

**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES**  
**LABORATOIRE Centre de Biophysique Moléculaire**

## **THÈSE** présentée par : **Aurélie GOMBAULT**

soutenue le : **20 Mai 2008**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**  
Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie

### **ETUDE DE LA REGULATION D'UNE PROTEINE GAP DE Ras DE LA LEVURE A L'HOMME**

**THÈSE dirigée par :**

**Dr. Hélène BENEDETTI**

CR1, CBM – CNRS UPR4301

**RAPPORTEURS :**

**Dr. Emmanuelle BOY-MARCOTTE**

**Dr. Jean-Vianney BARNIER**

MCU, Université Paris XI – IGM – CNRS UMR 8621

CR1, NBCM – CNRS UPR9040

---

**JURY :**

**Pr. Daniel LOCKER**

**Dr. Bertrand DAGNIER-FORNIER**

**Pr. Christian DAMBLON**

**Dr. Emmanuelle BOY-MARCOTTE**

**Dr. Jean-Vianney BARNIER**

**Dr. Hélène BENEDETTI**

Professeur, Université d'Orléans – CBM– CNRS UPR4301

DR2, IBGC – CNRS UMR5095

Professeur, Université d'Orléans – CBM– CNRS UPR4301

MCU, Université Paris XI – IGM – CNRS UMR 8621

CR1, NBCM – CNRS UPR9040

CR1, CBM – CNRS UPR4301

## REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au Centre de Biophysique Moléculaire au CNRS d'Orléans, dirigé par le Professeur Jean-Claude Beloeil, au sein de l'équipe Signalisation cellulaire et Neurofibromatose dirigée par le Docteur Hélène Bénédicti.

Je voudrais tout d'abord remercier la personne qui m'a encadré pendant ces trois années (ou plutôt trois ans et demi !) de thèse, le docteur Hélène Bénédicti, en qui je suis très reconnaissante. Les mots me manquent pour résumer en quelques lignes ce temps passé au sein de ton équipe. Un grand merci, Hélène, pour m'avoir divulgué ton savoir scientifique, pour ta motivation, ton enthousiasme marseillais, tes « yeux de la foi ». Tu es à mon sens une passionnée et j'espère que tes efforts vont payer. Je dois également te remercier pour tes conseils sur l'orientation scientifique que je choisirais. Tu m'as vraiment accompagné du début à la fin.

Enfin, en plus de ces qualités scientifiques que j'espère reproduire, tu as su accepter une thésarde enceinte !! (oups !) ... alors merci d'avoir fait preuve d'un caractère très humain. Un grand Merci pour tout.

Ensuite, je voudrais adresser toute ma reconnaissance à Jean-Vianney BARNIER et Emmanuelle BOY-MARCOTTE pour avoir accepté de juger ce travail. Mais je dois également vous remercier pour m'avoir accueillie dans vos laboratoires respectifs pour m'apprendre les rudiments de la culture cellulaire ou des Northern Blot. Un grand merci pour les discussions fructueuses et l'aide technique que vous m'avez apporté.

Je voudrais également exprimer ma sincère gratitude envers le Professeur Daniel LOCKER, qui a accepté de faire partie de mon jury de thèse après m'avoir supporté en DEA. Merci CHEF !

Mais je n'oublie pas non plus Martine et Andrée pour les discussions à thèmes variés au milieu des drosophiles.

Je dois également vous remercier pour m'avoir aiguillé dans les enseignements que j'ai dispensés et j'espère avoir été à la hauteur. J'ai pu acquérir un goût prononcé pour l'enseignement et j'espère continuer dans cette voie. Alors un grand merci aux enseignants chercheurs de génétique (Thierry, Arnaud, Martine, Daniel).

Enfin, je voudrais remercier le Professeur Christian Damblon pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

J'adresse ensuite mes plus sincères remerciements au Professeur Tobias Hévor qui nous a accueilli gracieusement dans son laboratoire, nous a laissé un accès au savoir scientifique et technique des membres de son équipe. Un petit salut particulier à Philippe, continue à faire rêver tes collègues à travers tes voyages... Mais également à Martine, Maryvonne et Mélanie. Merci pour tous vos conseils qui ont permis de faire avancer mon travail de thèse.

Enfin, je n'oublierais pas de remercier Françoise Vovelle pour sa collaboration fructueuse : ça a été long mais ça valait le coup !!!

Cependant, je dois avant tout dire un petit mot sur l'équipe Bénédict's. J'ai passé de très bons moments dans cette équipe et travaillé dans la bonne humeur malgré quelques coups de

« gueule » (mais c'est normal). J'espère avoir laissé quelques souvenirs de mon passage (Môrice, Môricette, la tirelire à gros mots, le tampon phosphate filmé par Issa, enfermer Alain R. dans son bureau... j'en ai oublié je pense, non ?). A ma collègue de paillasse, la Béa, avec qui j'ai fait toutes ces bêtises, reste une grande enfant et plein de gros bisous à Tiphaine qui m'a beaucoup écouté pendant les répétitions; la Fab, qui nous fait rigoler avec ces mille milliard de choses à faire (ce serait dommage que tu prennes ta retraite !) et Michel, qui sous ses airs « ronchon » a un grand cœur.

Je dois vous dire un grand merci pour m'avoir aidé à continuer mes manips quand j'étais enceinte. Et surtout ne croyez pas que vous vous débarrasser de moi, je passerais vous voir quand il y aura de bonnes occasions (comme un pot par exemple).

Enfin, je remercie Séverine avec qui je n'ai pas eu le temps de faire beaucoup connaissance.

Je n'oublierais pas non plus les étudiants qui ont été formés par l'équipe : Issa, Yue, Vanessa, Noëlline... Bon vent.

Je ne peux pas oublier le grand nombre de fois où j'ai embêté Hervé pour avoir de l'azote liquide (ou Franck sous condition d'un gâteau) ! Nadège pour ton accueil irréprochable, et la bonne volonté pour nous rendre des petits services (secrets). Un grand merci au service technique (Justo, Martial, Franck, François) et administratif qui répondent toujours rapidement à nos problèmes.

A mes copines de piscine, Céline, Christine, Béa, Hélène je compte sur toi pour motiver les troupes. Une mention spéciale pour Elias et ces repas de gym malgré mon absence irréprochable aux cours de gym...

Enfin, j'ai une pensée pour mon petit groupe de fille : Corinne, Nadège, Marylène, Fab et Béa avec qui j'ai passé beaucoup de temps et de bons moments (repas, picnic, apéro, resto, bavarder, bavarder, bavarder, bavarder...).

Ce travail n'aurait pas pu être possible sans tous les bons moments passés avec ma famille et mes amis qui étaient là pour me changer les idées. A mes petits bouts : Antoine, Jade, Tom, Emma et Zoé que je garde avec plaisir. Mes sœurs et mes beaux-frères qui m'ont toujours soutenus.

A Ludo, mon Chouchou, et à ma plus grande réussite, ma fille Ambre qui m'ont beaucoup aidé à trouver les ressources pour achever ce travail (et surtout qui ont réussi à me supporter).

Merci à tous pour ces trois années passées...

*Cette thèse est dédiée à mes parents,  
qui j'espère sont fiers de leur fille  
d'où ils nous regardent*

# *SOMMAIRE*



<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS ET FORMULES CHIMIQUES</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>11</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>17</b>
<b>1. LA NEUROFIBROMATOSE DE TYPE 1 OU MALADIE DE VON RECKLINGHAUSEN</b> .....	<b>21</b>
1.1. INTRODUCTION.....	21
1.1.1. Historique de la maladie.....	21
1.1.2. Identification du gène responsable de la maladie.....	21
1.1.3. Génétique de la Neurofibromatose de type 1.....	23
1.2. PRESENTATION CLINIQUE DE LA NEUROFIBROMATOSE DE TYPE 1.....	23
1.2.1. Principaux signes cliniques.....	25
1.2.1.1. Taches café au lait (TCL).....	25
1.2.1.2. Les lentignes.....	25
1.2.1.3. Les nodules de Lisch.....	25
1.2.1.4. Tumeurs du système nerveux.....	25
1.2.1.4.1. Tumeurs du système nerveux périphérique.....	25
1.2.1.4.2. Tumeurs du système nerveux central.....	27
1.2.2. Les complications associées à la NF1.....	27
1.2.2.1. Complications neurologiques.....	29
1.2.2.2. Les problèmes orthopédiques.....	29
1.2.2.3. Autres complications.....	31
1.2.3. Evolution des signes cliniques.....	31
1.3. LE GENE CODANT LA PROTEINE NF1.....	31
1.3.1. Organisation du gène NF1.....	31
1.3.2. Expression et régulation du gène NF1.....	33
1.3.2.1. Expression du gène NF1.....	33
1.3.2.2. Régulation du gène NF1.....	35
1.3.3. Mutations du gène NF1.....	37
1.3.4. Corrélation génotypes-phénotypes.....	39
1.3.5. Fonction du gène NF1 : un gène suppresseur de tumeur.....	39
1.3.6. NF1 et la fonction neuronale.....	41
1.3.7. Epissage alternatif.....	43
1.4. LA NEUROFIBROMINE.....	47
1.4.1. Présentation.....	47
1.4.2. Organisation de la protéine.....	47
1.4.2.1. Le domaine GRD.....	47
1.4.2.2. Le domaine Sec-PH.....	49
1.4.2.3. Les domaines CSRD et CTD.....	53
1.4.2.4. Le domaine GBD.....	55
1.4.3. Localisation de la protéine Nf1.....	55
1.4.4. Fonction de la neurofibromine.....	57
1.4.4.1. Rôle régulateur de RAS.....	57
1.4.4.1.1. Le domaine GRD de Nf1 est un inhibiteur de Ras.....	57
1.4.4.1.2. Diminution de l'inhibition de Ras et tumorigénèse.....	59
1.4.4.1.3. Diminution de l'inhibition de Ras et les problèmes cognitifs.....	61
1.4.4.1.4. Régulation de l'activité du domaine GRD.....	63
1.4.4.2. Nf1 et le réarrangement du cytosquelette.....	65
1.4.4.3. Stimulation de l'Adénylate Cyclase.....	69
1.4.5. Régulation de la neurofibromine.....	73
1.4.5.1. Phosphorylation de Nf1.....	73
1.4.5.1.1. Phosphorylation par la PKA.....	73
1.4.5.1.2. Phosphorylation par la PKC.....	75
1.4.5.1.3. Interactions avec NF1 phosphorylée.....	77
1.4.5.2. Ubiquitination de la Nf1.....	79
1.4.5.2.1. Mécanisme général d'action.....	79
1.4.5.2.2. Rôle de l'ubiquitination.....	81
1.4.5.2.3. Nf1 et l'ubiquitination.....	81
1.4.6. Nf1 et les modèles animaux.....	83

1.4.6.1	Le modèle murin.....	83
1.4.6.2	Le modèle drosophile .....	89
<b>2.</b>	<b>LES PROTEINES GAP DE RAS CHEZ LA LEVURE.....</b>	<b>93</b>
2.1.	PRESENTATION .....	93
2.2.	LA VOIE RAS/AMPC/PKA.....	97
2.2.1	Les protéines Ras de levure.....	97
2.2.2	Les régulateurs de Ras.....	99
2.2.2.1	Les facteurs d'échange (GEF) .....	99
2.2.2.2	Les protéines activatrices de l'activité GTPasique (GAP).....	101
2.2.3	L'adénylate cyclase.....	103
2.2.4	La protéine kinase A (PKA) .....	105
2.2.4.1	La sous-unité régulatrice : Bcy1p .....	105
2.2.4.2	Les sous-unités catalytiques.....	107
2.2.4.3	Fonction de la PKA .....	109
2.2.5	Autres acteurs de la voie .....	113
2.2.5.1	Les phosphodiesterases.....	113
2.2.5.2	Les activateurs de la voie.....	113
2.2.5.2.1	Le système Gpr1p/Gpa2p.....	113
2.2.5.2.2	Le glucose .....	117
2.2.5.2.2.	Mise en évidence d'un nouvel activateur .....	119
<b>3.</b>	<b>TFS1P, UN MEMBRE DE LA FAMILLE DES PEBP, AYANT UNE DOUBLE FONCTION ET ASSOCIEE A LA REPONSE GENERALE AU STRESS.....</b>	<b>121</b>
3.1.	CARACTERISTIQUES ET STRUCTURE 3D DE LA PROTEINE TFS1P .....	121
3.1.1	Caractéristiques de Tfs1p.....	121
3.1.2	Modification post-traductionnelles de Tfs1p.....	123
3.1.2.1	Les N-terminal Acétyl Transférases (NATs) .....	123
3.1.2.2	La N-terminal Acétyl Transférase B (Nat B).....	123
3.1.2.3	Importance de l'acétylation .....	125
3.1.3	Structure 3D de Tfs1p .....	127
3.2	LES FONCTIONS DE TFS1P.....	129
3.2.1	Tfs1p est un inhibiteur de protéase à sérine : la carboxypeptidase Y (CPY).....	129
3.2.1.1	La carboxypeptidase Y (CPY).....	129
3.2.1.2	Etude de la structure du complexe Tfs1p/CPY .....	129
3.2.2	Tfs1p inhibe la protéine Ira2p.....	133
3.2.2.1	Tfs1p est un suppresseur multicopie de mutations dans CDC25 .....	133
3.2.2.2	L'interaction Tfs1p/Ira2p est responsable du phénotype suppresseur de cdc25-1 .....	137
3.2.2.3	Tfs1p active la voie Ras/AMPC/PKA .....	139
3.2.3	Tfs1p et ses deux rôles inhibiteurs en opposition.....	139
3.3	TFS1P ET LA REPONSE AU STRESS .....	143
3.3.1	Présentation .....	143
3.3.2	Les éléments STRE .....	145
3.3.3	Les facteurs de transcription Msn2p et Msn4p .....	145
3.3.3.1	Présentation .....	145
3.3.3.2	Les domaines de Msn2p et son mode d'action dans l'initiation de la transcription.....	147
3.3.3.3	Les activités de Msn2p et Msn4p sont régulées.....	147
3.3.3.3.1	Action sur la localisation cellulaire .....	149
3.3.3.3.2	Action sur la stabilité de Msn2p.....	151
3.3.3.3.3	Action sur l'activation de la transcription et sur la formation d'un complexe Msn2p/ADN .....	153
3.3.4	HSP12, un gène rapporteur .....	155
3.4	TFS1P APPARTIENT A LA FAMILLE DES PEBPS.....	157
3.4.1	Présentation .....	157
3.4.2	Caractéristiques communes aux PEBPs .....	157
3.4.2.1	Caractéristiques moléculaires .....	159
3.4.2.1.1	La taille .....	159
3.4.2.1.2	Localisation.....	159
3.4.2.1.3	Fixation de ligands .....	159
3.4.2.2	Données structurales.....	161
3.4.3	Les PEBP, une famille très conservée à travers les espèces .....	163
3.4.3.1	Tfs1p et son homologue Ylr179cp.....	163
3.4.3.2	Les PEBPs d'autres espèces .....	165
3.4.3.3	Les PEBP de Mammifères.....	169

3.4.3.3.1	Chez le bœuf .....	169
3.4.3.3.2	Chez la souris .....	171
3.4.3.3.3	Chez le rat .....	171
3.4.3.3.4	Chez l'homme .....	173
	• hPEBP-2 .....	173
	• hPEBP-4 .....	173
	• hPEBP-1 .....	175
3.4.4	<i>La plurifonctionnalité des PEBPs CHEZ LES MAMMIFERES</i> .....	175
3.4.4.1	Les fonctions moléculaires des PEBP .....	175
3.4.4.1.1	RKIP est un inhibiteur de kinases .....	175
	• Présentation de la voie MAP Kinase Raf-1/MEK/ERK .....	177
	• RKIP inhibe Raf-1 et la voie MAP Kinase Raf-1/MEK/ERK .....	177
	• Régulation de l'activité inhibitrice de RKIP sur Raf-1 .....	181
	• RKIP phosphorylée inhibe la kinase GRK2 .....	183
	• RKIP inhibe les kinases Tak-1 et NIK et la voie d'activation de NF- $\kappa$ -B .....	185
3.4.4.1.2	Les PEBPs inhibent les protéases à sérine .....	189
3.4.4.2	Les fonctions cellulaires des PEBPs .....	189
3.4.4.2.1	RKIP et la motilité cellulaire .....	189
3.4.4.2.2	RKIP et le transport de la morphine .....	191
3.4.4.2.3	RKIP et la mitose .....	193
3.4.4.3	Les fonctions physiologiques des PEBPs au niveau de l'organisme .....	193
3.4.4.3.1	Le peptide HCNP .....	193
3.4.4.3.2	RKIP et la maladie d'Alzheimer .....	195
3.4.4.3.3	RKIP est un suppresseur de métastases .....	197
3.4.4.3.4	RKIP et l'apoptose .....	199
3.4.4.3.5	RKIP et le diabète .....	201
	<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>203</b>
	<b>1. MICROBIOLOGIE</b> .....	<b>205</b>
1.1.	SOUCHES UTILISEES .....	205
1.2.	MILIEUX DE CULTURE .....	205
	<b>2. EXPERIENCES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE</b> .....	<b>207</b>
2.1.	TECHNIQUES CLASSIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE .....	207
2.1.1.	<i>Manipulations classiques d'ADN</i> .....	207
2.1.2.	<i>Transformation de bactéries</i> .....	209
2.1.3.	<i>Transformation de levures</i> .....	211
2.1.4.	<i>Préparation d'ADN génomique de levure</i> .....	211
2.1.5.	<i>PCR sur colonies de levures</i> .....	211
2.2.	DETAILS DES CONSTRUCTIONS GENETIQUES .....	213
2.2.1.	<i>Constructions des protéines hybrides Tfs1p/Ylr179cp</i> .....	213
2.2.2.	<i>Clonage des hybrides Tfs1p/Ylr179cp dans pET14</i> .....	215
2.2.3.	<i>Clonage du fragment TBD d'Ira2p dans pESC-Flag</i> .....	215
2.2.4.	<i>Clonage dans le vecteur pEG202 (double hybride)</i> .....	215
2.2.5.	<i>Clonage de TFS1<math>\Delta</math>N<sub>2</sub> dans pADNS</i> .....	215
2.2.6.	<i>Clonage des mutants ponctuels de Tfs1p dans Yep351</i> .....	217
2.2.7.	<i>Clonage des PEBPs humaines dans pcDNA<sub>3</sub>-HA</i> .....	217
2.2.7.1	RKIP .....	217
2.2.7.2	hPEBP-2 .....	217
2.2.7.3	hPEBP-4 .....	219
2.2.8.	<i>Clonage des PEBPs humaines dans pGEX-6-P1</i> .....	219
2.2.9.	<i>Clonage des domaines de Nf1 dans p3X-flag</i> .....	219
2.2.9.1	SecPH .....	219
2.2.9.2	GAP-SecPH et CTD .....	219
2.2.10.	<i>Clonages réalisés en vue de la mise au point du crible double hybride</i> .....	221
2.2.10.1	Contrôle positif .....	221
2.2.10.2	Clonage des domaines de Nf1 dans pVjL <sub>9</sub> .....	221
2.3.	TEST DOUBLE HYBRIDE ENTRE LES PROTEINES HYBRIDES DE TFS1 ET LE DOMAINE TBD D'IRA2P .....	223
2.4.	TEST DOUBLE HYBRIDE SUR Nf1 .....	223
2.4.1.	<i>Vérification des témoins positifs et négatifs</i> .....	223
2.4.2.	<i>Criblage de la banque d'ADNc par croisement (mating)</i> .....	225



2.4.3.	<i>Coloration des levures au X-Gal</i> .....	227
2.4.4.	<i>Purification des plasmides de levure</i> .....	227
2.4.5.	<i>PCR sur les plasmides de levure</i> .....	227
2.4.6.	<i>Analyse des produits de PCR</i> .....	229
2.4.7.	<i>Isolation des plasmides portant la cible</i> .....	229
2.4.8.	<i>Séquençage</i> .....	229
2.5.	CONSTRUCTION DE SOUCHES DE LEVURE : INTEGRATION DE MUTATION PONCTUELLE AU GENOME..	229
2.5.1.	<i>Remplacement du gène TFS1 par la cassette URA3</i> .....	229
2.5.1.1	Amplification de la cassette URA3.....	229
2.5.1.2	Intégration de la cassette URA3 (FIGURE 45).....	231
2.5.1.3	Vérification des transformants.....	231
2.5.2.	<i>Remplacement de la cassette URA3 par le gène TFS1 ayant une mutation ponctuelle</i> .....	231
2.5.2.1	Clonage du gène TFS1N <sub>2</sub> K bis dans Yep351T.....	231
2.5.2.2	Amplification des gènes TFS1 muté.....	233
2.5.2.3	Intégration des gènes TFS1 muté (FIGURE 45).....	233
2.5.2.4	Vérification des transformants.....	233
2.6.	NORTHERN BLOT.....	235
2.6.1.	<i>Cultures</i> .....	235
2.6.2.	<i>Extraction des ARN</i> .....	235
2.6.3.	<i>Préparation des échantillons</i> .....	235
2.6.4.	<i>Migration, transfert et hybridation</i> .....	237
<b>3.</b>	<b>EXPERIENCES DE BIOCHIMIE</b> .....	<b>239</b>
3.1.	TECHNIQUES CLASSIQUES DE BIOCHIMIE.....	239
3.1.1.	<i>Préparation des extraits protéiques de levure</i> .....	239
3.1.2.	<i>Mise en évidence des protéines par Western blot</i> .....	239
3.1.2.1	Révélation par colorimétrie.....	239
3.1.2.2	Révélation par chimioluminescence.....	241
3.1.3.	<i>Purification des protéines</i> .....	241
3.2.	CO-IMMUNOPRECIPITATION.....	243
3.2.1.	<i>Co-immunoprécipitation entre le domaine TBD d'Ira2p et différentes formes de Tfs1p</i> .....	243
3.2.2.	<i>Co-immunoprécipitation entre RKIP et Nf1</i> .....	243
3.2.2.1	Billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-HA (Sigma A-2095).....	243
3.2.2.2	Billes d'agarose couplé à l'anticorps anti-flag (Sigma).....	245
3.2.2.3	Billes d'agarose protéine A conjuguées à des Ig-G de lapin puis billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-NF1 (Santa Cruz).....	247
3.2.	TESTS FONCTIONNELS DEMONTRANT L'INHIBITION D'IRA2P PAR TFS1P.....	247
3.3.1.	<i>Tests de choc thermique</i> .....	247
3.3.2.	<i>Test du phénotype suppresseur de la mutation cdc25-1</i> .....	249
3.4.	MESURE DE L'ACTIVITE CPY.....	249
3.5.	ETUDES SYSTEMATIQUES DE PHENOTYPES MUTANTS.....	251
3.5.1.	<i>Microculture par automatisation</i> .....	251
3.5.2.	<i>Calculs des taux de croissance</i> .....	251
3.6.	DICHOÏSME CIRCULAIRE.....	253
<b>4.</b>	<b>CULTURE CELLULAIRE</b> .....	<b>255</b>
4.1.	LIGNEES CELLULAIRES UTILISEES.....	255
4.2.	ELECTROPORATION.....	255
4.3.	ACTIVATION PAR LE TPA.....	257
4.4.	LYSE DES CELLULES.....	257
4.4.1.	<i>Lyse en présence de détergent</i> .....	257
4.4.2.	<i>Lyse sans détergent</i> .....	259
	<b>RESULTATS</b> .....	<b>261</b>
<b>1.</b>	<b>CARACTERISATION DE L'INTERACTION TFS1P/IRA2P</b> .....	<b>265</b>
1.1.	BASE DE L'ETUDE.....	265
1.2.	MODELISATION DE LA STRUCTURE DE YLR179CP.....	267
1.3.	DETERMINATION DES REGIONS IMPORTANTES DE TFS1P DANS L'INTERACTION TFS1P/IRA2P.....	269
1.3.1.	<i>Importance de la cavité de surface</i> .....	269
1.3.1.1.	Les mutants ponctuels de la cavité.....	269

1.3.1.2.	Importance de la cavité dans l'interaction Tfs1p/Ira2p.....	271
1.3.1.3.	Les mutants ponctuels et leur activité sur CPY .....	273
1.3.2.	<i>Autres déterminants essentiels pour l'interaction Tfs1p/Ira2p</i> .....	275
1.3.2.1.	Construction de protéines hybrides .....	275
1.3.2.2.	Analyse fonctionnelle et structurale des protéines hybrides .....	277
1.3.3.	<i>Implication de l'extrémité N-terminale dans l'interaction Tfs1p/Ira2p</i> .....	283
1.3.3.1.	Mutants ponctuels de l'extrémité N-terminale .....	283
1.3.3.2.	Analyse des mutants de l'extrémité N-terminale .....	285
<b>2.</b>	<b>CARACTERISATION DU ROLE PHYSIOLOGIQUE DE TFS1P.....</b>	<b>289</b>
2.1	DISSOCIATION DES ROLES DE TFS1P .....	289
2.1.1.	<i>Etude approfondie de l'activité de mutants ponctuels</i> .....	289
2.1.2.	<i>Analyse des tests systématiques phénotypiques</i> .....	291
2.1.2.1.	Tests systématiques phénotypiques après intégration au génome des mutations ponctuelles.....	291
2.1.2.2.	Synthèse des tests phénotypiques à grande échelle .....	297
2.1.2.3.	Tests systématiques phénotypiques en surproduisant Tfs1p et différentes formes de Tfs1p .....	299
2.2	SIGNIFICATION PHYSIOLOGIQUE DE L'INHIBITION D'IRA2P PAR TFS1P .....	303
2.2.1.	<i>Etude du taux d'AMPc dans la cellule en condition de stress</i> .....	305
2.2.2.	<i>Etude de la cinétique de production de Tfs1p après un stress</i> .....	307
2.2.3.	<i>Etude après un stress de l'expression d'un gène contrôlé par Msn2p/Msn4p</i> .....	307
<b>3.</b>	<b>ETUDE DE LA REGULATION DE LA NEUROFIBROMINE.....</b>	<b>313</b>
3.1	ETUDE DE L'INTERACTION ENTRE LES PEBPS ET Nf1 .....	313
3.1.1.	<i>Etude de l'interaction RKIP/Nf1 dans les cellules COS-7</i> .....	313
3.1.1.1.	Vérification de l'expression de RKIP et Nf1 dans les cellules COS-7.....	313
3.1.1.2.	Co-immunoprécipitation dans les cellules COS-7 .....	315
3.1.1.2.1.	Co-immunoprécipitation Nf1/RKIP dans des cellules COS-7.....	317
3.1.1.2.2.	Co-immunoprécipitation Nf1/RKIP avec des billes couplées à l'anticorps anti-flag dans des cellules COS-7 et élution avec le peptide flag.....	317
3.1.1.2.3.	Co-immunoprécipitation Nf1/RKIP avec des billes couplées à l'anticorps anti-flag dans des cellules COS-7 et influence de l'étiquette .....	319
3.1.1.3.	Co-immunoprécipitation Nf1/RKIP avec des billes couplées à l'anticorps anti-flag dans des cellules COS-7 après activation de la PKC et lyse dans un tampon 0.1% Triton X-100 .....	321
3.1.1.4.	Co-immunoprécipitation Nf1/RKIP avec des billes couplées à l'anticorps anti-flag dans des cellules COS-7 après activation de la PKC et lyse par sonication .....	323
3.1.2.	<i>Etude de l'interaction RKIP/Nf1 dans les astrocytes</i> .....	327
3.1.2.1.	Test de détection de RKIP et Nf1 dans différentes lignées d'astrocytes après lyse dans différentes conditions .....	327
3.1.2.2.	Immunoprécipitation de Nf1 .....	329
3.1.2.2.1.	Immunoprécipitation de Nf1 dans les astrocytes en culture primaire.....	329
3.1.2.2.2.	Immunoprécipitation de Nf1 dans les astrocytes après activation de la PKC.....	331
3.1.2.3.	Immunoprécipitation de Nf1 dans différentes lignées d'astrocytomes .....	335
3.1.2.3.1.	Les lignées d'astrocytomes humains : CCF et U87MG .....	335
3.1.2.3.2.	Les C6.....	335
3.1.3.	<i>Etude de l'interaction hPEBP-2 et hPEBP-4 avec Nf1 dans les cellules COS-7</i> .....	337
3.1.3.1.	Vérification de l'expression de hPEBP-2 et hPEBP-4 dans les cellules COS-7.....	337
3.1.3.5.	Co-Immunoprécipitation entre hPEBP-2 ou hPEBP-4 et les fragments de Nf1 .....	339
Trp	.....	340
3.2	MISE EN EVIDENCE DE NOUVEAUX PARTENAIRES DE LA NEUROFIBROMINE.....	341
3.2.1.	<i>Validation du système double hybride</i> .....	341
3.2.2.	<i>Crible de la banque d'ADNc</i> .....	345
3.2.3.	<i>Conclusion</i> .....	345
	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>347</b>
<b>1.</b>	<b>CARACTERISATION DES BASES MOLECULAIRES DE L'INTERACTION TFS1P/IRA2P.....</b>	<b>349</b>
<b>2.</b>	<b>SIGNIFICATION PHYSIOLOGIQUE DU ROLE DE TFS1P.....</b>	<b>353</b>
2.1	DUALITE DES FONCTIONS DE TFS1P .....	353
2.2	UNE TROISIEME FONCTION DE TFS1P .....	355
2.3	L'INHIBITION D'IRA2P EST PREDOMINANTE PAR RAPPORT A L'INHIBITION DE CPY LORSQUE TFS1P EST SURPRODUITE.....	357

2.4	TFS1P ET LA BOUCLE DE REPOSE AU STRESS.....	359
<b>3.</b>	<b>LA REGULATION DE LA NEUROFIBROMINE.....</b>	<b>361</b>
3.1	ARGUMENTS EN FAVEUR DE LA CONSERVATION DU MECANISME DE REGULATION DE LA LEVURE A L'HOMME.....	361
3.2	CONSERVATION DU MECANISME D'INTERACTION ET D'INHIBITION CHEZ L'HOMME ? .....	363
3.3	MISE EN EVIDENCE DE NOUVEAUX PARTENAIRES DE LA NEUROFIBROMINE.....	369
	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>371</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>377</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>413</b>
	<b>ANNEXE1 .....</b>	<b>415</b>

*LISTE DES  
ABREVIATIONS et  
FORMULES  
CHIMIQUES*



AC : Adénylate Cyclase	HD : Homéodomaine
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	IPTG : Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire	KO : Knock Out
AK3 : Adenylate kinase 3	LB : Luria Bertani
ARN : Acide RiboNucléique	LiAC : acétate de lithium
AMPc : Adénosine MonoPhosphate Cyclique	LLnL : N-acetyl-L-leucinyL-L-leucinyL-L-Norleucinal
APP : Amyloid Precursor Protein	LPA : Lysophosphatidic Acid
BET : Bromure d'Ethidium	LPI : Logarithmic Phenotypic Index
BCIP : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate	LSC : Logarithmic Strain Coefficient
BSA : Bovine Serum Albumine	MDCK : Madin-Darby canine kidney
CSRD : Cystein/Serin Rich Domain	MgCl <sub>2</sub> : chlorure de magnésium
CTD : C-Terminal Domain	MgSO <sub>4</sub> : sulfate de magnésium
DDAH : N(G),N(G)-dimethylarginine Dimethylaminohydrolase	NLS : Nuclear Localisation Signal
DEPC : DiEthyl PyroCarbonate	MMS : Méthyl méthane sulfonate
DMSO : DiMéthyl SulfOxide	MOPS :3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium	MPNST : Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor
DO : Densité Optique	NBT : NitroBlue Tetrazolium
DRG : Dorsal Root Ganglion	NGF : Nerve Growth Factor
DTT : Dithiothreitol	OMGP : Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein
EDTA : acide Ethylène Diamine TetrAcétique	PACAP : Pituitary Adenylate cyclase activating peptide
EGF : Epidermal growth factor	Pb : Paire de base
FGF : Fibroblast Growth Factor	PCR : Polymerase Chain Reaction
GAP : GTPase Activating Protein	PD : Paired Domain
GBD : Gpb Binding Domain	PDGF : Platelet-derived growth factor
GEF : Guanine Exchange Factor	PEBP : PhosphatidylEthanolamine Binding Protein
GDP : Guanosine DiPhosphate	PEG : PolyEthylène Glycol
GFP : Green Fluorescent Protein	PKA : Protéine Kinase AMPc dependent
GRD : GAP Related Domain	PKC : Protéine Kinase C
GST : Glutathione-S-transferase	PPI : Pour Préparation Injectable
GTP : Guanosine TriPhosphate	PVDF : Polyvinylidene Difluoride
HA : Hémagglutinine	RKIP : Raf Kinase Inhibitor Protein
	SD : Synthetic Defined medium

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SSC : Sodium Salt Citrate

STRE : Stress Response Element

TBD : Tfs1p Binding Domain

TNF : Tumor necrosis factor

TPA : 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate

TPR : Tetratrocopeptide

TSB : Transformation and Storage Buffer

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside

YPD : Yeast Peptone Dextrose

3-AT : 3-amino-1, 2, 4-triazole

3D : tridimensionnel

# *INTRODUCTION*





Pour approfondir la connaissance du vivant et identifier les erreurs de ses systèmes qui sont souvent responsables de maladies graves, il est désormais important de chercher à comprendre comment ils fonctionnent et les mécanismes aboutissant à leur dysfonctionnement. C'est pourquoi de nombreuses maladies font aujourd'hui l'objet de recherche scientifique. L'équipe d'Hélène BENEDETTI s'intéresse à l'étude des bases moléculaires d'une des maladies génétiques autosomales dominantes les plus fréquentes puisqu'elle touche environ 1 individu sur 3500 : La Neurofibromatose de type 1 (NF1).

Il s'agit d'une affection autosomique dominante (une personne atteinte de NF1 peut la transmettre à chacun de ses enfants quel que soit le sexe avec un risque de 50%) et sa pénétrance est quasi complète à l'âge de 5 ans. Cette maladie touche le système nerveux central avec l'apparition de gliomes et le système nerveux périphérique avec des neurofibromes. De nombreuses complications sont associées à la maladie avec notamment des difficultés d'apprentissage chez environ 40% des individus atteints.

Le gène *NF1*, responsable de la maladie, a été identifié comme étant un gène suppresseur de tumeur. Il est de grande taille et code une protéine soluble : la neurofibromine (Nf1). Cette protéine est une protéine GAP (GTPase Activating Protein) de Ras c'est-à-dire qu'elle joue un rôle inhibiteur de cette petite protéine G. Elle est de plus impliquée dans d'autres processus physiologiques.

Chez les malades, des mutations sont retrouvées tout le long de la protéine, mais à ce jour, aucune corrélation n'a pu être établie entre une mutation donnée et un phénotype particulier. De plus, une mutation donnée peut être à l'origine de différents phénotypes selon les individus. Tout ceci indique l'importance du contexte génétique et l'existence probable de gènes modificateurs de la maladie, ce qui pourrait expliquer l'extrême variabilité des phénotypes qui lui sont associés. Cependant aucun gène modificateur n'a été identifié pour l'instant.

L'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse développe trois stratégies pour étudier les bases moléculaires de la neurofibromatose.

La première consiste à utiliser le système modèle de la levure *Saccharomyces cerevisiae* parce que la protéine Nf1 a un homologue chez la levure, la protéine Ira2p, et que l'équipe a mis en évidence un nouvel inhibiteur endogène d'Ira2p, la protéine Tfs1p. Une étude du rôle physiologique de Tfs1p, des bases moléculaires de l'interaction Tfs1p/Ira2p, du mode



d'inhibition d'Ira2p par Tfs1p et des modifications post-traductionnelles d'Ira2p est ainsi menée dans l'équipe.

La seconde stratégie consiste à tester si l'interaction entre Tfs1p et Ira2p est conservée chez les mammifères et si Nf1 est inhibée par un homologue de Tfs1p.

Enfin, la troisième stratégie consiste à chercher de façon plus large de nouveaux régulateurs de la protéine Nf1 et pour cela, une recherche systématique des partenaires protéiques de Nf1 a été entreprise en effectuant un crible double hybride d'une banque d'ADNc de cerveau humain contre un domaine fonctionnel précis de Nf1.

Durant mon travail de thèse, j'ai participé à l'avancement de ces stratégies en travaillant à la fois sur les levures et sur des cultures de cellules de mammifères.

En ce qui concerne le système modèle de la levure *S. cerevisiae*, je me suis tout d'abord intéressée aux bases moléculaires de l'interaction Tfs1p/Ira2p. Il existe, dans cet organisme, une protéine homologue à Tfs1p : la protéine Ylr179cp. Peu d'informations sont disponibles sur cette protéine mais on sait qu'elle n'interagit pas avec Ira2p. En combinant des études fonctionnelles de différents mutants de Tfs1p et de protéines hybrides entre Tfs1p et Ylr179cp avec des études de modélisation moléculaire, nous avons pu mettre en évidence deux régions de Tfs1p participant à l'interaction avec Ira2p. Je me suis d'autre part intéressée au rôle physiologique de Tfs1p dans les levures et nous avons pu montrer son implication dans l'extinction de la réponse au stress.

En ce qui concerne la transposition de l'interaction Tfs1p/Ira2p à Nf1, j'ai réalisé des expériences de co-immunoprécipitation dans des cellules de mammifères en culture (cultures primaires ou lignées cellulaires) sur des protéines étiquetées ou endogènes dans différentes conditions de lyse des cellules et après diverses conditions de stimulation de leurs voies de signalisation.

Quant à la recherche systématique de nouvelles cibles de Nf1, j'ai mis en place le crible double hybride et participé à l'identification des premières cibles.

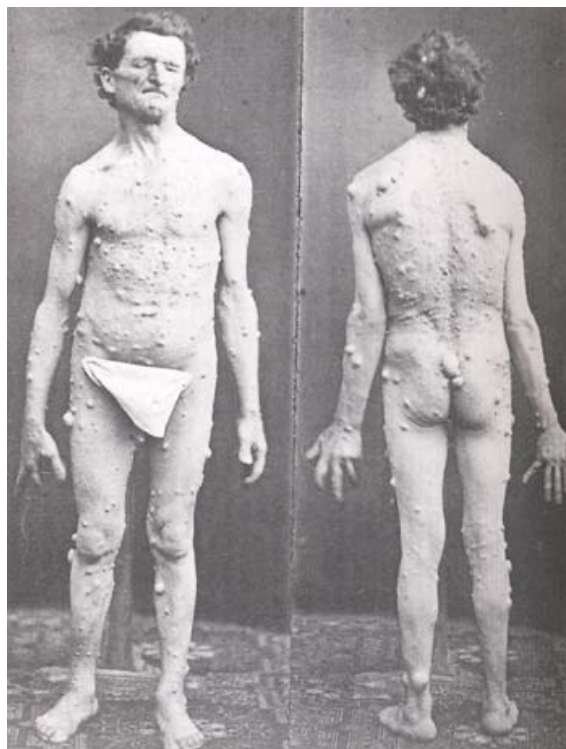


*ETUDE  
BIBLIOGRAPHIQUE*

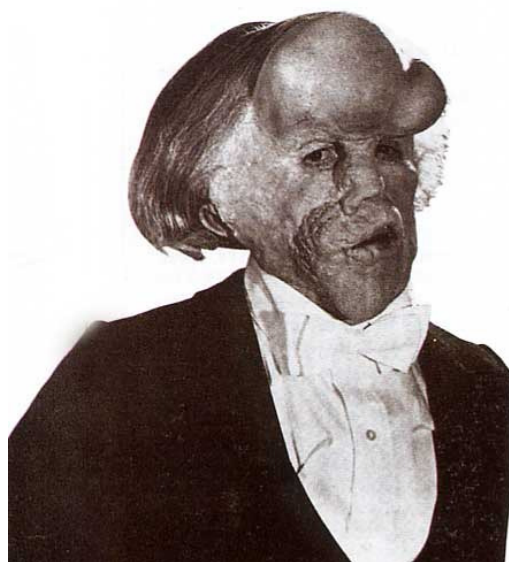








**FIGURE 1 : Illustration originale de Von Recklinghausen en 1882**



**FIGURE 2 : Elephant man**

# 1. LA NEUROFIBROMATOSE DE TYPE 1 OU MALADIE DE VON RECKLINGHAUSEN

La neurofibromatose de type 1 (NF1) ou maladie de Von Recklinghausen est connue depuis plus d'un siècle grâce à l'observation princeps de Von Recklinghausen en 1882, qui lui donna son nom. Il s'agit d'une des maladies génétiques autosomales dominantes les plus fréquentes, puisque l'incidence dans la population est de 1/3500 individus affectés, et le syndrome de prédisposition au cancer le plus commun. Bien que de nombreux cas soient héréditaires, entre 30 et 50% des cas sont des cas *de novo* provenant de mutations spontanées.

Il est donc primordial à ce jour d'approfondir la connaissance de la maladie et notamment de comprendre ses bases moléculaires.

## 1.1. Introduction

### 1.1.1. Historique de la maladie

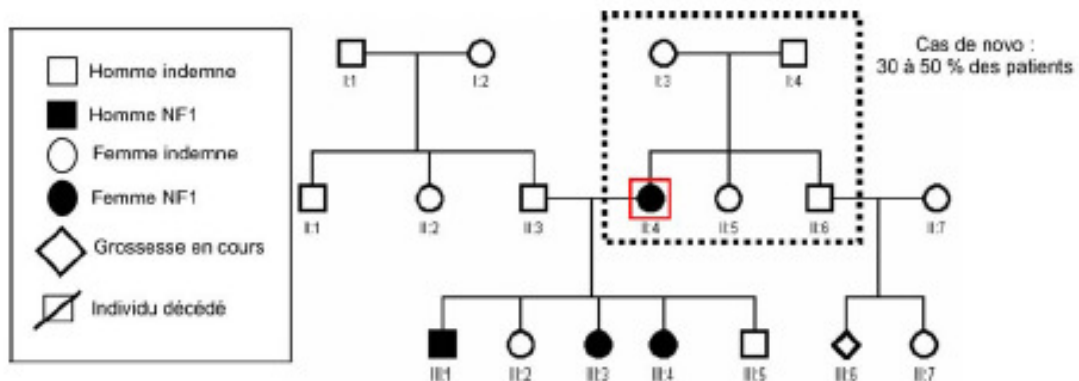
Mark Akenside semble être le premier, en 1768, à avoir décrit un malade porteur de nombreuses « verrues » qui parsemaient son corps, et cette anomalie avait été héritée de son père. Ensuite, Tilesius von Tilenau, en 1793, évoqua un malade du professeur Ludwig qui avait écrit un texte à son sujet « Case History of Extraordinarily Unsightly Skin ». Ce patient présentait également de nombreuses « formations » cutanées.

Mais c'est en 1882 que Von Recklinghausen décrivit la Neurofibromatose de type I (NF1) (FIGURE 1). Cette maladie a été évoquée pour expliquer la pathologie du patient Joseph Merrick, nommé « Elephant man », mais une autre hypothèse, celle du syndrome Proteus, est maintenant privilégiée pour expliquer le phénotype de ce patient (FIGURE 2).

### 1.1.2. Identification du gène responsable de la maladie

La stratégie utilisée pour isoler et identifier le gène responsable de la neurofibromatose de type I a été celle du clonage positionnel puisque la lésion biochimique responsable de la maladie était alors inconnue. Ce n'est qu'une centaine d'années après la découverte de la maladie, en 1987, que l'analyse de divers marqueurs a permis à Seizinger et Barker de localiser le locus *NF1* dans la région péricentromérique du chromosome 17 (Barker *et al.*, 1987; Seizinger *et al.*, 1987).

La description de translocations en 1987 et 1989 chez des patients atteints de NF1 a été primordiale pour l'établissement de la carte physique du gène (Ledbetter *et al.*, 1989).



**FIGURE 3 : Arbre généalogique d'une famille présentant des cas de NF1**  
(Pinson & Wolkenstein, 2005)

Dans cette forme familiale de NF1, par exemple, quatre individus sont atteints sur deux générations. L'individu II 4 (encadré en rouge), porteur d'une néomutation, est la première personne atteinte de NF1 dans cette famille. Le risque pour ses deux parents indemnes (I3 et I4) d'avoir un autre enfant atteint de NF1 est très faible et identique à celui d'un couple issu de la population générale en absence de mosaïque germinale.

En revanche, un individu atteint de NF1 a potentiellement la moitié de ses cellules germinales avec la copie mutée du gène *NF1*. Le risque de transmettre le gène muté à la génération suivante est alors de 50%. C'est le cas de l'individu II4 qui a transmis la maladie à trois de ses cinq enfants.

C'est en 1990 que les équipes de Collins et White ont isolé simultanément deux ADN complémentaires et ont pu localiser précisément le gène responsable de la maladie (Viskochil *et al.*, 1990; Wallace *et al.*, 1990). Le clonage du gène et son étude moléculaire ont permis d'affirmer l'homogénéité génétique de la NF1.

### **1.1.3. Génétique de la Neurofibromatose de type 1**

La neurofibromatose de type 1 (NF1) est une affection autosomique dominante ce qui signifie qu'un malade peut transmettre la maladie à chacun de ses enfants avec un risque de 50% (définit le caractère dominant de la maladie) et ce quel que soit le sexe (caractère autosomique).

Entre 30 à 50% des patients présentent des néomutations, et dans ce cas, aucun des deux parents du patient n'est atteint de la maladie (FIGURE 3).

La grande variabilité phénotypique de cette maladie peut faire méconnaître la présence d'antécédents familiaux. Sa recherche se fait donc par l'intermédiaire d'un interrogatoire rigoureux et par un examen clinique des parents, en particulier dermatologique et ophtalmologique. Les informations sont ensuite reportées sur un arbre généalogique (FIGURE 3) qui résumera ainsi l'enquête génétique familiale.

## **1.2 Présentation clinique de la Neurofibromatose de type 1**

La Neurofibromatose de type I (NF1) est responsable de troubles extrêmement variables, ce qui rend plus difficile le diagnostic de la maladie chez les patients. Certains signes de la NF1 ne sont pas toujours faciles à identifier. Dans la petite enfance, en l'absence d'antécédents familiaux, le diagnostic demeure parfois en suspens. Les symptômes évoluent avec l'âge et la pénétrance de la maladie est quasi complète à l'âge de 5 ans.

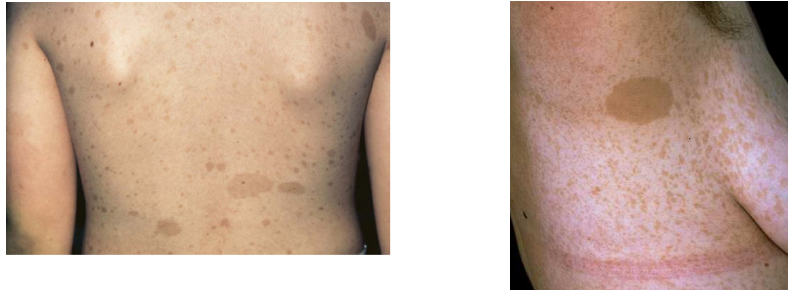
Par contre, chez la grande majorité des adultes, le diagnostic de la NF1 est facilité par les données de l'examen clinique.

S'il existe actuellement un diagnostic biologique possible à l'aide d'une prise de sang, on ne peut pas prédire au début de la vie si la forme de la maladie sera légère ou accompagnée de complications plus sérieuses.

La conférence du National Institute of Health de Bethesda (Etats-Unis) a permis, en 1988, de préciser sept critères pour le diagnostic de la NF1. Le diagnostic est posé

1	Un apparenté du premier degré atteint (parent, fratrie ou enfant).
2	Au moins 6 taches café au lait (TCLs) > 1,5 cm après la puberté > 0,5 cm avant la puberté
3	Lentigines axillaires ou inguinales
4	Ou Au moins deux neurofibromes quel que soit le type Au moins un neurofibrome plexiforme
5	Gliome du nerf optique
6	Au moins 2 nodules de Lisch (hamartome irien)
7	Une lésion osseuse caractéristique Pseudarthrose Dysplasie du sphénoïde Amincissement du cortex des os longs

**FIGURE 4 : Critères diagnostiques de la NF1 – Conférence de consensus sur les neurofibromatoses (NIH – Bethesda, 1988)**



**FIGURE 5 : Taches café au lait**



**FIGURE 6 : Lentigine axillaire**



**FIGURE 7 : Nodule de Lisch**

si deux de ces signes sont réunis chez un même individu (Conference statement) (FIGURE 4).

## **1.2.1 Principaux signes cliniques**

### 1.2.1.1 Taches café au lait (TCL)

Les TCLs constituent un des meilleurs signes diagnostiques de la NF1 et elles font parties d'une des premières manifestations de la NF1 (FIGURE 5). Elles sont présentes chez 99% des malades. Cependant, les TCLs ne sont pas spécifiques de la NF1 et sont retrouvées assez fréquemment au nombre de une à trois lors d'examen clinique d'enfants dans la population générale. La taille et le nombre de ces taches sont donc des paramètres importants à considérer. Par contre, leur répartition est aléatoire.

Elles peuvent être présentes dès la naissance ou apparaître au cours des 2 premières années de la vie. Pour être diagnostiqué NF1, il faut qu'il y ait un minimum de 6 taches mesurant au moins 1.5 cm chez l'adulte et 0.5 cm chez l'enfant.

### 1.2.1.2 Les lentigines

Elles désignent des TCL de petite taille qui siègent sélectivement dans les plis axillaires, inguinaux ou sous-mammaires (FIGURE 6). Elles constituent un signe capital dans l'enfance puisque leur prévalence est d'environ 80% à l'âge de 6 ans.

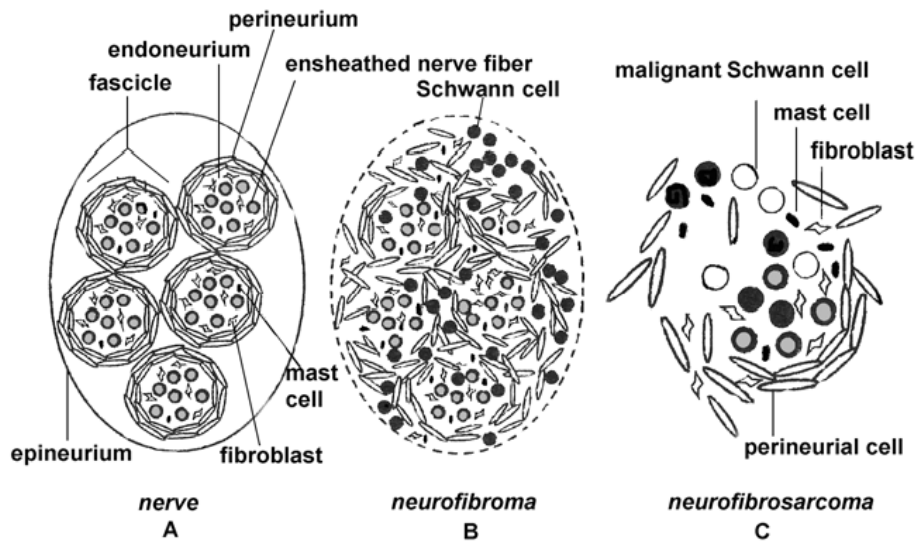
### 1.2.1.3 Les nodules de Lisch

Ce sont des malformations tissulaires d'aspect tumoral de l'iris (hamartomes iriens) qui n'entraînent aucun trouble visuel (FIGURE 7). Leur taille et leur nombre varient en fonction de l'âge puisque 10% des sujets de moins de 6 ans en sont atteints alors que 90% des patients en sont atteints après 16 ans.

### 1.2.1.4 Tumeurs du système nerveux

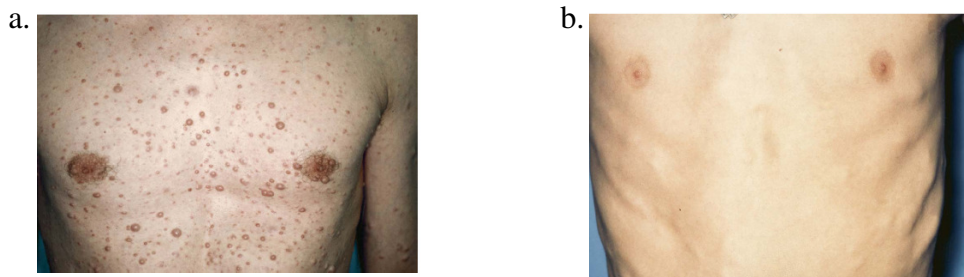
#### *1.2.1.4.1 Tumeurs du système nerveux périphérique*

La NF1 est caractérisée par le développement de neurofibromes qui sont des tumeurs bénignes de la gaine de myéline des nerfs périphériques. Du point de vue histologique, ce sont des tumeurs hétérogènes constituées essentiellement de cellules de Schwann et de fibroblastes, mais également de mastocytes et de cellules périneurales au sein d'une matrice riche en collagène (FIGURE 8).



**FIGURE 8 : Formation d'un neurofibrome**  
(d'après Cichowski & Jacks, 2001)

- A. Structure d'un nerf périphérique normal
- B. Neurofibrome bénin, la structure de la gaine nerveuse est désordonnée et une grande quantité de collagène est produite
- C. Neurofibrosarcome



**FIGURE 9 : Neurofibromes cutanés et sous-cutanés**

- a. Neurofibromes cutanés
- b. Neurofibromes sous-cutanés



**FIGURE 10 : Neurofibromes plexiformes**

Il existe trois types de neurofibromes :

- cutanés (FIGURE 9a), tumeurs bénignes présentes chez 95% des adultes atteints de NF1.
- sous-cutanés (FIGURE 9b), ce sont des neurofibromes nodulaires présents chez 20% des malades. Ils apparaissent à la puberté et leur nombre augmente avec l'âge et la grossesse.
- plexiformes (FIGURE 10), tuméfactions cutanées et sous-cutanées de taille très variable, de quelques centimètres à plusieurs dizaines, voire étendues à tout un segment corporel. Ce type de neurofibromes est présent chez 30% des patients, ils sont congénitaux et grossissent au cours de leur vie.

Les neurofibromes sont très invalidants en raison des déformations inesthétiques et des douleurs neurogènes qu'ils provoquent. Chez environ 10% des patients ayant des neurofibromes plexiformes, ces derniers peuvent dégénérer en tumeurs malignes agressives métastatiques appelées neurofibrosarcomes, ce qui contribue à la gravité de la maladie.

#### *1.2.1.4.2 Tumeurs du système nerveux central*

Des tumeurs peuvent également se développer à partir du système nerveux central provoquant notamment des astrocytomes ou des gliomes (Shannon *et al.*, 1994).

Les gliomes sont des tumeurs dérivées des cellules gliales du système nerveux central. Ces tumeurs peuvent se développer dans toutes les régions du cerveau. Cependant, ce sont les voies optiques, le cervelet et le tronc cérébral qui sont majoritairement atteints. Le gliome des voies optiques est la tumeur intracrânienne la plus fréquente au cours de la NF1 (15% des individus en sont atteints), et va souvent être responsable de la perte de la fonction visuelle de l'œil atteint. Il touche principalement les nerfs et/ou le chiasma optique et peut s'étendre le long des voies optiques.

### **1.2.2 Les complications associées à la NF1**

En plus de la grande variabilité de l'expression clinique associée à la maladie, la neurofibromatose de type I s'accompagne de nombreuses complications (Friedman & Birch, 1997). Notamment, une déficience mentale est souvent présente chez les enfants atteints de NF1.





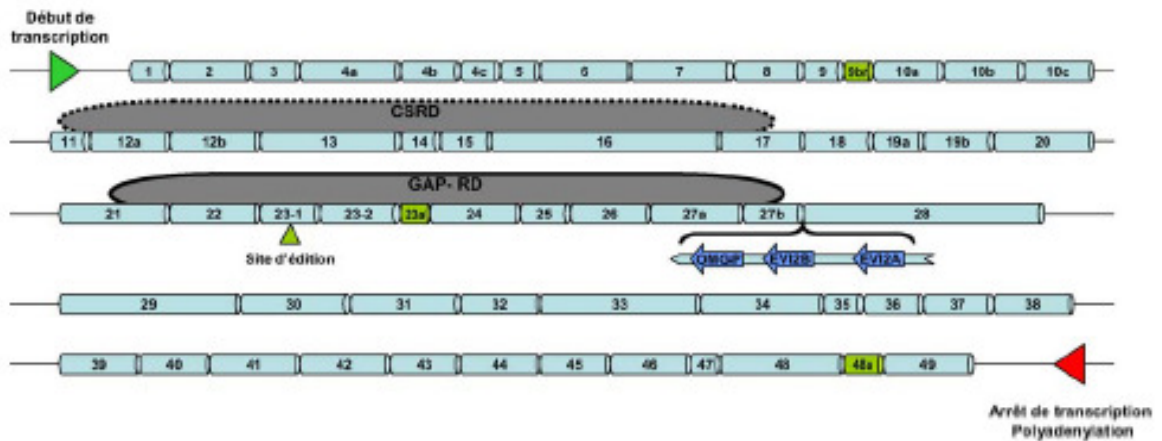
### 1.2.2.1 Complications neurologiques

Outre le rôle de la NF1 dans le développement de tumeurs, elle joue également un rôle important dans la fonction neuronale. Les complications neurologiques sont principalement des troubles neuropsychologiques avec des déficits cognitifs et des difficultés d'apprentissage (Ferner *et al.*, 1996). Ces troubles neuro-cognitifs altèrent parfois considérablement la scolarité, le quotient intellectuel est situé dans la moyenne basse, alors que les retards mentaux proprement dits ont une fréquence comparable à celle de la population générale. Ces troubles sont fréquents et touchent de 30 à 45% des patients. En effet, ils constituent le symptôme neurologique le plus commun chez des enfants atteints de NF1 et ces troubles ne sont pas améliorés à l'âge adulte (Hyman *et al.*, 2005; North *et al.*, 1997). Le syndrome de déficit de l'attention est le plus souvent décrit avec ou sans hyperactivité : troubles de l'attention, difficultés de coordination motrice, déficit de la mémoire récente, troubles perceptifs entraînant des problèmes pour lire, écrire, calculer, se repérer dans l'espace. Ces troubles sont parfois associés à des troubles de l'élocution.

Des défauts d'apprentissage ont été mis en évidence dans un modèle murin puisque des souris hétérozygote *nfl*<sup>+/-</sup> ont des problèmes d'apprentissage similaires à ceux rencontrés chez l'homme et la réduction de l'activité de p21ras améliore ces déficits cognitifs (Costa *et al.*, 2002). De plus, une voie de signalisation régulée par la neurofibromine chez la drosophile, autre organisme modèle, est aussi nécessaire pour son apprentissage (Guo *et al.*, 2000).

### 1.2.2.2 Les problèmes orthopédiques

Ce ne sont pas des complications rares puisqu'un développement anormal du squelette se manifeste dans 10 à 20% des patients atteints de NF1 (Riccardi *et al.*, 1994). Des dysplasies osseuses, une érosion des os, une ostéoporose ou des scoliozes sont caractéristiques. De plus, 5 à 10% des jeunes patients ont des fractures ou des anomalies osseuses et près de 50% des patients ont une faible densité osseuse (Gilbert & Brockman, 1995). Enfin, la chirurgie orthopédique pour corriger ces défauts échoue en partie à cause des pseudoarthroses (Crawford & Schorry, 1999).



**FIGURE 11 : Représentation schématique du gène *NF1***  
(Pinson & Wolkenstein, 2005)

Cette illustration représente les exons du gène *NF1*. Les gènes *OMGP*, *EVI2A* et *EVI2B* sont annotés dans l'intron 27. Les exons 9br, 23a et 48a soumis à l'épissage alternatif sont en vert, les domaines GAP-RD (appelé GRD dans la suite du manuscrit) et CSRD sont schématisés au dessus de la séquence codante correspondante, dans une bulle grise.

### 1.2.2.3 Autres complications

La liste des complications est malheureusement longue. En cas de NF1, le risque d'hypertension est augmenté de 6% chez ces patients ; ceci peut être dû à deux paramètres : le rétrécissement d'une artère conduisant le sang aux reins ou l'existence d'une tumeur au niveau d'une glande surrénale. A cette complication cardio-vasculaire, il faut ajouter des complications urinaires, viscérales, gastro-intestinales ou encore pulmonaires. Cependant, elles restent assez peu fréquentes.

## 1.2.3 Evolution des signes cliniques

La Neurofibromatose de type I est une maladie évolutive : certains signes cliniques sont présents dès la naissance alors que d'autres apparaissent progressivement avec l'âge. Chaque tranche d'âge comporte aussi des risques différents de complications.

La grossesse peut également correspondre à une période évolutive de la maladie : les neurofibromes cutanés ont tendance à augmenter en taille et en nombre (Dugoff & Sujansky, 1996). Tout ceci suggère qu'il pourrait y avoir un lien entre les changements hormonaux dus à une grossesse ou à la puberté et la NF1.

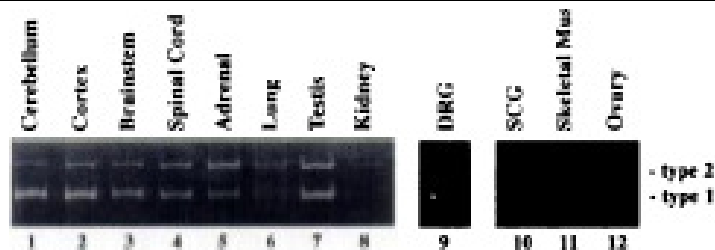
La gravité de la NF1 est variable d'un sujet à l'autre au sein d'une même famille, et elle augmente généralement avec l'âge du patient mais il n'existe aucun signe prédictif de l'évolution de la maladie (Wolkenstein *et al.*, 1996).

Il n'existe pas de traitement spécifique de la maladie actuellement. La prise en charge des patients correspond donc à une surveillance régulière et au traitement des complications éventuelles.

## 1.3 Le gène codant la protéine Nf1

### 1.3.1 Organisation du gène NF1

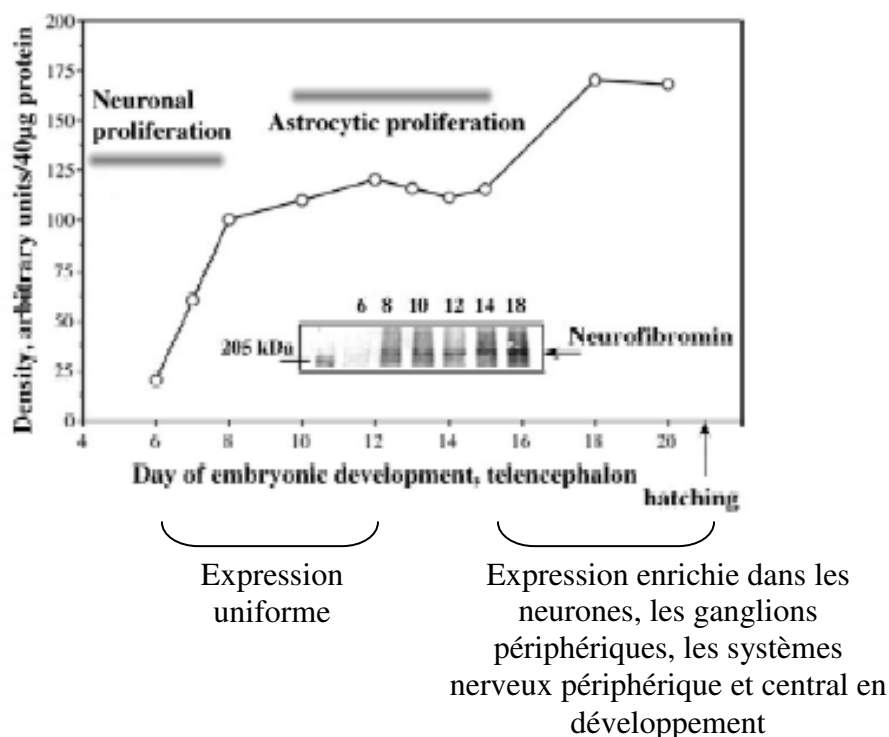
Le gène *NF1* est localisé dans la région péri-centromérique du bras long du chromosome 17 en position 17q11.2 (Cawthon *et al.*, 1990). Il s'agit d'un très grand gène qui s'étend sur 350kb d'ADN génomique (Marchuk *et al.*, 1991) avec 60 exons (FIGURE 11) (Li *et al.*, 1995b). Le gène *NF1* est exprimé de manière ubiquitaire, formant un ARN messager de 11 à 13kb avec de nombreux épissages alternatifs (Gutmann *et al.*, 1995).



**FIGURE 12 : Expression de l'ARN messager de *NF1***  
(Gutmann *et al.*, 1995)

Les ARN issus de tissus de rat adulte sont analysés par RT-PCR. L'expression est détectée dans les tissus du cerveau, les glandes adrénérgiques, les testicules et faiblement dans les ganglions de la racine dorsale mais le niveau est indétectable dans le cœur, les ovaires, le muscle squelettique, le poumon et le rein.

La bande supérieure représente l'isoforme II de *NF1* alors que la bande basse représente l'isoforme I.



**FIGURE 13 : Expression du gène *NF1* dans le cerveau**  
(d'après Li *et al.*, 2001)

L'expression de NF1 dans le temps dans le cerveau (telencephalon) est détectée par western blot. Les hémisphères cérébraux de 4 embryons sont rassemblés, lysés et homogénéisés dans du tampon RIPA au jour de développement embryonnaire indiqué. 40µg de protéine de chaque échantillon sont séparés sur gel SDS-PAGE 6% et un anticorps polyclonal dirigé contre Nf1 est utilisé et les résultats sont visualisés par chimioluminescence. Les données de 4 séries indépendantes sont quantifiées par densitométrie et notées sur le graphe ci-dessus.

Ce gène a la particularité d'englober 3 autres gènes localisés dans l'intron 27b et transcrits en sens inverse du gène *NF1* : les gènes *EVI2A* (*Ecotropic Viral Integration site*) (Cawthon *et al.*, 1990), *EVI2B* (Cawthon *et al.*, 1991) qui sont deux homologues humains de deux protooncogènes murins impliqués dans certains processus leucémogènes et le gène *OMGP* (Oligodendrocyte-Myelin GlycoProtein) qui code une protéine de la myéline (Viskochil *et al.*, 1991). *OMGP* serait impliquée dans la myélinisation du système nerveux central (Johnson *et al.*, 2000) et pourrait avoir un rôle dans l'inhibition de la croissance des neurites (Johnson *et al.*, 2000). Un pseudogène de l'adénylate kinase (*AK3*), orienté dans le même sens que *NF1*, a également été identifié dans l'intron 39 (Xu *et al.*, 1992).

### 1.3.2 Expression et régulation du gène *NF1*

#### 1.3.2.1 Expression du gène *NF1*

Le gène *NF1* est exprimé de manière ubiquitaire dans différents tissus. Daston *et al.* (1992) ont identifié la neurofibromine comme étant produite de manière plus abondante dans les neurones, les astrocytes, les cellules de Schwann, les oligodendrocytes et les leucocytes mais on la trouve également produite dans les mélanocytes et les kératinocytes.

Gutmann *et al.* (1995) ont cherché à déterminer le profil d'expression de *NF1* dans différents tissus. Ils démontrent ainsi l'expression de *NF1* dans le cerveau mais également dans les testicules et les glandes adrénérergiques (FIGURE 12).

D'autre part, il apparaît que *NF1* est exprimé dans les neurones du système nerveux central sans distribution spécifique vis à vis de la présence d'un neurotransmetteur d'une voie neuronale ou d'une région du cerveau (Nordlund *et al.*, 1993). Certaines régions du système nerveux central semblent toutefois exprimer plus fortement *NF1* : le bulbe olfactif, le noyau olfactif antérieur, le cortex piriforme, les neurones « moteurs », l'hippocampe, la substance noire, les cellules de Purkinje et plus faiblement dans les cellules des ganglions des racines dorsales et de la région frontale corticale (Daston *et al.*, 1992 ; Nordlund *et al.*, 1993 ; Gutmann *et al.*, 1995).

De plus, il a été noté une différence d'expression au cours du développement (Gutmann *et al.*, 1995 ; Li *et al.*, 2001). L'expression de *NF1* augmente progressivement des stades E6 à E9 de façon uniforme dans le cerveau (FIGURE 13). Puis après stabilisation, l'expression augmente de nouveau des stades E14 à E18 ; l'expression est alors enrichie dans les neurones et les ganglions périphériques du système nerveux central et périphérique en développement.



En ce qui concerne le gène à travers les espèces, *NF1* est hautement conservé : il y a environ 90% d'identité entre l'homme et la souris et environ 60% d'identité entre l'homme et la drosophile (Bernards *et al.*, 1993).

#### 1.3.2.2 Régulation du gène *NF1*

Une étude a été réalisée afin de comprendre comment ce gène pouvait contribuer à une maladie génétique à travers l'analyse de la régulation de sa transcription. Le promoteur de *NF1* possède plusieurs éléments de régulation comme des sites CRE (cAMP response element), SP1 et AP2 (Hajra *et al.*, 1994). Une carte de méthylation de la région promotrice du gène *NF1* a été établie et il a été démontré une sensibilité fonctionnelle pour la méthylation à des sites spécifiques dans la région régulatrice de *NF1* (Mancini *et al.*, 1999). Par l'intermédiaire du clonage de morceaux du promoteur de *NF1* couplés à un gène rapporteur, Zou *et al.* (2004) ont défini une région minimale du promoteur du gène *NF1* (-270 à +230) et une région répressive (+ 354 à + 539). Des essais de gels retard ont démontré la spécificité fonctionnelle des motifs CRE et SP1 : une diminution significative de l'activité du rapporteur a été observée quand ils sont mutés. Il s'avère que Sp1 est un prototype d'une famille multigénique de facteurs de transcription ayant des rôles dans la croissance cellulaire et la progression tumorale (Black *et al.*, 2001). Enfin, Zou *et al.*, 2004 ont émis l'hypothèse d'un rôle potentiel de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression du gène. Ils ont montré qu'une modification de l'état de méthylation dans le promoteur de *NF1* pouvait modifier l'activité du gène rapporteur. Cela suggère ainsi que la méthylation aberrante de ces sites *in vivo* pourrait jouer un rôle complémentaire dans l'inactivation épigénétique du gène *NF1* en relation avec les tumeurs liés à la neurofibromatose.

Plus récemment, Fishbein *et al.*, 2005 ont étudié cette méthylation dans des cellules de Schwann normales et dans des neurofibromes plexiformes dont les mutations somatiques sont inconnues. Ils ont montré que 47% des CpG méthylés étaient situés au niveau du site AP2 (-208pb). Le facteur de transcription AP2 est exprimé dans les cellules de Schwann et joue un rôle dans la régulation des gènes impliqués dans la myélinisation (Wegner, 2000). Fishbein *et al.* (2005) ont démontré que plus de la moitié des échantillons de tumeurs présentent de la méthylation ce qui laisse penser que les cellules de Schwann pourraient être la cible de méthylation dans les tumeurs.





Actuellement, aucun profil particulier de méthylation du promoteur de *NF1* n'a pu être mis en évidence après isolation de l'ADN correspondant à partir de cellules composant les neurofibromes de patients (Ebinger *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces auteurs est d'accord sur le fait que l'extinction de l'expression de *NF1* par méthylation ne serait pas un facteur déterminant dans sa régulation.

### 1.3.3 Mutations du gène *NF1*

L'étude des mutations dans le gène *NF1* est un travail difficile du fait de la grande taille de ce gène et de la diversité des lésions pathologiques (Pinson & Wolkenstein, 2005). En 1992, un consortium international sur la NF1 a été créé pour permettre la centralisation des informations concernant les mutations et les polymorphismes du gène (Korf, 1998). Il est accessible sur internet depuis 1996 sur le site : <http://www.nf.org/nf1gene/> et sur le site Human Gene Mutation Database (HGMD) de Cardiff : <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/> pour le gène *NF1*.

Actuellement, environ 500 mutations sont référencées dans cette base de données du consortium. Les mutations sont réparties sur l'ensemble du gène, et il est à noter qu'à ce jour, aucune mutation n'a été décrite dans les exons soumis à l'épissage alternatif (9a, 23a et 48a).

Les grands remaniements du locus *NF1* sont relativement rares. La plupart des lésions moléculaires sont des mutations ponctuelles de type non-sens (modification d'un acide aminé entraînant l'arrêt de la synthèse protéique), microdélétion/microinsertion, anomalies de l'épissage responsables d'une instabilité du transcrit et/ou de la synthèse d'une protéine tronquée. Les mutations faux-sens (modification d'un acide aminé entraînant une protéine non fonctionnelle) sont assez rares.

Il n'y a pas d'aire de points chauds pour les mutations du gène *NF1* mais les exons 10 et 37 ont été identifiés comme ayant le taux de mutation le plus élevé soit environ 30% des mutations (Messiaen *et al.*, 2000).

Très peu de mutations ont été détectées dans l'extrémité 3' transcrite non traduite. Les mutations localisées dans ces régions pourraient altérer le niveau d'expression du gène ou la stabilité du messager.

Le taux de néomutations du gène *NF1* a été estimé à  $10^{-4}$  par gamète et par génération, ce qui est un taux 100 fois supérieur au taux classiquement décrit chez les mammifères. La grande taille du gène, l'existence au sein de la séquence codante de nombreux dinucléotides CpG, la présence de séquences répétées directes et de séquences palindromiques ainsi que l'existence,



ailleurs dans le génome, de séquences homologues au gène *NF1* (plus de 30 pseudo-gènes) (Fahsold *et al.*, 2000) rendent compte des causes et des mécanismes possibles d'inactivation de ce gène (Pinson & Wolkenstein, 2005).

Une analyse des nombreuses mutations a été réalisée par Fahsold *et al.* (2000) et a permis d'identifier certains domaines fonctionnels de Nf1 : le domaine GRD (GAP Related Domain) responsable de l'activité GAP (GTPase Activating Protein) de Nf1 sur Ras et un domaine en amont du domaine GRD et incluant les exons 11 à 17. Cette région coïncide avec le domaine CSRD (Cysteine/Serine Rich Domain) défini par Izawa *et al.* en 1996. Cette région est sujette à la phosphorylation par la PKA et elle régulerait l'association entre la neurofibromine et les microtubules (Gregory *et al.*, 1993).

### **1.3.4 Corrélation génotypes-phénotypes**

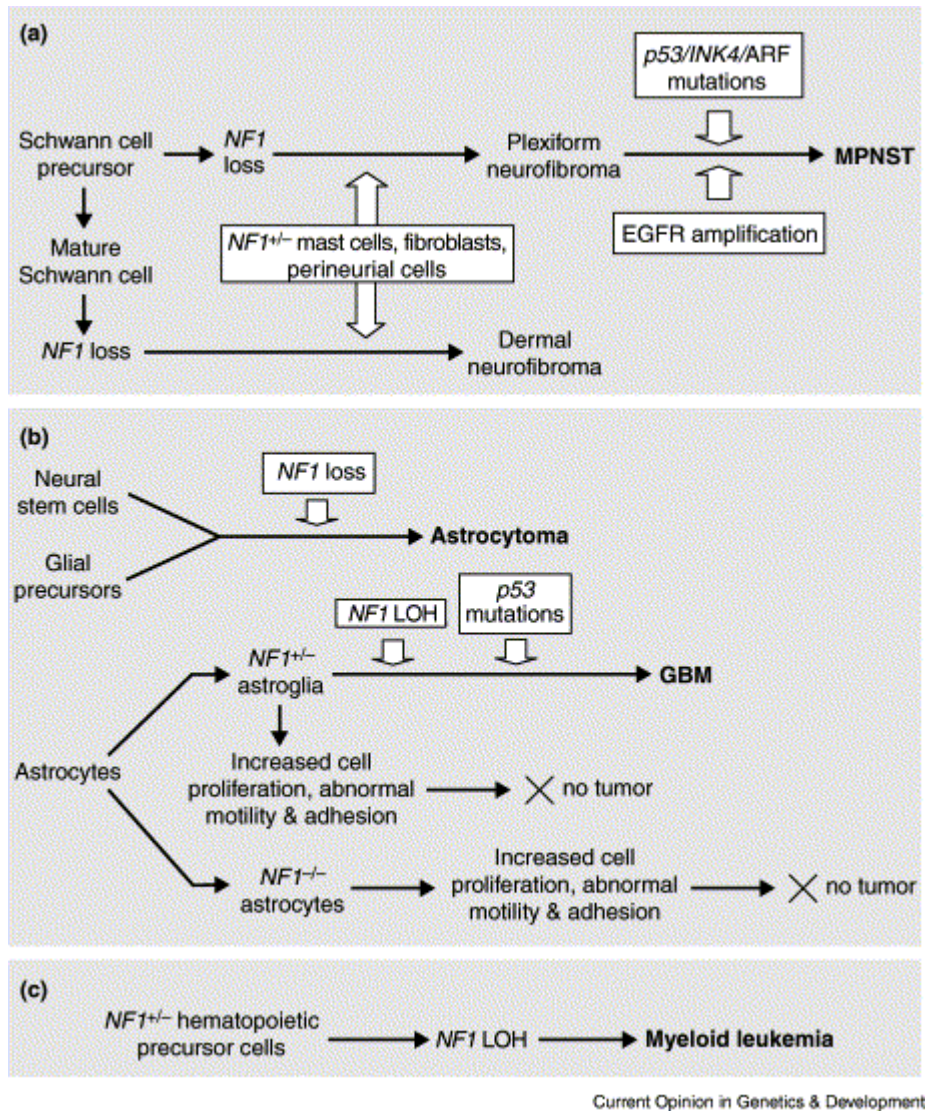
A ce jour, peu de relations entre le phénotype et les mutations du gène *NF1* ont été décrites. Cette absence de corrélation peut s'expliquer en partie par l'absence, jusqu'à une période récente, d'une recherche systématique des mutations chez les malades et par le manque d'informations cliniques fiables et complètes pour une partie des patients.

Actuellement, seules les délétions contenant l'ensemble du gène *NF1* et la région adjacente du génome semblent être corrélées avec un tableau clinique sévère comprenant des retards mentaux et/ou des troubles de l'apprentissage, une dysmorphie faciale et de nombreux neurofibromes cutanés (Wu *et al.*, 1995). A l'exception de ces grandes délétions, il n'existe aucun élément moléculaire, clinique ou familial pour prédire la gravité de la maladie.

### **1.3.5 Fonction du gène *NF1* : un gène suppresseur de tumeur**

La transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale apparaît comme la conséquence d'une succession de mutations génétiques responsables de l'activation de proto-oncogènes ou de l'inactivation d'anti-oncogènes.

Le gène *NF1* est considéré comme un anti-oncogène, c'est-à-dire un régulateur négatif de la prolifération cellulaire. Puisque le gène *NF1* apparaît être inactivé dans les tumeurs associées à la neurofibromatose, il est considéré comme agissant comme un suppresseur de tumeur (Ponder, 1992). Un ensemble de données plaide pour attribuer au gène *NF1* la fonction de gène suppresseur de tumeur, intervenant dans le processus de tumorigénèse selon le modèle de Knudson (Knudson, 1971). Ce modèle considère que deux mutations sont nécessaires à



**FIGURE 14 : Modèle de tumorigénèse associé à NF1**  
(Dasgupta & Gutmann, 2003)

(a) La perte totale de *NF1* dans les précurseurs des cellules de Schwann, et dans un contexte où les cellules environnantes (fibroblastes, cellules périneurales et mastocytes) sont hétérozygotes pour *NF1* provoque la formation de neurofibromes plexiformes. L'accumulation d'autres mutations dans p53, p16 ou p27 ou dans le contexte d'une amplification du récepteur à l'EGF favorise la transformation de ces neurofibromes en tumeurs hautement malignes. La perte de *NF1* dans les cellules de Schwann matures et dans un contexte de cellules *nf1*<sup>+/-</sup> est responsable de la formation de neurofibromes cutanés.

