifiée dans la souche *itub1-Glu*.

Le fait de retrouver des gènes dont les fonctions sont reliées à la membrane et à la paroi peut aussi être intéressant dans le cadre d'une étude sur la dynactine. Le groupe de Y. Ohya a montré que la dynactine est impliquée dans un point de contrôle de la synthèse de la paroi. Les cellules mutées sur les deux sous-untités de la 1-3β glucane synthase (*FKS1* et *FKS2*) sont bloquées en G2, après la duplication des SPBs mais avant leur séparation (Suzuki et al., 2004). Ce mécanisme implique le complexe dynactine, la cycline B2 et le facteur de transcription Fkh2p. Chez les mammifères, la sous-unité $p150^{GLUED}$ de la dynactine lie moins bien les bouts plus des microtubules Glu (Peris et al., 2006). Dans la levure, son homologue est Nip100p. Sa localisation aux bouts plus n'est pas décrite, mais elle n'a été observée qu'en sur-expression. Etant donné que Nip100p contient un domaine CAP-Gly, sa liaison à la tubuline Glu est certainement moins forte qu'avec de la tubuline sauvage. Ses fonctions sont peut-être perturbées. Il serait intéressant de savoir si, dans les levures exprimant de la tubuline Glu, le point de contrôle de la synthèse de la paroi est toujours effectif. Les liens que nous pouvons proposer sont la liaison génétique *tub1-Glu* avec *FKS1*, le fait que la dynactine lie moins bien les bouts plus des microtubules Glu de mammifères, et enfin, *FKH2* entraîne une résistance au bénomyl de la souche *itub1-Glu*.

Au final, ce crible m'a permis de relier, via *FKS1*, la petite protéine G Rho1p au mutant *itub1-Glu*. L'analyse de cette protéine est présentée dans le chapitre suivant.

IV. Petites protéines G et bouts plus des microtubules

IV.1. Rho1p contrôle l'association de Bik1p aux bouts plus des microtubules

Deux résultats du laboratoire m'ont poussé à m'intéresser à la petite protéine G Rho1p. Tout d'abord, le fait de retrouver *FKS1* dans le crible de létalité synthétique. D'autre part, Leticia Peris a observé que dans les cellules de mammifères, CLIP-170 est davantage associée aux bouts + des microtubules présents dans le 'leading edge', zone de la cellule dans laquelle les petites protéines G sont connues pour être actives (Kurokawa et al., 2005). Il est donc possible que les petites protéines G comme Rho1p régulent l'association de CLIP-170/Bik1p aux bouts plus des microtubules. Afin de tester cette régulation, le modèle levure semble approprié car les méthodes d'invalidation génique sont aisées et rapides. De plus nous disposons de différentes souches avec plus ou moins de Bik1p s'associant aux bouts plus des microtubules.

Rho1p est une petite protéine G étant présente sous deux états, liant le GTP ou bien le GDP. La forme liant le GTP est la forme active de la protéine. Des mutations ponctuelles ciblées sur la poche GTP de Rho1p permettent d'obtenir des protéines hydrolysant beaucoup moins bien le GTP. Ainsi la forme Rho1p reste plus longtemps sous sa forme GTP et ceci constitue une forme hyper-active de Rho1p. J'ai utilisé deux mutants, *rho1-G19V* et *rho1-Q68L* (Sekiya-Kawasaki et al., 2002). J'ai transformé ces plasmides dans différentes souches et observé la localisation de Bik1p.

Dans la souche *itub1-Glu* exprimant Bik1p-3GFP et une des deux formes hyper-actives de Rho1p, Bik1p est enrichie environ quatre fois aux bouts plus des microtubules par rapport à la souche *itub1-Glu* n'exprimant pas la forme hyper-active de Rho1p, d'après les mesures d'intensité de fluorescence (figure 37B). De plus, dans la souche contrôle *iTUB1*, l'expression des formes hyper-actives de Rho1p entraîne aussi un enrichissement de Bik1p aux bouts plus des microtubules (environ 1,5 fois). Dans les deux cas, les deux formes hyper-actives de Rho1p ont le même effet (figure 37B).

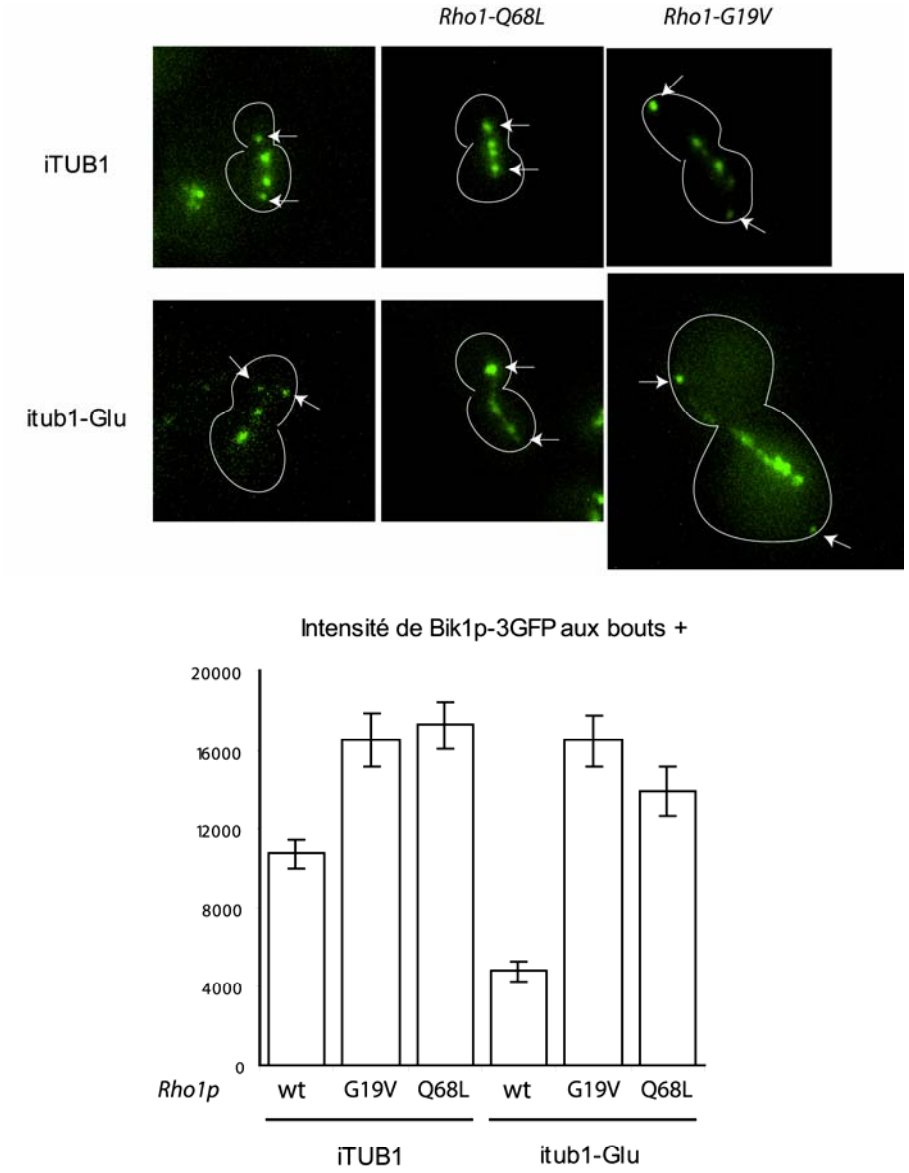


Figure 37. Effet de l'hyper-activation de Rho1p sur la localisation de Bik1p.
A. Localisation de Bik1p-3GFP dans les souches *iTUB1* (en haut à gauche), *iTUB1* exprimant *rho1-Q68L* (en haut au milieu), *iTUB1* exprimant *rho1-G19V* (en haut à droite), *itub1-Glu* (en bas à gauche), *itub1-Glu* exprimant *rho1-Q68L* (en bas au milieu), et *itub1-Glu* exprimant *rho1-G19V* (en bas à droite). Les flèches montrent les bouts plus des microtubules.
B. Quantification de l'intensité de fluorescence de Bik1p-3GFP aux bouts plus des microtubules. Les barres d'erreur représentent les s.e.m.

Les niveaux de fluorescence mesurés de Bik1p indiquent que, lorsque Rho1p est hyper-active, l'absence de la phénylalanine C-terminale de la tubuline alpha n'a pas d'effet sur l'enrichissement de Bik1p aux bouts plus des microtubules.

Il s'agit donc d'un effet très fort de Rho1p sur la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules. J'ai tout d'abord vérifié en western blot que Bik1p-3GFP est exprimée à des niveaux comparables avec ou sans Rho1p hyper-active (figure 38 en haut). J'ai vérifié d'autre part que la tubuline est toujours Glu dans les souches *itub1-Glu* également en western blot (figure 38 en bas).

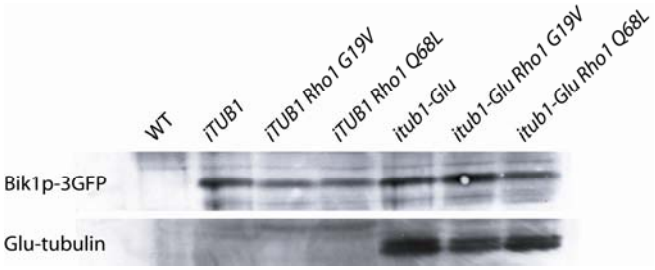


Figure 38. Contrôle de l'expression de Bik1p-3GFP.
Western-blot anti GFP (en haut) et anti tubuline-Glu (en bas) sur des extraits de protéines totales réalisés dans les souches indiquées. (*wt* représente le contrôle négatif n'exprimant pas *BIK1-3GFP*). Les dépôts sont normalisés après mesure de la concentration en protéines de chaque extrait.

Rho1p est localisée de façon asymétrique dans la levure. Elle est présente dans le bourgeon, au niveau des sites de croissances (Yamochi et al., 1994). Les premières observations de l'enrichissement de Bik1p aux bouts plus, suite à l'activation de Rho1p, semblent indiquer que cet enrichissement est plus important sur les microtubules dirigés vers le bourgeon. J'ai vérifié cela en mesurant l'intensité de fluorescence de Bik1p-3GFP sur les microtubules orientés vers le bourgeon *versus* ceux orientés vers la cellule mère. Les résultats présentés dans la figure 39 montrent clairement que Bik1p est plus enrichie sur les microtubules dirigés vers le bourgeon. Cette situation permet de penser que l'activation de Rho1p peut servir à créer une asymétrie de la localisation de Bik1p.

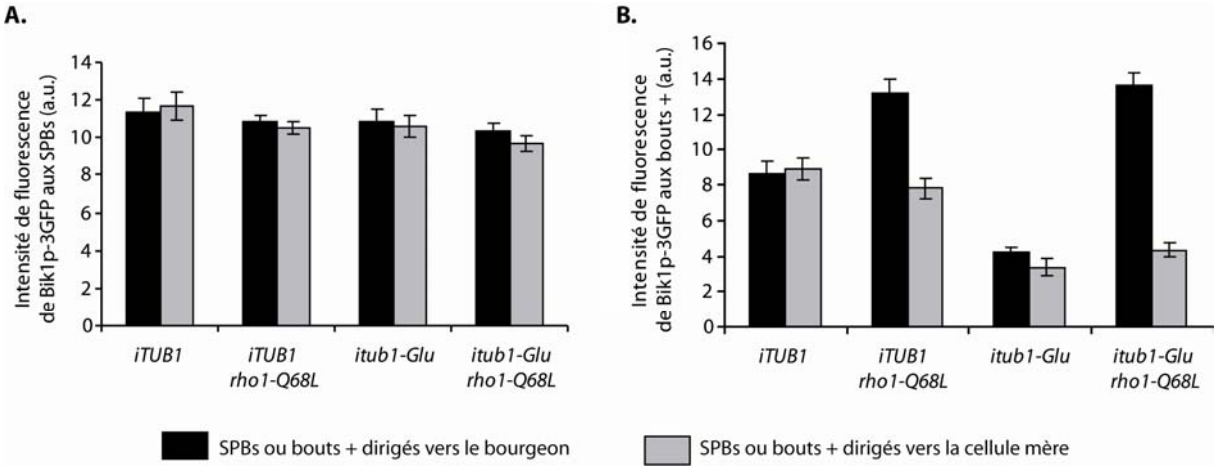


Figure 39. Asymétrie de l'enrichissement de Bik1p suite à l'hyperactivation de Rho1p.
A. Quantification de l'intensité de fluorescence de Bik1p-3GFP aux SPBs dirigés vers le bourgeon ou la cellule mère. Les barres d'erreur représentent les s.e.m.
B. Quantification de l'intensité de fluorescence de Bik1p-3GFP aux bouts plus des microtubules dirigés vers le bourgeon ou vers la cellule mère. Les barres d'erreur représentent les s.e.m.

Deux questions se posent alors. Quels sont les intermédiaires et les mécanismes qui permettent d'enrichir Bik1p suite à l'activation de Rho1p, et quelle est la signification physiologique de cette régulation.

Afin de répondre à la première question, j'ai commencé à analyser différentes possibilités. Tout d'abord l'enrichissement de Bik1p pourrait passer par un enrichissement d'autres protéines de bouts plus. Ainsi Bim1p, ou encore Kip2p, pourraient être les médiateurs de cet enrichissement.

J'ai analysé l'effet de Rho1p dans des souches *bim1Δ*. Dans tous les cas (*iTUB1 bim1Δ* et *itub1-Glu bim1Δ*), Bik1p-3GFP est enrichie aux bouts plus des microtubules par rapport aux souches n'exprimant pas les formes constitutivement actives de Rho1p. Les niveaux de fluorescence mesurés dans les souches *bim1Δ* sont comparables à ceux mesurés dans les souches exprimant *BIM1*. Ceci nous indique que Bim1p n'est pas requise pour l'effet de l'activation de Rho1p sur l'association de Bik1p aux bouts plus des microtubules.

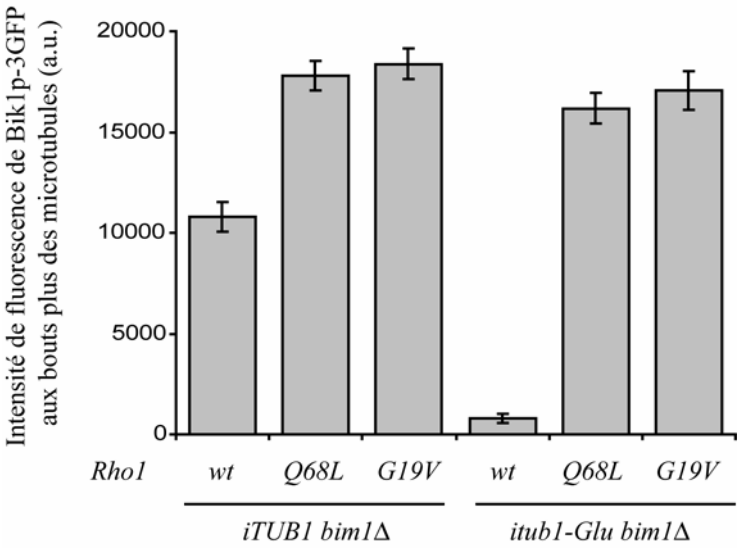


Figure 40. Effet de Bim1p sur la localisation de Bik1p après l'hyperactivation de Rho1p.
Quantification de l'intensité de fluorescence de Bik1p-3GFP dans les souches invalidées pour *BIM1*. Les barres d'erreur représentent les s.e.m.

L'analyse de Kip2p est en cours. Nous allons déterminer si dans des cellules *kip2Δ*, l'hyperactivation de Rho1p entraîne toujours un enrichissement de Bik1p aux bouts plus des microtubules.

L'enrichissement de Bik1p par Rho1p pourrait ne pas passer par un intermédiaire entre les microtubules et Bik1p. J'ai donc commencé à tester une autre possibilité qui est une modification directe de Bik1p. CLIP-170 est connue pour être phosphorylée. Une régulation par phosphorylation a aussi été proposée pour Bik1p par la kinase Tor1p, bien qu'elle n'ait pas été formellement démontrée (Choi et al., 2000). Ces phosphorylations ont été proposées pour réguler l'association de CLIP-170 aux microtubules.

J'ai donc ciblé quelques kinases potentielles et commencé leur invalidation dans des souches exprimant la version hyperactive de Rho1p

La suite de ce projet sera d'analyser d'autres protéines de bouts plus, afin de savoir si l'effet de Rho1p est dirigé uniquement sur Bik1p ou bien touche d'autres effecteurs tels Bim1p, Kip2p.

Une autre analyse concernera Rho1p. *RHO1* est un gène essentiel, toutefois nous pouvons utiliser un mutant conditionnel de Rho1p. En passant les cellules à température

restrictive nous pourrons analyser les effets de l'invalidation de Rho1p pour la localisation de Bik1p. Rho1p est enrichie dans le bourgeon, nous pourrons utiliser divers mutants dans lesquels Rho1p se localise uniformément dans la cellule afin de voir si l'effet de l'hyper-activation de Rho1p est toujours asymétrique ou non.

IV.2. Contrôle de la taille des cellules *itub1-Glu* exprimant le mutant *rho1-G19V*

En observant les souches exprimant une des versions hyper-actives de Rho1p j'ai noté le fait que certaines cellules paraissent plus grosses (figure 41). J'ai donc mesuré la taille des cellules des différentes souches.

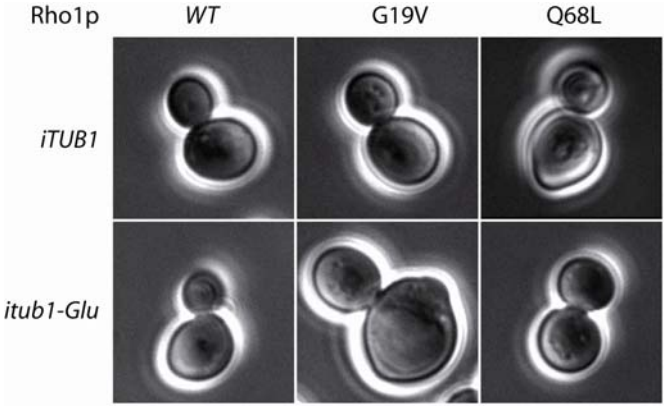


Figure 41. Effet de *rho1-G19V* sur la taille des cellules *itub1-Glu*.
Images représentatives en contraste de phase de cellules en mitose des souches *iTUB1* (en haut à gauche), *iTUB1 rho1-G19V* (en haut au milieu), *iTUB1 rho1-Q68L* (en haut à droite), *itub1-Glu* (en bas à gauche), *itub1-Glu rho1-G19V* (en bas au milieu), et *itub1-Glu rho1-Q68L* (en bas à droite).

La mesure de la longueur des cellules en phase G2/M m'a permis de montrer que les cellules de la souche *itub1-Glu* exprimant la protéine *rho1-G19V* sont beaucoup plus grandes que les mêmes cellules n'exprimant pas cette version hyper-active de Rho1p. La figure 42 montre la distribution des cellules dans des classes de taille (entre 7 et 7,99 µm de long par exemple) pour les souches *itub1-Glu* exprimant ou non la protéine *rho1-G19V*. Les distributions sont similaires, mais centrées sur une médiane plus élevée lorsque *rho1-G19V* est exprimée. Ainsi la taille moyenne des cellules est plus élevée lorsque *rho1-G19V* est exprimée.

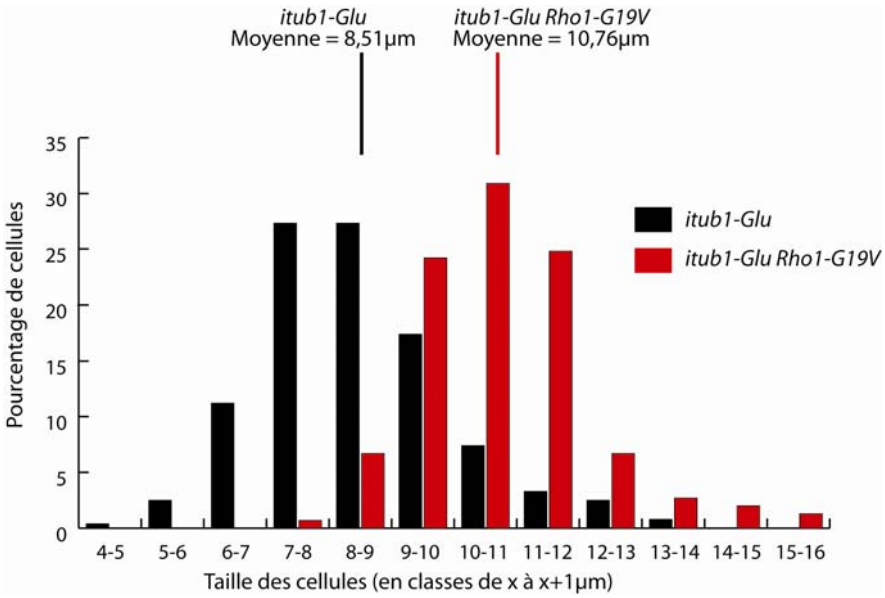


Figure 42. Effet de *rho1-G19V* sur la taille des cellules *itub1-Glu*.
Répartition de la taille des cellules en classes de 1 µm (pourcentage de cellules appartenant à chaque classe). Les moyennes sont indiquées par les barres verticales au dessus du graphique.

J'ai ensuite vérifié la taille des cellules dans tous les fonds génétiques (figure 43). Cette taille semble constante dans les cellules *iTUB1* exprimant ou non les versions hyperactives de Rho1p. Dans la souche *itub1-Glu,* l'expression de *rho1-Q68L* n'a pas d'effet sur la taille des cellules qui est comparable à celle des contrôles. Etant donné que les plasmides d'expression de *rho1-G19V* et *rho1-Q68L* sont les mêmes, ce résultat exclut un effet du plasmide *per se*. C'est donc bien la mutation *G19V* de Rho1p qui est à l'origine de ce défaut du contrôle de la taille.

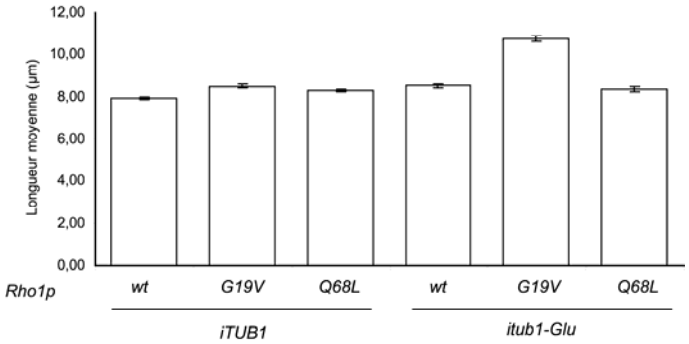


Figure 43. Comparaison de la taille des cellules *iTUB1* et *itub1-Glu* exprimant ou non Rho1p hyperactive.
Longueur moyenne des cellules (dans l'axe cellule mère – bourgeon) en mitose. Les barres d'erreur représentent les s.e.m.

La première question qui apparaît à la vue de ce résultat est de savoir pourquoi ce phénotype est spécifique de la souche *itub1-Glu*. Nous savons qu'une des différences avec les souches contrôles est le défaut d'association de Bik1p avec les bouts plus des microtubules. Il est possible d'imaginer que ce défaut d'interaction ait un effet dominant sur le contrôle de la taille des cellules, perturbé par l'expression du mutant *rho1-G19V*. Les différentes alternatives sont alors :

-soit l'effet passe par le fait que l'interaction réduite de Bik1p avec les bouts plus des microtubules a un effet dominant sur le mauvais contrôle de la taille des cellules. Dans ce cas, *rho1-G19V* ne devrait pas avoir d'effets sur la taille des cellules *itub1-Glu bik1Δ*.

-soit l'interaction réduite de Bik1p avec les bouts plus des microtubules correspond à une invalidation de *BIK1*. L'expression de *rho1-G19V* devrait alors avoir le même effet dans les souches *itub1-Glu, itub1-Glu bik1Δ* et *iTUB1 bik1Δ*, c'est-à-dire une augmentation de la taille moyenne des cellules.

-enfin, Bik1p n'est peut-être pas requise pour l'effet de *rho1-G19V* sur la taille des cellules. Les levures *itub1-Glu bik1Δ* exprimant *rho1-G19V* devraient être plus grosses que les cellules *iTUB1 bik1Δ* exprimant *rho1-G19V*.

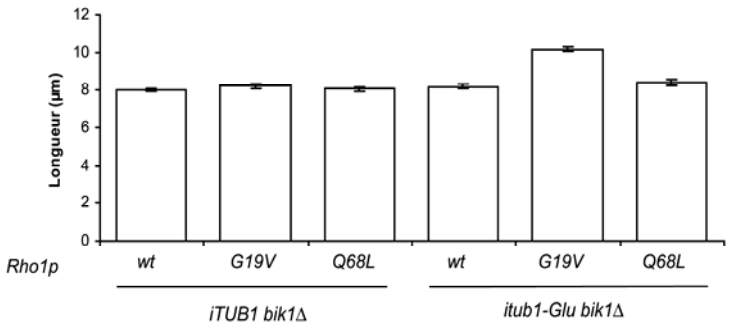


Figure 44. Effet de l'invalidation de *BIK1* sur la taille des cellules suite à l'hyperactivation de Rho1p.
Longueur moyenne des cellules (dans l'axe cellule mère – bourgeon) en mitose invalidées pour *BIK1*. Les barres d'erreur représentent les s.e.m.

La figure 44 montre que l'invalidation de *BIK1* n'a pas d'effet sur les phénotypes observés. L'expression de *rho1-G19V* entraîne une augmentation de la taille moyenne des cellules *itub1-Glu bik1Δ*, mais ne change pas celle des cellules *iTUB1 bik1Δ*. Ce résultat permet d'exclure une participation de Bik1p dans le contrôle de taille des cellules. Le

phénotype de taille des cellules semble donc bien lié à la tubuline Glu et non simplement Bik1p.

IV.3. Conclusions

Le crible de létalité synthétique m'a permis d'établir un lien avec la petite protéine G Rho1p. Les petites protéines G sont importantes dans la mise en place du 'leading edge' dans les cellules de mammifères (Kurokawa et al., 2005). Elles sont notamment connues pour réguler les interactions des microtubules avec le cortex (Fukata et al., 2002). J'ai mis en évidence le fait que Rho1p contrôle positivement la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules. Cette régulation semble importante puisque Bik1p peut s'associer fortement avec les bouts plus des microtubules Glu. De plus cet enrichissement correspond à la localisation de Rho1p dans le bourgeon. En effet, Bik1p est enrichie par Rho1p aux bouts plus des microtubules dirigés vers le bourgeon.

Nous allons compléter ces résultats en observant d'autres protéines s'associant aux bouts plus des microtubules. L'analyse des localisations de Kip2p, Dyn1p et Bim1p seront informatives. Ceci nous permettra de déterminer si Rho1p contrôle spécifiquement la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules, ou bien si Rho1p contrôle la localisation de plusieurs protéines de bouts plus des microtubules.

Nous allons aussi tester l'hypothèse que Rho1p modifie Bik1p de façon post-traductionnelle. L'hypothèse est que Rho1p active une kinase qui phosphoryle Bik1p. J'ai ciblé quelques kinases candidates. Tout d'abord, Tor1p et Tor2p qui lient Bik1p et semblent réguler son association avec les bouts plus des microtubules (Choi et al., 2000). Tor2p active Rho1p (Schmidt et al., 1997). Ensuite, Pkh3p est décrite comme liant Bik1p (Krogan et al., 2006). Pkh3p est une protéine kinase qui agit dans la voie de Pkc1p (protein kinase C 1) qui est activée par Rho1p (Inagaki et al., 1999). Nous pourrons aussi tester d'autres kinases phosphorylant Bik1p, identifiées dans un crible général de phosphorylation (Ptacek et al., 2005). Ce sont les kinases Atg1p, Cmk1p (protéine kinase dépendant de la calmoduline, similaire à la CamKII des mammifères), Swe1p (homologue de Wee1p de *S. pombe*), et Yck1p (yeast casein kinase I).

D'autre part, l'analyse de mutants thermosensibles de *RHO1* nous permettra de savoir si Rho1p est essentielle aux interactions des microtubules avec le cortex.