(b) La perte de *NF1* dans les précurseurs de cellules gliales et les cellules souches neurales provoque des astrocytomes. La perte d'hétérozygotie de *NF1* dans les astrocytes associés à des mutations dans p53 provoque la formation de glioblastomes multiformes (GBM). Cependant, la perte de *NF1* dans les astrocytes est probablement insuffisante pour la formation tumorale.

(c) La perte d'hétérozygotie de *NF1* dans les précurseurs des cellules myéloïdes provoque une hypersensibilité aux cytokines, une augmentation de la prolifération cellulaire et l'apparition de leucémies myéloïdes.

LOH : perte d'hétérozygotie

MPNST : Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors

l'apparition de tumeurs malignes : une mutation germinale, présente dès la conception des cellules, et une mutation dite somatique qui survient secondairement au sein de la cellule à partir de laquelle se développera la tumeur.

En accord avec ce modèle et bien que l'inactivation d'un seul allèle de *NF1* soit suffisante pour l'observation de plusieurs manifestations cliniques rencontrées chez les patients atteints de NF1, seule la perte d'hétérozygotie (donc de l'allèle sauvage restant) est responsable de la formation de neurofibromes (Cichowski *et al.*, 1999). Les cellules à l'origine du développement des gliomes mais aussi des neurofibromes et le moment critique auquel l'inactivation du deuxième allèle de *NF1* va être responsable de la formation des neurofibromes dans le système nerveux périphérique ont été identifiés et seront décrits dans le paragraphe 1.4.6.1. D'autre part, le développement de tumeurs malignes chez les patients atteints de NF1 nécessite la survenue d'autres mutations dans p53, Cdkn2A, Ink4, Arf ou PTEN ou bien l'amplification du récepteur au PDGF ou à l'EGF (Castle *et al.*, 2003; Zhu & Parada, 2002) (FIGURE 14).

### 1.3.6 *NF1* et la fonction neuronale

Il existe une relation entre la neurofibromatose et les difficultés d'apprentissage puisque 30 à 45% des individus atteints de NF1 en souffrent. L'épissage alternatif de *NF1* permet d'avoir 4 isoformes principales dont deux sont abondamment exprimées dans le cerveau. L'isoforme II possède l'exon 23a, qui est une région de 63pb dans l'ADN codant le domaine GRD. Cette isoforme a une plus grande affinité pour Ras que l'isoforme I, dépourvue de l'exon 23a. Par contre, l'activité GAP sur Ras de l'isoforme II est plus faible que celle de l'isoforme I. Costa *et al.* (2002) se sont interrogés sur le rôle de l'isoforme II. Pour cela, ils ont réalisé des études sur des souris homozygotes pour la mutation *nf1*<sup>23a-/-</sup>. Ils ont remarqué que ces souris étaient viables, physiquement normales et n'augmentaient pas la prédisposition au cancer. Cependant, elles présentent des altérations spécifiques d'apprentissage au niveau de l'hippocampe. Ces résultats suggèrent que l'isoforme II n'est pas indispensable au développement embryonnaire normal ou à la suppression tumorale mais qu'elle est essentielle pour le fonctionnement du cerveau. Ceci indiquerait que l'activité GAP de Nf1 (plus forte dans l'isoforme I) pourrait moduler l'apprentissage et la mémoire.

Récemment, Lush *et al.* (2008) ont montré, grâce à l'utilisation de souris ayant une délétion de *NF1* dans la majorité des neurones et des astrocytes corticaux, que *NF1* était



nécessaire à la formation de la barrière corticale dans le cortex somatosensoriel. Cette barrière corticale est constituée par les neurones corticaux de la couche IV qui forment des anneaux en organisant leur corps cellulaire et leurs dendrites au travers des axones des neurones thalamiques. Cette barrière est le témoin des communications synaptiques thalamocorticales et son absence dénote un défaut d'organisation neuronale dans le système nerveux central. D'autres protéines telles que le récepteur au glutamate NMDA, l'adénylate cyclase de type I, la PKA et la GTPase de Ras synaptique (syn GAP) sont aussi nécessaires à la formation de cette barrière dont le développement est régulé par de nombreux facteurs génétiques (Petersen, 2007). D'autres données encore, décrites en détail dans les fonctions associées à la neurofibromine (paragraphe 1.4.4) sont en accord avec un rôle dans la différenciation des neurones et la croissance des neurites (Patrakitkomjorn *et al.*, 2008; Yunoue *et al.*, 2003) ainsi que dans la synaptogénèse (Lin & Hsueh, 2008).

### 1.3.7 Epissage alternatif

Parmi les 60 exons du gène *NF1*, trois au moins sont soumis à un épissage alternatif : 9a, 23a et 48a (Andersen *et al.*, 1993). L'utilisation de ces sites d'épissage alternatif conduit à la synthèse de plusieurs isoformes de la protéine. Les différents transcrits ont une expression tissus-spécifique et semblent évoluer au cours du développement. De nouveaux variants présents chez certains patients ont été mis en évidence et présentent de hauts niveaux d'expression dans des tissus spécifiques (Vandenbroucke *et al.*, 2002).

L'isoforme I (GRDI) est la plus abondante, elle exclut l'exon 23a, et correspond à l'ARN messager dit « normal ». L'isoforme II se distingue du précédent par la présence de l'exon 23a au sein du domaine GRD. La distribution tissulaire de ces deux isoformes reste proche. Enfin, il a été démontré que l'isoforme II produisait une protéine dont l'activité GAP est diminuée (Andersen *et al.*, 1993a). Gutmann *et al.* (1995) ont examiné l'expression des deux isoformes I et II de *Nf1* dans différents tissus au cours du développement. Il apparaît qu'il n'y a pas, dans les neurones du système nerveux central, de changements nets dans l'expression des deux isoformes qui pourraient contribuer à la maturation ou à la différenciation de ces cellules. Dans les testicules en développement par contre, il y a un changement clair dans l'expression des deux isoformes : l'isoforme II est exprimée de façon prédominante durant les deux premières semaines de la vie post-natale. Il y a ensuite une nette augmentation de l'expression de l'isoforme I à partir du 14<sup>ème</sup> jour après la naissance et cela persiste à l'âge adulte.





L'isoforme contenant l'exon 48a (54pb) est présente presque exclusivement dans les tissus musculaires cardiaques, lisses et squelettiques (Gutmann *et al.*, 1995) alors que celui ayant l'exon 9a est plus favorablement observé pendant le développement embryonnaire du cerveau, dans le système nerveux central (Gutmann *et al.*, 1999). Les fonctions de ces deux dernières formes ne sont pas connues.

L'exon 43 possède un signal de localisation cellulaire qui est important pour la localisation de Nf1 dans le noyau (Vandenbroucke *et al.*, 2004). Un épissage alternatif a été détecté au niveau de cet exon (Vandenbroucke *et al.*, 2002). L'isoforme délété de l'exon 43 a une forte expression dans les poumons, le foie, le placenta, les reins et les muscles squelettiques mais est moins exprimé dans les tissus neuronaux (Vandenbroucke *et al.*, 2002). Cet épissage pourrait être utilisé afin de réguler la localisation cellulaire de Nf1.

L'épissage alternatif conduisant à ces différentes isoformes est très conservé entre les espèces, renforçant l'idée d'une différenciation fonctionnelle.

## NF1 (320 kDa)

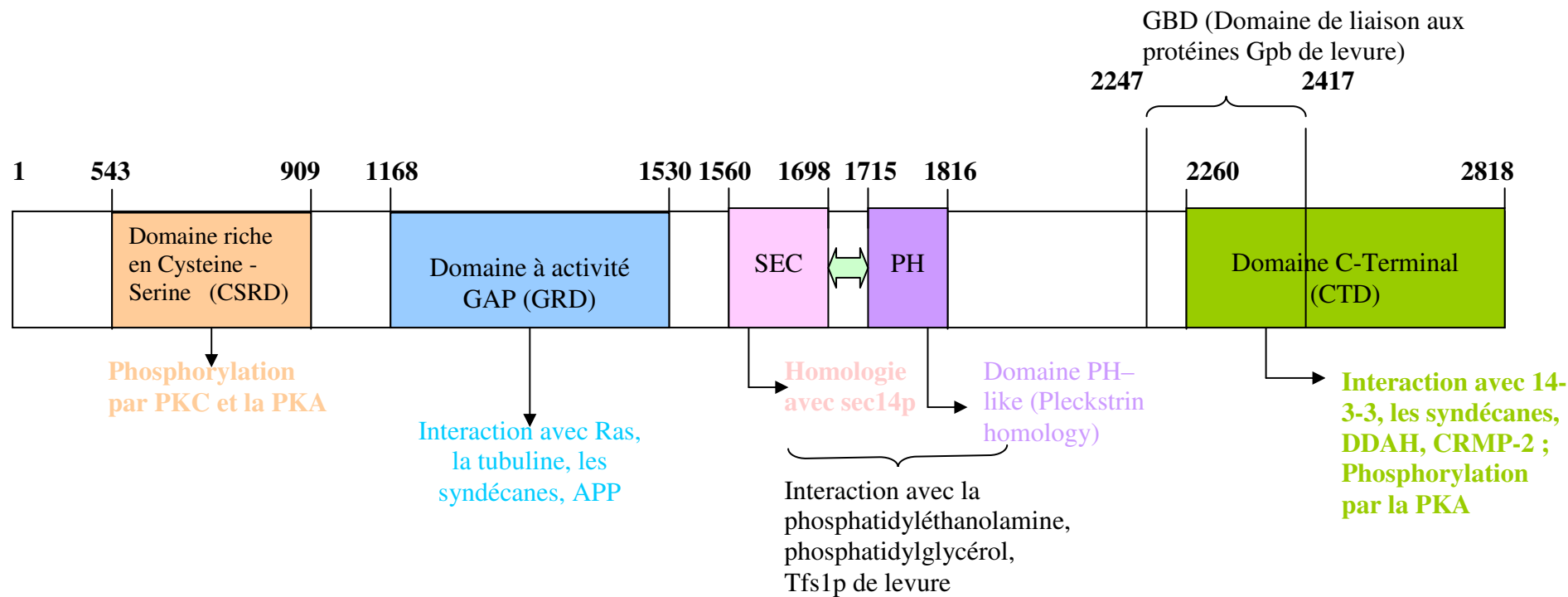


FIGURE 15 : Organisation en domaines de la neurofibromine

## 1.4 La neurofibromine

### 1.4.1 Présentation

Le gène *NF1* code une protéine appelée neurofibromine (Nf1). Il s'agit d'une grosse protéine composée de 2818 acides aminés pour une masse moléculaire de 320kDa (Marchuk *et al.*, 1991).

### 1.4.2 Organisation de la protéine

On peut identifier clairement différentes régions importantes dans l'organisation de la protéine Nf1 (FIGURE 15), comprenant deux domaines structuraux bien définis : GRD et SecPH (Trovo-Marqui & Tajara, 2006).

#### 1.4.2.1 Le domaine GRD

La neurofibromine appartient à la famille des protéines GAP de Ras (GTPases Activating Proteins) car elle possède un domaine central, GRD (GAP-Related Domain) de 330 résidus, identique environ à 30% au domaine catalytique des membres de la famille des Ras-GAP telles que les protéines p120GAP des mammifères, Ira1p et Ira2p de levure et Gap1 de la drosophile (Xu *et al.*, 1990 ; Ballester *et al.*, 1990). La région d'homologie entre Nf1, Ira1p et Ira2p s'étend en amont et en aval du domaine GRD.

La fonction commune de ces protéines est de stimuler la conversion de la forme active de p21<sup>ras</sup>, liée au GTP (Ras-GTP) en forme inactive liée au GDP (Ras-GDP) en activant la faible activité GTPase de Ras (FIGURE 16). La neurofibromine constitue donc un régulateur négatif de Ras et les mutations de *NF1*, responsables d'une perte de fonction du gène, aboutissent au maintien de Ras sous sa forme active (Ras-GTP) et à l'activation probable des voies de signalisation contrôlées par Ras : la voie des MAP Kinases (via Raf-1) et la voie PI3K (FIGURE 17). Cette cascade d'évènements entraîne une dérégulation de la croissance et/ou de la différenciation cellulaire.

La structure du domaine GRD (résidus 1198-1530 appelé NF1-333) de Nf1 a été obtenue par cristallisation aux rayons X (Scheffzek *et al.*, 1998) et révèle une protéine hélicoïdale qui ressemble au fragment correspondant dérivé de p120GAP (GAP-334) (Scheffzek *et al.*, 1996) (FIGURE 18). Nf1-333 peut être divisée en deux domaines : l'un appelé domaine central

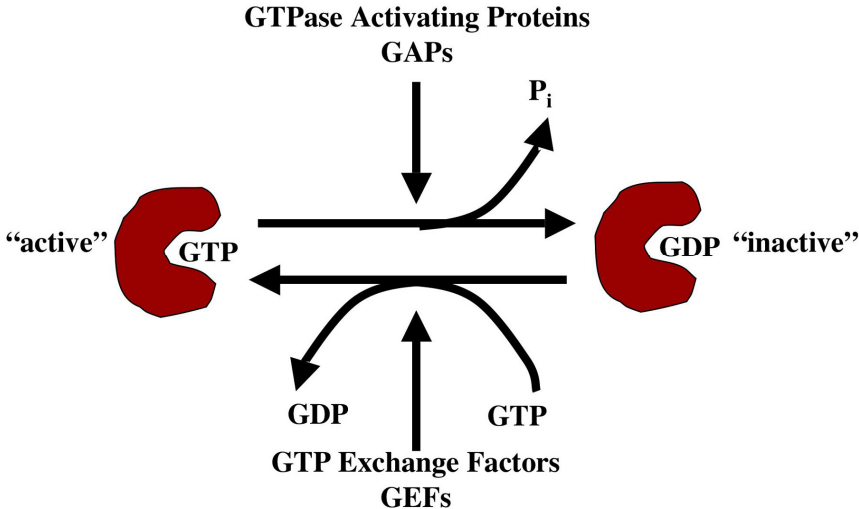


FIGURE 16: Mode d'action des protéines GAP de Ras

(NF1c) contient des résidus conservés par rapport à GAP-334 et l'autre appelé domaine extra (NF1ex) est moins homologue à GAP-334. Le domaine central coïncide avec le fragment minimal catalytique de la neurofibromine.

Les protéines à activité GAP telles que Nf1 et p120GAP se lient à Ras-GTP pour occuper efficacement son site actif. Ahmadian *et al.* (2003) ont cherché à déterminer les régions importantes dans les protéines GAP de Ras : une boucle en doigt arginine, une région FLR (phenylalanine-leucine-arginine) et une boucle variable  $\alpha 7$  contiennent les empreintes structurales gouvernant la fonction GAP. Le doigt arginine joue un rôle primordial dans la stabilisation de l'état de transition de la réaction GTPase. La fonction GTPase de Ras est contrôlée par des résidus proches de l'arginine catalytique et ces derniers déterminent l'orientation spécifique et le positionnement du doigt d'arginine du GRD dans le site actif de Ras. La région FLR contribue indirectement à la stimulation de l'activité GTPase stabilisant les régions variables de Ras. Enfin, la boucle variable  $\alpha 7$  possède plusieurs résidus conservés qui sont impliqués dans de nombreuses interactions avec la région « switch 1 » de Ras, qui détermine la spécificité de l'interaction entre Ras et les protéines GAP de Ras (Ahmadian *et al.*, 2003).

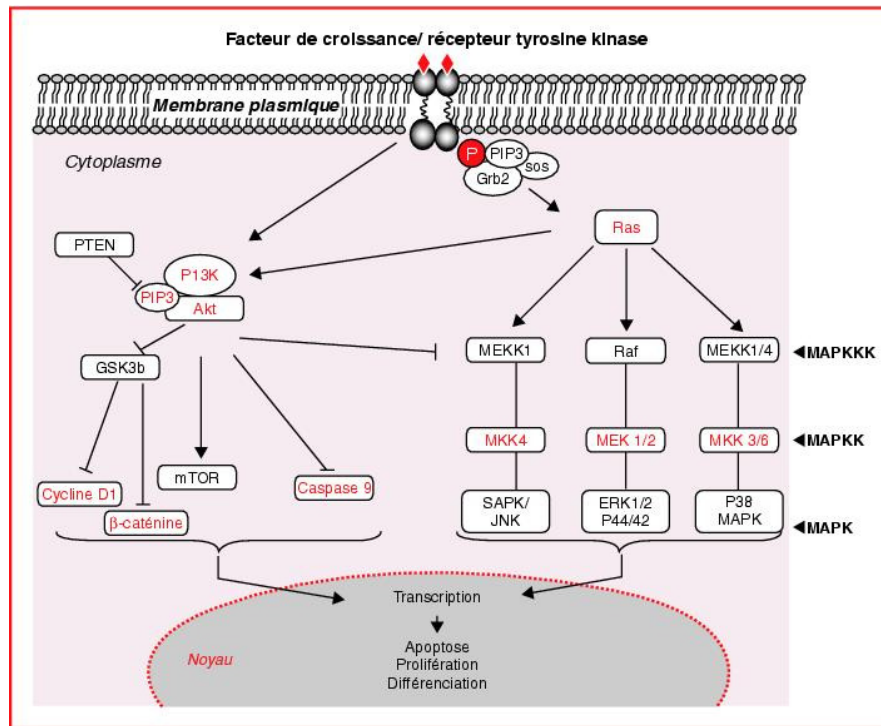
Outre son interaction avec Ras, le domaine GRD interagit également avec d'autres protéines telles que la tubuline (Xu & Gutmann, 1997), les syndécanes (Hsueh *et al.*, 2001) et l'APP (Amyloid Precursor Protein) (De Schepper *et al.*, 2006).

Le domaine GRD, important pour la fonction de la protéine, ne représente qu'une partie de la protéine (environ 10%) ce qui laisse penser que d'autres régions peuvent être importantes.

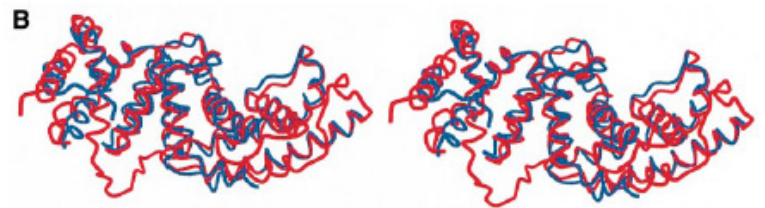
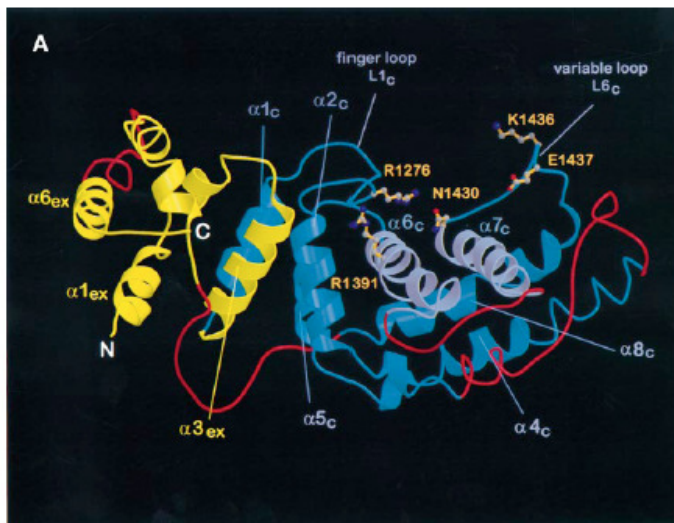
#### 1.4.2.2 Le domaine Sec-PH

Récemment, une nouvelle région de la protéine Nf1 a été identifiée par D'Angelo *et al* (2006). Elle représente 9% de la protéine totale. Il s'agit d'un fragment de 256 résidus situé en C-terminal du domaine GRD. Cette région est composée de deux modules :

- un module d'homologie à Sec14, qui est un site de fixation aux lipides (Sha *et al.*, 1998). Les domaines de type Sec14 ont été identifiés initialement dans la protéine Sec14p chez la levure. Ces domaines ont été retrouvés dans un grand nombre de protéines liant les lipides et également dans plusieurs protéines impliquées dans la signalisation cellulaire telles que les RhoGEFs, RhoGAPs et RasGAPs (Aravind *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 1999). D'un



**FIGURE 17 : Représentation des voies MAP Kinases et PI3K**  
(Suau *et al.*, 2006)



**FIGURE 18 : Structure du domaine GRD de Nf1 (NF1-333)**  
(Scheffzek *et al.*, 1998)

A. Représentation en ruban du modèle NF1-333. Le domaine central (NF1<sub>c</sub>) est représenté en bleu et le domaine extra (NF1<sub>ex</sub>) en jaune. Les régions qui ne sont pas visibles sur ce modèle sont « complétées » par les segments correspondants dérivés du modèle GAP-334 et sont représentées en rouge. Les hélices α6<sub>c</sub> et α7<sub>c</sub> forment le bas du sillon de liaison à Ras et sont schématisées en bleu clair.

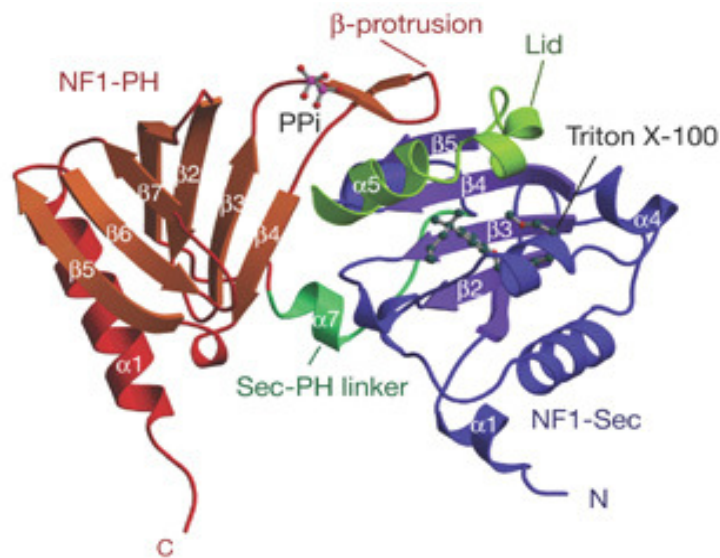
B. Représentation en superposition des structures générales de Nf1-333 (bleu) et GAP-334 (rouge).

point de vue structural, ces domaines forment une cavité dans laquelle des ligands hydrophobes se nichent comme cela a été identifié pour la protéine Sec14p (Sha *et al.*, 1998). La comparaison des structures des protéines homologues à Sec14 à celle du domaine Sec de Nf1 a permis à D'Angelo *et al.* (2006) de suggérer que le domaine Nf1-Sec adopterait une conformation fermée. Une hélice,  $\alpha 5$ , jouerait un rôle de couvercle au dessus de la cavité et serait maintenue par une interaction forte avec une protrusion de type  $\beta$ , dérivée de la région C-terminale du domaine PH adjacent. La transition de Nf1-Sec dans une conformation ouverte et donc une conformation susceptible d'accepter des ligands dans la cavité nécessite des changements conformationnels au niveau de la protrusion  $\beta$ . Le domaine PH étant un module d'interaction protéique, des interactions avec ce domaine pourraient induire des changements conformationnels de la protrusion  $\beta$  permettant l'ouverture du couvercle constitué par l'hélice  $\alpha 5$  et ainsi la liaison d'un second ligand dans la cavité du module Sec (FIGURE 19).

- un module de type PH (Pleckstrin Homology). Initialement, il a été montré que ce module était un domaine de fixation au Phosphatidyl Inositol, impliqué dans les processus de recrutement aux membranes (Mayer *et al.*, 1993). Puis, des études plus récentes ont identifié ce domaine comme un module d'interaction protéine-protéine dans la signalisation cellulaire (Lemmon, 2004). La possibilité que ce domaine interagisse avec des protéines augmente les chances de découvrir de nouveaux partenaires de Nf1 par double hybride ou par des expériences de co-précipitation afin d'obtenir de nouvelles informations sur sa fonction.

Ces deux modules, Sec et PH, sont connectés par un peptide hélicoïdal ( $\alpha 7$ ). Le rôle biologique de ce domaine Sec-PH n'a pas été clairement déterminé à ce jour. Cependant, il a été récemment montré, en combinant des expériences de spectrométrie de masse et de cristallographie aux rayons X, que des glycérophospholipides se liaient à l'intérieur de la cavité du domaine Sec de Nf1, en particulier la phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylglycérol (D'Angelo *et al.*, 2006; Welti *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter que la phosphatidyléthanolamine est un lipide majeur des membranes dans les cellules eucaryotes puisqu'il représente plus de 15% des phospholipides totaux dans les cellules neuronales (Calderon & DeVries, 1997) et plus de 45% dans certains tissus de *Drosophila melanogaster* où l'homologue de Nf1 est exprimé (Jones *et al.*, 1992; Vance, 2003).





**FIGURE 19 : Représentation en ruban du domaine Sec-PH de Nf1**  
(D'Angelo *et al.*, 2006)

Cette représentation montre clairement l'architecture des deux modules. Le module Sec (en bleu) est un domaine à repliement  $\alpha/\beta$ , caractéristique des domaines Sec14-like, et un feuillet  $\beta$  central formant le bas de la cavité hydrophobe qui est fermée par des hélices et contient une molécule de triton.

Le module PH est composé d'un repliement en sandwich  $\beta$  encadré par une hélice C-terminale qui est typique des domaines PH-like. Comme dans d'autres modules PH, une boucle est visible entre les brins  $\beta 3$  et  $\beta 4$ . Dans Nf1, cette boucle forme une petite protrusion  $\beta$ , composée de deux petits brins  $\beta$  antiparallèle. Cette protrusion stabilise l'hélice  $\alpha 5$  du module Sec qui forme ainsi un couvercle au dessus de sa cavité.

De plus, comme le domaine Sec-PH correspond à la région d'Ira2p qui interagit avec Tfs1p, nous pensons qu'il pourrait interagir avec différentes protéines et permettre ainsi de moduler l'activité du domaine GAP.

#### 1.4.2.3 Les domaines CSRD et CTD

La neurofibromine possède également un domaine CSRD (Cystein/Serine – Rich Domain) et un domaine CTD (C-Terminal Domain) qui sont des sites potentiels de phosphorylation (Tokuo *et al.*, 2001).

Le domaine CSRD possède plusieurs résidus cystéines pouvant constituer un domaine de liaison à l'ATP et 3 sites potentiels de phosphorylation par la PKA dont la signification fonctionnelle reste inconnue. Izawa *et al.*, 1996 ont mis en évidence la phosphorylation de la protéine Nf1 dans les régions N et C-terminales du domaine CSRD. Il existe également des sites de phosphorylation par la PKC dans ce domaine (Mangoura *et al.*, 2006).

Le domaine CTD, quant à lui, est également une cible de phosphorylation par la PKA (Feng *et al.*, 2004). Ces auteurs ont mis en évidence l'interaction entre le domaine CTD de Nf1 et une protéine 14-3-3, protéine multifonctionnelle régulant plusieurs voies de signalisation cellulaire. Feng *et al.* (2004) ont de plus montré qu'il était nécessaire d'avoir une phosphorylation PKA-dépendante sur les sérines 2576, 2578, 2580, 2813 et sur la thréonine 2556 afin d'avoir une interaction avec 14-3-3. L'augmentation de phosphorylation suivie de l'interaction avec 14-3-3 régulerait négativement l'activité GAP de la neurofibromine. De plus, ce domaine interagit avec d'autres protéines telles que la DDAH (N(G),N(G)-diméthylarginine diméthylaminohydrolase) (Tokuo *et al.*, 2001) et les syndécans (Hsueh *et al.*, 2001).

Le rôle de l'interaction entre Nf1 et la syndécane-2 via le domaine CTD de Nf1 a été récemment éclairci par Lin *et al.* (2007) et sera décrit dans le paragraphe 1.4.4.3.

Très récemment, Patrakitkomjorn *et al.* (2008) ont recherché de façon systématique, par copurification, les protéines se liant au CTD de Nf1. Ils en ont identifié 58 par spectrométrie de masse. L'interaction avec CRMP-2 (Collapsin Response Mediator Protein-2) impliquée dans la croissance des axones, a été mise en évidence par ces auteurs et de façon concomitante



par Lin et Hsueh (2008) qui ont aussi montré une interaction avec CRMP-4 et la chaîne  $\alpha$  de la propionyl CoA carboxylase. Le rôle de l'interaction entre Nf1 et CRMP-2 a été bien étudié par Patrakitkomjorn *et al.* (2008) et sera détaillé dans le paragraphe 1.4.4.2.

#### 1.4.2.4 Le domaine GBD

Récemment, le domaine GBD (Gpb Binding Domain), partiellement inclus dans le domaine CTD a été mis en évidence par Harashima *et al.* (2006) dans Ira2p. Il est responsable de l'interaction d'Ira2p avec les protéines kelch, homologues de sous-unités  $\beta$  de protéines G hétérotrimériques, les protéines Gpb1p et Gpb2p.

Il est à noter que seuls les domaines GRD et Sec-PH dont la structure 3D a été déterminée constituent des entités structurales à part entière.

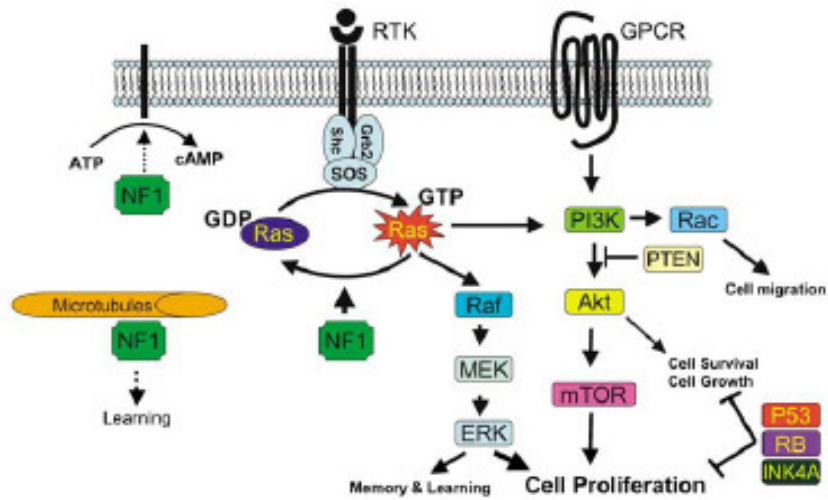
### 1.4.3 Localisation de la protéine Nf1

Des études de localisation subcellulaire ont montré dans un premier temps que Nf1 se trouvait dans les fractions solubles du cytoplasme (DeClue *et al.*, 1991) grâce à des expériences de fractionnement cellulaire.

La protéine Nf1 a ensuite été trouvée associée aux microtubules par immunofluorescence dans des fibroblastes de souris NIH3T3 et dans des fibroblastes PTK1 (female rat kangaroo kidney epithelial cells) (Gregory *et al.*, 1993).

Depuis quelques années, il a été montré que de nombreux gènes suppresseurs de tumeur font la « navette » entre le noyau et le cytoplasme (Hood & Silver, 2000). Ce type de mouvement intracellulaire régule la localisation de la protéine mais également sa fonction. La neurofibromine apparaît comme une protéine majoritairement cytoplasmique, avec différents types cellulaires montrant une localisation subcellulaire variable. En effet, plusieurs études ont montré que Nf1 pouvait être localisée dans le noyau (Daston & Ratner, 1992; Li *et al.*, 2001) mais la fonction de cette protéine dans le noyau et la régulation de son importation nucléaire restent imprécises.

Outre une localisation nucléaire de Nf1 dans les neurones télencéphaliques à différents stades de maturation, Li *et al.* (2001) ont aussi montré par immunofluorescence une colocalisation entre Nf1 et la F-actine pendant la première phase de différenciation. Durant la seconde phase de différenciation, par contre, Nf1 colocalise avec les microtubules mais pas la F-actine.



**FIGURE 20 : Représentation de la plurifonctionnalité de la neurofibromine**  
(Le & Parada, 2007)

Nf1 réprime l'activité Ras dans les cellules normales. La perte de l'expression de *NF1* conduit à une activité élevée de Ras, ce qui provoque une dérégulation de la croissance cellulaire et de la tumorigénèse.

Nf1 est également associée aux microtubules et module la voie de signalisation AMPc/PKA.

Plus récemment, un autre groupe a observé la localisation de fragments de Nf1 fusionnés à la GFP dans des cellules COS après transfection. Ils ont ainsi trouvé l'existence d'un NLS (Nuclear Localization Signal) situé dans l'exon 43. Des mutations au niveau de ce NLS bloquent complètement l'entrée de Nf1 dans le noyau (Vandenbroucke *et al.*, 2004).

#### 1.4.4 Fonction de la neurofibromine

La neurofibromine, de part sa grande taille et la présence de différents domaines, a les caractéristiques d'une protéine plurifonctionnelle (FIGURE 20). Les différentes fonctions dont elle est responsable sont détaillées ci-dessous.

##### 1.4.4.1. Rôle régulateur de RAS

###### 1.4.4.1.1 Le domaine GRD de Nf1 est un inhibiteur de Ras

La fonction la plus connue de la protéine Nf1 est son action due à la présence d'un domaine GRD. Les protéines GAP de Ras interagissent avec la forme active de Ras, Ras-GTP et stimulent l'activité GTPase intrinsèque de Ras pour permettre l'hydrolyse du GTP en GDP. Ainsi Ras est convertie dans sa forme inactive, Ras-GDP. Cette fonction de Nf1 a été mise en évidence grâce au clonage et à l'identification dans Nf1 d'une région homologue à d'autres protéines GAP (Ballester *et al.*, 1990). La structure 3D du complexe entre H-Ras et une protéine GAP humaine, p120GAP (GAP-334) a été déterminée et montre que l'interaction entre les deux molécules implique des régions hydrophobes et hydrophiles des deux protéines (Scheffzek *et al.*, 1997). Le mécanisme d'inhibition a été développé dans le paragraphe 1.4.2.1

L'interaction entre Nf1 et Ras-GTP et la stimulation de l'activité GTPase de Ras ont été démontrées (Martin *et al.*, 1990). Dans les cellules, la perte de Nf1 provoque donc une hyperactivation de Ras. Les conséquences de cette augmentation de l'activité de Ras se manifestent par l'activation de divers effecteurs de Ras incluant la voie Raf/MEK/ERK1/2, la voie PI3K/Akt/Tor et la voie Rac (FIGURE 20) (Rubin & Gutmann, 2005). Certains de ces signaux sont ensuite transmis au noyau pour réguler l'expression de gènes contrôlant la prolifération cellulaire, la mort cellulaire, la différenciation et la migration.

Le domaine GRD de Nf1 a également la capacité de stimuler l'activité GTPase des protéines Ras2p de levure et H-Ras mais ne stimule pas l'activité GTPase des protéines Ras oncogénique H-Ras<sup>val-12</sup> et RAS2<sup>val-19</sup> de levure (Xu *et al.*, 1990).



L'analyse des séquences des différents domaines GRD des protéines GAP de Ras a montré une forte similarité entre Nf1, les protéines Ira de levure et p120GAP. Ces domaines homologues interagissent avec Ras. Des études ont montré que la surexpression de la séquence codante pour le domaine GRD de Nf1 est capable de supprimer la sensibilité au choc thermique des mutants *ira1* et *ira2* (Ballester *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1990). Ces résultats impliquent que le domaine catalytique GRD de Nf1 doit être capable de stimuler l'activité GTPase des protéines Ras de levure.

#### 1.4.4.1.2. Diminution de l'inhibition de Ras et tumorigénèse

Les cellules tumorales dérivées de malades atteints de NF1 et de souris *nf1*<sup>-/-</sup> et *nf1*<sup>+/-</sup> ont été utilisées pour tester l'activité de Ras. Il apparaît que le taux de Ras-GTP et l'activation de certains effecteurs de Ras y sont plus élevés (Bajenaru *et al.*, 2001; Basu *et al.*, 1992; DeClue *et al.*, 1992; Sherman *et al.*, 2000). L'utilisation de modèles murins a permis de montrer que les cellules néoplastiques à l'origine des gliomes étaient les astrocytes et celles à l'origine des neurofibromes étaient les précurseurs des cellules de Schwann (Bajenaru *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2002). L'importance d'un contexte hétérozygote pour *NF1* (*nf1*<sup>+/-</sup>) dans les cellules environnantes a été soulignée dans certains cas (Bajenaru *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2002).

Il apparaît que les astrocytes de souris *nf1*<sup>+/-</sup> ont une voie Ras activée et une forte prolifération mais ils présentent aussi un attachement et une motilité anormale (Gutmann *et al.*, 1999; Gutmann *et al.*, 2001). Ces phénotypes liés à l'activation de Ras jouent très probablement un rôle dans la formation des gliomes. Des études sur les mastocytes et les cellules hématopoïétiques *nf1*<sup>+/-</sup> ont aussi démontré une forte prolifération associée à l'activation de Ras. Ces deux phénomènes sont réversés par l'introduction du domaine GRD de Nf1 dans les cellules. Par contre, un tel effet n'est pas observé après l'introduction du domaine GRD de p120GAP démontrant une spécificité de Nf1 vis à vis de la régulation de Ras (Hiatt *et al.*, 2001).

Les cellules de Schwann *nf1*<sup>-/-</sup> ont un potentiel angiogénique et invasif *in vitro* et elles ont un taux élevé de Ras-GTP (Kim *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1995; Sheela *et al.*, 1990). De plus, elles ont une morphologie anormale, similaire aux cellules exprimant Ras oncogénique. Enfin, Harrisingh *et al.* (2004) ont montré que la suractivation de Ras conduisait à la





dédiérenciation des cellules de Schwann. L'ensemble de ces phénotypes liés à l'activation de Ras joue un rôle dans la formation des neurofibromes.

#### 1.4.4.1.3. Diminution de l'inhibition de Ras et les problèmes cognitifs

L'activité de Ras et de ses effecteurs a été montrée comme étant accentuée dans le cortex et l'hippocampe de souris *nf1*<sup>+/-</sup>, conduisant à des anomalies dans les phénomènes de potentialisation à long terme qui sont des événements clés dans l'apprentissage et la mémoire (Costa *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005). En combinant des manipulations génétiques et pharmacologiques qui diminuent l'activité de Ras, ces auteurs ont pu montrer que les déficits d'apprentissage dans les souris *nf1*<sup>+/-</sup> étaient abolis.

Cela signifie que l'activation de Ras, conséquence de mutations dans *NF1*, est au moins partiellement responsable des problèmes d'apprentissage et de mémoire rencontrés dans les mutants *nf1* de souris et suggèrent un lien avec ces mêmes problèmes chez les patients atteints de la maladie.

D'autres données, utilisant le modèle murin vont dans le même sens. Elles ont été obtenues en générant des souris qui n'étaient plus capables de produire l'une des deux isoformes de Nf1 (isoforme II, Nf1-II), abondamment exprimée dans le cerveau. L'isoforme II de Nf1 contient l'exon 23a qui code pour 21 acides aminés supplémentaires dans le domaine GRD. L'isoforme I (Nf1-I), quant à elle, ne possède pas cet exon. Il apparaît que l'activité GAP de Nf1-I est plus forte que celle de Nf1-II. Les souris *nf1*<sup>23a/23a</sup> qui sont uniquement capables de produire l'isoforme I de Nf1 dans le cerveau se développent normalement et ne sont pas susceptibles à la formation de tumeurs. Par contre, elles possèdent les mêmes difficultés d'apprentissage que les souris *nf1*<sup>+/-</sup>. Ainsi, une activité GAP plus forte et des quantités de Ras-GTP plus faibles conduisent ici à des difficultés d'apprentissage.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'un taux anormalement élevé ou abaissé de Ras-GTP affecte l'apprentissage et la mémoire.

Il est connu depuis plusieurs années et par de nombreuses expériences que la voie MAPK, l'un des effecteurs de Ras, joue un rôle important dans le comportement, la mémoire, l'apprentissage spatial ainsi que la plasticité synaptique (Shalin *et al.*, 2006). Il n'est donc pas très étonnant que le rôle de Nf1 sur Ras puisse être impliqué dans ces phénomènes.



Yunoue *et al.* (2003) ont de plus mis en évidence un nouveau rôle de la fonction GAP de la neurofibromine dans la croissance des neurites de cellules neuronales (cellules PC12 et neurones de l'hippocampe de rat). Dans des cellules PC12, l'activité GAP de Nf1 augmente après stimulation par le NGF, ce qui est à corréluer avec l'inhibition de Ras pendant l'élongation des neurites. Cette augmentation de l'activité GAP de Nf1 est due à l'expression préférentielle de l'isoforme I de Nf1. D'autre part, Patrakitkomjorn *et al.* (2008) ont récemment montré que Nf1 régulait négativement les kinases Cdk5, Gsk3- $\beta$  et RhoK qui phosphorylent et inactivent CRMP-2 qui est impliquée dans la croissance des neurites dans les cellules PC12. Cette régulation serait liée à l'activité GAP de Nf1 car ces kinases sont stimulées par une forte activité de Ras.

L'ensemble de ces résultats démontrent que la régulation de Ras et du domaine GRD de Nf1 est essentielle à la différenciation neuronale et qu'une régulation anormale de l'activité GAP de Nf1 dans les cellules neuronales pourrait être impliquée dans les troubles d'apprentissage et de mémoire de la NF1.

#### 1.4.4.1.4. Régulation de l'activité du domaine GRD

Même si l'inhibition de Ras n'est pas la seule fonction de Nf1, elle apparaît jouer un rôle important dans la tumorigénèse et les difficultés d'apprentissage. Ainsi, l'activité GAP de Nf1 dans les cellules est très probablement un phénomène finement régulé et sa dérégulation joue peut être un rôle dans l'apparition de la maladie.

Récemment, Mangoura *et al.* (2006) ont démontré que la voie PKC jouait un rôle dans l'activation de l'activité GAP de Nf1. Après activation de la PKC, ces auteurs ont pu montrer que Nf1 était phosphorylée au niveau de son domaine CSRD et que cette phosphorylation favorisait l'association de Nf1 avec l'actine et stimulait son activité GAP. Les voies PKC et Ras étant fréquemment activées en même temps, il a été suggéré que ce phénomène serait éventuellement un moyen de contrôler rétroactivement et négativement Ras et de réorienter la réponse cellulaire qui était à l'origine une prolifération vers une migration.

Il a été montré que des lipides spécifiques tels que l'acide arachidonique, l'acide phosphatidique, l'acide oléique ou stéarique inhibent l'activité GAP de la protéine Nf1 *in vitro*, mais l'importance de ces résultats n'a pas été déterminée *in vivo* (Bollag & McCormick, 1991). La mise en évidence récente d'un nouveau domaine fonctionnel, Sec-PH, capable de lier les phospholipides relance actuellement ce type de recherche mais aucune donnée n'est



connue actuellement sur l'effet de la fixation de la phosphatidyléthanolamine au Sec-PH de Nf1 sur son activité GAP.

D'autre part, Bollag *et al.* (1993) ont montré que la tubuline inhibait *in vitro* l'activité GAP de Nf1. Or, la tubuline est un ligand *in vivo* du domaine GAP de Nf1 et Li *et al.* (2001) ont colocalisé par immunofluorescence Nf1 et les microtubules dans les neurones télencéphaliques durant leur seconde phase de différenciation. Cette interaction est régulée puisqu'elle disparaît au profit d'une interaction avec l'actine lorsque les neurones sont dans leur première phase de différenciation. Ces variations d'interaction pourraient correspondre à une régulation de l'activité GAP de Nf1.

Dans la levure, l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse a montré que Tfs1p interagissait avec le domaine Sec-PH d'Ira2p et que cela inhibait son activité GAP. Bien que l'on ne connaisse pas le mécanisme de cette inhibition, il pourrait être conservé chez l'homme et contribuer à réguler l'activité GAP de Nf1.

Cichowski *et al.* (2003) ont montré que Nf1 était ubiquitinylée et dégradée par le protéasome en réponse à des facteurs de croissance. Cette ubiquitinylation implique une région de 80 acides aminés en amont du domaine GRD. La cinétique de dégradation de Nf1 est inversement proportionnelle à la cinétique d'activation de Ras. Ce type de régulation sur Nf1 permettrait de moduler à la fois l'amplitude et la durée de l'activation de Ras.

Si le rôle de la neurofibromine vis-à-vis de la régulation de l'activité Ras par l'intermédiaire de son domaine GAP est bien défini, d'autres rôles ont été mis en évidence pour cette protéine. De plus, le domaine GRD ne représente que 10% de la protéine totale, ce qui suggère que d'autres régions de Nf1 pourraient avoir un rôle important dans la croissance, la migration cellulaire ou tout autre processus pouvant jouer un rôle dans le développement de la maladie.

#### 1.4.4.2 Nf1 et le réarrangement du cytosquelette

Plusieurs études convergent vers un rôle de Nf1 dans l'organisation du cytosquelette. En effet, Hsueh et ses collaborateurs (2001) ont montré que Nf1 était capable d'interagir avec les membres de la famille des Syndécans. Ces protéines sont des molécules de surface de la famille des protéoglycans héparane-sulfate qui agissent comme co-



récepteurs pour de multiples ligands extracellulaires (Carey, 1997). Tous les membres de la famille des syndécanes ont un domaine transmembranaire hydrophobe, un domaine extracellulaire ayant plusieurs sites de fixation aux glucosaminoglycanes (héparane sulfate) et un petit domaine intracellulaire capable d'induire une réorganisation du cytosquelette (Carey, 1997). Récemment, Lin *et al.* (2007) ont montré que Nf1 jouait un rôle dans le réarrangement du cytosquelette impliqué dans la formation des filopodes et des épines dendritiques via son interaction avec la syndécan-2. Compte tenu de l'implication de la voie AC/PKA dans ce phénomène, il sera décrit dans le paragraphe suivant.

De plus, il a été évoqué dans le paragraphe précédent qu'une colocalisation entre Nf1 et l'actine était observée pendant la première phase de différenciation des neurones télencéphaliques. Cette interaction est remplacée par une interaction entre Nf1 et les microtubules dans la seconde phase de différenciation de ces neurones (Li *et al.*, 2001). La zone d'interaction entre Nf1 et l'actine ou les microtubules résiderait dans le domaine GRD car les mutations des résidus R1391, P1400 et K1423 diminuent l'association avec les microtubules tandis que l'insertion de l'exon 23a, les mutations des résidus E1264, Q1426 n'ont aucun effet sur cette association (Xu & Gutmann, 1997). Nf1 peut également prendre part à des complexes impliquant la kinésine (Hakimi *et al.*, 2002; Patrakitkomjorn *et al.*, 2008).

A l'aide d'une technique utilisant les ARNi, des études récentes ont montré que la neurofibromine régulait dynamiquement la réorganisation du cytosquelette d'actine, et augmentait la motilité cellulaire (Ozawa *et al.*, 2005). L'extinction de la synthèse de Nf1 à l'aide d'ARNi provoque une phosphorylation élevée de la cofiline qui intervient dans la dépolymérisation de l'actine et sa réorganisation. Cette phosphorylation inactive la protéine et la réorganisation des filaments d'actine. Ainsi l'extinction de l'expression de *NF1* inactive la dépolymérisation de l'actine et l'invasion et la motilité cellulaire. Ozawa *et al.* (2005) ont montré que c'était via l'inhibition de la voie Rho-ROCK-LIMK2 que Nf1 exerçait son action sur la cofiline. De plus, l'expression exogène du domaine GRD est capable de supprimer les phénotypes induits par l'extinction de Nf1 par les ARNi. Ce nouveau rôle de la neurofibromine dans la machinerie de réorganisation du cytosquelette d'actine affecte l'adhésion et la motilité cellulaire. Un tel mécanisme pourrait être impliqué dans la formation de multiples neurofibromes chez des patients atteints de neurofibromatose.



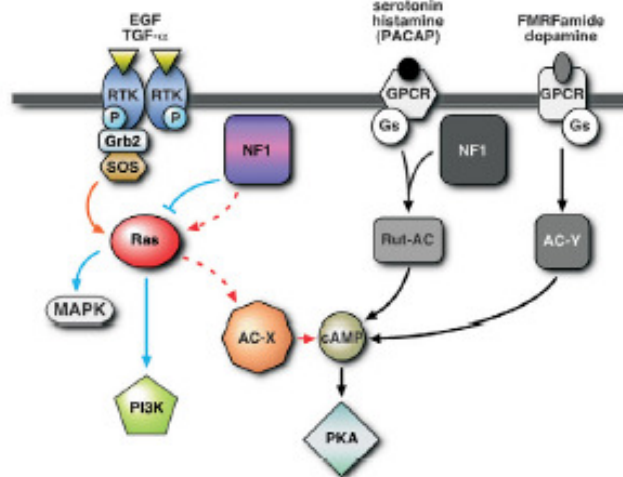


Enfin, très récemment, Patrakitkomjorn *et al.* (2008) ont montré l'implication de Nf1 dans la différenciation neuronale des cellules PC12 via son association à la protéine CRMP-2. CRMP-2 interagit avec la tubuline et la chaîne légère de la kinésine et elle intervient dans la croissance des axones. Elle est active et interagit avec la tubuline dans une forme non phosphorylée mais est inactive et n'interagit plus avec la tubuline lorsqu'elle est phosphorylée par Cdk5, Gsk3 $\beta$  ou RhoK. Patrakitkomjorn *et al.* (2008) ont montré que Nf1 maintenait CRMP-2 dans un état actif et la protégeait de la phosphorylation de deux façons : (1) soit directement en interagissant avec elle ; (2) soit indirectement en régulant négativement les kinases phosphorylant CRMP-2.

L'activité GAP de Nf1 pourrait jouer un rôle dans le processus de régulation négative des kinases car ces dernières sont stimulées par une forte activité de Ras.

#### 1.4.4.3 Stimulation de l'Adénylate Cyclase

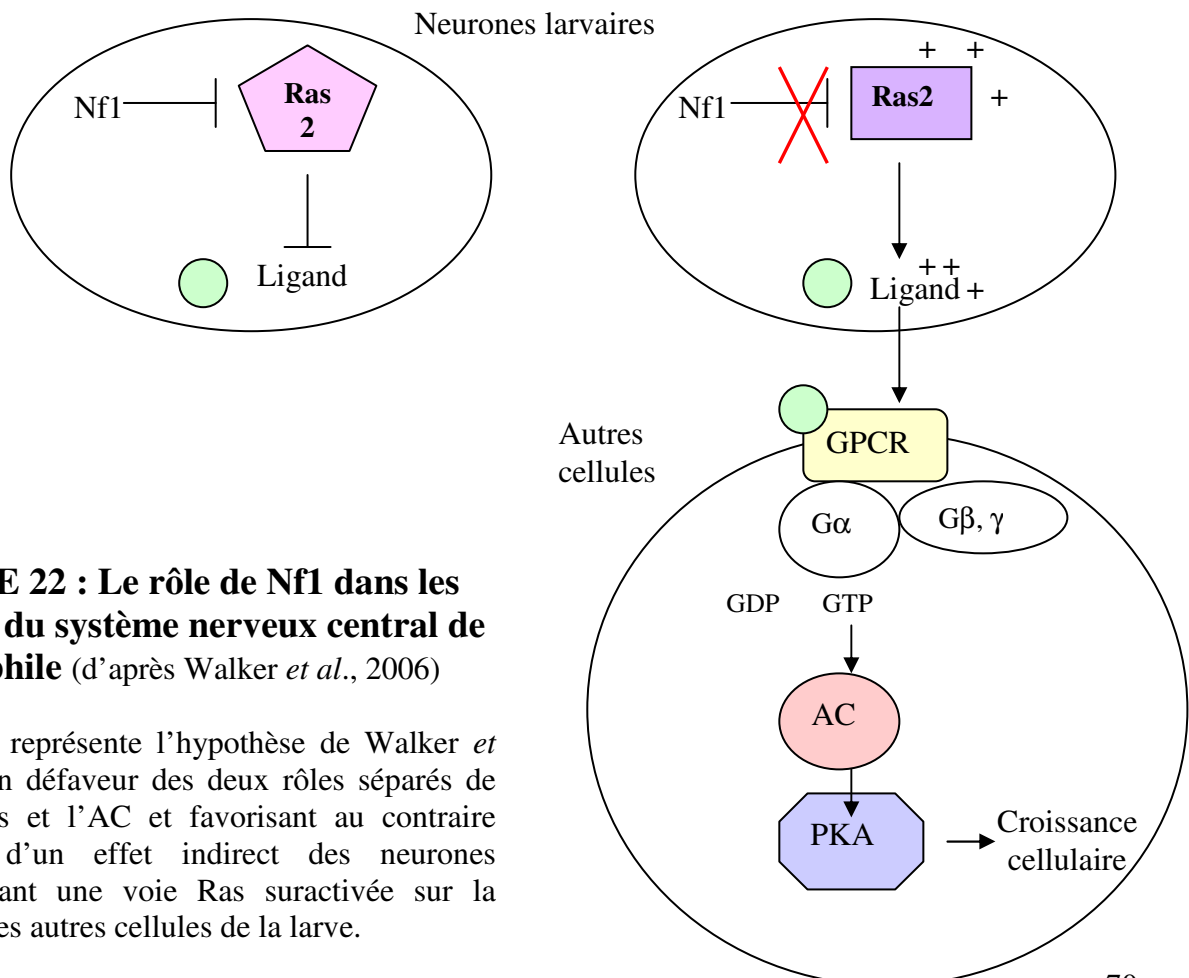
*Drosophila melanogaster* possède un homologue de Nf1 qui a 60% d'identité avec la protéine Nf1 humaine. Les mutants nuls pour *NF1* chez la drosophile sont viables et fertiles mais ils sont de taille plus petite (15 à 20% de réduction) (The *et al.*, 1997), ont un rythme circadien affecté (Williams *et al.*, 2001), ne possèdent pas une voie en réponse à des neuropeptides (Guo *et al.*, 1997) et présentent un déficit olfactif (Guo *et al.*, 2000). Alors que l'effet sur le rythme circadien est partiellement restauré par des mutations qui atténuent la signalisation via Ras (Williams *et al.*, 2001), tous les autres phénotypes sont supprimés en activant la voie AMPc/PKA (Guo *et al.*, 1997 ; Guo *et al.*, 2000 ; The *et al.*, 1997). Ce lien fonctionnel entre Nf1 et la voie AMPc/PKA existe aussi chez les mammifères puisque Tong *et al.* (2002) ont détecté un taux réduit d'AMPc dans des embryons de souris *nfl*<sup>-/-</sup> par rapport à des embryons *nfl*<sup>+/-</sup> (Tong *et al.*, 2002). D'autre part, Dasgupta *et al.* (2003) ont montré que l'inactivation de Nf1 dans les astrocytes provoquait la génération d'un taux réduit d'AMPc en réponse au neuropeptide PACAP favorisant l'hypothèse d'une fonction activatrice de Nf1 sur l'adénylate cyclase. Utilisant différents fragments de Nf1, ces auteurs ont de plus montré que le domaine GRD de Nf1 ne restaurait que partiellement l'effet de Nf1 sur l'adénylate cyclase.



**FIGURE 21 : Modèle d'activation de l'adénylate cyclase**  
(Hannan *et al.*, 2006)

L'adénylate cyclase peut être activée par trois voies de signalisation distinctes :

1. Une voie Nf1/Ras-dépendante qui est stimulée par des facteurs de croissance tels que l'EGF et le TGF $\alpha$  et qui active une adénylate cyclase non identifiée (AC-X). Elle n'implique pas la protéine G $\alpha_s$
2. Une voie Nf1/G $\alpha_s$ -dépendante agissant par l'intermédiaire de l'adénylate cyclase Rutabaga (Rut-AC), stimulée par la sérotonine et l'histamine et potentiellement par PACAP38. Cette voie ne nécessite pas Ras
3. une voie classique indépendante de Nf1 et de Ras, mais impliquant la protéine G $\alpha_s$ , est stimulée par la FMRFamide et la dopamine qui active une adénylate cyclase (AC-Y)



**FIGURE 22 : Le rôle de Nf1 dans les neurones du système nerveux central de drosophile** (d'après Walker *et al.*, 2006)

Cette figure représente l'hypothèse de Walker *et al.* (2006) en défaveur des deux rôles séparés de Nf1 sur Ras et l'AC et favorisant au contraire l'existence d'un effet indirect des neurones larvaires ayant une voie Ras suractivée sur la croissance des autres cellules de la larve.

Récemment, les recherches portant sur le rôle de l'activité GAP de Nf1 sur la voie AMPc/PKA ont donné des résultats contradictoires. D'un côté, Hannan *et al.* (2006) ont montré qu'il existait trois voies de signalisation impliquant l'adénylate cyclase dans le cerveau de drosophile (FIGURE 21) : (1) une voie stimulée par des facteurs de croissance, (2) une voie stimulée par la sérotonine et l'histamine et dépendante de Nf1 et de la sous unité  $G\alpha_s$  de la protéine G hétérotrimérique et impliquant l'adénylate cyclase nommée Rutabaga, et (3) une voie stimulée par la dopamine, et dépendante de la sous unité  $G\alpha_s$  mais indépendante de Nf1.

Alors que le domaine GRD et l'activité GAP de Nf1 sont nécessaires et suffisantes pour le rôle joué dans la première voie de signalisation dépendante de l'adénylate cyclase, c'est une région en C-terminal de Nf1 qui est critique pour le rôle joué par Nf1 dans la seconde voie de signalisation. Ho *et al.*, 2007 ont démontré que la première voie de signalisation et l'activité GAP de Nf1 jouaient un rôle dans la mémorisation à long terme (LTM) alors que la seconde voie et le domaine C-terminal de Nf1 régulaient la mémoire immédiate.

D'un autre côté, Walker *et al.* (2006) ont montré que Nf1 fonctionnait dans des neurones spécifiques du système nerveux central de la larve de drosophile et que c'était une activation trop importante de Ras et de ses effecteurs dans ces neurones qui était responsable des défauts de développement et de la petite taille des organismes par les effets occasionnés sur les autres cellules (Walker *et al.*, 2006) (FIGURE 22).

Récemment, un nouvel effet de Nf1, modulé par la voie AC/AMPc/PKA et non par la voie MAPK effectrice de Ras a été mis en évidence chez la drosophile (Tong *et al.*, 2007). Alors que les drosophiles mutantes pour *NF1* ont une durée de vie plus courte et une sensibilité accrue aux chocs thermiques et oxydatifs ainsi qu'une respiration mitochondriale plus faible et une production élevée d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), on observe le contraire chez des mouches surexprimant *NF1*. Ces résultats, qui impliquent la voie AMPc/PKA, suggèrent que Nf1 régule la respiration mitochondriale et la production de ROS via la phosphorylation de protéines mitochondriales. Mais rien n'est connu actuellement des mécanismes mis en jeu ni de leur dépendance vis à vis de Ras.

Comme abordé dans le paragraphe précédent, Lin *et al.* (2007) ont montré l'implication de Nf1 dans la formation de filopodes et d'épines dendritiques en mettant en évidence une nouvelle voie de signalisation induisant la polymérisation d'actine, la voie syndécan-2/Nf1/PKA/ENA-VASP. En travaillant sur des cellules HEK293T et des neurones de l'hippocampe en culture, ces auteurs ont montré que l'interaction entre le domaine C1 de la



petite queue cytoplasmique du syndécan-2 (30 résidus) et Nf1 était capable de médier une activation de la PKA qui phosphorylait alors les protéines ENA (Enabled) et VASP (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein) connues pour intervenir dans la formation et l'élongation des filopodes et interagissant avec l'actine. Actuellement, l'existence ou non d'un ligand pour le syndécan-2 et les mécanismes moléculaires à l'origine de l'activation de la PKA par Nf1 sont inconnus.

### 1.4.5 Régulation de la neurofibromine

La neurofibromine, produit du gène suppresseur de tumeur *NF1*, possède un domaine agissant comme un activateur de GAP et fonctionne en partie comme un régulateur négatif de Ras. La perte de l'expression de *NF1* chez des patients atteints de NF1 est associée à une activité élevée de Ras et une augmentation de la prolifération cellulaire et l'apparition de problèmes cognitifs. On a vu d'autre part que l'expression préférentielle de l'isoforme II possédant l'exon 23a et ayant une activité GAP moins élevée était aussi responsable de difficultés d'apprentissage dans le modèle murin. Ainsi, ceci suggère fortement que la régulation de la fonction GAP de la neurofibromine est très importante dans le développement des signes cliniques de la maladie. La régulation de sa localisation cellulaire (cytoplasme ou noyau), de sa stabilité, et de ses autres fonctions joue vraisemblablement aussi un rôle important.

#### 1.4.5.1 Phosphorylation de Nf1

La neurofibromine est une protéine finement régulée par des modifications post-traductionnelles. Notamment, elle est phosphorylée au niveau de différents domaines et par plusieurs kinases.

##### 1.4.5.1.1 Phosphorylation par la PKA

Des essais de phosphorylation *in vitro* ont montré que Nf1 était une cible potentielle pour la phosphorylation par la PKA (Izawa *et al.*, 1996). Ces auteurs ont aussi démontré que la neurofibromine était constitutivement phosphorylée par la PKA au niveau de deux domaines de la protéine : le domaine CSRD et le domaine CTD.

En 2001, Tokuo *et al.* ont mis en évidence un partenaire protéique interagissant avec le domaine CTD de Nf1. Il s'agit de la DDAH (N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-diméthylarginine



diméthylaminohydrolase), qui est un régulateur de la NO/NO synthase. La région de liaison de la DDAH a été trouvée dans le CSRD et dans le CTD, ce qui coïncide avec les régions possédant des sites spécifiques de phosphorylation par la PKA. La DDAH n'a pas d'effet direct sur l'activité kinase de la PKA mais elle augmente l'accessibilité des régions de Nf1 susceptibles d'être phosphorylées, plus particulièrement au niveau du domaine CSRD. Ceci suggère que cette phosphorylation est régulée par l'association de Nf1 à d'autres protéines. Ces associations pourraient de plus contrôler la fonction cellulaire de la neurofibromine.

Feng *et al.* (2004) ont cherché à identifier des protéines interagissant avec la neurofibromine à l'aide d'une colonne d'affinité immobilisant le domaine CTD. Ils ont ainsi mis en évidence une interaction *in vivo* et *in vitro* entre une protéine 14-3-3 et le domaine CTD de la neurofibromine. Cette interaction est renforcée lorsque le domaine CTD est phosphorylé par la PKA. L'augmentation de la phosphorylation du CTD et l'interaction avec 14-3-3 régule négativement l'activité GAP de la neurofibromine en modifiant la capacité de Nf1 à interagir avec Ras-GTP. Les protéines 14-3-3 appartiennent à une famille de protéines hautement conservées qui régulent plusieurs événements de transduction du signal intracellulaire dans toutes les cellules eucaryotiques.

#### 1.4.5.1.2 Phosphorylation par la PKC

Récemment, Mangoura et ses collaborateurs (2005) ont étudié la phosphorylation de la neurofibromine dépendante de la PKC. Ils ont mis en évidence que la neurofibromine était phosphorylée *in vivo*, en réponse à l'EGF, sur des résidus sérines par la PKC- $\alpha$ , chez l'homme, le rat et dans des cellules du système nerveux central. L'analyse des sites consensus de phosphorylation de la PKC sur la structure primaire de la neurofibromine a permis d'identifier 45 sites putatifs de phosphorylation comprenant 13 résidus thréonines et 32 résidus sérines. La majorité de ces sites consensus sont localisés en particulier dans le domaine CSRD de la neurofibromine. De plus, ces auteurs ont mis en évidence, par des expériences de co-immunoprécipitation, que l'exposition à l'EGF induisant la phosphorylation de Nf1 favorisait l'interaction de la neurofibromine avec l'actine. Enfin, ces mêmes auteurs ont regardé l'éventuel effet de la phosphorylation par la PKC du domaine CSRD sur l'activité GAP de Ras. Ils ont ainsi démontré que l'activation de la voie PKC stimulait l'activité GAP de Nf1. Ces résultats suggèrent que le domaine CSRD pourrait réguler l'activité du domaine GRD pourvu qu'il soit phosphorylé par la PKC et que Nf1 s'associe à l'actine.





L'association de Nf1 à l'actine est en accord avec les données précédentes (Li *et al.*, 2001) montrant que Nf1 colocalise avec la F-actine dans les neurones immatures. La séquence primaire de Nf1 ne contenant pas de domaine de liaison à des protéines du cytosquelette la nature de l'association entre les deux protéines n'est pas claire.

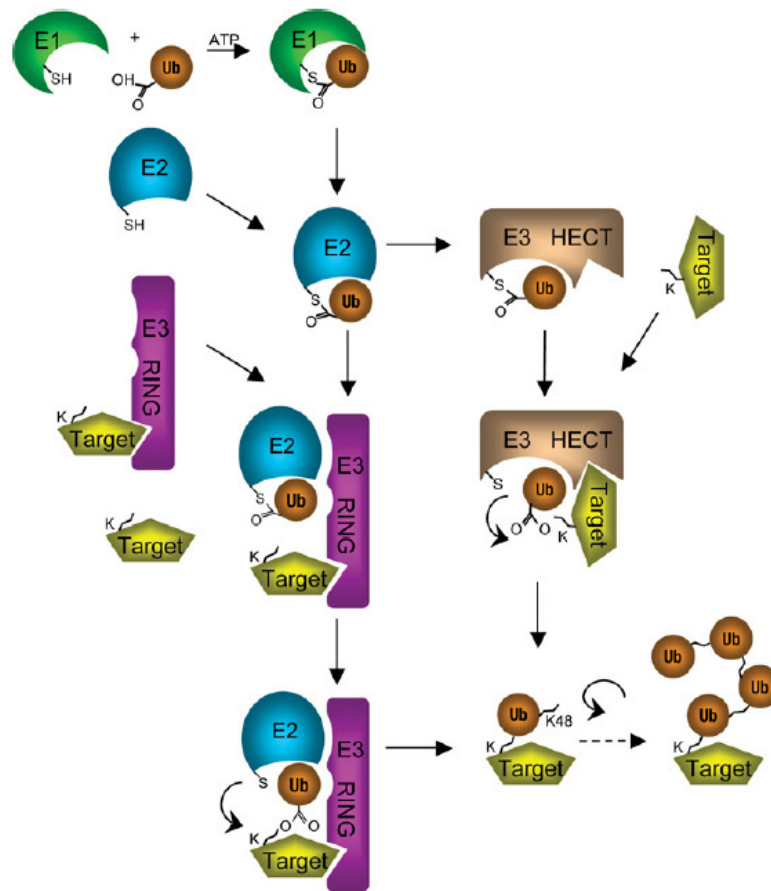
Ces mêmes auteurs ont de plus montré qu'il existait un effet allostérique du domaine non catalytique CSRD de Nf1 sur son domaine GRD au moins dans les cellules neurales. Ceci est en accord avec de précédentes données montrant que l'effet de la protéine p120GAP comme régulateur négatif de Ras est initié par des interactions protéine-protéine impliquant différents domaines non catalytiques (Clark *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1992). Cet effet allostérique des domaines non catalytiques sur l'activité GAP est démontré par le fait que la surexpression de différentes portions de la région N-terminale de p120GAP module la voie Ras. De tels mécanismes ont été postulés pour l'action de protéines GAP sur les protéines G hétérotrimériques (Chidiac & Ross, 1999) et sur la famille des protéines Rho (Kuroda *et al.*, 1996).

#### *1.4.5.1.3 Interactions avec Nf1 phosphorylée*

Des interactions spécifiques ont été trouvées uniquement lorsque la neurofibromine était phosphorylée. Ainsi, Feng *et al.* (2004) ont montré que la phosphorylation de Nf1 par la PKA favorisait l'interaction avec les protéines 14-3-3 et que le rôle de cette interaction était d'inhiber l'activité GAP de Nf1.

De la même manière, Mangoura et ses collaborateurs (2005) ont vu que Nf1 pouvait être phosphorylée par la PKC, ce qui induisait son interaction avec l'actine et favorisait une activation de la fonction GAP.

Toutes ces observations conduisent à l'hypothèse que la phosphorylation de Nf1 pourrait médier des interactions spécifiques entre Nf1 et d'autres protéines qui pourraient avoir des effets régulateurs sur la fonction de la neurofibromine. La recherche de ces protéines présente donc un intérêt particulier dans l'objectif d'identifier de nouveaux composants cellulaires pouvant jouer un rôle important dans la régulation de Ras.



**FIGURE 23 : Mécanisme général de l'ubiquitination**  
(Hurley *et al.*, 2006)

E1, E2 et E3 sont les trois enzymes permettant la réaction d'ubiquitination qui consiste à lier l'ubiquitine à un substrat protéique.

HECT : homologous to EGAP C-terminus; K: Lysine; RING: really interesting new gene; Ub: ubiquitine; E1: enzyme d'activation; E2: enzyme de conjugaison; E3: ubiquitine ligase.

#### 1.4.6.2. Ubiquitination de la Nf1

La protéolyse médiée par l'ubiquitine régule un grand nombre de protéines impliquées dans divers processus cellulaires, tels que le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation et la réponse immunitaire (Ciechanover *et al.*, 2000).

##### 1.4.6.2.1 Mécanisme général d'action

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle impliquant l'ajout de manière covalente d'une petite protéine, l'ubiquitine, à une chaîne latérale de lysine appartenant aux protéines substrats. L'ubiquitine est une protéine de faible poids moléculaire et constituée de 76 résidus dans les cellules de mammifères. La liaison de l'ubiquitine à un substrat nécessite une cascade de réactions catalysées par au moins trois enzymes distinctes (FIGURE 23): E1 ou enzyme d'activation de l'ubiquitine, E2 ou enzyme de conjugaison de l'ubiquitine et E3 ou ubiquitine ligase (Hershko & Ciechanover, 1998). Tout d'abord, une molécule d'ubiquitine est activée par E1 via la formation d'une liaison thioester entre sa glycine C-terminale et un résidu cystéine catalytique de E1. Une fois activée, l'ubiquitine est transférée sur un site thiol de E2. Enfin, E3 va faciliter le transfert de l'ubiquitine de E2 vers le substrat qui sera modifié au niveau d'un résidu lysine.

Les ubiquitines ligases (E3) peuvent être divisées en deux groupes principaux : les protéines avec un domaine catalytique HECT (Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus) et les protéines à domaine RING (Really Interesting New Gene) (Hershko & Ciechanover, 1998)

Les E3-HECT participent directement à la catalyse en fournissant un résidu cystéine alors que les E3-RING facilitent le processus d'ubiquitination en recrutant l'ubiquitine sur E2 pour le substrat (Ardley & Robinson, 2005).

Lorsqu'une seule ubiquitine est fixée au substrat, on parle de mono-ubiquitination. Cependant, l'ubiquitine possède elle-même 7 résidus Lysine aux positions 6, 11, 27, 29, 33, 48 et 63. Après la liaison de l'ubiquitine à son substrat, l'addition successive de plusieurs molécules d'ubiquitine peut avoir lieu sur une lysine de l'ubiquitine précédemment attachée au substrat : on parle alors de poly-ubiquitination. Les poly-ubiquitinations sur K29 et K48 de l'ubiquitine ciblent les protéines vers le protéasome alors que celles sur K63 peuvent modifier des interactions protéines-protéines et cibler des protéines membranaires vers l'endocytose.



#### 1.4.6.2.2 Rôle de l'ubiquitination

Le rôle prédominant de l'ubiquitination est de cibler le substrat au protéasome 26S pour une dégradation rapide (Hershko & Ciechanover, 1998). En règle générale, le substrat est poly-ubiquitinylé par au moins 4 molécules d'ubiquitine fixées sur la lysine 48 de l'ubiquitine précédente. Cette modification permet au substrat d'être reconnu efficacement par des récepteurs spécifiques de l'ubiquitine sur le protéasome (Thrower *et al.*, 2000). Des découvertes récentes indiquent que l'ubiquitination ne conduit pas dans tous les cas à la dégradation du substrat mais peut jouer des rôles dans la régulation de la fonction de la protéine par des processus indépendants du protéasome (Sun & Chen, 2004). Un exemple est celui de l'ubiquitination agissant comme un signal du trafic membranaire. Dans la levure et les cellules de mammifères, la mono-ubiquitination peut constituer un signal pour l'internalisation de protéines à la surface cellulaire et leur entrée dans la voie de l'endocytose (Staub & Rotin, 2006).

#### 1.4.6.2.3 Nf1 et l'ubiquitination

En 2003, Cichowski *et al.* examinèrent la stabilité de la protéine Nf1 dans différents types cellulaires (NIH3T3, IMR90, cellules de Schwannome RT4) après les avoir traitées au sérum. Ils virent une rapide disparition de Nf1 dans les 5 premières minutes après le traitement puis une ré-augmentation de la quantité de protéine 30 minutes après l'ajout de sérum. Les mêmes variations dans la quantité de Nf1 ont été enregistrées après traitement au LPA, au PGDF et à l'EGF suggérant que l'activation de récepteurs couplés aux protéines G ou de récepteurs à activité Tyrosine kinase pouvait transduire des signaux conduisant à la dégradation de Nf1.

Ils montrèrent ensuite que la neurofibromine était une cible directe de la machinerie d'ubiquitination. Pour cela, des cellules ont été transfectées avec un plasmide codant pour une molécule d'ubiquitine étiquetée par 6-His après traitement au LLnL (N-acetyl-L-leucinyl-L-leucinyl-L-norleucinal) (Hofmann *et al.*, 1996). Les protéines étiquetées par 6-His sont ensuite purifiées sur une résine de nickel et analysées par western blot à l'aide d'un anticorps anti-neurofibromine. Cet anticorps a permis de révéler une traînée caractéristique des protéines poly-ubiquitinées, démontrant que la neurofibromine était ubiquitinée *in vivo* (Cichowski *et al.*, 2003).



En testant la dégradation de différents fragments de Nf1, Cichowski *et al.* (2003) ont montré l'importance d'une région de 80 résidus en amont du domaine catalytique GRD de la neurofibromine.

En comparant le taux d'activation de Ras et de l'effecteur ERK dans des cellules *nf1<sup>+/+</sup>*, *nf1<sup>+/-</sup>* et *nf1<sup>-/-</sup>*, après stimulation par différentes concentrations de sérum, ces auteurs démontrèrent que Nf1 n'est dégradée qu'après une forte stimulation par 10% de sérum puis re-synthétisée. De plus, les cellules *nf1<sup>+/-</sup>* et *nf1<sup>-/-</sup>* sont hypersensibles à de faible quantité de sérum et sont capables de proliférer à des concentrations non mitogéniques de sérum. Cela signifie que Nf1, qui est dégradée dans des conditions mitogéniques de stimulation des cellules, permet une action de Ras maximale et la prolifération qui en résulte. Par contre, en absence de signal mitogénique, la présence de Nf1 inhibe l'action de Ras et la prolifération cellulaire.

Ainsi, la régulation dynamique de la neurofibromine par le protéasome représente un mécanisme de contrôle important à la fois dans la durée et dans l'amplitude de la signalisation dépendante de Ras. Ce mécanisme, encore mal connu, pourrait être exploité de manière thérapeutique afin d'atténuer l'action de la voie Ras dans des tumeurs ayant des mutations au niveau de gènes fonctionnant en amont de Ras.

#### **1.4.6 Nf1 et les modèles animaux**

Il n'existe pas de modèle animal naturel reproduisant exactement la pathologie humaine, bien que l'existence d'anomalies pigmentaires et de tumeurs cutanées de type neurofibrome ou schwannome ait été rapportée chez un certain nombre de mammifères et de poissons (Riccardi, 1992).

##### **1.4.6.1 Le modèle murin**

Les premiers modèles animaux expérimentaux ont été obtenus avec la production de 2 lignées de souris en invalidant l'homologue murin de la Nf1 (Brannan *et al.*, 1994). Les souris hétérozygotes *nf1<sup>+/-</sup>* ont une sensibilité accrue aux tumeurs mais ne développent pas de neurofibrome ou d'astrocytome. Elles montrent également des altérations cognitives telles que l'apprentissage et la mémoire spatiale (Silva *et al.*, 1997).

Costa *et al.* (2001) ont généré des souris incapables de produire l'isoforme II de Nf1 (avec l'exon 23a, compris dans le GRD), *nf1<sup>23a-/-</sup>*. Ces souris sont viables, physiquement normales





mais elles présentent des altérations spécifiques de l'apprentissage comme cela a été évoqué dans les paragraphes 1.3.6 et 1.4.4.1.

Par contre, les produits de conception  $nf1^{-/-}$  meurent *in utero*, entre 11,5 et 14 jours postcoitum et présentent une malformation cardiaque sévère. Ceci est dû au besoin de Nf1 dans l'endothélium embryonnaire (Gitler *et al.*, 2002).

Cichowski *et al.* (1999) ont créé des souris chimériques partiellement constituées de cellules  $nf1^{-/-}$ . Pour cela, ils ont préalablement créé des cellules souches embryonnaires homozygotes  $nf1^{-/-}$  et ils les ont injectées dans les blastocytes C57BL/6. Plusieurs degrés de chimérisation ont été obtenus. Les souris ayant le plus fort taux de chimérisation sont mortes très rapidement et celles ayant le plus faible taux (- de 15%) ne présentaient aucun phénotype. Celles ayant un taux moyen de chimérisation, par contre, ont pu être étudiées car elles présentaient des phénotypes reliés à la neurofibromatose : myélodysplasie, présence de neurofibromes. Ces études n'ont pas permis d'identifier les types cellulaires à l'origine des tumeurs mais ont clairement montré la contribution des cellules  $nf1^{-/-}$  dans la formation des tumeurs et l'importance de la perte d'allèle sauvage de *NF1*.

Des études plus récentes ont été réalisées en utilisant des souris « knock-out » (KO) conditionnelles dans lesquelles les auteurs ont invalidé le gène *NF1* dans les astrocytes (Bajenaru *et al.*, 2003) ou au niveau de certains précurseurs de cellules de Schwann (Zhu *et al.*, 2002). Les souris qui n'expriment pas *NF1* dans les astrocytes ( $nf1^{-/-}$ ) développent des gliomes des voies optiques pourvu que l'environnement de ces cellules soit hétérozygote pour *NF1* ( $nf1^{+/+}$ ). Il n'y a pas de formation de gliome dans un contexte sauvage pour *NF1* ( $nf1^{+/+}$ ). Ce sont ces expériences qui ont permis aux auteurs de démontrer que les cellules néoplastiques à l'origine des gliomes sont les astrocytes (Bajenaru *et al.*, 2003). De la même manière Zhu et ses collaborateurs (2002) ont mis en évidence que la perte de *NF1* dans des cellules de Schwann est suffisante pour générer des tumeurs analogues aux neurofibromes pourvu que l'environnement de ces cellules soit hétérozygote pour *NF1* ( $nf1^{+/+}$ ). Ces expériences ont permis de démontrer que les cellules à l'origine des neurofibromes sont les cellules de Schwann.