Les cellules *itub1-Glu* exprimant le mutant hyper-actif *rho1-G19V* sont plus grandes que les cellules contrôles. Ce résultat implique un contrôle de la taille des cellules par la tubuline. La kinase TOR est impliquée dans les contrôles de la taille des cellules chez la drosophile (pour revue voir (Edgar, 2006)). Ces mécanismes sont peut-être mal régulés dans la cellule exprimant de la tubuline Glu. De plus, la phosphatidylinositol 3 kinase Dp110 de la drosophile semble aussi réguler la taille des cellules (Leevers et al., 1996). Or, Vps15p, retrouvé dans le crible de synthétiques létaux, est un régulateur de la seule phosphatidylinositol 3 kinase de la levure, Vps34p. Il sera intéressant de comprendre pourquoi les cellules *itub1-Glu* ne contrôlent pas leur taille de la même façon que les cellules contrôles quand *rho1-G19V* est exprimée.

Enfin, il est aussi connu que le volume cellulaire de *S. cerevisiae* est d'autant plus grand que les cellules sont vieilles (Zadrag et al., 2006). Les cellules *itub1-Glu* exprimant *rho1-G19V* vieillissent peut-être prématurément.

CONCLUSION GENERALE

Chapitre 4 – Conclusion générale

Au début de ma thèse, le laboratoire a montré que la phénylalanine C-terminale de la tubuline α était d'importance majeure pour les fonctions des microtubules chez *Saccharomyces cerevisiae* (Badin-Larcon et al., 2004). En effet, Bik1p se lie moins bien aux bouts plus des microtubules Glu. Ceci entraîne un défaut des interactions des microtubules avec le cortex, et un défaut de migration nucléaire.

J'ai alors recherché les gènes dont la sur-expression peut restaurer l'association de Bik1p aux bouts plus des microtubules. J'ai montré que le seul gène ayant cette caractéristique est *TUB3,* qui code pour la tubuline α sauvage. Le résultat de ce crible montre que le défaut d'association de Bik1p avec les bouts plus des microtubules Glu est certainement du à un défaut d'interaction de Bik1p avec la tubuline α Glu. Parallèlement, le laboratoire a pu montrer que, chez les eucaryotes supérieurs, CLIP-170 a moins d'affinité pour les microtubules détyrosinés (Peris et al., 2006).

J'ai utilisé les levures n'exprimant que de la tubuline Glu comme des modèles originaux pour l'étude de Bik1p. En effet, Bik1p est exprimée mais s'associe mal aux bouts plus des microtubules Glu. Je me suis intéressé aux mécanismes participant à la localisation et aux fonctions de Bik1p aux bouts plus des microtubules. Ces résultats sont schématisés dans la figure 45.

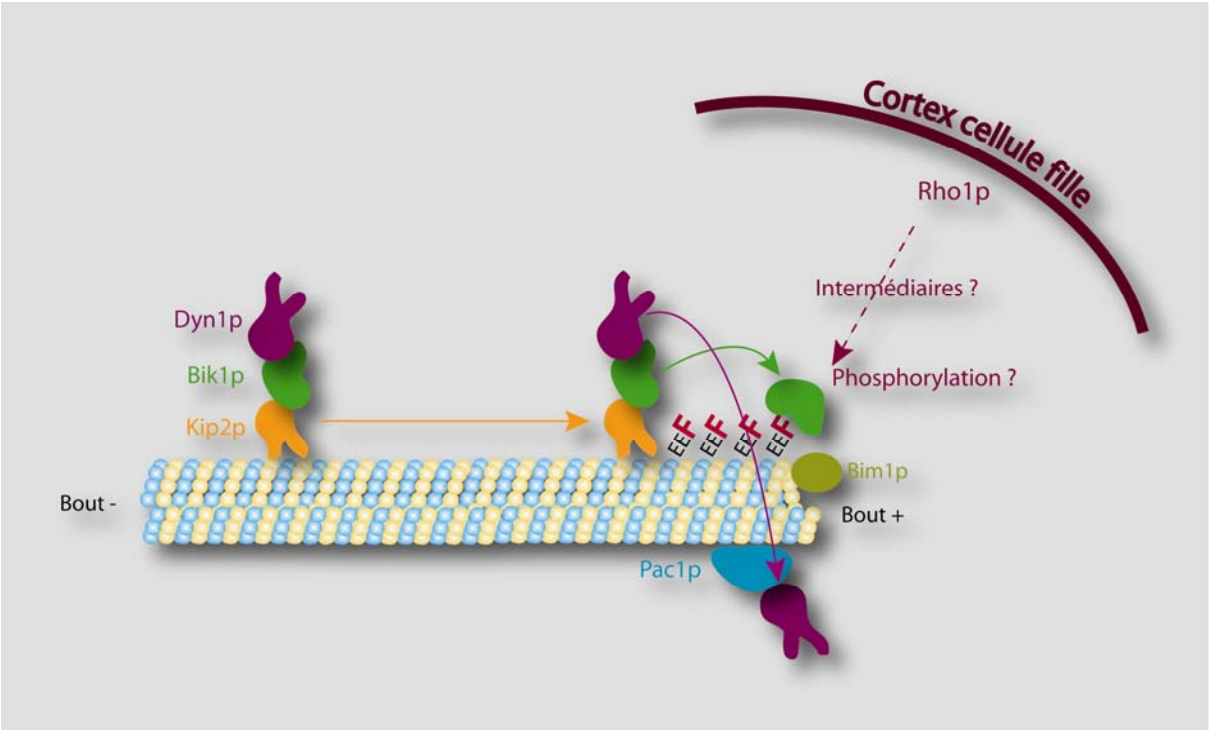


Figure 45. Régulations de localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules.
Ce schéma illustre le rôle de la phénylalanine C-terminale de la tubuline alpha pour la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules. La kinésine Kip2p cible Bik1p vers les bouts plus et participe avec Bik1p au ciblage, mais non à l'ancrage, de la dynéine aux bouts plus. Pac1p pourrait favoriser cet ancrage de la dynéine. Bim1p est placée aux bouts plus, mais à côté de Bik1p. Son rôle exact reste à définir. Enfin Rho1p, ancrée au cortex de la cellule fille permet un enrichissement localisé de Bik1p aux bouts plus des microtubules.

Interaction Bim1p/EB1 et Bik1p/CLIP-170

Nous avons cherché un rôle de Bim1p pour la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules. Il est connu que Bik1p et Bim1p interagissent. Leurs homologues, EB1 et CLIP-170, interagissent aussi. Cette interaction fait intervenir le domaine CAP-Gly de CLIP-170 et la queue C-terminale EB1 (Hayashi et al., 2005; Honnappa et al., 2006; Komarova et al., 2005). La déplétion de EB1 et EB3 par interférence ARN dans des cellules CHO-K1 entraîne une diminution de la quantité de CLIP-170 aux bouts plus des microtubules. Cette association est restaurée complètement par l'ajout d'un plasmide qui exprime EB1, mais est aussi restaurée à 75% par l'ajout d'un plasmide qui exprime un mutant de EB1 ne possédant pas sa queue C-terminale (Komarova et al., 2005). Or, ce mutant de EB1 sans la queue C-terminale interagit très faiblement avec CLIP-170. Il semblerait donc que l'interaction EB1/CLIP-170 ne participe pas directement à l'association de CLIP-170 avec les bouts plus des microtubules. Les résultats que j'ai obtenus sont en accord avec ces observations. En

effet, nous avons pu observer un rôle de Bim1p dans la localisation de Bik1p aux bouts plus des microtubules Glu et les données dont nous disposons nous font pencher vers un rôle indirect de Bim1p, en jouant sur la structure ou la conformation des bouts plus des microtubules. Dans ce cadre, les résultats récents des groupes de Hoenger et Brunner sont intéressants. Mal3p, l'homologue de EB1, se lie à la suture des microtubules et pourrait ainsi participer à la mise en place de conformations spécifiques des bouts plus des microtubules (Sandblad et al., 2006). L'interaction entre EB1 et CLIP-170 (et Bim1p et Bik1p) est intéressante. Nos données nous font penser que cette interaction n'est pas importante aux bouts plus des microtubules. Son étude permettrait de définir où, et quand, elle a lieu et joue un rôle. Nous n'observons pas de rôle de Bim1p pour Bik1p aux bouts plus des microtubules sauvages, mais aux bouts plus des microtubules Glu. Bik1p a une affinité réduite pour les microtubules Glu. Ainsi, cette situation de basse affinité pourrait révéler un rôle de Bim1p. Dans la levure, les microtubules Glu ne sont pas présents, mais ils existent dans les cellules des eucaryotes supérieurs. Il serait intéressant de savoir si EB1 est importante pour la localisation de CLIP-170 aux bouts plus d'une sous population de microtubules, qui pourrait être, par exemple, constituée de microtubules détyrosinés.

Bik1p, Kip2p et la phénylalanine de la tubuline alpha :

Dans les cellules de mammifères, CLIP-170 est localisée aux bouts plus des microtubules. Le mécanisme gouvernant cette localisation semble dépendre directement de l'interaction de CLIP-170 avec la tubuline α. Les résultats obtenus ensuite chez les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae* (Busch et al., 2004; Carvalho et al., 2004) ont proposé un transport, et un ancrage, au moins partiel, de Bik1p (*S. cerevisiae*) et Tip1p (*S. pombe*) aux bouts plus des microtubules, par les kinésines Kip2p (*S. cerevisiae*) et Tea2p (*S. pombe*). Un tel mécanisme n'a pas pu être mis en évidence chez les mammifères jusqu'à présent. Ceci présentait une différence majeure dans les modes de localisation de CLIP-170 et ses homologues au cours de l'évolution. Le travail que je présente ici montre directement que la kinésine Kip2p participe à un transport de Bik1p aux bouts plus des microtubules, mais n'ancre pas Bik1p aux bouts plus. La phénylalanine de la tubuline alpha est cruciale dans l'interaction de Bik1p avec les bouts plus. Ces résultats montrent clairement que le mécanisme de localisation de Bik1p est le même que celui de CLIP-170. Il existe toutefois une différence majeure entre CLIP-170 et Bik1p. CLIP-170 ne s'associe qu'aux bouts plus des microtubules en croissance, alors que

Bik1p est présente aux bouts plus des microtubules en croissance, en pause et en décroissance. Cette différence n'est pas encore comprise, mais pourrait être reliée à la dynamique même des microtubules. En effet, les microtubules de *S. cerevisiae* ont des vitesses de croissance et décroissance très différentes, et sont réduites d'un facteur dix dans la levure comparées aux vitesses mesurées dans les cellules de mammifères. Le rôle de la kinésine Kip2p est alors sujet à discussion. Tout d'abord, nous avons montré que Kip2p participe directement au recrutement de la dynéine aux bouts plus des microtubules. D'autre part, l'expression de Kip2p est régulée au cours du cycle de division cellulaire, et atteint un pic en mitose (Carvalho et al., 2004). Ainsi, Kip2p pourrait augmenter la concentration locale de Bik1p aux bouts plus des microtubules, entraînant un enrichissement de Bik1p à ces bouts plus. Ce rôle est attrayant puisqu'il permet un contrôle temporel de la quantité de Bik1p aux bouts plus des microtubules. Ce mécanisme a été cherché chez les mammifères, mais n'est toujours pas mis en évidence. On peut penser qu'il n'existe pas, ou encore qu'il existe mais ne concerne qu'une sous population de microtubules ou ne soit mis en jeu que pendant des périodes bien précises. Enfin, on peut aussi imaginer qu'un tel mécanisme ne soit mis en jeu que dans des types cellulaires ou des structures cellulaires bien précises.

Lors de cette étude, j'ai obtenu des cellules n'ayant plus d'intermédiaires des interactions des microtubules avec le cortex. Dans ces cellules, le fuseau semble se positionner selon un mécanisme par défaut basé sur la géométrie de la cellule. Ce mécanisme par défaut suivant l'axe le plus long de la cellule est observé lors des premières divisions cellulaires des œufs d'amphibiens, des embryons de *caenorhabditis elegans* (Tsou et al., 2003) ou encore des cellules de mammifères (pour revue, voir (Thery and Bornens, 2006). *Saccharomyces cerevisiae* semble adopter le même mécanisme lorsque les contraintes imposées par les interactions des microtubules astraux avec le cortex sont supprimées.

Contrôle des bouts plus des microtubules par les Rho GTPases

Nous avons montré une régulation de la quantité de Bik1p aux bouts plus des microtubules par la petite protéine G Rho1p. Cette observation est très intéressante, et sera l'objet d'une attention particulière au laboratoire. J'ai montré que cette régulation est indépendante de l'état phénylalaniné de la tubuline et de Bim1p.

De plus, au laboratoire, Leticia Peris a montré que CLIP-170 est plus enrichie aux bouts plus des microtubules situés dans le front de migration dans des fibroblastes primaires qu'aux bouts plus des microtubules situés dans le reste de la cellule. Le front de migration est connu pour être une zone avec des Rho GTPases actives. L'utilisation de versions hyperactives de Rho GTPases entraîne aussi un enrichissement de CLIP-170 aux bouts plus des microtubules.

Ces travaux permettent de proposer pour la première fois un contrôle de la quantité de protéines liées aux bouts plus des microtubules par des Rho GTPases. Dans la levure, Rho1p est localisée au cortex du bourgeon, et, dans les cellules de mammifères, elles sont actives dans certaines zones dont le front de migration. Les Rho GTPases permettent alors un contrôle spatial des bouts plus des microtubules.

Les études dans la levure permettront, en utilisant toute la force de ce modèle, de proposer un mécanisme moléculaire, et d'identifier les intermédiaires entre l'activation de Rho1p et l'enrichissement de Bik1p aux bouts plus des microtubules. Bik1p et CLIP-170 étant des protéines phosphorylées, il est probable que Rho1p active une kinase qui phosphoryle Bik1p, et que cette phosphorylation permette une plus forte association de Bik1p aux bouts plus des microtubules. Les résultats que nous obtiendrons seront directement transférables aux cellules des eucaryotes supérieurs.