Très récemment, Wu *et al.* (2008) et Zheng *et al.* (2008) ont, de façon concomitante, démontré que les cellules à l'origine des neurofibromes n'étaient pas des cellules de Schwann matures mais des précurseurs de cellules de Schwann. Wu *et al.* (2008) ont montré *in vitro*, en utilisant des précurseurs de cellules gliales prélevés au jour embryonnaire 12.5 (E12.5) puis *in*



*vivo*, en utilisant des souris KO conditionnelles n'exprimant plus *NFI* au niveau des cellules ayant le promoteur Dhh (Desert Hedgehog) activé (c'est à dire les précurseurs des cellules gliales à partir de E12.5), que le moment, au cours du développement, où *NFI* était inactivé était primordial pour la formation des neurofibromes. Ce moment, se situe autour de E12.5 et les cellules cibles sont les précurseurs de cellules gliales formant les cellules de capsules frontières au niveau de la racine dorsale et ventrale des nerfs et les cellules de Schwann embryonnaires qui existent dans tous les nerfs périphériques et craniens.

Lorsque *NFI* n'est plus exprimé dans ces deux types de cellules à E12.5, des neurofibromes se développent dans un contexte génétique sauvage pour *NFI* (*nfl*<sup>+/+</sup>) alors qu'un contexte génétique hétérozygote *nfl*<sup>+/-</sup> était nécessaire dans les conditions décrites par Zhu *et al.* (2002). Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que Zhu *et al.* (2002) ont utilisé des souris KO conditionnelles n'exprimant plus *NFI* au niveau des cellules ayant le promoteur KroX20 activé. Or, ce promoteur est activé à E10.5 au niveau des cellules limitant la capsule mais à E15.5 seulement au niveau des cellules de Schwann embryonnaires et déjà différenciées dans les nerfs périphériques et craniens. Ainsi, peut-être n'y a-t-il pas suffisamment de progéniteurs de cellules gliales touchées par la perte de *NFI* et un contexte *nfl*<sup>+/-</sup> est peut être alors nécessaire pour provoquer le développement de neurofibromes.

Zheng *et al.* (2008) sont arrivés aux mêmes conclusions que Wu *et al.* (2008) en utilisant des souris KO conditionnelles dans lesquelles *NFI* était délété au niveau des cellules ayant le promoteur Po activé, c'est à dire essentiellement des précurseurs de cellules de Schwann à partir de E11.5. Wu *et al.* (2008) et Zheng *et al.* (2008) ont d'autre part constaté en faisant l'histologie des nerfs périphériques avant la formation des tumeurs que seuls les faisceaux Remak regroupant des axones de faible diamètre entourés de cellules de Schwann non myélinisées avaient une morphologie anormale. Zheng *et al.* (2008) ont montré que ce sont ces structures anormales qui sont le point de départ des neurofibromes plexiformes et qu'ils se transforment ensuite en cellules de Schwann non myélinisées anormales qui sont les premières cellules tumorales.

D'autres études encore ont été effectuées sur des souris KO conditionnelles. Ainsi, la fonction de *Nf1* a pu être spécifiquement abolie dans les cellules neuronales différenciées (Zhu *et al.*, 2001). Ces souris ont un développement anormal du cortex cérébral, ce qui suggère que *Nf1* a un rôle indispensable dans le développement du système nerveux central. Bien qu'elles n'aient pas de tumeur, ces souris ont une astroglie étendue ou une microglie ainsi que des déficits d'apprentissage sévères.



Récemment, Lush *et al.* (2008) ont créé des souris dans lesquelles l'expression de *NF1* était abolie dans la majorité des neurones et des astrocytes corticaux. Ces souris sont dépourvues de barrière corticale dans le cortex somatosensoriel. Bien que l'on ne puisse pas pour l'instant relier cette structure neuronale anormale aux problèmes cognitifs liés à la NF1, cela suggère que *NF1* joue un rôle dans le développement du système nerveux central.

Enfin, des souris où *NF1* est invalidé uniquement dans les cellules endothéliales ont été générées et étudiées (Gitler *et al.*, 2003). Ces expériences ont permis de montrer que plusieurs phénotypes de souris KO pour *NF1* sont reproduits par ces souris et notamment les malformations cardiaques. Gitler *et al.* (2002) ont aussi créé des souris *nfl*<sup>-/-</sup> dans les cellules de la crête neurale. Ces souris meurent au moment de la naissance. Elles n'ont pas de malformation cardiaque mais présentent des tumeurs, ayant pour origine les cellules de la crête neurale, telles que les ganglioneurosarcomes, des phéochromocytomes et une hyperplasie des tissus issus de la crête neurale qui sont aussi affectés chez certains patients atteints de NF1. Ismat *et al.* (2006) ont montré que le domaine GRD de Nf1 était capable de réverser les défauts cardiovasculaires chez les embryons *nfl*<sup>-/-</sup> mais pas l'hyperplasie des tissus issus de la crête neurale.

#### 1.4.6.2 Le modèle drosophile

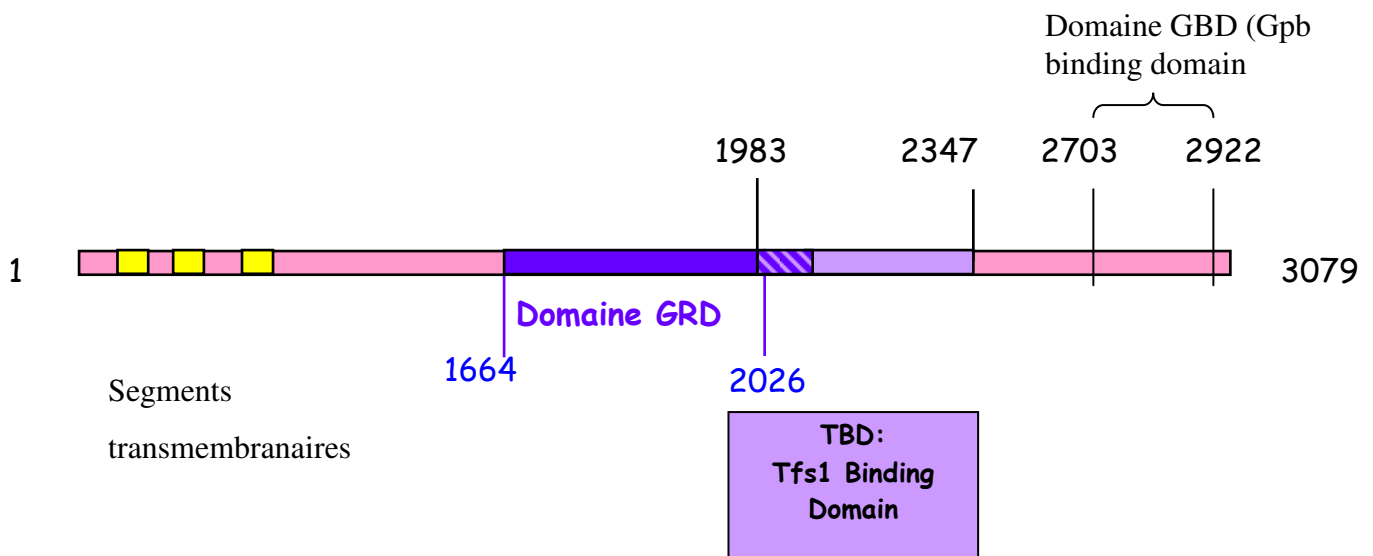
Il existe un autre modèle animal, couramment utilisé pour les études génétiques : *Drosophila melanogaster*. Malgré la distance phylogénétique entre les espèces, il existe une surprenante homologie dans la structure de la neurofibromine entre espèces humaine et animale. Ce modèle drosophile a précédemment été détaillé dans le paragraphe 1.4.4.3. Ce modèle a essentiellement permis de faire le lien entre Nf1 et la voie AMPc/PKA. En effet, de nombreuses études montrent que Nf1 régule le taux d'AMPc à la fois dans le modèle drosophile et souris (Dasgupta *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 1997; Hannan *et al.*, 2006; The *et al.*, 1997; Tong *et al.*, 2002). Bien qu'il n'y ait pas de région spécifique de la protéine Nf1 associée à un phénotype particulier de la maladie (Fahsold *et al.*, 2000; Mattocks *et al.*, 2004), il apparaît que le domaine GRD est suffisant pour médier la régulation de Ras au sein des



voies de signalisation cellulaire, alors que la région CTD est nécessaire pour une voie d'activation de l'adénylate cyclase indépendante de Ras (Hannan *et al.*, 2006). Chez la drosophile, des mutants nuls pour *NFI* présentent des défauts d'apprentissage et de mémoire immédiate. Ce phénotype comportemental est attribué à une perturbation de la voie d'activation de l'adénylate cyclase appelée Rutabaga (Guo *et al.*, 2000). Cependant, Ho *et al.* (2007) viennent de montrer qu'en plus de l'apprentissage, la mémoire à long terme est abolie dans ces mutants nuls. Ces auteurs suggèrent que le domaine GRD est nécessaire et suffisant pour la mémoire à long terme alors que le CTD est essentiel pour la mémoire immédiate.

Ces modèles animaux sont donc indispensables pour l'étude du rôle de la neurofibromine dans le développement, les phénomènes de prolifération/différenciation cellulaires et les fonctions associatives. Ils constituent aussi un outil de choix pour la caractérisation de *loci* modificateurs de la neurofibromine en vue de l'identification de leurs homologues humains.





**FIGURE 24: Représentation de la protéine Ira2p**

## 2. LES PROTEINES GAP DE Ras CHEZ LA LEVURE

### 2.1. Présentation

Il a été identifié 2 gènes chez la levure *S. cerevisiae*, *IRA1* et *IRA2*, qui codent des protéines possédant des domaines homologues aux protéines GAP de Ras des mammifères (Tanaka *et al.*, 1989).

La protéine Ira2p est une grosse protéine membranaire de 3079 résidus ayant une masse moléculaire de 315kDa. Cette protéine est constituée de 3 domaines transmembranaires qui permettent un ancrage de la protéine à la membrane plasmique, le reste de la protéine étant cytosolique. Elle possède aussi un domaine central à activité GAP d'environ 350 résidus, un domaine d'interaction protéique (domaine TBD ; Chautard *et al.*, 2004) et un domaine C-terminal dans lequel se trouve le domaine GBD capable d'interagir avec les protéines Gpb1p et Gpb2p (Harashima *et al.*, 2006) (FIGURE 24).

L'activité GAP stimule l'hydrolyse du GTP lié aux protéines Ras (Trahey & McCormick, 1987).

Une délétion du gène *IRA1* ou du gène *IRA2* est responsable de phénotypes variés en accord avec la fonction qui leur est attribuée : suppression de la létalité de mutations *cdc25*, augmentation du taux d'AMPc intracellulaire, augmentation de la sensibilité au choc thermique et à la privation d'azote, défauts de sporulation et une accumulation moindre de glycogène (Tanaka *et al.*, 1989; Tanaka *et al.*, 1990a). Ces phénotypes sont comparables à ceux du mutant *ras<sup>val-19</sup>*, constitutivement actif, qui a une activité GTPase intrinsèque réduite. Ces résultats indiquent que les protéines Ira1p et Ira2p régulent négativement l'activité de Ras.

Le double mutant *ira1ira2*, viable, présente des phénotypes sévères qui sont comparables à la somme des phénotypes des simples mutants comme : un taux élevé de Ras-GTP et d'AMPc (Tanaka *et al.*, 1990a). Colombo *et al.* (2004) ont montré que le taux de Ras-GTP de cette souche était déjà si élevé que la réponse au glucose ne pouvait plus l'augmenter.

Bien que Ira1p et Ira2p régulent Ras2p et présentent 45% d'identité de séquence, des preuves génétiques et biochimiques suggèrent que les protéines Ira ne sont pas fonctionnellement redondantes et peuvent être impliquées dans des réponses à différents stress environnementaux (Park *et al.*, 2005b; Tanaka *et al.*, 1990b). La surexpression d'un des deux



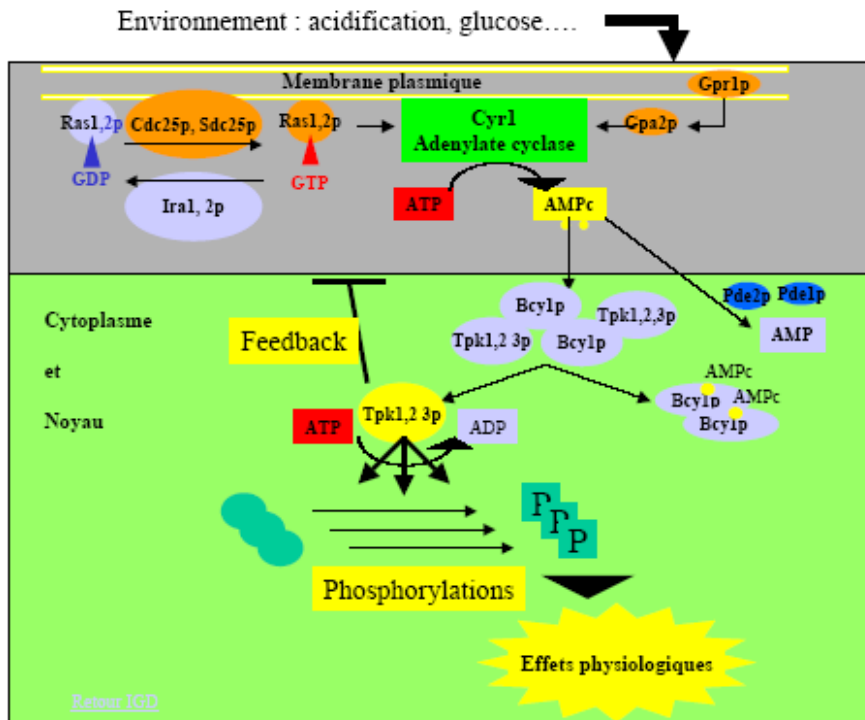
gènes *IRA* ne supprime pas complètement le phénotype dû à l'absence de l'autre gène. Par exemple, la surexpression de *IRA1* est incapable de supprimer le phénotype de sensibilité au choc thermique d'un mutant *ira2* alors qu'*IRA2* surexprimée est capable de supprimer ce phénotype dans un mutant *ira1* (Tanaka *et al.*, 1990a). De plus, la surexpression de *IRA2* supprime le phénotype du double mutant *gpb1gpb2* alors que la surexpression de *IRA1* ne le fait pas (Harashima *et al.*, 2006). En outre, les mutations *ira1* suppriment la létalité des mutations *cdc25* de manière plus efficace que les mutations *ira2* (Tanaka *et al.*, 1990b).

D'autre part, la mutation *ras2* supprime efficacement les phénotypes des mutations *ira1* et *ira2* (sensibilité au choc thermique, défaut de sporulation) alors que la mutation *ras1* est capable de supprimer la mutation *ira2* mais pas la mutation *ira1* (Tanaka *et al.*, 1990a). Il existe donc des préférences entre Ira et Ras. Ce résultat est confirmé par l'analyse des nucléotides guanyliques liés à Ras1p et Ras2p (Tanaka *et al.*, 1989; Tanaka *et al.*, 1990a). Quand *RAS1* et *RAS2* sont surexprimés dans un mutant *ira1*, le pourcentage de Ras1-GTP est similaire à celui de Ras2-GTP alors que, dans le mutant *ira2* il y a plus de Ras1-GTP que de Ras2-GTP. Ces résultats montrent qu'Ira2p agit plus efficacement sur Ras1p que sur Ras2p.

Enfin, Ira1p et Ira2p sont également finement contrôlées : Chautard *et al.* (2004) ont montré que Ira2p était capable d'interagir avec la protéine Tfs1p, PEBP de levure, alors que la protéine Ira1p n'est pas capable d'interagir avec cette protéine.

De plus, les protéines Ira1p et Ira2p sont contrôlées par deux composants de la voie GPCR-G $\alpha$  (G protein coupled receptor) : Gpr1p/Gpa2p, qui est une voie de réponse au glucose et aux sucres analogues qui va induire l'activation de la voie AC/AMPC/PKA indépendant de Ras (Harashima *et al.*, 2006). Ces deux composants sont les protéines Kelch Gpb1p et Gpb2p. Elles interagissent avec le domaine GBD d'Ira1p et d'Ira2p et les stabilisent. En stabilisant les protéines Ira1p et Ira2p, Gpb1p et Gpb2p diminuent le niveau intracellulaire de Ras-GTP et contribuent à inhiber la voie AC/AMPC/PKA via Ras. Or, ces protéines Kelch se comportent comme des protéines G $\beta$  en interagissant et en inhibant la protéine G Gpa2p (Lu & Hirsch, 2005). Elles contrôlent donc aussi négativement la voie AC/AMPC/PKA en aval de la voie Gpr1p/Gpa2p indépendamment de Ras (Harashima *et al.*, 2006).

Comme pour la protéine Nf1, les protéines GAP de Ras de levure sont modifiées post-traductionnellement : des études systématiques ont révélé que Ira2p et Ira1p étaient ubiquitinyllées (Hitchcock *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2003) et phosphoryllées (Budovskaya *et al.*, 2005; Ficarro *et al.*, 2002).



**FIGURE 25 : La voie Ras/AMPC/PKA chez la levure *Saccharomyces cerevisiae***

Les protéines Ira1p et Ira2p sont donc deux protéines GAP qui régulent négativement la voie Ras/AMPC/PKA.

## **2.2. La voie Ras/AMPC/PKA**

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la voie Ras/AMPC/PKA joue un rôle majeur car elle contrôle de nombreux processus physiologiques tels que le métabolisme (et plus précisément la glycolyse et la néoglucogénèse), la résistance aux stress et la prolifération cellulaire. Pour s'adapter aux contraintes environnementales, il est nécessaire de détecter les signaux, les traiter et les intégrer afin de mettre en place une réponse cellulaire efficace. Ceci exige que la voie soit très finement régulée pour s'adapter rapidement à toutes les variations du milieu extérieur. Les différents composants de cette voie sont étudiés depuis le début des années 80 (FIGURE 25).

### **2.2.1 Les protéines Ras de levure**

Chez la levure, il existe deux homologues aux gènes *RAS* humains : *RAS1* et *RAS2* (DeFeo-Jones *et al.*, 1983; Powers *et al.*, 1984), de masse moléculaire respectives 36 et 42kDa. Ils sont considérés comme les interrupteurs d'une voie de transduction du signal.

La double mutation *ras1ras2* est létale alors que les cellules survivent avec un seul des deux gènes (Kataoka *et al.*, 1984). L'expression de Ras1p et Ras2p est régulée de façon différente à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel. Dans les cellules cultivées sur glucose, l'expression de *RAS1* et la synthèse de la protéine diminuent vers le milieu de la phase exponentielle. Au contraire, Ras2p est faible en début de phase exponentielle, augmente d'un facteur 10 au milieu de cette phase puis reste constant. La quantité d'ARNm de *RAS2* restant constante tout au long de la phase exponentielle, la régulation s'effectue au niveau de la traduction. Quand les cellules sont cultivées en présence d'éthanol comme seule source de carbone, le niveau d'expression de *RAS1* est très faible alors qu'il n'y a pas de diminution de Ras2p. Il semble en outre que la traduction de la protéine Ras2p soit stimulée en cas de carence nutritionnelle (Breviario *et al.*, 1988).

De plus, des mutants *ras2<sup>-</sup>* mais pas *ras1<sup>-</sup>* présentent un phénotype d'hypoactivation de la voie et le taux d'AMPC dans les cellules *ras2<sup>-</sup>* est plus faible que dans un mutant *ras1<sup>-</sup>* (Toda *et al.*, 1985). En outre, Ras2p purifiée active l'adénylate cyclase plus efficacement que Ras1p



(Broek *et al.*, 1985) suggérant que Ras2p joue un rôle prédominant dans la voie de signalisation Ras/AMPC/PKA.

La particularité des protéines Ras est d'agir comme des commutateurs moléculaires puisqu'elles oscillent entre un état actif, lié au GTP, et un état inactif, lié au GDP (FIGURE 16) (Wittinghofer & Pai, 1991). L'activité GAP stimule l'hydrolyse du GTP réalisée par les protéines Ras (Trahey et McCormick, 1987). Sous leur forme active, les protéines Ras vont stimuler l'adénylate cyclase (Toda *et al.*, 1985).

Des analyses génétiques révèlent la présence de gènes régulateurs qui modulent l'activité des protéines Ras.

## 2.2.2 Les régulateurs de Ras

Les protéines Ras sont régulées par deux couples de protéines antagonistes : des facteurs d'échange ou GEF (Guanine Exchange Factor) et les protéines activatrices de l'activité GTPasique, GAP (GTPase Activating Protein).

### 2.2.2.1 Les facteurs d'échange (GEF)

Les facteurs d'échange augmentent le rapport Ras-GTP/Ras-GDP en permettant d'échanger le GDP de Ras en GTP.

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ce sont les produits des gènes *CDC25* (Jones *et al.*, 1991) et *SDC25* (Damak *et al.*, 1991) qui sont les protéines GEF de Ras. Elles constituent un régulateur positif permettant l'échange du GDP, lié aux protéines Ras, en GTP (Broek *et al.*, 1987; Haney & Broach, 1994). Le gène *CDC25* code une protéine de 1589 acides aminés qui produit un polypeptide d'environ 180kDa (Garreau *et al.*, 1990; Vanoni *et al.*, 1990). Le fragment C-terminal inclut le domaine catalytique et le signal de localisation à la membrane via des interactions hydrophobes (Garreau *et al.*, 1996). Ce fragment C-terminal est suffisant à l'activité biologique totale et essentiel à la croissance et à la viabilité des cellules. Par exemple, il est essentiel pour la croissance normale des mutants *Δcdc25* et *cdc25* thermosensibles à température restrictive. Dans la région N-terminale, un motif SH3 est présent et permet à Cdc25p d'interagir avec l'adénylate cyclase. Ce domaine semble de plus augmenter la capacité de l'adénylate cyclase à interagir avec Ras-GTP *in vitro* (Mintzer & Field, 1999). A côté de ce motif SH3, il y a un motif CDB (Cyclin Destruction Box). L'activité de Cdc25p est





contrôlée par un processus de dégradation dépendant de l'ubiquitine qui est ciblé par le motif CDB (Kaplun & Jacquet, 1995).

Un rôle biologique a été attribué à la région N-terminale de Cdc25p. En effet, suite à une stimulation par du glucose, certains résidus sont phosphorylés. Cette phosphorylation diminue l'association de Cdc25p aux membranes et donc son accessibilité à Ras (Gross *et al.*, 1992). Cette phosphorylation pourrait prendre une part active dans la boucle de rétrocontrôle de la voie Ras/AMPC/PKA par la protéine kinase A (PKA) elle-même.

Plus récemment, Chen *et al.*, 2000 ont montré que la région N-terminale de Cdc25p (acides aminés 1-1087) était capable de réguler l'activité GEF de la protéine. En double hybride, la partie N-terminale est capable d'interagir avec elle-même, avec la partie C-terminale et avec la protéine entière. D'autre part, la surexpression de la région N-terminale provoque le même phénotype que celui d'un mutant dominant négatif. Cet effet dominant négatif semble être le résultat de l'oligomérisation de la partie N-terminale avec la protéine Cdc25p endogène. Par comparaison entre l'activité GTPasique de Ras en présence de la protéine Cdc25p entière ou seulement sa région catalytique C-terminale, Crechet *et al.*, 2000 ont également montré que la région N-terminale de Cdc25p régulait l'interaction entre le domaine catalytique et la protéine Ras2p quand celle-ci est farnésylée.

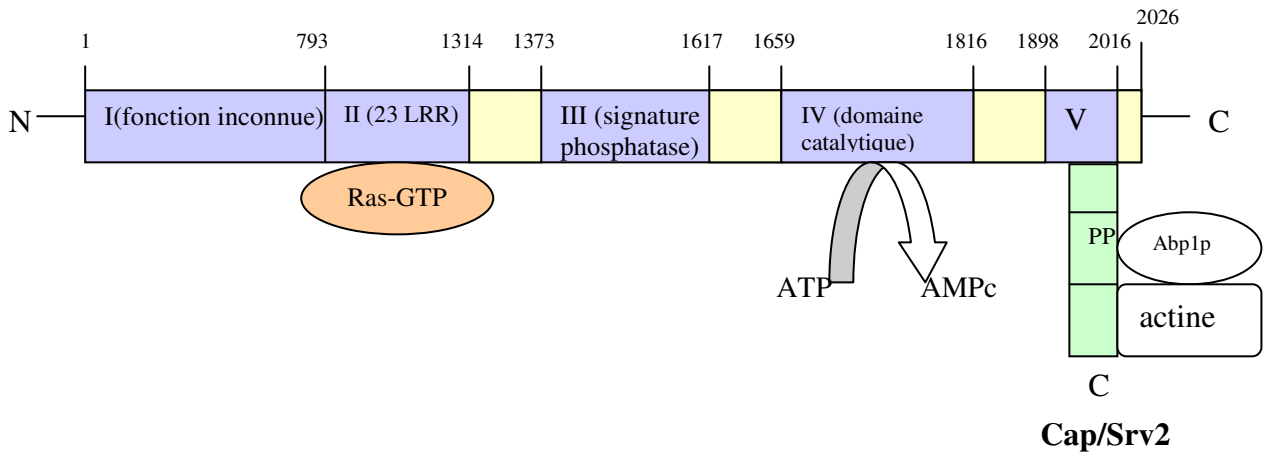
Le gène *SDC25* a été isolé comme un suppresseur multicopie du mutant *cdc25-5* (Boy-Marcotte *et al.*, 1989). Contrairement à *CDC25*, la délétion du gène *SDC25* n'est pas létale et ne confère aucun phénotype particulier. Sdc25p est capable de former des hétérodimères avec Cdc25p via des interactions avec leurs domaines C-terminaux (Camus *et al.*, 1997).

#### 2.2.2.2 Les protéines activatrices de l'activité GTPasique (GAP)

En opposition à l'action des facteurs d'échange, les produits des gènes *IRA1* et *IRA2* inhibent la fonction sauvage des protéines Ras de manière antagoniste à la fonction de la protéine Cdc25p. Les protéines Ira1p et Ira2p sont donc deux protéines GAP qui régulent négativement la voie Ras/AMPC/PKA. Bien qu'elles soient en partie fonctionnellement redondantes, chacune des protéines Ira pourrait jouer des rôles spécifiques dans la régulation des protéines Ras. Les protéines Ira1p et Ira2p ont été présentées dans le paragraphe 2.1.

L'activité GAP des protéines Ira stimule la faible activité GTPasique intrinsèque de Ras. Ce mécanisme a pu être élucidé grâce à la résolution des structures tridimensionnelles

### Adénylate cyclase



**FIGURE 26: Représentation schématique des domaines de l'adénylate cyclase**

L'adénylate cyclase est schématisée en bleu et jaune, avec ses 5 domaines fonctionnels. La protéine Cap/Srv2 est représentée en vert.

LRR : Leucine Rich Repeats (répétitions riches en leucines) ; PP: région riche en prolines

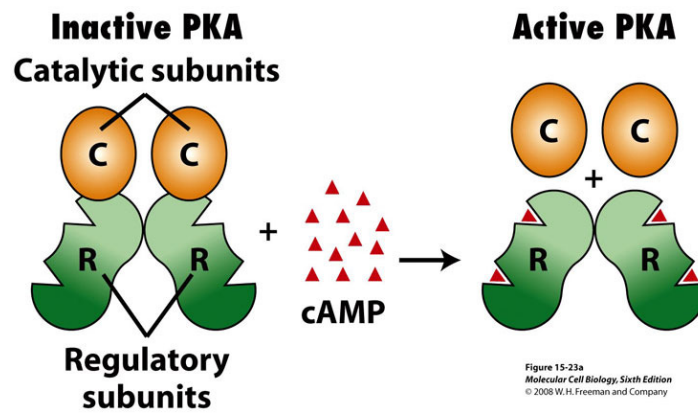
du domaine catalytique de p120GAP (Scheffzek *et al.*, 1996) et de son complexe avec Ras (Scheffzek *et al.*, 1997) ainsi que par des études biochimiques (Ahmadian *et al.*, 1997). Le mécanisme d'activation de l'activité GTPasique de Ras repose sur deux évènements : la stabilisation des résidus des régions variables I et II de Ras (switch I et II) et la stabilisation de l'état de transition de l'hydrolyse du GTP en introduisant un résidu arginine dans le site actif de Ras, ce qui facilite la réaction GTPase. Ce résidu arginine neutralise les charges négatives qui se développent sur les oxygènes des phosphates du nucléotide durant l'hydrolyse du GTP (Resat *et al.*, 2001; Scheffzek *et al.*, 1996). Te Biesebeke et ses collaborateurs (2001) ont mis en évidence dans Ira2p la présence d'une région avec un doigt arginine qui est impliquée dans sa capacité à reconnaître les protéines Ras.

### 2.2.3 L'adénylate cyclase

L'AMPc chez la levure résulte de la transformation de l'ATP, catalysée par une enzyme, l'Adénylate Cyclase, produit du gène *CYR1* (Cyclic AMP Requirement) (Matsumoto *et al.*, 1982). Cette enzyme est une protéine de 2026 résidus, localisée au niveau de la membrane plasmique. Cette localisation semble dépendre de la présence d'autres éléments de la voie. Notamment, l'inactivation de *CDC25* réduit très fortement la quantité d'adénylate cyclase liée à la membrane (Pardo *et al.*, 1991). De même, 90% de l'activité de l'adénylate cyclase est retrouvée dans la fraction cytoplasmique dans un mutant *ras1 ras2 bcy1* (Engelberg *et al.*, 1990).

De plus, il semble que l'activation de Cyr1p dépende de sa localisation. En effet, la protéine GAP Ira1p est nécessaire à l'ancrage de l'adénylate cyclase à la membrane, ce qui permet son activation (Mitts *et al.*, 1991). Le mutant *Δira1* présente un taux très bas d'activité de l'adénylate cyclase et les membranes de ces mutants sont incapables de lier l'adénylate cyclase *in vitro*. En comparant les fractions cytosoliques et membranaires dans une souche sauvage, on remarque que la majorité de l'activité de l'adénylate cyclase est dans la fraction membranaire (80%) et le reste dans la fraction cytosolique. Cette distribution est complètement changée dans un mutant *Δira1* puisqu'il y a 90% de l'adénylate cyclase dans la fraction soluble et une réduction remarquable de l'activité totale (Mitts *et al.*, 1991).

La protéine Cyr1p a 5 domaines fonctionnels : une région N-terminale de fonction inconnue, un domaine de liaison à Ras (Shima *et al.*, 1997) qui possède une répétition de plusieurs motifs LRR (Leucine Rich Repeats), un domaine possédant une signature caractéristique d'un



**FIGURE 27 : Représentation schématique de la PKA**

domaine de phosphatase PP2C dont l'activité n'a pas été mise en évidence, un domaine catalytique et une région C-terminale contenant le site de liaison à Cap/Srv2p (FIGURE 26). La protéine Cap/Srv2p est une protéine bi-fonctionnelle (Gerst *et al.*, 1991) : elle joue un rôle dans l'activation de l'adénylate cyclase par Ras et elle est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine.

La perte de l'activité de Cyr1p conduit à une diminution du taux d'AMPc intracellulaire, provoquant des phénotypes pléiotropiques qui miment la privation en nutriments tels que l'arrêt de croissance en phase G1 ou le défaut de sporulation. Les mutants *cyr1* sont plus tolérants au froid et plus résistants à certains types de stress comme le choc thermique ou oxydatif.

Chez *S. cerevisiae*, l'adénylate cyclase est activée par deux systèmes distincts : le système de récepteur couplé aux protéines G, le système Gpr1p/Gpa2p (Colombo *et al.*, 1998), et le système Ras/Cdc25p (Toda *et al.*, 1985) (FIGURE 25).

## 2.2.4 La protéine kinase A (PKA)

La PKA est fortement conservée de la levure à l'homme. Sous forme inactive, elle est représentée par un hétérotétramère constitué d'un homodimère de deux sous-unités régulatrices, produits du gène *BCY* (By-pass of cyclic AMP requirement) et de deux sous-unités catalytiques, produits des gènes *TPK1*, *TPK2* ou *TPK3* (Toda *et al.*, 1985) (FIGURE 27).

### 2.2.4.1 La sous-unité régulatrice : Bcy1p

*BCY1* n'est pas un gène essentiel à la croissance des cellules en milieu contenant du glucose comme source de carbone. Des souches *Δbcy1* présentent les caractéristiques d'une PKA constitutivement active c'est à dire une sensibilité au choc thermique, une absence de sporulation ou encore une absence d'accumulation des sucres de réserves (Cannon & Tatchell, 1987; Toda *et al.*, 1987). Chaque sous-unité régulatrice possède 2 sites de fixation à l'AMPc mais il semble qu'un seul site de fixation soit fonctionnel chez la levure, contrairement aux PKA des mammifères (Hixson & Krebs, 1980).

Des études de localisation cellulaire ont montré que Bcy1p avait un profil de localisation dynamique dépendant de signaux extracellulaires (Griffioen *et al.*, 2000; Griffioen *et al.*, 2001). En effet, la protéine Bcy1p possède un signal de localisation nucléaire



(NLS) à son extrémité N-terminale et des sérines au niveau de ce NLS vont être phosphorylées par des kinases ce qui entrainera un changement de localisation de la protéine. La localisation de Bcy1p est dépendante de la source de carbone : dans des cellules cultivées en présence de glucose, Bcy1p est trouvée presque exclusivement dans le noyau alors que la carence en glucose conduit à une localisation presque exclusive de Bcy1p dans le cytoplasme. Cette localisation cytoplasmique pourrait inhiber l'activité PKA et ainsi contrôler l'activité d'enzymes impliqués dans la glycolyse ou la synthèse de sucres de réserves qui sont des cibles de la PKA. Cela permettrait d'adapter le métabolisme du carbone des cellules à leur mode respiratoire.

Des stimuli externes (choc thermique, source de carbone) vont provoquer la phosphorylation de Bcy1p par d'autres kinases, telles que Yak1p et Mck1p, et affecter sa localisation cellulaire (Griffioen *et al.*, 2003; Griffioen *et al.*, 2001; Werner-Washburne *et al.*, 1991). Sous sa forme phosphorylée, Bcy1p va transloquer du noyau au cytoplasme. Dans le cytoplasme, Bcy1p va interagir avec Zds1p, qui joue un rôle d'« ancre » cytoplasmique pour la protéine phosphorylée (Griffioen *et al.*, 2003; Griffioen *et al.*, 2001). Griffioen *et al.* (2003) ont montré que la fonction de Bcy1p était indépendante de sa localisation, mais que la relocalisation de Bcy1p dans le cytoplasme pouvait servir à diriger la PKA vers des substrats cytoplasmiques.

En fait, la PKA influe elle-même sur la phosphorylation et donc la localisation de sa propre sous-unité régulatrice. En effet, l'expression de Yak1p, une kinase rapidement activée après la disparition de glucose dans le milieu, est réprimée par la PKA elle-même (Smith *et al.*, 1998). En effet, Yak1p est sous la dépendance des deux facteurs de transcription spécifiques de la réponse générale au stress : Msn2p et Msn4p qui sont négativement régulés par la PKA.

#### 2.2.4.2 Les sous-unités catalytiques

Il existe trois isoformes de la sous-unité catalytique de la PKA chez la levure, codées par les gènes *TPK1*, *TPK2*, et *TPK3* (Toda *et al.*, 1987).

Une délétion des trois gènes codant pour cette sous-unité est létale pour la cellule, mais un des trois gènes est suffisant pour remplir la fonction essentielle de la PKA. *TPK1* a d'abord été identifié comme suppresseur multicopie du caractère létal d'un mutant *ras2* dans un milieu non fermentescible (Cannon & Tatchell, 1987; Toda *et al.*, 1987). *TPK2* et *TPK3* ont ensuite été identifiés sur la base de leurs similitudes de séquences avec *TPK1* (Toda *et al.*, 1987). Des cellules déficientes pour l'activité PKA stoppent leur croissance et arrêtent leur cycle en phase





G1. Elles présentent également des phénotypes de cellules en carence nutritionnelle, accumulent le tréhalose et le glycogène et sont plus résistantes aux stress (Thevelein, 1994).

La région C-terminale des Tpk est fortement conservée : il existe 77% d'identité entre les régions C-terminales de Tpk1/2, 88% entre Tpk1/3 et 75% entre Tpk2/3. Cette région contient le domaine catalytique composé d'un site de liaison à l'ATP et du site d'interaction avec le substrat. Deux régions sont impliquées dans l'interaction avec Bcy1p : les résidus 177-178 et 233-261 (Gibbs *et al.*, 1992).

Les rôles physiologiques des trois Tpk sont similaires mais pas équivalents. En l'absence de Bcy1p, c'est Tpk2 qui contribue de façon majoritaire à l'activité de la PKA (Cameron *et al.*, 1988). Dans la souche sauvage, la transcription du gène *TPK3* est faible et la protéine Tpk3p est instable (Mazon *et al.*, 1993). Pour ce qui est de la croissance et de la différenciation des levures en pseudohyphes, les Tpk jouent des rôles différents : Tpk2p stimule la filamentation alors que Tpk3p l'inhibe (Pan & Heitman, 2000).

Dans tous les cas, les Tpk reconnaissent la séquence consensus RRXS/T sur les protéines cibles et phosphorylent la sérine ou la thréonine (Edelman *et al.*, 1987). Cette phosphorylation par la PKA a été décrite pour un certain nombre de cibles cellulaires dont des enzymes du métabolisme, des facteurs de transcription et des protéines kinases.

Ces trois sous-unités ont des fonctions dissociables et chevauchantes dans la réponse à l'activation par l'AMPc (Chevtzoff *et al.*, 2005). Des activités uniques leur ont cependant été attribuées. Ainsi Chevtzoff *et al.* (2005) ont montré que la perte de Tpk3p mais pas des deux autres sous-unités provoquait une réduction significative de la fonction respiratoire se traduisant par une diminution de la biogénèse mitochondriale en réponse à la demande énergétique plus réduite durant la croissance des cellules.

#### 2.2.4.3 Fonction de la PKA

L'activation de la PKA par l'AMPc correspond à un schéma très conservé dans le système de signalisation eucaryote. Chez la levure *S. cerevisiae*, la PKA régule de nombreux processus physiologiques en réponse à son signal d'activation.

Ainsi, suite à un signal extérieur, les protéines Ras1p et Ras2p vont être recrutées et activées pour stimuler l'adénylate cyclase qui produira l'AMPc (De Vendittis *et al.*, 1986). L'augmentation du taux d'AMPc dans la cellule va permettre de libérer les sous-unités catalytiques de la PKA de l'inhibition par la sous-unité régulatrice (Toda *et al.*, 1987).



En effet, lorsque l'AMPc se fixe aux sous-unités régulatrices, ces dernières se dissocient des sous-unités catalytiques (FIGURE 27).

La production d'AMPc est soumise à un phénomène de rétrocontrôle très efficace (Nikawa *et al.*, 1987) si bien que des perturbations majeures dans la voie de signalisation ne provoquent que de légères variations de la quantité d'AMPc intracellulaire. Cependant, il existe des souches appelées *tpk<sup>w</sup>* (Tpk « weak », souche délétée de deux des trois gènes *TPK* et possédant une mutation ponctuelle sur le gène *TPK* restant) dont l'activité PKA est atténuée et dont le rétrocontrôle a disparu qui permettent d'observer directement la capacité de l'adénylate cyclase à produire de l'AMPc. Dans ces souches *tpk<sup>w</sup>*, la concentration d'AMPc est augmentée de 1000 fois (Nikawa *et al.*, 1987). Des mutants *bcy1*, par contre, dans lesquels l'activité de la PKA est constitutive ont des taux très faibles d'AMPc. Ces données suggèrent que la PKA exerce un rétrocontrôle strict sur la capacité des cellules à synthétiser l'AMPc. Bien que Ras (Resnick & Racker, 1988), les protéines contrôlant Ras, Cdc25p (Gross *et al.*, 1999) ou Ira (Tanaka *et al.*, 1989) aient été proposées comme cibles directes du rétrocontrôle de la PKA, la seule cible mise en évidence à ce jour est la protéine Pde1p, une phosphodiesterase ayant une faible affinité pour l'AMPc. En effet, Ma *et al.* (1999) ont clairement montré une accumulation accrue d'AMPc après addition de glucose à la culture cellulaire d'une souche *Δpde1* tandis qu'une surproduction de Pde1p abolissait l'accumulation d'AMPc. Ils ont montré que l'activation de la PKA résultant de l'addition de glucose induisait la phosphorylation de Pde1p et que cette phosphorylation provoquait une stimulation de l'hydrolyse de l'AMPc par Pde1p. Colombo *et al.* (2004) ont relancé l'hypothèse selon laquelle Ras, ou une protéine en amont de Ras pourrait être une cible de ce rétrocontrôle en démontrant que l'addition de glucose à une culture cellulaire provoque une augmentation du taux de Ras2-GTP qui est indépendante de la voie Gpr1p/Gpa2p et que ce taux de Ras2-GTP est régulé de façon stricte par la PKA comme c'est le cas pour l'AMPc.

La PKA active va phosphoryler un grand nombre de protéines impliquées dans la transcription : Msn2p, Msn4p (Gorner *et al.*, 1998) ; Adr1p (Cherry *et al.*, 1989), le métabolisme : Cho1p (Kinney & Carman, 1988) ; Pfk2p (Dihazi *et al.*, 2003), fructose biphosphatase, pyruvate kinase (Portela *et al.*, 2001) et l'accumulation du glycogène (glycogène synthase, glycogène phosphorylase) et du tréhalose (tréhalose, tréhalose-6-Phosphatase) (Smith *et al.*, 1998) et le cycle cellulaire. Bien que tous les isomères Tpk soient fonctionnellement redondants pour la viabilité cellulaire, ils apparaissent réguler différents processus et une étude à grande échelle a montré que c'étaient des protéines distinctes qui



étaient ciblées par Tpk1 (256), Tpk2 (29) et Tpk3 (79) et que plus de 87% des substrats de PKA étaient uniquement phosphorylés par une seule de ces Tpk (Ptacek *et al.*, 2005).

Enfin, la PKA est capable de phosphoryler sa propre sous-unité régulatrice, Bcy1p, et l'état de phosphorylation de Bcy1p va affecter son affinité pour la sous unité catalytique (Kuret *et al.*, 1988).

## 2.2.5 Autres acteurs de la voie

### 2.2.5.1 Les phosphodiesterases

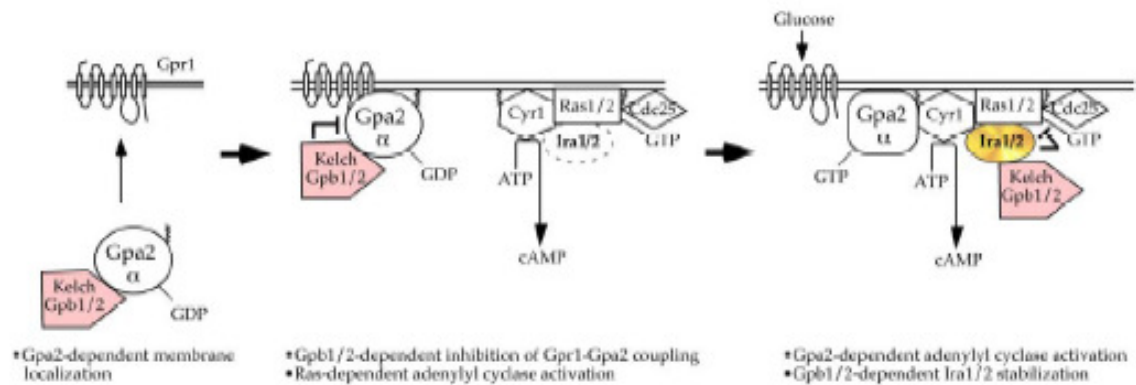
Les phosphodiesterases Pde1p et Pde2p sont responsables de la dégradation de l'AMPc. Ce sont des protéines de 43 et 61kDa respectivement dont les gènes ont été identifiés comme des suppresseurs multicopie de la sensibilité au choc thermique du mutant *ras2<sup>val9</sup>* (Nikawa *et al.*, 1987). Les fonctions de ces deux enzymes varient. En effet, Pde2p contrôle le niveau de base de l'AMPc alors que Pde1p intervient pour diminuer les fortes concentrations d'AMPc lors de l'addition de glucose ou de l'acidification intracellulaire (Ma *et al.*, 1999). La faible affinité de Pde1p pour l'AMPc comparée à la forte affinité de Pde2p est tout à fait cohérente avec ces deux fonctions. Pde1p peut être phosphorylée sur la sérine 252 par la PKA. Cette phosphorylation ne change pas son activité intrinsèque ni son affinité pour l'AMPc mais elle apparaît être importante *in vivo* pour stimuler la dégradation de l'AMPc. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'induction d'interactions protéine-protéine ou le ciblage de Pde1p à une localisation spécifique (Ma *et al.*, 1999).

Dans le double mutant *pde1pde2*, le niveau basal d'AMPc intracellulaire augmente seulement d'un facteur 2 par rapport à la souche sauvage mais le phénotype observé est caractérisé par une hyperactivation de la PKA (Nikawa *et al.*, 1987). Ces résultats suggèrent que le mécanisme de rétrocontrôle de l'accumulation d'AMPc est majoritairement indépendant des phosphodiesterases ou au moins que leur effet peut être mimé par d'autres mécanismes dans ce fond génétique. Ce même double mutant peut également sauver les défauts de la double mutation *ras1 ras2*.

### 2.2.5.2 Les activateurs de la voie

#### 2.2.5.2.1 Le système Gpr1p/Gpa2p

Ce système n'agit pas en amont de la voie Ras/ AMPc/PKA mais en parallèle de celle-ci pour contrôler l'activation de l'adénylate cyclase et la synthèse d'AMPc.



**FIGURE 28: Modèle d'action des protéines Kelch Gpb1/2p sur la voie Ras/AMPC/PKA (Harashima *et al.*, 2006)**

Gpb1/2p se lieraient préférentiellement à Gpa2-GDP et seraient recrutées à la membrane par l'intermédiaire de l'interaction entre Gpa2p et Gpr1p. Gpb1/2 inhibent le complexe Gpa2p/Gpr1p (Harashima & Heitman, 2002 ; 2005). Quand le glucose se fixe au récepteur Gpr1, il y aurait échange du GDP en GTP sur Gpa2p et Gpb1/2p se dissocieraient de Gpa2-GTP. Puis, Gpa2-GTP stimule la production d'AMPC via l'adénylate cyclase et ensuite les sous-unités Gpb1/2p libérées vont interagir avec les protéines Ira1/2p et les stabiliser. Les protéines Ira1/2p se lient à Ras-GTP et stimulent l'hydrolyse du GTP favorisant la forme Ras-GDP.

Les protéines G hétérotrimériques sont des régulateurs clés de la croissance et du développement des cellules eucaryotes. Chez la levure, il existe deux gènes codant des sous-unités  $\alpha$  des protéines G : *GPA1* et *GPA2* ont été identifiés (Nakafuku *et al.*, 1987; Nakafuku *et al.*, 1988).

*GPA1* est impliqué dans l'activation de la voie MAPK régulant l'accouplement suite à l'interaction des phéromones avec leurs récepteurs Ste2/Ste3p (Dietzel & Kurjan, 1987).

*GPA2* est, quant à lui, impliqué dans la régulation de l'AMPc et il a été montré que la surexpression de *GPA2* provoquait une augmentation du taux d'AMPc en présence de glucose (Nakafuku *et al.*, 1988). De plus, Gpa2p est nécessaire pour la synthèse d'AMPc induite par le glucose (Colombo *et al.*, 1998).

Gpa2p est couplée à un récepteur de la surface cellulaire, appelé Gpr1p, composé de sept domaines transmembranaires qui est une structure typique des récepteurs couplés aux protéines G (Xue *et al.*, 1998). Cette interaction a été mise en évidence par double hybride et elle a lieu au niveau de la queue C-terminale et de la troisième boucle cytosolique de Gpr1p. Les effets conférés par une délétion de *GPR1* sont supprimés grâce à l'activation constitutive de Gpa2p (Lorenz *et al.*, 2000). De plus, les études de Rolland *et al.* (2000) ont montré que Gpr1p était un senseur du glucose extracellulaire et servait elle-même de récepteur au glucose. Le double mutant *gpa2ras2* tout comme le double mutant *gpr1ras2* montre des défauts de croissance sévères, suggérant que Gpa2p et Ras2p ont des fonctions partiellement redondantes et parallèles dans la voie de signalisation AC/AMPc/PKA. Colombo *et al.* (1998) ont précisé que Gpa2p pouvait être considéré comme un régulateur positif de l'adénylate cyclase puisque le pic d'AMPc induit par le glucose était éliminé dans une souche mutante *gpa2*.

Contrairement à la voie Ras, peu de choses sont connues sur la branche Gpa2/AMPc/PKA. Mais on pense que cette voie jouerait un rôle lors de la transition de la phase respiratoire à la phase fermentaire sur glucose mais n'agirait pas sur l'activité basale de l'adénylate cyclase. Deux protéines à domaines kelch ont été mises en évidence, Gpb1p et Gpb2p, comme étant impliquées dans la voie Gpa2/AMPc/PKA. Gpb1p et Gpb2p interagissent avec Gpa2p et l'inhibe (Batlle *et al.*, 2003; Harashima & Heitman, 2002). Une délétion de *GPB1* et *GPB2* provoque un phénotype avec une activité élevée de la PKA. Cependant, l'introduction d'une mutation *gpa2* dans cette souche n'atténue que partiellement les phénotypes induits par *gpb1 gpb2*. Cela confirme que Gpb1p et Gpb2p ont une fonction antagoniste à Gpa2p mais suggère de plus qu'elles agissent sur un autre composant de la voie AC/AMPc/PKA (Batlle *et al.*, 2003; Harashima & Heitman, 2002). Une étude récente a confirmé cela en montrant que les





protéines Gpb1p et Gpb2p interagissent avec Ira1p et Ira2p (Harashima *et al.*, 2006). En se liant au domaine C-terminal conservé de Ira1p et Ira2p, Gpb1p et Gpb2p stabilisent les deux protéines Ira ce qui provoque une diminution du taux de Ras-GTP et une inactivation de la voie AC/AMPC/PKA (FIGURE 28) d'une autre manière que par l'inhibition de Gpa2p.

Une étude antérieure de Lu et Hirsch (2005) avait montré que Gpb1p et Gpb2p étaient capables d'altérer le niveau de phosphorylation des substrats de la PKA sans altérer la concentration intracellulaire en AMPc. Cela suggérerait une action de ces protéines en aval de l'adénylate cyclase, peut être au niveau des sous-unités régulatrices ou catalytiques de la PKA. Ce modèle n'est pas à opposer au précédent et a reçu la confirmation des expériences menées par Peeters *et al.* (2006). Ces auteurs ont en effet montré que Gpb1p interagissait directement avec la sous-unité catalytique de la PKA et que Gpb1p avait plus d'affinité pour Gpa2-GTP que pour Gpa2-GDP et pourrait se comporter en effecteur de Gpa2-GTP. Cela leur a permis de proposer un modèle selon lequel Gpa2p régulerait l'activité de la PKA de deux façons : soit par une activation directe de l'adénylate cyclase comme cela a déjà été démontré (Colombo *et al.*, 1998) soit indépendamment de l'adénylate cyclase par l'intermédiaire de l'inhibition des protéines kelch qui n'iraient plus alors inhiber la PKA en interagissant avec sa sous-unité catalytique. Dans ce dernier modèle, Gpb1p et Gpb2p ne seraient pas uniquement contrôlées par Gpa2p mais d'autres stimuli pourraient intervenir (Peeters *et al.*, 2006).

#### 2.2.5.2.2 *Le glucose*

Quand du glucose est ajouté à des cellules qui ont poussées en absence de glucose, une augmentation transitoire du taux d'AMPC dans la cellule est observée. Colombo *et al.* (2004) ont prouvé que l'addition de glucose provoquait une augmentation rapide (concomitante à celle de la concentration en AMPc) de la quantité de Ras2-GTP. Dans un mutant *gpr1 gpa2*, l'augmentation de la quantité d'AMPC après ajout de glucose est moins importante que dans une souche sauvage ce qui confirme que les deux systèmes Gpr1p/Gpa2p et Ras/Cdc25p/Ira, agissent tous deux sur l'adénylate cyclase après addition de glucose.

L'augmentation de Ras2-GTP induite par le glucose ne dépend pas de Gpr1p/Gpa2p. La délétion de *GPR1* ou *GPA2* provoque même une augmentation de la quantité de Ras2-GTP ce qui montre que les deux systèmes interagissent entre eux d'une façon directe ou indirecte (Colombo *et al.*, 2004). (Rolland *et al.*, 2000) ont montré que la phosphorylation intracellulaire du glucose par la glucokinase ou les hexokinases était nécessaire pour qu'il y



ait une activation de la voie AC/AMPC/PKA. Colombo *et al.* (2004) ont montré qu'il en était de même pour l'augmentation de Ras2-GTP. L'hypothèse de ces auteurs est que ce phénomène de phosphorylation du glucose serait responsable de l'inhibition de la protéine Ira2p ce qui conduirait à une augmentation de la quantité de Ras2-GTP.

#### *2.2.5.2.2. Mise en évidence d'un nouvel activateur*

Récemment, Chautard *et al.* (2004) ont mis en évidence un nouvel activateur de la voie Ras/AMPC/PKA : la protéine Tfs1p (Tenty-Five Suppressor 1). Cette protéine, appartenant à la famille très conservée des PEBP (Phosphatidylethanolamine Binding Protein), est décrite en détail dans le chapitre suivant. L'étude du rôle physiologique de Tfs1p a fait l'objet d'une partie de mon travail de thèse.



### **3. Tfs1p, un membre de la famille des PEBP, ayant une double fonction et associée à la réponse générale au stress**

La protéine Tfs1p appartient à la famille hautement conservée des PEBP (Phosphatidyléthanolamine binding protein) qui sont présentes chez de nombreux organismes tels que les mammifères, les plantes, la drosophile, la levure et les bactéries. Les membres de cette famille sont caractérisés par la présence d'une cavité permettant la fixation de ligands anioniques (FIGURE 30).

Robinson & Tatchell, 1991 placent la protéine Tfs1p au carrefour entre la voie Ras/AMPC/PKA et la voie générale de réponse au stress chez la levure. En effet, Tfs1p a été initialement isolée comme suppresseur multicopie de la mutation *cdc25-1*.

De plus, *TFS1* est un gène régulé par la réponse générale au stress en raison de la présence d'éléments STRE (Stress response element) au niveau de son promoteur. Ainsi, Tfs1p est surproduite dans diverses conditions de stress tels que le stress oxydatif, le choc thermique et la transition diauxique (Boy-Marcotte *et al.*, 1998; Boy-Marcotte *et al.*, 1999; Godon *et al.*, 1998).

Enfin, deux fonctions ont été attribuées à cette protéine : Tfs1p est capable d'inhiber une protéase à sérine, la CPY (Carboxypeptidase Y) (Bruun *et al.*, 1998) et Tfs1p est un inhibiteur d'une protéine GAP de Ras, Ira2p (Chautard *et al.*, 2004).

#### **3.1. Caractéristiques et structure 3D de la protéine Tfs1p**

##### **3.1.1 Caractéristiques de Tfs1p**

La protéine Tfs1p est une protéine de 219 acides aminés, localisée à la fois dans le cytoplasme et le noyau des cellules. Ses caractéristiques moléculaires sont définies par une taille de 24,357 kDa et un point isoélectrique de 6,25. Le gène codant cette protéine est localisé sur le chromosome XII et le mutant nul pour *tfs1* est viable.

Tfs1p a un homologue chez la levure : il s'agit d'une protéine de 201 résidus nommée Ylr179cp. Les gènes *TFS1* et *YLR179C* sont adjacents.

Tfs1p possède une particularité : elle est acétylée sur sa méthionine N-terminale (Huang *et al.*, 1987) par la N-terminal acétyltransférase NatB (Caesar & Blomberg, 2004).



Récemment, des expériences de résonance plasmonique de surface et des essais de liaison aux liposomes ont révélé que Tfs1p avait plus d'affinité pour les phospholipides anioniques tels que la phosphatidylsérine, le phosphatidylinositol 3-phosphate, le phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate que pour la phosphatidyléthanolamine (Mima *et al.*, 2006).

### 3.1.2 Modification post-traductionnelles de Tfs1p

L'acétylation de l'extrémité N-terminale est une des modifications les plus courantes dans les cellules eucaryotes : plus de 40% des protéines de levure et presque 90% des protéines de mammifères sont acétylées en N-terminal (Polevoda & Sherman, 2003). L'addition du groupement acétyl est catalysée par les N-terminal Acétyl Transférases.

#### 3.1.2.1 Les N-terminal Acétyl Transférases (NATs)

Les NATs agissent sur des substrats ayant une séquence d'acides aminés spécifique en N-terminal. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, il existe 3 Nats : Nat A, B et C.

La Nat A est composée des sous-unités Ard1p et Nat1p (Mullen *et al.*, 1989). Nat5p s'associe à ces deux dernières protéines bien que cette association ne semble pas indispensable à la fonction de Nat A (Gautschi *et al.*, 2003). Les substrats de Nat A ont une terminaison N-terminale -Ser, -Ala, -Gly, et -Thr (Polevoda *et al.*, 1999). L'acétylation dépendante de Nat A nécessite d'ôter la méthionine initiale par action des 2-Méthionine aminopeptidases Map1p et Map2p (Polevoda & Sherman, 2000).

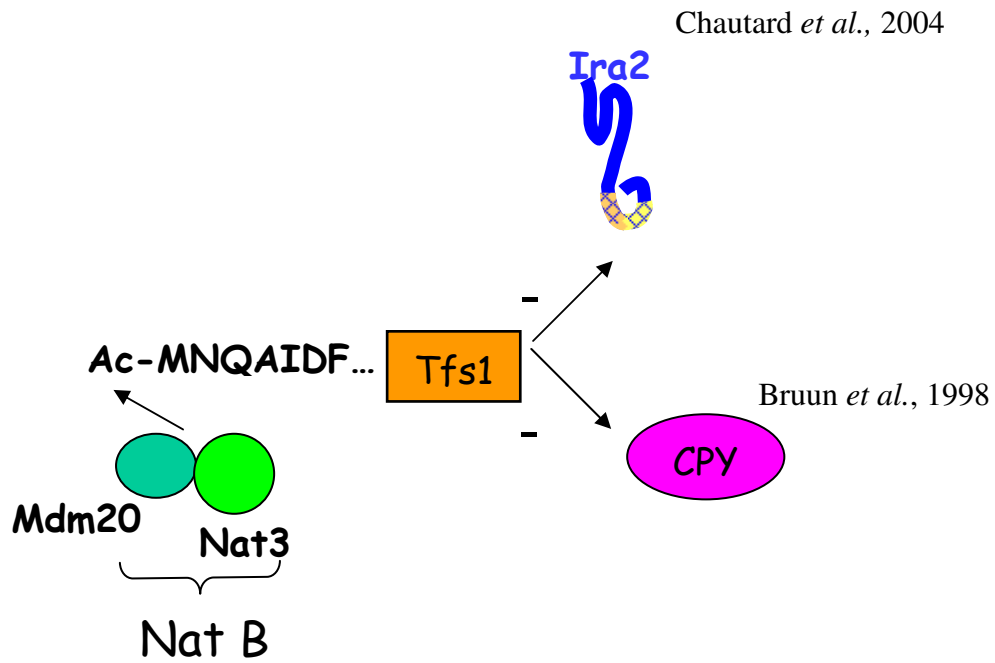
La Nat C est composée des sous-unités Mak3p, Mak10p et Mak 31p (Rigaut *et al.*, 1999) alors que Nat B est formée de Nat3p et Mdm20p (Polevoda *et al.*, 2003). Les substrats de Nat C ont une extrémité N-terminale par Met-Ileu ou Met-Leu.

Une autre classe spécifique de substrats possédant une extrémité N-terminale Ser-Glu-Phe, Ala- Glu-Phe ou Gly- Glu-Phe nécessite les trois Nats pour l'acétylation (Polevoda *et al.*, 1999).

#### 3.1.2.2 La N-terminal Acétyl Transférase B (Nat B)

Cette enzyme est composée d'une sous-unité catalytique Nat3p et d'une sous-unité régulatrice Mdm20p.





**FIGURE 30 : Acétylation de Tfs1p**

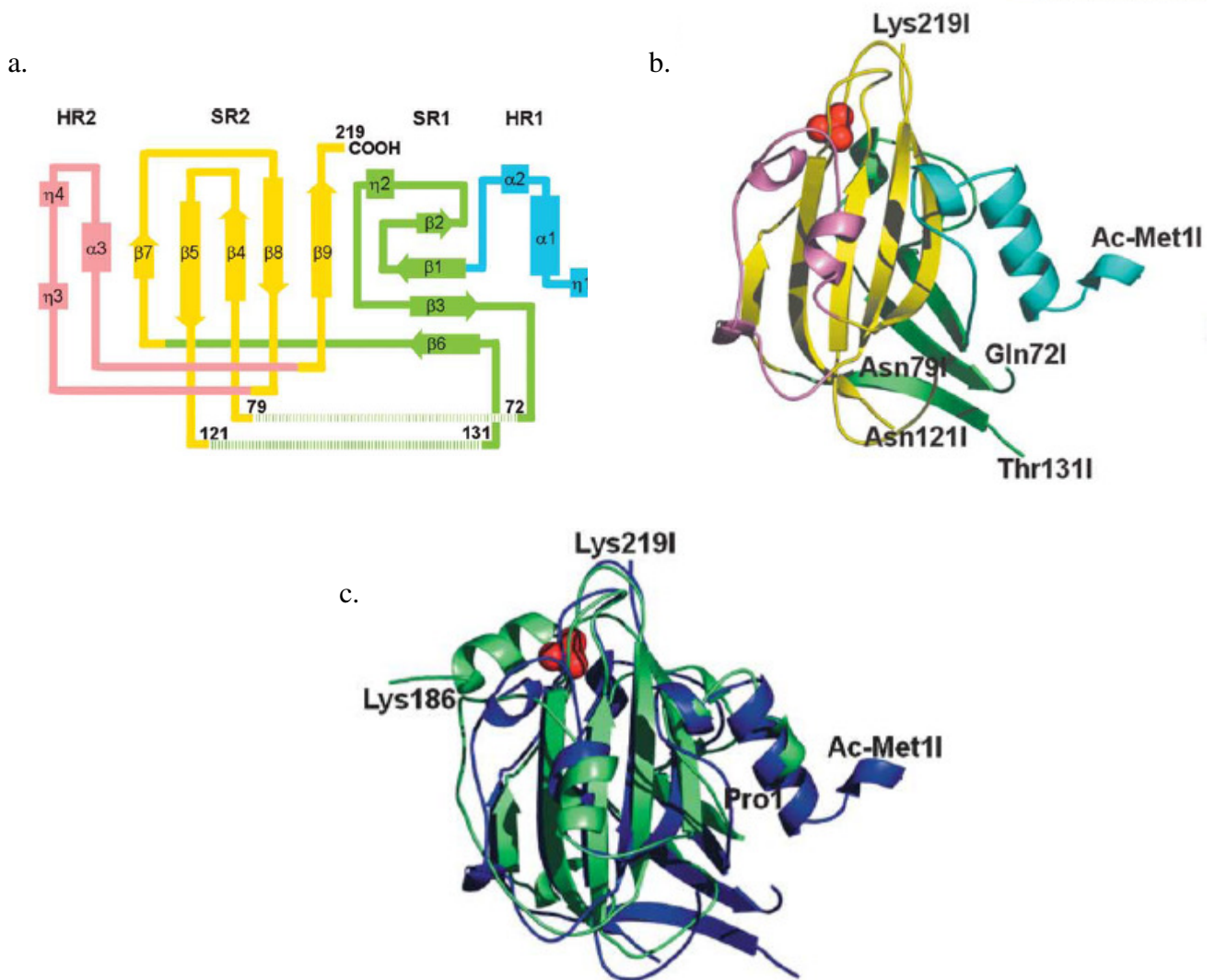
Le gène *NAT3* codant pour la sous-unité catalytique de Nat B montre une influence sur l'acétylation N-terminale d'un nombre limité de protéines de levure : 10 substrats de Nat B ont été identifiés incluant Act1p et Rnr4p (Polevoda *et al.*, 1999), Tpm1p (Singer & Shaw, 2003), 4 protéines ribosomales (Arnold *et al.*, 1999) et 3 sous-unités du protéasome 26S (Kimura *et al.*, 2000).

Des levures délétées des gènes *NAT A*, *B* ou *C* sont viables mais présentent des phénotypes variés, qui sont d'ailleurs plus sévères pour les souches  $\Delta natB$ . Des cellules  $\Delta nat3$ , qui montrent une perte de fonction de Nat B, sont caractérisées par une diminution de la croissance, une sensibilité à différents inhibiteurs de croissance, une incapacité à se multiplier à 37°C ou encore des anomalies mitochondriales et vacuolaires (Polevoda *et al.*, 2003 ; Singer & Shaw, 2003).

La séquence de l'extrémité N-terminale utile pour le substrat de Nat B est MD-, ME- et MN-. Cependant, le nombre de protéines dans le protéome de levure avec cette terminaison s'élève à 600, indiquant que beaucoup d'autres protéines sont potentiellement modifiées par le système Nat B chez la levure. Tfs1p est la première protéine native de levure avec une extrémité N-terminale MN- à être identifiée comme un substrat de l'enzyme Nat B (FIGURE 29).

### 3.1.2.3 Importance de l'acétylation

Il a été démontré dans certains cas que l'acétylation du groupement N-terminal a une importance biologique pour la fonction de la protéine. Chez la levure, l'acétylation N-terminale médiée par Nat A des protéines Orc1p et Sir3p est nécessaire pour le mécanisme de blocage transcriptionnel c'est-à-dire pour réprimer des gènes en formant des structures d'hétérochromatine (Geissenhoner *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004b). De manière similaire, la perte de l'acétylation dépendante de NAT C de la GTPase Arl3p empêchent le ciblage de cette protéine dans l'appareil de Golgi (Behnia *et al.*, 2004; Setty *et al.*, 2004). Enfin, l'acétylation de la tropomyosine et de l'actine par Nat B est nécessaire pour la formation de filaments d'actine stables (Polevoda *et al.*, 2003; Singer & Shaw, 2003). Récemment, l'identification de trois nouvelles cibles de Nat B impliquées dans la régulation du cycle cellulaire a confirmé l'importance fonctionnelle de l'acétylation par Nat B (Caesar *et al.*, 2006).



**FIGURE 30 : Modèle de la structure de Tfs1p**

(d'après Mima *et al.*, 2005)

a. Diagramme topologique de l'arrangement des structures secondaires de Tfs1p  
Les brins  $\beta$  ( $\beta 1$  à 9) sont représentés par des flèches, et les hélices  $\alpha$  ( $\alpha 1$  à 3) et 3-10 par des rectangles. La structure générale de Tfs1p comprend 4 unités : HR1 (bleu) formé par  $\eta 1$  et  $\alpha 1-2$ , SR1 (vert) par  $\beta 1-3$ ,  $\beta 6$  et  $\eta 2$ , SR2 (jaune) par  $\beta 4-5$  et  $\beta 7-9$  et HR2 (rose) par  $\eta 3-4$  et  $\alpha 3$ .

b. Représentation en ruban de la structure de Tfs1p  
Les régions HR1, HR2, SR1 et SR2 sont colorées de la même façon que dans la figure a.

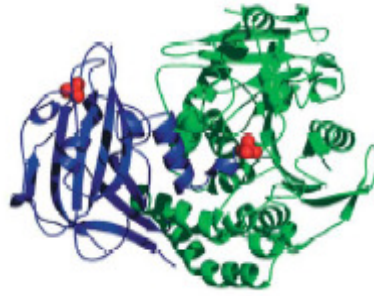
c. Superposition des structures de Tfs1p (en bleu) et de la PEBP bovine (en vert) ; l'ion sulfate lié à Tfs1p est représenté par des sphères rouges

Pour Tfs1p, l'acétylation de la méthionine N-terminale a aussi une importance fonctionnelle pour l'inhibition de CPY (Mima *et al.*, 2002). En effet, ces auteurs ont montré que Tfs1p étiquetée par 6 histidines en N-terminal et exprimée chez la bactérie *E.coli* inhibait CPY avec une efficacité plus faible que lorsque la protéine était exprimée chez la levure. Une protéine Tfs1p non étiquetée mais non acétylée est, elle, complètement incapable de la moindre inhibition de CPY (Mima *et al.*, 2002). En résolvant la structure 3D d'un complexe Tfs1p/CPY, Mima *et al.* (2005) ont pu expliquer moléculairement le rôle de l'acétylation de Tfs1p dans l'inhibition de CPY (voir paragraphe 3.2.1).

### 3.1.3 Structure 3D de Tfs1p

La structure tri-dimensionnelle de Tfs1p est obtenue à partir de celle du complexe entre Tfs1p et CPY. Elle est constituée majoritairement d'une entité centrale en feuillet de type  $\beta$  et d'un segment hélicoïdal N-terminal. Ce segment est formé d'une hélice  $3_{10}$  ( $\eta_1$ ) et de deux hélices  $\alpha$  ( $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ ) pour définir la région HR1 (Hélicoïdal region 1) (FIGURE 30a). L'entité de type  $\beta$  est formée par trois segments caractérisés par des structures secondaires : deux régions riches en brin  $\beta$  (SR1 et SR2 : Strand-rich Region) et une région en hélices (HR2). La région SR2 est composée d'un feuillet  $\beta$  central constitué de 5 brins anti-parallèles et elle est entourée par une seconde région en feuillet  $\beta$  anti-parallèle d'un côté et une région hélicoïdale comprenant trois hélices  $\alpha$  (HR2) insérée entre les brins  $\beta_8$  et  $\beta_9$ . La superposition de la structure de Tfs1p et de celle de la PEBP bovine (FIGURE 30c) montre de fortes similarités notamment au niveau de la région SR2. Cette forte similarité est à rapprocher du fait que le feuillet  $\beta$  central est une caractéristique commune aux membres de la famille des PEBP.

La cavité correspondant au site de fixation de ligands chez les PEBP est formée par les résidus des boucles connectant les brins  $\beta_4$  et  $\beta_5$  puis  $\beta_8$  et  $\beta_7$  de SR2. Dans la structure 3D du complexe Tfs1/CPY, la cavité de Tfs1p loge un ion sulfate. La superposition du site de liaison de Tfs1p avec celui de la PEBP bovine montre que l'arrangement spatial des résidus formant les cavités et les liaisons hydrogènes pour lier le ligand anionique (ion sulfate pour Tfs1p et groupement phosphate de la phosphoryléthanolamine pour la PEBP bovine) est hautement conservé entre les deux protéines (Serre *et al.*, 1998 ; Mima *et al.*, 2005).



**FIGURE 31 : Représentation en ruban de la structure du complexe  
Tfs1p/CPY**

(d'après Mima *et al.*, 2005)

Tfs1p est représentée en bleu et CPY en vert. Les ions sulfates sont schématisés par des sphères rouges.

## 3.2 Les fonctions de Tfs1p

### 3.2.1 Tfs1p est un inhibiteur de protéase à sérine : la carboxypeptidase Y (CPY)

Tfs1p a été identifiée comme un inhibiteur spécifique d'une protéase à sérine, la carboxypeptidase Y (CPY) (Bruun *et al.*, 1998). Tfs1p inhibe spécifiquement CPY avec une constante d'inhibition ( $K_i$  apparent) de 0,1nM.

#### 3.2.1.1 La carboxypeptidase Y (CPY)

La CPY est une protéase vacuolaire, appartenant à la famille des carboxypeptidases à sérine. Elle est impliquée dans la dégradation C-terminale des peptides et des protéines. Les protéases à sérine de type carboxypeptidase utilisent un mécanisme faisant intervenir une triade catalytique Asp-His-Ser, très similaire à celle des protéases à sérines de la famille de la trypsine et de la subtilisine.

La carboxypeptidase Y est le produit du gène *PRC1*, elle est synthétisée sous la forme d'une pré-proenzyme possédant un peptide signal de 20 acides aminés suivi d'un propeptide de 91 acides aminés et de la séquence de CPY « mature » composée de 421 acides aminés. Le transport du précurseur à travers le réticulum endoplasmique est accompagné du clivage de la séquence signal (Blachly-Dyson & Stevens, 1987). Dans le lumen du réticulum endoplasmique, la protéine subit également une première étape de glycosylation pour donner la forme appelée p1-CPY (67kDa) (Stevens *et al.*, 1982). Pendant le transit dans l'appareil de golgi, la protéine subit de nouvelles étapes de glycosylation qui aboutissent à la formation de p2-CPY de 69kDa (Trimble *et al.*, 1983). Un segment de 4 acides aminés du propeptide est alors responsable du ciblage de la protéine à la vacuole (Valls *et al.*, 1990). A son entrée dans la vacuole, le propeptide est clivé lors d'un processus faisant intervenir la protéinase A (Pep4), libérant ainsi la forme mature et active de CPY (61kDa) (Ammerer *et al.*, 1986).

#### 3.2.1.2 Etude de la structure du complexe Tfs1p/CPY

La structure cristallographique du complexe Tfs1p/CPY a été résolue récemment par Mima et ses collaborateurs (2005) à une résolution de 2.7 Å. La structure générale du complexe est une structure compacte ellipsoïdale (FIGURE 31).

Dans ce complexe, Tfs1p interagit avec CPY par l'intermédiaire de deux sites de liaison : un site primaire en N-terminal qui comprend les 7 résidus N-terminaux de Tfs1p et un site de



liaison secondaire qui est principalement formé par les résidus localisés au niveau de l'hélice  $\alpha 1$  dans la région HR1 et les 4 brins  $\beta$  dans la région SR1. L'analyse de cette structure indique également la présence de deux sites de liaison à des ions sulfates qui sont localisés dans les cavités proches des résidus catalytiques de CPY et des boucles connectant les brins  $\beta$  centraux de Tfs1p.

Les régions de CPY qui sont en contact avec son inhibiteur Tfs1p ont également été déterminées. Il s'agit du site actif et 3 hélices  $\alpha$  (Ser 204-Ser227, Val230-Arg250 et Asn299-Ala309) encadrées par le site de fixation du substrat de CPY. L'étude structurale suggère de plus fortement que la boucle Cys262-Cys268 de CPY joue un rôle spécifique dans la formation du complexe avec Tfs1p.

Cette structure a aussi permis d'élucider le mécanisme précis par lequel Tfs1p inhibait CPY. L'inhibition est due au site primaire d'interaction de Tfs1p (également appelé site réactif inhibiteur N-terminal) qui vient se localiser dans le site actif de CPY. Plusieurs éléments de ce site jouent un rôle clé :

(1) le groupement acétyl de Ac-Met1 est en interaction hydrophobe avec la leucine 267 de la boucle Cys262-Cys268 et les régions carboxylate et S'1 de CPY.

(2) La chaîne latérale de l'Ac-Met1 est en contact avec les résidus hydrophobes de la région S1 de CPY.

(3) De plus, la liaison amide de l'Ac-Met1 est en liaison hydrogène avec le groupement carbonyle de la glycine 53 dans la région carboxylate.

(4) Les chaînes latérales de l'Asn2 et de la Glu3 interagissent par des liaisons hydrogènes avec le groupement carbonyle de l'Asn266 localisée dans la boucle Cys262-Cys268 de CPY.

(5) Les autres résidus, Ala4, Ileu5 et Phe7 du site primaire d'interaction de Tfs1p sont entourés par les résidus hydrophobes de la région S1 de CPY.

Dans le but de clarifier le mode d'inhibition de Tfs1p déterminé par la structure 3D du complexe Tfs1p/CPY, Mima *et al.* (2005) ont analysé les propriétés biochimiques de 4 mutants de *TFS1* : une forme non acétylée en N-terminal, l'addition d'une glycine en N-terminal pour mimer le groupement acétyl, une forme délétée de la région N-terminale ( $\Delta 1-7$ ) et une forme à la fois non acétylée et délétée en C-terminal ( $\Delta 217-219$ ). Les analyses des séquences d'acides aminés, du spectre de dichroïsme circulaire et de spectrométrie de masse révèlent que les protéines mutantes purifiées ont la structure primaire attendue et un repliement correct qui est similaire à celui de la forme native de Tfs1p. Les études





d'inhibition indiquent que le groupement acétyl en N-terminal possède des propriétés optimales pour que l'inactivation de CPY soit efficace en terme à la fois de taille et d'hydrophobicité. De plus, les 7 résidus N-terminaux de Tfs1p, qui constituent le site primaire d'interaction entre Tfs1p et CPY, sont absolument essentiels à l'activité inhibitrice de Tfs1p en solution alors que les 3 résidus C-terminaux ne contribuent que légèrement à cet effet inhibiteur.

Des analyses de chromatographie en gel de filtration de l'interaction entre les différents mutants de Tfs1p et CPY montrent que le site d'interaction primaire comprenant les résidus 1 à 7 de Tfs1p est essentiel non seulement à l'activité inhibitrice mais aussi à la formation correcte du complexe Tfs1p/CPY. Autrement dit, Tfs1p est incapable de former un complexe stable avec CPY par la seule liaison au site d'interaction secondaire à CPY.

Ces résultats montrent clairement que le mode d'interaction et d'inhibition de Tfs1p avec CPY est différent de celui des autres inhibiteurs classiques de carboxypeptidase qui se lient à la protéase de façon analogue à leur substrat et possèdent un seul site réactif inhibiteur. Trois caractéristiques différencient le mode d'interaction et d'inhibition de Tfs1p avec CPY par rapport à celui des inhibiteurs canoniques de carboxypeptidase : (1) le mode d'interaction avec le site actif de CPY, différent de celui du substrat, (2) l'implication d'un groupement acétyl N-terminal issu d'une modification post-traductionnelle pour l'inhibition complète de la protéase et (3) les sites d'interaction multiples entre Tfs1p et CPY.

Des analyses de résonance plasmonique de surface et de liaison aux liposomes réalisées avec différents mutants de Tfs1p suggèrent de plus que le segment N-terminal (Met1-His18) du site de liaison primaire de Tfs1p à CPY est essentiel pour l'efficacité et la spécificité de liaison de Tfs1p aux phospholipides anioniques (Mima *et al.*, 2006).

### **3.2.2 Tfs1p inhibe la protéine Ira2p**

#### *3.2.2.1* Tfs1p est un suppresseur multicopie de mutations dans *CDC25*

Tripp *et al.* (1989) ont été les premiers à identifier Tfs1p comme un suppresseur multicopie de mutations dans *CDC25*. D'après leurs études sur gels 2D du phosphoprotéome de cellules surproduisant Tfs1p ou non, ces auteurs ont suggéré que Tfs1p contrôlait la phosphorylation de deux protéines de 31kDa. L'état de phosphorylation de ces deux protéines est fortement corrélé avec l'arrêt du cycle cellulaire (pour les formes



phosphorylées) et la prolifération cellulaire (pour les formes non phosphorylées). L'hypothèse alors émise serait que Tfs1p pourrait agir en aval de la PKA et réguler l'activité d'une phosphatase ou inhiber une sérine thréonine kinase.

Des études plus poussées sur ce rôle potentiel de Tfs1p précédemment décrit ont été réalisées par Robinson & Tatchell (1991). Ils ont également identifié Tfs1p comme un suppresseur multicopie de mutations dans *CDC25* en examinant l'effet de la surproduction de Tfs1p sur plusieurs mutants *cdc25*.

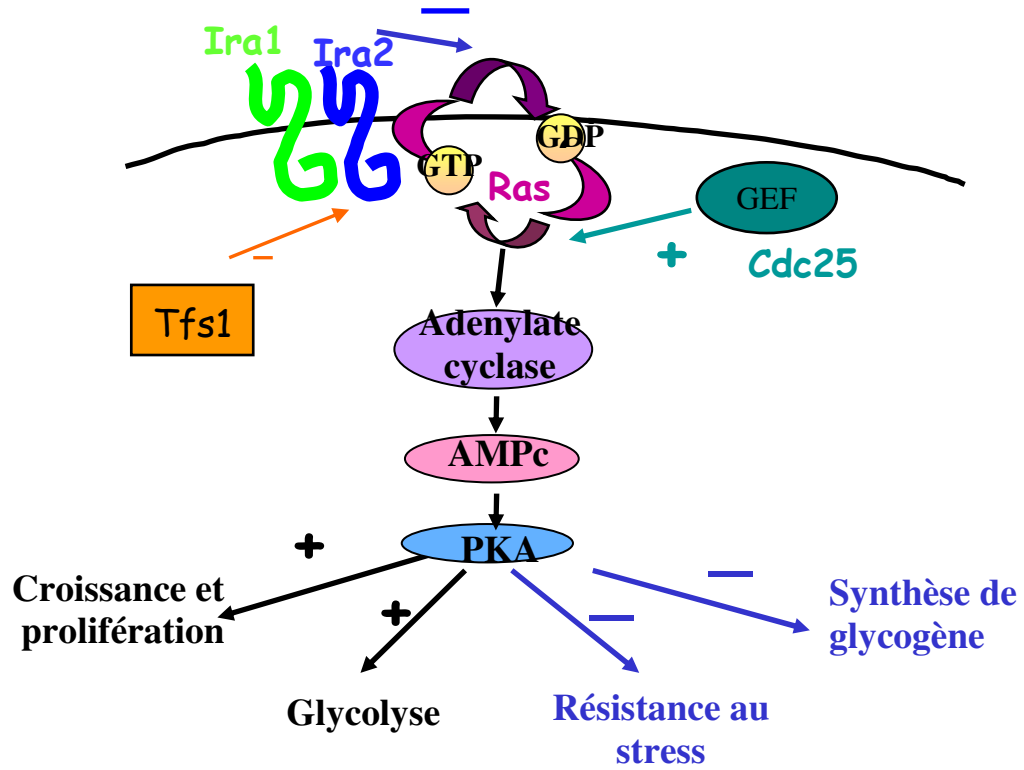
Trois mutants ponctuels thermosensibles à 37°C ont été testés : *cdc25-1*, *cdc25-5* et *cdc25-10* (Camonis *et al.*, 1986; Hartwell *et al.*, 1970; Martegani *et al.*, 1986). A la température permissive de 26°C, les souches mutantes *cdc25-5* et *cdc25-10* ne se multiplient pas normalement et semblent avoir une activité adénylate cyclase proche de celle d'une souche sauvage. A 36°C, ces mutants arrêtent rapidement leur croissance et l'activité adénylate cyclase est fortement réduite. Par contre, le mutant *cdc25-1* a une croissance perturbée même à 26°C mais continue de croître très légèrement à 36°C (Petitjean *et al.*, 1990). Robinson *et al.*, 1987 ont construit d'autres mutants en remplaçant des fragments de la séquence de *CDC25* par les marqueurs *URA3* et *LEU2*.

Robinson et Tatchell (1991) ont examiné l'effet de la surexpression de *TFS1* dans chacun de ces mutants. *TFS1* surexprimé permet à une souche mutante *cdc25-1* de croître à 37°C sur glucose mais supprime faiblement le défaut de croissance sur glycérol à 30°C. Le mutant *cdc25-5* surexprimant *TFS1* n'est pas capable de croître à 37°C mais à 35°C.

D'autre part, la surproduction de Tfs1p dans une souche sauvage n'est pas responsable de l'apparition de phénotypes marquants, si ce n'est une légère diminution de l'accumulation du glycogène.

En résumé, *TFS1* surexprimé requiert une activité résiduelle de *CDC25* pour exercer son effet car Tfs1p surproduite ne compense pas une délétion totale de *CDC25*. La surproduction de Tfs1p ne permet pas non plus de compenser la délétion de Ras ou de l'adénylate cyclase. De plus, Robinson et Tatchell (1991) ont montré que Tfs1p avait seulement une faible influence sur la production d'AMPc. Ces résultats ne vont pas dans le sens d'un rôle direct de Tfs1p sur l'activité de l'adénylate cyclase.

Les conclusions de Robinson et Tatchell (1991) diffèrent de celles de Tripp *et al.* (1989) pour qui le rôle de Tfs1p se situait en aval de la PKA. Au contraire, Robinson et Tatchell montrent que Tfs1p requiert une activité résiduelle de Cdc25p



**FIGURE 32 :** Tfs1p et la voie Ras/AMPC/PKA chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

pour exercer son action et que Tfs1p ne permet pas de supprimer les mutations de Ras ou de l'adénylate cyclase. Leur hypothèse était que Tfs1p agirait en amont de la PKA et qu'elle pourrait agir en association avec Cdc25p pour faciliter l'échange du GDP sur Ras. Ces auteurs envisagèrent aussi que Tfs1p puisse avoir un rôle dans la localisation de l'adénylate cyclase à la membrane.

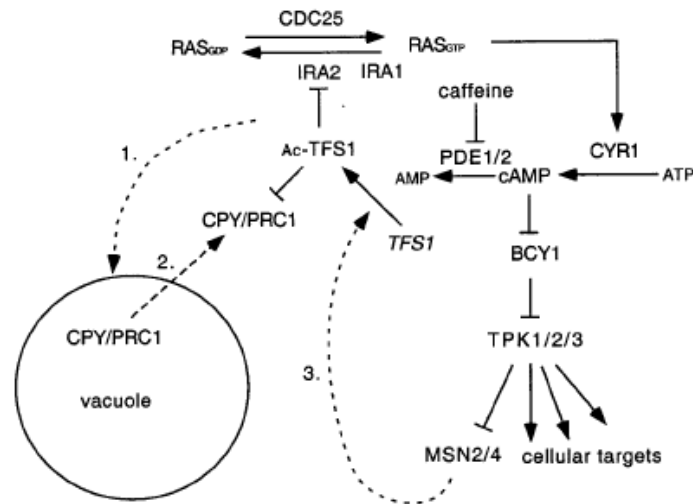
### 3.2.2.2 L'interaction Tfs1p/Ira2p est responsable du phénotype suppresseur de *cdc25-1*

L'identification d'un nouveau partenaire de Tfs1p a été possible en réalisant un crible double hybride. Un seul partenaire a été identifié parmi 80 clones positifs isolés à partir d'une banque d'ADN génomique de levure contenant  $1,2 \cdot 10^8$  clones indépendants. Ce partenaire était la protéine GAP de Ras Ira2p. Le domaine minimal d'Ira2p nécessaire à l'interaction avec Tfs1p a été précisé. Il s'agit du domaine commun à tous les clones positifs obtenus en double hybride, appelé domaine TBD (Tfs1p Binding Domain) qui s'étend des résidus 1992 à 2347 (FIGURE 24). Ce domaine est situé en C-terminal du domaine GRD mais empiète de 34 acides aminés sur ce dernier. Si ce chevauchement est inexistant, l'interaction Tfs1p/Ira2p est abolie.

Cette interaction a été validée biochimiquement par des expériences de co-précipitation *in vivo* et *in vitro*. D'autre part, les auteurs démontrent que l'interaction Tfs1p/Ira2p est directe et ne nécessite pas la présence d'autres protéines de levure (Chautard *et al.*, 2004).

Ira2p étant l'antagoniste de Cdc25p dans la régulation de Ras chez la levure, l'hypothèse selon laquelle Tfs1p supprime la mutation *cdc25-1* en inhibant Ira2p est alors émise. En effet, en inhibant Ira2p, l'antagoniste de Cdc25p, Tfs1p surproduite devrait permettre de compenser certaines mutations dans *CDC25* et notamment à la souche thermosensible *cdc25-1* de se multiplier à 37°C.

Chautard *et al.* ont démontré cette hypothèse en travaillant avec la souche *cdc25-1*. Si l'hypothèse est correcte, Tfs1p devrait avoir perdu sa capacité à compenser la mutation *cdc25-1* dans une souche *cdc25-1* délétée du domaine TBD d'Ira2p (*cdc25-1  $\Delta$ ira2TBD*). Les résultats montrent que, contrairement à ce qui se passe lorsque Tfs1p est surproduite dans une souche *cdc25-1* c'est-à-dire une croissance des cellules à 37°C, la surproduction de Tfs1p dans une souche *cdc25-1* délétée du domaine TBD, ne permet pas à



**FIGURE 33 : Représentation des rôles inhibiteurs de Tfs1p**  
(d'après Caesar & Blomberg, 2004)

Les flèches en pointillés indiquent les voies fonctionnelles potentielles de Tfs1p.

1. Autophagocytose du complexe Tfs1p/Ira2p par la vacuole pour être détruit par CPY.

2. Passage de CPY dans le cytoplasme induit par un stress, qui pourrait expliquer la fonction inhibitrice de Tfs1p

3. La boucle de rétro-contrôle négatif de la réponse générale au stress via les éléments STRE présents dans le promoteur du gène Tfs1p augmente la production de Tfs1p menant à l'inhibition d'Ira2p, ce qui provoque une forte activité PKA et par conséquent la répression de la réponse au stress par l'inhibition des facteurs de transcription Msn2/4p.

ces cellules de croître à 37°C. Ceci démontre donc que l'effet suppresseur de Tfs1p nécessite le domaine TBD d'Ira2p et suggère fortement que Tfs1p pourrait jouer un rôle inhibiteur vis-à-vis de l'activité GAP de Ira2p.

Chautard *et al.* (2004) ont de plus isolé des mutants ponctuels de Tfs1p incapables d'interagir avec Ira2p, ils sont aussi incapables de compenser, après surproduction, la mutation *cdc25-1*.

### 3.2.2.3 Tfs1p active la voie Ras/AMPC/PKA

La voie Ras/AMPC/PKA contrôle négativement la réponse générale au stress chez la levure *S. cerevisiae* (FIGURE 32). Si la voie Ras/AMPC/PKA est activée, la PKA va agir négativement sur les facteurs de transcription Mns2p et Msn4p et ainsi contribuer à l'affaiblissement de la réponse au stress. Si Tfs1p inhibe Ira2p, sa surproduction va induire un taux élevé d'activité de Ras et donc de la voie Ras/AMPC/PKA tandis que la délétion de *TFS1* sera associée au phénotype inverse. En analysant la sensibilité de souches  $\Delta tfs1$  ou surproductrices de Tfs1p à un choc thermique ou oxydatif, Chautard *et al.* (2004) ont montré qu'une souche  $\Delta tfs1$  était moins sensible à ces deux stress qu'une souche sauvage alors qu'une souche surproduisant Tfs1p était plus sensible à ces deux stress qu'une souche sauvage. Ce résultat prouve que Tfs1p inhibe Ira2p et ainsi contribue à activer la voie Ras/AMPC/PKA.

### 3.2.3 Tfs1p et ses deux rôles inhibiteurs en opposition

Ainsi, deux rôles inhibiteurs ont été mis en évidence pour la protéine Tfs1p. Ces rôles attirent l'attention car Tfs1p interagit et inhibe Ira2p, qui est une protéine membranaire (Chautard *et al.*, 2004) et d'autre part, Tfs1p inhibe spécifiquement une carboxypeptidase vacuolaire, CPY (Bruun *et al.*, 1998). Tfs1p a donc deux rôles qui prennent naissance à des localisations différentes de la cellule. D'autre part, Bruun *et al.* (1998) ont montré que ces deux fonctions de Tfs1p sont indépendantes. En effet, dans un contexte  $\Delta prc1$ , Tfs1p ne supprime pas la mutation *cdc25-1* donc Tfs1p ne supprime pas la mutation *cdc25-1* en inhibant CPY.

Une des premières hypothèses proposée a été que les inhibiteurs cytoplasmiques de protéases joueraient un rôle de protection car ils sont capables de piéger les protéases au cas où la paroi de la vacuole serait endommagée (Bruun *et al.*, 1998). Tfs1p inhiberait CPY quand celle-ci serait accidentellement libérée dans le cytoplasme après un stress pouvant rompre partiellement la membrane vacuolaire. Cependant, des arguments





contredisent cette hypothèse car une des fonctions importantes de la vacuole est de maintenir la stabilité osmotique et électrolytique de la cellule. Ainsi, une détérioration de la paroi vacuolaire conduirait à la libération des protéases et hydrolases mais surtout à une modification importante de l'équilibre des sels et du pH dans la cellule. Or, il n'existe aucune donnée prouvant que la cellule puisse survivre à de telles conditions. Takeshige *et al.*, 1992 ont proposé que ces inhibiteurs auraient plutôt pour rôle de réguler la protéolyse lors du phénomène d'autophagocytose, quand une partie du contenu cytoplasmique entre dans la vacuole. Ce phénomène, induit en cas de carence en nutriments, est un processus de trafic membranaire qui permet au matériel cytoplasmique d'être transporté non spécifiquement à la vacuole pour y être dégradé.

Plus récemment, Caesar & Blomberg (2004) ont proposé un nouveau modèle (FIGURE 33) permettant d'expliquer l'interconnection des fonctions inhibitrices de Tfs1p. Ces auteurs émettent l'hypothèse que Tfs1p pourrait faciliter la dégradation de Ira2p par CPY dans la vacuole, en stimulant l'autophagocytose du complexe par exemple, et activerait ainsi la voie PKA. Ces auteurs font le lien entre les trois protéines Tfs1p, Ira2p et CPY et suggèrent ainsi que Tfs1p inhiberait Ira2p en facilitant sa dégradation.

La liaison de Tfs1p aux membranes cellulaires a été récemment étudiée par Mima et ses collaborateurs (2006) grâce à des expériences de microscopie par fluorescence dans des cellules de levure produisant une protéine Tfs1p étiquetée avec la GFP (Green Fluorescent Protein). Ces analyses révèlent que la localisation cellulaire de Tfs1p-GFP est spécifiquement ciblée vers les membranes et le lumen des vacuoles plutôt que vers la membrane cytoplasmique pendant la phase stationnaire de croissance.

La composition lipidique des membranes subcellulaires chez la levure *S. cerevisiae* a été étudiée (Schneiter *et al.*, 1999; Zinser *et al.*, 1991), mais peu d'informations précises concernant le contenu en phosphoinositides des membranes vacuolaires et la variation de la composition des phospholipides à différentes phases de croissance sont disponibles. Il reste à définir si ce ciblage de Tfs1p à la membrane des vacuoles dépend de la capacité de cet inhibiteur à se lier aux phospholipides incluant la phosphatidylsérine et les phosphoinositides. La relocalisation de Tfs1p pendant la phase stationnaire conduit à proposer un nouveau modèle dans lequel la localisation de Tfs1p serait cytoplasmique pendant la phase de croissance. Par contre, Tfs1p serait ciblée vers les phospholipides anioniques des membranes vacuolaires pendant la phase stationnaire, et pourrait même être internalisée dans la lumière vacuolaire pour réguler les activités de CPY.

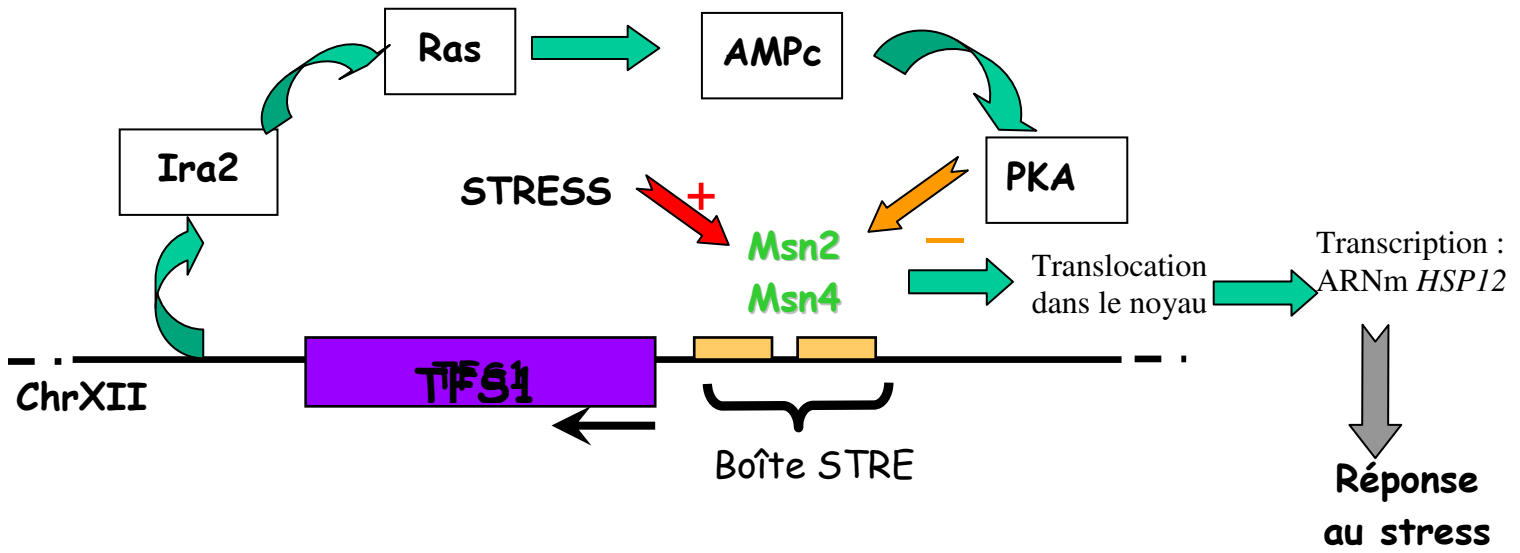


FIGURE 34 : Représentation de la réponse générale au stress

L'interaction de Tfs1p avec la protéine GAP, Ira2p (Chautard *et al.*, 2004) pourrait réguler la localisation cytoplasmique de Tfs1p en phase logarithmique de croissance. De plus, il a été démontré que Tfs1p était capable d'interagir et d'inhiber CPY en condition acide (Mima *et al.*, 2004). L'analyse des propriétés inhibitrices de Tfs1p *in vitro* supporte ainsi le schéma proposé par Mima *et al.* (2006) selon lequel Tfs1p inhiberait CPY à l'intérieur des vacuoles.

### **3.3 Tfs1p et la réponse au stress**

Tous les organismes développent des mécanismes d'adaptation aux variations environnementales car les conditions du milieu extérieur sont loin d'être constantes et les cellules sont soumises à de nombreux stress environnementaux (fluctuations de température, d'osmolarité, de pH, présence de molécules toxiques, longues périodes de privation de nutriment). Chez la levure, les réponses cellulaires impliquent l'activation de la transcription de nombreux gènes dont certains vont promouvoir une adaptation spécifique à la nouvelle condition environnementale alors que d'autres, moins spécifiques, seront induits en réponse à une large variété de modifications.

Le système de réponse au stress impliquant les boîtes STRE (Stress Response Element) et les facteurs de transcription Msn2p et Msn4p est un exemple de réponse à large spécificité, appelé système général de réponse au stress. A côté de la réponse générale au stress, il existe des réponses cellulaires dites « spécialisées » qui sont spécifiques à chaque type de stress (présence de drogues, choc oxydatif, choc osmotique, choc thermique...).

#### **3.3.1 Présentation**

Plusieurs études ont mis en évidence que *TFS1* était fortement surexprimé en conditions de stress. Roth *et al.*, 1998 ont identifié *TFS1* comme un gène dont l'expression est plus forte à 39°C qu'à 30°C. En effet, *TFS1* est un gène dont l'expression est induite lors de nombreux stress, en particulier en cas de choc thermique (Gash *et al.* 2000 ; Boy-Marcotte *et al.*, 1999). Mais il a été également montré que la quantité d'ARN messager de *TFS1* augmentait lors d'un choc diauxique (DeRisi *et al.*, 1997) et lorsque la cellule est soumise à un agent mutagène comme le MMS (Jelinsky & Samson, 1999). Enfin, Fauchon *et al.* (2002) ont identifié *TFS1* parmi les gènes surexprimés en présence de 1mM de Cadmium. Ces données du transcriptome sont confirmées par les études du protéome démontrant que la protéine Tfs1p est surproduite lorsque la cellule subit un stress. La réponse cellulaire au choc



oxydatif a été particulièrement étudiée par gels 2D (Godon *et al.*, 1998; Hasan *et al.*, 2002). Tfs1p est surproduite environ 10 fois dans ces conditions.

La surexpression de *TFS1* s'explique par la présence de deux boîtes STRE dans le promoteur du gène en position -79 et -122. Ces séquences STRE sont les cibles des facteurs de transcription Msn2p et Msn4p qui sont responsables de la réponse générale au stress (FIGURE 34).

Le gène *YLR179C*, homologue et adjacent à *TFS1*, est, quant à lui, dépourvu d'élément STRE, ce qui explique que ce gène ne soit pas surexprimé en conditions de stress.

### 3.3.2 Les éléments STRE

La cellule exposée à un stress développe une tolérance contre de fortes doses de ce stress mais aussi contre des stress causés par d'autres agents. Ainsi, il semble exister un mécanisme capable de percevoir et de répondre à différentes formes de stress.

Un élément *cis* responsable de l'activation de la transcription en réponse à de nombreux stress a été à l'origine identifié sur le promoteur des gènes *CTT1* et *DDR2* (Kobayashi & McEntee, 1993; Wieser *et al.*, 1991). Cet élément est appelé STRE, il contient la séquence consensus CCCCT et peut fonctionner dans les deux sens (5'CCCCT 3' et 5'AGGGG3'). La séquence STRE a ensuite été retrouvée en amont de plusieurs gènes induits en réponse à un stress tels que *CTT1*, *DDR2*, *HSP12*, *TPS2*, *GSY2* et *GPH1* (Ruis & Schuller, 1995). L'analyse du génome de la levure prévoit que environ 200 gènes pourraient être régulés via cet élément STRE (Moskvina *et al.*, 1998). Une seule copie de cet élément est suffisante pour activer un gène rapporteur dans différentes conditions de stress (Kobayashi & Mc Entee, 1993). Toutefois, l'existence de deux copies de cet élément a un effet plus grand qu'une seule copie. La voie Ras/AMPC/PKA régule négativement l'induction des gènes possédant des STRE (Marchler *et al.*, 1993) (voir paragraphe 3.3.3.3).

Les facteurs de transcription impliqués dans la reconnaissance des boîtes STRE ont été décrits, il s'agit de Msn2p et Msn4p.

### 3.3.3 Les facteurs de transcription Msn2p et Msn4p

#### 3.3.3.1 Présentation

Les facteurs de transcription Msn2p et Msn4p ont été initialement identifiés comme des supprimeurs multicopie d'un mutant *snf1* thermosensible sur milieu raffinose (la kinase Snf1p permet la dérepression d'un certain nombre de gènes après épuisement du



milieu en glucose) (Estruch & Carlson, 1993). Ils présentent environ 30% d'identité, localisée principalement au niveau des domaines de liaison à l'ADN. Ils appartiennent à la famille des facteurs de transcription à doigt de zinc Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> et ont l'unique particularité d'être activés par une grande variété de stress environnementaux. Les facteurs de transcription Msn2p et Msn4p sont capables de se fixer aux séquences STRE *in vitro* et peuvent activer la transcription d'un gène rapporteur possédant un élément STRE ce qui montre que cette séquence est suffisante pour l'induction de l'expression dépendante de Msn2/4p (Martinez-Pastor *et al.*, 1996).

### 3.3.3.2 Les domaines de Msn2p et son mode d'action dans l'initiation de la transcription

Le domaine de Msn2p se fixant à la séquence STRE est un domaine à doigt de zinc localisé à l'extrémité C-terminale de la protéine. Msn2p possède aussi un domaine activateur de la transcription (TAD) (Estruch & Carlson, 1993). Ce n'est que récemment que Boy-Marcotte *et al.* (2006) ont pu localiser le domaine TAD de Msn2p dans la moitié N-terminale de ce dernier. Lallet *et al.* (2006) ont ensuite apporté des informations sur le mode d'action de Msn2p dans l'initiation de la transcription des gènes dépendants de STRE. Ces auteurs ont montré que le TAD de Msn2p était capable d'interagir avec Gal11p, un composant d'un module du médiateur de l'ARN pol II. Cette interaction avec un composant de la queue du médiateur permet de recruter la machinerie transcriptionnelle et la constitution du complexe d'initiation de la transcription. D'autres travaux ont précédemment montré que Gal11p interagissait directement avec le TAD de différents autres facteurs de transcription (Swi5p, Gal4p, Gcn4p) dans le but d'initier la transcription (Bhoite *et al.*, 2001; Jeong *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2004).

### 3.3.3.3 Les activités de Msn2p et Msn4p sont régulées

L'activité de Msn2p et Msn4p est reliée à leur localisation nucléaire. Ainsi, toute condition pouvant influencer sur leur localisation cellulaire va influencer sur leur activité. La localisation subcellulaire de Msn2p et Msn4p est régulée par un mécanisme sophistiqué. En condition normale de croissance, Msn2p et Msn4p sont localisés dans le cytoplasme ; par contre, en condition de stress, ils migrent vers le noyau (Gorner *et al.*, 1998).





La stabilité des deux protéines et toute condition pouvant influencer sur leur stabilité auront aussi des conséquences sur leur activité. Enfin, la stimulation de la formation d'un complexe Msn2p/ADN est aussi un facteur qui peut moduler l'activité de ces protéines.

#### 3.3.3.1.1 Action sur la localisation cellulaire

Il a d'abord été montré que Msn2p était phosphorylée *in vitro* par la PKA (O'Brien *et al.*, 1995). De plus, une forte activité de la PKA provoque une localisation cytoplasmique de Msn2p alors qu'une faible activité de cette kinase conduit à son accumulation dans le noyau (Garreau *et al.*, 2000; Gorner *et al.*, 1998; Jacquet *et al.*, 2003).

Gorner *et al.* (2002) ont élucidé ce phénomène. Les facteurs de transcription Msn2p et Msn4p possèdent un signal de localisation nucléaire (NLS), qui est contrôlé négativement par la phosphorylation via la PKA. Cette phosphorylation est réversible par l'action d'une phosphatase. Ce NLS est localisé à proximité du doigt de zinc (Gorner *et al.*, 2002; Gorner *et al.*, 1998). Un signal d'exportation nucléaire et/ou des déterminants d'ancrage cytoplasmique, qui n'ont pas été complètement caractérisés, sont localisés dans la région centrale des protéines Msn2p et Msn4p (Gorner *et al.*, 1998). Il a été montré que l'exportation nucléaire nécessiterait la présence de l'exportine Msn5p (Gorner *et al.*, 1999).

Récemment, Boy-Marcotte *et al.* (2006) ont montré que le domaine N-terminal de Msn2p contenait une autre région importante pour la localisation cytoplasmique de Msn2p. Comme l'avait montré Gorner *et al.* (1998) pour la région localisée dans le domaine central de Msn2p, Boy-Marcotte *et al.* (2006) ont montré que le rôle de cette région dépendait de l'exportine Msn5p et de la présence éventuelle de signaux de stress.

Gorner *et al.* (2002) ont montré que la phosphorylation du NLS de Msn2p par la PKA répondait à un signal de carence en glucose mais pas à un signal provenant d'un autre stress. La région impliquée dans l'exportation de Msn2p hors du noyau est elle aussi régulée par la PKA, et sa phosphorylation dépend de signaux de stress. Jacquet *et al.*, 2003 ont montré qu'il existait un phénomène d'oscillation de Msn2p et Msn4p entre le noyau et le cytoplasme qui était déclenché par différents types de stress d'intensité moyenne.

Ces étapes multiples de régulation permettent vraisemblablement d'accroître l'amplitude et la robustesse de la réponse au stress médiée par Msn2/4p.



Ces oscillations de Msn2p sont contrôlées par la voie AMPc/PKA qui affecte ses cinétiques d'importation et d'exportation mais la synthèse protéique n'intervient pas dans ce phénomène. De plus, Msn2p et Msn4p présentent des différences au niveau de la régulation de leurs oscillations et tandis que Msn2p semble être impliqué dans la réponse à des stress faibles, Msn4p est impliquée dans la réponse à des stress plus forts (Jacquet *et al.*, 2003).

De plus, il a été montré qu'une protéine 14-3-3, Bmh2p, pouvait agir comme un partenaire d'ancrage au cytosol de Msn2p, sous le contrôle de la voie TOR (Beck & Hall, 1999). La présence de rapamycine ou la disparition du glucose dans le milieu de culture, deux conditions inhibant TOR, provoquent la dissociation du complexe Bmh2p/Msn2p et Bmh2p/Msn4p et les facteurs de transcription jusque là retenus dans le cytoplasme peuvent alors être transloqués dans le noyau. Cette dissociation n'aurait pas lieu dans les conditions classiques de stress (Beck & Hall, 1999).

En l'absence de Msn5p, Msn2p et Msn4p restent bloquées dans le noyau. Cependant, cela n'affecte pas la régulation des gènes placés sous le contrôle de la réponse générale au stress. Cette découverte indique que la localisation subcellulaire de Msn2/4p n'est pas le seul niveau de contrôle dans la réponse au stress dépendante de Msn2p et Msn4p (Estruch, 2000). De plus, elle montre que la localisation cytoplasmique de Msn2p pendant la croissance normale reflète un équilibre dynamique dans lequel l'exportation nucléaire de Msn2p prédomine sur son importation.

La kinase Snf1p impliquée dans la voie de répression par le glucose ainsi que la phosphatase PP1 agissent aussi sur le NLS de Msn2p après une forte déplétion en glucose (De Wever *et al.*, 2005) et jouent donc un rôle dans la régulation de sa localisation cellulaire.

#### *3.3.3.3.2 Action sur la stabilité de Msn2p*

De façon générale, après initiation de la transcription et formation du complexe d'initiation autour des facteurs de transcription spécifiques, la machinerie de l'ARN pol II doit être remodelée et permettre aux étapes suivantes de la transcription d'avoir lieu. Un mécanisme, appelé « veuve noire », a été proposé pour permettre d'éliminer les composants du complexe d'initiation qui ne sont pas nécessaires à l'étape d'élongation : à savoir les



facteurs d'initiation de transcription spécifiques. Ce mécanisme consiste en la dégradation, par protéolyse, de ces facteurs de transcription.

Un tel mécanisme a été confirmé pour Gal4p (Muratani *et al.*, 2005) et pour Gcn4p (Chi *et al.*, 2001). En ce qui concerne Msn2p, plusieurs données semblent aussi confirmer ce modèle. (Garreau *et al.*, 2000) ont tout d'abord montré que Msn2p était hyperphosphorylée après un stress. Cette hyperphosphorylation a lieu dans le noyau dans une région de 250 acides aminés proche du TAD (Boy-Marcotte *et al.*, 2006) et elle est effectuée par la kinase dépendante des cyclines Srb10p (ou Ssn3p) qui est un composant du médiateur de l'ARN pol II (Lallet *et al.*, 2004). Cette phosphorylation a lieu après que Msn2p ait recruté le médiateur de l'ARN pol II via son interaction avec Gal11p (Lallet *et al.*, 2006). Divers auteurs ont montré que cette hyperphosphorylation serait impliquée dans la dégradation de Msn2p par le protéasome, dans le noyau (Bose *et al.*, 2005; Durchschlag *et al.*, 2004; Lallet *et al.*, 2004). Ainsi, la phosphorylation de Msn2p par Srb10p permettrait de cibler Msn2p pour une dégradation intranucléaire. Ce mécanisme permet vraisemblablement d'éteindre la réponse au stress après le retour à des conditions environnementales normales. Cette hypothèse est à rapprocher du fait que les conditions de stress activent la dégradation de la sous-unité régulatrice de Srb10p (Srb11) et donc inactivent Srb10p et par voie de conséquence la dégradation de Msn2p. Une telle régulation permettrait ainsi d'entretenir la réponse au stress en cas de stress persistant. Cependant, les résultats de Durchschlag *et al.* (2004) indiquent que la dégradation de Msn2p dans le noyau ne jouerait pas un rôle important dans le cas de la réponse à des stress forts et courts mais interviendrait par contre dans le cas de stress moins forts ou plus longs ou de limitations sévères dans la source de carbone après un choc diauxique. Ainsi, les levures auraient plusieurs stratégies, selon le type de stress, pour adapter leur réponse.

#### *3.3.3.3 Action sur l'activation de la transcription et sur la formation d'un complexe Msn2p/ADN*

Les conditions de stress ont aussi une action stimulante sur l'activité activatrice de transcription de Msn2p comme l'ont montré Boy-Marcotte *et al.* (2006) à l'aide de protéines fusion TAD-MSN2- domaine de liaison à l'ADN de LexA et du gène rapporteur *HIS3* sous le contrôle de l'opérateur LexA. D'autre part, Hirata *et al.* (2003) et Gorner *et al.* (1998) ont montré que la kinase Gsk3p et les conditions de stress stimulaient l'interaction de Msn2p avec l'ADN.



### **3.3.4 HSP12, un gène rapporteur**

Le gène *HSP12* code une des deux principales protéines de choc thermique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Hsp12p est massivement accumulée dans les cellules exposées à un choc thermique, osmotique, un stress oxydatif et de fortes concentrations d'alcool. Son promoteur contient 5 boîtes STRE. De plus, Varela *et al.*, 1995 ont montré que l'expression du gène *HSP12* était modulée par la voie HOG (high-osmolarity glycerol) et négativement régulée par la voie AMPc/PKA puisque cette expression est réprimée par une forte activité PKA.

Ce gène constitue donc un bon gène rapporteur de la réponse au stress et il sera utilisé comme tel dans une partie de mon travail de thèse.





### 3.4 *Tfs1p* appartient à la famille des PEBPs

La famille des PEBPs est une famille de protéines très conservée à travers l'évolution. Deux homologues de cette famille ont été décrits chez la levure: les protéines *Tfs1p* et *Ylr179cp*.

#### 3.4.1 Présentation

C'est en 1984 que Bernier et Jollès ont isolés, à partir de cerveau de bœuf, une protéine soluble, basique et de masse moléculaire apparente 23kDa (Bernier & Jolles, 1984). Des expériences d'affinité ont montré que cette protéine avait la capacité d'interagir *in vitro* de manière non covalente avec des anions organiques tels que les ions acétate, phosphate et la phosphatidyléthanolamine, qui lui a donné son nom : PEBP (Phosphatidylethanolamine Binding Protein) (Bernier *et al.*, 1986). Sa séquence ne présentait aucune homologie significative avec celle des autres protéines connues à l'époque (Schoentgen *et al.*, 1987).

La famille des PEBP constitue un groupe très conservé au cours de l'évolution, composée de membres isolés et caractérisées dans un grand nombre d'organismes : les plantes (*Antirrhinum*, (Bradley *et al.*, 1997), *Arabidopsis thaliana* (Ohshima *et al.*, 1997), la tomate (Pnueli *et al.* 1998)), les parasites (*Plasmodium falciparum* (Trottein & Cowman, 1995)), les bactéries (*E. coli* (Serre *et al.* 2001), *Bacillus anthracis* (Uchida *et al.*, 1993), *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998), *Bacillus subtilis* (Kunst *et al.*, 1997)), les nématodes (*Toxocara canis*, (Gems *et al.*, 1995)), les insectes (*Drosophila melanogaster* (Pikielny *et al.*, 1994)) et les mammifères incluant notamment le bœuf, le singe, la souris, l'homme (Tohdoh *et al.*, 1995). En comparant les séquences protéiques et les caractéristiques moléculaires et biochimiques des différents homologues, de nombreux points communs ont été mis en évidence, conférant une signature commune à toutes les PEBPs.

#### 3.4.2 Caractéristiques communes aux PEBPs

En analysant l'alignement des séquences primaires de différents homologues des PEBPs, on s'aperçoit que les protéines de la famille des PEBPs présentent une grande conservation de certains résidus, principalement dans la région centrale de la séquence des protéines. Ainsi, une séquence consensus constituant la signature de la famille des PEBPs a pu être identifiée:

	< αA >	< βA >	< βB >	< βC >	< αB >	<	
Ht		PVDLSKWSGPLSLQEVD	EQPHPLHVTYAGA...	AYDELGKVLTPQV	ENRPT.S		52
Mc		PVDLSKWSGPLSLQEVD	EQPHPLHVTYAGA...	ALDELGKVLTPQV	ENRPT.S		51
Cow		PVDLSKWSGPLSLQEVD	ERPHPLQVKYGA...	EVDLGLKVLTPQV	ENRPT.S		51
Rat		MAADISQWAGPLSLQEVD	EPHPLRVYGGV...	TVDELGKVLTPQV	ENRPT.S		52
Droa	MKLPALHLLFLGYICLARS	QNDENVRRIMK...	EMBVPEIL	DEPPRELLRIKYDNT...	IDIBEGKTYTPT	TELFQP..R	74
OV16	MHCLQVVI	AIYLSFGKISABNANCKKCTPMLVDS	AFKEHGIVPDV	VSTAPT	KLNVSYNN...	LTVNLGNE	LTPQV
Toxc	DEANNCAAS	INLCQNP	TFEPLVRDR	CQKTCGLCAGCGFISSGIVPLV	VTSA	PSRRVSVTFANN...	VQVNCNTLTTAQVANQPT..
CEN		MAAKV	SDPLVIGR	IVGVDFHFTSTVKMS	VIYNSNNSIKHVYN	GHELE	PSAVTSTP..R
Plaaf		MTIPTISEL	KKDRIIPHY	FPNDKIDLN	VDLFI	SPKAGK	EVNHNHGVLDIAGTGSVPRNIKFSSEPPDGYC..
Yeast		MNQADFAQAS	IDSYKKGILE	DVYIHDTS	FQPSGILAVR	YSSAPVAMGNTLPTEKARSKPQFQFTFNKQMQKSVPO	77
	βE>	< βF >	< βG >	< βH >		< βI >	
Human	ISWDGLD	SGKLYTLVLTDPDAPSRKDPKYREWHHFLVVMKGN	DISSGTVLSD.....	YVGS	PPKGTGLHRYVW		122
Monkey	ISWDGLD	SGKLYTLVLTDPDAPSRKDPKYREWHHFLVVMKGN	DISSGTVLSD.....	YVGS	PPKGTGLHRYVW		121
Cow	ITWDGLD	PGKLYTLVLTDPDAPSRKDPKYREWHHFLVVMKGN	DISSGTVLSD.....	YVGS	PPKGTGLHRYVW		121
Rat	ISWDGLD	PGKLYTLVLTDPDAPSRKDPKYREWHHFLVVMKGN	DISSGTVLSE.....	YVGS	PPKGTGLHRYVW		122
Droa	LDWNA	DPESFYTVLNICPDAPNREPMYRSRLHMLVVMV	PGLDIMKQ	QPISE.....	YFGL	PPIDSGIQRYLI	143
OV16	VSWDA	EPGALYTLVLTDPDAPSRKDPVFRWHHFLVVMKGN	DISSGTVLSD.....	YVGS	PPKGTGLHRYVW		149
Toxc	VTWEA	QPNDRYTLINVD	DPDPSAANGQQGRLHWVWINIPGN	NIAGTTLAA.....	FQPS	TAAANTGVHRYVW	211
CEN	VEVHGGDMRSF	TLINVD	DPDVPGPSDPYLRHLHWVTDIPG	TDS	SGFK.EV.....	VSYEMPRNIGIHRVW	126
Plaaf		FVLFV	DDPYRRLR	PDGKYYHWV	SGIKTKELIKGTQKNCV	TILP.....	YVGS
Yeast	ANAYVPQDDDL	FLVMTDPDAPSKTHKWS	PHLVECLKLL	LNETHETSGATE	FFASEFNTKGSNTLIE	YMG	PAPPKGSGPHRYVW
	βI >	< αC >	< βJ >	< αD >			
Human	LVYEQDRPL	.KCDEPILSNRSGDHRGKFKVASFRKKYELR	PVACTCYQAEWDDYVPKLYEQLSGK				187
Monkey	LVYEQARPL	.KCDEPILSNRSGDHRGKFKVASFRKKYELG	PVAGACYQAEWDDYVPKLYEQLSGK				186
Cow	LVYEQEGPL	.KCDEPILSNRSGDHRGKFKVASFRKKYELG	PVACTCYQAEWDDYVPKLYEQLSGK				186
Rat	LVYEQEQPL	.NCDEPILSNKSGDNRGKFKVESFRKKYHLG	PVACTCFQAEWDDSVPKLHDQLAGK				187
Droa	LVYQGS	DKL.DFDEKKMELSNADGHSNFDVMKFTQ	KYEMGSPVACNIFQSRWDEYVPELMKTLGVSE				210
OV16	LVYKQ	PGSITDTQH.....GGNR	RNPKVMDPANKHHLGNPVACNFFQAKHED				199
Toxc	LVYRQ	PAAINSPLLNLLVQ.DSER	PGFGTTAFATQFNLGSPYACNPFYRSQA				264
CEN	LLFKQ	KKRQAMLSPP.....VVCR	DGFNTRKFTQENELGLPVAAVFFNCQRETAARRR				182
Plaaf	IISL	IKKEEDKNITGLPHYKGEKYYITRVKFN	NYESVHNIAQINNMKI	IVGYNWCQIEG			190
Yeast	LLY	....KQPKGVDSSKFSKIKDRPNWGYGTP	ATGVGKWKAKENNLQLVASNFFYAETK				221

Structure

**FIGURE 35 : Alignement des séquences d'une sélection de membres de la famille des PEBP (Banfield *et al.*, 1998)**

Un code couleur a été utilisé pour les résidus : les résidus rouges correspondent aux résidus identiques à plus de 90% dans la famille, les résidus bleus comme Phe/Tyr, Leu/Met, Ile/Val, Asn/Asp/Gln, Glu sont conservés à 90% dans toute la famille et les résidus roses sont identiques à plus de 50%.

## DPD-x-P-x(11)-H-x(28-30)-G-x-HR

Les extrémités N et C-terminales des protéines de la famille sont quant à elles plus variables d'une protéine à l'autre, et selon les espèces (FIGURE 35).

### 3.4.1.1 Caractéristiques moléculaires

#### 3.4.1.1.1 La taille

Les PEBPs sont toutes des protéines solubles d'environ 20 à 25kDa avec des disparités au niveau de la taille des protéines. Parmi les protéines les plus petites, on trouve la protéine Ybhb d'*Escherichia coli* qui ne comporte que 158 résidus pour une masse de 17kDa. Par ailleurs, la PEBP humaine 1 (h-PEBP1) et la PEBP bovine 1 (b-PEBP1) sont très proches avec une masse d'environ 21kDa, elles ne diffèrent que de quelques résidus (11). La protéine Tfs1p de levure a une taille de 24kDa.

Le point iso-électrique des PEBP n'est pas conservé et varie entre 5 et 9.

#### 3.4.2.1.2 Localisation

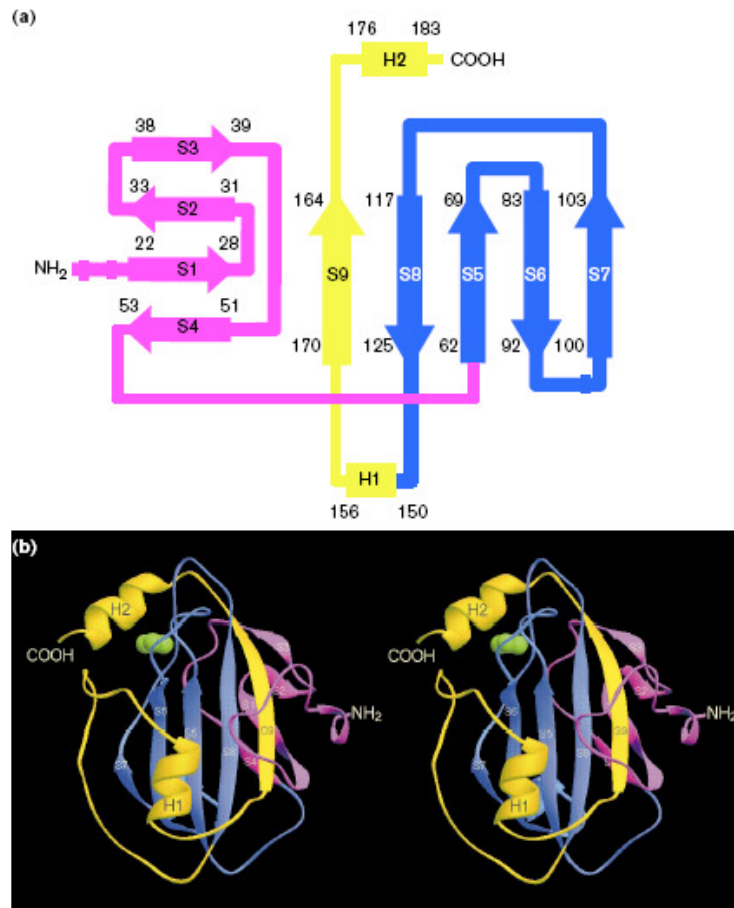
Les PEBPs sont majoritairement localisés dans le cytoplasme des cellules mais on peut aussi les retrouver sécrétées dans le milieu extracellulaire. Cependant, les PEBP ne comportent généralement pas de séquence signal de sécrétion caractéristique sauf quelques protéines comme OBP5 et CG17919 de la drosophile.

Ainsi, la PEBP-1 de rat a été retrouvée à la surface de fibroblastes de rat non perméabilisés (Hengst *et al.*, 2001), et la PEBP-1 humaine dans le liquide céphalorachidien et dans le sérum (Goumon *et al.*, 2004).

De manière générale, l'expression des PEBP est ubiquitaire car on les retrouve dans la majorité des tissus.

#### 3.4.2.1.3 Fixation de ligands

Les PEBPs sont caractérisées par leur capacité à fixer des ligands anioniques comme cela a été démontré en 1986 pour la PEBP-1 de bœuf avec la phosphatidyléthanolamine. Cependant, Bucquoy et ses collaborateurs (1994) ont identifié d'autres ligands pour cette protéine tels que la bromosulfophtaléine, l'estradiol mais également des nucléotides comprenant le GTP, le GDP, l'ATP, le FAD, le NADP mais pas l'AMPc, l'AMP, le GMPc ni le NAD (Bucquoy *et al.*, 1994).



**FIGURE 36: Architecture générale de la PEBP bovine**  
(Serre *et al.*, 1998)

(a) Diagramme topologique de la PEBP

Les brins β sont symbolisés par des flèches et les hélices α par des rectangles. Le feuillet β1 (en magenta) est formé de 4 brins anti-parallèles (S1-S4), le feuillet β2 est également composé de 4 brins anti-parallèles (S5-S8) et est terminé par une extension (en jaune) hélice α- feuillet β- hélice α.

(b) Modèle en ruban de la PEBP. La molécule d'acétate liée est représentée par des sphères vertes.

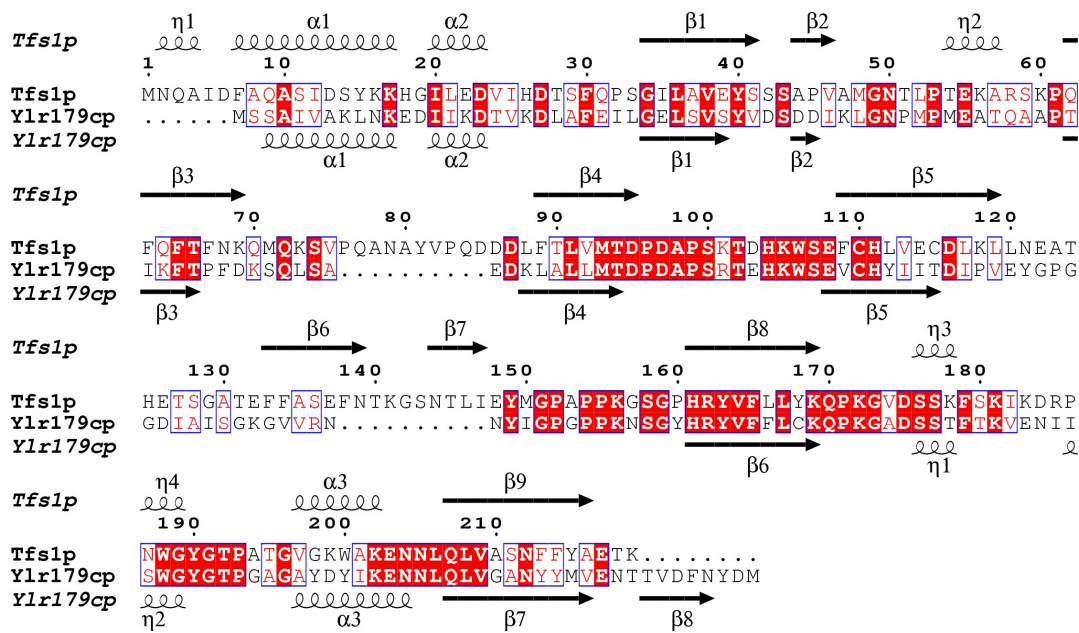
Enfin, il a récemment été montré que la PEBP-1 humaine était capable de fixer des dérivés de la morphine (Goumon *et al.*, 2006).

#### 3.4.1.2 Données structurales

Plusieurs structures cristallographiques de différents homologues de la famille des PEBP ont été résolues : les PEBP-1 bovine (Serre *et al.*, 1998) et humaine (Banfield *et al.*, 1998), la protéine CEN d'*Antirrhinum centroradialis* (Banfield & Brady, 2000), les protéines d'*Escherichia coli* Ybhb et Ybcl (Serre *et al.*, 2001), la PEBP-2 de souris (Simister *et al.*, 2002), la protéine Tfs1p de levure en complexe avec un de ses partenaires (Mima *et al.*, 2005), les protéines Tfl1 et FT d'*Arabidopsis thaliana* (Ahn *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces données permet d'affirmer que les PEBP appartiennent à une même famille structurale. En effet, le repliement général des protéines de la famille est particulièrement conservé. La structure est principalement composée de brins  $\beta$  organisés en feuillets  $\beta$  anti-parallèles formant deux clés grecques interagissant entre elles par une interface hydrophobe (FIGURE 36). La structure générale est très compacte et présente une cavité unique à la surface des protéines. La PEBP-1 bovine a été co-cristallisée avec trois petits ligands anioniques : un ion acétate, un ion phosphate et un groupement phosphoryléthanolamine (tête polaire de la phosphatidyléthanolamine). Ces molécules se logent exactement dans la cavité (Serre *et al.*, 1998) en établissant des liaisons hydrogènes avec l'aspartate 69, l'histidine 85, la glycine 109 et la tyrosine 119. Le site de fixation des ligands anioniques est délimité par deux boucles qui relient des brins  $\beta$ , appelées CR1 et CR2 (Connecting Region), et ce site de fixation est recouvert par l'hélice C-terminale chez les protéines de mammifères (Serre *et al.*, 1998 ; Banfield *et al.*, 1998). Les résidus délimitant la cavité intègrent les résidus constituant la signature des PEBP.

Une caractéristique remarquable de la structure des PEBP (de plantes et de mammifères) est la présence de deux liaisons peptidiques *cis* dans la boucle CR1, impliquant l'alanine 72 et la proline 73 pour l'une et l'arginine 81 et le glutamate 82 pour l'autre (numérotation de la séquence de la PEBP bovine). Ces deux liaisons peptidiques *cis* jouent un rôle dans la structure de la cavité de surface. Or, les liaisons peptidiques *cis* ne faisant pas intervenir une proline sont très rares dans les structures protéiques. Cela indique que la cavité de surface pourrait jouer un rôle très important dans la fonction de ces protéines.



**FIGURE 37: Alignement des séquences des protéines Tfs1p et Ylr179cp et prédictions des structures secondaires de Ylr179cp**  
(Gombault *et al.*, 2007)

L'alignement est réalisé par CLUSTAL W et est représenté en utilisant ESPript. Les résidus identiques sont écrits en blanc sur fond rouge et les résidus similaires sont en rouges. Les hélices  $\alpha$ , les brins  $\beta$ , les coudes  $\beta$  de Tfs1p et ceux prédits pour Ylr179cp par PSIREP sont représentés respectivement par des lignes ondulées, des flèches et des TT. Les numéros indiquent le nombre de résidus.

Cependant, les protéines de la famille des PEBP présentent des différences structurales significatives surtout au niveau des extrémités N et C-Terminales. Cela pourraient être un point clé pour leur fonction biologique spécifique.

### 3.4.3 Les PEBP, une famille très conservée à travers les espèces

#### 3.4.3.1 Tfs1p et son homologue Ylr179cp

Les deux gènes codant ces protéines sont adjacents sur le chromosome XII, ils sont transcrits dans le même sens et les protéines correspondantes présentent 40% d'identité (FIGURE 37). Les mutants nuls pour *tfs1*, *ylr179c* et le double mutant  $\Delta tfs1\Delta ylr179c$  sont viables.

Ylr179cp est une protéine de fonction inconnue à ce jour, très peu de données sont disponibles à son sujet dans la littérature. *YLR179C* fait partie des gènes régulés par le système PDR (Pleitropic Drug Resistance). Ce système, constitué de plusieurs facteurs de transcription est induit lorsque la levure croît en présence de drogues (Cui *et al.*, 1998) et il lui permet de résister à l'action de ces drogues. Cependant, le rôle joué par Ylr179cp dans ce système est inconnu à ce jour.

Récemment, une analyse biochimique de Ylr179cp ainsi qu'une étude comparative vis à vis de Tfs1p a été réalisée (Fukada *et al.*, 2007). L'étude de la structure secondaire de Ylr179cp a été analysée par dichroïsme circulaire. Elle montre que Ylr179cp a une structure prédominante de type  $\beta$  puisqu'il apparaît 47.8% de feuillet  $\beta$ , ce qui est caractéristique des protéines de la famille des PEBP. De plus, elle ne possède pas de pont disulfure ; ces deux caractéristiques sont similaires à la protéine Tfs1p.

Puisque Tfs1p inhibe CPY et est acétylée pour que l'inhibition soit efficace, cette activité a été testée pour Ylr179cp. Il apparaît par spectrométrie de masse que la méthionine 1 en N-terminal est clivée et une acétylation a lieu sur la sérine 2. De plus, Ylr179cp n'inhibe pas CPY et n'interagit pas avec elle contrairement à Tfs1p. Comme l'acétylation de Tfs1p est cruciale pour son inhibition de CPY, il est possible que la modification post-traductionnelle de Ylr179cp joue également un rôle prépondérant pour la fonction de cette protéine.

Enfin, l'analyse des transcrits par Northern blot et l'étude de la localisation cellulaire des deux protéines montrent une différence entre les deux protéines. Ylr179cp est localisée dans le cytoplasme des cellules en phase de croissance alors qu'elle disparaît en phase stationnaire.





Par contre, Tfs1p est exclusivement localisée dans le cytoplasme, mais pourrait cependant transloquer sélectivement dans la membrane et la lumière des vacuoles pendant la phase stationnaire (Mima *et al.*, 2006).

D'autre part, Ylr179cp n'est pas surproduite en condition de stress car son gène est dépourvu de séquence STRE. Enfin, Chautard *et al.* (2004) n'ont pas trouvé Ylr179cp comme interagissant avec Ira2p ni supprimant la mutation *cdc25-1*.

Même si Tfs1p et Ylr179cp appartiennent à une même famille de protéines, leurs propriétés biochimiques et physiologiques sont différentes.

#### 3.4.3.2 Les PEBPs d'autres espèces

- Les PEBPs de bactérie, Ybhb et Ybcl

Deux protéines homologues de la PEBP chez la bactérie *E. coli* ont été décrites, produites puis purifiées. L'alignement des séquences indique une identité de 56% entre les deux séquences des protéines, alors qu'elles ne possèdent que 25% (pour Ybhb) et 28% (pour Ybcl) d'identité avec la PEBP bovine. Les deux protéines ont une localisation différente : Ybhb est cytoplasmique et Ybcl est périplasmique.

Les fonctions de ces deux protéines n'ont pas été identifiées. Cependant, leur structure a été résolue (Serre *et al.*, 2001). Elles apparaissent très proches et présentent les caractéristiques générales communes aux protéines de la famille des PEBP. Les protéines Ybhb et Ybcl sont capables de former des homodimères en solution, ce qui conduit à la formation d'une nouvelle configuration de la zone de fixation des ligands anioniques, à l'interface entre les deux monomères.

- Les PEBPs de plante

Les PEBPs de plantes font partie des PEBPs les plus étudiées avec celles des mammifères. Elles semblent jouer un rôle essentiel dans l'architecture des plantes. En effet, les phénotypes des plantes sauvages et mutées pour la PEBP sont très différents au niveau de l'inflorescence.

L'homologue des PEBP chez *Antirrhinum falciparum* est la protéine Cen (centroradialis). Le mutant *cen* est radicalement différent par rapport au type sauvage (Bradley *et al.*, 1996). Chez ce mutant, le méristème apical inflorescent est converti en fleur : l'inflorescence indéterminée est convertie en inflorescence déterminée ce qui se traduit par un phénotype modifié. En effet, la plante mutante pour le gène *CEN* est plus petite et plus touffue



car sa croissance s'arrête prématurément. Ceci tend à montrer que le gène *CEN* joue probablement un rôle dans la programmation du méristème apical.

L'alignement de la séquence de la protéine Cen avec celle de la PEBP-1 bovine indique 20% d'identité et 23% avec hPEBP-1. La structure de la protéine Cen a été déterminée par remplacement moléculaire à partir de celle de hPEBP-1. Bien que sa séquence soit plus éloignée, la protéine Cen présente un cœur  $\beta$  conservé. Les différences majeures proviennent d'une délétion correspondant aux résidus 111 et 112 de b-PEBP1 localisés dans une boucle à proximité du site de fixation des ligands.

Les homologues de Cen chez *Arabidopsis thaliana* sont Tfl1 (Terminal flower 1) et FT (Flower locus T). Ces deux protéines agissent au niveau de promoteurs intervenant dans la formation des fleurs grâce à leur interaction avec un facteur de transcription, FD. Cependant, FT induit la floraison alors que Tfl1 la réprime (Bradley *et al.*, 1996). Les structures cristallographiques ont été résolues (Banfield & Brady, 2000) et indiquent que la différence d'activité serait due à un résidu qui bloque partiellement l'accès au site de fixation des ligands chez FT mais pas chez Tfl1 (Tyr85 pour FT/ His88 pour Tfl1) (Ahn *et al.*, 2006).

Contrairement à *Antirrhinum* et *Arabidopsis* qui sont des plantes monopodiales (développement selon une phase végétative puis reproductive), la tomate est une plante sympodiale c'est à dire que les deux phases végétative et reproductive alternent tout au long de la croissance. Cette alternance est régulée par le gène *SP* (*Self-Pruning*), homologue de *CEN* et *TFL1* (Ahn *et al.*, 2006). Un mutant ponctuel correspondant à la substitution de la proline 76 par une leucine, qui est un résidu particulièrement conservé au sein de la famille des PEBP, ne présente pas réellement une structure altérée mais présente une rupture de la régularité des cycles d'alternance phase végétative / phase reproductive (Pnueli *et al.*, 1998). Ceci entraîne une croissance qui avorte prématurément. Des partenaires de SP ont été identifiés par double hybride : il s'agit d'homologues des protéines 14-3-3 de mammifères et d'une sérine/thréonine kinase (Pnueli *et al.*, 1998). Cela suggère que SP joue un rôle dans la signalisation cellulaire. Le site d'interaction avec ses cibles protéiques semblent être différent de la cavité conservée des PEBPs car la mutation P76L n'empêche pas l'interaction (Pnueli *et al.*, 2001).



- Les PEBPs de drosophile

L'analyse informatique du génome de *Drosophila melanogaster* conduit à la mise en évidence de 7 gènes putatifs codant pour les PEBP dont 6 possèdent la signature caractéristique de la famille des PEBPs. Seule la protéine OBP5 (Odorant Binding Protein 5) possède une signature légèrement altérée, mais sa séquence, la conservation des résidus et la longueur de la protéine amènent à classer OBP5 dans la famille des PEBPs.

Les protéines Cg18594 et Cg17919 ont été identifiées dans une étude protéomique systématique visant à répertorier les protéines dont la production est induite dans l'hémolymph de drosophile après une infection microbienne ou par du lipopolysaccharide (Levy *et al.*, 2004; Vierstraete *et al.*, 2004). Des études récentes ont permis l'expression, la production et la caractérisation de la protéine Cg18594 à des fins d'analyses biophysiques (Rautureau *et al.*, 2006).

Cependant, le rôle des PEBP de drosophile n'est pas clairement identifié alors que la drosophile est un organisme de choix pour des études génétiques.

#### 3.4.3.3 Les PEBP de Mammifères

Un début de classification a été réalisé pour les PEBP de mammifères. A partir d'un alignement de séquence, Simister et ses collaborateurs ont distingués, en 2002, 4 sous-familles de PEBP de mammifères : PEBP1, 2, 3 et 4 (Banfield *et al.*, 1998; Simister *et al.*, 2002). Cette classification, réalisée à partir de 13 protéines de mammifères ne permet pas de classer correctement toutes les PEBP.

Chez l'homme, les deux PEBP caractérisées ont été nommées hPEBP-1 (ou RKIP) et hPEBP-4. La protéine de souris mPEBP-2 présente 84% d'identité avec hPEBP-1. Les PEBP-2 de rat et de souris présentent 91% d'identité entre elles. La protéine mPEBP-3 de souris est légèrement plus éloignée car elle possède 79% d'identité avec hPEBP-1. Ceci suggère que les PEBP sont très apparentées entre elles. Cependant, la mPEBP-4 ne présente que 27% d'identité avec hPEBP-1. En effet, la sous-famille PEBP-4 est caractérisée par deux insertions (au niveau des résidus 55 et 102 de hPEBP-1) et une délétion (131 à 134 de hPEBP-1).

##### 3.4.3.3.1 Chez le bœuf

La PEBP bovine, mise en évidence en 1984 à partir de cerveau de bœuf par Bernier et Jolles, a été décrite et caractérisée au niveau biochimique. Sa structure a été résolue en 1998 (Serre *et al.*, 1998). Bernier *et al.* (1986) ont identifié l'interaction entre la PEBP



bovine et la phosphatidyléthanolamine, puis sa séquence fut déterminée en 1997 par Schoentgen *et al.* (1997).

L'interaction de la PEBP avec des membranes modèles montre que la PEBP ne pénètre pas dans les membranes et qu'elle interagit faiblement au niveau des têtes polaires de phospholipides négativement chargés (Vallee *et al.*, 2001).

Plus récemment, la PEBP bovine a été trouvée dans les cellules chromaffines, les plaquettes et le sérum (Goumon *et al.*, 2004). Elle est localisée au niveau des membranes et dans le cytoplasme des cellules mais on la retrouve également dans la matrice et la membrane des granules de sécrétion des cellules chromaffines. La PEBP peut être sécrétée bien qu'elle ne possède pas de séquence signal.

#### *3.4.3.3.2 Chez la souris*

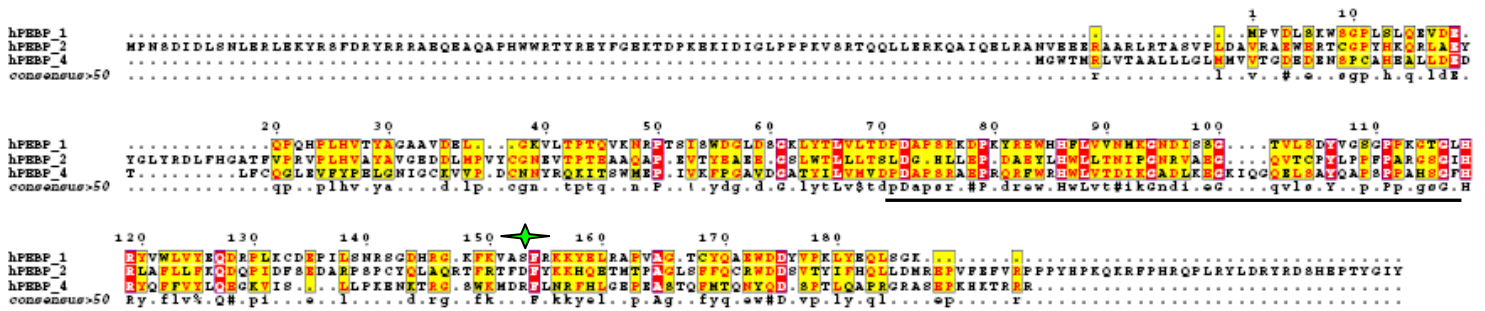
La PEBP-1 de souris a été particulièrement étudiée au niveau des testicules et de l'épididyme, où elle est très abondante mais elle est quasiment ubiquitaire (Vierula *et al.*, 1992). mPEBP-1 est un facteur de décapacitation des spermatozoïdes : la protéine disparaît de la membrane au moment où le spermatozoïde acquiert sa fertilité (Gibbons *et al.*, 2005).

Un deuxième membre de la famille des PEBPs a été identifié dans cet organisme. C'est une protéine de 21kDa qui est spécifique des testicules, appelée mPEBP-2. Cette protéine est localisée dans les cellules germinales haploïdes à des étapes précoces et spécifiques de la spermatogénèse. Ceci suggère une spécificité fonctionnelle de ces protéines soit dans la spermatogénèse ou dans la maturation de la membrane des spermatozoïdes (Hickox *et al.*, 2002).

#### *3.4.3.3.3 Chez le rat*

La rPEBP-1 a été isolée dans l'épididyme de rat par Jones *et al.* (1980). Brooks, en 1985, a démontré que la PEBP était présente sous deux formes : l'une liée à la membrane plasmique des spermatozoïdes, l'autre soluble dans les fluides sécrétés par les testicules et l'épididyme (Brooks, 1985). La caractérisation et la localisation de rPEBP-1 et mPEBP-1 montrent que les PEBPs sont principalement exprimées dans l'étape finale du processus d'élongation des spermatozoïdes (Seddiqi *et al.*, 1996). Les auteurs suggèrent donc que cette protéine serait impliquée dans la morphogénèse cellulaire et plus particulièrement dans l'élongation des cellules.





**FIGURE 38: Alignement des séquences des PEBPs humaines (Clustal W, figure réalisée avec le logiciel Esript)**

Les cadres rouges indiquent les résidus identiques ; les résidus non conservés mais similaires sont indiqués en jaune. Le motif DPD-x-P-x(11)-H-x(28-30)-G-x-HR est souligné en noir ; l'étoile verte indique la sérine 153.

#### 3.4.3.3.4 Chez l'homme

Dans les bases de données, 3 gènes codant pour des PEBPs humaines sont identifiés : hPEBP-1, hPEBP-2 et hPEBP-4 ainsi qu'un pseudo-gène.

- **hPEBP-2**

La PEBP-2 n'a pas été étudiée à ce jour, elle a simplement été décrite dans les bases de données comme une protéine ribosomale de mitochondrie MRPL38. Elle ne possède que 27% d'identité par rapport à hPEBP-1 et elle ne possède que partiellement la signature conservée des PEBP : il manque le motif DPD-x-P de la séquence consensus DPD-x-P-x(11)-H-x(28-30)-G-x-HR (FIGURE 38). Enfin, elle possède une grosse insertion par rapport à hPEBP-1 puisqu'elle est composée de 346 résidus contre 187 pour hPEBP-1.

- **hPEBP-4**

Wang *et al.* (2004c) ont récemment mis en évidence un nouveau membre de la famille des PEBP à partir d'une banque d'ADNc de cellules de moelle osseuse humaine : hPEBP-4. L'alignement de sa séquence avec les autres PEBP (bœuf, souris, rat, singe, humaine) révèle une similarité proche, de 30 à 60% d'identité de séquence et montre qu'elle possède le motif conservé caractéristique des PEBPs. Elle possède 34% d'identité de séquence avec hPEBP-1 et elle ne possède pas la sérine 153 qui peut être phosphorylée par la PKC (Corbit *et al.*, 2003).

L'étude de son expression par RT-PCR et Northern blot montre que hPEBP-4 s'exprime fortement dans de nombreux des tissus (testicules, cœur, muscle squelettique et thyroïde) et avec un signal plus faible dans le cerveau, le foie, les poumons, la moelle osseuse, la corde spinale et la glande adrénargique (Wang *et al.*, 2004c). Comme la majorité des PEBPs, hPEBP-4 a une expression ubiquitaire dans les tissus sains mais on la retrouve également fortement exprimée dans des cellules cancéreuses (carcinomes ovarien, de la prostate, du sein). Ces auteurs ont de plus montré que son expression dans les cellules tumorales est nettement augmentée après traitement au TNF $\alpha$ . Alors que hPEBP-4 est normalement colocalisée avec les lysosomes, la stimulation des cellules (HEK293T) par le TNF $\alpha$  provoque son transfert à la membrane plasmique. Des expériences de co-précipitation et des tests de liaison *in vitro* suggèrent de plus que hPEBP-4 est capable d'interagir avec Raf-1 et MEK1 (Wang *et al.*, 2004c). Au niveau fonctionnel, hPEBP-4 apparaît promouvoir la résistance cellulaire à l'apoptose induite par le TNF $\alpha$  en inhibant l'activation de la voie Raf-1/MEK/ERK et, comme le suggèrent Wang *et al.* (2004c), en inhibant l'externalisation de la phosphatidyléthanolamine. La phosphatidyléthanolamine est localisée dans le feuillet



lipidique interne de la membrane plasmique dans des cellules normales mais est externalisée au niveau du feuillet lipidique externe de cette membrane dans des cellules apoptotiques. La localisation de hPEBP-4 au niveau de la membrane plasmique après stimulation des cellules au TNF $\alpha$  suggère une interaction avec la phosphatidyléthanolamine au niveau du feuillet cytoplasmique de la membrane qui empêcherait l'externalisation de la phosphatidyléthanolamine et le maintien de l'asymétrie du feuillet phospholipidique, inhibant ainsi l'apoptose.

- **hPEBP-1**

La plus connue et la plus étudiée des PEBPs humaine est la PEBP-1, plus connue sous le nom de RKIP (Raf Kinase Inhibitor Protein). Elle est très abondante dans le cerveau en particulier dans le cytoplasme des oligodendrocytes et des cellules de Schwann, deux types cellulaires formant la gaine de myéline des axones respectivement dans le système nerveux central et périphérique. Les alignements de séquence entre les PEBP-1 humaine et de bœuf présentent plus de 94% d'identité puisqu'elles ne diffèrent qu'au niveau de 11 résidus. Au niveau fonctionnel, RKIP doit avoir une grande importance compte tenu de son implication dans un nombre conséquent de rôles physiologiques.

### **3.4.4 La plurifonctionnalité des PEBPs CHEZ LES MAMMIFERES**

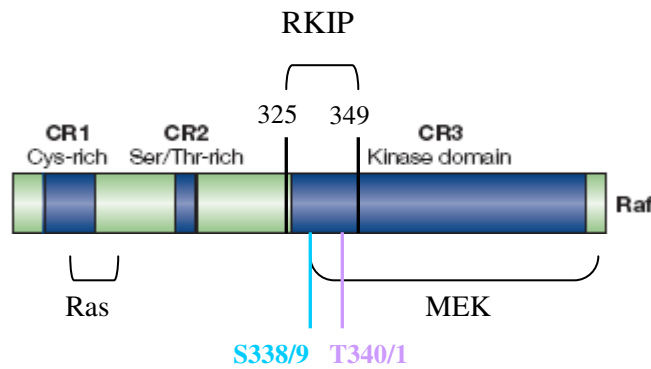
Les PEBP constituent une famille de protéines très conservée au cours de l'évolution, suggérant un rôle prépondérant dans les différentes espèces. Chez l'homme, la PEBP-1 ou RKIP est une protéine multifonctionnelle caractéristique de cette famille et est impliquée dans des fonctions biologiques diverses et variées.

hPEBP-4 a été beaucoup moins étudiée mais les données actuelles indiquent un rôle cellulaire qui pourrait être opposé à celui de RKIP.

#### 3.4.4.1 Les fonctions moléculaires des PEBP

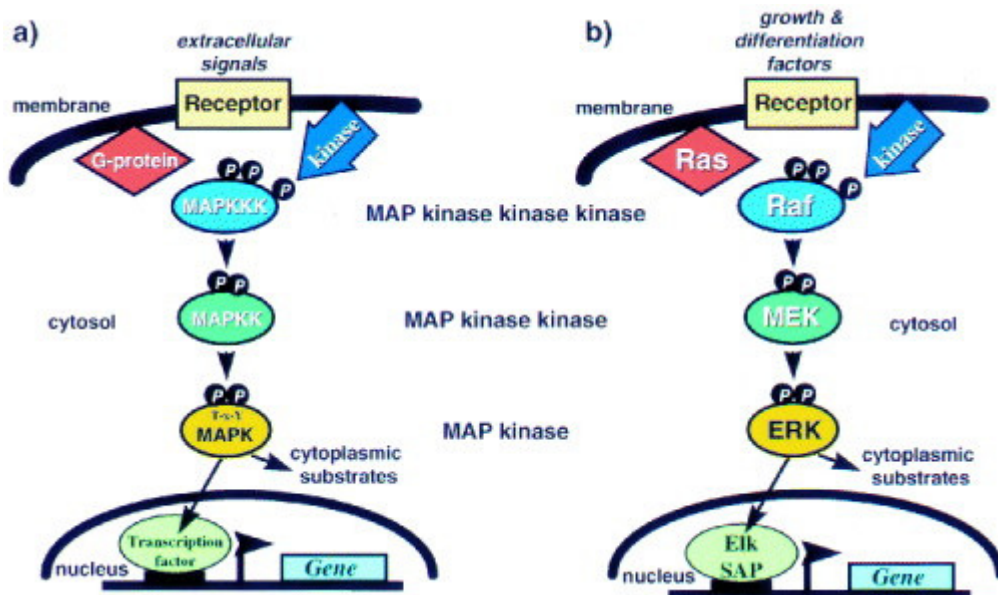
##### *3.4.4.1.1 RKIP est un inhibiteur de kinases*

RKIP est capable d'inhiber plusieurs kinases. La première kinase pour laquelle il a été montré que RKIP avait une activité inhibitrice est Raf-1 comme son nom l'indique : Raf Kinase Inhibitor Protein.



**FIGURE 39: Représentation de la structure de la protéine Raf-1**

La protéine Raf-1 possède trois régions conservées (CR) : CR1, un domaine riche en cystéine qui constitue une partie du domaine de fixation de Ras et qui interagit aussi avec les lipides membranaires ; CR2, une région riche en sérine/thréonine, sites potentiels pour la régulation de la phosphorylation; et CR3, le domaine kinase, qui peut lier MEK. Le domaine de liaison à RKIP est indiqué ainsi que les sérines 338/339 et les tyrosines 340/341.



**FIGURE 40: Représentation de la voie des MAP Kinases (Kolch, 2000)**

- a. Voie générale des MAP Kinases
- b. Voie Raf/MEK/ERK

- **Présentation de la voie MAP Kinase Raf-1/MEK/ERK**

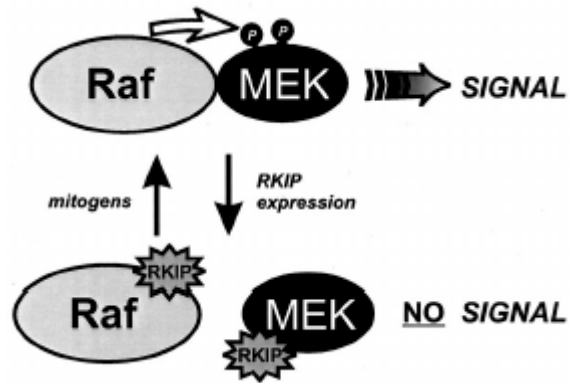
La voie MAP Kinase Raf-1/MEK/ERK est une voie de signalisation cellulaire très conservée qui est impliquée dans le contrôle de nombreux processus cellulaires fondamentaux incluant la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, la motilité, la survie et le métabolisme (Kolch, 2005). Des molécules extracellulaires telles que les facteurs de croissance ou les hormones peuvent générer des signaux qui seront transmis de la membrane plasmique jusqu'au noyau (Elion, 1998). Cette voie est constituée d'une cascade de kinases qui sont organisées en complexe autour de la protéine Ras (Moodie *et al.*, 1993). La petite protéine G Ras est activée par de nombreux récepteurs de facteurs de croissance via le facteur d'échange SOS. Sous forme Ras-GTP, Ras est alors active et va se lier avec une forte affinité à Raf et la recruter au niveau de la membrane où elle va être activée par phosphorylation.

Il existe trois isoformes des protéines Raf chez les mammifères : A-Raf, B-Raf et Raf-1 (ou C-Raf). Les protéines A et B-Raf montrent un profil d'expression spécifique de tissu alors que Raf-1 est plus largement exprimée. Les processus d'activation des protéines Raf sont très compliqués faisant intervenir de nombreuses phosphorylations et déphosphorylations qui conduiront à des changements conformationnels. Toutes les isoformes des protéines Raf sont composés de deux domaines, un domaine N-terminal régulateur et un domaine carboxy-terminal à activité kinase (Cutler & Morrison, 1997) (FIGURE 39).

C'est par son domaine N-terminal régulateur que Raf-1 interagit avec Ras à la membrane. Des changements de conformations ont lieu permettant d'exposer le domaine kinase à des phosphorylations (FIGURE 40). Raf-1, considérée comme une MAPKKK (MAP Kinase Kinase Kinase), est phosphorylée sur la sérine 338 et la tyrosine 341 (Kolch, 2000), respectivement par PAK-3 (King *et al.*, 1998) et Src (Mason *et al.*, 1999). Une fois activée, cette MAPKKK va phosphoryler et activer une MAP Kinase Kinase (MAPKK) : MEK 1 (MAP Extracellular signal-regulated Kinase 1). Enfin, MEK1 activée va à son tour phosphoryler une MAP Kinase appelée ERK1 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1), qui une fois activée va induire des réponses cellulaires adaptées en activant notamment la transcription de différents gènes.

- **RKIP inhibe Raf-1 et la voie MAP Kinase Raf-1/MEK/ERK**

Dans le but d'identifier des protéines capables de réguler Raf-1, Yeung *et al.* (1999) ont isolé, en réalisant un crible double hybride à partir d'une banque d'ADNc



**FIGURE 41 : Modèle de la fonction de RKIP**

L'activation de MEK par Raf-1 nécessite l'interaction physique entre Raf-1 et MEK. La liaison de RKIP avec Raf-1 ou MEK entraînent la dissociation des complexes Raf-MEK ce qui provoque une inactivation de MEK et de la voie.