Par la suite, nous pourrons étudier le rôle physiologique de cette régulation. Dans ce cadre, il est intéressant d'observer que l'activation de RhoA entraîne la stabilisation des microtubules orientés vers le front de migration de la cellule (Cook et al., 1998; Palazzo et al., 2001). Cette stabilisation a été mesurée en observant l'état détyrosiné des microtubules. L'effet de RhoA implique les protéines mDia (une formine), APC et EB1. Or, CLIP-170 se lie moins bien aux bouts plus des microtubules Glu, ce qui pourrait défavoriser l'interaction des bouts plus des microtubules avec le cortex. Toutefois cet effet pourrait être balancé par le fait que RhoA ou d'autres Rho GTPases puissent associer CLIP-170 aux bouts plus des microtubules, même s'ils sont détyrosinés. On peut imaginer la séquence suivante : des Rho GTPases sont activées au front de migration. Cette activation entraîne la stabilisation des microtubules, qui deviennent alors détyrosinés. Les interactions avec le cortex impliquant CLIP-170 sont toujours possibles, car les Rho GTPases actives permettent un enrichissement de CLIP-170 aux bouts plus des microtubules Glu. Si ces microtubules 'voulaient' interagir avec le cortex dans des zones où les Rho GTPases ne sont pas activées, CLIP-170 ne serait

pas associées aux bouts plus des microtubules Glu. Un contrôle spatial et temporel de ces interactions est alors possible.

Les Rho GTPases sont impliquées dans la régulation du cytosquelette microtubulaire, mais aussi du cytosquelette d'actine (pour revues, voir (Basu and Chang, 2007; Rodriguez et al., 2003; Watanabe et al., 2005). Ces deux structures interagissent fortement dans la cellule. Des protéines permettent le lien entre ces structures, c'est notamment le cas du complexe Bim1p/Kar9p/Myo2p (voir paragraphe IV.5.3.9. de l'introduction) dans la levure et qui semble conservé chez les mammifères (Gundersen et al., 2004), mais aussi d'autres protéines, telles que ACF7 chez les mammifères (Karakesisoglou et al., 2000; Kodama et al., 2003). Ces interactions vont permettre un guidage des microtubules vers leurs cibles ou encore une stabilisation des microtubules afin de permettre une interaction efficace, par exemple avec le cortex. L'activation des Rho GTPases pourrait former un réseau d'actine et enrichir les bouts plus des microtubules en protéines afin de permettre des interactions entre ces deux structures. Dans la levure, les Rho GTPases (Rho3p et Rho4p) sont connues pour activer la formine Bni1p et participent ainsi à la mise en place des câbles d'actine (Dong et al., 2003). Nous apportons un rôle dans le contrôle de la composition en protéines aux bouts plus des microtubules. Ces observations permettent de comprendre le rôle central des Rho GTPases dans la cellule. Elles permettent de remodeler localement le cytosquelette d'actine et le cytosquelette microtubulaire, afin que ces deux structures interagissent correctement, en liaison avec le cortex de la cellule. Elles vont pouvoir notamment établir les structures nécessaires à la migration de la cellule.

Bik1p et cellules polyploïdes

BIK1 n'est pas essentiel, mais le devient dans des cellules polyploïdes (Lin et al., 2001). La polyploïdie est impliquée dans la mise en place de l'aneuploïdie dans les cellules tumorales (Margolis, 2005). Cette aneuploïdie, avec l'instabilité chromosomique, est une des caractéristiques de la plupart des cellules cancéreuses (Cahill et al., 1999). Il a été montré que des cellules tétraploïdes de souris invalidées pour p53 forment des tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans des souris, alors que les mêmes cellules diploïdes n'en forment pas (Fujiwara et al., 2005). Il serait donc intéressant de savoir pourquoi Bik1p devient essentielle dans cellules

polyploïdes. L'utilisation de levures polyploïdes exprimant de la tubuline Glu pourrait permettre d'appréhender cette question.

Vers un rôle plus large de l'acide aminé C-terminal de la tubuline α

J'ai recherché l'ensemble des invalidations géniques qui sont létales en conjonction avec la mutation *itub1-Glu*. J'ai identifié des composants ayant pour caractéristique commune d'être reliés aux membranes et paroi. Ceci ouvre de nombreuses perspectives de travail. Il s'agira de comprendre si le cortex est affecté dans les cellules exprimant de la tubuline Glu. Le rôle de *VPS15,* qui est un régulateur de la PI3 kinase Vps34p, sera intéressant. Vps34p phosphoryle les phosphatidyl inositol. Les phosphoinositides sont des composants mineurs des membranes importants dans diverses fonctions, notamment la motilité cellulaire, ou encore le trafic vésiculaire. Ils participent à des signalisations membranaires, et des domaines protéiques peuvent reconnaître spécifiquement et interagir avec les phosphoinositides. C'est par exemple le cas de Num1p, qui contient un domaine d'homologie à la pleckstrine, et qui est ancrée à la membrane et participe à l'ancrage de la dynéine au cortex (voir paragraphe IV.5.3.9.).

Nous pourrons poser comme hypothèse de travail que les bouts plus des microtubules sont régulés par des micro-domaines membranaires, et participent à la mise en place de ces micro-domaines. Ainsi, nous pourrons déterminer si la signalisation par les phosphoinositides, et la mise en place des protéines associées au cortex cellulaire, sont perturbées dans les souches Glu. Nous pourrons alors peut-être identifier des voies de signalisation impliquées dans les interactions des microtubules avec le cortex.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

Adams, A.E., and J.R. Pringle. 1984. Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol*. 98:934-45.

Adams, I.R., and J.V. Kilmartin. 1999. Localization of core spindle pole body (SPB) components during SPB duplication in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol*. 145:809-23.

Akhmanova, A., C.C. Hoogenraad, K. Drabek, T. Stepanova, B. Dortland, T. Verkerk, W. Vermeulen, B.M. Burgering, C.I. De Zeeuw, F. Grosveld, and N. Galjart. 2001. Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell*. 104:923-35.

Alvarez, L.A., T. Yamamoto, B. Wong, T.J. Resnick, J.F. Llena, and S.L. Moshe. 1986. Miller-Dieker syndrome: a disorder affecting specific pathways of neuronal migration. *Neurology*. 36:489-93.

Amberg, D.C. 1998. Three-dimensional imaging of the yeast actin cytoskeleton through the budding cell cycle. *Mol Biol Cell*. 9:3259-62.

Andrieux, A., P.A. Salin, M. Vernet, P. Kujala, J. Baratier, S. Gory-Faure, C. Bosc, H. Pointu, D. Proietto, A. Schweitzer, E. Denarier, J. Klumperman, and D. Job. 2002. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev*. 16:2350-64.

Aniento, F., N. Emans, G. Griffiths, and J. Gruenberg. 1993. Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol*. 123:1373-87.

Arce, C.A., H.S. Barra, J.A. Rodriguez, and R. Caputto. 1975. Tentative identification of the amino acid that binds tyrosine as a single unit into a soluble brain protein. *FEBS Lett*. 50:5-7.

Argarana, C.E., H.S. Barra, and R. Caputto. 1978. Release of [14C]tyrosine from tubulinyl-[14C]tyrosine by brain extract. Separation of a carboxypeptidase from tubulin-tyrosine ligase. *Mol Cell Biochem*. 19:17-21.

Argarana, C.E., H.S. Barra, and R. Caputto. 1980. Tubulinyl-tyrosine carboxypeptidase from chicken brain: properties and partial purification. *J Neurochem*. 34:114-8.

Arnal, I., C. Heichette, G.S. Diamantopoulos, and D. Chretien. 2004. CLIP-170/tubulin-curved oligomers coassemble at microtubule ends and promote rescues. *Curr Biol*. 14:2086-95.

Askham, J.M., K.T. Vaughan, H.V. Goodson, and E.E. Morrison. 2002. Evidence that an interaction between EB1 and p150(Glued) is required for the formation and maintenance of a radial microtubule array anchored at the centrosome. *Mol Biol Cell*. 13:3627-45.

Badin-Larcon, A.C., C. Boscheron, J.M. Soleilhac, M. Piel, C. Mann, E. Denarier, A. Fourest-Lieuvin, L. Lafanechere, M. Bornens, and D. Job. 2004. Suppression of nuclear oscillations in Saccharomyces cerevisiae expressing Glu tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:5577-82.

Baratier, J., L. Peris, J. Brocard, S. Gory-Faure, F. Dufour, C. Bosc, A. Fourest-Lieuvin, L. Blanchoin, P. Salin, D. Job, and A. Andrieux. 2006. Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase II. *J Biol Chem*. 281:19561-9.

Barra, H.S., C.A. Arce, J.A. Rodriguez, and R. Caputto. 1974. Some common properties of the protein that incorporates tyrosine as a single unit and the microtubule proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 60:1384-90.

Barra, H.S., J.A. Rodriguez, C.A. Arce, and R. Caputto. 1973. A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins (14 C)arginine by a ribonuclease-sensitive system and (14 C)tyrosine by a ribonuclease-insensitive system. *J Neurochem*. 20:97-108.

Barral, Y. 2003. [Are mitotic spindles a cellular sensory organ?]. *Med Sci (Paris)*. 19:1054-6.

Basu, R., and F. Chang. 2007. Shaping the actin cytoskeleton using microtubule tips. *Curr Opin Cell Biol*. 19:88-94.

Baudier, J., and R.D. Cole. 1987. Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. *J Biol Chem*. 262:17577-83.

Beinhauer, J.D., I.M. Hagan, J.H. Hegemann, and U. Fleig. 1997. Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form. *J Cell Biol*. 139:717-28.

Berlin, V., C.A. Styles, and G.R. Fink. 1990. BIK1, a protein required for microtubule function during mating and mitosis in Saccharomyces cerevisiae, colocalizes with tubulin. *J Cell Biol*. 111:2573-86.

Berrueta, L., J.S. Tirnauer, S.C. Schuyler, D. Pellman, and B.E. Bierer. 1999. The APC-associated protein EB1 associates with components of the dynactin complex and cytoplasmic dynein intermediate chain. *Curr Biol*. 9:425-8.

Bienz, M. 2002. The subcellular destinations of APC proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:328-38.

Bobinnec, Y., A. Khodjakov, L.M. Mir, C.L. Rieder, B. Edde, and M. Bornens. 1998. Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J Cell Biol*. 143:1575-89.

Bode, C.J., M.L. Gupta, K.A. Suprenant, and R.H. Himes. 2003. The two alpha-tubulin isotypes in budding yeast have opposing effects on microtubule dynamics in vitro. *EMBO Rep*. 4:94-9.

Bonnet, C., D. Boucher, S. Lazereg, B. Pedrotti, K. Islam, P. Denoulet, and J.C. Larcher. 2001. Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *J Biol Chem*. 276:12839-48.

Bornens, M. 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*. 14:25-34.

Brunner, D., and P. Nurse. 2000. CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell*. 102:695-704.

Bu, W., and L.K. Su. 2003. Characterization of functional domains of human EB1 family proteins. *J Biol Chem*. 278:49721-31.

Bullitt, E., M.P. Rout, J.V. Kilmartin, and C.W. Akey. 1997. The yeast spindle pole body is assembled around a central crystal of Spc42p. *Cell*. 89:1077-86.

Burke, D., P. Gasdaska, and L. Hartwell. 1989. Dominant effects of tubulin overexpression in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol*. 9:1049-59.

Burkhardt, J.K., C.J. Echeverri, T. Nilsson, and R.B. Vallee. 1997. Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J Cell Biol*. 139:469-84.

Busch, K.E., and D. Brunner. 2004. The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules. *Curr Biol*. 14:548-59.

Busch, K.E., J. Hayles, P. Nurse, and D. Brunner. 2004. Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules. *Dev Cell*. 6:831-43.

Busson, S., D. Dujardin, A. Moreau, J. Dompierre, and J.R. De Mey. 1998. Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr Biol*. 8:541-4.

Byers, B., and L. Goetsch. 1974. Duplication of spindle plaques and integration of the yeast cell cycle. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 38:123-31.

Byers, B., and L. Goetsch. 1975. Behavior of spindles and spindle plaques in the cell cycle and conjugation of Saccharomyces cerevisiae. *J Bacteriol*. 124:511-23.

Cahill, D.P., K.W. Kinzler, B. Vogelstein, and C. Lengauer. 1999. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol*. 9:M57-60.

Carminati, J.L., and T. Stearns. 1997. Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J Cell Biol*. 138:629-41.

Caron, J.M. 1997. Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: I. In vivo and cell-free studies. *Mol Biol Cell*. 8:621-36.

Caron, J.M., L.R. Vega, J. Fleming, R. Bishop, and F. Solomon. 2001. Single site alpha-tubulin mutation affects astral microtubules and nuclear positioning during anaphase in Saccharomyces cerevisiae: possible role for palmitoylation of alpha-tubulin. *Mol Biol Cell*. 12:2672-87.

Carvalho, P., M.L. Gupta, Jr., M.A. Hoyt, and D. Pellman. 2004. Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation. *Dev Cell*. 6:815-29.

Carvalho, P., J.S. Tirnauer, and D. Pellman. 2003. Surfing on microtubule ends. *Trends Cell Biol*. 13:229-37.

Casamayor, A., and M. Snyder. 2002. Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Curr Opin Microbiol*. 5:179-86.

Chant, J., and I. Herskowitz. 1991. Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway. *Cell*. 65:1203-12.

Cheeseman, I.M., D.G. Drubin, and G. Barnes. 2002. Simple centromere, complex kinetochore: linking spindle microtubules and centromeric DNA in budding yeast. *J Cell Biol*. 157:199-203.

Chen, T., T. Hiroko, A. Chaudhuri, F. Inose, M. Lord, S. Tanaka, J. Chant, and A. Fujita. 2000. Multigenerational cortical inheritance of the Rax2 protein in orienting polarity and division in yeast. *Science*. 290:1975-8.

Choi, J.H., N.R. Adames, T.F. Chan, C. Zeng, J.A. Cooper, and X.F. Zheng. 2000. TOR signaling regulates microtubule structure and function. *Curr Biol*. 10:861-4.

Choi, J.H., P.G. Bertram, R. Drenan, J. Carvalho, H.H. Zhou, and X.F. Zheng. 2002. The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase. *EMBO Rep*. 3:988-94.

Cook, T.A., T. Nagasaki, and G.G. Gundersen. 1998. Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J Cell Biol*. 141:175-85.

Coquelle, F.M., M. Caspi, F.P. Cordelieres, J.P. Dompierre, D.L. Dujardin, C. Koifman, P. Martin, C.C. Hoogenraad, A. Akhmanova, N. Galjart, J.R. De Mey, and O. Reiner. 2002. LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Mol Cell Biol*. 22:3089-102.

Cottingham, F.R., and M.A. Hoyt. 1997. Mitotic spindle positioning in Saccharomyces cerevisiae is accomplished by antagonistically acting microtubule motor proteins. *J Cell Biol*. 138:1041-53.

Courey, A.J., and S. Jia. 2001. Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev*. 15:2786-96.

Cuschieri, L., R. Miller, and J. Vogel. 2006. Gamma-tubulin is required for proper recruitment and assembly of Kar9-Bim1 complexes in budding yeast. *Mol Biol Cell*. 17:4420-34.

de Nobel, H., C. Ruiz, H. Martin, W. Morris, S. Brul, M. Molina, and F.M. Klis. 2000. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology*. 146 (Pt 9):2121-32.

De Zeeuw, C.I., C.C. Hoogenraad, E. Goedknegt, E. Hertzberg, A. Neubauer, F. Grosveld, and N. Galjart. 1997. CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. *Neuron*. 19:1187-99.

Dhillon, N., M. Oki, S.J. Szyjka, O.M. Aparicio, and R.T. Kamakaka. 2006. H2A.Z functions to regulate progression through the cell cycle. *Mol Cell Biol*. 26:489-501.

Diamantopoulos, G.S., F. Perez, H.V. Goodson, G. Batelier, R. Melki, T.E. Kreis, and J.E. Rickard. 1999. Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *J Cell Biol*. 144:99-112.

Dillman, J.F., 3rd, and K.K. Pfister. 1994. Differential phosphorylation in vivo of cytoplasmic dynein associated with anterogradely moving organelles. *J Cell Biol*. 127:1671-81.

Dong, Y., D. Pruyne, and A. Bretscher. 2003. Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J Cell Biol*. 161:1081-92.

Draviam, V.M., I. Shapiro, B. Aldridge, and P.K. Sorger. 2006. Misorientation and reduced stretching of aligned sister kinetochores promote chromosome missegregation in EB1- or APC-depleted cells. *Embo J*. 25:2814-27.

Drgonova, J., T. Drgon, K. Tanaka, R. Kollar, G.C. Chen, R.A. Ford, C.S. Chan, Y. Takai, and E. Cabib. 1996. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science*. 272:277-9.

Dujardin, D., U.I. Wacker, A. Moreau, T.A. Schroer, J.E. Rickard, and J.R. De Mey. 1998. Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J Cell Biol*. 141:849-62.

Dujardin, D.L., L.E. Barnhart, S.A. Stehman, E.R. Gomes, G.G. Gundersen, and R.B. Vallee. 2003. A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *J Cell Biol*. 163:1205-11.

Dujardin, D.L., and R.B. Vallee. 2002. Dynein at the cortex. *Curr Opin Cell Biol*. 14:44-9.

Dzhindzhev, N.S., S.L. Rogers, R.D. Vale, and H. Ohkura. 2005. Distinct mechanisms govern the localisation of Drosophila CLIP-190 to unattached kinetochores and microtubule plus-ends. *J Cell Sci*. 118:3781-90.

Echeverri, C.J., B.M. Paschal, K.T. Vaughan, and R.B. Vallee. 1996. Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *J Cell Biol*. 132:617-33.

Edde, B., J. Rossier, J.P. Le Caer, E. Desbruyeres, F. Gros, and P. Denoulet. 1990. Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science*. 247:83-5.

Edgar, B.A. 2006. How flies get their size: genetics meets physiology. *Nat Rev Genet*. 7:907-16.

Edmondson, D.G., M.M. Smith, and S.Y. Roth. 1996. Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev*. 10:1247-59.

Eipper, B.A. 1972. Rat brain microtubule protein: purification and determination of covalently bound phosphate and carbohydrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 69:2283-7.

Erck, C., R.A. MacLeod, and J. Wehland. 2003. Cloning and genomic organization of the TTL gene on mouse chromosome 2 and human chromosome 2q13. *Cytogenet Genome Res*. 101:47-53.

Erck, C., L. Peris, A. Andrieux, C. Meissirel, A.D. Gruber, M. Vernet, A. Schweitzer, Y. Saoudi, H. Pointu, C. Bosc, P.A. Salin, D. Job, and J. Wehland. 2005. A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:7853-8.

Ersfeld, K., J. Wehland, U. Plessmann, H. Dodemont, V. Gerke, and K. Weber. 1993. Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. *J Cell Biol*. 120:725-32.

Eshel, D., L.A. Urrestarazu, S. Vissers, J.C. Jauniaux, J.C. van Vliet-Reedijk, R.J. Planta, and I.R. Gibbons. 1993. Cytoplasmic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:11172-6.

Evangelista, M., D. Pruyne, D.C. Amberg, C. Boone, and A. Bretscher. 2002. Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol*. 4:260-9.

Farkasovsky, M., and H. Kuntzel. 1995. Yeast Num1p associates with the mother cell cortex during S/G2 phase and affects microtubular functions. *J Cell Biol*. 131:1003-14.

Farkasovsky, M., and H. Kuntzel. 2001. Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast. *J Cell Biol*. 152:251-62.

Faulkner, N.E., D.L. Dujardin, C.Y. Tai, K.T. Vaughan, C.B. O'Connell, Y. Wang, and R.B. Vallee. 2000. A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol*. 2:784-91.

Feierbach, B., E. Nogales, K.H. Downing, and T. Stearns. 1999. Alf1p, a CLIP-170 domain-containing protein, is functionally and physically associated with alpha-tubulin. *J Cell Biol*. 144:113-24.

Fitch, I., C. Dahmann, U. Surana, A. Amon, K. Nasmyth, L. Goetsch, B. Byers, and B. Futcher. 1992. Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell*. 3:805-18.

Fodde, R., J. Kuipers, C. Rosenberg, R. Smits, M. Kielman, C. Gaspar, J.H. van Es, C. Breukel, J. Wiegant, R.H. Giles, and H. Clevers. 2001. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol*. 3:433-8.

Folker, E.S., B.M. Baker, and H.V. Goodson. 2005. Interactions between CLIP-170, tubulin, and microtubules: implications for the mechanism of Clip-170 plus-end tracking behavior. *Mol Biol Cell*. 16:5373-84.

Fourest-Lieuvin, A., L. Peris, V. Gache, I. Garcia-Saez, C. Juillan-Binard, V. Lantez, and D. Job. 2006. Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell*. 17:1041-50.

Fujiwara, T., M. Bandi, M. Nitta, E.V. Ivanova, R.T. Bronson, and D. Pellman. 2005. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature*. 437:1043-7.

Fujiwara, T., K. Tanaka, A. Mino, M. Kikyo, K. Takahashi, K. Shimizu, and Y. Takai. 1998. Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell*. 9:1221-33.

Fukata, M., T. Watanabe, J. Noritake, M. Nakagawa, M. Yamaga, S. Kuroda, Y. Matsuura, A. Iwamatsu, F. Perez, and K. Kaibuchi. 2002. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell*. 109:873-85.

Gadde, S., and R. Heald. 2004. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr Biol*. 14:R797-805.

Gaertig, J., M.A. Cruz, J. Bowen, L. Gu, D.G. Pennock, and M.A. Gorovsky. 1995. Acetylation of lysine 40 in alpha-tubulin is not essential in Tetrahymena thermophila. *J Cell Biol*. 129:1301-10.

Gagnon, C., D. White, J. Cosson, P. Huitorel, B. Edde, E. Desbruyeres, L. Paturle-Lafanechere, L. Multigner, D. Job, and C. Cibert. 1996. The polyglutamylated lateral chain of alpha-tubulin plays a key role in flagellar motility. *J Cell Sci*. 109 (Pt 6):1545-53.

Galjart, N. 2005. CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:487-98.

Gard, D.L., and M.W. Kirschner. 1985. A polymer-dependent increase in phosphorylation of beta-tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *J Cell Biol*. 100:764-74.

Geissler, S., G. Pereira, A. Spang, M. Knop, S. Soues, J. Kilmartin, and E. Schiebel. 1996. The spindle pole body component Spc98p interacts with the gamma-tubulin-like Tub4p of Saccharomyces cerevisiae at the sites of microtubule attachment. *Embo J*. 15:3899-911.

Gibbons, B.H., and I.R. Gibbons. 1987. Vanadate-sensitized cleavage of dynein heavy chains by 365-nm irradiation of demembranated sperm flagella and its effect on the flagellar motility. *J Biol Chem*. 262:8354-9.

Gibbons, I.R. 1965. Chemical dissection of cilia. *Arch Biol (Liege)*. 76:317-52.

Gill, S.R., T.A. Schroer, I. Szilak, E.R. Steuer, M.P. Sheetz, and D.W. Cleveland. 1991. Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J Cell Biol*. 115:1639-50.

Goffeau, A., B.G. Barrell, H. Bussey, R.W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J.D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E.J. Louis, H.W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, and S.G. Oliver. 1996. Life with 6000 genes. *Science*. 274:546, 563-7.

Gonczy, P., S. Pichler, M. Kirkham, and A.A. Hyman. 1999. Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of MTOC positioning, including centrosome separation, in the one cell stage Caenorhabditis elegans embryo. *J Cell Biol*. 147:135-50.

Grava, S., F. Schaerer, M. Faty, P. Philippsen, and Y. Barral. 2006. Asymmetric recruitment of dynein to spindle poles and microtubules promotes proper spindle orientation in yeast. *Dev Cell*. 10:425-39.

Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, and L.I. Binder. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:4913-7.

Gruneberg, U., K. Campbell, C. Simpson, J. Grindlay, and E. Schiebel. 2000. Nud1p links astral microtubule organization and the control of exit from mitosis. *Embo J*. 19:6475-88.

Gundersen, G.G., E.R. Gomes, and Y. Wen. 2004. Cortical control of microtubule stability and polarization. *Curr Opin Cell Biol*. 16:106-12.

Habermann, A., T.A. Schroer, G. Griffiths, and J.K. Burkhardt. 2001. Immunolocalization of cytoplasmic dynein and dynactin subunits in cultured macrophages: enrichment on early endocytic organelles. *J Cell Sci*. 114:229-240.

Harada, A., Y. Takei, Y. Kanai, Y. Tanaka, S. Nonaka, and N. Hirokawa. 1998. Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J Cell Biol*. 141:51-9.

Hayashi, I., A. Wilde, T.K. Mal, and M. Ikura. 2005. Structural basis for the activation of microtubule assembly by the EB1 and p150Glued complex. *Mol Cell*. 19:449-60.

Hayles, J., and P. Nurse. 2001. A journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:647-56.

He, X., D.R. Rines, C.W. Espelin, and P.K. Sorger. 2001. Molecular analysis of kinetochore-microtubule attachment in budding yeast. *Cell*. 106:195-206.

Heald, R. 2000. Motor function in the mitotic spindle. *Cell*. 102:399-402.

Heil-Chapdelaine, R.A., J.R. Oberle, and J.A. Cooper. 2000. The cortical protein Num1p is essential for dynein-dependent interactions of microtubules with the cortex. *J Cell Biol*. 151:1337-44.

Hirokawa, N., R. Sato-Yoshitake, T. Yoshida, and T. Kawashima. 1990. Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo. *J Cell Biol*. 111:1027-37.

Hoffman, P.N., D.W. Cleveland, J.W. Griffin, P.W. Landes, N.J. Cowan, and D.L. Price. 1987. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:3472-6.

Honnappa, S., O. Okhrimenko, R. Jaussi, H. Jawhari, I. Jelesarov, F.K. Winkler, and M.O. Steinmetz. 2006. Key interaction modes of dynamic +TIP networks. *Mol Cell*. 23:663-71.

Huckaba, T.M., A.C. Gay, L.F. Pantalena, H.C. Yang, and L.A. Pon. 2004. Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomes and actin patches in the budding yeast, Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol*. 167:519-30.

Huffaker, T.C., J.H. Thomas, and D. Botstein. 1988. Diverse effects of beta-tubulin mutations on microtubule formation and function. *J Cell Biol*. 106:1997-2010.

Huisman, S.M., and M. Segal. 2005. Cortical capture of microtubules and spindle polarity in budding yeast - where's the catch? *J Cell Sci*. 118:463-71.

Hussain, M., and J. Lenard. 1991. Characterization of PDR4, a Saccharomyces cerevisiae gene that confers pleiotropic drug resistance in high-copy number: identity with YAP1, encoding a transcriptional activator [corrected]. *Gene*. 101:149-52.

Hwang, E., J. Kusch, Y. Barral, and T.C. Huffaker. 2003. Spindle orientation in Saccharomyces cerevisiae depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables. *J Cell Biol*. 161:483-8.

Inagaki, M., T. Schmelzle, K. Yamaguchi, K. Irie, M.N. Hall, and K. Matsumoto. 1999. PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol Cell Biol*. 19:8344-52.

Jacobs, C.W., A.E. Adams, P.J. Szaniszlo, and J.R. Pringle. 1988. Functions of microtubules in the Saccharomyces cerevisiae cell cycle. *J Cell Biol*. 107:1409-26.

Janke, C., K. Rogowski, D. Wloga, C. Regnard, A.V. Kajava, J.M. Strub, N. Temurak, J. van Dijk, D. Boucher, A. van Dorsselaer, S. Suryavanshi, J. Gaertig, and B. Edde. 2005. Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science*. 308:1758-62.

Jaquenoud, M., and M. Peter. 2000. Gic2p may link activated Cdc42p to components involved in actin polarization, including Bni1p and Bud6p (Aip3p). *Mol Cell Biol*. 20:6244-58.

Jaspersen, S.L., and M. Winey. 2004. The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:1-28.

Jiang, Y., P. Proteau, D. Poulter, and S. Ferro-Novick. 1995. BTS1 encodes a geranylgeranyl diphosphate synthase in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem*. 270:21793-9.

Job, D., C.T. Rauch, E.H. Fischer, and R.L. Margolis. 1983. Regulation of microtubule cold stability by calmodulin-dependent and -independent phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80:3894-8.

Job, D., O. Valiron, and B. Oakley. 2003. Microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol*. 15:111-7.

Joglekar, A.P., D.C. Bouck, J.N. Molk, K.S. Bloom, and E.D. Salmon. 2006. Molecular architecture of a kinetochore-microtubule attachment site. *Nat Cell Biol*. 8:581-5.