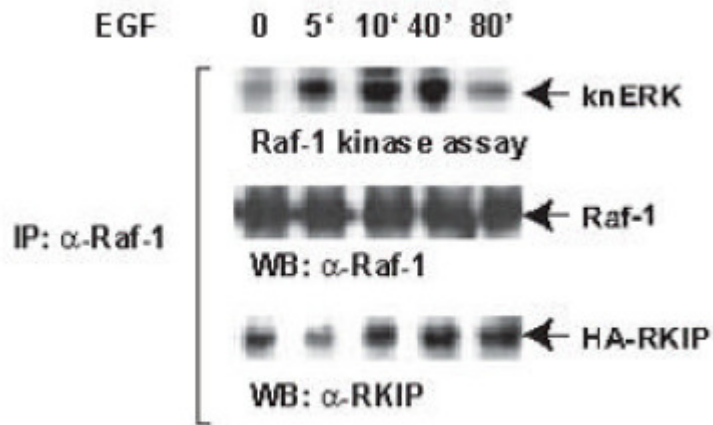
humaine, une protéine interagissant avec Raf-1. Cette protéine inhibe la phosphorylation et l'activation de MEK1 par Raf-1 et a été appelée RKIP (Raf Kinase Inhibitor Protein) (FIGURE 41). Grâce à des tests d'interaction *in vitro*, les auteurs ont mis en évidence que RKIP était capable de se lier à Raf-1 et MEK1, mais pas à Ras. Ceci a été confirmé *in vivo* à partir de lysat cellulaire puisque RKIP co-immunoprécipite avec Raf-1 et MEK1 et des observations en microscopie confocale montrent qu'elle est colocalisée avec Raf-1 dans des cellules quiescentes ou transformées par v-Ras, une forme oncogénique de Ras (Yeung *et al.*, 1999).

Dans le but de rechercher la pertinence de l'interaction entre RKIP et des kinases du module Raf/MEK/ERK, l'expression endogène de RKIP a été inhibée en injectant des anticorps spécifiques ou en exprimant un ARN antisens. Ceci a eu pour résultat de provoquer l'activation de la transcription des gènes dépendants de la voie Raf/MEK/ERK. Au contraire, la surproduction de RKIP a eu pour résultat d'empêcher l'activation de ces gènes et d'interférer avec la prolifération et la différenciation cellulaire induite par Raf-1 (Yeung *et al.*, 1999).

Les mécanismes moléculaires de la fonction inhibitrice de RKIP ont été étudiés plus précisément par l'équipe de Yeung *et al.* (2000). RKIP forme un complexe ternaire avec Raf-1, MEK et ERK. Cependant, alors que MEK et ERK peuvent s'associer simultanément à RKIP, les liaisons de Raf-1 à RKIP ou de Raf-1 à MEK sont mutuellement exclusives. RKIP est capable de dissocier le complexe Raf-1/MEK et agit comme un inhibiteur compétitif pour la phosphorylation de MEK. La localisation des domaines de liaison montre que MEK et Raf-1 se fixent à des domaines chevauchants de RKIP alors que MEK et RKIP s'associent à des sites différents de Raf-1. Les deux sites de liaison à Raf-1 et à MEK doivent être détruits pour empêcher l'inhibition de la voie MAPK par RKIP ; ce résultat montre que la liaison de RKIP soit à Raf-1, soit à MEK, est suffisante pour l'inhibition (Yeung *et al.*, 2000). De plus, il semble que la cavité conservée des PEBP serait impliquée dans l'interaction RKIP/Raf-1. Ce dernier point a été confirmé plus récemment par Rath *et al.* (2008) qui ont montré que des mutants ponctuels perturbant l'accessibilité de la cavité de RKIP étaient affectés dans leurs paramètres d'interaction avec Raf-1 (Rath *et al.*, 2008).

Des études ont aussi montré que RKIP inhibait l'activation de Raf-1 en bloquant la phosphorylation de Raf-1 par les kinases Src et PAK (p21-activated kinase) (Trakul *et al.*, 2005). De plus, cette régulation induite par RKIP est spécifique de Raf-1 et pas de B-Raf. En effet, RKIP est capable d'interagir avec B-Raf, mais elle n'a pas d'activité régulatrice sur cette protéine contrairement à Raf-1 (Trakul *et al.*, 2005). Ces résultats





**FIGURE 42 : Activité kinase et association RKIP/Raf-1**  
(Park *et al.*, 2006)

Raf-1 et HA-RKIP sont co-exprimées dans des cellules COS-1. Après avoir privées les cellules de sérum pendant la nuit, les cellules sont activées en utilisant de l'EGF (30ng/ml). Les immunoprécipités de Raf-1 sont soumis à des essais d'activité de kinase en utilisant une protéine MEK recombinante et une protéine ERK recombinante dépourvue d'activité kinase (knERK).

L'immunoprécipitation de Raf-1 est analysée par western blot en utilisant l'anticorps α-Raf-1 et l'association à RKIP est détectée en utilisant l'anticorps anti-RKIP.

rèvent que la régulation de la cascade de signalisation MAP kinase par RKIP est un mécanisme dépendant de l'isoforme de Raf.

Plus récemment, en étudiant en détail le mode d'inhibition de Raf-1 par RKIP, (Park *et al.*, 2006) ont réussi à concilier ces deux types de résultats qui pouvaient paraître contradictoires. En effet, en procédant à des études cinétiques de l'interaction RKIP/Raf-1 *in vivo* après activation des cellules par le facteur de croissance EGF, les auteurs ont pu distinguer deux phases d'association de RKIP à Raf-1 (FIGURE 42). La première, rapide (entre 0 et 5 minutes après activation par EGF) aurait lieu entre RKIP et Raf-1 non activée. Après une dissociation transitoire entre RKIP et Raf-1, la deuxième phase d'association apparaît après 10 minutes entre RKIP et Raf-1 activée, phosphorylée sur les sérines 338/339 et la tyrosine 341 respectivement par PAK et Src. Ces deux phases d'association de RKIP à Raf-1 indiquent deux niveaux de régulation de Raf-1 par RKIP : le premier niveau, lors de la première phase d'association, va empêcher l'activation de Raf-1 ; le deuxième niveau, lors de la deuxième phase d'association, va empêcher la phosphorylation de MEK par compétition mais pas l'activation de Raf-1 puisque cette dernière est déjà activée.

Park *et al.* (2006) sont allés plus loin dans l'étude de l'interaction RKIP/Raf-1. Ils ont utilisés des mutants de délétion de Raf-1 et différents peptides issus de Raf-1, et ils ont étudié leurs interactions *in vivo* ou *in vitro* avec RKIP. Ils ont ainsi montré que la région de Raf-1 importante pour l'interaction avec RKIP était les 24 résidus amino-terminaux du domaine kinase de Raf-1 (résidus 325-349). Parmi ces 24 résidus se trouvent les sérines 338/339 et la tyrosine 341 qui sont phosphorylées par Src et PAK. Il apparaît que l'interaction avec le peptide non phosphorylé est de faible affinité avec des cinétiques d'association et de dissociation rapides indiquant une association instable et un turn-over rapide. Par contre, l'association avec le peptide phosphorylé sur les sérines 338/339 et la tyrosine 341 est de plus forte affinité (30 fois plus importante) et la phosphorylation apparaît être un signal d'ancrage. En utilisant des « peptides-arrays » avec des séries de peptides de 23 acides aminés différant à chaque fois de 4 acides aminés, les auteurs ont pu montrer que RKIP se liait de part et d'autre des sérines 338, 339 et tyrosine 340 et 341 de façon constante et plus ou moins fortement selon l'état de phosphorylation au niveau de la séquence centrale SSYY.

- **Régulation de l'activité inhibitrice de RKIP sur Raf-1**

Des études ont montré que les sérines/thréonines kinases de la famille des PKC sont capables d'activer Raf-1 (Ueda *et al.*, 1996) et/ou MEK (Schonwasser *et al.*, 1998) en



réponse à des facteurs de croissance. Elles jouent un rôle clé de médiateur dans plusieurs processus physiologiques tels que la croissance, la mort, la différenciation et la transformation cellulaires (Nishizuka, 1992). Il existe 3 classes principales de PKC (Protein Kinase C) qui se distinguent par leur activation. Les PKC classiques ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II, et  $\gamma$ ) ont besoin de calcium et de diacylglycérol (DAG) alors que les « nouvelles » PKC ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  et  $\theta$ ) nécessitent le DAG pour être actives mais pas de calcium. Raf-1 semble être phosphorylée par les PKC au niveau de plusieurs sites mais il n'apparaît pas que ces phosphorylations soient nécessaires à l'activation de Raf-1 (Corbit *et al.*, 2003; Kolch *et al.*, 1993; Yip-Schneider *et al.*, 2000).

D'après l'analyse de la séquence de RKIP pour les sites de phosphorylation, la sérine 153 serait une cible potentielle de phosphorylation par PKC. Corbit et ses collaborateurs (2003) ont donc étudié la phosphorylation de RKIP à l'aide d'un mutant S<sub>153</sub>V, la valine étant un résidu non phosphorylable. Les auteurs ont ainsi mis en évidence la phosphorylation de RKIP *in vitro* par les PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$  et  $\xi$  sur la sérine 153 et la substitution de la S<sub>153</sub> empêche ces phosphorylations. Les « nouvelles » PKC ( $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\eta$ ) n'agissent pas sur RKIP. Tous ces résultats suggèrent que la S<sub>153</sub> est le site majeur de phosphorylation de RKIP par PKC et que cette phosphorylation n'est pas effectuée par toutes les isoformes de PKC.

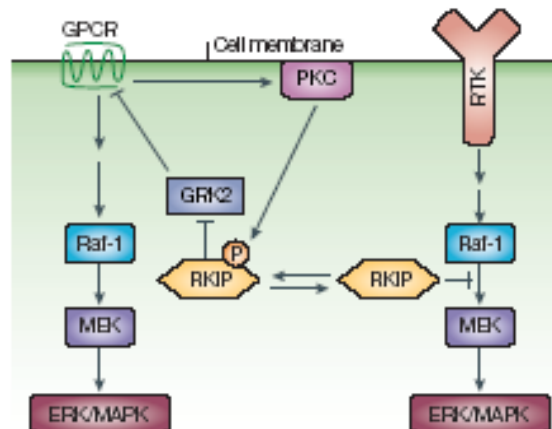
Les auteurs se sont ensuite focalisés sur l'isoforme  $\xi$  car ils avaient précédemment montré que cette isoforme médiait l'activation de Raf-1 par l'EGF dans des cellules H19-7 (Corbit *et al.*, 2000). Cette phosphorylation de RKIP par la PKC  $\xi$  *in vivo* ou *in vitro* en réponse à l'EGF ou au TPA provoque la libération de RKIP qui était alors liée à Raf-1. Comme cela a été montré sur la figure 42, la cinétique de phosphorylation de RKIP après activation par l'EGF est très rapide (5 minutes). C'est cette phosphorylation qui survient avant la deuxième phase d'association entre RKIP et Raf-1 et permet la pleine activation de la voie Raf/MEK/ERK.

L'augmentation de l'expression de la PKC permet donc de supprimer l'inhibition de la voie MAP Kinase par RKIP mais pas par le mutant RKIP-S<sub>153</sub>V.

La phosphorylation par la PKC libère donc un inhibiteur clé de la voie MAP Kinase et peut représenter un mécanisme général pour la régulation de cette voie.

- **RKIP phosphorylée inhibe la kinase GRK2**

Il était connu que la PKC régulaient l'activation de la cascade de signalisation Raf/MEK/ERK en réponse à des facteurs de croissance, mais jusqu'à ce que Corbit *et al.* (2003) montrent que RKIP était phosphorylée par la PKC et se dissociait alors de Raf-1, les mécanismes de cette activation n'étaient pas élucidés.



**FIGURE 43: Rôle de la phosphorylation de RKIP par la PKC**  
(Kolch, 2005)

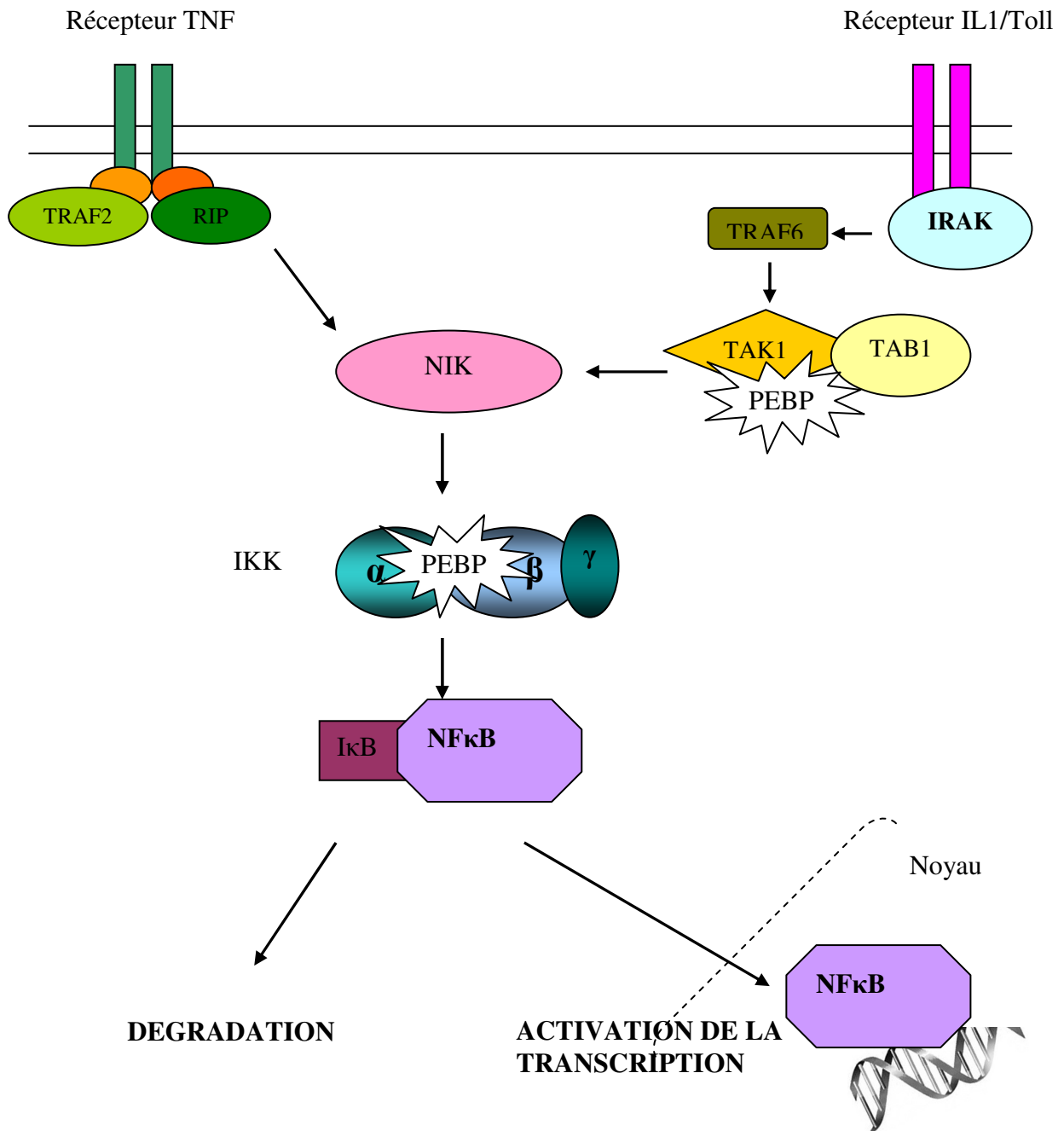
Lorenz *et al.* (2003) ont étudié plus précisément le mécanisme de phosphorylation de RKIP. La phosphorylation de RKIP sur la sérine 153 provoque la dissociation du complexe Raf-1/RKIP et favorise alors l'association de RKIP avec la kinase GRK2 (G-protein-coupled Receptor Kinase 2). Dans les cellules de mammifères, le principal rétrocontrôle inhibiteur pour les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) est GRK2 qui phosphoryle les récepteurs activés, induisant ainsi leur dissociation des protéines G et leur internalisation (Krupnick & Benovic, 1998). La fonction de Grk2 est indispensable et nécessite d'être strictement contrôlée. Une mauvaise régulation peut provoquer des désordres comme l'hypertension (Gros *et al.*, 1997) ou des problèmes cardiaques (Ungerer *et al.*, 1993).

L'étude menée par Lorenz *et al.* (2003) a permis de montrer que RKIP était un inhibiteur physiologique de GRK2. En activant la PKC, le signal issu de la fixation d'un ligand donné sur un récepteur GPCR est amplifié par deux processus : (1) RKIP phosphorylée par la PKC ainsi activée se détache de Raf-1 et la voie MAPK est activée ; (2) RKIP phosphorylée bloque ensuite l'internalisation du récepteur en inhibant GRK2 ce qui prolonge la durée du signal d'activation à la membrane (FIGURE 43).

- **RKIP inhibe les kinases Tak-1 et NIK et la voie d'activation de NF- $\kappa$ -B**

L'activateur transcriptionnel NF- $\kappa$ -B est nécessaire à la régulation d'un grand nombre de gènes en réponse à l'inflammation, aux infections virales et bactériennes ou d'autres stimuli de stress. Les gènes qui répondent à NF- $\kappa$ -B codent une variété de cytokines, de molécules d'adhésion cellulaire ou de protéines effectrices ou anti-apoptotiques. L'activation de NF- $\kappa$ -B en réponse à la stimulation par le TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ) et l'interleukine 1 beta (IL-1 $\beta$ ) a été largement étudiée (Ghosh *et al.*, 1998) ; cependant, les mécanismes qui régulent ces réponses sont encore mal compris.

NF- $\kappa$ -B, sous forme active, est un dimère qui peut être assemblé de plusieurs membres de facteurs de transcription de la famille Rel : p50, p52, p65, RelB et c-Rel. Dans la majorité des cas, c'est le dimère composé des membres p65 et p50 qui se forme. p50 intervient dans la fixation du complexe à l'ADN et p65 est responsable de l'activité activatrice de la transcription de NF- $\kappa$ -B. Cependant, il existe également des homodimères p50/p50 et p65/p65 ainsi qu'un certain nombre de combinaisons faisant intervenir chacun des membres de la famille Rel.



**FIGURE 44: Représentation de la voie d'activation de NFκB**

Dans des cellules non stimulées, NF- $\kappa$ -B est localisé dans le cytoplasme sous forme inactive et lié à une famille de protéines inhibitrices appelées I $\kappa$ B (inhibitors of  $\kappa$ B) (FIGURE 44). L'activation de NF- $\kappa$ -B nécessite la phosphorylation de I $\kappa$ B sur deux résidus sérines. Cette phosphorylation rend possible sa polyubiquitination puis sa dégradation par le protéasome, ce qui permet au dimère NF- $\kappa$ -B de transloquer vers le noyau. La phosphorylation de I $\kappa$ B est effectuée par la kinase I $\kappa$ B kinase (IKK) constituée des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ .

Yeung *et al.* (2001) ont mis en évidence la capacité de RKIP à réguler négativement la voie d'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ -B. En effet, la variation du taux d'expression de RKIP affecte la voie NF- $\kappa$ -B indépendamment de la voie MAP Kinase. En fait, RKIP est capable d'interagir physiquement avec 4 kinases de la voie NF- $\kappa$ -B : NIK (NF- $\kappa$ -B inducing kinase), TAK-1 (Transforming growth factor beta-activated kinase-1), IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ . De plus, des essais d'activité kinase *in vitro* ont montré que RKIP inhibait l'action de NIK et TAK-1. Comme indiqué sur la figure 44, NIK et TAK-1 sont impliquées dans la phosphorylation et l'activation d'IKK en réponse à des stimuli (Banfield & Brady, 2000; Yeung *et al.*, 2001). TAK-1 est impliquée dans la voie d'activation par l'interleukine IL-1 $\beta$  et phosphoryle directement la kinase NIK. NIK est la kinase sur laquelle convergent les voies d'activation par l'interleukine IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ . NIK active directement IKK en phosphorylant IKK $\alpha$ .

Le mode d'action de RKIP sur la voie d'activation de NF- $\kappa$ -B comporte d'étranges similitudes avec l'action de RKIP dans la voie Raf/MEK/ERK. En effet, comme Raf-1, NIK et TAK-1 appartiennent à la famille des MAPK.

Peu d'études ont été effectuées jusqu'à présent pour préciser l'implication de RKIP vis à vis de la voie d'activation NF- $\kappa$ -B dans la physiologie cellulaire.

Schuerer *et al.* (2006) ont cependant montré que RKIP serait impliquée dans le processus de différenciation des monocytes via l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ -B, indépendamment de la voie Raf/MEK/ERK.

Toutes les données concernant l'inhibition par RKIP de différentes kinases suggèrent que RKIP représente une nouvelle famille hautement conservée de régulateurs de kinases. De plus, le rôle cellulaire de RKIP pourrait être de coordonner la régulation de différentes voies de signalisation cellulaire.





#### 3.4.4.1.2 Les PEBPs inhibent les protéases à sérine

Les protéases à sérine sont impliquées dans de nombreux processus reliés au développement et à l'homéostasie des tissus. Elles dégradent également les composants de la matrice extracellulaire pour permettre la croissance des axones ou des neurites et les processus de migration cellulaire (Seeds *et al.*, 1999). Elles sont de plus capables de promouvoir la mort cellulaire et d'agir comme des facteurs mitotiques (Vaughan *et al.*, 1995). Leur activité protéolytique est strictement contrôlée par des inhibiteurs spécifiques qui doivent agir de manière équilibrée pour assurer un développement normal. Des perturbations dans l'équilibre de la régulation de l'activité des protéases à sérine pourraient être impliquées dans des pathologies de type maladie d'Alzheimer (Turgeon & Houenou, 1997).

Beaucoup de protéases à sérine ont été détectées dans le système nerveux central incluant la chymotrypsine, l'élastase, la thrombine, le t-PA (tissue-type Plasminogen Activator) (Davies *et al.*, 1998).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'homologue de RKIP, Tfs1p a été identifiée en 1998 comme un inhibiteur d'une protéase à sérine, la Carboxypeptidase Y (CPY) (Bruun *et al.*, 1998). Ce rôle semble avoir été conservé au cours de l'évolution puisque Hengst *et al.* (2001) ont montré que mPEBP-3 était capable d'inhiber la thrombine et d'autres protéases à sérine.

Jusque là, le seul inhibiteur endogène connu de la thrombine était la nexine-1 (Hofsteenge & Stone, 1987). Dans l'étude menée par Hengst et ses collaborateurs (2001), un nouvel inhibiteur a été purifié et caractérisé à partir de cerveau de souris. L'analyse par spectrométrie de masse a révélé qu'il s'agissait d'une PEBP. Des études plus poussées ont démontré que la PEBP exerçait son activité inhibitrice sur plusieurs protéases à sérine incluant la thrombine, la neuropsine et la chymotrypsine alors que la trypsine et l'élastase n'était pas affectées. La PEBP définit donc une nouvelle classe d'inhibiteurs de protéases à sérine.

#### 3.4.4.2 Les fonctions cellulaires des PEBPs

##### 3.4.4.2.1 RKIP et la motilité cellulaire

Le mouvement des cellules est un mécanisme fondamental dans de nombreux processus normaux et pathologiques tels que la morphogenèse, la réparation de blessures et l'état métastatique. La motilité cellulaire fait intervenir l'assemblage et la dissociation des



filaments d'actine, le mouvement de molécules motrices et l'adhésion de cellules. La locostatine est une petite molécule capable d'inhiber la locomotion des cellules et leur protrusion membranaire dans différents systèmes ainsi que la migration de certaines cellules cancéreuses (Mc Henry *et al.*, 2002). (Zhu *et al.*, 2005) ont montré que RKIP est l'une des 4 protéines se liant spécifiquement à la locostatine et que cette interaction empêchait la formation du complexe RKIP/Raf-1. Ces auteurs ont de plus montré que l'extinction de RKIP par des ARNi dans des cellules MDCK provoquait une diminution du taux de leur migration cellulaire, mimant le phénotype induit par la locostatine. Par contre, la surexpression de RKIP dans ces mêmes cellules était capable de promouvoir la dispersion et la migration cellulaire et de réduire les effets de la locostatine. Ainsi, ces études démontrent que RKIP est une cible de la locostatine et qu'elle joue un rôle positif dans la migration cellulaire. RKIP est la seule des 4 cibles de la locostatine à jouer un rôle dans la migration cellulaire. A ce jour, les mécanismes moléculaires de l'inhibition de RKIP qui sont responsables de l'arrêt de la motilité cellulaire sont inconnus.

#### 3.4.4.2.2 *RKIP et le transport de la morphine*

La morphine-6-glucuronide (M6G), dérivée de la morphine, est actuellement considérée comme un nouveau facteur endocrine (Glattard *et al.*, 2006). En effet, la M6G est présente dans les granules des cellules chromaffines de la médullosurrénale, après stimulation (Goumon *et al.*, 2006). Les mêmes auteurs ont montré qu'au sein des granules des cellules chromaffines, on trouve également l'enzyme UDP-glucuronosyltransférase 2B-like, qui est capable de transformer la morphine en M6G hautement analgésique. Une fois sécrétée dans la circulation, la M6G pourrait avoir plusieurs actions systémiques sur les cellules immunitaires par exemple. Ces activités pourraient être facilitées par RKIP, elle aussi sécrétée, et qui est capable de fixer la M6G et d'agir comme « bouclier moléculaire » en l'empêchant d'être dégradée rapidement (Goumon *et al.*, 2006).

L'impact de ces études est primordial puisque les implications cliniques sont nombreuses. En effet, la M6G est actuellement en essai de phase III dans les douleurs post-opératoires. De plus, des greffes de cellules chromaffines de la médullosurrénale sont expérimentées depuis 20 ans dans des modèles des douleurs aiguës et chroniques. Dans ces expériences, la M6G pourrait participer activement à l'effet analgésique observé.



#### 3.4.4.2.3 *RKIP et la mitose*

Des études récentes ont montré que RKIP s'associait aux centrosomes et aux kinétochores et qu'elle était capable de réguler le fuseau mitotique dans les cellules de mammifères (Eves *et al.*, 2006). En effet, la délétion de RKIP provoque notamment une diminution de l'index mitotique et du nombre de cellules en métaphase.

La délétion de Raf-1 ou l'inhibition de MEK sont capables d'inverser l'effet provoqué par la délétion de RKIP. L'hyperactivation de Raf-1, par contre, mime le phénotype induit par la délétion de RKIP. Enfin, la délétion de RKIP ou l'hyperactivation de Raf-1 modifient la localisation et l'activité kinase de Aurora B, qui est un régulateur du fuseau mitotique. En effet, la localisation de Aurora B au niveau des kinétochores et son activité kinase sont diminuées. Ces résultats indiquent donc que RKIP régulerait la kinase Aurora B et le fuseau mitotique par l'intermédiaire de la voie Raf/MEK/ERK. Le mécanisme précis impliqué dans la régulation de l'activité kinase d'Aurora B reste à déterminer. Il pourrait s'agir d'un mécanisme indirect de phosphorylation par des protéines permettant le recrutement de Aurora B au kinétochore.

Tout ceci démontre que de petits changements dans la voie MAP Kinase pourraient avoir un impact important sur la régulation du cycle cellulaire.

#### 3.4.4.3 Les fonctions physiologiques des PEBPs au niveau de l'organisme

##### 3.4.4.3.1 *Le peptide HCNP*

En 1984, Ojika et Appel ont décrit un peptide de 11 acides aminés, responsable de la stimulation de la production d'acétylcholine au niveau de l'hippocampe chez le rat (Ojika & Appel, 1984). Le séquençage de ce peptide révéla qu'il correspondait à l'extrémité N-terminale de la PEBP-1 de rat. Ce peptide a pris le nom de HCNP pour Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide. Ce peptide stimule l'assimilation de la choline, la synthèse d'acétylcholine et l'activité choline acétyl-transférase de manière dose-dépendante.

Plus tard, un homologue de HCNP a été isolé chez la souris et l'homme. Il correspond respectivement aux extrémités N-terminales des PEBP murine et humaine (Matsukawa *et al.*, 1999; Tohdoh *et al.*, 1995). (Otsuka & Ojika, 1996) ont mis en évidence une protéine de 68kDa, localisée au niveau de l'hippocampe, capable de cliver la PEBP pour donner le peptide HCNP.



Chez l'homme, la stimulation de l'activité cholinergique est fonction de l'âge, ce qui laisse penser que le peptide HCNP pourrait être un facteur neurotrophique lors du développement de l'hippocampe, lequel joue un rôle important dans la mémoire et l'apprentissage (Yuasa *et al.*, 2001). HCNP pourrait agir indépendamment mais aussi en synergie avec le NGF (Nerve Growth Factor) pour augmenter la production de choline acétyltransférase qui joue un rôle dans le développement cholinergique des noyaux septaux médians du cerveau (Ojika *et al.*, 1994). De plus, l'analyse de cerveaux néonataux humains et de leur corde spinale a montré que le taux d'expression de RKIP est élevé dans le cytoplasme des oligodendrocytes de la matière blanche et les cellules de Schwann entourant les extrémités nerveuses alors que son expression est faible au niveau des neurones acétylcholinergiques (Moore *et al.*, 1996).

Goumon *et al.* (2004) ont montré que PEBP et son peptide dérivé HCNP sont présents dans les granules de sécrétion de cellules chromaffines de bœuf. Dans la matrice de ces granules, PEBP peut être impliquée dans des mécanismes de maturation, en inhibant les protéases à sérine et donc en affectant la production de neuropeptides impliqués dans l'homéostasie. Ces mêmes auteurs ont montré que le peptide HCNP exerçait un effet marqué sur les performances du muscle cardiaque. Ce peptide a une action inotrope négative c'est-à-dire qu'il diminue la contractilité du muscle cardiaque. Ainsi, RKIP et HCNP peuvent être considérés comme des facteurs endocrines de la physiologie cardiaque.

#### *3.4.4.3.2 RKIP et la maladie d'Alzheimer*

La maladie d'Alzheimer est la forme de démence la plus diagnostiquée dans la population âgée. Elle est cliniquement caractérisée par un déclin progressif de nombreuses fonctions cognitives comme les pertes de mémoire, l'aphasie ou encore la perte de la capacité à organiser des activités normales.

Un lien a été établi entre RKIP, le peptide HCNP et la maladie d'Alzheimer ou la démence (Maki *et al.*, 2002; Mitake *et al.*, 1996). Ces recherches sont basées sur l'observation d'un fort taux d'expression et d'accumulation du peptide HCNP dans les corps d'Hirano. Il s'agit d'agrégats cytoplasmiques d'actine et de protéines liées à l'actine qui affectent le cytosquelette des cellules nerveuses et dont la présence est associée à des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Les patients qui possèdent des corps d'Hirano souffrent de troubles cholinergiques du système septo-hippocampal qui affectent l'apprentissage et la mémoire. De plus, des taux importants du peptide HCNP ont été détectés dans le liquide cébrospinal à un stade précoce de la maladie (Tsugu *et al.*, 1998).





D'autre part, la baisse d'activité cholinergique est une hypothèse permettant d'expliquer le déficit cognitif observé chez les malades atteints de la maladie d'Alzheimer. Or, on observe une baisse générale du taux de PEBP et de HCNP dans la région CA1 de l'hippocampe des patients. Cette chute pourrait être à l'origine de la baisse d'activité cholinergique qui est détectée dans la maladie.

En utilisant un modèle souris de la maladie d'Alzheimer, Georges *et al.* (2006) ont montré que le taux de PEBP dans l'hippocampe de ces souris diminuait significativement à 11 mois, qui est le moment exact où les peptides  $\beta$  amyloïdes commencent à s'accumuler, et à 15 mois où les peptides  $\beta$  amyloïdes s'aggrègent en plaques. Ils démontrèrent une corrélation significative entre la diminution du taux de PEBP dans l'hippocampe et l'accumulation de peptides  $\beta$  amyloïdes. Les liens de cause à effet de cette corrélation sont inconnus. Les résultats de ce groupe suggèrent que les peptides  $\beta$  amyloïdes pourraient induire la dégradation de la PEBP ou la modifier post-traductionnellement dans l'hippocampe puisqu'aucun changement n'est observé au niveau de l'expression de son ARN messager (George *et al.*, 2006). Le peptide amyloïde pourrait interagir directement avec la PEBP ou bien son accumulation pourrait augmenter le niveau de neurotoxicité des cellules de l'hippocampe de façon telle que le clivage de la PEBP en HCNP serait affecté. Il apparaît cependant que les peptides amyloïdes s'accumulent non seulement dans l'hippocampe mais aussi dans le cortex alors que la PEBP ne disparaît que de l'hippocampe. Ces résultats suggèrent que d'autres protéines, spécifiques de l'hippocampe, pourraient participer à la baisse du taux de PEBP.

#### *3.4.4.3 RKIP est un suppresseur de métastases*

Les métastases, qui sont la première cause de décès chez les patients atteints de cancer, restent l'un des aspects les plus importants mais le moins connu du cancer de la prostate notamment. Les métastases sont définies comme étant la formation de tumeurs secondaires à croissance progressive à des sites discontinus de la tumeur primaire (Welch & Rinker-Schaeffer, 1999). Le processus métastatique implique une cascade complexe d'évènements. Une cellule cancéreuse métastatique doit échapper à la tumeur primaire, entrer dans la circulation, envahir un autre compartiment de tissus et ensuite grossir et se multiplier à un site secondaire.

Fu et ses collaborateurs (2003) ont remarqué les premiers que des cellules provenant de cancer primaire de la prostate exprimaient RKIP alors que des cellules



métastatiques n'exprimaient pas cette protéine (Fu *et al.*, 2003). Plus tard, d'autres études ont montré une diminution de l'expression de *RKIP* dans d'autres tumeurs : cancer du sein (Chatterjee *et al.*, 2004), dans plusieurs lignées cellulaires de mélanome (Park *et al.*, 2005c), de carcinome des cellules de Merkel (Houben *et al.*, 2006) ou encore de carcinome des cellules du foie (Schuierer *et al.*, 2006).

Fu *et al.* (2003) ont montré que la surproduction de *RKIP* dans des cellules cancéreuses de la prostate est associée à une diminution de l'invasion cellulaire *in vitro* et à une diminution de l'invasion des vaisseaux sanguins par les cellules métastatiques. Par contre, la surexpression de *RKIP* ne semble pas avoir d'effet direct sur la tumeur primaire ni influencer les propriétés tumorigènes des cellules du cancer de la prostate. Par contre, cette protéine apparaît être un nouveau suppresseur de métastases qui pourrait contribuer à diminuer l'invasion des vaisseaux par les cellules métastatiques.

Récemment *RKIP* a été considérée comme facteur pronostique pour évaluer le risque métastatique chez les patients atteints d'un cancer de la prostate (Fu *et al.*, 2006).

#### 3.4.4.3.4 *RKIP* et l'apoptose

En 2004, Chatterjee *et al.* démontrèrent que *RKIP* jouait un rôle dans la sensibilisation des cellules cancéreuses aux traitements chimiothérapeutiques. En effet, les auteurs ont montré que le niveau d'expression de *RKIP* dans des cellules cancéreuses (de la prostate et du sein) augmente rapidement après un traitement par des drogues anti-cancéreuses favorisant l'apoptose des cellules. L'expression maximale de *RKIP* coïncide exactement avec le début du phénomène d'apoptose. De plus, dans des cellules cancéreuses résistantes aux drogues (cellules RC1), l'ajout de drogue (9NC 9-nitrocamptothecin) ne provoque pas d'augmentation de l'expression de *RKIP*. Par contre, l'expression ectopique de *RKIP* « re-sensibilise » ces cellules et conduit à l'apoptose. Enfin, la diminution de la quantité de *RKIP* cellulaire (par ARNi) provoque une résistance des cellules vis à vis de l'apoptose induite par les drogues anti-cancéreuses.

Une autre étude menée par (Jazirehi *et al.*, 2004) a montré que le rituximab, anticorps monoclonal chimérique spécifique pour le CD20 humain (marqueur spécifique des lymphocytes B) (Reff *et al.*, 1994), peut interférer dans la voie Raf/MEK /ERK ce qui conduit à la diminution de l'expression de *BCL-XL*. Le rituximab inhibe l'activité kinase de ERK, réduit la phosphorylation des composants de cette voie (Raf, MEK, ERK) et diminue l'activité du facteur de transcription AP-1 et l'expression du gène *BCL-XL*. Ces données ont



permis aux auteurs de proposer un modèle dans lequel le rituximab affecte à la fois la voie de prolifération cellulaire et la voie conduisant à l'apoptose. Or, il apparaît que le traitement des cellules au rituximab induit la synthèse de RKIP. Il semble donc que RKIP joue un rôle de médiateur de l'apoptose. Néanmoins, le mécanisme permettant l'induction de RKIP est actuellement inconnu.

En 2005, Wang *et al.* ont décrit hPEBP-4 comme une molécule anti-apoptotique et ayant un profil d'expression préférentiel dans les tissus cancéreux du sein (Wang *et al.*, 2005). Ceci ferait de la PEBP-4 une nouvelle cible thérapeutique dans le cancer du sein : l'inhibition de l'expression de *hPEBP-4* pouvant constituer une approche prometteuse.

#### *3.4.4.3.5 RKIP et le diabète*

RKIP pourrait intervenir dans les effets secondaires du diabète par l'intermédiaire de lien avec la PKC. En effet, il a été montré que la PKC jouait un rôle dans les néphropathies diabétiques (Kikkawa *et al.*, 2003). Dans les cas de diabète, la PKC est suractivée, notamment au niveau du rein, ce qui entraîne une modification de la régulation de l'ensemble des voies de transduction du signal. *RKIP* semble être surexprimé dans les cellules rénales de souris diabétiques (lignée OVE26) présentant des désordres de régulation (Thongboonkerd, 2004). Des expériences sont en cours pour déterminer si l'implication d'excès de RKIP participe au développement de la néphropathie diabétique, ou si au contraire il contribue à l'atténuation des conséquences dues à la sur-activation de la PKC.



# *MATÉRIEL ET MÉTHODES*



Souche	Génotype	Source
BY4742	<i>MATa, his3Δ1, leu2 Δ0, lys Δ0, ura3 Δ0</i>	Euroscarf
BY4742ΔT	BY4742, <i>tfs1 :: kan</i>	Chautard <i>et al</i> , 2004
BY4742ΔTY	BY4742, <i>tfs1, ylr179c :: kan</i>	Chautard <i>et al</i> , 2004
BY4742 ΔT(U)	BY4742, <i>tfs1 :: ura3</i>	Ce travail
BY4742ΔT(Tfs1P99L)	BY4742, <i>tfs1 :: tfs1P99L</i>	Ce travail
BY4742ΔT(Tfs1N2K)	BY4742, <i>tfs1 :: tfs1N2K</i>	Ce travail
BY4742Δprc1	BY4742, <i>prc1 :: kanMX4</i>	Euroscarf
BY4742Δprc1ΔT(U)	BY4742, <i>prc1 :: kanMX4 tfs1 :: ura3</i>	Ce travail
BY4742Δprc1ΔT(Tfs1P99L)	BY4742, <i>prc1 :: kanMX4 tfs1 :: tfs1P99L</i>	Ce travail
BY4742Δprc1ΔT(Tfs1N2K)	BY4742, <i>prc1 :: kanMX4 tfs1 :: tfs1N2K</i>	Ce travail
LRB27	<i>MATa, his4, leu2, ura3, cdc25-1</i>	L. Robinson
LRB27Δnat3	LRB27, <i>nat3 ::kanMX4</i>	Ce travail
LRB27Δmdm20	LRB27, <i>mdm20 ::kanMX4</i>	Ce travail
LRB27Δprc1	LRB27, <i>prc1 ::kanMX4</i>	Ce travail
EGY48	<i>MATa, trp1, his3, ura3, leu2 ::6 LexAop-LEU2</i>	MoBiTec
Y187	<i>MATa, his3, trp1, ade2, leu2, ura3 gal4Δ, met, gal80Δ, MEL1, ura3::Gal1(UAS)-Gal1TATA-LacZ</i>	P. Billuart
L40ΔGal4	<i>MATa, trp1, leu2, his3, lys2 ::op LexA(4)-his3, ura3 ::op LexA(8)-LacZ, gal4Δ</i>	P. Billuart

Table 1 : Liste des différentes souches de levures utilisées

## 1. Microbiologie

### 1.1. Souches utilisées

La souche bactérienne utilisée pour toutes les isolations et amplifications de plasmides, ainsi que les clonages est la souche d'*Escherichia coli* C600 (*F* [*el4*<sup>-</sup> (*McrA*<sup>-</sup>) ou *el4*<sup>+</sup> (*McrA*<sup>+</sup>) *thr-14 leuB6 thi-1 lacY1 glnV44 supE44 rbfD1 fhuA21*). Pour la production des protéines His<sub>6</sub>-Ylr179c, His<sub>6</sub>-Tfs1Y, His<sub>6</sub>-Tfs2Y et His<sub>6</sub>-Tfs3Y, la souche d'*E.coli* utilisée est BL21 (DE3) (*F ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)*).

La production des fragments GST-RKIP, GST-PEBP2 ou GST-PEBP3 est réalisée dans la souche W3110 (*λ, lN (mD-rmE) 1, rphI*).

La souche TOP10 provenant du kit « Topo TA Cloning<sup>®</sup> » (Invitrogen) a pour génotype : (*F mcrA Δ[mrr-hdsRMS-mcrBC] Φ 80 lacZ ΔMIS ΔlacX74 deoRrecA1ara D139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>r</sup>) endA1 nupG*). Cette souche est vendue chimiquement compétente et permet d'amplifier le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> contenant le fragment d'ADN d'intérêt préalablement obtenu par PCR.

La souche HB101 utilisée déjà compétente (PROMEGA) est utilisée pour amplifier les plasmides de la banque d'ADNc de cerveau humain qui se sont révélés positifs dans le crible du double hybride. Elle a pour génotype : *F<sup>-</sup>, thi-1, hsdS20 (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (str<sup>r</sup>), xyl-5, mtl-1*.

La liste des différentes souches de levures utilisées est présentée en [table 1](#).

### 1.2. Milieux de culture

Les cultures bactériennes ont été réalisées en milieu LB supplémenté en antibiotique nécessaire pour maintenir les plasmides (ampicilline 100μg/ml ou chloramphénicol 34μg/ml).

Les différentes souches de levures ont été cultivées en milieu riche YPD (Yeast extract 1%, Peptone 2%, Dextrose 2%) ou en milieu minimum synthétique (MP Bio) dépourvu des compléments nécessaires pour le maintien des plasmides. La source de carbone est le glucose (2%) sauf pour la surexpression des gènes clonés sous promoteur Gal, dans ce cas, le milieu contient 2% galactose et 1% raffinose.

Nom	Séquence 5'-3'
HB1	GATCATATGAACCAAGCAATAGACTTCGCAC
HB2	ACTCGAGGATCCTTATTTTCGTTTCCGCATAGAAGAA
HB3	GCAGAGCTCGAGTTGAATCCGAAGTTA
HB13	TAGCGGCCGCAAGCAATAGACTTCGCACAAG
HB15	ACTCGAGGATCCTTACATGTCATAGTTGAATCA
HB38	CCCTGCAGGGTGCAGCAACCGGCTCGTATAG
HB39	CGCGCG GAGCTCCTATTTTCGTTTCCGCATAGAAGAAATTGG
HB40	CGCATTCTACCCAGTGGCATACTTCAGACCCTTGTGATCTG
HB41	CAGATCACAAGTGGTCTGAAGTATGCCACTTGGTAGAATGCG
HB44	GCAATGCGGCCGCTTTCTAGTGCCATCGTTGCTAAA
HB46	TGCTTGTGCGAAGTCTATTGCTTGTGTCATGTTTTTTGCGTTTTCTCTTGTT
HB47	GAACAAGAGAACAAGCAAAAAACATGCAACAAGCAATAGACTTCGCACAAGCA
HB48	TGCTTGTGCGAAGTCTATTGCTTGGTGCATGTTTTTTGCGTTTTCTCTTGTT
HB49	GAACAAGAGAACAAGCAAAAAACATGCACCAAGCAATAGACTTCGCACAAGCA
HB52	TAGCGGCCGCCCATGAACAAGCAATAGACTTCG
HB53	TAGCGGCCGCCCATGAAGCAAGCAATAGACTTCG
HB54	TAGCGGCCGCCCATGCACCAAGCAATAGACTTCG
HB55	TAGCGGCCGCCCATGCAACAAGCAATAGACTTCG
HB56	GATCATATGTCTAGTGCCATCGTTGCTAAAC
HB57	CGCGCGAGATCTTAGGCCAATTAGGCCAACCTAAAATGGAA
HB58	GCGCGCTTAATTAATCAGGCAGCTATTAGGTTATACGAACTG
HB59	CAGCGGCCGCATGCAAGCAATAGACTTCGCACAA
HB60	CACCGCGGCTATTTTCGTTTCCGCATAGAAG
Thyb1	GATTTCAACTATGACATGTAGGTATATATATATATATATATATGTATATGTA
Thyb2	TACATATACATATATATATATATATATACCTACATGTCATAGTTGAAATCAACGG TCGTG
Thyb3	GTTTTCGACCATGTAATAATTGGAGGCAACTAGTTGCAGGTTG
Thyb4	GGAAAACAACCTGCAACTAGTTGCCTCCAATTATTACATGGTCGAAAACAC GACCG
Thyb5	GAGAACATTATCTCCTGGGGTTACGGCACCCCTGCCACCGGT
Thyb6	GCCAACACCGGTGGCAGGGGTGCCGTAACCCAGGAGATAATGTTCTCAAC
Thyb7	CTCAACCTTGGTAAAAGTAGATGAGTCCACGCCTTAGGCTGC
Thyb8	TATAAGCAGCCTAAGGGCGTGGACTCATCTACTTTTACCAAGGTTGAGAAC
Thyb9	GGTGTCTGTGAGAAATAACTATATGGGACCAGCTCCACCCAAG
Thyb10	TGGAGCTGGTCCCATATAGTTATTTCTCACGACACCCTTCCC
Thyb11	AATATCAGTGATGTAGTGGCAGAATTCAGACCCTTGTG
Thyb12	TGGTCTGAATTCTGCCACTACATCATCACTGATATTCCTGTC
Thyb13	TTCGAGATTCTTGGTGAGCTTGCCGTAGAGTACTCATCAAGT
Thyb14	TGAGTACTCTACGGCAAGCTCACCAAGAATCTCGAACGCCAA
Thyb15	AGCAACGATGGCACTAGACATGTTTTTTGCTTGTCTCTTGTCTTG
Thyb16	CAAGAGAACAAGCAAAAAACATGTCTAGTGCCATCGTTGCTAAAC
Yhyb7	TTCTCGAAAATTAAGGATAGACCGAACTGGGGGTACGGTACTCCTGGTGCGGGT
Yhyb8	ACCCGCACCAGGAGTACCGTACCCCAAGTTCGGTCTATCCTTAATTTTCGAGAA
Yhyb11	ACGAAGGGCTCGAACACACTAATAGAATATATTGGGCCTGGTCCACCAAAGA ACTCC
Yhyb12	GTTCTTTGGTGGACCAGGCCAATATATTCTATTAGTGTGTTTCGAGCCCTTC GTATTG
HB61	CGCGCGGGTACCGTATCCATATGATGTTCCCTGATTATGCTGAATTCCCGGT GGACCTCAGCAAGTGGTCCGGG

Table 2 : Liste des différents oligonucléotides utilisés

Pour sélectionner les mutants qui ont perdu le marqueur *URA3*, les levures sont étalées sur milieu minimum contenant du 5-FOA (5-Fluoorotic acid, Zymo Research) à 1mg/ml.

Pour sélectionner les clones positifs en double hybride et éliminer le bruit de fond, 3mM 3-AT (Q-BIO gene) a été rajouté au milieu SD-H-L-T.

Les souches LRB27 $\Delta$ nat3, LRB27 $\Delta$ prc1 et LRB27 $\Delta$ mdm20 ont été construites par croisement et sporulation (extrait de levure 0.1%, 1% acétate de potassium pH7, glucose 0.05%, agar 2%, acides aminés 20mg/L).

## 2. EXPERIENCES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

### 2.1. *Techniques classiques de biologie moléculaire*

#### 2.1.1. Manipulations classiques d'ADN

Les enzymes utilisées pour les réactions de PCR sont la « Expand High Fidelity PCR System » (Roche) en programme Hot Start, privilégiée pour le clonage de produit de PCR en raison de sa haute fidélité, la « DyNAzyme<sup>TM</sup>II DNA polymérase » (Finnzyme) qui fonctionne préférentiellement sur l'ADN génomique de levure ou pour les PCR sur colonies de levures. La Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase High fidelity (Invitrogen) est privilégiée pour les produits de PCR destinés au clonage dans le vecteur navette pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>. La Taq ADVANTAGE polymérase (BD Bioscience) est utilisée lors de l'amplification des domaines de Nf1 à partir d'une banque d'ADNc.

Pour l'identification des clones obtenus par double hybride, la Tfi DNA Polymerase (Invitrogen) est utilisée.

La liste des oligonucléotides utilisés est présentée dans la [table 2](#).

Les fragments de PCR obtenus ont été purifiés grâce au kit « Nucleospin Extract » (Macherey-Nagel) par extraction des fragments d'ADN à partir de gels d'agarose 1%.

Selon l'enzyme utilisée lors de la PCR, ces fragments purifiés peuvent être :

- Soit sous-clonés dans le vecteur navette « pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>TA Cloning » (Invitrogen) Ce vecteur est vendu ouvert avec un système de topoisomérase greffée de part et d'autre du site d'ouverture du plasmide. Les extrémités T non appariées en 3' s'hybrident avec les

Nom	Séquence 5'-3'
HB62	CGCGCGTCTAGAGTCGACCTACTTCCCAGACAGCTGCTCGTACAG
HB63	CGCGCGGGTACCGTATCCATATGATGTTCCCTGATTATGCTGAATTCCCCAACAG TGACATCGACTTGAGCAACCTG
HB64	CGCGCGTCTAGAGTCGACTTAGTAGATGCCATAGGTGGGCTCATG
HB65	CGCGCGGGTACCGTATCCATATGATGTTCCCTGATTATGCTGAATTCCGGTTGGAC AATGAGGCTGGTTACAGCAGCA
HB66	CGCGCGTCTAGAGTCGACCTATCTCCGCCTGGTTTTGTGCTTGGG
HB67	GATCAAGCTTGCCACCATGCCGGTGGACCTCAGCAAG
HB68	GATCCTCGAGCTACTTCCCAGACAGCTGCTCGTAC
HB69	GATCCTCGAGCTAAGCATAATCAGGAACATCATATGGATACTTCCCAGACAGCT GCTCGTAC
HB70	TACTGCGGCCGCGTACCTGGGTCCTCCAGAGCACAAACCTGTG
HB71	GACGCTCGAGGGTGTGTTGGCAGGGATACATAAACCTGATGT
HB72	TACTGCGGCCGCGGGTTACCACAAGGATCTCCAGACAAGAGCTACATTTATG
HB73	GACGTCGACGGTGTGTTGCAGGGATACATAAACCTGATGTCTC
HB74	TACTGCGGCCGCGCAATATAATCCATCCCTGCAACCAAGTCTTGTTGTC
HB75	GACGCTCGAGCACGATCTTCTTAATGCTATTACGTTTGAAACTGCCAGCG
HB76	CGCGAGTCGACCTGGTTACCACAAGGATCTCCAGACAAGA
HB77	GTCTACTGCAGTCAGTCGGGCTGTGACAGTTCCCAGG
HB78	CGCGAGTCGACCTTCAAAGTTTGAGGAATTTATGACTAGGCATG
HB79	GGCGCAATTTCTTTACTTATTGATGATGTTCTTGGCCAATTA
HB80	GGCGCCTCGAGTTCATGATGACGCCTCAGTGGCAGCTATTA
HB81	CTATTTGTTTCCGCATAGAAGAAATTGGAGGCAACTAGTTGCAGGTTGTT GAATTTCCCGGGATCCGG
HB82	GGTGCAGCAACCGGCTCGTATAGATACGGATAAGATAGAGTATATTGTGCA ACAAGCTAGCTTGGCTGCAGG
HB83	CTATTTGTTTCCGCATAGAAGAAATTGGA
HB84	GGTGCAGCAACCGGCTCGTATA
HB85	CAATGTCTGACGCAGGTA
HB86	CTTCTTGGTTGGGTCTTC
HB87	AGAGGTTGCTGCTTTGGT
HB88	TGGACCACTTTCGTCGTA
HB89	CACATTACTCCCTACAAAC
HB90	TCTGCGGGTGTATACAGA
HB91	GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGA
HB92	CTATTCGATGAAGATACCCACCAAACC

Table 2 : Liste des différents oligonucléotides utilisés

extrémités A non appariées en 3' du fragment d'ADN amplifié par PCR. Les topoisomérases réalisent alors une liaison phosphodiester entre le vecteur et le produit de PCR. De plus, le site d'insertion est situé dans le gène de la  $\beta$ -galactosidase pour permettre une sélection des vecteurs ayant inséré le fragment d'intérêt sur milieu LB-ampicilline (100 $\mu$ g/ml) contenant 0.4 mM d'IPTG et 0.08 mg/ml de X-Gal.

- soit clonés directement dans le vecteur d'intérêt.

Pour cela, une midipréparation du plasmide est effectuée avec le kit «Nucleobond PC100 » (Macherey-Nagel). Une fois que la séquence du gène à cloner est amplifiée par PCR et purifiée, le fragment de PCR et le plasmide sont digérés par les mêmes enzymes. Les enzymes de restriction utilisées ainsi que leur tampon de réaction sont fournis par BioLabs. Pour chaque digestion, les enzymes ont été utilisées dans un rapport de 0.1 U/ $\mu$ g d'ADN. Les étapes de ligation sont effectuées avec le kit « Rapid DNA ligation kit » (Roche) selon les recommandations du fabricant puis le produit de ligation est transformé dans des bactéries C600 compétentes.

Les minipréparations de plasmide ont été réalisées grâce au kit « Nucleospin Quick Plasmid » (Macherey-Nagel) pour vérifier si l'insert est intégré.

Pour les séquençages, des minipréparations ont été réalisés avec le kit « Nucleospin Plasmid » (Macherey-Nagel). Au moins 1 $\mu$ g d'ADN plasmidique purifié est à chaque fois envoyé à la société MWG qui réalise les séquençages.

### **2.1.2. Transformation de bactéries**

Les bactéries TOP10 (Invitrogen) sont vendues compétentes et sont transformées grâce au protocole fourni par les fabricants.

Les bactéries C600 ou W3110 sont rendues compétentes par l'ajout de 500 $\mu$ l de TSB froid (PEG<sub>3350</sub> 10%, DMSO 5%, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM dans du LB) à un culot de 10ml de culture de cellules de DO<sub>600nm</sub> 0.6 à 0.9. Après 10 minutes dans la glace, 0.5 $\mu$ l de plasmide ou 5 $\mu$ l de mélange de ligation sont ajoutés à 50 $\mu$ l de cellules compétentes. Une incubation de 30 minutes dans la glace est réalisée suivie d'une incubation sous agitation d'1 heure à 37°C dans 250 $\mu$ l de TSB-glucose 8%. Le mélange est finalement étalé sur boîte LB-antibiotique nécessaire au maintien du plasmide.



### 2.1.3. Transformation de levures

Une culture de levure (30ml) est centrifugée à une  $DO_{600nm}$  comprise entre 0.5 et 1 puis le culot est rincé dans du TE (Tris HCl pH7.5, EDTA 1mM). Les cellules sont ensuite reprises dans 150 $\mu$ l de TE/LiAC (1 volume de TE 10X, 1 volume de LiAC 1M, 8 volumes d'eau stérile). La quantité de cellules dépend de la nature de l'ADN à intégrer : 50  $\mu$ l pour un plasmide ou 100 $\mu$ l pour un fragment linéaire. On utilise 0.2 $\mu$ g de vecteur circulaire ou 4 produits de PCR de 50 $\mu$ l purifiés (pour l'ADN linéaire). Ensuite, 0.1mg d'ADN entraîneur (sperme de saumon) et 300 $\mu$ l d'une solution de transformation (PEG<sub>4000</sub> 40%, TE 1X, LiAC 0.1M) sont ajoutés, ces quantités sont doublées dans le cas du fragment linéaire. Le mélange est incubé 30 minutes à 30°C (ou à 25°C pour les souches thermosensibles), puis 10% de DMSO final sont ajoutés avant de réaliser un choc thermique de 20 minutes à 42°C (voire 15 minutes pour les transformations délicates). Les cellules sont finalement placées 2 minutes dans la glace avant d'être étalées sur le milieu de sélection.

### 2.1.4. Préparation d'ADN génomique de levure

Une culture de 3ml de levure est centrifugée et le culot est repris dans 200 $\mu$ l de tampon de lyse (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris HCl pH8 10mM, EDTA 1mM) et 200 $\mu$ l de phénol/chloroforme/alcool isoamylique. Le mélange est ensuite vortexé 3 minutes avec des billes de verres (425-600 $\mu$ m, Sigma). Ensuite, 200 $\mu$ l de TE 1X sont ajoutés et le lysat est centrifugé 5 minutes à 10 000g. La phase aqueuse est récupérée et 1ml d'éthanol 100% y est ajouté. Le mélange est de nouveau centrifugé 10 minutes à 10 000g. Le culot est repris dans 400 $\mu$ l de TE et 30 $\mu$ g de RNase A. Après une incubation de 15 minutes à 37°C, l'ADN est précipité avec 10 $\mu$ l d'acétate d'ammonium 4M et 1ml d'éthanol 100% et placé 5 minutes dans la glace. Le mélange est centrifugé 10 minutes à 10 000g, le culot est séché et repris dans 10 à 20 $\mu$ l d'eau PPI selon la grosseur du culot.

### 2.1.5. PCR sur colonies de levures

Cette technique consiste à prélever directement la colonie sur boîte et à l'étaler le long de la paroi d'un microtube à PCR. Ensuite, 50 $\mu$ l de zymolase (10mg/ml) sont ajoutés pour casser la paroi des levures. Le mélange est vortexé puis incubé 20 minutes à 30°C. Après une centrifugation d'1 minute à 6000rpm, le surnageant est éliminé, le culot est chauffé 5 minutes à 95°C et repris dans 20 $\mu$ l de mélange de PCR (dNTPs 0.25mM, tampon 1X, amorce



Plasmides	Description	Source
Yep351	2 $\mu$ , LEU2	Hill <i>et al.</i> , 1993
Yep351T	Yep351, <i>TFS1</i>	Chautard <i>et al.</i> , 2004
Yep351T P <sub>99</sub> L	Yep351, <i>TFS1</i> (P <sub>99</sub> L)	Chautard <i>et al.</i> , 2004
Yep351T H <sub>111</sub> A	Yep351, <i>TFS1</i> (H <sub>111</sub> A)	Chautard <i>et al.</i> , 2004
Yep351T R <sub>162</sub> A	Yep351, <i>TFS1</i> (R <sub>162</sub> A)	Chautard <i>et al.</i> , 2004
Yep351T F <sub>109</sub> V	Yep351, <i>TFS1</i> (F <sub>109</sub> V)	Voir texte
Yep351T N <sub>2</sub> K	Yep351, <i>TFS1</i> (N <sub>2</sub> K)	Voir texte
Yep351T N <sub>2</sub> Q	Yep351, <i>TFS1</i> (N <sub>2</sub> Q)	Voir texte
Yep351T N <sub>2</sub> Kbis	Yep351, <i>TFS1</i> (N <sub>2</sub> Kbis)	Voir texte
Yep351T-BCY	Yep351, <i>TFS1</i> -BCY	Voir texte
Yep351T-CY	Yep351, <i>TFS1</i> -CY	Voir texte
Yep351T-1Y	Yep351, <i>TFS1</i> -1Y	Voir texte
Yep351T-2Y	Yep351, <i>TFS1</i> -2Y	Voir texte
Yep351T-3Y	Yep351, <i>TFS1</i> -3Y	Voir texte
Yep351T-4Y	Yep351, <i>TFS1</i> -4Y	Voir texte
Yep352Y-3T	Yep352, <i>YLR179c-3T</i>	H. Bénédicti
Yep352Y	Yep352, <i>YLR179C</i>	Chautard <i>et al.</i> , 2004
YDp-U	YDp, <i>URA3</i>	Berben <i>et al.</i> , 1991
pAB2865	CEN, <i>TPM1-5</i> , <i>URA3</i>	Polevoda <i>et al.</i> , 2003
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	Ampr, Knr, 3'-T, topoI-activated	Invitrogen
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup> RKIP	pCR2.1 TOPO, <i>RKIP</i>	Voir texte
p3X-flag	Amp <sup>r</sup> , P-CMV, SV40 Ori	J.V. Barnier
p3X-flag SecPH	p3X-flag, SecPH ( <i>NF1</i> )	Voir texte
p3X-flag GAP- SecPH 5	p3X-flag, <i>GAP- SecPH 5</i> ( <i>NF1</i> )	Voir texte
p3X-flag GAP- SecPH 7	p3X-flag, <i>GAP- SecPH 7</i> ( <i>NF1</i> )	Voir texte
pcDNA <sub>3</sub>	Amp <sup>r</sup> , neo <sup>r</sup> , SV 40 ORI, P-CMV	V. Piller
pcDNA <sub>3</sub> -HA	Amp <sup>r</sup> , neo <sup>r</sup> , SV 40 ORI, P-CMV	J.V. Barnier
pcDNA <sub>3</sub> RKIP	pcDNA <sub>3</sub> , <i>RKIP</i>	Voir texte
pcDNA <sub>3</sub> -HA RKIP	pcDNA <sub>3</sub> -HA, <i>RKIP</i>	Voir texte
pcDNA <sub>3</sub> -HA PEBP2	pcDNA <sub>3</sub> -HA, <i>PEBP2</i>	Voir texte
pcDNA <sub>3</sub> -HA PEBP3	pcDNA <sub>3</sub> -HA, <i>PEBP3</i>	Voir texte
pGex-6-P1	Amp <sup>r</sup> , GST	J.V. Barnier
pGex-6-P1 RKIP	pGex-6-P1, <i>RKIP</i>	Voir texte
pGex-6-P1 PEBP2	pGex-6-P1, <i>PEBP2</i>	Voir texte
pGex-6-P1 PEBP4	pGex-6-P1, <i>PEBP4</i>	Voir texte
pDNR-LIBhPEBP4	pDNR-LIB, <i>PEBP4</i>	Open Biosystem
pVjL <sub>9</sub>	2 $\mu$ , TRP1 LEXA	P. Billuart
pVjL <sub>9</sub> TFS1	pVjL <sub>9</sub> , <i>TFS1</i>	Voir texte
pVjL <sub>9</sub> SecPH(NF1)	pVjL <sub>9</sub> , <i>SecPH</i> ( <i>NF1</i> )	Voir texte
pVjL <sub>9</sub> GAP- SecPH 5	pVjL <sub>9</sub> , <i>GAP- SecPH 5</i> ( <i>NF1</i> )	Voir texte
pVjL <sub>9</sub> GAP- SecPH 7	pVjL <sub>9</sub> , <i>GAP- SecPH 7</i> ( <i>NF1</i> )	Voir texte
pACT <sub>2</sub>	2 $\mu$ , LEU2 GAL4AD	P. Billuart
pACT <sub>2</sub> TBD(IRA2)	pACT <sub>2</sub> , <i>TBD(IRA2)</i>	Voir texte
pJG4-5	2 $\mu$ , TRP1, transcriptionnal AD	MoBiTec
pJGIra2-TBD	pJG4,5, <i>IRA2 TBD</i>	Chautard <i>et al.</i> , 2004
pADNS	2 $\mu$ , LEU2	Colicelli <i>et al.</i> , 1989
pADNS-Tfs1	pADNS, <i>TFS1</i>	H. Bénédicti
pADNSTAN2	pADNS, <i>TFS1</i> $\Delta$ N2	Voir texte

Table 3 : Liste des plasmides utilisés

1 $\mu$ M, 0.4 U « DyNAzyme<sup>TM</sup>II DNA polymérase » (Finnzyme)). Le programme est effectué en Hot Start, et 3 minutes d'élongation sont nécessaires pour 800pb (au lieu de 1 minute pour 1000pb pour une PCR classique).

## **2.2. Détails des constructions génétiques**

La liste des différents plasmides utilisés ou construits pendant cette étude est présentée en [table 3](#). Les constructions sont détaillées dans le paragraphe suivant.

### **2.2.1. Constructions des protéines hybrides Tfs1p/Ylr179cp**

La construction des protéines hybrides Tfs1p-1Y, Tfs1p-2Y, Tfs1p-3Y et Tfs1p-4Y a nécessité deux étapes pour leur construction. Il a d'abord fallu amplifier par PCR différentes portions des gènes *TFS1* et *YLR179c* correspondant aux différents domaines à échanger. Pour ces amplifications, les matrices utilisées ont été le plasmide Yep351T pour les fragments de *TFS1* et le plasmide Yep352Y pour les fragments de Ylr179cp. Les couples d'oligonucléotides utilisés ont été répertoriés dans la table 4, ils ont été choisis de manière à réaliser des PCR « chevauchantes ».

La seconde étape consistait à amplifier la longueur totale des gènes hybrides en utilisant des amorces externes HB3 et HB52. Les matrices utilisées sont des fragments de PCR synthétisés lors de la première étape et s'hybridant sur leur région chevauchante.

Le gène codant pour la protéine Tfs1-BCY a été construit selon le même principe avec les plasmides Yep351T et Yep352Y-3T. Ce dernier plasmide code pour une protéine hybride Tfs1p/Ylr179cp possédant tous les domaines de Ylr179cp sauf le domaine 3 qui a été remplacé par celui de Tfs1p. Les amorces externes sont HB52 et HB53.

Pour le gène codant pour Tfs1-CY, les matrices Yep351T et Yep351T-BCY ont été utilisées et les amorces externes HB52 et HB53.

D'autre part, les amorces internes utilisées introduisent les sites SacI et PstI pour permettre le clonage ensuite dans Yep351.

Plasmides	Description	Source
pGNG	2 $\mu$ , URA3, LexAop-GFP	MoBiTec
pESC-Flag	2 $\mu$ , URA3, TPI pro	Invitrogen
pESC-TBD	pESC-Flag, IRA2 TBD	Voir texte
pET14-b	Amp <sup>r</sup> , pT7-His <sub>6</sub>	Novagen
pET14-Ylr179c	pET14-b, pT7-His <sub>6</sub> - <i>YLR179C</i>	H. Bénédetti
pET14-1Y	pET14-b, pT7-His <sub>6</sub> - <i>TFS1-1Y</i>	Voir texte
pET14-2Y	pET14-b, pT7-His <sub>6</sub> - <i>TFS1-2Y</i>	Voir texte
pET14-3Y	pET14-b, pT7-His <sub>6</sub> - <i>TFS1-3Y</i>	Voir texte
pEG202	2 $\mu$ , HIS3, LexA DBD, NLS	MoBiTec
pEG202T	pEG202, <i>TFS1</i>	<i>Chautard et al</i> , 2004
pEG202T $\Delta$ 2	pEG202, <i>TFS1<math>\Delta</math>2</i>	Voir texte
pEG202TP <sub>99</sub> L	pEG202, <i>TFS1(P<sub>99</sub>L)</i>	<i>Chautard et al</i> , 2004
pEG202TH <sub>111</sub> A	pEG202, <i>TFS1(H<sub>111</sub>A)</i>	<i>Chautard et al</i> , 2004
pEG202TR <sub>162</sub> A	pEG202, <i>TFS1(R<sub>162</sub>A)</i>	<i>Chautard et al</i> , 2004
pEG202TF <sub>109</sub> V	pEG202, <i>TFS1(F<sub>109</sub>V)</i>	Voir texte
pEG202TN <sub>2</sub> K	pEG202, <i>TFS1(N<sub>2</sub>K)</i>	Voir texte
pEG202TN <sub>2</sub> Q	pEG202, <i>TFS1(N<sub>2</sub>Q)</i>	Voir texte
pEG202T-1Y	pEG202, <i>TFS1-1Y</i>	Voir texte
pEG202T-2Y	pEG202, <i>TFS1-2Y</i>	Voir texte
pEG202T-3Y	pEG202, <i>TFS1-3Y</i>	Voir texte
pEG202T-4Y	pEG202, <i>TFS1-4Y</i>	Voir texte
pEG202T-BCY	pEG202, <i>TFS1-BCY</i>	Voir texte
pEG202T-CY	pEG202, <i>TFS1-CY</i>	Voir texte
pEG202Y	pEG202, <i>YLR179c</i>	<i>Chautard et al</i> , 2004

Table 3 : Liste des plasmides utilisés

Couples d'amorces	Régions d'ADN amplifiées par PCR	Protéine entière
HB38/Thyb15 Thyb16/Thyb14	Promoteur de <i>TFS1</i> Région 1 de <i>Ylr179c</i>	Tfs1-1Y
Thyb13/HB3 HB38/Thyb11 Thyb12/Thyb10	Régions A, 2, B, 3, C de Tfs1 et le t de <i>TFS1</i> Promoteur de <i>TFS1</i> et régions 1 et A de Tfs1 Région 2 de <i>Ylr179c</i>	Tfs1-2Y
Thyb9/HB3 HB38/Thyb7 Thyb8/Thyb6	Régions B, 3, C de Tfs1 et le t de <i>TFS1</i> Promoteur de <i>TFS1</i> et les régions 1, A, 2 et B de Tfs1 Région 3 de <i>Ylr179c</i>	Tfs1-3Y
Thyb5/HB3 HB38/Thyb3 Thyb4/Thyb2	Régions C et 4 de Tfs1 et le t de <i>TFS1</i> Promoteur de <i>TFS1</i> et les régions 1, A, 2, B et 3 de Tfs1 Région 4 de <i>Ylr179c</i>	Tfs1-4Y
Thyb1/HB3 HB38/Yhyb12	Terminateur de <i>TFS1</i> Promoteur de <i>TFS1</i> , les régions 1, A, et 2 de Tfs1 Et une portion la région B de <i>Ylr179c</i>	Tfs1-BCY
HB39/Yhyb11	Régions 4 et 3 de Tfs1, la région C et une portion de la Région B de <i>Ylr179c</i>	
Hb38/Yhyb8 HB39/Yhyb9	Promoteur de <i>TFS1</i> et les régions 1, A, 2 et B de Tfs1 Régions 3 et 4 de Tfs1 et la région C de <i>Ylr179c</i>	Tfs1-CY

Table 4 : Couples d'amorces utilisés pour la construction des gènes hybrides

### 2.2.2. Clonage des hybrides Tfs1p/Ylr179cp dans pET14

Pour réaliser les constructions pET14T-1Y, pET14T-2Y et pET14T-3Y, des fragments codant pour Tfs1-1Y, Tfs1-2Y et Tfs1-3Y ont été amplifiés respectivement à partir des plasmides Yep351T-1Y, Yep351T-2Y et Yep351T-3Y. Les oligonucléotides utilisés pour l'amplification sont les paires HB56/HB2 pour Tfs1-1Y et HB1/HB2 pour Tfs1-2Y et Tfs1-3Y. Après digestion par NdeI/XhoI, les fragments de PCR sont introduits dans le vecteur pET14, linéarisé avec les mêmes sites.

### 2.2.3. Clonage du fragment TBD d'Ira2p dans pESC-Flag

La séquence correspondant au domaine TBD d'Ira2p est obtenue par PCR à partir d'ADN génomique de levure en utilisant les amorces HB57 et HB58. Après digestion du vecteur pESC-flag et du fragment de PCR par le couple d'enzymes BglII/PacI, une ligation est réalisée.

### 2.2.4. Clonage dans le vecteur pEG202 (double hybride)

Chacun des hybrides ou des gènes mutés ont été insérés dans le plasmide pEG202 en phase avec le gène *LexA*. Pour cela, les couples d'oligonucléotides suivant ont été utilisés :

- HB52/HB2 pour *TFS1*, *TFS1-CY*, *TFS1-BCY*, *TFS1-2Y*, *TFS1-3Y* et *TFS1-F<sub>109</sub>V*
- HB52/HB15 pour *TFS1-4Y*
- HB44/HB2 pour *TFS1-1Y*
- HB55/HB2 pour *TFS1-N<sub>2</sub>Q*
- HB13/HB2 pour *TFS1Δ2*
- HB53/HB2 pour *TFS1N<sub>2</sub>K* ;

Les matrices utilisées sont des minipréparations d'ADN des constructions de chacun des mutants dans Yep351 et le fragment de PCR est digéré par NotI/XhoI et inséré dans le vecteur pEG202 linéarisé par ces mêmes sites.

### 2.2.5. Clonage de *TFS1ΔN<sub>2</sub>* dans pADNS

*TFS1* délété de son second codon a été amplifié par PCR avec les amorces HB59 et HB60. Puis le fragment de PCR digéré par NotI/SacII est inséré dans le vecteur pADNS linéarisé par les mêmes sites.



### 2.2.6. Clonage des mutants ponctuels de Tfs1p dans Yep351

Les mutants N<sub>2</sub>Q et F<sub>109</sub>V ont été obtenus par mutagenèse dirigée en réalisant des PCR avec les couples d'amorces HB40/HB41 pour F<sub>109</sub>V et HB46/HB47 pour N<sub>2</sub>Q. Les oligonucléotides externes utilisés sont HB3 et HB38. La séquence totale des mutants est clonée dans le vecteur Yep351 grâce aux sites SacI/PstI.

Le mutant N<sub>2</sub>K a été obtenu par mutagenèse dirigée en réalisant des PCR avec les couples d'amorces HB3/HB38 et en utilisant Yep351T comme matrice. Les sites utilisés pour insérer ce fragment sont SacI/PstI.

### 2.2.7. Clonage des PEBPs humaines dans pcDNA<sub>3</sub>-HA

#### 2.2.7.1 RKIP

La séquence du gène *RKIP* est obtenue par PCR grâce au couple d'amorces HB61 et HB62 en utilisant comme matrice de l'ADNc de fibroblaste humain (donné par J-V BARNIER). Le fragment de PCR est inséré dans le vecteur navette pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>. Après digestion par les enzymes KpnI et XbaI, le gène est inséré en phase avec l'étiquette HA dans le vecteur pcDNA<sub>3</sub>-HA ouvert grâce aux mêmes enzymes.

Le gène *RKIP* est également inséré dans le vecteur pcDNA<sub>3</sub> sans étiquette (donné par V. PILLER). Sa séquence est amplifiée par PCR avec le couple d'amorce HB67 et HB68 en utilisant comme matrice une minipréparation d'ADN pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-*RKIP*. De la même manière, une PCR amplifiant le gène *RKIP* est réalisée avec les amorces HB67 et HB69. Ce dernier oligonucléotide a la particularité d'avoir la séquence codante d'une étiquette HA en 3' insérée. Les 2 inserts et le vecteur pcDNA<sub>3</sub> sont digérés par les enzymes HindIII et XhoI pour permettre le clonage.

#### 2.2.7.2 hPEBP-2

Une amplification par PCR à partir d'ADNc de cerveau humain (donné par P. BILLUART) grâce aux amorces HB63 et HB64 est réalisée pour obtenir la séquence du gène *hPEBP-2*. Cette séquence est insérée en phase avec l'étiquette HA dans pcDNA<sub>3</sub>-HA en digérant séquentiellement le vecteur et l'insert par KpnI puis par XbaI.



### 2.2.7.3 hPEBP-4

Le gène *hPEBP-4* cloné dans le vecteur pDNR-LIB a été acheté chez Openbiosystem. Une minipréparation d'ADN de ce vecteur a été utilisée comme matrice pour amplifier la séquence du gène *PEBP-4* par PCR avec le couple d'amorces HB65 et HB66. Comme précédemment, le vecteur pcDNA<sub>3</sub>-HA et l'insert ont été digérés séquentiellement par les enzymes KpnI et XbaI.

### 2.2.8. Clonage des PEBPs humaines dans pGEX-6-P1

Les constructions pGEX-6-P1-*RKIP*, pGEX-6-P1-*PEBP2* et pGEX-6-P1-*PEBP4* contiennent les séquences des gènes *RKIP*, *PEBP2* et *PEBP4* insérées en phase en aval de l'étiquette GST.

Les séquences sont amplifiées par PCR avec les amorces identiques au clonage dans pcDNA<sub>3</sub>-HA et en utilisant comme matrice pcDNA<sub>3</sub>-HA-*RKIP*, pcDNA<sub>3</sub>-HA-*PEBP2* et pcDNA<sub>3</sub>-HA-*PEBP4*. Les fragments sont insérés dans le vecteur pGEX-6-P1 grâce à une digestion enzymatique par EcoRI et Sall.

### 2.2.9. Clonage des domaines de Nf1 dans p3X-flag

Les différents domaines SecPH, GAP-SecPH5 et GAP-SecPH7 codant pour le gène *NF1* humain sont amplifiés en utilisant la Taq Advantage® polymérase (BD Biosciences) à partir de la banque d'ADNc de poumon humain Marathon-Ready™ commercialisé par BD Biosciences.

#### 2.2.9.1 SecPH

La banque d'ADNc a été utilisée comme matrice pour amplifier la séquence correspondant au domaine SecPH de Nf1, avec le couple d'amorce HB70 et HB71.

Le fragment de PCR purifié est digéré par les enzymes de restriction NotI et XhoI et le vecteur p3X-flag est linéarisé grâce au couple d'enzymes NotI et Sall.

#### 2.2.9.2 GAP-SecPH et CTD

Les séquences de ces domaines de Nf1 sont amplifiées à partir de la même banque d'ADNc grâce aux couples d'amorces HB72/HB73 pour GAP-SecPH et HB74/HB75 pour CTD. Du fait de leur grande taille (2000pb pour GAP-SecPH et 1800pb pour CTD), les fragments de PCR obtenus sont purifiés et sous-clonés dans le vecteur navette pCR<sup>®</sup>2.1-





TOPO<sup>®</sup>. Plusieurs clones pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>- GAP-SecPH ont été envoyés à la séquence ce qui nous a permis d'identifier deux clones : GAP-SecPH5 (sans l'exon 23a, localisé dans le domaine GAP) et GAP-SecPH7 (possédant l'exon 23a).

Les inserts, une fois la séquence vérifiée, sont récupérés par digestion enzymatique par NotI et Sall et sont intégrés en phase avec l'étiquette Flag dans le vecteur p3X-flag ouvert par ces mêmes enzymes.

## **2.2.10. Clonages réalisés en vue de la mise au point du crible double hybride**

### 2.2.10.1 Contrôle positif

Chautard *et al.* ont précédemment démontré que la protéine Tfs1p était capable d'interagir avec la protéine GAP Ira2p par double hybride et par co-précipitation. Nous avons donc décidé d'utiliser cette interaction entre Tfs1p et Ira2p comme témoin positif de notre crible double hybride.

Pour cela, le domaine TBD d'Ira2p est cloné dans le vecteur pACT<sub>2</sub>. Ceci est réalisé en amplifiant la séquence correspondant à ce domaine par PCR avec les amorces HB79 et HB80, en utilisant comme matrice une minipréparation d'ADN du plasmide pJG4,5-TBD, et la Taq « Expand High Fidelity PCR System » (Roche). Le vecteur pACT<sub>2</sub> et le fragment de PCR purifié sont digérés la nuit par les enzymes EcoRI et XhoI. Après quantification à l'aide d'un nanodrop, une ligation rapide est effectuée avec le kit « Rapid DNA ligation kit » (Roche) suivie d'une transformation dans les bactéries C600 compétentes.