Kahana, J.A., G. Schlenstedt, D.M. Evanchuk, J.R. Geiser, M.A. Hoyt, and P.A. Silver. 1998. The yeast dynactin complex is involved in partitioning the mitotic spindle between mother and daughter cells during anaphase B. *Mol Biol Cell*. 9:1741-56.

Kaksonen, M., Y. Sun, and D.G. Drubin. 2003. A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell*. 115:475-87.

Kaksonen, M., C.P. Toret, and D.G. Drubin. 2005. A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell*. 123:305-20.

Kamasaki, T., R. Arai, M. Osumi, and I. Mabuchi. 2005. Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle. *Nat Cell Biol*. 7:916-7.

Karakesisoglou, I., Y. Yang, and E. Fuchs. 2000. An epidermal plakin that integrates actin and microtubule networks at cellular junctions. *J Cell Biol*. 149:195-208.

Karsenti, E., and I. Vernos. 2001. The mitotic spindle: a self-made machine. *Science*. 294:543-7.

Kato, C., K. Miyazaki, A. Nakagawa, M. Ohira, Y. Nakamura, T. Ozaki, T. Imai, and A. Nakagawara. 2004. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *Int J Cancer*. 112:365-75.

Kikyo, M., K. Tanaka, T. Kamei, K. Ozaki, T. Fujiwara, E. Inoue, Y. Takita, Y. Ohya, and Y. Takai. 1999. An FH domain-containing Bnr1p is a multifunctional protein interacting with a variety of cytoskeletal proteins in Saccharomyces cerevisiae. *Oncogene*. 18:7046-54.

Kilmartin, J.V., and A.E. Adams. 1984. Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast Saccharomyces. *J Cell Biol*. 98:922-33.

King, S.M. 2000. The dynein microtubule motor. *Biochim Biophys Acta*. 1496:60-75.

Kinzler, K.W., and B. Vogelstein. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 87:159-70.

Knop, M., G. Pereira, S. Geissler, K. Grein, and E. Schiebel. 1997. The spindle pole body component Spc97p interacts with the gamma-tubulin of Saccharomyces cerevisiae and functions in microtubule organization and spindle pole body duplication. *Embo J*. 16:1550-64.

Knop, M., and E. Schiebel. 1997. Spc98p and Spc97p of the yeast gamma-tubulin complex mediate binding to the spindle pole body via their interaction with Spc110p. *Embo J*. 16:6985-95.

Kodama, A., I. Karakesisoglou, E. Wong, A. Vaezi, and E. Fuchs. 2003. ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell*. 115:343-54.

Komarova, Y., G. Lansbergen, N. Galjart, F. Grosveld, G.G. Borisy, and A. Akhmanova. 2005. EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules. *Mol Biol Cell*. 16:5334-45.

Korinek, W.S., M.J. Copeland, A. Chaudhuri, and J. Chant. 2000. Molecular linkage underlying microtubule orientation toward cortical sites in yeast. *Science*. 287:2257-9.

Kormanec, J., I. Schaaff-Gerstenschlager, F.K. Zimmermann, D. Perecko, and H. Kuntzel. 1991. Nuclear migration in Saccharomyces cerevisiae is controlled by the highly repetitive 313 kDa NUM1 protein. *Mol Gen Genet*. 230:277-87.

Krogan, N.J., G. Cagney, H. Yu, G. Zhong, X. Guo, A. Ignatchenko, J. Li, S. Pu, N. Datta, A.P. Tikuisis, T. Punna, J.M. Peregrin-Alvarez, M. Shales, X. Zhang, M. Davey, M.D. Robinson, A. Paccanaro, J.E. Bray, A. Sheung, B. Beattie, D.P. Richards, V. Canadien, A. Lalev, F. Mena, P. Wong, A. Starostine, M.M. Canete, J. Vlasblom, S. Wu, C. Orsi, S.R. Collins, S. Chandran, R. Haw, J.J. Rilstone, K. Gandi, N.J. Thompson, G. Musso, P. St Onge, S. Ghanny, M.H. Lam, G. Butland, A.M. Altaf-Ul, S. Kanaya, A. Shilatifard, E. O'Shea, J.S. Weissman, C.J. Ingles, T.R. Hughes, J.

Parkinson, M. Gerstein, S.J. Wodak, A. Emili, and J.F. Greenblatt. 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Nature*. 440:637-43.

Kurokawa, K., T. Nakamura, K. Aoki, and M. Matsuda. 2005. Mechanism and role of localized activation of Rho-family GTPases in growth factor-stimulated fibroblasts and neuronal cells. *Biochem Soc Trans*. 33:631-4.

Kurzchalia, T.V., and R.G. Parton. 1999. Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol*. 11:424-31.

Lafanechere, L., C. Courtay-Cahen, T. Kawakami, M. Jacrot, M. Rudiger, J. Wehland, D. Job, and R.L. Margolis. 1998. Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *J Cell Sci*. 111 (Pt 2):171-81.

Lansbergen, G., I. Grigoriev, Y. Mimori-Kiyosue, T. Ohtsuka, S. Higa, I. Kitajima, J. Demmers, N. Galjart, A.B. Houtsmuller, F. Grosveld, and A. Akhmanova. 2006. CLASPs attach microtubule plus ends to the cell cortex through a complex with LL5beta. *Dev Cell*. 11:21-32.

Lansbergen, G., Y. Komarova, M. Modesti, C. Wyman, C.C. Hoogenraad, H.V. Goodson, R.P. Lemaitre, D.N. Drechsel, E. van Munster, T.W. Gadella, Jr., F. Grosveld, N. Galjart, G.G. Borisy, and A. Akhmanova. 2004. Conformational changes in CLIP-170 regulate its binding to microtubules and dynactin localization. *J Cell Biol*. 166:1003-14.

Lantz, V.A., and K.G. Miller. 1998. A class VI unconventional myosin is associated with a homologue of a microtubule-binding protein, cytoplasmic linker protein-170, in neurons and at the posterior pole of Drosophila embryos. *J Cell Biol*. 140:897-910.

Larcher, J.C., D. Boucher, S. Lazereg, F. Gros, and P. Denoulet. 1996. Interaction of kinesin motor domains with alpha- and beta-tubulin subunits at a tau-independent binding site. Regulation by polyglutamylation. *J Biol Chem*. 271:22117-24.

Lawrence, C.J., R.K. Dawe, K.R. Christie, D.W. Cleveland, S.C. Dawson, S.A. Endow, L.S. Goldstein, H.V. Goodson, N. Hirokawa, J. Howard, R.L. Malmberg, J.R. McIntosh, H. Miki, T.J. Mitchison, Y. Okada, A.S. Reddy, W.M. Saxton, M. Schliwa, J.M. Scholey, R.D. Vale, C.E. Walczak, and L. Wordeman. 2004. A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol*. 167:19-22.

Lee, H., U. Engel, J. Rusch, S. Scherrer, K. Sheard, and D. Van Vactor. 2004. The microtubule plus end tracking protein Orbit/MAST/CLASP acts downstream of the tyrosine kinase Abl in mediating axon guidance. *Neuron*. 42:913-26.

Lee, L., J.S. Tirnauer, J. Li, S.C. Schuyler, J.Y. Liu, and D. Pellman. 2000. Positioning of the mitotic spindle by a cortical-microtubule capture mechanism. *Science*. 287:2260-2.

Lee, W.L., J.R. Oberle, and J.A. Cooper. 2003. The role of the lissencephaly protein Pac1 during nuclear migration in budding yeast. *J Cell Biol*. 160:355-64.

Leevers, S.J., D. Weinkove, L.K. MacDougall, E. Hafen, and M.D. Waterfield. 1996. The Drosophila phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. *Embo J*. 15:6584-94.

Li, J., W.L. Lee, and J.A. Cooper. 2005. NudEL targets dynein to microtubule ends through LIS1. *Nat Cell Biol*. 7:686-90.

Li, Y.Y., E. Yeh, T. Hays, and K. Bloom. 1993. Disruption of mitotic spindle orientation in a yeast dynein mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:10096-100.

Liakopoulos, D., J. Kusch, S. Grava, J. Vogel, and Y. Barral. 2003. Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment. *Cell*. 112:561-74.

Ligon, L.A., S.S. Shelly, M. Tokito, and E.L. Holzbaur. 2003. The microtubule plus-end proteins EB1 and dynactin have differential effects on microtubule polymerization. *Mol Biol Cell*. 14:1405-17.

Lin, H., P. de Carvalho, D. Kho, C.Y. Tai, P. Pierre, G.R. Fink, and D. Pellman. 2001. Polyploids require Bik1 for kinetochore-microtubule attachment. *J Cell Biol*. 155:1173-84.

Llanos, R., V. Chevrier, M. Ronjat, P. Meurer-Grob, P. Martinez, R. Frank, M. Bornens, R.H. Wade, J. Wehland, and D. Job. 1999. Tubulin binding sites on gamma-tubulin: identification and molecular characterization. *Biochemistry*. 38:15712-20.

Lopez-Bendito, G., and Z. Molnar. 2003. Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nat Rev Neurosci*. 4:276-89.

Lord, M., F. Inose, T. Hiroko, T. Hata, A. Fujita, and J. Chant. 2002. Subcellular localization of Axl1, the cell type-specific regulator of polarity. *Curr Biol*. 12:1347-52.

Lowe, J., H. Li, K.H. Downing, and E. Nogales. 2001. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 A resolution. *J Mol Biol*. 313:1045-57.

Lu, B., F. Roegiers, L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 2001. Adherens junctions inhibit asymmetric division in the Drosophila epithelium. *Nature*. 409:522-5.

Maddox, P.S., J.K. Stemple, L. Satterwhite, E.D. Salmon, and K. Bloom. 2003. The minus end-directed motor Kar3 is required for coupling dynamic microtubule plus ends to the cortical shmoo tip in budding yeast. *Curr Biol*. 13:1423-8.

Maekawa, H., and E. Schiebel. 2004. Cdk1-Clb4 controls the interaction of astral microtubule plus ends with subdomains of the daughter cell cortex. *Genes Dev*. 18:1709-24.

Maekawa, H., T. Usui, M. Knop, and E. Schiebel. 2003. Yeast Cdk1 translocates to the plus end of cytoplasmic microtubules to regulate bud cortex interactions. *Embo J*. 22:438-49.

Maiato, H., E.A. Fairley, C.L. Rieder, J.R. Swedlow, C.E. Sunkel, and W.C. Earnshaw. 2003. Human CLASP1 is an outer kinetochore component that regulates spindle microtubule dynamics. *Cell*. 113:891-904.

Maiato, H., C.L. Rieder, and A. Khodjakov. 2004. Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *J Cell Biol*. 167:831-40.

Maiato, H., P. Sampaio, C.L. Lemos, J. Findlay, M. Carmena, W.C. Earnshaw, and C.E. Sunkel. 2002. MAST/Orbit has a role in microtubule-kinetochore attachment and is essential for chromosome alignment and maintenance of spindle bipolarity. *J Cell Biol*. 157:749-60.

Margolis, R.L. 2005. Tetraploidy and tumor development. *Cancer Cell*. 8:353-4.

Margolis, R.L., and L. Wilson. 1981. Microtubule treadmills--possible molecular machinery. *Nature*. 293:705-11.

Marschall, L.G., R.L. Jeng, J. Mulholland, and T. Stearns. 1996. Analysis of Tub4p, a yeast gamma-tubulin-like protein: implications for microtubule-organizing center function. *J Cell Biol*. 134:443-54.

Mathe, E., Y.H. Inoue, W. Palframan, G. Brown, and D.M. Glover. 2003. Orbit/Mast, the CLASP orthologue of Drosophila, is required for asymmetric stem cell and cystocyte divisions and development of the polarised microtubule network that interconnects oocyte and nurse cells during oogenesis. *Development*. 130:901-15.

Meneghini, M.D., M. Wu, and H.D. Madhani. 2003. Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell*. 112:725-36.

Mennella, T.A., L.G. Klinkenberg, and R.S. Zitomer. 2003. Recruitment of Tup1-Ssn6 by yeast hypoxic genes and chromatin-independent exclusion of TATA binding protein. *Eukaryot Cell*. 2:1288-303.

Merdes, A., and J. De Mey. 1990. The mechanism of kinetochore-spindle attachment and polewards movement analyzed in PtK2 cells at the prophase-prometaphase transition. *Eur J Cell Biol*. 53:313-25.

Mialhe, A., L. Lafanechere, I. Treilleux, N. Peloux, C. Dumontet, A. Bremond, M.H. Panh, R. Payan, J. Wehland, R.L. Margolis, and D. Job. 2001. Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. *Cancer Res*. 61:5024-7.

Miki, H., Y. Okada, and N. Hirokawa. 2005. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol*. 15:467-76.

Mimori-Kiyosue, Y., I. Grigoriev, G. Lansbergen, H. Sasaki, C. Matsui, F. Severin, N. Galjart, F. Grosveld, I. Vorobjev, S. Tsukita, and A. Akhmanova. 2005. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *J Cell Biol*. 168:141-53.

Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, and S. Tsukita. 2000. Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells. *J Cell Biol*. 148:505-18.

Misu, K., K. Fujimura-Kamada, T. Ueda, A. Nakano, H. Katoh, and K. Tanaka. 2003. Cdc50p, a conserved endosomal membrane protein, controls polarized growth in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell*. 14:730-47.

Mitchison, T., and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 312:237-42.

Moens, P.B., and E. Rapport. 1971. Spindles, spindle plaques, and meiosis in the yeast Saccharomyces cerevisiae (Hansen). *J Cell Biol*. 50:344-61.

Molk, J.N., E.D. Salmon, and K. Bloom. 2006. Nuclear congression is driven by cytoplasmic microtubule plus end interactions in S. cerevisiae. *J Cell Biol*. 172:27-39.

Moseley, J.B., and B.L. Goode. 2006. The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev*. 70:605-45.

Murofushi, H. 1980. Purification and characterization of tubulin-tyrosine ligase from porcine brain. *J Biochem (Tokyo)*. 87:979-84.

Nagase, H., and Y. Nakamura. 1993. Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum Mutat*. 2:425-34.

Nakanishi-Shindo, Y., K. Nakayama, A. Tanaka, Y. Toda, and Y. Jigami. 1993. Structure of the N-linked oligosaccharides that show the complete loss of alpha-1,6-polymannose outer chain from och1, och1 mnn1, and och1 mnn1 alg3 mutants of Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem*. 268:26338-45.