Ensuite, la séquence du gène *TFS1* est clonée dans le vecteur pVjL<sub>9</sub>. Ce gène étant déjà cloné dans le vecteur pEG202, des midipréparations d'ADN de pEG202-TFS1 et du vecteur pVjL<sub>9</sub> sont préparées. Les sites de restriction du site de multiclonaage de pVjL<sub>9</sub> étant tous présents dans *TFS1*, *TFS1* a été divisé en deux fragments d'ADN (BamHI/EcoRI et EcoRI/XhoI) afin d'être introduit dans pVjL<sub>9</sub> (ouvert par BamHI/Sall). Après quantification au nanodrop, une ligation rapide est effectuée grâce au kit « Rapid DNA ligation kit » (Roche) suivie d'une transformation dans les C600 compétentes.

### 2.2.10.2 Clonage des domaines de Nf1 dans pVjL<sub>9</sub>

Les séquences correspondant aux morceaux SecPH, GAP-SecPH5 et GAP-SecPH7 sont amplifiées par PCR en utilisant comme matrice une minipréparation d'ADN



p3X-flag-GAP-SecPH5 pour SecPH et GAP-SecPH5 et de p3X-flag-GAP-SecPH7 pour GAP-SecPH 7. Les amorces utilisées sont HB76 et HB77 pour les 2 fragments GAP-SecPH, et les amorces HB78 et HB77 pour SecPH. Les fragments de PCR purifiés et une midipréparation d'ADN de pVjL9 sont digérés par le couple d'enzyme SalI/PstI. Après quantification au nanodrop, une ligation rapide est effectuée suivie d'une transformation dans des C600 compétentes.

### **2.3. Test DOUBLE HYBRIDE entre les protéines hybrides de Tfs1 et le domaine TBD d'Ira2p**

Le système utilisé pour ce test double hybride dérive de celui développé par (Fields & Song, 1989). Les plasmides pEG202, pJG4-5 et pGNG et la souche EGY48 proviennent de la société MoBiTec GmbH. Toutes les étapes ont été réalisées selon les recommandations du fabricant.

### **2.4. Test DOUBLE HYBRIDE sur Nf1**

#### **2.4.1. Vérification des témoins positifs et négatifs**

Avant de commencer le crible double hybride sur la banque d'ADNc, une série de tests est effectuée afin de valider les témoins positifs et négatifs.

Les vecteurs pVjL9- SecPH, pVjL9-GAP-SecPH5, pVjL9-GAP-SecPH7 et pVjL9-TFS1 sont transformés dans les levures L40ΔGal4. Les transformants obtenus sont étalés sur milieu minimum SD-T. Parallèlement, les plasmides pACT<sub>2</sub>, pACT<sub>2</sub>-TBD (Ira2p) sont transformés dans la souche de levure Y187. Ces transformants sont étalés sur milieu SD-L.

Chacun des transformants obtenus sera repiqué une fois sur le milieu de sélection approprié.

Une colonie de chaque transformant est inoculée en culture liquide dans le milieu correspondant. Après une nuit sous agitation à 30°C, 10μl de culture liquide sont étalés sur boîte contenant le milieu minimum approprié sous forme de ligne pour une souche et de colonnes pour la seconde. Après une nuit dans l'étuve à 30°C, un croisement est réalisé sur une même boîte YPD en répliquant à l'aide de velours les lignes et colonnes. Ces croisements sont ensuite répliqués sur milieu minimum SD-T-L sur lequel tous les diploïdes doivent se multiplier et en parallèle sur SD-T-L-H sur lequel seul le témoin positif doit croître. Un léger bruit de fond peut subsister c'est-à-dire que les témoins négatifs peuvent croître légèrement.



Pour éviter ce problème, il existe une drogue, le 3-AT, qui entre en compétition avec l'histidine et qui va inhiber les faibles taux d'expression de la protéine His3 de manière à éliminer le bruit de fond sur milieu déficient en histidine. Les croisements sont donc répliqués sur le milieu SD-T-L-H + 3-AT avec différentes concentrations de 3-AT (1mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM). La concentration qui sera choisie pour réaliser le crible double hybride sera 3mM car c'est la concentration à laquelle il y a le moins de bruit de fond et où le témoin positif se multiplie correctement.

#### **2.4.2. Criblage de la banque d'ADNc par croisement (maiting)**

A partir d'une pré-culture de 10ml de la souche L40ΔGal4 pVjL9-SecPH (Nf1) en milieu liquide SD-T, inoculer une culture de 90ml à  $DO_{(600nm)} = 0.3-0.4$ . Quand la culture a atteint une DO proche de 1, le tube de 1ml contenant la souche Y187 transformées par la banque est décongelé en douceur sur un lit de glace. Un aliquot de 10μl est prélevé et mis dans la glace.

La quantité restante est transvasée dans 8ml de YPD stérile et préchauffé à 30°C. Une incubation de 10 minutes à 30°C est réalisée puis ces 8ml sont mélangés aux 90ml de L40ΔGal4 pVjL9-SecPH (Nf1). Le mélange est agité doucement à la main puis centrifugé dans des tubes stériles à 4100rpm pendant 7 minutes à température ambiante. Le culot est repris dans 5 ml de YPD stérile et préchauffé à 30°C et 1ml de la suspension est étalé par boîte YPD (15mm) préchauffé à 30°C. Le falcon sera rincé avec du YPD pour récupérer le maximum de cellules et ceci sera ré-étalé comme précédemment. Les boîtes sont incubés à 30°C pendant 4h30. Le croisement est beaucoup plus efficace sur boîte qu'en milieu liquide.

Pendant l'incubation, il faut tester la viabilité des cellules après décongélation. Pour cela, des dilutions des 10μl prélevés des cellules de la banque sont réalisés en YPD :  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ . 100μl de chacune des dilutions sera étalé sur boîte (9mm) YPD et en parallèle sur SD-L.

Après croisement sur boîte YPD, les levures sont ensuite collectées avec de l'eau stérile : mettre 2ml d'eau par boîte, racler avec un râteau et prélever à l'aide d'une pipette. Les boîtes seront rincées 2 fois pour avoir un volume total maximal de 20ml de cellules récoltées. Puis ces cellules seront étalées par fraction de 400μl sur des boîtes de 15mm contenant le milieu de sélection SD-T-L-H avec 3mM 3-AT. Les boîtes sont incubées à 30°C et l'apparition des colonies est surveillée. Dès que le diamètre dépasse 1mm, la colonie est repiquée sur SD-T-L-H. Puis elle sera repiquée sur SD-T-L-H + 3mM 3-AT. Chaque colonie sera ensuite inoculée en milieu liquide SD-T-L-H afin de réaliser un glycérol.



Un aliquot de 100µl de cellules (parmi les 20ml de cellules raclées de boîtes YPD) est utilisé pour tester l'efficacité du croisement (mating) et pour connaître le nombre total de cellules sur lesquelles le crible est réalisé. Des dilutions de cet aliquot sont réalisées à  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  et 100µl de ces dilutions sont étalés sur boîte (9mm) SD-L, SD-T, SD-L-T.

#### **2.4.3. Coloration des levures au X-Gal**

Un mélange de coloration est réalisé, comprenant 5ml de tampon Phosphate 0.5M, 4.7ml d'agar 1%, 200µl de X-Gal 2% dans le DMF et 100µl de SDS 10%. Le tampon phosphate et le SDS ont été filtrés stérilement. Ces 10ml de solution de coloration sont versés délicatement à l'aide d'une pipette sur une boîte SD-T-L-H sur lequel le clone positif a fraîchement poussé. La boîte est ensuite replacée dans l'étuve à 30°C. La coloration est surveillée après 2 heures, 12 heures puis 24 heures.

#### **2.4.4. Purification des plasmides de levure**

Les glycérols des clones positifs sont étalés sur milieu SD-T-L-H. Après 48 heures à 30°C, des cultures liquides de 15ml sont inoculées et mises sous agitation à 25°C pendant 48 heures. Les cultures sont ensuite centrifugées 10 minutes à 4100 rpm. Une fois le surnageant éliminé, les cellules sont rincées avec 1ml d'EDTA 10mM pH8, et centrifugées 10 minutes à 4100 rpm. Le culot est repris dans 600µl de tampon sorbitol (1.2M sorbitol, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1M Tris/HCl pH7.5, 35mM β-Mercaptoethanol). La paroi cellulaire est digérée en ajoutant 200 U de lyticase (Sigma) puis en incubant 30 minutes à 30°C. Les sphéroplastes sont isolés par une centrifugation de 10 minutes à 2000g. Le surnageant est éliminé et l'isolation des plasmides est réalisée en utilisant le kit standard Nucleospin® Plasmid (Macherey-Nagel) en procédant pour la première étape à l'ajout du tampon A1.

#### **2.4.5. PCR sur les plasmides de levure**

Des PCR sont réalisées en prenant 2µl de préparation de plasmide de levure comme matrice. 5 unités de Tfi DNA polymérase sont utilisées, 0.2 µM de chaque amorce HB91 et HB92, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM de dNTPs. Le programme comprend une dénaturation initiale à 94°C pendant 2 minutes, suivi de 35 cycles composés chacun d'une dénaturation de 30 secondes à 94°C, d'une hybridation d'1 minute à 56°C et d'une extension à 72°C pendant 2 minutes, enfin une extension finale de 7 minutes à 72°C.





Les produits de PCR sont analysés sur gel d'agarose 1%.

#### **2.4.6. Analyse des produits de PCR**

Les produits de PCR identifiés sur gel seront ensuite digérés par HaeIII d'une part, et par BstNI d'autre part. 7µl des produits de PCR sont digérés par 2 unités d'enzyme à 37°C pour HaeIII et à 60°C pour BstNI pendant 1 heure et demie. Les digestions sont enfin analysées sur gel d'agarose 2%. Les profils de digestions sont comparés entre eux pour identifier les clones identiques.

#### **2.4.7. Isolation des plasmides portant la cible**

Des bactéries HB101 compétentes sont achetées chez Proméga et la transformation est réalisée selon les recommandations du fabricant : 20µl de cellules compétentes sont utilisées avec 2µl de minipréparation de plasmides de levures. Les transformants sont étalés sur milieu M9-Agar (M9 1X, Agar 1.5%, MgSO<sub>4</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1mM, Glucose 0.2%, Thiamine 0.5.10<sup>-5</sup> %, Proline 4.10<sup>-3</sup>%, Glutamine 4.10<sup>-3</sup>%, Ampicilline 100 µg/ml). Les colonies obtenues sont repiquées sur milieu M9-agar et celles qui croissent sont inoculées afin d'extraire l'ADN plasmidique de la cible par minipréparation d'ADN.

#### **2.4.8. Séquençage**

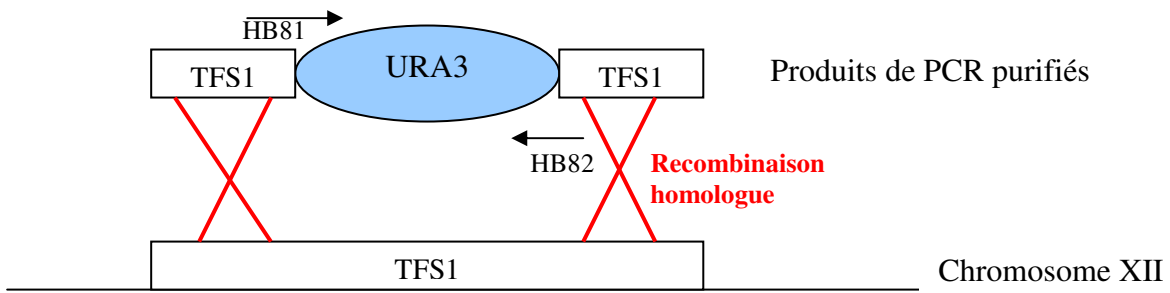
Les clones positifs non préalablement identifiés par leur profil de digestion sont envoyés sous forme de minipréparation d'ADN à la société MILLEGEN. La quantité minimale de matrice garantissant le résultat pour une réaction de séquençage correspond 1.5µg.

### ***2.5. Construction de souches de levure : intégration de mutation ponctuelle au génome***

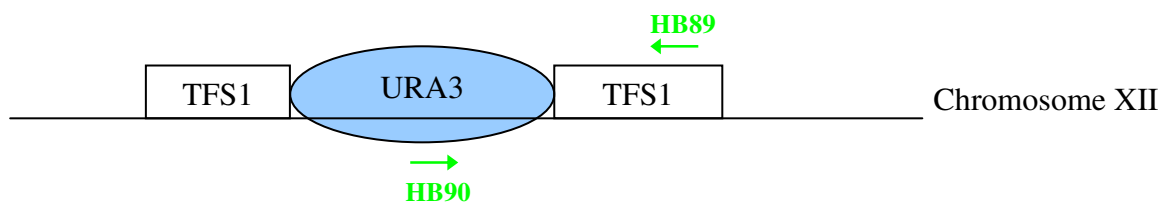
#### **2.5.1. Remplacement du gène *TFS1* par la cassette *URA3***

##### *2.5.1.1 Amplification de la cassette URA3*

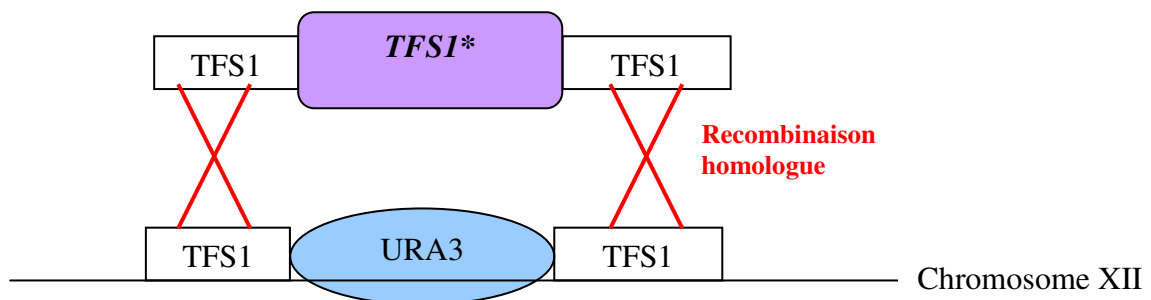
Le gène codant pour la cassette *URA3* est amplifié à partir du plasmide YDp-U grâce aux amorces HB81 et HB82 par PCR. L'enzyme utilisée est la Taq « Expand High



1. Remplacement du gène *TFS1* par la cassette *URA3*



2. Vérification des transformants par PCR puis par Western blot



3. Remplacement de la cassette *URA3* par *TFS1* muté



4. Intégration au génome du gène *TFS1* muté

**FIGURE 45 : Stratégie d'intégration d'un gène muté au génome de la levure**

Fidelity PCR System » (Roche) car elle possède une grande fidélité vis à vis de la matrice. Quatre PCR de 50µl sont réalisées et purifiées grâce au kit « Nucleospin Extract » (Macherey-Nagel) pour une intégration.

#### 2.5.1.2 Intégration de la cassette *URA3* (FIGURE 45)

Les produits de PCR purifiés sont évaporés jusqu'à atteindre un volume final de 10µl. La transformation de cet ADN linéaire est ensuite réalisée dans 100µl de levures BY4742 ou BY4742Δ*prc1* rendues compétentes en suivant le protocole décrit dans le paragraphe 2.1.3 en doublant toutes les quantités par rapport à une transformation classique de levure par de l'ADN plasmidique. Après un choc thermique de 15 minutes à 42°C, le mélange de transformation est incubé avec 400µl de milieu YPD sous agitation et à 30°C pendant 3 heures avant d'étaler ce mélange sur milieu minimum SD-Ura.

#### 2.5.1.3 Vérification des transformants

Il est nécessaire de réaliser deux tests permettant la vérification des transformants susceptibles d'être positifs, c'est-à-dire ayant intégré la cassette *URA3* en lieu et place du gène *TFS1*.

Des PCR sur colonies de levure sont réalisées en utilisant une amorce interne au gène *URA3*, HB90, et une amorce placée en amont du gène *TFS1*, HB89.

La deuxième vérification consiste à réaliser les extraits protéiques correspondants aux clones positifs identifiés par PCR sur colonies puis à effectuer un Western blot révélé avec un anticorps dirigé contre Tfs1p.

### **2.5.2. Remplacement de la cassette *URA3* par le gène *TFS1* ayant une mutation ponctuelle**

#### 2.5.2.1 Clonage du gène *TFSIN<sub>2</sub>K bis* dans Yep351T

Afin d'intégrer le gène muté *TFSIN<sub>2</sub>K* à la place du gène *URA3* dans le génome de la levure, il faut pouvoir disposer de régions homologues en amont et en aval du gène *TFSIN<sub>2</sub>K* sur Yep351TN<sub>2</sub>K et du gène *URA3* sur le chromosome. Ces régions n'étant pas présentes dans Yep351TN<sub>2</sub>K, nous avons construit un nouveau vecteur Yep351TN<sub>2</sub>K bis remplissant ce critère.



Des midipréparations de Yep351T et Yep351T N<sub>2</sub>K sont réalisées et digérées par BamHI. Après une purification sur gel d'agarose à l'aide du kit « Nucleospin Extract » (Macherey-Nagel), une seconde digestion est effectuée par MluI suivi d'une seconde purification. Le vecteur linéarisé Yep351T et l'insert *TFSIN<sub>2</sub>K* sont quantifiés sur gel d'agarose et une ligation est réalisée grâce au kit « Rapid DNA ligation kit » (Roche).

Plusieurs minipréparations d'ADN sont envoyés pour être séquencés chez MWG car seule l'analyse de la séquence pouvait nous indiquer les clones ayant bien la mutation N<sub>2</sub>K (on ne peut pas différencier Yep351T et Yep351TN<sub>2</sub>K car ils ont la même taille).

#### 2.5.2.2 Amplification des gènes *TFSI* muté

Une PCR est effectuée afin d'amplifier le gène *TFSI* ayant une mutation ponctuelle : *TFSIP<sub>99</sub>L* et *TFSIN<sub>2</sub>K*. L'amplification est réalisée à partir des plasmides Yep351T P<sub>99</sub>L ou Yep351T N<sub>2</sub>Kbis grâce aux amorces HB89 et HB91 et à la Taq « Expand High Fidelity PCR System » (Roche) . 5 PCR sont réalisées par mutants et par souches.

#### 2.5.2.3 Intégration des gènes *TFSI* muté (FIGURE 45)

Les 5 produits de PCR sont purifiés grâce au kit « Nucleospin Extract » (Macherey-Nagel) et évaporés jusqu'au volume final de 10µl. Cet ADN est transformé dans 100µl de levures BY4742ΔT(U) ou BY4742Δprc1ΔT(U) comme précédemment, en doublant les quantités par rapport à une simple transformation. Après avoir incubé le mélange dans du milieu YPD, les levures sont étalées sur un milieu minimum 5-FOA qui tuera les transformants ayant conservé la cassette *URA3*.

#### 2.5.2.4 Vérification des transformants

Des PCR de vérification sont réalisées sur l'ADN génomique extrait à partir des transformants qui ont poussé. Les amorces utilisées sont HB83 et HB84 avec la « DyNAzyme<sup>TM</sup> II DNA polymérase » (Finnzyme) qui est la Taq fonctionnant le plus efficacement sur les extraits d'ADN génomique.

Les clones positifs, détectés par PCR, sont séquencés par MWG. Les extraits protéiques sont également réalisés suivi d'une analyse par Western blot, révélé par l'anti-Tfs1p.



## **2.6. Northern blot**

### **2.6.1. Cultures**

Les souches utilisées sont la souche sauvage BY4742, la souche délétée du gène *TFS1* (BY4742 $\Delta$ T), et la souche BY4742TP<sub>99</sub>L. Les cultures de 250ml en milieu riche YPD sont placées la nuit à 26°C pour atteindre une DO<sub>600nm</sub> comprise entre 0.8 et 1. Des cultures des souches BY4742 transformées par pADNS et BY4742 $\Delta$ T transformées par pADNS-TFS1 ont également été réalisées dans 50ml de milieu SD-L à 26°C la nuit pour atteindre une DO<sub>600nm</sub> proche de 1. Le lendemain, les 50ml de culture sont transvasées dans 200ml de YPD et sont replacés à 26°C jusqu'à atteindre une DO<sub>600nm</sub> comprise entre 0.8 et 1. Une fois la DO atteinte pour chacune des souches, un choc thermique est alors réalisé à 38°C, et 25ml de culture sont prélevés toutes les 15 minutes. A chaque prélèvement, la DO<sub>600nm</sub> est notée, puis les cellules sont centrifugées à 4°C et le culot est rincé dans 1ml d'eau froide stérile avant d'être congelé dans l'azote liquide.

### **2.6.2. Extraction des ARN**

Les cellules sont resuspendues dans 400 $\mu$ l de tampon TES (Tris-HCl pH7.5 10mM, EDTA 10mM, SDS 0.5%) auxquels sont ajoutés 400 $\mu$ l de phénol acide avant la décongélation des culots afin de limiter l'action des RNases. Le mélange est vortexé deux fois 30 secondes et incubé 4 minutes à 65°C. Après 3 minutes dans la glace, le mélange est centrifugé 5 minutes à 10 000g. La phase aqueuse est alors transférée dans un tube contenant 400 $\mu$ l de chloroforme et 40 $\mu$ l d'acétate d'ammonium 3M. Après une centrifugation de 5 minutes à vitesse maximale à 4°C, la phase aqueuse est prélevée et additionnée de 1ml d'éthanol absolu froid. Une dernière centrifugation de 10 minutes à vitesse maximale à 4°C nous permet d'obtenir un culot repris dans 100 $\mu$ l d'eau DEPC.

### **2.6.3. Préparation des échantillons**

La quantité d'ARN total est dosée en prenant la DO à 260nm. 15 $\mu$ g d'ARN est mélangé avec 1.5 $\mu$ l de MOPS 10X, 5.5 $\mu$ l de formaldéhyde 37%, 15 $\mu$ l de formamide et de l'eau pour atteindre un volume final de 30 $\mu$ l. Il est ajouté 3 $\mu$ l de tampon de charge (4mg de bleu de bromophénol et 0.25g de Ficoll dans 1ml d'eau) et 1 $\mu$ l de BET (0.5 mg/ml préparé au dernier moment)





#### 2.6.4. Migration, transfert et hybridation

Les ARN sont dénaturés en chauffant les échantillons 15 minutes à 55°C et sont rapidement chargés sur un gel en conditions dénaturantes, 1% agarose/ 2% formaldéhyde en tampon MOPS 1X sans BET. La cuve de migration a été pré-traitée toute la nuit avec une solution d'eau DEPC (1/1000). Après 1 heure de migration à 100mA, le gel est incubé 15 minutes dans de l'eau DEPC, suivi de 2 bains dans du SSC 10X sous agitation.

Le transfert est réalisé sur une membrane de nylon Hybond-N (Amersham Biosciences) par capillarité toute la nuit dans du tampon SSC 10X. Le lendemain, les membranes sont rincées dans du tampon SSC 6X puis séchées pendant 2 heures à 80°C ce qui permet de fixer l'ARN aux membranes.

Les sondes sont réalisées à partir d'un produit de PCR purifié, obtenu par amplification d'ADN génomique à l'aide d'amorces (HB85/HB86 pour le gène *HSP12* et HB87/HB88 pour le gène de l'Actine *ACT1*). Le marquage est effectué par Random Priming à partir de 50ng d'ADN grâce au kit « Rediprime II random prime labelling system » (Amersham Biosciences) avec 3µl de l'[α-<sup>32</sup>P] d-CTP. La sonde est purifiée par tamisage moléculaire avec des colonnes Microspins G-50.

La préhybridation et l'hybridation se font en tampon modifié Church et Gilbert (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH7.2 0.5M, SDS 7%, BSA 1%, EDTA 1mM). La préhybridation est réalisée à 65°C en tube d'hybridation avec 20ml de tampon. L'hybridation est faite dans 7ml de tampon avec 10 à 20ng de chaque sonde. Les sondes sont dénaturées 5 minutes dans l'eau bouillante, puis refroidies 5 minutes dans la glace avant d'être placées dans la solution d'hybridation préchauffée à 65°C. Après 20 heures d'hybridation, la membrane est lavée deux fois 10 minutes à 65°C dans 25ml de tampon A (Tampon Phosphate 40mM, EDTA 1mM, BSA 0.5%, SDS 5%) puis trois lavages de 5 minutes dans un tampon B (Tampon Phosphate 40mM, EDTA 1mM, SDS 1%). La membrane est finalement séchée sur du papier 3M, avant d'être enveloppée dans du SaranWrap pour être placée en autoradiographie pendant l'après-midi.



### **3. Expériences de biochimie**

#### **3.1. Techniques classiques de biochimie**

##### **3.1.1. Préparation des extraits protéiques de levure**

Pour être analysés en Western blot, les extraits protéiques de levure sont préparés selon une méthode dérivée de celle décrite par Yaffe & Schatz (1984).

Les cellules sont cultivées jusqu'à atteindre une  $DO_{600nm}=1$ , centrifugées et resuspendues dans 500 $\mu$ l d'eau froide. Après ajout de 150 $\mu$ l d'un mélange NaOH 2M /  $\beta$ -mercaptoéthanol 8%, les cellules sont incubées 10 minutes dans la glace. On ajoute ensuite du TCA (10% final) avant une nouvelle incubation de 10 minutes dans la glace. Les échantillons sont par la suite centrifugés à 10 000g et les culots sont repris dans du tampon Laemmli 1X, 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol. Avant d'être chargés sur gel d'acrylamide, les échantillons sont chauffés 5 minutes à 95°C.

##### **3.1.2. Mise en évidence des protéines par Western blot**

L'analyse des extraits protéiques est réalisée sur gel d'acrylamide (8, 10, 12 ou 15%) en conditions dénaturantes et réductrices suivant la méthode de Laemmli (1970). Après l'électrophorèse dans du tampon de migration 1X (Tris 3g/l, Glycine 14,4g/l, SDS 1g/l), les protéines sont transférées sur une membrane soit de nitrocellulose Hybond-C extra (Amersham Biosciences) pour une révélation par colorimétrie soit sur une membrane PVDF Hybond-P (Amersham Biosciences) pour une révélation par chimioluminescence. Le transfert est réalisé dans une cuve de transfert liquide (Biorad) dans un tampon de transfert (Tris 192mM/Glycine 25mM, éthanol 20%).

Après transfert sur nitrocellulose, les protéines totales sont visualisées en incubant la membrane dans du rouge Ponceau 0.2%, 3% TCA dissous dans de l'eau.

Afin d'identifier les protéines selon leur taille, des marqueurs de poids moléculaires sont déposés sur chaque gel, le marqueur coloré Dual Color (BIO-RAD) est généralement utilisé.

###### **3.1.2.1 Révélation par colorimétrie**

La membrane est saturée dans une solution TBS-Lait écrémé 5% pendant une durée minimale d'1 heure avant d'être incubée avec différents anticorps : anti-Tfs1 ou anti-

Substrat utilisé pour la révélation	Sensibilité approximative
SuperSignal <sup>®</sup> West Dura	250 fg
SuperSignal <sup>®</sup> West Pico	1 pg
NBT/BCIP	100 pg

Table 5: Comparaison des différents substrats utilisé pour révéler un Western blot.

RKIP (lapin), anti-HA (rat, 1/2500, Roche). Les anticorps polyclonaux obtenus chez le lapin sont dilués au 1/500 (pour Tfs1) et 1/2500 (pour RKIP) en TBS–Lait écrémé 5%, les anticorps commerciaux sont utilisés selon les recommandations des fabricants.

Après 3 lavages en TBS–Lait écrémé 5%, les anticorps fixés sur la membrane sont détectés grâce à des anticorps secondaires anti-rat ou anti-lapin couplés à la phosphatase alcaline (Promega), dilués au 1/7500 dans du TBS-lait écrémé 5%. Après plusieurs lavages (1 lavage en TBS–Lait écrémé 5%, puis 2 lavages en TBS et 1 lavage dans le tampon de révélation (Tris-HCl 0.1M pH9.5, NaCl 0.1M, MgCl<sub>2</sub> 5mM)), la présence de ces anticorps est révélée grâce aux réactifs NBT et BCIP selon les conseils du fabricant (Promega).

#### 3.1.2.2 Révélation par chimioluminescence

La membrane est saturée dans une solution de TBS-T (Tween<sup>20</sup> 0.1%)- Lait écrémé 5% pendant au moins 1 heure. Les anticorps primaires sont incubées dans cette même solution: anti-RKIP (Santa Cruz, chèvre) au 1/500, anti-Nf1 (Santa Cruz, lapin) au 1/500, anti-flag (Sigma, souris) au 1/1000, anti-HA (Roche, rat) au 1/5000, anti-Tfs1 (lapin) au 1/1000.

Après incubation avec l'anticorps primaire pendant 1 heure à température ambiante ou la nuit à 4°C, 5 lavages de 5 minutes dans du TBS-T (Tween<sup>20</sup> 0.1%) sont effectués avant d'incuber la membrane avec les anticorps secondaires correspondants couplés à la peroxydase à une dilution 1/33 000 dans du TBS-T (Tween<sup>20</sup> 0.1%)- lait écrémé 5% pendant 1 heure. De nouveau, 5 lavages de 5 minutes dans du TBS-T (Tween<sup>20</sup> 0.1%) sont réalisés avant d'incuber la membrane avec le substrat en quantité équivalente de luminol et de peroxyde d'hydrogène (SuperSignal®West Dura ou West Pico, Pierce).

Le luminol est oxydé en présence de peroxydase et de peroxyde d'hydrogène pour donner un produit en état excité : le 3-aminophtalate qui émet une lumière à 425nm. La chimioluminescence est un système de détection à haute sensibilité par rapport à la révélation par colorimétrie comme le montre la table 5.

### 3.1.3. Purification des protéines

Les protéines His<sub>6</sub>-Ylr179c, His<sub>6</sub>-Tfs1-1Y, His<sub>6</sub>-Tfs1-2Y, et His<sub>6</sub>-Tfs1-3Y ont été purifiées à partir d'un lysat de cellules BL21 (DE3) transformées par les plasmides pET-14T-1Y, pET-14T-2Y, pET-14T-3Y et pET-14Y et induites pendant 2 heures par 100µM IPTG (Serre *et al.*, 2001). Le lysat a été obtenu après sonication des cellules en tampon de



lyse (tampon phosphate 50mM pH8, Tris/HCl pH8 10mM, NaCl 50mM, imidazole 5mM,  $\beta$ -mercaptoethanol 5mM) contenant des inhibiteurs de protéases (Sigma), du lysozyme (100 $\mu$ g/ml), Dnase (5 $\mu$ g/ml) et MgCl<sub>2</sub> (10mM). Après une centrifugation de 2 heures à 40000g, le lysat est incubé avec une résine d'affinité « Talon™ cobalt affinity resin » (Clontech) pendant 30 minutes à température ambiante. La résine a ensuite été lavée plusieurs fois en tampon de lyse (20 minutes) puis la protéine a été éluée grâce à 2 incubations de 20 minutes en tampon de lyse contenant 400mM d'imidazole. L'éluat est dialysé dans un tampon Tris-HCl pH7.5 25mM, NaCl 30mM,  $\beta$ -mercaptoethanol 7mM et concentré à 1mg/ml.

### **3.2. Co-immunoprécipitation**

#### **3.2.1. Co-immunoprécipitation entre le domaine TBD d'Ira2p et différentes formes de Tfs1p**

Les cellules BY4742 $\Delta$ T sont co-transformées par les plasmides pESC-Flag-TBD et Yep351 portant différentes formes de *TFS1*. Les cellules se multiplient en milieu sélectif Gal-Raf jusqu'à atteindre une DO<sub>(600nm)</sub> de 0.8, puis les extraits cellulaires sont préparés avec des billes de verre dans un tampon PBS (0.02M phosphate de sodium pH7.4, 150mM NaCl) contenant 10% de glycérol et 1% de BSA ainsi que des inhibiteurs de protéases (Roche). Tfs1p et les protéines Tfs1p-hybrides sont immunoprécipitées dans le tampon de lyse avec des billes protéines G liées covalamment à l'anticorps anti-Tfs1 (Pierce), d'après les recommandations du fabricant.

#### **3.2.2. Co-immunoprécipitation entre RKIP et Nf1**

Les protéines totales sont dosées à l'aide du kit de dosage protéique BC Assay Uptima (Interchim).

Une quantité fixe de lysat cellulaire est incubée avec des billes, à 4°C, sur une roue permettant une agitation continue, pendant un temps variable selon les billes utilisées :

##### **3.2.2.1 Billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-HA (Sigma A-2095)**

On prélève 10 $\mu$ l de billes d'agarose couplé à l'anticorps anti-HA (50% soit 5 $\mu$ l de billes pures). Après rinçage, elles sont ajoutées directement au lysat. L'incubation est réalisée pendant 2 heures à 4°C puis 3 lavages successifs sont effectués avec 500 $\mu$ l de tampon de lyse. Au dernier lavage, 10 $\mu$ l de tampon sont laissés sur les billes et 10 $\mu$ l de Laemmli 2X (100mM





Tris pH6.8, SDS 2%, glycérol 20%,  $\beta$ -Mercaptoethanol 0.25mM, bleu de bromophénol 0.01%) sont ajoutés. Le mélange Laemmli + billes est vortexé, chauffé 5 minutes à 95°C. Après une centrifugation, le surnageant est récupéré (= immunoprécipitat). Les immunoprécipitats sont analysés par western blot en déposant 5 $\mu$ l de l'éluat sur gel d'acrylamide 15% (qui seront détectés par l'anticorps anti-HA) alors que le reste de l'échantillon est chargé sur gel d'acrylamide 8% pour détecter le co-immunoprécipitat (qui sera détecté avec l'anticorps anti-flag).

#### 3.2.2.2 Billes d'agarose couplé à l'anticorps anti-flag (Sigma)

Ces billes sont conservées à 4°C diluées à 30% dans du TENET (30mM Tris HCl pH7.5, 120mM NaCl, 5mM EDTA pH8, 1% Triton X-100). 100 $\mu$ l du mélange billes-TENET sont prélevés et les billes sont rincées 2 fois avec 500 $\mu$ l de tampon de lyse. Ces billes sont mises au contact du lysat durant 2 heures à 4°C sous agitation. Après cette incubation, le surnageant est récupéré (= fraction non fixée), les billes sont lavées 3 fois avec 500 $\mu$ l de tampon de lyse. Enfin, deux types d'élution ont été testés : la première, de manière classique, en ajoutant 30 $\mu$ l de Laemmli 1X (50mM Tris pH6.8, SDS 1%, glycérol 10%, bleu de bromophénol 0.01%), le  $\beta$ -mercaptoéthanol (0.125mM) est ajouté après l'élution. Les immunoprécipitats sont analysés sur gel d'acrylamide 8% en déposant 5 $\mu$ l de l'éluat (qui seront détectés par l'anticorps anti-flag) alors que le reste de l'échantillon est déposé sur gel d'acrylamide 15% (qui seront détectés par l'anticorps anti-HA ou l'anticorps dirigé contre RKIP) pour voir s'il y a co-immunoprécipitation.

La seconde élution est de type compétitive grâce au peptide Flag (Sigma) qui fera compétition avec l'anticorps couplé aux billes. Pour cette dernière élution, après les lavages, on ajoute 60 $\mu$ l de peptide flag (2mg/ml) sur les billes et le mélange est incubé 30 minutes dans la glace. Puis le surnageant est récupéré et 20 $\mu$ l de Laemmli 4X (200mM Tris pH6.8, SDS 4%, glycérol 40%,  $\beta$ -Mercaptoethanol 0.5mM, bleu de bromophénol 0.02%) sont additionnés pour constituer l'éluat. De la même manière que précédemment, les immunoprécipitats sont analysés sur gel d'acrylamide 8% en déposant 5 $\mu$ l de l'éluat alors que le reste de l'échantillon est déposé sur gel d'acrylamide 15% pour voir s'il y a co-immunoprécipitation.



### 3.2.2.3 Billes d'agarose protéine A conjuguées à des Ig-G de lapin puis billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-NF1 (Santa Cruz)

Ces deux types de billes sont incubés la nuit à 4°C dans du TENET. 40µl de mélange billes/TENET sont utilisés par expérience (ce qui correspond à 10µl de billes sèches). Avant d'être utilisées, elles sont lavées avec le tampon de lyse utilisé pour lyser les cellules. Le lysat est incubé une première fois avec les billes d'agarose conjugué à des Ig-G de lapin pendant 30 minutes à 2 heures à 4°C. Cette première incubation a pour objectif de réduire les interactions non spécifiques. Puis le surnageant est récupéré et incubé avec les billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-Nf1 pendant 3 heures à 4°C. Le surnageant récupéré correspondant de nouveau à la fraction non fixée. Les billes sont rincées au moins 3 fois avec 500µl de tampon de lyse en incubant le mélange billes + tampon de lyse 10 minutes dans la glace avant d'être centrifugé, ceci vise à réduire le bruit de fond.

L'élution est réalisée en ajoutant 30µl de Laemmli 1X ((50mM Tris pH6.8, SDS 1%, glycérol 10%, bleu de bromophénol 0.01%, β-mercaptoéthanol 0.125mM) sur les billes. Le mélange est chauffé 5 minutes à 95°C avant de récupérer le surnageant.

5 µl de l'élution seront analysées pour vérifier si l'immunoprécipitation a fonctionné et le reste de l'éluat sera analysé pour voir s'il y a co-immunoprécipitation.

## **3.2. Tests fonctionnels démontrant l'inhibition d'Ira2p par Tfs1p**

### **3.3.1. Tests de choc thermique**

Les tests de choc thermique sont réalisés sur la souche BY4742ΔT transformée par Yep351, Yep351T, Yep351TN<sub>2</sub>K, Yep351TP<sub>99</sub>L, Yep351TF<sub>109</sub>V, Yep351T-1Y, Yep351T-2Y, Yep351T-3Y, Yep351T-4Y, Yep351T-CY, ou par Yep351T-BCY. Des pré-cultures sont effectuées et on inocule des cultures de 3ml en milieu SD-L pour avoir une DO<sub>600nm</sub> proche de 2 le lendemain. Les cultures sont ensuite diluées et calibrées dans du milieu riche YPD à DO<sub>600nm</sub> = 2 avant d'être pré-traitées 20 minutes à 37°C (pour induire la surproduction de Tfs1p) et incubées à 52°C pendant différents temps (0, 20, 25 minutes). Après ce choc thermique, les cultures sont diluées en série (de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-4</sup>) et étalées sur des boîtes YPD.



### 3.3.2. Test du phénotype suppresseur de la mutation *cdc25-1*

La souche LRB27 est transformée par Yep351, Yep351T, Yep351TN<sub>2</sub>Q, Yep351TN<sub>2</sub>K, Yep351TF<sub>109</sub>V, Yep351T-1Y, Yep351T-2Y, Yep351T-3Y, Yep351T-4Y, Yep351T-CY, Yep351T-BCY. La transformation est réalisée selon le protocole classique décrit dans le paragraphe 2.1.3 à l'exception faite que le mélange de transformation est incubé 30 minutes à 25°C (au lieu de 30°C, puisqu'il s'agit d'une souche thermosensible) et le choc thermique à 42°C est réduit à 15 minutes. Les cellules sont étalées sur milieu minimum SD-Leu et incubées à 25°C.

Chaque transformant est ensemencé en culture liquide puis étalé sur une boîte de milieu minimum SD-Leu à 25°C et en parallèle sur une boîte YPD à 37°C.

### 3.4. Mesure de l'activité CPY

L'activité de la Carboxypeptidase Y (CPY) a été déterminée par Caesar et Blomberg (Université de Göteborg, Suède). Tout d'abord, les extraits protéiques totaux des souches BY4742 $\Delta$ prc1 $\Delta$ T ou BY4742 $\Delta$ T transformées par Yep351 portant différentes formes de *TFS1* (TFS1, TFS1-1Y, TFS1-2Y, TFS1-3Y, TFS1-4Y, TFS1-CY, TFS1BCY, TFS1N<sub>2</sub>K, TFS1P<sub>99</sub>L, TFS1H<sub>111</sub>A, TFS1F<sub>109</sub>V, TFS1R<sub>162</sub>A) ont été préparés.

Les quantités de la protéine Tfs1 et des protéines Tfs1 mutantes (TFS1, TFS1-1Y, TFS1-2Y, TFS1-3Y, TFS1-4Y, TFS1-CY, TFS1BCY) dans les extraits protéiques sont quantifiées grâce à une analyse sur gel SDS- PAGE 2D et la concentration en protéines totales est déterminée en utilisant le kit de détermination Bio Rad.

Pour les mutants ponctuels de Tfs1p (TFS1N<sub>2</sub>K, TFS1P<sub>99</sub>L, TFS1H<sub>111</sub>A, TFS1F<sub>109</sub>V, TFS1R<sub>162</sub>A) la quantité de protéine a été comparée sur gel 1D par rapport à l'actine.

L'activité de la CPY est déterminée en mesurant l'hydrolyse d'un peptide : le N-(3-[2-furyl]acryloyl)-Phe-Phe (FA-Phe-Phe, Sigma). L'hydrolyse du substrat conduit à une diminution de l'absorption qui est continuellement mesurée à 25°C à 337nm. Différentes quantités des extraits protéiques sont incubées avec une quantité fixe de CPY purifiée commerciale (Sigma, 21943) en présence du peptide FA-Phe-Phe. L'activité de la CPY a été mesurée 3 fois et le rapport Tfs1/CPY est calculé afin de tracer la courbe.

Stress	Concentrations	Effet cellulaire
KCl	2, 1.45 M	Toxicité des ions potassium et chlore
NaCl	1.25, 0.85 M	Toxicité des ions sodium chlore
LiCl	0.225, 0.15 M	Toxicité de l'ion lithium
CdCl <sub>2</sub>	0.15, 0.1 mM	Toxicité de l'ion cadmium
CuCl <sub>2</sub>	0.75, 0.375 mM	Toxicité de l'ion cuivre
NiCl <sub>2</sub>	0.75, 0.375 mM	Toxicité de l'ion nickel
NaAsO <sub>2</sub>	5, 3.5 mM	Toxicité de l'arsenite
CoCl <sub>2</sub>	0.015, 0.01 mM	Toxicité de l'ion cobalt
Ethanol	10, 7, 5%	Stress par l'éthanol
pH acide	pH 2, 3.5	Stress par le pH acide
Superoxyde/Paraquat	400, 250µg/ml	Stress oxydatif causé par la production de superoxyde
Galactose	2%	Galactose comme source de carbone
Mannose	2%	Mannose comme source de carbone
Fructose	2%	Fructose comme source de carbone
Sucrose	2%	Sucrose comme source de carbone
Raffinose	2%	Raffinose comme source de carbone
Mélibiose	2%	Mélibiose comme source de carbone
Arabinose	2%	Arabinose comme source de carbone
Ethanol	2%	Ethanol comme source de carbone
Glycérol	2%	Glycérol comme source de carbone
Glucose (faible)	0.5%	Faible concentration de glucose
Glucose (élevé)	16%	Concentration élevée de glucose
MMS	0.01, 0.005%	Méthylation de l'ADN
Hydroxyurée	15, 10 mg/ml	Inhibition de <i>RNR4</i> (ribonucléotide réductase)
Cisplatine	0.15, 0.1 mg/ml	Pontage de l'ADN
Caféine	2.25, 1.5 mg/ml	Inhibition des phosphodiésterases <i>PDE1/2</i>
Tunicamycine	1.5, 1 µg/ml	Inhibition de la glycosylation <i>ALG7</i>
Rapamycine	1, 0.5 µg/ml	Inhibition de <i>TOR1/2</i>
Cycloheximide	0.1, 0.05 µg/ml	Inhibition de la traduction
Paramomycine	15, 10 µg/ml	Inhibition de la traduction
2, 4 Dinitrophénol (DNP)	0.2 mg/ml	phosphorylation oxydative

Table 6 : Conditions environnementales utilisées pour les tests systématiques phénotypiques à grande échelle

### **3.5. Etudes systématiques de phénotypes mutants**

#### **3.5.1. Microculture par automatisation**

Ces études sont réalisées par Caesar et Blomberg (Université de Göteborg, Suède). Les souches de levure sont cultivées en microculture de 350µl pendant 48 heures dans l'appareil Bioscreen analyser C (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) (Warringer & Blomberg, 2003). L'étude est réalisée en duplicat avec 8 souches sauvages comme contrôle interne pour chaque condition.

Différents inhibiteurs provenant de chez Sigma Aldrich sont testés, les concentrations sont ajustées pour avoir une réduction de 15 à 150% du taux de croissance de la souche sauvage. Pour les tests systématiques phénotypiques à grande échelle des souches  $\Delta prc1$  et  $\Delta ira2$  et des souches où les mutations ponctuelles (Tfs1P<sub>99</sub>L et Tfs1N<sub>2</sub>K) sont intégrées au chromosome dans un contexte BY4742 et BY4742 $\Delta prc1$ , les conditions environnementales sont répertoriées dans la table 6.

Pour les tests systématiques phénotypiques à petite échelle des souches  $\Delta tfs1$  surproduisant Tfs1p native ou les différents mutants de Tfs1p (TFS1N<sub>2</sub>K, TFS1R<sub>162</sub>A), les conditions testées sont les suivantes : NaCl 0.85mM et 1M, 6-auracil 200µg/ml et 300µg/ml, diamide 1.4mM et 1.7 mM, DTT 2.1mM, Hydroxyurée 8mg/ml, MnCl<sub>2</sub> 20mM, LiCl 150mM, Phénanthroline 2µM, Bromide d'éthidium 45µg/ml et 90µg/ml, Myriocine 2µg/ml et 3µg/ml, Cafféine 1mg/ml, Paraquat 300µg/ml et 600µg/ml, 2,3 butadione monoxine 15mM et 25mM, 4-nitroquinolone (4NQO) 0.24µg/ml et 0.34µg/ml, EDTA 22mM et 45mM ou DMSO 3% (v/v).

#### **3.5.2. Calculs des taux de croissance**

Pour quantifier le comportement de chaque souche par rapport à la souche de référence, le coefficient logarithmique *LSC* est calculé. La valeur du *LSC* décrit la croissance de chaque mutant par rapport à la souche sauvage, les valeurs négatives indiquent une diminution de la croissance.

Le *LSC* est calculé en soustrayant la valeur logarithmique de la variable correspondant au taux de croissance de la souche à caractériser de la valeur logarithmique de la variable correspondant à la vitesse de croissance de la souche sauvage. D'autres variables, autre que la vitesse de croissance, sont analysées : le temps de latence et l'efficacité de croissance.





Le *LPI*, index phénotypique logarithmique, décrit la sensibilité de chaque souche à un inhibiteur spécifique par rapport à la réponse de cet inhibiteur dans un contexte sauvage tel que :

$$LPI\ i = LSC_{i, \text{inhibiteur}} - LSC_{i, \text{basal}}$$

Cet indice normalise les défauts de croissance général en milieu basal.

### **3.6. Dichroïsme circulaire**

Les protéines étiquetées 6-Histidines ont été produites et purifiées à partir d'*E.coli* comme précédemment décrit. Elles sont concentrées à 0.3mg/ml dans un tampon phosphate de potassium 10mM, pH8. Les mesures de dichroïsme circulaire sont réalisées sur le spectropolarimètre Jasco-J-810 CD, dans une gamme de longueur d'onde comprise entre 185 et 260nm, prises dans une cuve en quartz de 1mm à 5°C. Chaque spectre correspond à la moyenne de 5 mesures consécutives et tous les spectres sont corrigés en soustrayant la valeur de ligne de base du tampon.



## 4. CULTURE CELLULAIRE

### 4.1. Lignées cellulaires utilisées

Tout d'abord, les cellules COS-7 ont été cultivées dans des flasques en milieu DMEM supplémenté avec du sérum de veau fœtal (10%), de la pénicilline (100U/ml), de la streptomycine (100µg/ml) et de la L-Glutamine (2mM).

Les cultures d'astrocytes ont été effectuées dans le laboratoire de Neurobiologie de Tobias HEVOR (Université d'Orléans). Trois lignées cellulaires ont été cultivées : 2 lignées cellulaires de gliome humains, U87MG et CCF, et 1 lignée cellulaire de gliome de rat, C6.

Des cultures primaires d'astrocytes normaux de rat ont été réalisées en accouplant des rats et en prélevant les cellules *in vivo* sur les nouveaux-nés.

Toutes les cultures d'astrocytes sont réalisées dans des boîtes de pétri en milieu DMEM (Sigma) supplémenté avec du sérum de veau fœtal (10%, BioWest), de la pénicilline (100U/ml, Eurobio), de la streptomycine (100µg/ml, Eurobio) et de la L-Glutamine (2mM, Eurobio).

Tous ces types cellulaires se multiplient dans des incubateurs à 37°C sous atmosphère humide, à 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.2. Electroporation

Les transfections ou co-transfections par électroporation sont réalisées sur les cellules COS-7 avec 5µg de chaque minipréparation d'ADN dans 4.10<sup>6</sup> cellules COS-7.

Le milieu des cellules est aspiré et est remplacé par du D-PBS afin d'ôter les résidus de milieu qui inhiberaient l'action de la trypsine. Après avoir retiré le PBS, 1.5ml de Trypsine/EDTA 1X (Sigma) est ajouté sur les cellules afin de les décoller. La trypsine agira environ 4 minutes puis son action est stoppée par l'ajout de 10ml de milieu DMEM complet. Les cellules sont ainsi récoltées et un aliquot de cellules est prélevé pour les compter grâce à une cellule de Mallassez. Les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 800 tours. Le culot cellulaire est repris dans du milieu de façon à avoir 4 millions de cellules dans 400µl de milieu. Ensuite, 5µg de chaque plasmide et 400µl de cellules sont placés dans une cuve à électroporation. L'électroporateur (Biorad) est réglé sur 200V et 950µF. Après électroporation, le contenu de



la cuve est replacé dans une flasque contenant 12ml de milieu, qui est incubée à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> pendant 48 heures.

### **4.3. Activation par le TPA**

Les cellules COS-7 sont privées de sérum en les plaçant dans du milieu DMEM supplémenté avec de la BSA (0.5%), pénicilline (100U/ml), streptomycine (100µg/ml) et L-Glutamine (2mM). Environ 16 heures après cette privation, le TPA (800nM, Sigma) est ajouté au milieu pendant 30 minutes à 37°C, temps nécessaire pour que la PKC phosphoryle RKIP (Corbit *et al.*, 2003).

Les astrocytes sont mis en carence en les mettant dans un milieu DMEM supplémenté avec 0.5% de sérum de veau fœtal, pénicilline (100U/ml), streptomycine (100µg/ml) et L-Glutamine (2mM). Environ 16 heures après cette privation, le TPA (800nM, Sigma) est ajouté au milieu pendant 5 minutes à 37°C, temps nécessaire pour que la PKC phosphoryle Nf1 (Mangoura *et al.*, 2005).

### **4.4. Lyse des cellules**

#### **4.4.1. Lyse en présence de détergent**

La lyse est effectuée sur la glace. Le milieu est enlevé des boîtes et les cellules sont rincées 2 fois avec 5ml de PBS 1X froid. Les cellules sont lysées dans le tampon de lyse 1X (Tris-HCl pH7.5 50mM, Triton X-100 1%, NaCl 100mM, NaF 50mM, EDTA 5mM, Aprotinine 10µg/ml, Pyrophosphate de Sodium 10mM) auquel on ajoute un cocktail d'inhibiteur de protéases et de phosphatases (Benzamidine 1mM, CLAP [Chymostatine, Leupeptine, Antipapaïne, Pepstatine A] 1µg/ml, Pefabloc 1mM, Orthovanadate 1mM, PNPP 20mM, β-glycérophosphate 20mM, acide okadaïque 50ng/ml). Les boîtes sont incubées 15 minutes à 4°C avec une agitation manuelle. Les cellules sont détachées à l'aide de grattoirs, le lysat est récolté dans des microtubes puis mélangé à l'aide d'un vortex. Le lysat est finalement centrifugé 15 minutes à 22 000g à 4°C. Le surnageant est récupéré.

La lyse peut être réalisée dans les mêmes conditions en diminuant la quantité de détergent, Triton X-100 0.1%, ou en utilisant des détergents plus doux comme la digitonine (1% ou 0.1%).



#### **4.4.2. Lyse sans détergent**

La sonication est un moyen de lyser les cellules sans l'utilisation de détergent. Les cellules sont récoltées à l'aide de grattoirs dans du PBS 1X contenant le cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases décrit que pour la lyse avec détergent. Les cellules sont récupérées dans des microtubes puis elles sont soniquées 2 fois 10 secondes ou 2 fois 5 secondes, à Puissance 7 et à 50% du cycle actif.

Un essai de lyse a été réalisé avec des billes de verre (0.5mm, Biospec products, Inc). Les cellules sont récoltées comme précédemment puis un volume de bille pour un volume de lysat est ajouté et le lysat est agité à l'aide d'un vortex pendant 3 minutes 30.

Enfin, après ces deux types de lyse, le lysat est centrifugé 10 minutes à 4°C à 10 000g, et le surnageant est récupéré.





# *RESULTATS*

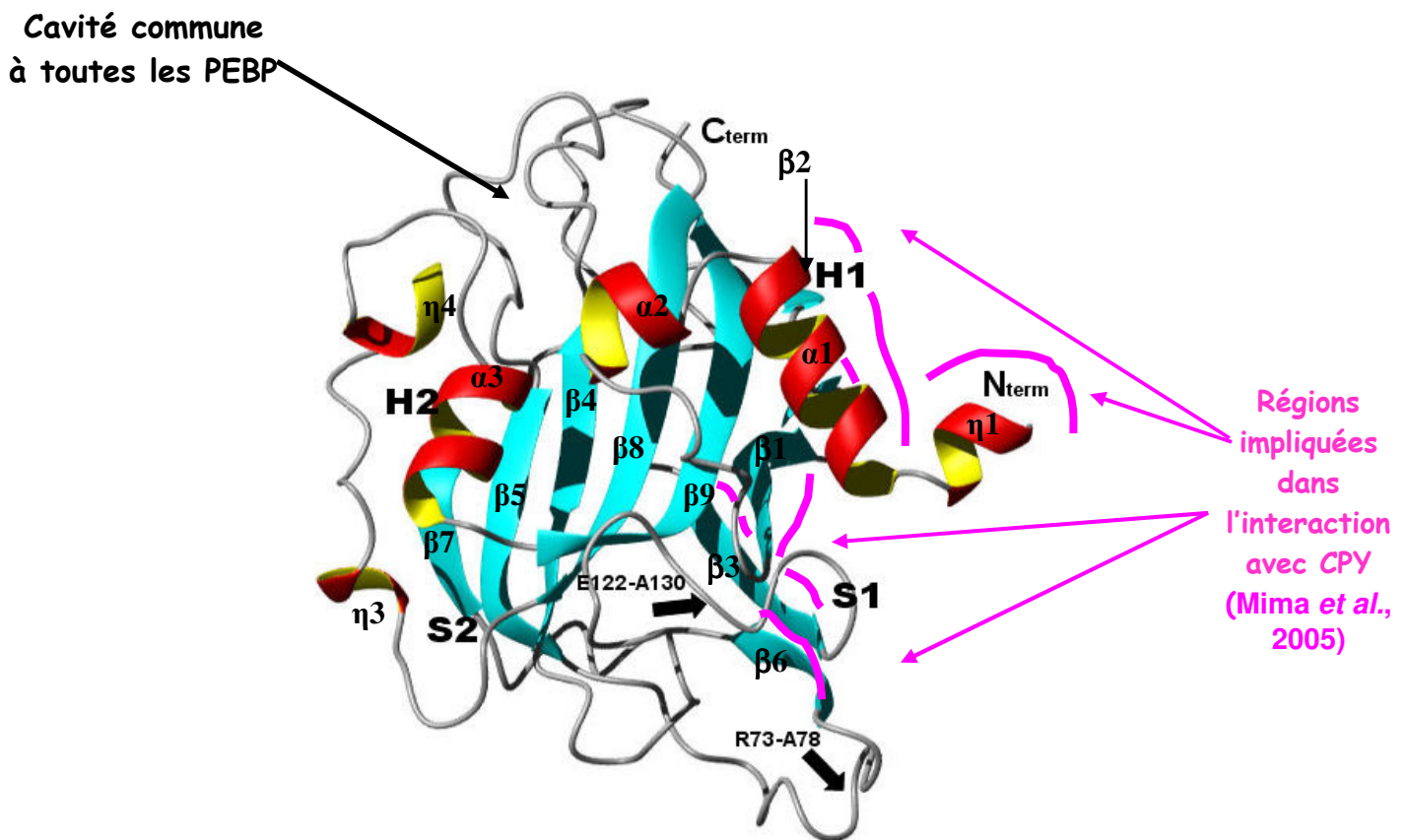


Ce travail de thèse a consisté à essayer de préciser les bases moléculaires de la Neurofibromatose de type 1 et d'obtenir des informations sur la régulation des activités de la protéine à l'origine de la maladie. De nombreuses questions restent actuellement sans réponses à propos de Nf1 et de la neurofibromatose : a/ la maladie présente une variabilité extrême de ses manifestations phénotypiques et une mutation donnée de *NF1* est responsable d'une variété complexe de symptômes cliniques suivant les patients. Il semble donc que des gènes modificateurs existent et certains d'entre eux pourraient être impliqués dans différentes fonctions de Nf1 ou intervenir dans sa régulation. b/ Le domaine GRD représente 10% seulement de la protéine Nf1, d'autres régions de la protéine sont vraisemblablement importantes. c/ Bien que la plupart des interactions entre Nf1 et ses partenaires implique le domaine GRD, des partenaires d'autres domaines de Nf1 doivent exister et devraient être recherchés. Actuellement, les principales études développées sur la neurofibromatose sont des caractérisations génétiques et phénotypiques conduites par des médecins et des physiologistes. Des études protéomiques et transcriptomiques sont aussi menées sur des cohortes de patients afin de mettre en évidence les gènes modificateurs associés aux tumeurs malignes et aux différentes formes de la maladie.

L'étude des bases moléculaires de la neurofibromatose et de la régulation des activités de la neurofibromine a été initiée par deux biais : l'un repose sur les données obtenues chez un organisme eucaryote modèle, la levure *S.cerevisiae*. L'autre repose sur des études menées sur des cellules de mammifères en culture et la protéine Nf1 humaine.

Les études menées sur la levure ont ciblés l'homologue de Nf1, la protéine Ira2p, et plus précisément la compréhension des bases moléculaires de l'interaction entre Ira2p et un nouvel inhibiteur de son activité, Tfs1p, ainsi que le rôle physiologique de cet inhibiteur dans les levures.

Les études conduites sur les cellules de mammifères ont consisté à tester si Nf1 était aussi régulé par l'homologue de Tfs1p et à mettre en évidence de nouveaux partenaires de la protéine Nf1 par l'intermédiaire d'un crible double hybride.



**FIGURE 46 : Régions importantes de Tfs1p dans l'interaction avec CPY**

Les feuillets  $\beta$  sont représentés en bleu et les hélices en rouge et jaune. La flèche noire indique la localisation de la cavité conservée des PEBPs ; les flèches et les traits roses indiquent les régions de Tfs1p impliquées dans l'interaction Tfs1p/CPY. Les extrémités N et C-terminales sont respectivement annotées Nterm et Cterm. Les hélices ( $\eta 1$  à 4 et  $\alpha 1$  à 3) et les feuillets ( $\beta 1$  à 9) sont indiqués.

## 1. Caractérisation de l'interaction Tfs1p/Ira2p

Chautard *et al.* (2004) ont mis en évidence que la protéine Tfs1p, PEBP de levure, interagit et inhibe la protéine GAP Ira2p. L'interaction a été démontrée par le système double hybride puis validée par des expériences de co-précipitation. L'activité inhibitrice de Tfs1p sur l'activité GAP d'Ira2p a été démontrée de manière indirecte *in vivo*, en testant dans un premier temps l'effet suppresseur de la surproduction de Tfs1p sur la mutation *cdc25-1* thermosensible (Cdc25p étant l'antagoniste d'Ira2p). D'autre part, il a été montré que la surproduction de Tfs1p augmentait la sensibilité au stress des cellules, résultat probable de l'activation de la voie Ras/AMPC/PKA.

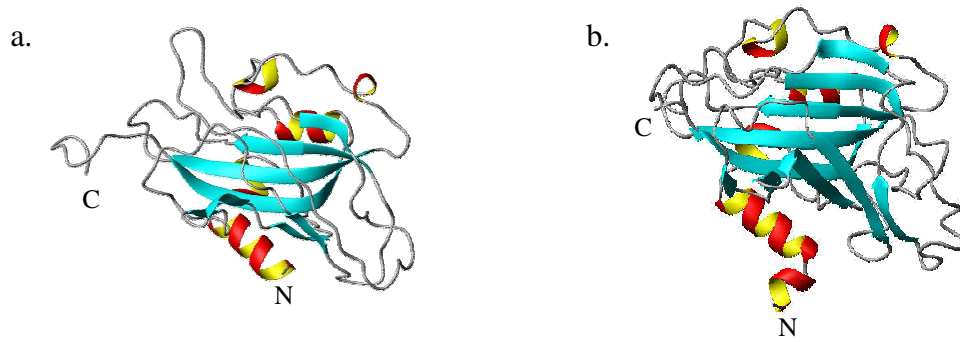
La région d'interaction d'Ira2p avec Tfs1p a été précisée par double hybride : il s'agit du domaine TBD (Tfs1p Binding Domain). Par contre, la ou les régions de Tfs1p intervenant dans cette interaction n'étaient pas encore connues. Nous avons voulu les caractériser.

### 1.1. Base de l'étude

La protéine Tfs1p appartient à la famille des PEBP. Chez la levure *S.cerevisiae*, il existe deux PEBP : Tfs1p et Ylr179cp. L'alignement des séquences (FIGURE 37) révèle 39% d'identité entre les deux protéines. Cependant, Ylr179cp n'interagit pas et n'inhibe pas Ira2p. Cet alignement montre que les structures secondaires prédites de Ylr179cp s'alignent avec celle de Tfs1p.

Tfs1p, en plus d'interagir et d'inhiber Ira2p, est un inhibiteur de la carboxypeptidase Y (CPY) (Bruun *et al.*, 1998). Récemment, la structure 3D de Tfs1p en complexe avec CPY a été résolue (Mima *et al.*, 2005) et a permis de mettre en évidence les zones de Tfs1p importantes dans son interaction avec CPY (FIGURE 46). Deux sites de liaison de Tfs1p caractéristiques ont pu être identifiés : les 7 résidus N-terminaux (site primaire de liaison à CPY) ainsi que les résidus localisés dans l'hélice  $\alpha 1$  et dans les 4 brins  $\beta$  :  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 6$  (site secondaire de liaison à CPY).

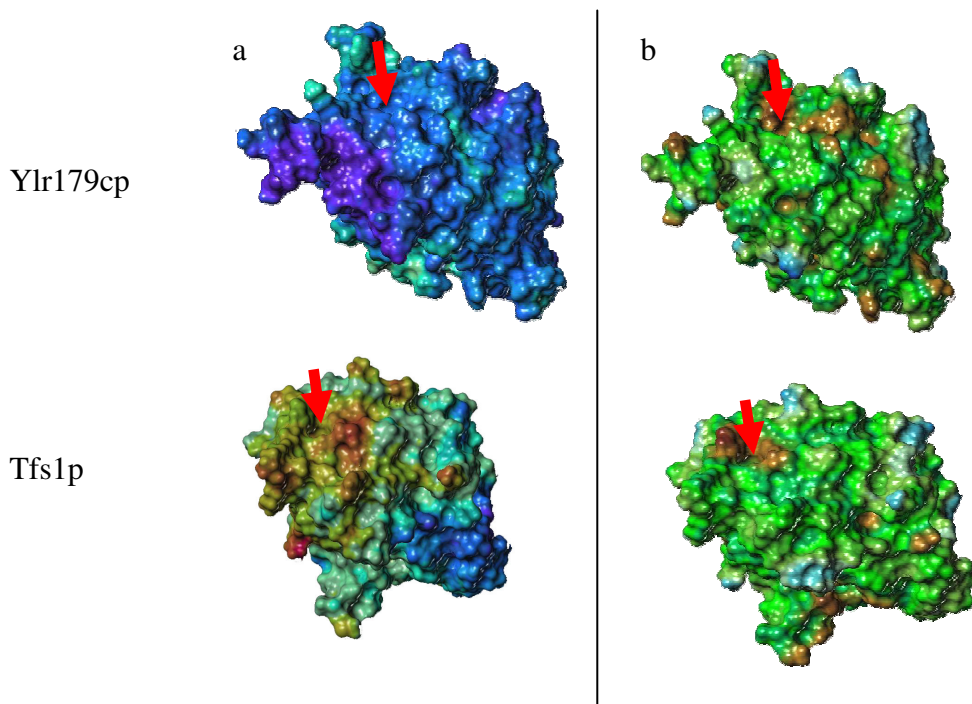
Il nous a paru intéressant de modéliser Ylr179cp car Tfs1p interagit avec Ira2p mais pas Ylr179cp. Ainsi, si on trouve des régions accessibles de Tfs1p aux propriétés



**FIGURE 47 : Représentation MOLMOL du repliement global de Ylr179cp et de Tfs1p**

- a. Ylr179cp
- b. Tfs1p

Les feuillets  $\beta$  sont représentés en bleu et les hélices en rouge et jaune.  
N indique l'extrémité N-Terminale et C, l'extrémité C-Terminale.



**FIGURE 48 : Caractérisation des propriétés de surface de Ylr179cp et Tfs1p**

- a. Potentiel électrostatique des protéines Ylr179cp et Tfs1p

La surface est colorée avec un potentiel électrostatique croissant, allant du bleu ( $-100 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) au rouge ( $+300 \text{ kcal mol}^{-1}$ ).

- b. Hydrophobicité des protéines Ylr179cp et Tfs1p

La surface est colorée selon une hydrophobicité croissante, du bleu ( $-0.2$  unités arbitraires) au marron ( $+0.1$  ua).

La cavité de surface est indiquée par une flèche rouge.

différentes des régions correspondantes de Ylr179cp, alors, elles pourraient être impliquées dans l'interaction Tfs1p/Ira2p.

## **1.2. Modélisation de la structure de Ylr179cp**

Les expériences de modélisation ont été réalisées par l'équipe de Françoise Vovelle (CBM, Orléans). La structure 3D de Ylr179cp a été construite avec le programme MODELLER. Une représentation MOLMOL de l'architecture globale de la protéine est représentée sur la figure 47. La région C-terminale du modèle de Ylr179cp est déstructurée et sort de la structure générale de la protéine car elle n'a pu être modélisée. En effet, cette région ne s'aligne pas avec le domaine C-terminal de Tfs1p.

Un diagramme de Ramachandran a été tracé et il montre d'excellents résultats puisque plus de 90% des résidus sont situés dans des zones favorables et qu'aucun résidu n'est dans la zone prohibée (données non montrées).

Si l'on compare les repliements des deux protéines, on remarque qu'ils sont très similaires. Les hélices  $\alpha$  sont bien conservées et la relation entre le modèle de la structure secondaire et les prédictions de PSIREN est correcte. L'hélice  $\eta_1$  et le brin  $\beta_7$  de Tfs1p correspondent à des zones délétées de la protéine Ylr179cp et sont donc absents de cette protéine. Certains brins ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , et  $\beta_3$ ) sont plus courts dans le modèle Ylr179cp que pour Tfs1p et le brin  $\beta_6$ , prédit par PSIREN, n'est pas formé dans Ylr179cp.

Un point commun entre les protéines est de la cavité de surface, caractéristique de la famille des PEBPs. Cette cavité est signalée par une flèche rouge sur la figure 47. Au niveau de la séquence, les résidus de la cavité sont bien conservés entre les deux protéines. D'après le modèle de la structure, le site de liaison est également bien conservé par rapport aux autres PEBP dont la structure est connue même si sa taille peut varier d'un modèle à l'autre selon l'orientation des chaînes.

Cependant, les propriétés de surface sont très différentes entre les deux protéines : Tfs1p a une large zone électropositive alors que cette zone devient totalement négative pour Ylr179cp (FIGURE 48a). De plus, une zone hydrophobe autour de la cavité caractérise Tfs1p alors qu'elle disparaît en partie dans Ylr179cp (FIGURE 48b).

Les deux régions importantes dans l'interaction Tfs1p/CPY sont caractérisées par les 7 résidus N-terminaux (site primaire de liaison) et les résidus situés dans l'hélice  $\alpha_1$  et dans 4





brins  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  et  $\beta_6$  ; site secondaire de liaison). Les propriétés électrostatiques et hydrophobes sont globalement préservées pour Ylr179cp dans la 2<sup>ème</sup> zone de liaison. Mais les 7 résidus N-terminaux de Tfs1p sont délétés de Ylr179cp. De plus, certains résidus du site secondaire de liaison sont remplacés par des résidus aux propriétés physiques différentes tels que H18/E12 ou I35/E29. De telles modifications de séquences au niveau de ce site sont responsables de l'absence d'interaction entre Ylr179cp et CPY.

L'ensemble de ces différences entre Tfs1p et Ylr179cp au niveau des propriétés de surface et du domaine N-terminal peut aussi expliquer l'absence d'interaction entre Ylr179cp et Ira2p. Cette modélisation de Ylr179cp va être utile pour réaliser une série de constructions de protéines « hybrides » en échangeant des régions de Tfs1p avec celles de Ylr179cp.

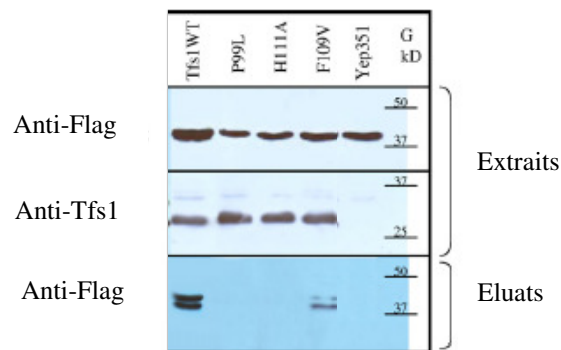
### **1.3. Détermination des régions importantes de Tfs1p dans l'interaction Tfs1p/Ira2p**

#### **1.3.1. Importance de la cavité de surface**

Tous les membres de la famille des PEBP sont caractérisés par la présence d'une cavité de surface conservée à travers l'évolution qui permet la fixation de ligands chargés négativement tels l'ion sulfate pour Tfs1p ou l'ion acétate pour RKIP. Nous avons donc regardé si cette cavité pouvait être impliquée dans l'interaction Tfs1p/Ira2p.

##### 1.3.1.1. Les mutants ponctuels de la cavité

La cavité de surface de Tfs1p (FIGURE 46 ; désignée par une flèche rouge sur la FIGURE 48) comprend les résidus D<sub>95</sub>, A<sub>98</sub>, P<sub>99</sub>, F<sub>109</sub> et H<sub>111</sub> de la grande boucle entre les brins  $\beta_4$  et  $\beta_5$ , et les résidus M<sub>150</sub>, A<sub>153</sub>, P<sub>154</sub>, P<sub>155</sub>, H<sub>161</sub> et Y<sub>163</sub> de la boucle située entre les brins  $\beta_7$  et  $\beta_8$ . Cette petite cavité et les résidus l'entourant délimitent une région à la surface de la molécule hautement cationique. La surface de Tfs1p est globalement positive, seule une zone est électro-négative à l'opposé de la cavité résultant de l'accumulation de résidus chargés négativement : D<sub>85</sub>, D<sub>86</sub>, D<sub>87</sub>, E<sub>122</sub>, E<sub>126</sub> et D<sub>175</sub>. La région de fixation des ligands se caractérise également par une hydrophobie alors que le reste de la surface protéique est davantage hydrophile.



**FIGURE 49 : Expériences de co-immunoprécipitation entre le domaine TBD d'Ira2p et les mutants de Tfs1p**

Les extraits de cellules BY4742 $\Delta$ T co-transformées par pESC-TBD et Yep351 ou ses dérivés (Yep351, Yep351T, Yep351TP<sub>99</sub>L, Yep351TH<sub>111</sub>A et Yep351TF<sub>109</sub>V) sont analysés par Western Blot en utilisant les anticorps anti-flag et anti-Tfs1. Les extraits sont immunoprécipités avec des anticorps anti-Tfs1 couplés de manière covalente avec des billes protéines G. L'éluat est analysé par Western blot avec un anticorps anti-flag.

Des mutations ponctuelles sur des résidus conservés (dans la signature de la famille des PEBP) de Tfs1p et participant à la formation de la cavité ont été réalisées : P<sub>99</sub>L, H<sub>111</sub>A, R<sub>162</sub>A, F<sub>109</sub>V. Il s'avère que l'histidine 111, placée sur la paroi de la cavité, correspond à l'histidine 85 de la PEBP bovine qui est impliquée dans l'interaction avec la phosphatidyléthanolamine et l'acétate comme le montre la structure 3D (Serre *et al.*, 1998). La mutation H<sub>111</sub>A devrait rompre l'interaction avec les ligands. La proline 99 constitue l'un des résidus en conformation *cis* dans la boucle L1, elle est située sur un coude au bord de la cavité et semble nécessaire à sa formation. L'arginine 162 forme des ponts salins avec les résidus D<sub>23</sub> et D<sub>27</sub>. Ces ponts ne seraient pas formés avec la mutation R<sub>162</sub>A et pourrait entraîner une réduction de la stabilité de la protéine. Enfin, l'alignement des produits des gènes *TFS1* et *YLR179C* révèle une importante conservation au niveau des résidus participant à la formation de la cavité. Cependant, il existe une différence notable entre les résidus V<sub>93</sub> de Ylr179cp et F<sub>109</sub> de Tfs1p. Il s'avère que l'espace occupé par ces résidus au niveau de la cavité est différent. La mutation F<sub>109</sub>V provoque un déplacement de la boucle L2 vers le centre de la cavité réduisant ainsi l'accessibilité de la cavité.

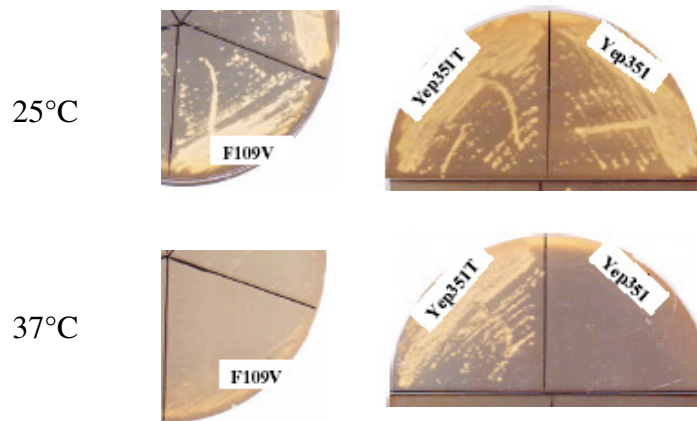
Ces mutants ponctuels de la cavité ont été obtenus par mutagenèse dirigée.

#### 1.3.1.2. Importance de la cavité dans l'interaction Tfs1p/Ira2p

Afin de savoir si la cavité jouait un rôle dans l'interaction avec Ira2p, chacun des mutants ponctuels de la cavité a été testée en double hybride et en co-immunoprécipitation.

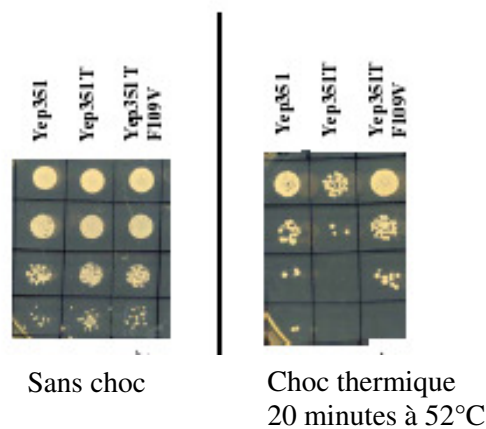
Chautard *et al.* (2004) avait précédemment montré que les mutants Tfs1P<sub>99</sub>L, Tfs1R<sub>162</sub>A et Tfs1H<sub>111</sub>A étaient incapables d'interagir avec Ira2p (en double hybride) et avaient également perdu leur capacité à inhiber Ira2p. Nous avons confirmé l'absence d'interaction par co-immunoprécipitation.

En ce qui concerne le mutant F<sub>109</sub>V, le résultat du double hybride est légèrement positif comparativement aux témoins. Si l'on observe les résultats de co-immunoprécipitation (FIGURE 49), on peut clairement voir que le mutant Tfs1F<sub>109</sub>V interagit avec le domaine TBD d'Ira2p. Cependant, l'interaction n'est pas aussi forte que si l'on regarde celle entre Tfs1p et Ira2p (témoin positif). Cela suggère que la mutation F<sub>109</sub>V affaiblit l'interaction entre Tfs1p et Ira2p sans l'empêcher totalement. En effet, cette mutation ne provoque pas de grandes modifications de l'architecture globale du site actif mais l'accessibilité et la taille de la cavité sont considérablement réduites.



**FIGURE 50 : Effet de la surproduction du mutant Tfs1F<sub>109</sub>V sur le phénotype suppresseur de la mutation *cdc25-1***

Des cellules LRB27 (*cdc25-1*) sont transformées par les plasmides Yep351, Yep351T, Yep351TF<sub>109</sub>V. Les cellules qui ont poussé en culture liquide SD-L à 25°C sont étalées sur milieu YPD à 25°C ou à la température restrictive de 37°C.



**FIGURE 51 : Effet du choc thermique sur le mutant Tfs1F<sub>109</sub>V**

Des cellules BY4742ΔT sont transformées par Yep351, Yep351T (considéré comme les témoins négatif et positif) et Yep351TF<sub>109</sub>V. Ces cellules croissent jusqu'à saturation, sont incubées 45 minutes à 37°C et subissent un choc thermique de 20 à 25 minutes à 52°C. Après avoir refroidies les cellules, une série de dilution au 1/10 est étalé sur milieu YPD afin d'évaluer le taux de survie.

L'activité fonctionnelle de ce mutant a également été testée afin de déterminer, si comme les autres mutants ponctuels de la cavité, il était capable d'inhiber Ira2p. Deux tests fonctionnels indirects ont été réalisés : la suppression du phénotype thermosensible *cdc25-1* (FIGURE 50) et la résistance au choc thermique (FIGURE 51). Lorsque Tfs1p est surproduite, elle est capable de supprimer le phénotype thermosensible *cdc25-1* et permet aux cellules de croître à 37°C, alors que des cellules qui ne surproduisent pas Tfs1p ne se multiplient pas. On remarque que contrairement à Tfs1p, Tfs1F<sub>109</sub>V n'est pas capable de supprimer la mutation thermosensible et les cellules sont incapables de croître à 37°C.

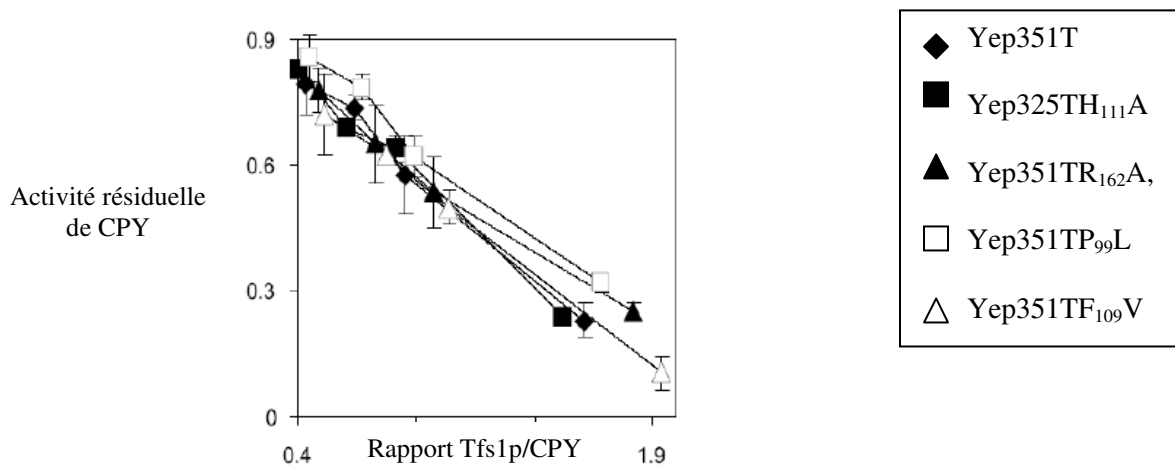
La surproduction de Tfs1p est également responsable d'une sensibilité au choc thermique. En effet, Tfs1p inhibe Ira2p qui inhibe Ras. Ainsi, Tfs1p active la voie Ras/AMPC/PKA. Un des rôles physiologiques de cette voie est de contrôler négativement la résistance au stress, donc la surproduction de Tfs1p augmentera la sensibilité au stress des cellules et notamment la sensibilité au choc thermique. En réalisant un choc thermique de 20 minutes à 52°C, on n'observe pas de sensibilité de la souche surproduisant Tfs1F<sub>109</sub>V par rapport à Tfs1p. Les résultats des deux tests fonctionnels vont dans le sens où Tfs1F<sub>109</sub>V n'inhibe pas Ira2p. Le mutant Tfs1F<sub>109</sub>V serait donc capable d'interagir avec le domaine TBD d'Ira2p mais faiblement par rapport à Tfs1p. Ce mutant ponctuel est par contre incapable d'inhiber Ira2p.

Les résidus de la cavité permettant la fixation de ligands chargés négativement semblent donc être essentiels pour l'interaction entre Tfs1p et le domaine TBD d'Ira2p.

#### 1.3.1.3. Les mutants ponctuels et leur activité sur CPY

Nous avons voulu tester l'activité des mutants ponctuels de la cavité vis-à-vis de l'inhibition de CPY. Pour cela, des extraits cellulaires surproduisant Tfs1p ou les différentes formes mutées de Tfs1p dans un contexte *Aprc1Δtfs1* sont mélangées avec une quantité fixe de CPY purifiée. La quantité de Tfs1p et des mutants de Tfs1p est estimée sur gel 2D. L'activité de CPY en présence de différentes quantités d'extraits cellulaires est déterminée en mesurant l'hydrolyse du peptide FA-Phe-Phe qui se traduit par une diminution de l'absorption à 337nm à 25°C (selon la méthode décrite par Bruun *et al.*, 1998).

La figure 52 présente l'effet des mutations de la cavité sur l'activité inhibitrice de CPY. Les extraits de cellules *Aprc1Δtfs1* transformées par le plasmide Yep351T constituent le témoin positif de l'expérience. On remarque que l'activité résiduelle de CPY diminue en fonction du



**FIGURE 52 : Activité inhibitrice de CPY des mutants de Tfs1p affectés dans la cavité**

Des extraits cellulaires totaux de cellules BY4742  $\Delta prc1 \Delta tfs1$  transformées par Yep351T, Yep351TH<sub>111</sub>A, Yep351TR<sub>162</sub>A, Yep351TP<sub>99</sub>L et Yep351TF<sub>109</sub>V sont préparés et mélangés à une quantité fixe de CPY purifiée. L'activité sur le peptide FA-Phe-Phe est déterminée. La quantité de Tfs1p a été préalablement estimée dans chaque extrait cellulaire et l'activité résiduelle de CPY est portée sur le graphe en fonction du rapport Tfs1p/CPY.



**FIGURE 53 : Alignement des séquences des protéines Tfs1p et Ylr179cp et mise en évidence de régions variables et homologues entre les protéines**

Les résidus des régions variables (1, 2, 3, et 4) sont respectivement en rouge, rose, jaune et bleu. Les résidus des régions homologues (A, B et C) sont en noir. Les résidus conservés entre Tfs1p et Ylr179cp sont surlignés en gris. Les astérisques indiquent les résidus modifiés par mutagenèse. Les résidus des éléments de structure secondaire de Tfs1p (brins  $\beta$  et hélices  $\alpha$ ) sont soulignés et en caractère gras. Les éléments putatifs des structures secondaires de Ylr179cp sont écrits en italique, souligné et en caractère gras.

rapport Tfs1p/CPY montrant l'effet inhibiteur de Tfs1p. Si on analyse l'effet des mutants de la cavité sur l'activité résiduelle de CPY, aucun changement n'est observé par rapport à Tfs1p. Cela montre que les mutants de la cavité sont toujours actifs pour inhiber l'activité de CPY. Cette activité des mutants atteste du repliement correct de ces derniers.

Ces résultats montrent clairement que la cavité conservée ne joue aucun rôle dans l'inhibition de CPY. Cela est à rapprocher du fait que dans la structure 3D du complexe Tfs1p/CPY, la cavité est localisée dans une région opposée à celles en contact avec CPY (Mima *et al.*, 2005) (FIGURE 46).

### **1.3.2. Autres déterminants essentiels pour l'interaction Tfs1p/Ira2p**

La cavité n'est pas la seule région importante dans la structure de Tfs1p. En effet, nous avons vu en alignant les séquences entre Tfs1p et Ylr179cp qu'il existait des domaines homologues et des domaines variables entre les deux protéines. L'échange de certains de ces domaines entre les deux protéines pourrait nous révéler le caractère essentiel de l'un des domaines pour l'interaction Tfs1p/Ira2p.

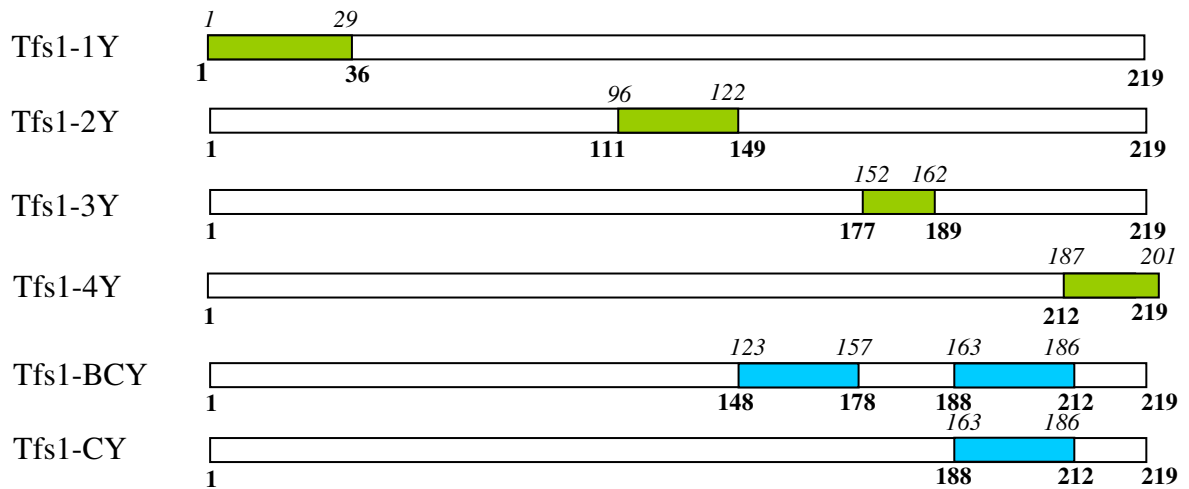
#### **1.3.2.1. Construction de protéines hybrides**

L'alignement des séquences de Tfs1p et Ylr179cp permet d'identifier différents domaines au sein des deux protéines (FIGURE 53). Les domaines 1 à 4 présentent une grande variabilité entre les deux protéines et sont donc considérés comme des régions « variables ». Les domaines A à C sont plus homologues et sont appelés régions « homologues ». Pour obtenir des informations sur les domaines importants pour l'interaction Tfs1p/Ira2p, 6 protéines « hybrides » ont été construites en échangeant différents domaines de Tfs1p par les domaines correspondants de Ylr179cp.

Dans une première approche, chaque domaine dit « variable » de Tfs1p a été remplacé par le domaine correspondant de Ylr179cp (FIGURE 54). Cette stratégie nous a conduits à construire 4 hybrides nommés Tfs1-1Y, Tfs1-2Y, Tfs1-3Y, Tfs1-4Y. Le domaine 1 de Tfs1p, correspondant à l'extrémité N-terminale (aa 1 à 35, domaine en rouge sur la figure 53), a ainsi été remplacé par le domaine 1 de Ylr179cp (aa 1 à 29) pour donner l'hybride Tfs1-1Y.

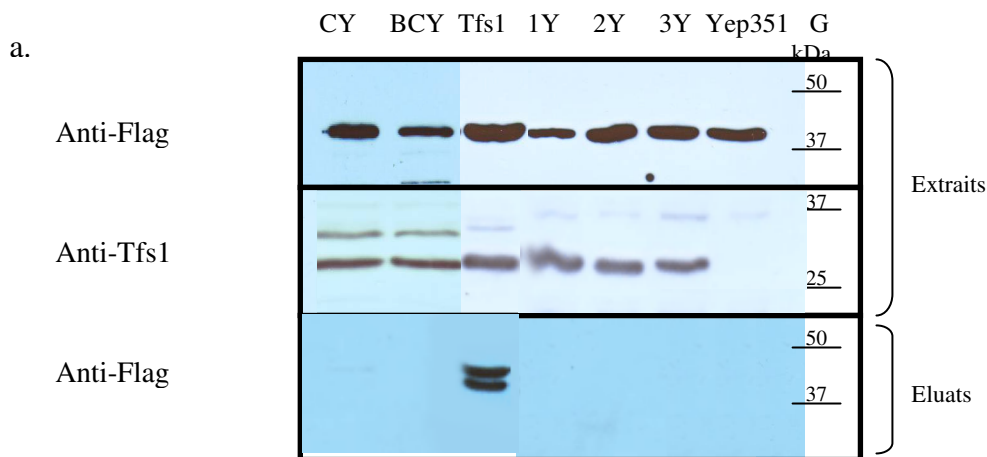
De la même manière, l'hybride Tfs1-2Y a été obtenu en remplaçant le domaine 2 de Tfs1p (aa 112 à 148) correspondant à la fin du feuillet S2 et à la plupart de la boucle L2 par le domaine de Ylr179cp (aa 96 à 122). Le domaine 3 de Tfs1p, comprenant la partie C-terminale de la





**FIGURE 54 : Construction des protéines hybrides**

Les chiffres en gras correspondent aux limites des régions de Tfs1p et les chiffres en italiques à celles de Ylr179cp. Les carrés verts sont les domaines dits « variables » de Tfs1p qui ont été remplacés par les domaines correspondants de Ylr179cp. Les carrés bleus correspondent aux domaines homologues de Tfs1p remplacés par les domaines correspondant de Ylr179cp.



**FIGURE 55a : Analyse fonctionnelle des hybrides**

a. Co-immunoprécipitations

Les extraits de cellules BY4742ΔT co-transformées par pESC-TBD et les dérivés de Yep351 (Yep351, Yep351T, Yep351T1Y, 2Y, 3Y, BCY, CY) sont analysés par Western Blot en utilisant les anticorps anti-flag et anti-Tfs1. Les extraits sont immunoprécipités avec des anticorps anti-Tfs1 couplés de manière covalente avec des billes protéines G. L'éluat est analysé par Western blot avec un anticorps anti-flag. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à la peroxydase et les western blot sont révélés par chimioluminescence

boucle L3 et l'hélice H1 (aa 178 à 188) a été remplacé par le domaine de Ylr179cp (aa 152 à 162) pour constituer l'hybride Tfs1-3Y. Enfin, l'hybride Tfs1-4Y résulte de l'échange du domaine 4 de Tfs1p comprenant la partie C-terminale de la protéine (aa 213 à 219) par la partie C-terminale de Ylr179cp.

D'autre part, la construction d'une seconde série d'hybrides a ensuite été réalisée : Tfs1-BCY et Tfs1-CY. Ainsi, Tfs1-BCY est constituée de tous les domaines variables et du domaine A (aa 36 à 111) de Tfs1p comprenant les boucles L0 et L1, le brin S1 et les deux premiers résidus de S2. Cet hybride est également composé des domaines B (aa 123 à 151) et C (aa 163 à 186) de Ylr179cp qui remplacent les domaines correspondants de Tfs1p (aa 149 à 177 et 189 à 212). Le domaine B contient la fin de la boucle L2, le brin S3 et la boucle L3 tandis que le domaine C contient le brin S4 et une partie du domaine C-terminal. Enfin, Tfs1-CY comprend les domaines variables, les domaines A et B de Tfs1p. Le seul domaine de Ylr179cp présent est le domaine C (aa 163 à 186) remplaçant le domaine correspondant de Tfs1p (aa 189 à 212).

L'activité de tous les mutants vis à vis de Ira2p a été testée et leur structure a été étudiée par modélisation moléculaire.

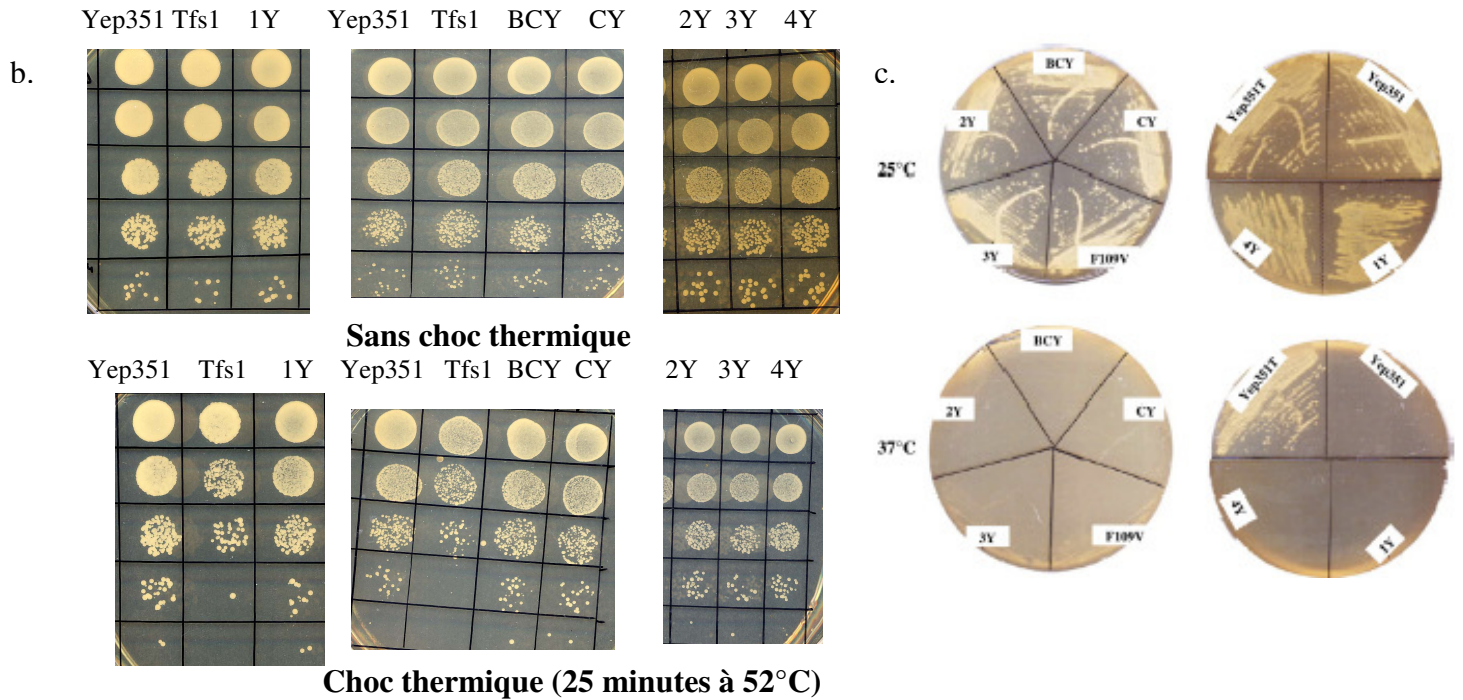
#### 1.3.2.2. Analyse fonctionnelle et structurale des protéines hybrides

Pour chacun de ces hybrides, nous avons testé l'interaction entre l'hybride et le domaine TBD d'Ira2p par double hybride et co-immunoprécipitation (FIGURE 55a).

Aucune protéine hybride n'est capable d'interagir avec le domaine TBD d'Ira2p ni par double hybride ni par co-immunoprécipitation. De plus, ces gels montrent que les protéines hybrides sont produites dans des quantités comparables à Tfs1p et sont stables (FIGURE 55a, membrane supérieure). L'activité inhibitrice a également été testée par choc thermique ou par suppression du phénotype *cdc25-1* (FIGURE 55b et c). Ces tests révèlent que tous les mutants sont inactifs, ils n'inhibent pas Ira2p.

Un modèle de la structure 3D des hybrides a été construit pour chaque hybride d'après la structure 3D de Tfs1p et le modèle de structure de Ylr179cp (FIGURE 56).

Les résultats concernant l'hybride Tfs1-4Y sont difficilement interprétables. Notamment le modèle de la structure 3D est hypothétique car il y a une grande incertitude concernant les structures secondaires et tertiaires et la localisation spatiale de la région 4 de Ylr179cp. L'étude de cet hybride ne sera donc pas poursuivie.



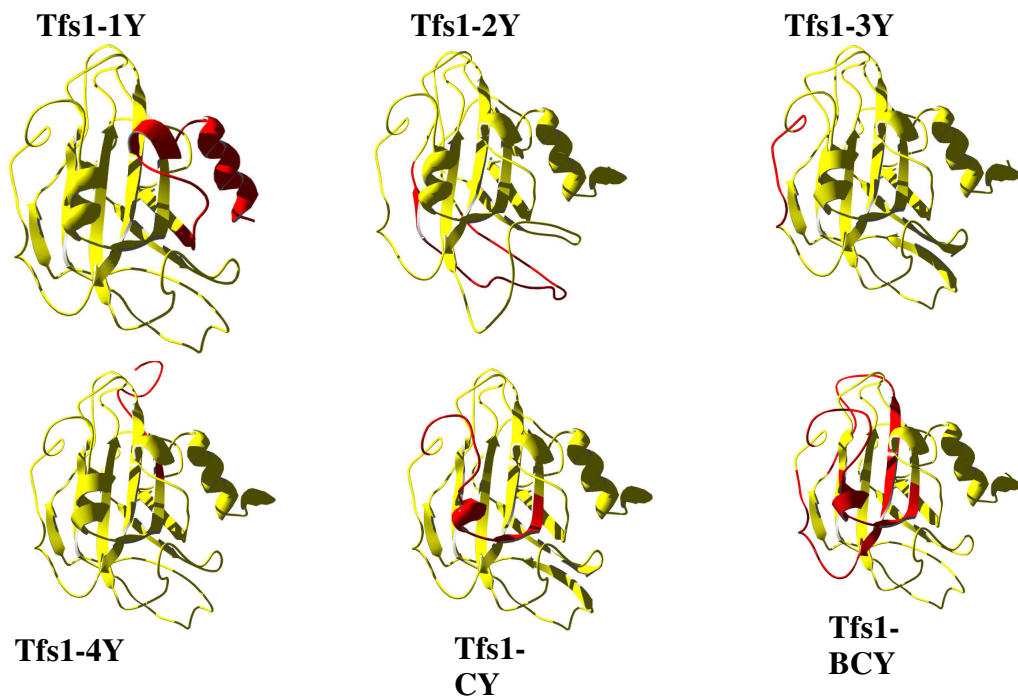
**FIGURE 55 : Analyse fonctionnelle des hybrides**

b. Tests de choc thermique

Des cellules BY4742ΔT sont transformées par Yep351, Yep351T (considérés comme les témoins négatif et positif), Yep351T1Y, Yep351T2Y, Yep351T3Y, Yep351T4Y, Yep351TCY et Yep351TBCY. Ces cellules se multiplient jusqu'à saturation, sont incubées 45 minutes à 37°C et subissent un choc thermique de 20 à 25 minutes à 52°C. Après les avoir refroidies, une série de dilution au 1/10 est étalé sous forme de spots sur milieu YPD afin d'évaluer le taux de survie.

c. Phénotype suppresseur de la mutation *cdc25-1*

Des cellules LRB27 sont transformées par les plasmides Yep351, Yep351T, Yep351T-1Y, Yep351T-2Y, Yep351T-3Y, Yep351T-4Y, Yep351T-BCY, Yep351T-CY. Les cellules sont étalées à partir de cultures liquides SD-L sur milieu YPD à 25°C ou à la température restrictive de 37°C.



**FIGURE 56 : Modèle des protéines hybrides**

Les régions de Tfs1p et Ylr179cp sont colorées respectivement en jaune et rouge.

Concernant les autres hybrides, trois hypothèses peuvent être proposées pour expliquer la perte d'interaction et d'inhibition d'Ira2p :

(1) La stabilité de la protéine et le repliement global de la protéine hybride peuvent être modifiés et empêcher ainsi l'interaction avec Ira2p voire même son inhibition.

(2) Le site actif, impliqué dans l'interaction Tfs1p/Ira2p, peut être modifié ;

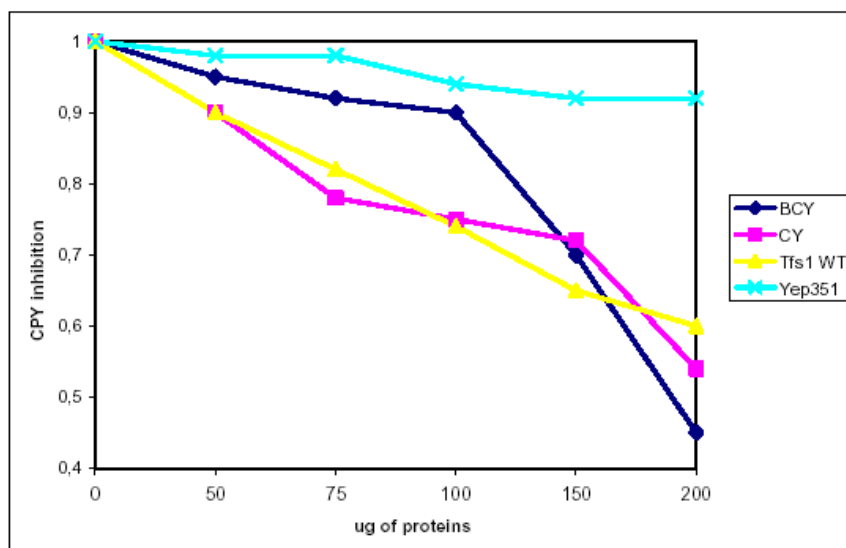
(3) Ou bien les propriétés électrostatiques des hybrides, qui pourraient gêner le processus de reconnaissance (moment dipolaire, charge nette), ou la zone de contact entre les deux molécules (c'est-à-dire le potentiel électrostatique de surface) peuvent être altérées.

Afin de voir si l'architecture des mutants est correcte, leur capacité à inhiber la carboxypeptidase Y a été testée. En effet, si les hybrides sont actifs sur la CPY, cela signifie que le repliement des protéines est correct puisqu'elles ont une activité. La figure 57 montre clairement que l'activité des hybrides CY et BCY est similaire à celle du sauvage montrant qu'ils ont conservé leur capacité à inhiber CPY. Les autres protéines hybrides (Tfs1-1Y, Tfs1-2Y et Tfs1-3Y) n'ont pas d'activité sur CPY. Cela est tout à fait attendu pour Tfs1-1Y et Tfs1-2Y : en effet, des régions de Tfs1p impliquées dans l'interaction avec CPY ont été échangées par celles de Ylr179cp. Par contre, cela est surprenant pour Tfs1-3Y.

Dans le cas des hybrides Tfs1-1Y, Tfs1-2Y et Tfs1-3Y, des analyses de dichroïsme circulaire ont été effectuées (FIGURE 58). Pour cela, ces hybrides ont été étiquetés avec 6-histidines, puis produits dans *E. coli* et purifiés. Leur spectre de dichroïsme circulaire a été déterminé et comparé à celui de Ylr179c-6-His. L'analyse du spectre Tfs1-1Y suggère que la conformation de cet hybride est correcte puisque le spectre est comparable à celui de Ylr179cp. Par contre, d'après le spectre de l'hybride Tfs1-3Y, cet hybride n'aurait pas un repliement convenable, ce qui est à corrélérer avec le fait qu'il soit inactif vis-à-vis de CPY bien que ni le site primaire ni le site secondaire d'interaction entre Tfs1p et CPY ne soit affecté.

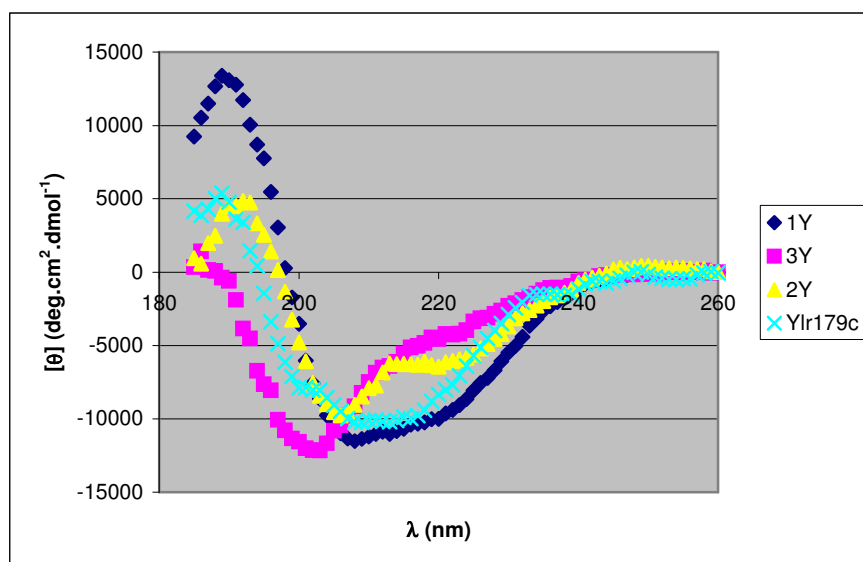
Le spectre CD de l'hybride Tfs1-2Y révèle une différence de conformation par rapport à Ylr179cp. Dans ce mutant, la boucle L2 est plus courte (10 résidus) que dans la structure de Tfs1p. Les différences les plus remarquables entre l'hybride et la protéine native concernent les propriétés électrostatiques. La charge nette est de 6 au lieu de 3 ; le moment dipolaire, similaire en termes de valeur, subit une rotation importante et le potentiel de surface est deux fois plus positif près du site actif. Pour ces raisons, il sera difficile de tirer des conclusions des résultats et des modèles obtenus avec les hybrides Tfs1-3Y et Tfs1-2Y.

Concernant les autres hybrides, Tfs1-1Y, Tfs1-CY et Tfs1-BCY, les caractéristiques de la cavité de surface et les propriétés électrostatiques sont reportées dans la table 7.



**FIGURE 57 : Effet des hybrides Tfs1CY et Tfs1BCY sur l'activité inhibitrice de CPY**

Des extraits protéiques totaux ont été préparés à partir de cellules BY4742 $\Delta$ prc1 $\Delta$ tfs1 transformée par Yep351 (bleu ciel), Yep351T (jaune), Yep351TCY (rose) et Yep351TBCY(bleu foncé). Une analyse par western blot des extraits protéiques avec un anticorps anti-Tfs1 montre que les mutants Tfs1CY et Tfs1BCY sont en quantité équivalente par rapport au sauvage. La concentration protéique est mesurée pour chaque extrait et différentes quantités d'extraits protéiques sont mélangées à une quantité fixe de CPY purifiée. L'activité de CPY est déterminée en mesurant l'hydrolyse du peptide FA-Phe-Phe qui induit une diminution de l'absorption à 337nm à 25°C. Elle est portée sur le graphe en fonction des microgrammes de protéines ajoutés à CPY.



**FIGURE 58 : Spectres de dichroïsme circulaire des protéines Ylr179cp et des hybrides purifiées à l'aide de l'étiquette 6-His**

Les formes des protéines Ylr179cp, Tfs1-1Y, Tfs1-2Y, Tfs1-3Y étiquetées 6-Histidines sont produites et purifiées de la bactérie *E.coli*. Elles sont concentrées à 0.3 mg/ml dans un tampon phosphate de potassium 10mM, pH8, et les mesures de dichroïsme circulaire sont enregistrées sur le spectropolarimètre Jasco J-810. Les spectres sont mesurés dans la gamme d'UV lointain (185nm-260nm) dans une cuve en quartz de 1mm de large à 5°C. Chaque spectre correspond à la moyenne de 5 mesures consécutives et tous les spectres sont corrigés en ôtant la ligne de base du tampon.

Protéines	Interaction avec Ira2p Double hybride /co-IP	Inhibition d'Ira2p (phénotype suppresseur de cdc25-1)	Propriétés électrostatiques de la zone Electropositive	Cavité		Domaine N-terminal	
				Accessibilité	Hydrophobicité	Accessibilité	Hydrophobicité
Tfs1	+ / +	+	wt	wt	wt	wt	wt
Tfs1F <sub>109</sub> V	± / ±	-	wt	-	wt	wt	wt
Tfs1-1Y	- / -	-	wt	wt	wt	-	-
Tfs1-BCY	- / -	-	--	-	-	-	-
Tfs1-CY	- / -	-	-	+/-	wt	wt	wt

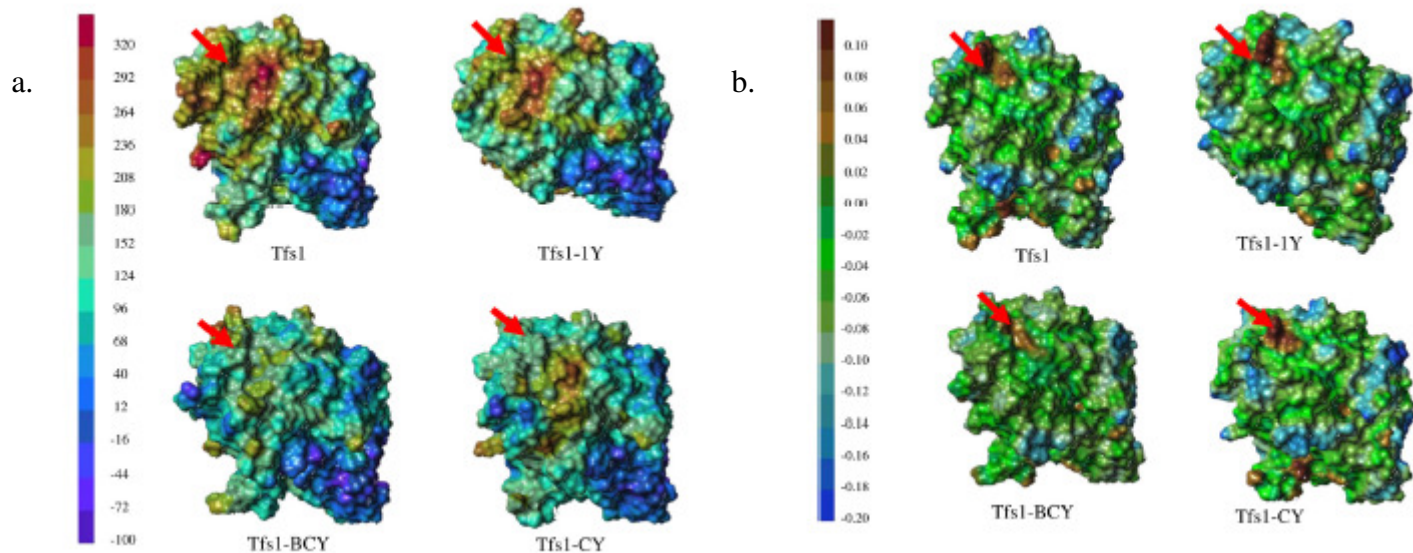
Le signe + signifie que l'interaction ou l'inhibition est positive ; le signe - signifie que le test est négatif ; wt signifie que le phénotype est identique à Tfs1p et le signe - indique une différence avec Tfs1p.

**Table 7** : Analyse fonctionnelle et structurale de Tfs1p et de mutants de Tfs1p

Les potentiels électrostatiques et d'hydrophobicité de la surface de la molécule sont comparés à ceux de Tfs1p (FIGURE 59).

L'ensemble de ces résultats suggère que l'hybride Tfs1-1Y est un mutant particulièrement intéressant puisqu'il fournit de nouvelles informations concernant les déterminants nécessaires pour l'interaction Tfs1p/Ira2p. En effet, la séquence du site de liaison des ligands anioniques est bien conservée ce qui conduit à la conservation de la géométrie globale et de la cavité de surface (appelée également site actif). Les propriétés électrostatiques globales qui pourraient affecter le processus de reconnaissance des ligands ne sont pas modifiées (Table 7). La seule différence entre Tfs1p et Tfs1-1Y, qui pourrait être responsable de la non-interaction avec le domaine TBD d'Ira2p, est le remplacement de la région N-terminale par celle de Ylr179cp. Ces informations révèlent donc que la région N-terminale de Tfs1p est impliquée dans l'interaction Tfs1p/Ira2p.

L'hybride Tfs1-BCY possède des modifications au niveau de la région du site actif, entraînant des modifications de la cavité et des propriétés de surface. La cavité est devenue très petite et son environnement est moins électropositif que celui de la protéine native (FIGURE 59a), l'hydrophobicité est également légèrement réduite (FIGURE 59b). Ainsi, le site actif mais également l'environnement de ce site semble jouer un rôle important dans l'incapacité de l'hybride Tfs1-BCY à interagir avec Ira2p.



**FIGURE 59 : Potentiels électrostatiques et d'hydrophobicité de la surface de Tfs1p et des hybrides**

Les surfaces MOLCAD de Tfs1p, Tfs1-1Y, Tfs1-CY et Tfs1-BCY sont dans la même orientation que sur la figure 48.

a. le potentiel électrostatique est représenté par des couleurs, allant du bleu au rouge selon l'échelle dessinée à gauche des modèles. Le site actif est pointé par la flèche rouge

b. le potentiel d'hydrophobicité est représenté par des couleurs, allant du bleu au marron selon l'échelle dessinée à gauche des modèles. L'hydrophobicité de la région de la cavité est indiquée par la flèche rouge

L'hybride Tfs1-CY comprend tous les domaines variables de Tfs1p ainsi que ses domaines homologues A et B. Le seul domaine de Ylr179cp présent est le domaine C. De façon surprenante, malgré le haut degré d'identité entre les domaines C des deux protéines, Tfs1-CY n'est pas capable d'interagir avec le domaine TBD d'Ira2p (en double hybride et en co-immunoprécipitation FIGURE 55a). Le modèle de Tfs1-CY montre que les caractéristiques d'accessibilité au site actif et les caractéristiques d'hydrophobicité sont relativement similaires à celles de la protéine Tfs1p native. La profondeur de la cavité est quelque peu réduite. Par contre, la molécule est moins électropositive et la charge nette est modifiée ce qui entraîne un environnement du site actif moins cationique. Ces informations nous indiquent que la région électropositive entourant la cavité est importante pour l'interaction Tfs1p/Ira2p.

Ainsi, la face entière de Tfs1p comprenant le site actif et la région N-terminale, semble constituer une zone de contact avec la protéine Ira2p et jouer un rôle prépondérant dans l'interaction. L'environnement de la cavité est également un paramètre à prendre en compte pour l'interaction.

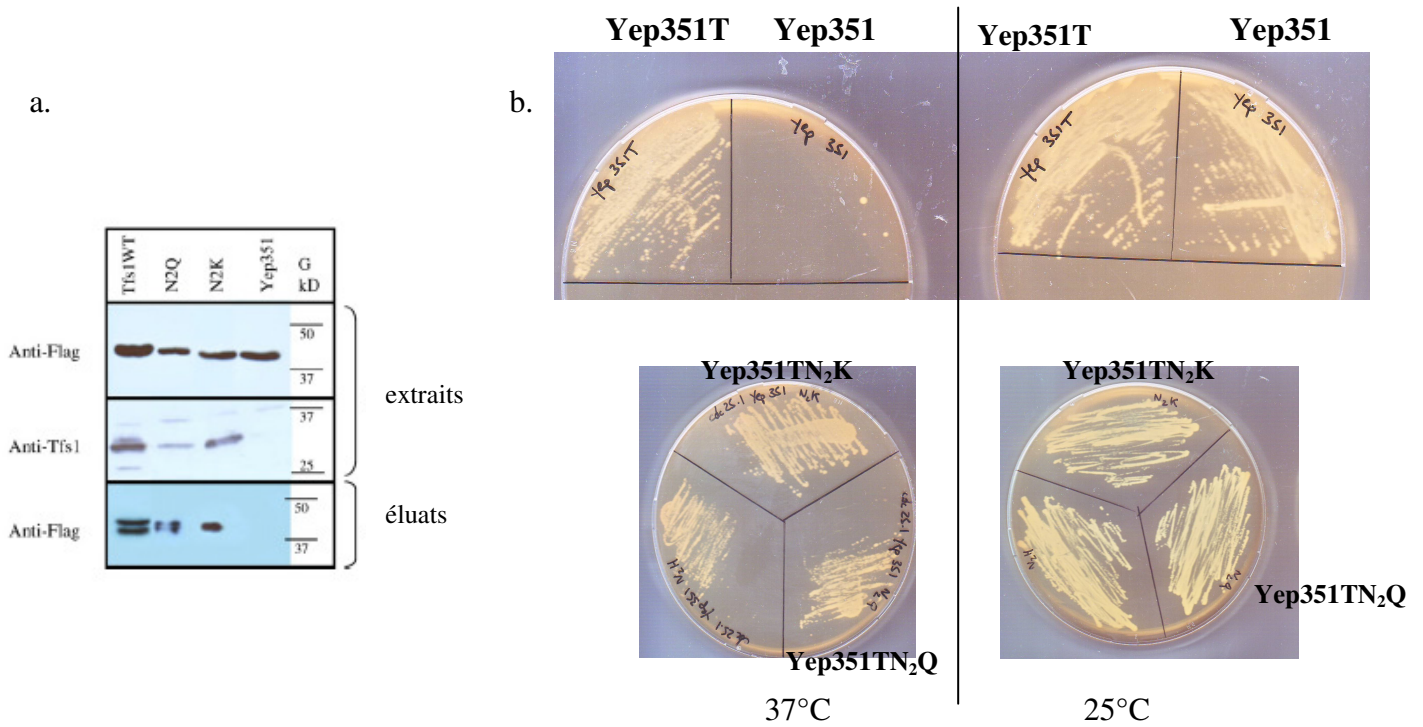
Puisque Tfs1p est acétylée à son extrémité N-terminale pour que la protéine puisse inhiber CPY, nous avons cherché à savoir si cette extrémité était impliquée dans l'interaction Tfs1p/Ira2p.

### **1.3.3. Implication de l'extrémité N-terminale dans l'interaction Tfs1p/Ira2p**

#### **1.3.3.1. Mutants ponctuels de l'extrémité N-terminale**

Tfs1p fait partie des 40% de protéines chez la levure *S.cerevisiae* à être acétylée à l'extrémité N-terminale. Les N-acétyl-transférases sont capables de transférer un groupement acétyl à partir de l'acétylCoA sur le N-terminal de certaines protéines (Polevoda *et al.*, 1999). Récemment, il a été démontré que l'acétyl-transférase NatB (Caesar & Blomberg, 2004) qui est capable d'acétyler certaines protéines possédant une extrémité Met-Glu, Met-Asp ou Met-Asn est responsable de l'acétylation de Tfs1p. Mima *et al.* (2002) ont montré que l'acétylation de Tfs1p était absolument nécessaire pour l'inhibition de CPY. En résolvant la structure 3D du complexe Tfs1p/CPY Mima *et al.* (2005) ont pu expliquer les mécanismes moléculaires de cette inhibition. Notamment, les 7 premiers résidus formant l'hélice  $\eta_1$  sont essentiels à l'interaction Tfs1p/CPY et l'acétylation du résidu M<sub>1</sub> est requise





**FIGURE 60 : Expériences de co-immunoprécipitation entre le domaine TBD d'Ira2p et les mutants de Tfs1p**

a. Co-immunoprécipitation entre le domaine TBD d'Ira2p et les mutants de Tfs1p de l'extrémité N-terminale

Les extraits de cellules BY4742 $\Delta$ T co-transformées par pESC-TBD et Yep351 contenant les différentes formes de TFS1 (Yep351, Yep351T, Yep351TN<sub>2</sub>K et Yep351TN<sub>2</sub>Q) sont analysés par Western Blot en utilisant les anticorps anti-flag et anti-Tfs1. Les extraits sont immunoprécipités avec des anticorps anti-Tfs1 couplés de manière covalente avec des billes protéines G. L'éluat est analysé par Western blot avec un anticorps anti-flag. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à la peroxydase et les western blots sont révélés par chimioluminescence.

b. Phénotype suppresseur de la mutation *cdc25-1*

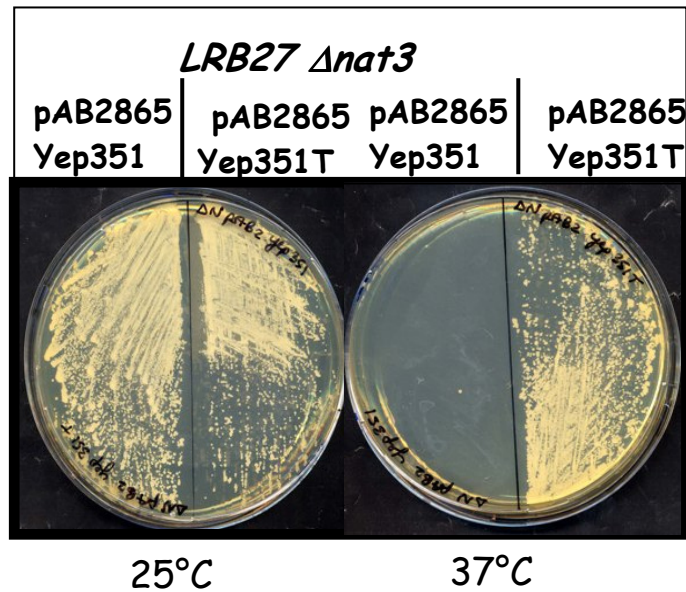
Des cellules LRB27 (*cdc25-1*) sont transformées par les plasmides Yep351, Yep351T, Yep351-Tfs1N<sub>2</sub>K, Yep351Tfs1N<sub>2</sub>Q. Les cellules sont étalées à partir de cultures liquides SD-L sur milieu YPD à 25°C ou à la température restrictive de 37°C.

pour que l'inhibition soit efficace. Les résidus M<sub>1</sub>-Ac et N<sub>2</sub> établissent pour cela des interactions pour cela des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes avec le site actif de CPY.

### 1.3.3.2. Analyse des mutants de l'extrémité N-terminale

La construction de mutants de l'extrémité N-terminale nous a permis de chercher le rôle de cette acétylation et des résidus M<sub>1</sub> et N<sub>2</sub> dans l'interaction Tfs1p/Ira2p. Le mutant N<sub>2</sub>Q a été construit pour voir l'effet de l'acétylation puisque cette mutation empêche l'acétylation mais ne modifie guère les propriétés de ce second résidu Asn. Les expériences de co-immunoprécipitation (FIGURE 60a) et de double hybride montrent que ce mutant est capable d'interagir avec Ira2p ce qui suggère que l'acétylation ne serait pas utile à l'interaction Tfs1p/Ira2p. Nous avons obtenus d'autres résultats suggérant que l'acétylation n'était pas importante pour l'inhibition d'Ira2p. Pour cela, Tfs1N<sub>2</sub>Q a été surproduite dans une souche *cdc25-1* et la croissance des transformants a été suivie à 37°C. Tfs1N<sub>2</sub>Q restaure la mutation thermosensible *cdc25-1* suggérant que l'acétylation N-terminale de Tfs1p ne joue pas de rôle dans l'inhibition d'Ira2p (FIGURE 60b).

Ces résultats ont été confirmés de façon plus générale par une expérience qui nous a permis de montrer que Tfs1p conservait son phénotype suppresseur de *cdc25-1* dans un contexte l'empêchant d'être acétylée. En effet, Caesar et Blomberg (2004) ont montré que l'acétylation de Tfs1p était dépendante de l'acétyl transférase NatB. Or, cette enzyme est composée de deux sous-unités, Mdm20p et Nat3p. En comparant les profils protéiques sur gels 2D d'une souche sauvage et d'un mutant *Anat3*, ces auteurs ont identifiés quatre protéines acétylées par Nat3p : Act1p, Tpm1p, Rnr4p et Tfs1p. Ainsi, nous avons testé le phénotype suppresseur de la mutation *cdc25-1* dans une souche LRB27 *Anat3*. Cependant, les mutants *Anat3* et *Δmdm20* ne sont pas viables à 37°C (Polevoda *et al.*, 2003), ce qui nous empêchait de voir l'effet de la surproduction de Tfs1p. Cependant, Singer *et al.*, 2000 ont rapporté que certains phénotypes, et notamment le phénotype thermosensible dû à la mutation *Δmdm20*, pouvaient être supprimés par des mutants dans *TPM1* et *ACT1*. Ainsi, il existe un mutant *tpm1-5* qui restaure la formation des cables d'actine dans la souche *Δmdm20*. Polevoda *et al.* (2003) ont montré que ce mutant *tpm1-5* était aussi capable de supprimer le phénotype thermosensible de souches *Anat3*. Le plasmide codant pour ce mutant *tpm1-5*, appelé pAB2865, a été transformé



**FIGURE 61 : Test du phénotype suppresseur de la mutation *cdc25-1* pour un mutant de l'acétylation**

Des cellules *LRB27Δnat3* sont transformées par les plasmides pAB2865 et Yep351 ou Yep351T. Les cellules sont étalées à partir de cultures liquides à 25°C ou à la température restrictive de 37°C sur milieu YPD.

Protéines	Interaction avec Ira2p Double hybride /co-IP	Inhibition d'Ira2p (phénotype suppresseur de <i>cdc25-1</i> )	Propriétés électrostatiques de la zone Electropositive	Cavité		Domaine N-terminal	
				Accessibilité	Hydrophobicité	Accessibilité	Hydrophobicité
Tfs1	+ / +	+	wt	wt	wt	wt	wt
Tfs1N <sub>2</sub> K	+ / +	+	wt	wt	wt	wt	wt
Tfs1N <sub>2</sub> Q	+ / +	+	wt	wt	wt	wt	wt
Tfs1Δ2	+ / ND	ND	wt	wt	wt	-	-
Tfs1ΔN <sub>2</sub>	ND / +	ND	wt	wt	wt	-	-

Le signe + signifie que l'interaction ou l'inhibition est positive ; ND indique que le test n'a pas été réalisé (Non Déterminé) ; wt signifie que le phénotype est identique à Tfs1p et le signe - indique une différence avec Tfs1p.

**Table 8 : Analyse fonctionnelle et structurale de Tfs1p et des mutants de l'extrémité N-terminale de Tfs1p**

dans une souche LBR27*Anat3* surproduisant ou non Tfs1p afin de tester la croissance à 37°C. La figure 61 expose les résultats de cette expérience et confirme que l'acétylation de Tfs1p n'est pas requise pour l'activité inhibitrice de Tfs1p sur Ira2p. En effet, Tfs1p a gardé sa capacité à supprimer le phénotype thermosensible de la mutation *cdc25-1* car lorsque la protéine est surproduite dans un contexte *Anat3*, elle permet aux cellules de croître à 37°C comme Tfs1p dans un contexte sauvage pour *NAT3*.

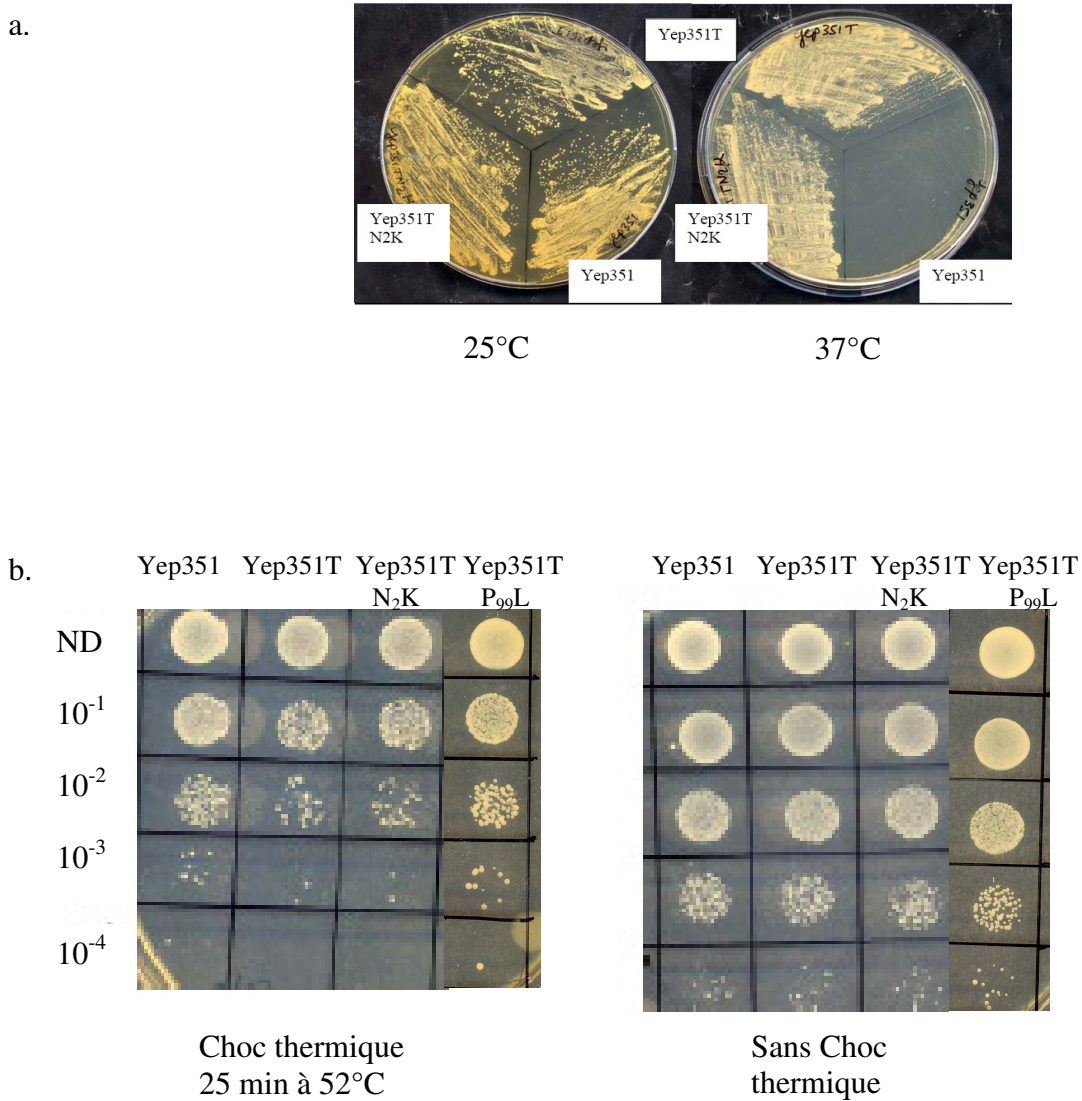
Le mutant N<sub>2</sub>K possède une mutation au niveau du résidu Arginine 2 en Lysine, résidu chargé positivement. Cette modification va donc entraîner des perturbations des propriétés spatiales et électrostatiques de ce second résidu de Tfs1p. Cela n'empêche pas Tfs1N<sub>2</sub>K d'interagir avec Ira2p comme nous l'avons montré par double hybride et par co-immunoprécipitation (Table 8 et FIGURE 60a) et d'inhiber Ira2p (FIGURE 60b). Le mutant Tfs1ΔN<sub>2</sub> qui est délété de ce second résidu et Tfs1Δ2 qui est délété des deux premiers résidus (M<sub>1</sub> et N<sub>2</sub>) sont eux aussi capables d'interagir avec Ira2p (Table 8).

L'ensemble des résultats de l'analyse fonctionnelle et structurale de ces mutants est résumé dans la table 8.

Les mutants Tfs1N<sub>2</sub>Q, Tfs1N<sub>2</sub>K, Tfs1ΔN<sub>2</sub> et Tfs1Δ2 interagissent tous avec Ira2p (Table 8 et FIGURE 60). Ces résultats prouvent que l'acétylation de Tfs1p et ses deux premiers résidus ne sont pas impliqués dans l'interaction Tfs1p/Ira2p. Ainsi, la région N-terminale de Tfs1p est bien impliquée à la fois pour l'interaction avec CPY et pour l'interaction avec Ira2p mais nous venons de démontrer que ce sont des résidus différents qui interviennent et jouent des rôles clés dans chaque interaction.

Les régions de Tfs1p impliquées dans l'interaction avec le domaine TBD d'Ira2p ont donc été définies : la région N-terminale, le site actif et son environnement. Seule la région N-terminale est commune aux interactions Tfs1p/CPY et Tfs1p/Ira2p.

Après avoir défini les bases moléculaires de l'interaction Tfs1p/Ira2p, nous nous sommes intéressés à l'importance relative des deux fonctions inhibitrices de Tfs1p (inhibition de CPY et d'Ira2p) dans la physiologie cellulaire. Les résultats obtenus suggérant un rôle prépondérant de l'inhibition d'Ira2p dans certaines conditions nous ont poussé à mieux définir ces conditions et nous ont permis de mettre en évidence un rôle de Tfs1p dans le rétrocontrôle négatif de la réponse au stress.



**FIGURE 62 : Tests fonctionnels des mutants ponctuels**

a. Test du phénotype suppresseur de la mutation *cdc25-1* sur le mutant Tfs1N<sub>2</sub>K  
Des cellules LRB27 (*cdc25-1*) sont transformées par les plasmides Yep351, Yep351T ou Yep351TN<sub>2</sub>K. Les cellules sont étalées à partir de cultures liquides à 25°C ou à la température restrictive de 37°C sur milieu YPD.

b. Test du choc thermique  
Des cellules BY4742ΔT sont transformées par Yep351, Yep351T, Yep351TN<sub>2</sub>K ou Yep351TP<sub>99</sub>L. Ces cellules croissent jusqu'à saturation, sont incubées 45 minutes à 37°C et subissent un choc thermique de 25 minutes à 52°C. Après les avoir refroidies, une série de dilution au 1/10 est étalé sous forme de spots sur milieu YPD afin d'évaluer le taux de survie.  
ND : Non dilué

## 2. Caractérisation du rôle physiologique de Tfs1p

La protéine Tfs1p de levure inhibe indépendamment la protéase à sérine CPY et la protéine GAP de Ras, Ira2p. En effet, deux arguments sont en faveur de l'indépendance entre les deux fonctions : une délétion de *PRC1* ne supprime pas la mutation *cdc25-1* (Bruun *et al.*, 1998) et la surexpression de *TFS1* supprime la mutation *cdc25-1* dans un contexte *Aprc1* (Hélène Bénédicti, communication personnelle). Les régions de Tfs1p impliquées dans chacune des interactions ont été déterminées. La cavité de surface conservée de Tfs1p intervient dans l'inhibition d'Ira2p mais pas dans celle de CPY. Par contre, l'acétylation N-terminale de Tfs1p est requise pour inhiber CPY mais pas pour inhiber Ira2p. Sur la base de ces informations, nous avons utilisé dans la suite du travail deux mutants de Tfs1p spécifiquement affectés dans une des deux fonctions inhibitrices, dans le but de déterminer la contribution de chacune de ces fonctions dans le rôle physiologique de Tfs1p. Pour cela, une batterie de tests systématiques phénotypiques a été appliquée à ces mutants dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe d'A. Blomberg (Université de Göteborg, Suède) qui a mis au point ce type d'approche systématique appelée « yeast phenomics ».

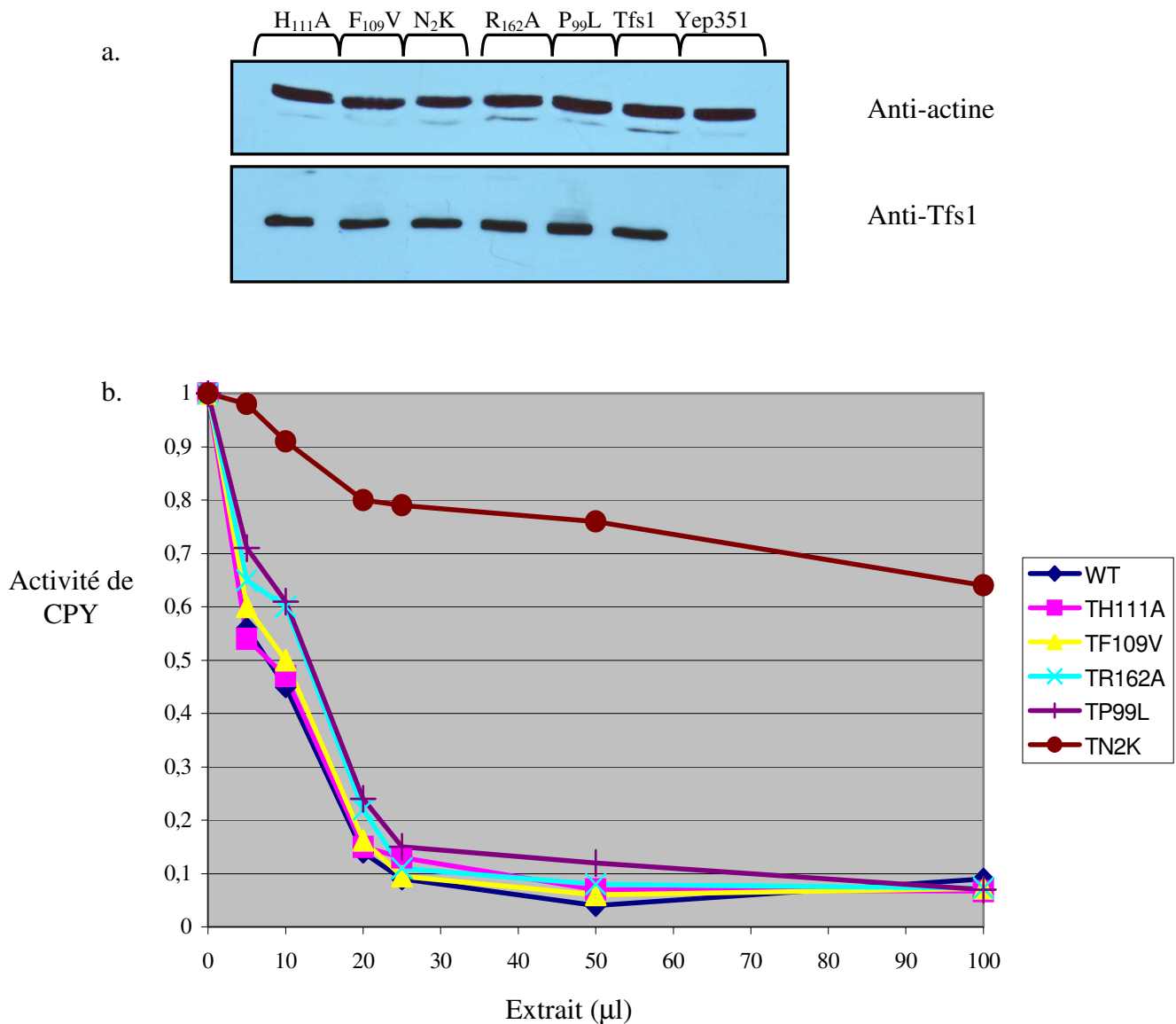
### 2.1 Dissociation des rôles de Tfs1p

#### 2.1.1. Etude approfondie de l'activité de mutants ponctuels

Le mutant ponctuel Tfs1N<sub>2</sub>K, modifié au niveau de l'extrémité N-terminale et dépourvu d'acétylation N-terminale, est toujours capable d'interagir avec Ira2p. Nous avons voulu vérifier qu'il était incapable d'inhiber CPY mais toujours capable d'inhiber Ira2p. La figure 62a montre que Tfs1N<sub>2</sub>K est capable de supprimer la mutation *cdc25-1*, et la figure 62b montre que la surproduction de Tfs1N<sub>2</sub>K, comme celle de Tfs1p, est capable d'induire une sensibilité au choc thermique. Ces données sont en faveur d'une inhibition d'Ira2p. La figure 63b montre de plus que Tfs1N<sub>2</sub>K, contrairement aux mutants ponctuels de la cavité, n'a aucune activité sur CPY.

Au contraire, les mutants de la cavité de surface conservée (P<sub>99</sub>L, H<sub>111</sub>A, R<sub>162</sub>A) ne peuvent plus interagir ni inhiber Ira2p (Chautard *et al.*, 2004 ; FIGURE 49 et 50) mais ils ont conservé leur capacité à inhiber CPY (FIGURE 52 et 63b).

Les tests de l'activité de CPY effectués ici ont été réalisés à partir d'extraits cellulaires bruts, nous avons préalablement comparé la quantité de chaque mutant de Tfs1p dans les extraits par



**FIGURE 63 : Test d'activité de différents mutants sur CPY**

a. Analyse comparative des différents mutants de Tfs1p

Des extraits cellulaires de cellules BY4742 $\Delta$ *prc1* $\Delta$ *tfs1* transformées par les dérivés de Yep351 (Yep351T, Yep351TH<sub>111</sub>A, Yep351TF<sub>109</sub>V, Yep351TN<sub>2</sub>K, Yep351TR<sub>162</sub>A et Yep351TP<sub>99</sub>L) sont préparés. Ils sont analysés par Western blot en utilisant des anticorps anti-actine (étalon interne) et anti-Tfs1. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à la peroxydase et les western blot sont révélés par chimioluminescence.

b. Dosage de l'activité de mutants de Tfs1p sur CPY

Des extraits protéiques totaux ont été préparés à partir de cellules BY4742 $\Delta$ *prc1* $\Delta$ *tfs1* transformée par Yep351T (WT ; bleu foncé), Yep351TH<sub>111</sub>A (rose), Yep351TF<sub>109</sub>V (jaune), Yep351TR<sub>162</sub>A (bleu ciel), Yep351TP<sub>99</sub>L (mauve) et Yep351TN<sub>2</sub>K (marron). Différentes quantités d'extraits protéiques sont mélangées à une quantité fixe de CPY purifiée. L'activité de CPY est déterminée par en mesurant l'hydrolyse du peptide FA-Phe-Phe qui induit une diminution de l'absorption à 337nm à 25°C. Elle est portée sur le graphe en fonction des microlitres d'extraits ajoutés à CPY.

rapport à un contrôle interne constitué par l'actine (FIGURE 63a). Ces analyses révèlent que la production des différents mutants ponctuels, de la cavité ou de l'extrémité N-terminale, est équivalente et que les extraits cellulaires utilisés dans les tests d'activité de CPY contiennent des quantités équivalentes de chaque mutant de Tfs1p.

Les mutants Tfs1N<sub>2</sub>K et Tfs1P<sub>99</sub>L sont donc des mutants de choix pour mettre en avant une seule des fonctions de Tfs1p. Ils seront donc utilisés dans des tests systématiques phénotypiques réalisés dans différentes conditions.

### 2.1.2. Analyse des tests systématiques phénotypiques

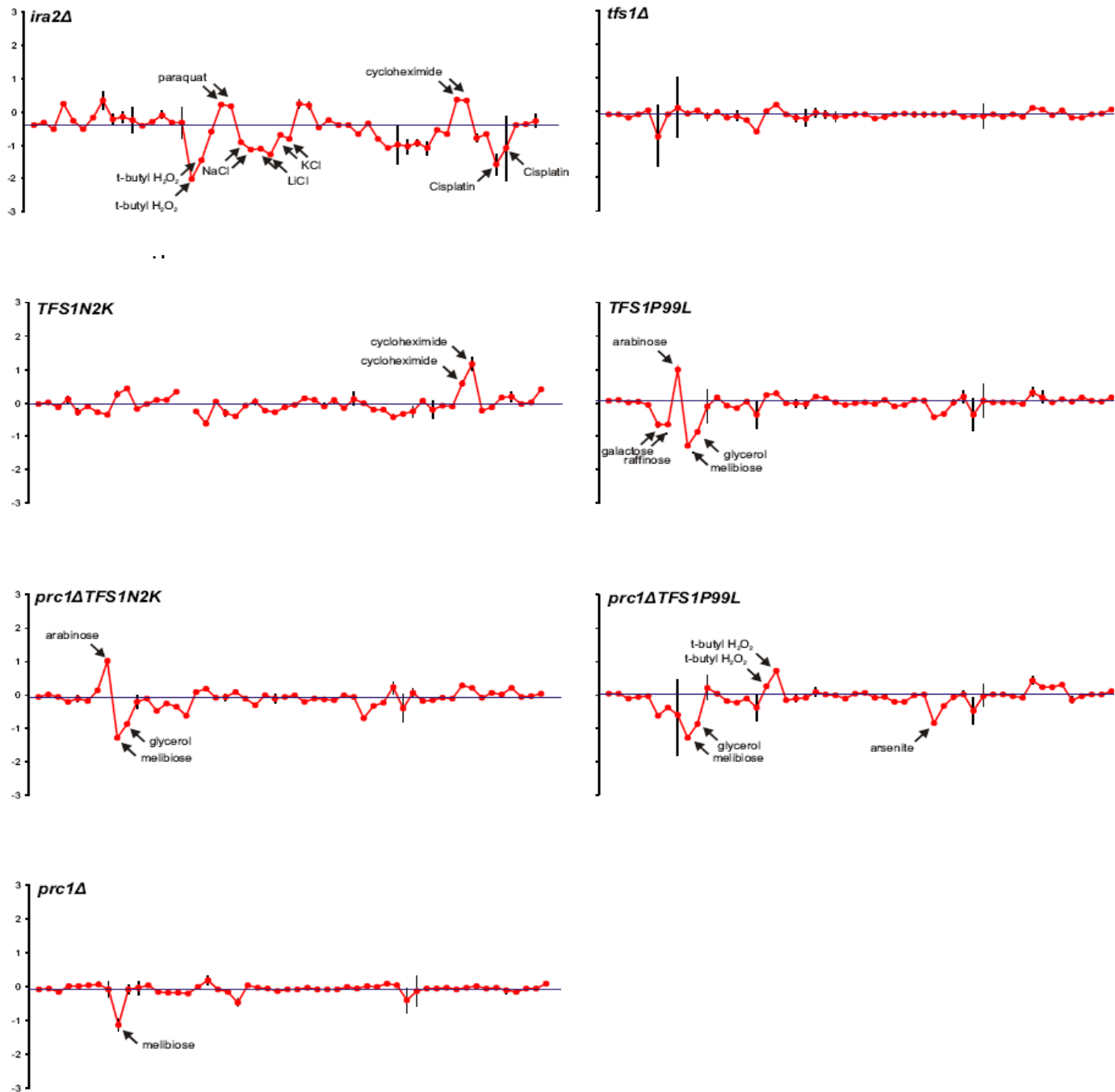
Les mutants ponctuels Tfs1N<sub>2</sub>K et Tfs1P<sub>99</sub>L constituent un véritable outil pour déchiffrer l'importance physiologique de l'inhibition médiée par Tfs1p sur Ira2p et sur CPY. Une série de tests phénotypiques à grande échelle a été réalisée sur des souches dans lesquelles les mutations ponctuelles avaient été intégrées au génome. Une seconde série de tests à moins grande échelle a été réalisée en utilisant des conditions particulières dans lesquelles les levures surproduisent Tfs1p et les mutants Tfs1N<sub>2</sub>K et Tfs1R<sub>162</sub>A.

#### 2.1.2.1. Tests systématiques phénotypiques après intégration au génome des mutations ponctuelles

Les tests systématiques ont tout d'abord été réalisés à grande échelle sur des souches entièrement délétées de *TFS1* ( $\Delta tfs1$ ), *PRC1* ( $\Delta prc1$ ) ou *IRA2* ( $\Delta ira2$ ) ou des souches sauvages ou  $\Delta prc1$  dans lesquelles les mutations ponctuelles de Tfs1p (N<sub>2</sub>K et P<sub>99</sub>L) avaient été intégrées au génome des levures par recombinaison homologue. C'est l'équipe d'A. Blomberg qui a effectué les séries de tests systématiques phénotypiques.

La croissance de ces différentes souches et plus particulièrement trois paramètres caractérisant cette dernière soit le temps de latence, l'efficacité de croissance et la vitesse de croissance des cellules ont été analysés dans différentes conditions environnementales : 31 conditions différentes ont été testées, et certaines d'entre elles ont été utilisées à 2 concentrations différentes ce qui donne un total de 51 conditions environnementales différentes. Ces conditions comprennent : des variations nutritionnelles, des stress en présence d'ions métalliques, des risques environnementaux et des inhibiteurs spécifiques ayant un impact sur une grande gamme de processus cellulaires tel que la rapamycine et la caféine (voie de signalisation), l'hydroxyurée (réplication de l'ADN), le





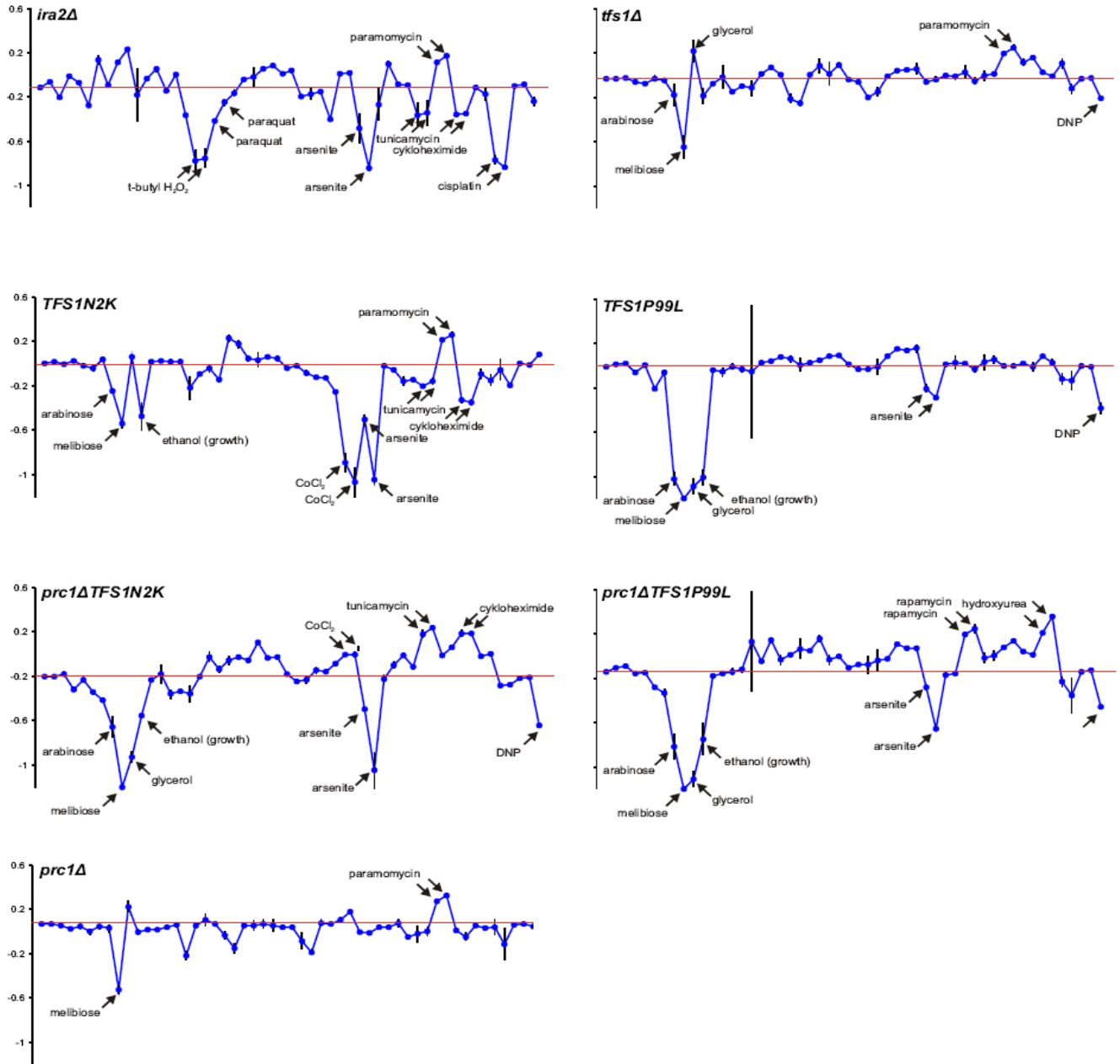
**FIGURE 64A : Tests systématiques phénotypiques – Temps de latence**

Les profils sont basés sur le calcul de la valeur du LSC (n=2). Un LSC négatif indique une sensibilité alors qu'un LSC positif indique une résistance.

cisplatine et le MMS (réparation de l'ADN), le paraquat (stress oxydatif), le DNP (phosphorylation oxydative)... (voir Table 6 dans Matériel et Méthodes). Pour normaliser le comportement de ces souches, un coefficient spécifique, le LSC (Logarithmic Strain coefficient) est chaque fois calculé : quand le LSC est négatif, cela indique une sensibilité de la souche alors qu'un LSC positif indique une résistance.

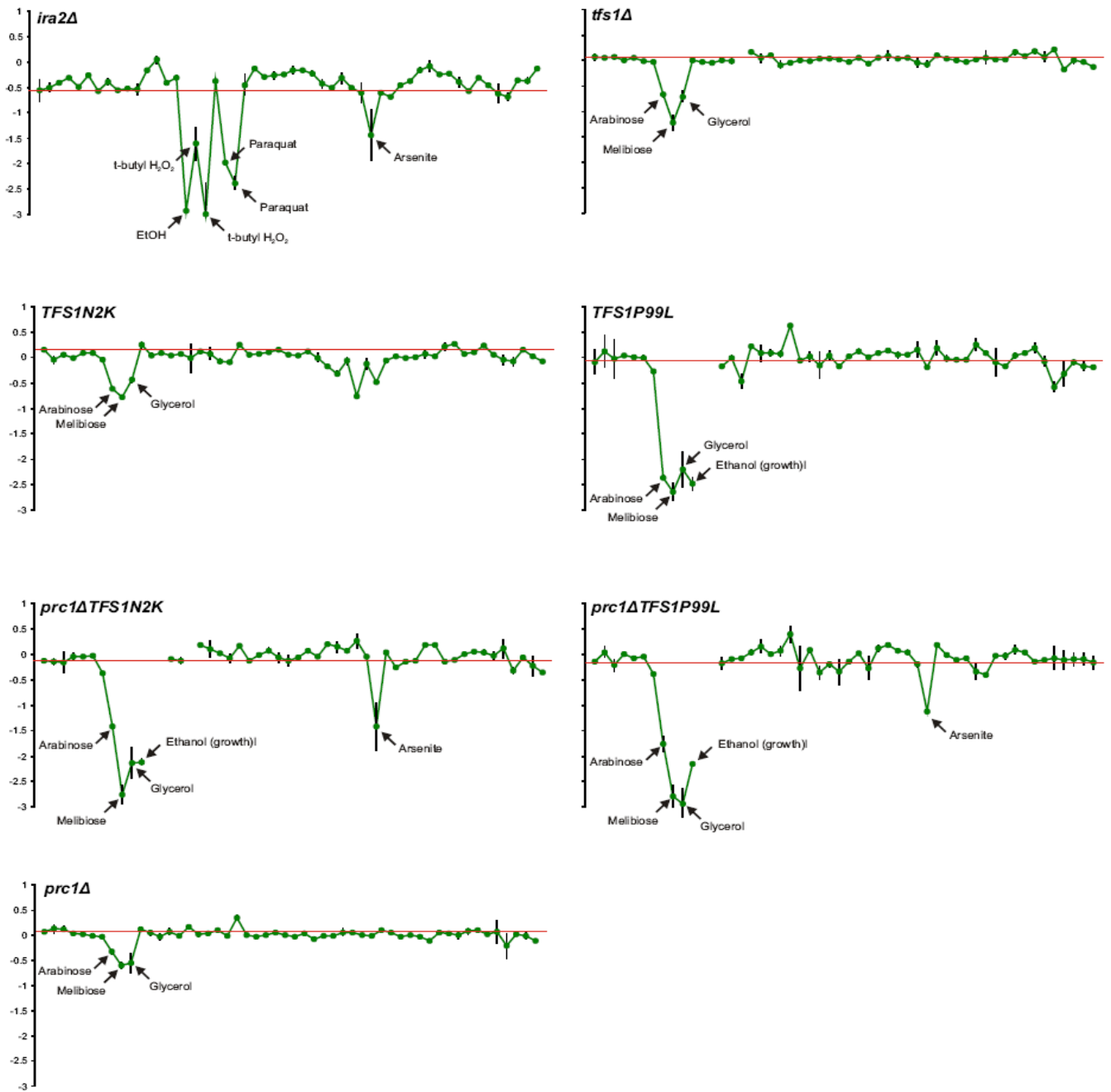
Dans un premier temps, nous avons comparé les profils phénotypiques des souches *Aprc1* et *Aira2* à ceux des souches concernant Tfs1p (*Atfs1*, Tfs1N<sub>2</sub>K et Tfs1P<sub>99</sub>L). Les différences les plus significatives affectent les variables mesurant la vitesse de croissance (FIGURE 64B). Puisque Tfs1p inhibe Ira2p et CPY, les phénotypes de la souche *Atfs1* devraient être opposés à ceux des souches *Aprc1* et *Aira2*. Or la figure 64 montre que ce n'est pas le cas. De plus, les phénotypes des mutants ponctuels intégrés au chromosome sont plus sévères et plus diversifiés que ceux correspondant à une souche *Atfs1*. Effectivement, nous nous attendions pour la souche *Atfs1* à observer des phénotypes correspondant à la somme de ceux des mutants ponctuels et cela n'a pas été le cas. En fait, la souche *Atfs1* possède une croissance réduite sur arabinose et mélibiose comme les deux mutants ainsi qu'une légère résistance à la paramomycine comme Tfs1N<sub>2</sub>K et une légère sensibilité au DNP comme Tfs1P<sub>99</sub>L. Par contre, les deux mutants présentent de nouveaux phénotypes. Certains sont communs aux deux comme une faible croissance sur éthanol et une sensibilité à l'arsenite alors que d'autres sont spécifiques à chaque mutant : sensibilité au CoCl<sub>2</sub> et à la cycloheximide pour Tfs1N<sub>2</sub>K et une faible croissance sur glycérol pour Tfs1P<sub>99</sub>L. Ces nouveaux phénotypes peuvent être expliqués par un déséquilibre entre les deux fonctions inhibitrices de Tfs1p sur Ira2p et sur CPY : la persistance de l'une et l'absence de l'autre donnerait des phénotypes absents de la souche *Atfs1* soit en permettant le renforcement de la fonction restante, soit en créant de nouveaux phénotypes.