Nathke, I.S., C.L. Adams, P. Polakis, J.H. Sellin, and W.J. Nelson. 1996. The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J Cell Biol*. 134:165-79.

Neff, N.F., J.H. Thomas, P. Grisafi, and D. Botstein. 1983. Isolation of the beta-tubulin gene from yeast and demonstration of its essential function in vivo. *Cell*. 33:211-9.

Newpher, T.M., R.P. Smith, V. Lemmon, and S.K. Lemmon. 2005. In vivo dynamics of clathrin and its adaptor-dependent recruitment to the actin-based endocytic machinery in yeast. *Dev Cell*. 9:87-98.

Nguyen, T., D.B. Vinh, D.K. Crawford, and T.N. Davis. 1998. A genetic analysis of interactions with Spc110p reveals distinct functions of Spc97p and Spc98p, components of the yeast gamma-tubulin complex. *Mol Biol Cell*. 9:2201-16.

Novick, P., and D. Botstein. 1985. Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants. *Cell*. 40:405-16.

O'Toole, E.T., M. Winey, and J.R. McIntosh. 1999. High-voltage electron tomography of spindle pole bodies and early mitotic spindles in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell*. 10:2017-31.

Oakley, B.R., C.E. Oakley, Y. Yoon, and M.K. Jung. 1990. Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in Aspergillus nidulans. *Cell*. 61:1289-301.

Osmond, B.C., C.A. Specht, and P.W. Robbins. 1999. Chitin synthase III: synthetic lethal mutants and "stress related" chitin synthesis that bypasses the CSD3/CHS6 localization pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:11206-10.

Ozols, J., and J.M. Caron. 1997. Posttranslational modification of tubulin by palmitoylation: II. Identification of sites of palmitoylation. *Mol Biol Cell*. 8:637-45.

Palazzo, A.F., T.A. Cook, A.S. Alberts, and G.G. Gundersen. 2001. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol*. 3:723-9.

Palmer, R.E., M. Koval, and D. Koshland. 1989. The dynamics of chromosome movement in the budding yeast Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol*. 109:3355-66.

Palmer, R.E., D.S. Sullivan, T. Huffaker, and D. Koshland. 1992. Role of astral microtubules and actin in spindle orientation and migration in the budding yeast, Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol*. 119:583-93.

Papamichos-Chronakis, M., R.S. Conlan, N. Gounalaki, T. Copf, and D. Tzamarias. 2000. Hrs1/Med3 is a Cyc8-Tup1 corepressor target in the RNA polymerase II holoenzyme. *J Biol Chem*. 275:8397-403.

Papamichos-Chronakis, M., T. Petrakis, E. Ktistaki, I. Topalidou, and D. Tzamarias. 2002. Cti6, a PHD domain protein, bridges the Cyc8-Tup1 corepressor and the SAGA coactivator to overcome repression at GAL1. *Mol Cell*. 9:1297-305.

Paschal, B.M., E.L. Holzbaur, K.K. Pfister, S. Clark, D.I. Meyer, and R.B. Vallee. 1993. Characterization of a 50-kDa polypeptide in cytoplasmic dynein preparations reveals a complex with p150GLUED and a novel actin. *J Biol Chem*. 268:15318-23.

Paschal, B.M., S.M. King, A.G. Moss, C.A. Collins, R.B. Vallee, and G.B. Witman. 1987. Isolated flagellar outer arm dynein translocates brain microtubules in vitro. *Nature*. 330:672-4.

Paschal, B.M., A. Mikami, K.K. Pfister, and R.B. Vallee. 1992. Homology of the 74-kD cytoplasmic dynein subunit with a flagellar dynein polypeptide suggests an intracellular targeting function. *J Cell Biol*. 118:1133-43.

Paturle-Lafanechere, L., B. Edde, P. Denoulet, A. Van Dorsselaer, H. Mazarguil, J.P. Le Caer, J. Wehland, and D. Job. 1991. Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry*. 30:10523-8.

Paturle, L., J. Wehland, R.L. Margolis, and D. Job. 1989. Complete separation of tyrosinated, detyrosinated, and nontyrosinatable brain tubulin subpopulations using affinity chromatography. *Biochemistry*. 28:2698-704.

Pellman, D., M. Bagget, Y.H. Tu, G.R. Fink, and H. Tu. 1995. Two microtubule-associated proteins required for anaphase spindle movement in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol*. 130:1373-85.

Pereira, G., T.U. Tanaka, K. Nasmyth, and E. Schiebel. 2001. Modes of spindle pole body inheritance and segregation of the Bfa1p-Bub2p checkpoint protein complex. *Embo J*. 20:6359-70.

Perez, F., G.S. Diamantopoulos, R. Stalder, and T.E. Kreis. 1999. CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell*. 96:517-27.

Perez, F., K. Pernet-Gallay, C. Nizak, H.V. Goodson, T.E. Kreis, and B. Goud. 2002. CLIPR-59, a new trans-Golgi/TGN cytoplasmic linker protein belonging to the CLIP-170 family. *J Cell Biol*. 156:631-42.

Peris, L., M. Thery, J. Faure, Y. Saoudi, L. Lafanechere, J.K. Chilton, P. Gordon-Weeks, N. Galjart, M. Bornens, L. Wordeman, J. Wehland, A. Andrieux, and D. Job. 2006. Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol*. 174:839-49.

Pierre, P., J. Scheel, J.E. Rickard, and T.E. Kreis. 1992. CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell*. 70:887-900.

Pringle J.R., J.R. Broach, and E.W. Jones. 1997. The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Pruyne, D., A. Legesse-Miller, L. Gao, Y. Dong, and A. Bretscher. 2004. Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:559-91.

Ptacek, J., G. Devgan, G. Michaud, H. Zhu, X. Zhu, J. Fasolo, H. Guo, G. Jona, A. Breitkreutz, R. Sopko, R.R. McCartney, M.C. Schmidt, N. Rachidi, S.J. Lee, A.S. Mah, L. Meng, M.J. Stark, D.F. Stern, C. De Virgilio, M. Tyers, B. Andrews, M. Gerstein, B. Schweitzer, P.F. Predki, and M. Snyder. 2005. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*. 438:679-84.

Qadota, H., C.P. Python, S.B. Inoue, M. Arisawa, Y. Anraku, Y. Zheng, T. Watanabe, D.E. Levin, and Y. Ohya. 1996. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science*. 272:279-81.

Quintyne, N.J., S.R. Gill, D.M. Eckley, C.L. Crego, D.A. Compton, and T.A. Schroer. 1999. Dynactin is required for microtubule anchoring at centrosomes. *J Cell Biol*. 147:321-34.

Raybin, D., and M. Flavin. 1975. An enzyme tyrosylating alpha-tubulin and its role in microtubule assembly. *Biochem Biophys Res Commun*. 65:1088-95.

Reed, N.A., D. Cai, T.L. Blasius, G.T. Jih, E. Meyhofer, J. Gaertig, and K.J. Verhey. 2006. Microtubule acetylation promotes Kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol*. 16:2166-72.

Regnard, C., E. Desbruyeres, P. Denoulet, and B. Edde. 1999. Tubulin polyglutamylase: isozymic variants and regulation during the cell cycle in HeLa cells. *J Cell Sci*. 112 (Pt 23):4281-9.

Reinsch, S., and P. Gonczy. 1998. Mechanisms of nuclear positioning. *J Cell Sci*. 111 (Pt 16):2283-95.

Reinsch, S., and E. Karsenti. 1997. Movement of nuclei along microtubules in Xenopus egg extracts. *Curr Biol*. 7:211-4.

Rickard, J.E., and T.E. Kreis. 1990. Identification of a novel nucleotide-sensitive microtubule-binding protein in HeLa cells. *J Cell Biol*. 110:1623-33.

Rickard, J.E., and T.E. Kreis. 1991. Binding of pp170 to microtubules is regulated by phosphorylation. *J Biol Chem*. 266:17597-605.

Riehemann, K., and C. Sorg. 1993. Sequence homologies between four cytoskeleton-associated proteins. *Trends Biochem Sci*. 18:82-3.

Robinow, C.F., and J. Marak. 1966. A fiber apparatus in the nucleus of the yeast cell. *J Cell Biol*. 29:129-51.

Rodal, A.A., L. Kozubowski, B.L. Goode, D.G. Drubin, and J.H. Hartwig. 2005. Actin and septin ultrastructures at the budding yeast cell cortex. *Mol Biol Cell*. 16:372-84.

Rodriguez, O.C., A.W. Schaefer, C.A. Mandato, P. Forscher, W.M. Bement, and C.M. Waterman-Storer. 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol*. 5:599-609.

Roof, D.M., P.B. Meluh, and M.D. Rose. 1992. Kinesin-related proteins required for assembly of the mitotic spindle. *J Cell Biol*. 118:95-108.

Sagot, I., S.K. Klee, and D. Pellman. 2002a. Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat Cell Biol*. 4:42-50.

Sagot, I., A.A. Rodal, J. Moseley, B.L. Goode, and D. Pellman. 2002b. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol*. 4:626-31.

Salina, D., K. Bodoor, D.M. Eckley, T.A. Schroer, J.B. Rattner, and B. Burke. 2002. Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown. *Cell*. 108:97-107.

Sandblad, L., K.E. Busch, P. Tittmann, H. Gross, D. Brunner, and A. Hoenger. 2006. The Schizosaccharomyces pombe EB1 homolog Mal3p binds and stabilizes the microtubule lattice seam. *Cell*. 127:1415-24.

Schatz, P.J., L. Pillus, P. Grisafi, F. Solomon, and D. Botstein. 1986a. Two functional alpha-tubulin genes of the yeast Saccharomyces cerevisiae encode divergent proteins. *Mol Cell Biol*. 6:3711-21.

Schatz, P.J., F. Solomon, and D. Botstein. 1986b. Genetically essential and nonessential alpha-tubulin genes specify functionally interchangeable proteins. *Mol Cell Biol*. 6:3722-33.

Scheel, J., P. Pierre, J.E. Rickard, G.S. Diamantopoulos, C. Valetti, F.G. van der Goot, M. Haner, U. Aebi, and T.E. Kreis. 1999. Purification and analysis of authentic CLIP-170 and recombinant fragments. *J Biol Chem*. 274:25883-91.

Schliwa, M., and G. Woehlke. 2003. Molecular motors. *Nature*. 422:759-65.

Schmidt, A., M. Bickle, T. Beck, and M.N. Hall. 1997. The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell*. 88:531-42.

Schott, D.H., R.N. Collins, and A. Bretscher. 2002. Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin-V lever arm length. *J Cell Biol*. 156:35-9.

Schroder, H.C., J. Wehland, and K. Weber. 1985. Purification of brain tubulin-tyrosine ligase by biochemical and immunological methods. *J Cell Biol*. 100:276-81.

Schroer, T.A. 2004. Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:759-79.

Schroer, T.A., and M.P. Sheetz. 1991. Two activators of microtubule-based vesicle transport. *J Cell Biol*. 115:1309-18.

Schwartz, K., K. Richards, and D. Botstein. 1997. BIM1 encodes a microtubule-binding protein in yeast. *Mol Biol Cell*. 8:2677-91.

Sekiya-Kawasaki, M., M. Abe, A. Saka, D. Watanabe, K. Kono, M. Minemura-Asakawa, S. Ishihara, T. Watanabe, and Y. Ohya. 2002. Dissection of upstream regulatory components of the Rho1p effector, 1,3-beta-glucan synthase, in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*. 162:663-76.

Shaw, J.A., P.C. Mol, B. Bowers, S.J. Silverman, M.H. Valdivieso, A. Duran, and E. Cabib. 1991. The function of chitin synthases 2 and 3 in the Saccharomyces cerevisiae cell cycle. *J Cell Biol*. 114:111-23.

Sheeman, B., P. Carvalho, I. Sagot, J. Geiser, D. Kho, M.A. Hoyt, and D. Pellman. 2003. Determinants of S. cerevisiae dynein localization and activation: implications for the mechanism of spindle positioning. *Curr Biol*. 13:364-72.

Sheu, Y.J., B. Santos, N. Fortin, C. Costigan, and M. Snyder. 1998. Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol Cell Biol*. 18:4053-69.

Skop, A.R., and J.G. White. 1998. The dynactin complex is required for cleavage plane specification in early Caenorhabditis elegans embryos. *Curr Biol*. 8:1110-6.

Smith, D.S., M. Niethammer, R. Ayala, Y. Zhou, M.J. Gambello, A. Wynshaw-Boris, and L.H. Tsai. 2000. Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat Cell Biol*. 2:767-75.

Smith, R.L., and A.D. Johnson. 2000. Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem Sci*. 25:325-30.

Sobel, S.G., and M. Snyder. 1995. A highly divergent gamma-tubulin gene is essential for cell growth and proper microtubule organization in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol*. 131:1775-88.

Spang, A., S. Geissler, K. Grein, and E. Schiebel. 1996. gamma-Tubulin-like Tub4p of Saccharomyces cerevisiae is associated with the spindle pole body substructures that organize microtubules and is required for mitotic spindle formation. *J Cell Biol*. 134:429-41.

Sproul, L.R., D.J. Anderson, A.T. Mackey, W.S. Saunders, and S.P. Gilbert. 2005. Cik1 targets the minus-end kinesin depolymerase kar3 to microtubule plus ends. *Curr Biol*. 15:1420-7.

Stack, J.H., D.B. DeWald, K. Takegawa, and S.D. Emr. 1995. Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 PtdIns 3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. *J Cell Biol*. 129:321-34.

Stack, J.H., P.K. Herman, P.V. Schu, and S.D. Emr. 1993. A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *Embo J*. 12:2195-204.

Steffen, W., S. Karki, K.T. Vaughan, R.B. Vallee, E.L. Holzbaur, D.G. Weiss, and S.A. Kuznetsov. 1997. The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of Xenopus oocytes. *Mol Biol Cell*. 8:2077-88.

Stolz, J., and S. Munro. 2002. The components of the Saccharomyces cerevisiae mannosyltransferase complex M-Pol I have distinct functions in mannan synthesis. *J Biol Chem*. 277:44801-8.

Strawn, L.A., and H.L. True. 2006. Deletion of RNQ1 gene reveals novel functional relationship between divergently transcribed Bik1p/CLIP-170 and Sfi1p in spindle pole body separation. *Curr Genet*.

Strickland, L.I., Y. Wen, G.G. Gundersen, and D.R. Burgess. 2005. Interaction between EB1 and p150glued is required for anaphase astral microtubule elongation and stimulation of cytokinesis. *Curr Biol*. 15:2249-55.

Su, L.K., M. Burrell, D.E. Hill, J. Gyuris, R. Brent, R. Wiltshire, J. Trent, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 1995. APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res*. 55:2972-7.

Sullivan, D.S., and T.C. Huffaker. 1992. Astral microtubules are not required for anaphase B in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol*. 119:379-88.

Sun, D., C.L. Leung, and R.K. Liem. 2001. Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins. *J Cell Sci*. 114:161-172.

Suzuki, M., R. Igarashi, M. Sekiya, T. Utsugi, S. Morishita, M. Yukawa, and Y. Ohya. 2004. Dynactin is involved in a checkpoint to monitor cell wall synthesis in Saccharomyces cerevisiae. *Nat Cell Biol*. 6:861-71.

Swaroop, A., M. Swaroop, and A. Garen. 1987. Sequence analysis of the complete cDNA and encoded polypeptide for the Glued gene of Drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:6501-5.

Thazhath, R., C. Liu, and J. Gaertig. 2002. Polyglycylation domain of beta-tubulin maintains axonemal architecture and affects cytokinesis in Tetrahymena. *Nat Cell Biol*. 4:256-9.

Thery, M., and M. Bornens. 2006. Cell shape and cell division. *Curr Opin Cell Biol*. 18:648-57.

Thery, M., V. Racine, A. Pepin, M. Piel, Y. Chen, J.B. Sibarita, and M. Bornens. 2005. The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol*. 7:947-53.

Thuriaux, P. 2004. La Levure. Belin, Paris. 268 pp.

Tirnauer, J.S., J.C. Canman, E.D. Salmon, and T.J. Mitchison. 2002. EB1 targets to kinetochores with attached, polymerizing microtubules. *Mol Biol Cell*. 13:4308-16.

Tirnauer, J.S., E. O'Toole, L. Berrueta, B.E. Bierer, and D. Pellman. 1999. Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules. *J Cell Biol*. 145:993-1007.

Tong, A.H., M. Evangelista, A.B. Parsons, H. Xu, G.D. Bader, N. Page, M. Robinson, S. Raghibizadeh, C.W. Hogue, H. Bussey, B. Andrews, M. Tyers, and C. Boone. 2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science*. 294:2364-8.

Tong, A.H., G. Lesage, G.D. Bader, H. Ding, H. Xu, X. Xin, J. Young, G.F. Berriz, R.L. Brost, M. Chang, Y. Chen, X. Cheng, G. Chua, H. Friesen, D.S. Goldberg, J. Haynes, C. Humphries, G. He, S. Hussein, L. Ke, N. Krogan, Z. Li, J.N. Levinson, H. Lu, P. Menard, C. Munyana, A.B. Parsons, O. Ryan, R. Tonikian, T. Roberts, A.M. Sdicu, J. Shapiro, B. Sheikh, B. Suter, S.L. Wong, L.V. Zhang, H. Zhu, C.G. Burd, S. Munro, C. Sander, J. Rine, J. Greenblatt, M. Peter, A. Bretscher, G. Bell, F.P. Roth, G.W. Brown, B. Andrews, H. Bussey, and C. Boone. 2004. Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science*. 303:808-13.

Tsou, M.F., W. Ku, A. Hayashi, and L.S. Rose. 2003. PAR-dependent and geometry-dependent mechanisms of spindle positioning. *J Cell Biol*. 160:845-55.

Tytell, J.D., and P.K. Sorger. 2006. Analysis of kinesin motor function at budding yeast kinetochores. *J Cell Biol*. 172:861-74.

Utsugi, T., M. Minemura, A. Hirata, M. Abe, D. Watanabe, and Y. Ohya. 2002. Movement of yeast 1,3-beta-glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. *Genes Cells*. 7:1-9.

Vaisberg, E.A., M.P. Koonce, and J.R. McIntosh. 1993. Cytoplasmic dynein plays a role in mammalian mitotic spindle formation. *J Cell Biol*. 123:849-58.

Valetti, C., D.M. Wetzel, M. Schrader, M.J. Hasbani, S.R. Gill, T.E. Kreis, and T.A. Schroer. 1999. Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol Biol Cell*. 10:4107-20.

Vallee, R.B., J.S. Wall, B.M. Paschal, and H.S. Shpetner. 1988. Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. *Nature*. 332:561-3.

Vaughan, K.T., S.H. Tynan, N.E. Faulkner, C.J. Echeverri, and R.B. Vallee. 1999. Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. *J Cell Sci*. 112 (Pt 10):1437-47.

Vaughan, P.S., P. Miura, M. Henderson, B. Byrne, and K.T. Vaughan. 2002. A role for regulated binding of p150(Glued) to microtubule plus ends in organelle transport. *J Cell Biol*. 158:305-19.

Vinh, D.B., J.W. Kern, W.O. Hancock, J. Howard, and T.N. Davis. 2002. Reconstitution and characterization of budding yeast gamma-tubulin complex. *Mol Biol Cell*. 13:1144-57.

Waddle, J.A., T.S. Karpova, R.H. Waterston, and J.A. Cooper. 1996. Movement of cortical actin patches in yeast. *J Cell Biol*. 132:861-70.

Watanabe, T., J. Noritake, and K. Kaibuchi. 2005. Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol*. 15:76-83.

Waterman-Storer, C.M., S. Karki, and E.L. Holzbaur. 1995. The p150Glued component of the dynactin complex binds to both microtubules and the actin-related protein centractin (Arp-1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:1634-8.

Webster, D.R., G.G. Gundersen, J.C. Bulinski, and G.G. Borisy. 1987. Assembly and turnover of detyrosinated tubulin in vivo. *J Cell Biol*. 105:265-76.

Webster, D.R., J. Wehland, K. Weber, and G.G. Borisy. 1990. Detyrosination of alpha tubulin does not stabilize microtubules in vivo. *J Cell Biol*. 111:113-22.

Wehland, J., and K. Weber. 1987a. Tubulin-tyrosine ligase has a binding site on beta-tubulin: a two-domain structure of the enzyme. *J Cell Biol*. 104:1059-67.

Wehland, J., and K. Weber. 1987b. Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of alpha-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. *J Cell Sci*. 88 (Pt 2):185-203.

Weinstein, B., and F. Solomon. 1990. Phenotypic consequences of tubulin overproduction in Saccharomyces cerevisiae: differences between alpha-tubulin and beta-tubulin. *Mol Cell Biol*. 10:5295-304.

Weisman, L.S. 2003. Yeast vacuole inheritance and dynamics. *Annu Rev Genet*. 37:435-60.

Wen, Y., C.H. Eng, J. Schmoranzer, N. Cabrera-Poch, E.J. Morris, M. Chen, B.J. Wallar, A.S. Alberts, and G.G. Gundersen. 2004. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol*. 6:820-30.

Westermann, S., A. Avila-Sakar, H.W. Wang, H. Niederstrasser, J. Wong, D.G. Drubin, E. Nogales, and G. Barnes. 2005. Formation of a dynamic kinetochore- microtubule interface through assembly of the Dam1 ring complex. *Mol Cell*. 17:277-90.

Westermann, S., H.W. Wang, A. Avila-Sakar, D.G. Drubin, E. Nogales, and G. Barnes. 2006. The Dam1 kinetochore ring complex moves processively on depolymerizing microtubule ends. *Nature*. 440:565-9.

Westermann, S., and K. Weber. 2003. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:938-47.

Wigge, P.A., O.N. Jensen, S. Holmes, S. Soues, M. Mann, and J.V. Kilmartin. 1998. Analysis of the Saccharomyces spindle pole by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *J Cell Biol*. 141:967-77.

Winey, M., C.L. Mamay, E.T. O'Toole, D.N. Mastronarde, T.H. Giddings, Jr., K.L. McDonald, and J.R. McIntosh. 1995. Three-dimensional ultrastructural analysis of the Saccharomyces cerevisiae mitotic spindle. *J Cell Biol*. 129:1601-15.

Wittmann, T., A. Hyman, and A. Desai. 2001. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat Cell Biol*. 3:E28-34.

Wittmann, T., and C.M. Waterman-Storer. 2005. Spatial regulation of CLASP affinity for microtubules by Rac1 and GSK3beta in migrating epithelial cells. *J Cell Biol*. 169:929-39.

Wolyniak, M.J., K. Blake-Hodek, K. Kosco, E. Hwang, L. You, and T.C. Huffaker. 2006. The regulation of microtubule dynamics in Saccharomyces cerevisiae by three interacting plus-end tracking proteins. *Mol Biol Cell*. 17:2789-98.

Wu, X., X. Xiang, and J.A. Hammer, 3rd. 2006. Motor proteins at the microtubule plus-end. *Trends Cell Biol*. 16:135-43.

Wu, X.S., G.L. Tsan, and J.A. Hammer, 3rd. 2005. Melanophilin and myosin Va track the microtubule plus end on EB1. *J Cell Biol*. 171:201-7.

Yamochi, W., K. Tanaka, H. Nonaka, A. Maeda, T. Musha, and Y. Takai. 1994. Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol*. 125:1077-93.

Yin, H., D. Pruyne, T.C. Huffaker, and A. Bretscher. 2000. Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature*. 406:1013-5.

Zadrag, R., M. Kwolek-Mirek, G. Bartosz, and T. Bilinski. 2006. Relationship between the replicative age and cell volume in Saccharomyces cerevisiae. *Acta Biochim Pol*. 53:747-51.

Zahner, J.E., H.A. Harkins, and J.R. Pringle. 1996. Genetic analysis of the bipolar pattern of bud site selection in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol*. 16:1857-70.

Des microtubules détyrosinés : quelles conséquences pour la cellule ?

Les microtubules (MT) sont des structures dynamiques contrôlant divers aspects essentiels de l'architecture cellulaire. En particulier, les bouts plus des MT (bouts +) sont capables d'accumuler des protéines spécifiques jouant un rôle dans le contrôle de la dynamique microtubulaire et dans l'interaction des MT avec le cortex cellulaire. Ces interactions sont notamment décisives pour le positionnement correct du fuseau mitotique. La description des mécanismes permettant l'accumulation de protéines aux bouts + est donc importante pour la compréhension des fonctions microtubulaires.

La tyrosine C-terminale de la tubuline α est cruciale pour l'interaction de protéines à domaine CAP-Gly avec les bouts +. En effet, CLIP-170 et son homologue de *S.cerevisiae* Bik1p se lient moins bien aux bouts + des MT dépourvus de tyrosine C-terminale (MT Glu).

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié les perturbations associées au déficit de liaison de Bik1p aux bouts + des MT Glu dans *S. cerevisiae*.

Les modèles actuels proposent que Bik1p est amenée aux bouts + par son association avec la kinésine Kip2p. La dynéine (Dyn1p) est alors recrutée par Bik1p aux bouts + pour être ciblée vers le cortex. Nous montrons que, dans des levures n'exprimant que de la tubuline détyrosinée (souche *tub1-Glu*), Kip2p et Dyn1p sont correctement associées aux bouts +, malgré le déficit de liaison de Bik1p. Nous proposons que, dans les cellules sauvages, le complexe Kip2p/Bik1p transporte Dyn1p le long des MT vers les bouts +. Kip2, Bik1p et Dyn1p s'associent alors aux bouts + de façon indépendante.

De plus, nous montrons que des formes constitutionnellement actives de la petite protéine G Rho1p favorisent l'association de Bik1p avec les bouts +. Ces données seront importantes pour comprendre le rôle des Rho GTPases dans la régulation des MT, notamment dans la migration cellulaire.

L'ensemble de ce travail suggère de nouveaux modèles pour la formation et la fonction des complexes protéiques associés aux bouts +.

Finalement, nous avons recherché de manière systématique les mutations qui, associées avec la mutation *tub1-Glu*, sont létales chez la levure (létalité synthétique). Ce crible a identifié des composants participant à la formation de la membrane et de la paroi cellulaire. Ces gènes pourraient être impliqués, au niveau cortical, dans la mise en place des interactions des microtubules avec le cortex, et montrent l'importance de la tyrosine C-terminale de la tubuline α dans cette fonction.

Mots-clés : Bik1p, CLIP-170, bouts + des microtubules, tubuline Glu, dynéine, positionnement du fuseau, cortex cellulaire.

Detyrosinated microtubules : what consequences for the cell ?

Microtubules (MT) are dynamic structures involved in different essential processes of cell architecture. Particularly, MT plus ends (+ends) can accumulate specific proteins controlling MT dynamics and MT interaction with the cell cortex. These interactions are implicated in the correct positionning of the mitotic spindle. Description of the mechanisms of protein association with MT +ends is important to understand MT functions.

C-terminal tyrosine of α-tubulin is crucial for the interaction of CAP-Gly domain containing proteins. Indeed, CLIP-170 and its *S. cerevisiae* homolog Bik1p bind less efficiently to MT deleted for the C-terminal tyrosine (Glu MT).

In this work, we studied the consequences of low Bik1p association with Glu MT +ends.

Current models propose that Bik1p is targeted towards MT +ends by the kinesin Kip2p. Dynein (Dyn1p) is, then, recruited by Bik1p at MT +ends and offloaded at the cortex. Here, we show that, in yeast cells expressing only detyrosinated tubulin (*tub1-Glu* strain), Kip2p and Dyn1p are correctly associated with MT +ends, despite the decreased Bik1p binding. We propose that, in wild type cells, the Kip2p/Bik1p complex transports Dyn1p along MT towards MT +ends. Then, Kip2p, Bik1p and Dyn1p track MT +ends independently.

Moreover, we show that constituvely active forms of the small G protein Rho1p favour Bik1p binding to MT +ends. These data will be important to understand the role of Rho GTPases in the regulation of MT, for instance during migration of mammalian cells.

Finally, we systematically searched for mutations that are lethal in combination with the *tub1-Glu* mutation (synthetic lethality). This screen identified components important in the formation of cell membrane and cell wall. These genes could be involved, at the cortex, in the establishment of microtubule-cortex interactions, and could show the importance of the α-tubulin C-terminal tyrosine in this function.

Keywords : Bik1p, CLIP-170, microtubule +end, Glu tubulin, dynein, spindle positionning, cell cortex.