Ainsi, les sensibilités à l'arsenite, la cycloheximide et la tunacamycine de la souche Tfs1N<sub>2</sub>K peuvent être comparées à celles de la souche *Aira2* et suggèrent que cela refléterait une augmentation de la capacité de Tfs1N<sub>2</sub>K à inhiber Ira2p peut être en raison de sa plus grande disponibilité cellulaire. Il faut également remarquer que la faible croissance de la souche Tfs1P<sub>99</sub>L sur glycérol et ses problèmes de croissance sur mélibiose, arabinose et éthanol, comparé à Tfs1N<sub>2</sub>K, peuvent être mis en relation avec les défauts d'inhibition d'Ira2p. En fait, la mutation P<sub>99</sub>L pourrait être responsable d'une faible activité de la voie Ras/AMPC/PKA et puisque la PKA active plusieurs enzymes de la voie de la glycolyse, cette voie pourrait être affectée pour le mutant Tfs1P<sub>99</sub>L. Cependant, ces phénotypes de Tfs1P<sub>99</sub>L



**FIGURE 64B : Tests systématiques phénotypiques – Vitesse de croissance**

Les profils sont basés sur le calcul de la valeur du LSC (n=2). Un LSC négatif indique une sensibilité alors qu'un LSC positif indique une résistance.



**FIGURE 64C : Tests systématiques phénotypiques – Efficacité de croissance**

Les profils sont basés sur le calcul de la valeur du LSC (n=2). Un LSC négatif indique une sensibilité alors qu'un LSC positif indique une résistance



ne peuvent provenir uniquement d'une réduction de l'inhibition d'Ira2p puisque la plupart d'entre eux sont aussi présents dans Tfs1N<sub>2</sub>K.

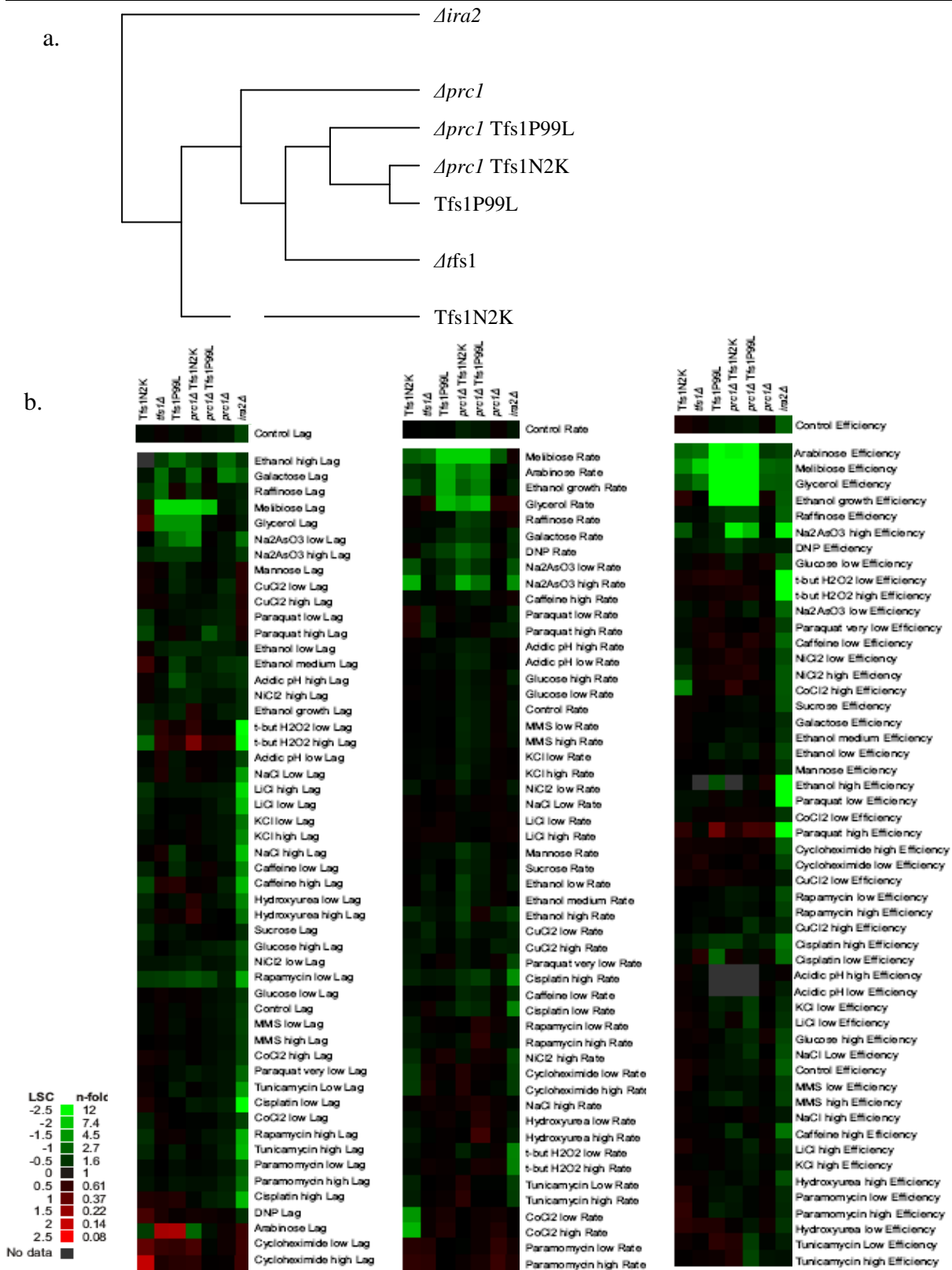
Les souches *Aprc1* Tfs1N<sub>2</sub>K et *Aprc1* Tfs1P<sub>99</sub>L ont aussi été étudiées et comparées aux souches précédentes. Si les seules fonctions de Tfs1p sont l'inhibition de CPY et Ira2p, le phénotype de la souche *Aprc1* Tfs1N<sub>2</sub>K devrait ressembler à celui de la souche *Aprc1* puisque le défaut d'inhibition de CPY ne peut affecter cette souche. Or, les phénotypes spécifiques de *Aprc1* Tfs1N<sub>2</sub>K par rapport à *Aprc1* montrent une croissance faible sur arabinose, glycérol et éthanol et une sensibilité à l'arsenite. Ces résultats suggèrent fortement l'existence d'une autre fonction de Tfs1p qui pourrait être abolie par la mutation N<sub>2</sub>K.

Il est à remarquer que la sensibilité au CoCl<sub>2</sub> et à la cycloheximide, qui reflèterait un déséquilibre entre les deux fonctions inhibitrices de Tfs1p, disparaît dans un contexte *Aprc1*. La souche *Aprc1* Tfs1P<sub>99</sub>L présente des phénotypes similaires à la souche Tfs1P<sub>99</sub>L avec de légères différences (légère résistance à la rapamycine et l'hydroxyurée) qui seraient spécifiques du contexte *Aprc1*. La croissance faible sur arabinose, glycérol, éthanol et la sensibilité à l'arsenite correspondent exactement aux phénotypes de la souche *Aprc1* Tfs1N<sub>2</sub>K et suggèrent fortement que la troisième fonction de Tfs1p est aussi affectée par la mutation P<sub>99</sub>L. Enfin, la sensibilité à l'arsenite est plus forte pour Tfs1N<sub>2</sub>K que pour Tfs1P<sub>99</sub>L et elle est absente dans *Δtfs1*. Ce phénotype, qui semble être lié à la troisième fonction de Tfs1p, pourrait être diminué par l'incapacité de Tfs1P<sub>99</sub>L et de *Δtfs1* à inhiber Ira2p.

Ainsi, cette analyse phénotypique nous a permis de suggérer une troisième fonction de Tfs1p qui reste à identifier. L'inhibition de CPY pourrait être responsable d'une légère résistance à la paramomycine et d'une sensibilité au CoCl<sub>2</sub>, alors que l'inhibition d'Ira2p pourrait causer une légère sensibilité au DNP et une légère résistance à la rapamycine et à l'hydroxyurée dans un contexte *Aprc1*. Ces phénotypes, beaucoup moins marqués que ceux associés à la troisième fonction de Tfs1p indiquent que cette troisième fonction jouerait un rôle prépondérant par rapport aux deux autres dans les conditions testées.

#### 2.1.2.2. Synthèse des tests phénotypiques à grande échelle

Afin d'avoir une vision globale et synthétique des résultats obtenus par l'analyse des tests phénotypiques, un graphique hiérarchisé a été réalisé (FIGURE 65a) et les différentes catégories phénotypiques à grande échelle (temps de latence, vitesse et efficacité de croissance) ont été dissociées pour une meilleure compréhension (FIGURE 65b).



**FIGURE 65 : Bilan des tests systématiques phénotypiques**

a. Graphique hiérarchique

b. Diagramme regroupant les phénotypes des différentes souches d'après le temps de latence, la vitesse et l'efficacité de croissance

En vert est indiquée la sensibilité par rapport à BY4742 ; en rouge la résistance par rapport à BY4742

Ces diagrammes montrent que les phénotypes les plus similaires sont ceux de Tfs1P<sub>99</sub>L et *Δprc1*Tfs1N<sub>2</sub>K. La troisième fonction de Tfs1p est affectée dans ces mutants et l'incapacité de Tfs1P<sub>99</sub>L à inhiber Ira2p pourrait renforcer la fonction inhibitrice de la protéine sur CPY et ainsi conférer des phénotypes similaires à la souche *Δprc1*. Cette similarité entre Tfs1P<sub>99</sub>L et *Δprc1*Tfs1N<sub>2</sub>K indique que le défaut d'inhibition d'Ira2p qui est spécifique à Tfs1P<sub>99</sub>L n'induirait que des changements phénotypiques mineurs dans les conditions testées.

Les phénotypes de la souche *Δprc1*Tfs1P<sub>99</sub>L sont également proches de ceux des souches précédentes ce qui suggère que les phénotypes liés à l'absence de *PRC1* ne constituent pas de changements importants.

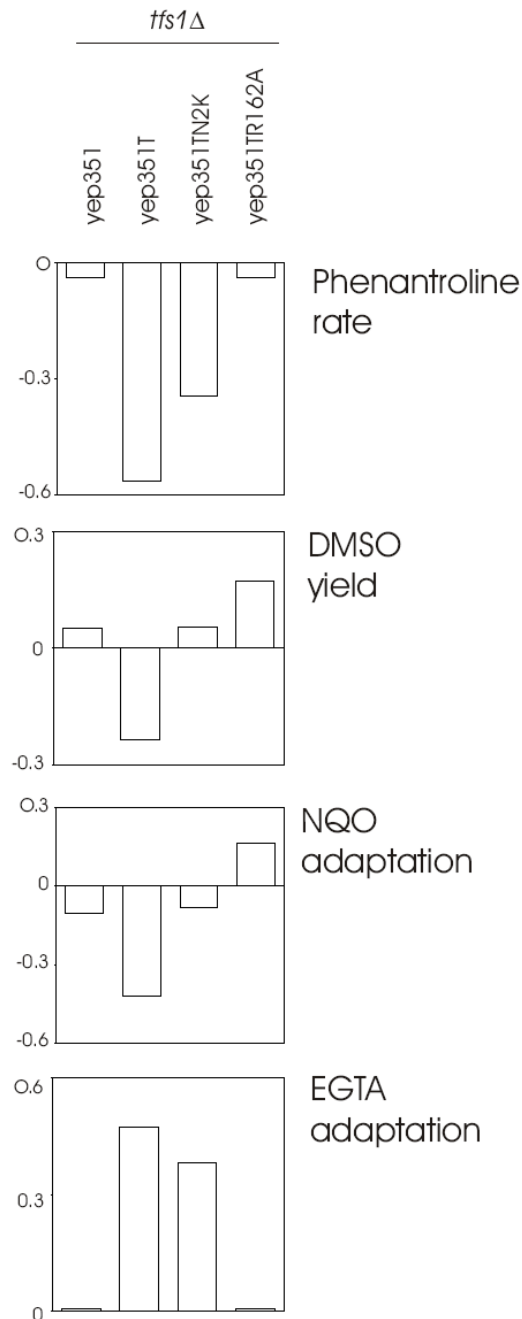
Quant à la souche Tfs1N<sub>2</sub>K, elle semble être plus éloignée des autres souches de Tfs1p. Elle diffère des souches Tfs1P<sub>99</sub>L, *Δprc1*Tfs1P<sub>99</sub>L et *Δprc1* Tfs1N<sub>2</sub>K par le défaut d'inhibition de CPY. Un tel défaut devrait donc induire des phénotypes plus marqués. Une autre différence possible est le déséquilibre entre les deux fonctions inhibitrices de Tfs1p qui devrait être en faveur d'un renforcement de l'activité inhibitrice d'Ira2p. Cette hypothèse est confirmée par les phénotypes similaires de Tfs1N<sub>2</sub>K et *Δira2* concernant le temps de latence en présence de mannose, de cycloheximide, de CuCl<sub>2</sub>, de t-butyl et l'efficacité de croissance en présence de caféine, NiCl<sub>2</sub> et CoCl<sub>2</sub>.

#### 2.1.2.3. Tests systématiques phénotypiques en surproduisant Tfs1p et différentes formes de Tfs1p

De nombreuses études ont montré que Tfs1p est surproduit en réponse à un stress (Fauchon *et al.*, 2002; Gasch *et al.*, 2000; Hasan *et al.*, 2002; Jelinsky & Samson, 1999). Or, la réponse au stress est régulée par la voie Ras/AMPC/PKA et une forte activité de cette voie régule négativement la réponse au stress en inhibant ses facteurs de transcription spécifiques Msn2p et Msn4p. Comme Tfs1p active la voie Ras/AMPC/PKA par son inhibition d'Ira2p, sa surproduction pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'extinction de la réponse au stress.

Nous avons voulu tester l'importance potentielle de la fonction inhibitrice de Tfs1p sur Ira2p en réalisant des tests phénotypiques sur des souches qui surproduisent Tfs1p ou des formes mutantes de Tfs1p (Tfs1N<sub>2</sub>K et Tfs1R<sub>162</sub>A). Le mutant ponctuel affectant la cavité testé est Tfs1R<sub>162</sub>A qui comme Tfs1P<sub>99</sub>L n'interagit pas et n'inhibe pas Ira2p. C'est un test moins large que le précédent qui a été conduit. Seize substances chimiques différentes ont été testées et certaines d'entre elles ont été administrées à deux concentrations différentes ce qui a donné un total de 25 conditions environnementales testées. Comme précédemment, trois





**FIGURE 66 : Tests systématiques phénotypiques dans les conditions où Tfs1p et les différentes formes de Tfs1p sont surproduites**

La souche BY4742ΔT, transformée par Yep351, Yep351T, Yep351TN<sub>2</sub>K, or Yep35TP<sub>99</sub>L est cultivée dans 25 conditions environnementales. L'index phénotypique logarithmique (LPI) est calculé pour le temps de latence, la vitesse et l'efficacité de croissance. Les conditions dans lesquelles le niveau d'expression de TFS1 montre un impact fort (LPI>0.2 et p<0.05) pour la croissance sont reportées sur la figure. Les tests ont été réalisés deux fois.

paramètres caractérisant la croissance ont été mesurées : temps de latence, vitesse et efficacité de croissance. Un indice logarithmique phénotypique (LPI) a ensuite été calculé pour définir l'impact de la drogue sur la croissance de la souche testée.

La figure 66 présente les résultats les plus significatifs de ces tests, où la production de Tfs1p native est responsable d'un phénotype marqué par rapport à la souche de référence BY4742 $\Delta$ tfs1. La production de la forme native de Tfs1p diminue fortement la croissance en présence de phénanthroline. Cette augmentation de sensibilité à la phénanthroline survient aussi lorsque le mutant Tfs1N<sub>2</sub>K (forme inhibant Ira2p) est surproduit. Par contre, la surproduction du mutant Tfs1R<sub>162</sub>A (qui inhibe seulement CPY) ne provoque aucune sensibilité à la phénanthroline. Ces résultats indiquent que la réponse à la phénanthroline, dépendante de Tfs1p, est liée à sa capacité à inhiber Ira2p. Si on regarde la réponse à l'EGTA, la surexpression de *TFS1* induit également un phénotype marqué correspondant à un temps de latence plus court. Cet effet apparaît dépendre uniquement de l'activité altérée de la voie PKA via l'inhibition d'Ira2p. Par contre, en présence de DMSO et de NQO, les effets phénotypiques semblent dépendre de façon moins prononcée de l'inhibition d'Ira2p. Cela pourrait être interprété comme une dépendance mixte vis-à-vis des deux fonctions inhibitrices de Tfs1p ou bien comme une dépendance vis-à-vis de la troisième fonction de Tfs1p.

L'ensemble des réponses phénotypiques obtenues sur les tests des substances chimiques a été rassemblé et des variances ont été calculées pour représenter les différences phénotypiques globales en comparant les différentes formes de Tfs1p. Dans un premier temps, les variances ont été calculées sur chacune des variables logarithmiques de croissance, pour chaque condition et chaque souche testée. Ensuite, une valeur moyenne des variances regroupant toutes les conditions a été calculée pour chaque souche et pour chaque paramètre de croissance. Au final, ces trois variables ont été moyennées en une seule. L'index de variance phénotypique est le rapport de cette variable entre la surproduction de Tfs1p native et celle relative aux mutants de Tfs1p (Table 9).

Ces résultats indiquent que l'inhibition d'Ira2p apparaît généralement comme étant une fonction prépondérante par rapport à l'inhibition de CPY. En effet, les phénotypes observés pour la surproduction du mutant Tfs1N<sub>2</sub>K sont généralement proches de ceux causés par la protéine Tfs1p native. C'est ce qu'indique le faible index de variance dans une souche sauvage ou délétée de *TFS1*. Par contre, les effets induits par la surproduction de Tfs1R<sub>162</sub>A,

Strain background	Phenotypic variance index		Index ratio
	TFS1 vs R162A	TFS1 vs N2K	R162A/N2K
WT	0.0093	0.0022	4.2
tfs1 $\Delta$	0.0100	0.0043	2.3
pro1 $\Delta$	0.0128	0.0014	9.4
ira2 $\Delta$	0.0037	0.0054	0.7

Table 9 : Etude de la similarité des phénotypes des différentes formes de Tfs1p

mutant de la cavité, différent beaucoup plus de la forme sauvage, comme l'indique l'index de variance plus élevé dans ces deux mêmes souches.

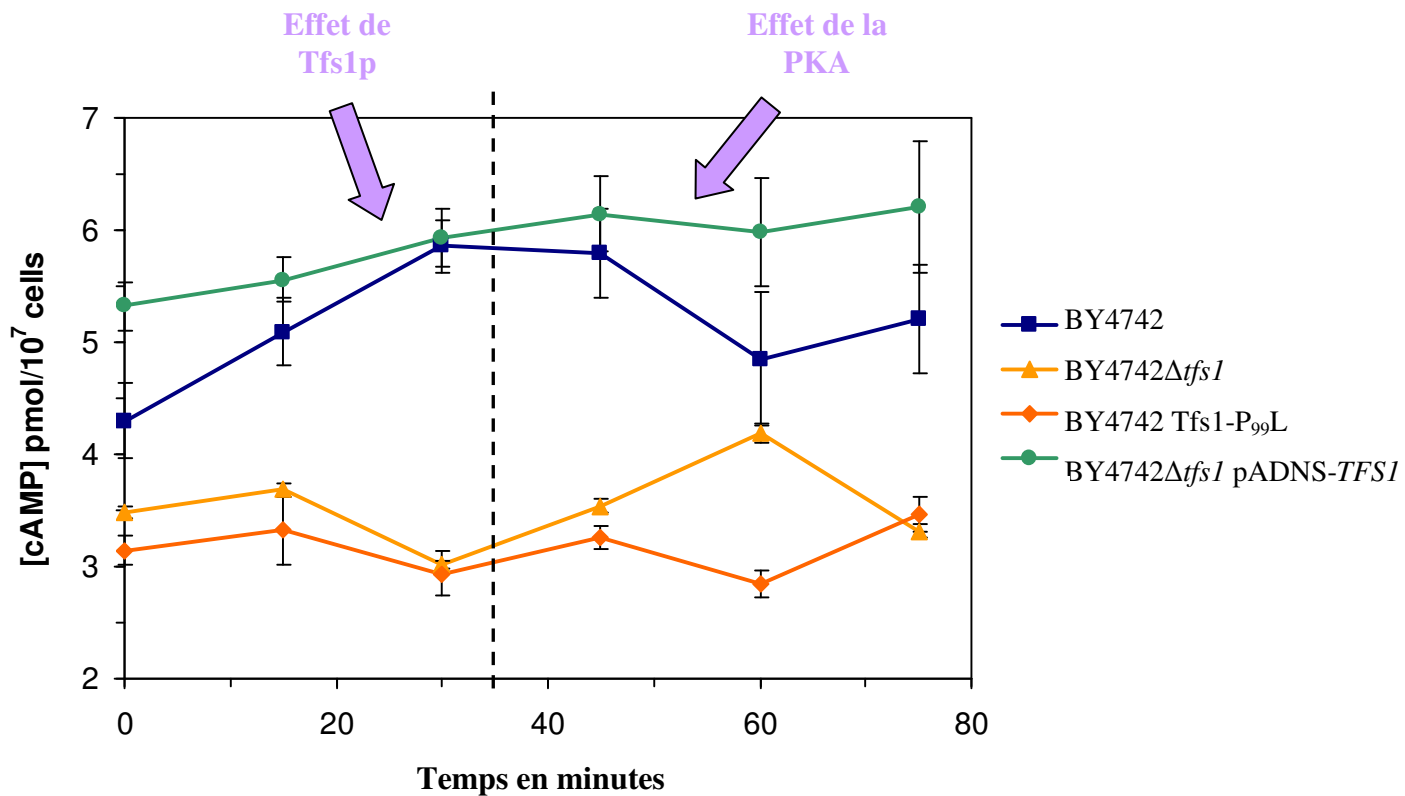
L'analyse de la surexpression des mutants de Tfs1p dans un contexte *Aprc1* ou *Aira2* est aussi très révélatrice. La surexpression de *TFS1R162A* dans une souche *Aprc1*, permet de calculer un index de variance phénotypique 10 fois supérieur à celui du mutant N<sub>2</sub>K dans cette même souche. Cela va dans le sens d'un rôle prépondérant de l'inhibition d'Ira2p par rapport aux autres fonctions de Tfs1p. D'autre part, la surexpression de ces mutants dans une souche *Aira2* révèle des conséquences phénotypiques similaires pour chacun d'entre eux (le rapport des index de variance étant proche de 1). Cela signifie que les conséquences phénotypiques de la surproduction des deux mutants sont proches dans un contexte *Aira2* où l'inhibition d'Ira2p ne peut avoir lieu.

Ces données nous permettent de conclure que dans des conditions de surproduction de Tfs1p, l'inhibition d'Ira2p est prédominante par rapport à celle de CPY. Cela semble être aussi le cas par rapport à la troisième fonction de Tfs1p qui est affectée par les deux mutations. Cependant, une conclusion définitive ne pourra être avancée qu'après avoir testé des conditions environnementales plus larges telles que celles décrites pour les tests précédents. Cette observation est à rapprocher du rôle que pourrait jouer Tfs1p dans le rétrocontrôle négatif de la réponse au stress via l'inhibition d'Ira2p après qu'il ait été surproduit suite à un stress.

## **2.2 Signification physiologique de l'inhibition d'Ira2p par Tfs1p**

La surproduction de la protéine Tfs1p est induite par la réponse générale au stress car *TFS1* a, en amont de son promoteur, deux boîtes STRE (Stress Response Element) qui sont les éléments reconnus par Msn2p et Msn4p, les facteurs de transcription spécifiques à cette réponse. La voie Ras/AMPC/PKA contrôle de nombreux processus physiologiques incluant le contrôle négatif de la résistance au stress. En effet, la PKA phosphoryle le NLS de Msn2p et ainsi empêche l'adressage de Msn2p au noyau et sa fonction de facteur de transcription. On peut donc imaginer que Tfs1p, qui permet l'activation de la voie Ras/AMPC/PKA via son inhibition sur Ira2p, pourrait constituer une boucle de rétrocontrôle négatif de la réponse au stress (FIGURE 34).

Pour valider cette hypothèse, nous avons cherché des preuves moléculaires de cet « effet » de Tfs1p. Pour cela, deux types d'expériences ont été menés : l'étude, après un stress, de



**FIGURE 67 : Etude des variations du taux d'AMPc en condition de stress**

Différentes souches (BY4742, BY4742Δtfs1, BY4742Tfs1P<sub>99</sub>L, BY4742Δtfs1 transformée par pADNS-TFS1) sont cultivées à 26°C jusqu'à un DO comprise entre 0.8 et 1 puis elles subissent un choc thermique à 38°C. Les cellules sont prélevées toutes les 15 minutes, filtrées, puis l'AMPc est extrait par l'acide perchlorique et des cycles de congélation dans l'azote liquide. Après centrifugation, le surnageant est neutralisé avec un tampon carbonate de potassium. Le pH du surnageant est ajusté à pH6.5. Le surnageant est ensuite soumis à un dosage de l'AMPc à l'aide d'un kit de dosage de type ELISAT (the correlate-EIA cyclic AMP kit, Assay Designs).

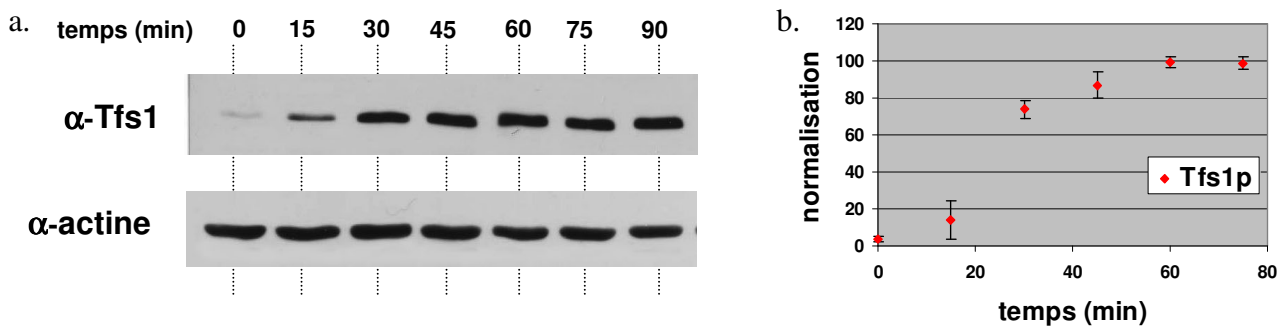
la variation de l'AMPc dans les cellules et l'étude, après un stress, de l'expression du gène *HSP12*, contrôlé par les facteurs de transcription Msn2p et Msn4p.

### 2.2.1. Etude du taux d'AMPc dans la cellule en condition de stress

Le taux d'AMPc chez la levure *S.cerevisiae* fait l'objet d'une forte régulation. La synthèse d'AMPc par l'adénylate cyclase nécessite l'activation d'au moins une des deux protéines Ras1p et Ras2p (Toda *et al.*, 1985). Ira1p et Ira2p régulant négativement les deux protéines Ras, elles ont une action négative sur le taux d'AMPc (Tanaka *et al.*, 1990a). La synthèse de l'AMPc est aussi régulée positivement par le système Gpr1p/Gpa2p en réponse à l'addition de glucose (Colombo *et al.*, 1998). Il existe également deux phosphodiésterases, Pde1p et Pde2p, capables de réduire le niveau d'AMPc en le transformant en AMP. La régulation la plus drastique est celle exercée par le rétrocontrôle de la PKA en réponse à une accumulation d'AMPc (Nikawa *et al.*, 1987). Ainsi, dans une souche où l'activité de la PKA est réduite (Tpkweak), le taux d'AMPc mesuré est 1000 fois plus important que dans une souche où l'activité PKA est normale.

Lorsque les cellules subissent un choc thermique, la concentration en AMPc augmente dans un premier temps pendant les 30 premières minutes puis diminue suite au rétrocontrôle de la PKA. Comme cela a été mis en évidence par Wang *et al.* (2004a), le taux d'AMPc est donc multiplié par deux dans une souche sauvage puis revient au niveau initial. Nous avons aussi obtenu pratiquement ce type de courbe pour les trois essais que nous avons effectué sur la souche sauvage (FIGURE 67 ; courbe bleue). Si Tfs1p joue un rôle dans le rétrocontrôle négatif de la réponse au stress en inhibant Ira2p, on devrait observer des différences dans la variation du taux d'AMPc au cours de la réponse au stress en faisant varier la quantité de Tfs1p. On peut ainsi s'attendre à une absence de l'augmentation du taux d'AMPc en absence de Tfs1p puisque la voie Ras/AMPc/PKA sera moins active.

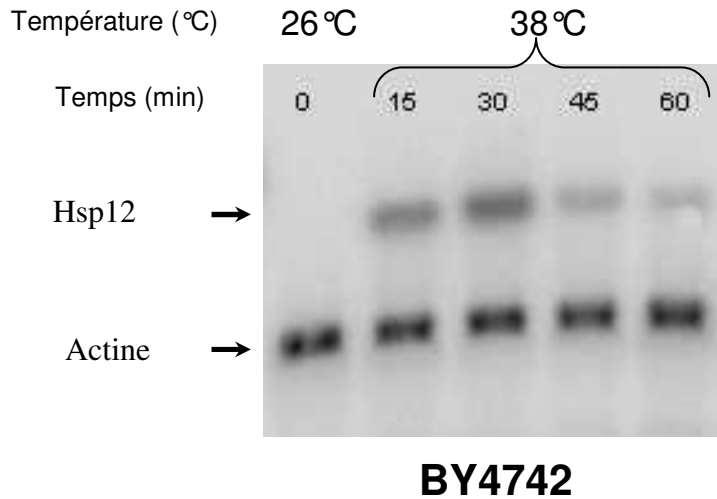
Dans une souche délétée de *TFS1* (FIGURE 67 ; courbe orange), on observe aucune variation significative du taux d'AMPc au cours d'un choc thermique. D'autre part, le niveau basal d'AMPc est plus faible que dans la souche sauvage. Il semble donc que l'absence de Tfs1p empêche l'augmentation du taux d'AMPc puisque la voie Ras/AMPc/PKA n'est pas, alors, activée. Le comportement de la souche BY4742Tfs1P<sub>99</sub>L (FIGURE 67 ; courbe rouge) est similaire à celui de la souche  $\Delta tfs1$ . Ces résultats sont cohérents car la mutation ponctuelle empêche l'interaction et l'inhibition d'Ira2p donc la voie Ras/AMPc/PKA n'est pas activée non plus.



**FIGURE 68 : Expression de la protéine Tfs1p après un choc thermique**

a. Des cellules BY4742 sont cultivées à 26°C jusqu'à atteindre une DO comprise entre 0.8 et 1. Elles subissent ensuite un stress thermique à 38°C. Les extraits protéiques sont réalisés toutes les 15 minutes et sont analysés par Western blot en utilisant les anticorps anti-Tfs1 et anti-actine. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à la peroxydase et le western blot est révélé par chimioluminescence.

b. Chaque point a été quantifié et le rapport Tfs1/Actine est porté sur le graphe pour normaliser les valeurs



**FIGURE 69 : Etude de l'expression du gène *HSP12* après un choc thermique**

Des cellules BY4742 sont cultivées à 26°C jusqu'à atteindre une DO comprise entre 0.8 et 1. Elles subissent ensuite un choc thermique à 38°C. Les ARN messagers sont extraits toutes les 15 minutes et sont analysés par Northern blot avec deux sondes radioactives, *HSP12* et *ACT1* (contrôle interne).

Concernant les résultats de la surproduction de Tfs1p, la voie Ras/AMPC/PKA est encore plus active car *TFS1* est sous la dépendance d'un promoteur fort constitutif. Ceci explique que le niveau basal du taux d'AMPC dans la souche BY4742 pADNS-*TFS1* (FIGURE 67 ; courbe verte) soit plus élevé que dans la souche sauvage. D'autre part, l'augmentation du taux d'AMPC est dissociée de la réponse au stress, comme cela est le cas pour la surproduction de Tfs1p.

Ces résultats obtenus vont dans le sens d'une participation de Tfs1p à un rétrocontrôle négatif de la réponse au stress.

### **2.2.2. Etude de la cinétique de production de Tfs1p après un stress**

Nous avons cherché à savoir quelle était la cinétique de production de Tfs1p après un choc thermique dans la cellule. Pour cela, des cellules BY4742 sont cultivées à 26° et soumises à un stress thermique à 38°C. Puis des échantillons sont prélevés toutes les 15 minutes afin d'en extraire les protéines. Les résultats sont analysés par western blot et sont présentés sur la figure 68. La production de Tfs1p commence au bout de 15 minutes et atteint un plateau vers 45 minutes. La production de la protéine reste stable dans le temps au moins pendant 90 minutes.

Cette cinétique est tout à fait en accord avec les résultats obtenus précédemment pour le dosage du taux d'AMPC dans la cellule en condition de stress. En effet, le taux d'AMPC augmente jusqu'à 30 minutes pour atteindre un maximum, ce qui correspond au début de la surproduction de Tfs1p. Malgré le plateau de production de Tfs1p, le taux d'AMPC diminue ensuite vraisemblablement à cause du rétrocontrôle efficace de la PKA.

### **2.2.3. Etude après un stress de l'expression d'un gène contrôlé par Msn2p/Msn4p**

Pour étudier ce phénomène de boucle de rétrocontrôle, nous avons suivi par Northern Blot l'expression d'un gène contrôlé par les facteurs de transcription Msn2p/Msn4p, le gène codant la protéine chaperonne Hsp12p (contenant 5 éléments STRE dans son promoteur). Les expériences ont été menées dans des cellules normales (BY4742 ou BY4742 pADNS), des cellules délétées de *TFS1* (BY4742 $\Delta$ *tfs1*), des cellules produisant le mutant



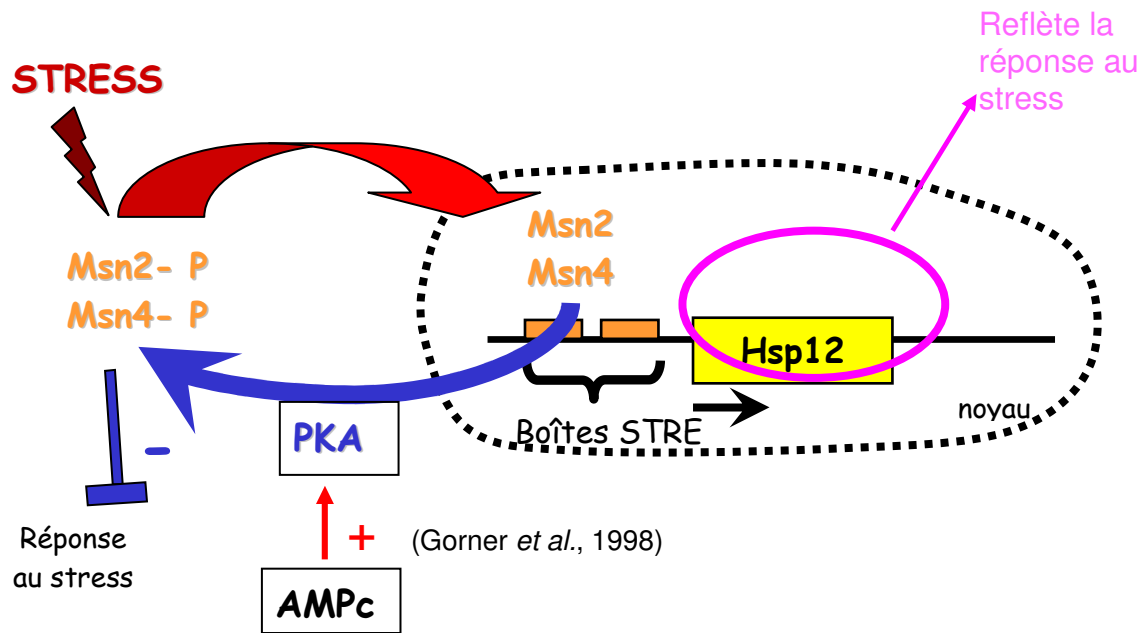


FIGURE 70 : Schéma de la réponse au stress

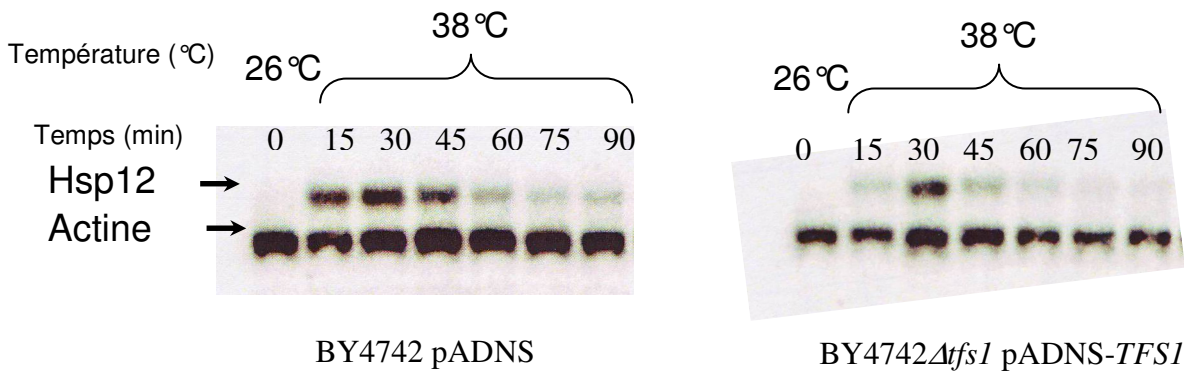


FIGURE 71 : Etude de l'expression du gène *HSP12* après un choc thermique dans une souche surproduisant Tfs1p

Des cellules BY4742 transformées par pADNS et BY4742Δ*tfs1* par pADNS-*TFS1* sont cultivées à 26°C jusqu'à atteindre une DO comprise entre 0.8 et 1. Elles subissent ensuite un choc thermique à 38°C. Les ARN messagers sont extraits toutes les 15 minutes et sont analysés par Northern blot avec deux sondes radioactives, *HSP12* et *ACT1* (contrôle interne).

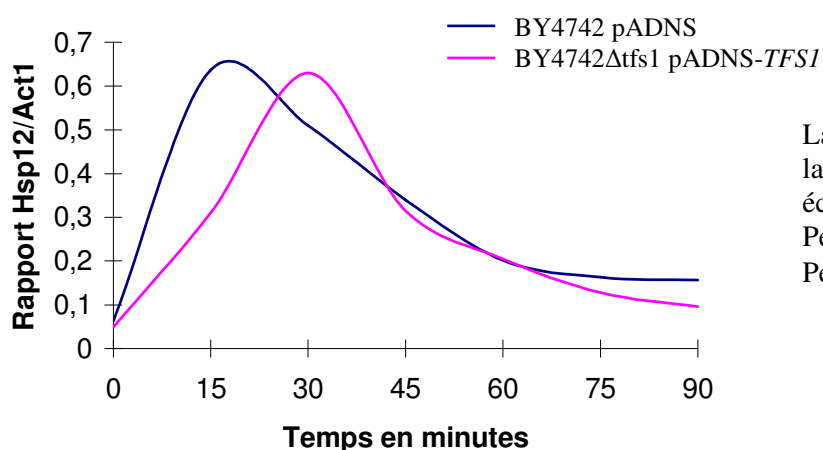


FIGURE 72 : Etude du rapport *Hsp12/Act1*

La pente correspondant à la partie descendante de la courbe est calculée en traçant celle-ci sur une échelle semi-logarithmique.

Pente pour BY4742 pADNS : -0.154

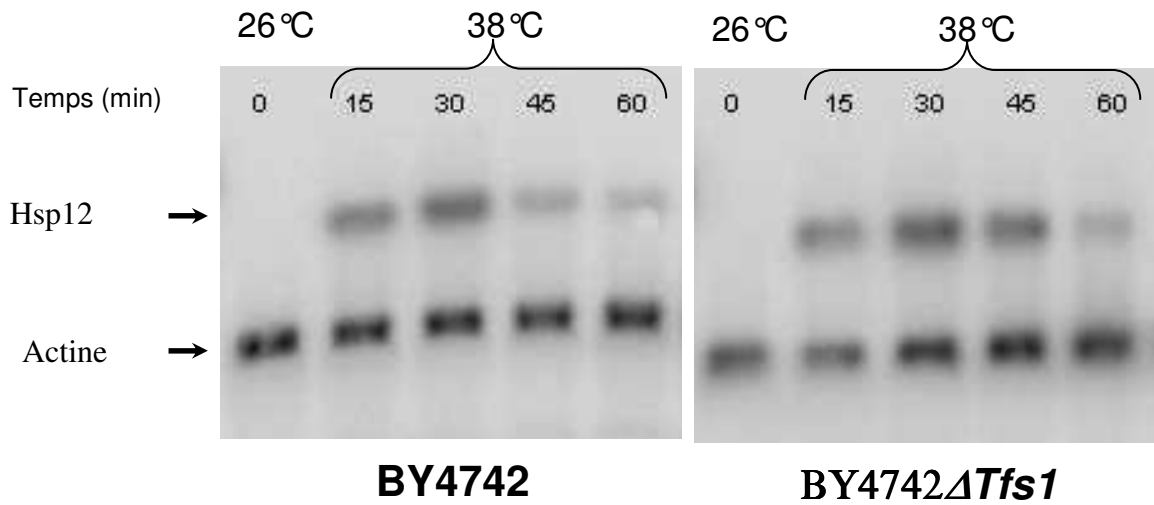
Pente pour BY4742Δ*tfs1* pADNS-*TFS1* : -0.2125

Tfs1P<sub>99</sub>L (BY4742 Tfs1P<sub>99</sub>L) ou des cellules surproduisant Tfs1p native (BY4742 $\Delta$ tfs1 pADNS-*TFS1*) en condition de choc thermique. Les cellules, après avoir poussé à 26°C, sont placées sous agitation à 38°C (choc thermique). Des prélèvements de cellules sont réalisés toutes les 15 minutes et les ARN messagers sont extraits pour permettre l'analyse de l'expression de *HSP12* par Northern blot avec une sonde radioactive *HSP12* et une sonde radioactive *ACT1* (constituant l'étalon interne). Les expériences n'ont pas été réalisées sur l'ensemble des souches lors de la même manipulation. Or, les résultats ne sont directement comparables pour ce type d'expérience que si les souches en question sont traitées simultanément. C'est pourquoi, chaque souche intéressante (BY4742 $\Delta$ tfs1 pADNS-*TFS1* et BY4742 $\Delta$ tfs1) a été manipulée simultanément et exactement dans les mêmes conditions qu'une souche témoin (BY4742 pADNS et BY4742). Chaque expérience a été refaite au moins à trois reprises et les mêmes résultats ont été reproduits chaque fois.

Comme nous le voyons sur la figure 69, des cellules BY4742 soumises à un choc thermique surexpriment *HSP12* au bout de 15 minutes et cette expression est maximale à 30 minutes. Après 45 minutes, la surexpression diminue, témoignant d'une extinction de la réponse au stress. Nous pensons que Tfs1p pourrait jouer un rôle dans ce phénomène d'extinction.

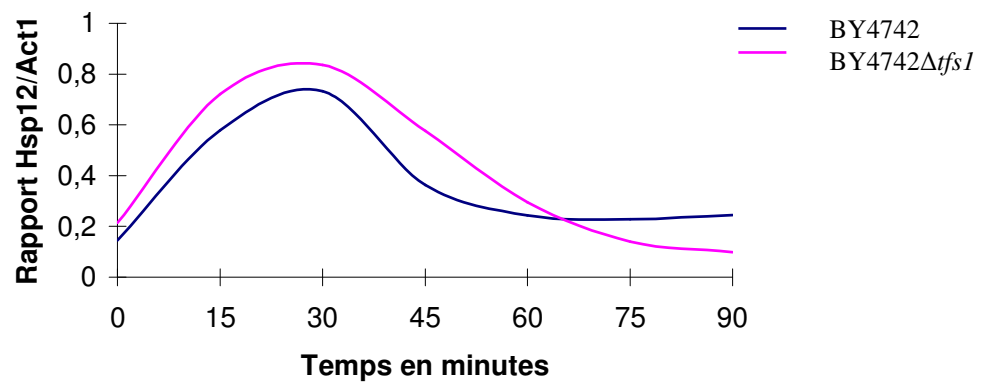
Théoriquement, suite à un choc thermique, les facteurs de transcription Msn2p/Msn4p vont être activés et transloqués au noyau pour se fixer aux séquences STRE (FIGURE 70) et permettre l'activation de la transcription de *HSP12*. La réponse au stress est alors induite. Si, comme le suggèrent les expériences mesurant le taux d'AMPc, Tfs1p joue un rôle dans le contrôle négatif de la réponse au stress, nous devrions pouvoir observer une réponse au stress plus faible dans une souche surexprimant *TFS1* de façon découplée au stress.

Pour cela, la surproduction de Tfs1p a été réalisée en utilisant un plasmide multicopie appelé pADNS et possédant un promoteur constitutif ADH1 derrière lequel *TFS1* a été introduit. La réponse observée est présentée sur la figure 71. Le rapport Hsp12/Actine a été mesuré pour chaque point afin de tenir compte de la variation de charge des échantillons sur le gel (FIGURE 72). Ce rapport qui reflète la réponse au stress a, de façon reproductible, un maximum décalé dans une souche surproduisant Tfs1p par rapport à une souche sauvage. Ainsi, dans des cellules où la voie Ras/AMPc/PKA est plus forte, la réponse au stress apparaît être légèrement retardée par rapport à une souche sauvage. D'autre part, la pente de la deuxième partie de la courbe qui traduit la vitesse d'extinction de la réponse au stress est plus



**FIGURE 73 : Etude de l'expression du gène *HSP12* après un choc thermique**

Des cellules BY4742 et BY4742Δ*tfs1* sont cultivées à 26°C jusqu'à atteindre une DO comprise entre 0.8 et 1. Elles subissent ensuite un stress thermique à 38°C. Les ARN messagers sont extraits toutes les 15 minutes et sont analysés par Northern blot avec deux sondes radioactives, *HSP12* et *ACT1* (contrôle interne).



**FIGURE 74 : Etude du rapport Hsp12/Act1**

La pente correspondant à la partie descendante de la courbe est calculée en traçant celle-ci sur une échelle semi-logarithmique.

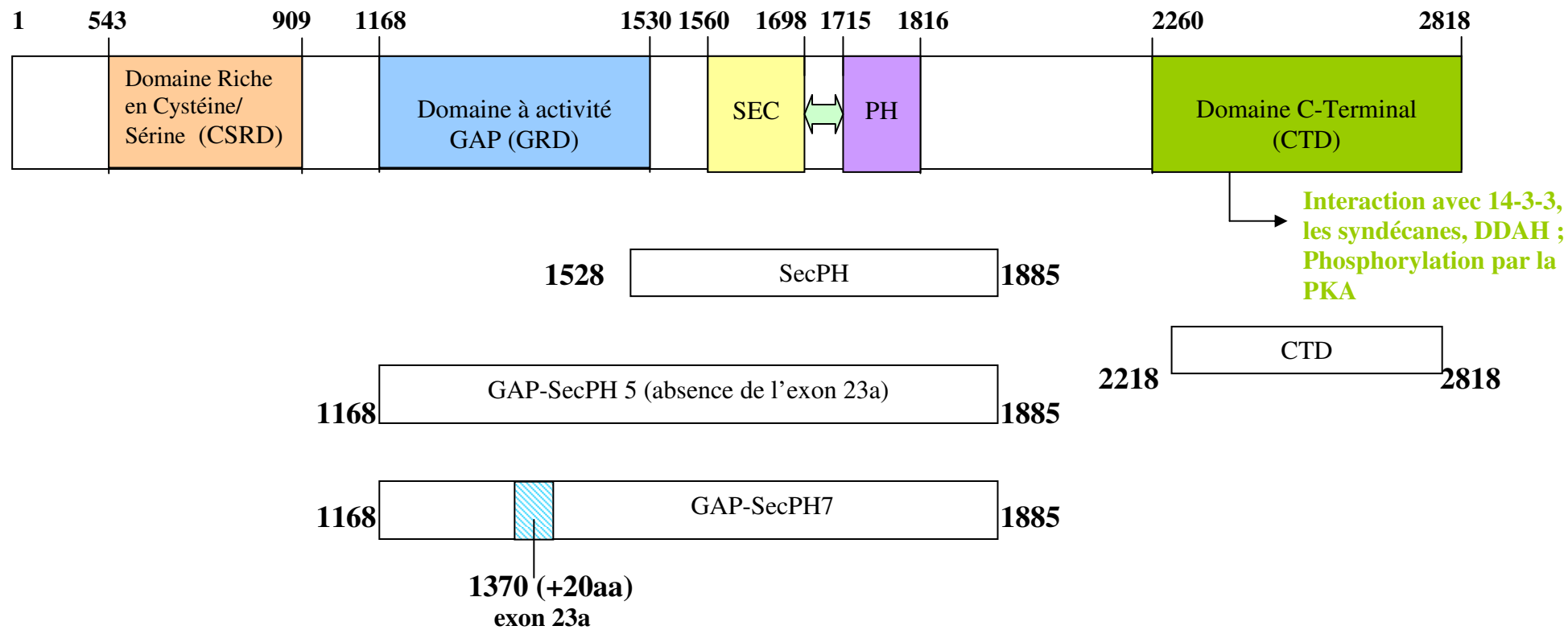
Pente pour BY4742 : -0.369

Pente pour BY4742Δ*tfs1* : -0.2705

élevée pour BY4742 $\Delta$ tfs1 pADNS-*TFS1* que pour BY4742 pADNS. Cela traduit une extinction plus rapide de la réponse au stress. Afin de confirmer ce premier résultat, une expérience identique a été réalisée dans une souche délétée de *TFS1*. Le résultat obtenu est présenté sur la figure 73. Comme l'indique la courbe du rapport Hsp12/Act1 (FIGURE 74), le pic d'expression de *HSP12* se situe à 30 minutes pour les deux souches et ne subit pas de décalage. Par contre, l'extinction de la réponse au stress est ralentie pour une souche délétée de *TFS1*. En effet, la pente de la deuxième partie de la courbe est plus élevée pour la souche sauvage que la souche  $\Delta$ tfs1.

Nous observons donc une prolongation faible mais significative de la réponse au stress en absence de Tfs1p ce qui est un argument en faveur de notre hypothèse sur le rôle de Tfs1p dans la boucle de rétrocontrôle négatif de la réponse au stress.

Cette cinétique de l'expression de *HSP12* est en accord avec les résultats obtenus pour l'induction de la production de Tfs1p en condition de stress. En effet, l'expression de *HSP12* est induite dès 15 minutes, ce qui correspond au début de la surproduction de Tfs1p. Il est cohérent que des gènes induits par la réponse générale au stress soient exprimés en même temps. L'expression de *HSP12* diminue dès 45 minutes ce qui correspond au plateau de la surproduction de Tfs1p. Cela est tout à fait cohérent avec un effet de Tfs1p sur l'extinction de la réponse au stress. Il est cependant clair qu'à ce niveau là de la réponse au stress, d'autres facteurs que le rôle de Tfs1p interviennent ce qui rend la démonstration moins claire qu'avec l'expérience précédente sur l'AMPc.



NB : le nombre d'acide aminé total (2818aa) correspond à Nf1 sans l'exon 23a

⇔ Peptide connecteur

**FIGURE 75: Représentation des différents fragments de Nf1**

### 3. ETUDE DE LA REGULATION DE LA NEUROFIBROMINE

#### 3.1 Etude de l'interaction entre les PEBPs et Nf1

Cette étude est basée sur les données publiées en 2004 par Chautard *et al.* qui ont mis en évidence chez la levure une interaction entre les protéines Tfs1p et Ira2p. En effet, d'après l'analyse des banques de données, nous savons que ces deux protéines ont des homologues humains qui sont respectivement les PEBPs et Nf1. De nombreux mécanismes importants pour la vie et la survie de la cellule sont conservés au cours de l'évolution. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à regarder si cette interaction, mise en évidence chez la levure, pouvait être conservée chez les mammifères.

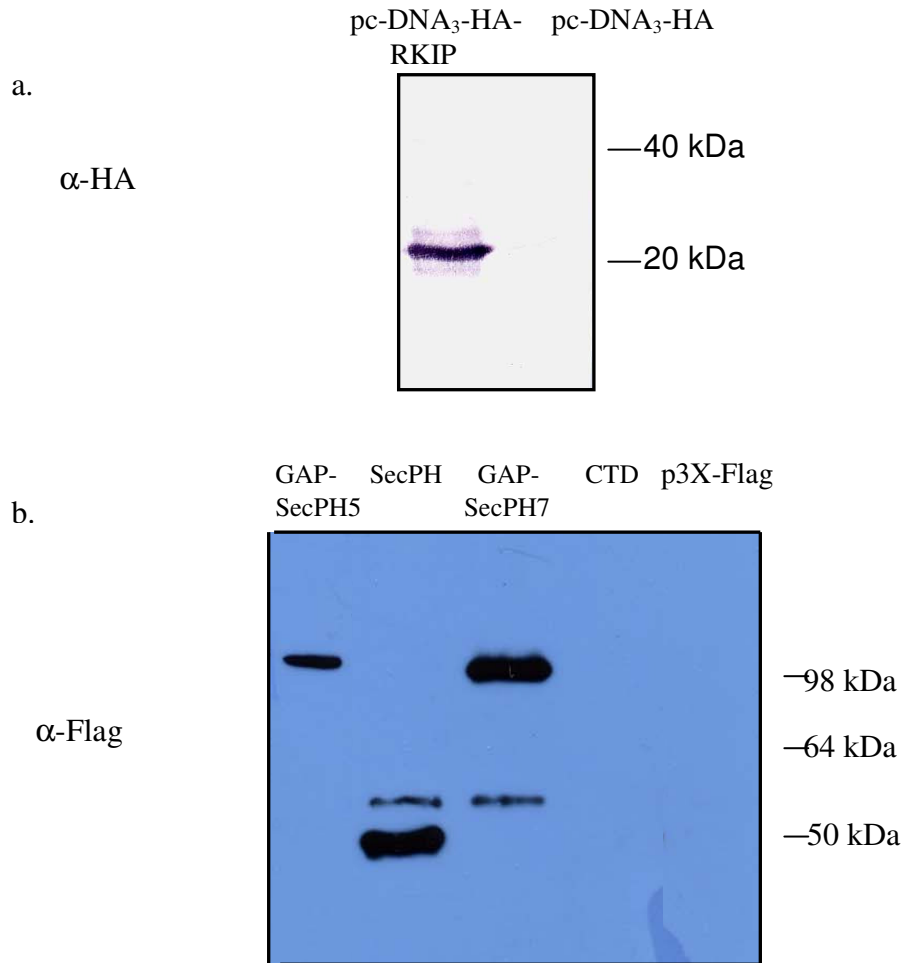
##### 3.1.1. Etude de l'interaction RKIP/Nf1 dans les cellules COS-7

###### 3.1.1.1. Vérification de l'expression de *RKIP* et *NF1* dans les cellules COS-7

Les cellules COS-7 ont été choisies pour les premiers essais de co-immunoprécipitation car il s'agit de cellules faciles à cultiver et à transfecter.

La séquence correspondant au gène *RKIP* a été clonée dans le vecteur pcDNA<sub>3</sub>-HA. La protéine Nf1 étant une très grosse protéine de 2818 résidus, nous avons choisi dans un premier temps de ne pas travailler sur la protéine entière pour nos expériences de co-immunoprécipitation. En effet, nous avons vu précédemment que Nf1 s'organisait selon différentes régions. Deux domaines structuraux bien définis ont été mis en évidence : GRD, domaine portant l'activité GAP (GTPase activating protein) et SecPH, module d'interaction protéique (D'Angelo *et al.*, 2006). Nous nous sommes intéressés à ces deux domaines adjacents en travaillant sur des constructions GAP-SecPH et SecPH (FIGURE 75). Nous nous sommes également intéressés à une autre région de la protéine, le domaine CTD (C-terminal domain), qui est connu pour être la zone d'interaction avec une protéine 14-3-3 (Feng *et al.*, 2004), avec la DDAH (Tokuo *et al.*, 2001) et les syndécanes (Hsueh *et al.*, 2002).

De plus, un épissage alternatif a lieu au niveau du domaine GAP. Nous nous sommes ainsi intéressés aux deux isoformes du domaine GAP dans le contexte de la construction GAP-SecPH. L'isoforme la plus abondante exclut l'exon 23a : nous avons appelé cette construction GAP-SecPH5 dans notre étude. Le seconde isoforme, moins abondante, possède cet exon 23a. La construction a été appelée GAP-SecPH7 (FIGURE 75).



**FIGURE 76 : Vérification de l'expression de *RKIP* et des fragments de Nf1 dans les cellules COS-7**

Quatre millions de cellules COS-7 ont été électroporés avec 5 $\mu$ g de différents plasmides ayant les séquences codantes de nos protéines d'intérêt (pcDNA<sub>3</sub>-HA-*RKIP*, pcDNA<sub>3</sub>-HA, p3X-Flag-SecPH, p3X-Flag-GAP-SecPH5, p3X-Flag-GAP-SecPH7 et p3X-Flag-CTD, p3X-Flag), les cellules sont lysées dans un tampon Tris-HCl pH7.5 50mM, Triton X-100 1%, NaCl 100mM, NaF 50mM, EDTA 5mM, contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases appropriés. (a) Les échantillons sont chargés sur gel d'acrylamide 15%, un anticorps anti-HA puis un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline sont utilisés et le western blot est révélé par colorimétrie. (b) Les échantillons sont chargés sur gel d'acrylamide 8%, un anticorps anti-flag puis un anticorps secondaire couplé à la peroxydase sont utilisés et le western blot est révélé par chimioluminescence.

Nous avons cloné les séquences correspondant aux domaines SecPH, GAP-SecPH5, GAP-SecPH7 et CTD dans le vecteur p3X-flag.

Toutes ces constructions possédant les différents inserts ont été envoyées à séquencer pour éliminer d'éventuelles erreurs de la Taq polymérase. L'intérêt de cloner dans ces vecteurs est la présence d'une étiquette (étiquette HA pour RKIP et Flag pour les fragments de Nf1) qui nous permettra de repérer nos protéines d'intérêt.

La production de chaque protéine a été vérifiée en analysant les lysats, contenant les extraits totaux protéiques, par Western blot (FIGURE 76). *RKIP* s'expriment correctement puisque la protéine est détectée par Western blot à la taille attendue soit 20kDa.

En ce qui concerne les fragments correspondant aux domaines SecPH et GAP-SecPH de Nf1, ils sont produits et facilement détectés par chimioluminescence aux tailles attendues soit environ 42kDa pour SecPH et 83kDa pour GAP-SecPH. La faible différence de taille entre les deux domaines GAP-SecPH5 et 7 (23 résidus soit environ 2kDa) n'est pas détectable par western blot.

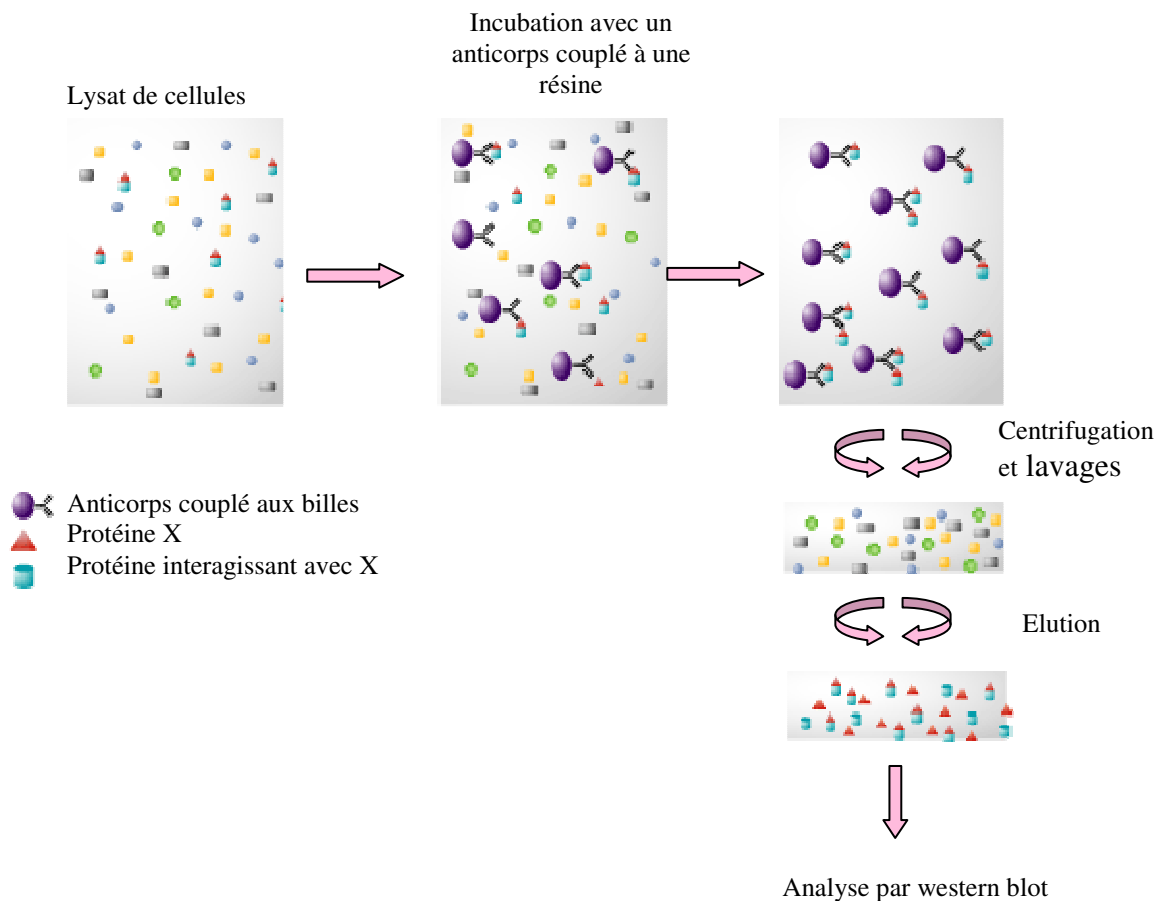
D'autre part, il m'a été impossible de détecter le fragment CTD de Nf1 même en exposant le film plus longtemps. Plusieurs expériences ont été répétées, mais à aucun moment le fragment CTD n'a pu être détecté. Nous avons alors décidé de concentrer nos efforts sur les fragments SecPH et GAP-SecPH5 et 7.

#### 3.1.1.2.Co-immunoprécipitation dans les cellules COS-7

RKIP est la PEBP humaine la plus connue et la plus décrite dans la littérature. De plus, comme Nf1, elle est fortement exprimée dans le cerveau. Pour savoir si RKIP interagissait avec Nf1, une expérience de double hybride avait précédemment été réalisée avec le domaine de Nf1 correspondant au domaine TBD d'Ira2p (déterminé par alignement) mais sans résultat positif. Cependant, dans la levure, les modifications post-traductionnelles n'ont pas lieu ce qui pouvait expliquer l'absence d'interaction.

C'est pourquoi, nous avons utilisé une autre méthode de choix pour mettre en évidence une éventuelle interaction entre RKIP et Nf1 qui est la co-immunoprécipitation. Cette technique (FIGURE 77) vise à enrichir une solution à la fois en une protéine donnée mais aussi en ses partenaires dont on pourra révéler la présence ensuite par Western blot.





**FIGURE 77 : Principe de la co-immunoprécipitation**

Un anticorps couplé à une résine est incubé avec un lysat cellulaire ou un mélange de protéines. Une série de lavages/centrifugations permet d'éliminer les protéines non fixées. La dernière étape est l'éluion qui permet de récupérer le complexe protéique, qui sera ensuite analysé par western blot.

*3.1.1.2.1. Co-immunoprécipitation Nf1/RKIP dans des cellules COS-7*

Des co-transfections par électroporation dans des cellules COS-7 ont été réalisées avec les plasmides pcDNA<sub>3</sub>-HA-RKIP et p3X-flag-GAP-SecPH7, p3X-flag-GAP-SecPH5 ou p3X-flag-SecPH. Le témoin négatif correspond au vecteur pcDNA<sub>3</sub>-HA-RKIP co-transfecté avec le plasmide p3X-flag vide et inversement, chaque fragment de Nf1 est co-transfecté avec le plasmide pcDNA<sub>3</sub>-HA.

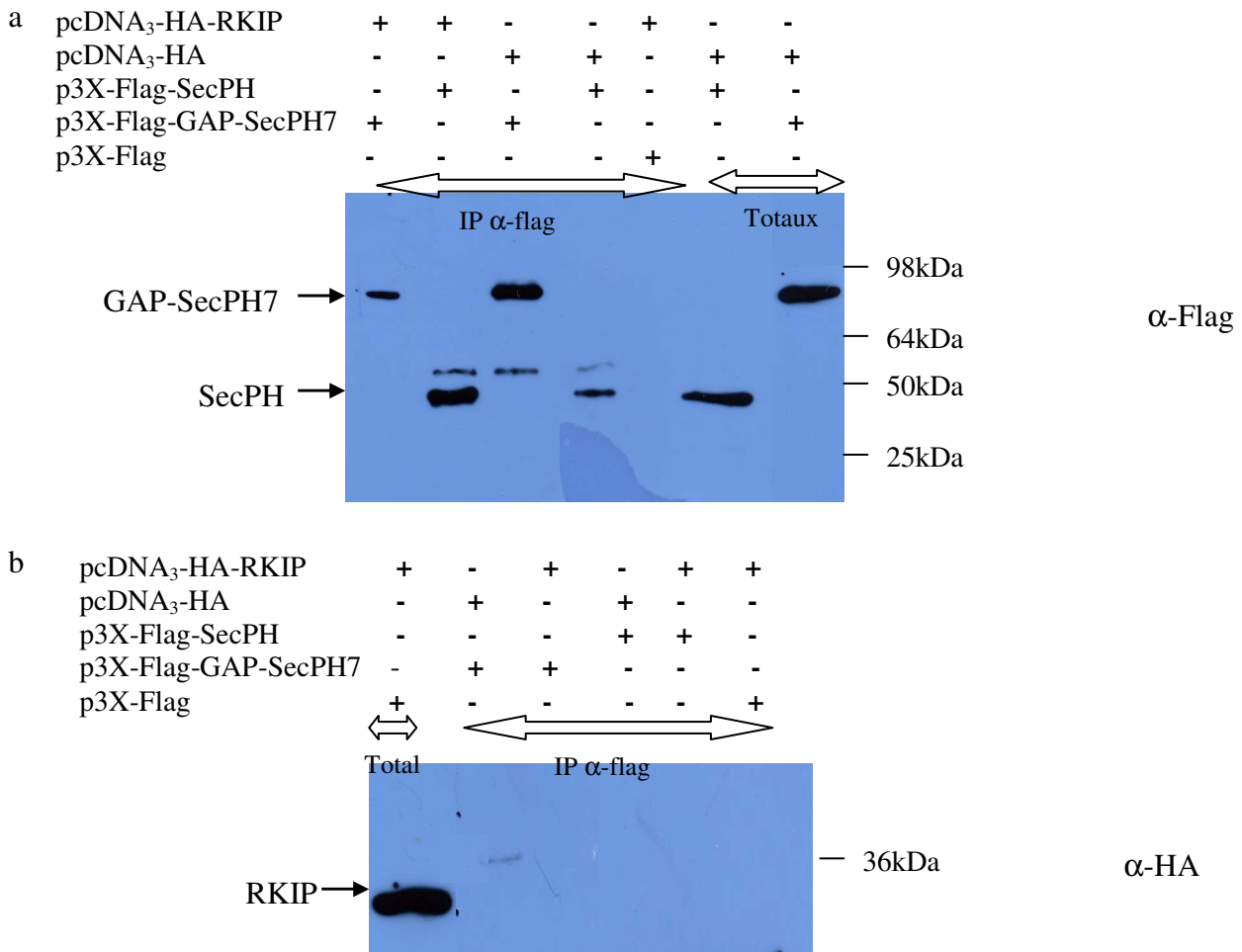
Après incubation des cellules co-transfectées, les cellules sont lysées dans un tampon contenant 1% de Triton X-100. Le lysat est ensuite incubé avec des billes d'agarose couplées à un anticorps anti-HA. Les résultats ne sont pas concluants. L'immunoprécipitation contre RKIP fonctionne car la protéine est bien enrichie. Cependant, lorsque l'on regarde si les fragments de Nf1 sont co-immunoprécipités avec RKIP, on remarque un bruit de fond correspondant à GAP-SecPH ou SecPH dans les témoins négatifs suggérant une fixation non spécifique des fragments de Nf1 aux billes (résultats non montrés).

Pour pallier à ce problème, de nouveaux essais ont été réalisés en inversant la manipulation. L'immunoprécipitation a été effectuée sur des lysats de cellules COS-7 co-transfectées comme précédemment avec des billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-flag. De cette manière, les fragments de Nf1 sont immunoprécipités spécifiquement. Par contre, de nouveau, si on regarde si RKIP est co-immunoprécipitée avec les fragments de Nf1, une bande non spécifique correspondant à la taille de RKIP est révélée (résultats non montrés). RKIP se fixerait aux billes qu'il y ait Nf1 ou pas.

*3.1.1.2.2. Co-immunoprécipitation Nf1/RKIP avec des billes couplées à l'anticorps anti-flag dans des cellules COS-7 et élution avec le peptide flag*

Dans l'objectif de m'affranchir de la non spécificité des bandes détectées, j'ai de nouveau réalisé une co-immunoprécipitation avec des billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-flag. La particularité de cette manipulation est l'élution, réalisée de manière compétitive c'est à dire à l'aide d'un peptide flag afin d'induire une compétition entre les protéines fusionnées à l'étiquette flag et l'anticorps lié aux billes.

Des co-transfections par électroporation dans des cellules COS-7 ont été réalisées avec les plasmides pcDNA<sub>3</sub>-HA-RKIP et p3X-flag-GAP-SecPH7 ou p3X-flag-SecPH. Le témoin négatif correspond au vecteur pcDNA<sub>3</sub>-HA-RKIP co-transfecté avec le



**FIGURE 78 : Co-immunoprécipitation Nf1/RKIP avec des billes couplées à un anticorps anti-flag dans des cellules COS-7**

Des co-transfections de cellules COS-7 ont été réalisées avec 5µg de différents plasmides comme le montre le signe + dans le tableau ci-dessus. Une co-immunoprécipitation avec des billes d'agarose couplées à un anticorps anti-flag est effectuée. (a) Après élution avec le peptide flag, 5µl de chaque éluat sont chargés sur gel d'acrylamide 8%, puis le western blot correspondant est incubé avec l'anticorps anti-flag pour vérifier l'efficacité d'immunoprécipitation. (b) L'autre partie des échantillons (25µl) est chargée sur gel d'acrylamide 15%, et le western blot correspondant est incubé avec l'anticorps anti-HA afin de voir si RKIP est co-immunoprécipitée avec les fragments de Nf1.

Les western blot ont été révélés par chimioluminescence après incubation avec des anticorps secondaires couplés à la peroxydase.

La double flèche indique les pistes correspondant aux immunoprécipitats (IP α-flag) ou aux extraits totaux.

plasmide p3X-flag vide et inversement, chaque fragment de Nf1 est co-transfecté avec le plasmide pcDNA<sub>3</sub>-HA.

Après incubation des cellules co-transfectées, les cellules sont lysées dans un tampon contenant 1% de Triton X-100. Le lysat est ensuite incubé avec des billes d'agarose couplées à des anticorps anti-Flag. Après lavages des billes, celles-ci sont incubées avec le peptide flag puis le surnageant est récupéré pour constituer l'éluat.

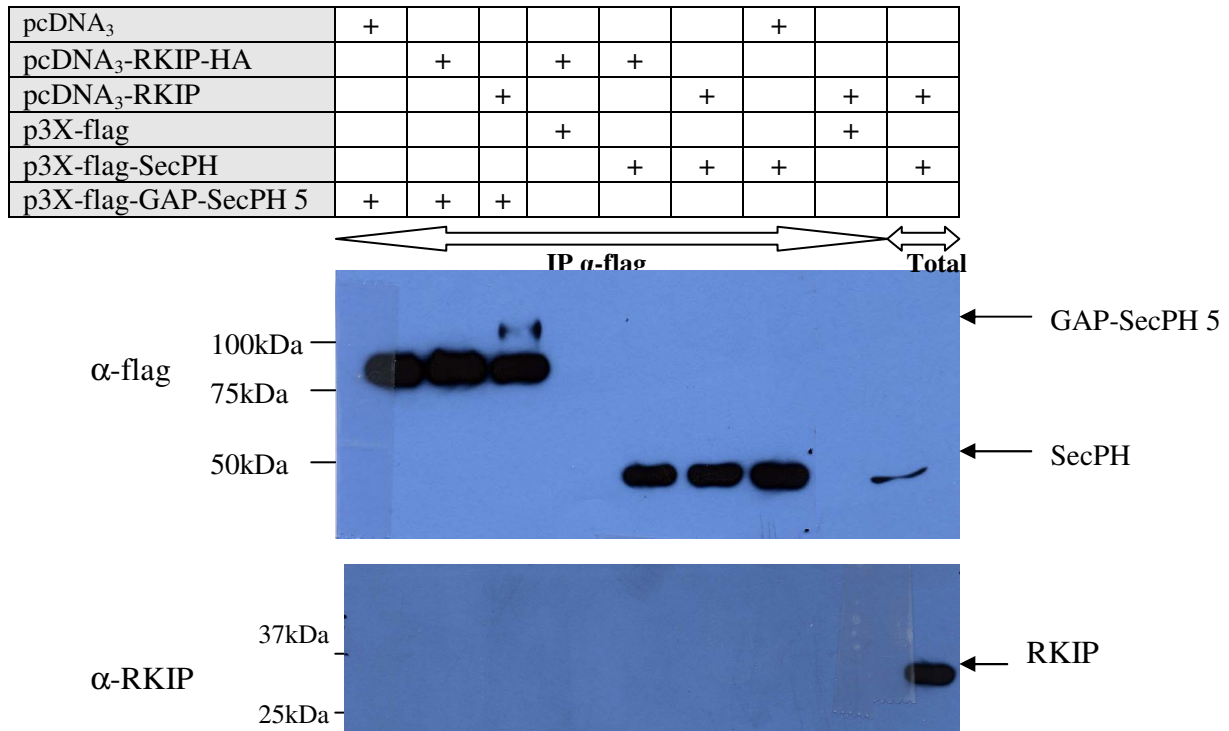
L'analyse des échantillons totaux révèle que les fragments de Nf1 et *RKIP* s'expriment dans les cellules COS-7 (FIGURE 78). De plus, on remarque que les fragments GAP-SecPH7 et SecPH de Nf1 ont été immunoprécipités de manière spécifique. Par contre, lorsque les éluats sont révélés par l'anticorps anti-HA pour détecter la présence de *RKIP*, on remarque que l'on ne détecte pas celle-ci dans les immunoprécipitats. Cependant, l'élution avec le peptide flag nous a permis d'éliminer la fixation non spécifique aux billes.

Des résultats identiques (non montrés) ont été obtenus avec GAP-SecPH5.

#### *3.1.1.2.3. Co-immunoprécipitation Nf1/RKIP avec des billes couplées à l'anticorps anti-flag dans des cellules COS-7 et influence de l'étiquette*

Dans les expériences précédentes de co-immunoprécipitation, *RKIP* est étiqueté en N-terminal par un épitope HA. Nous avons voulu tester si la place de l'étiquette pour *RKIP* ou la présence même d'une étiquette pouvait jouer un rôle sur l'interaction éventuelle entre *RKIP* et Nf1. Pour cela, la séquence codante pour *RKIP* a été clonée dans le vecteur pcDNA<sub>3</sub>, car il existe des anticorps dirigés contre la protéine *RKIP*. *RKIP* a aussi été clonée dans le même vecteur mais avec l'étiquette HA positionnée en C-terminal. Ce test concernant les étiquettes n'a pas été appliqué à Nf1 car GAP-SecPH et SecPH sont des fragments de la protéine et il n'existe pas d'anticorps spécifiques contre ces fragments.

Les résultats sont présentés sur la figure 79 qui nous montre que l'immunoprécipitation anti-flag réalisée sur des cellules COS-7 transfectées par les plasmides p3X-flag-GAP-SecPH5 et p3X-flag-SecPH a fonctionné puisque les domaines SecPH et GAP-SecPH sont détectés, tandis que le témoin correspondant au vecteur p3X-flag vide est, comme attendu, négatif. Des résultats identiques (non montrés) ont été obtenus en transfectant p3X-Flag-GAP-SecPH7.



**FIGURE 79 : Co-Immuno-précipitation RKIP/Nf1 dans des cellules COS-7 (billes d'agarose couplées à un anticorps anti-flag)**

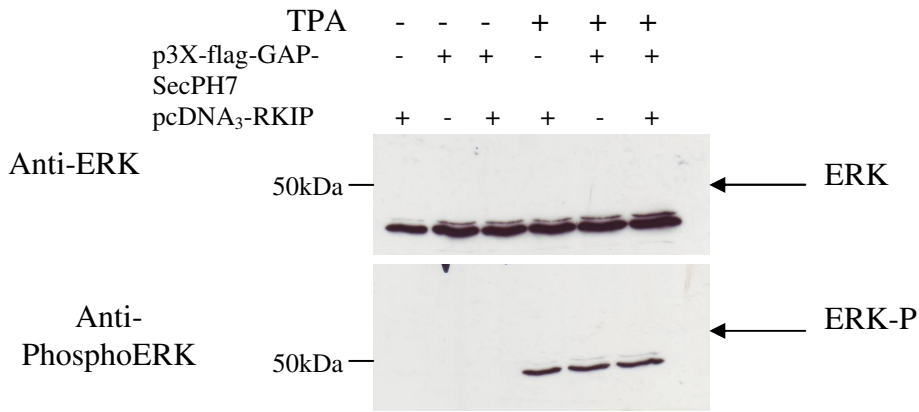
Des co-transfections de cellules COS-7 ont été réalisées avec 5 $\mu$ g de différents plasmides comme le montre le signe + dans le tableau ci-dessus. Une co-immunoprécipitation avec des billes d'agarose couplées à un anticorps anti-flag est effectuée. Après élution avec le peptide flag, 5 $\mu$ l de l'éluat sont chargés sur gel d'acrylamide 8%, puis le western blot correspondant est incubé avec l'anticorps anti-flag pour vérifier l'efficacité d'immunoprécipitation. L'autre partie des échantillons (25 $\mu$ l) est chargée sur gel d'acrylamide 15%, et le western blot correspondant est incubé avec l'anticorps anti-RKIP afin de voir si RKIP est co-immunoprécipitée avec les fragments de Nf1. Les western blot ont été révélés par chimioluminescence après incubation avec des anticorps secondaires couplés à la peroxydase. La double flèche indique les pistes correspondant aux immunoprécipités (IP  $\alpha$ -flag) ou aux extraits totaux.

Lorsque l'immunoprécipitation anti-flag est réalisée sur des extraits de cellules COS-7 co-transfectées avec p3X-flag-GAP-SecPH5 ou p3X-flag-SecPH et pcDNA<sub>3</sub>-RKIP ou pcDNA<sub>3</sub>-RKIP-HA, la révélation du Western blot avec l'anticorps polyclonal dirigé contre RKIP ou l'anticorps anti-HA nous montre que *RKIP* (FIGURE 79) et *RKIP-HA* (résultats non montrés) sont bien exprimées dans les extraits totaux. Cependant, RKIP ou RKIP-HA ne sont révélées dans aucune des pistes correspondant aux éluats de co-immunoprécipitation. L'absence d'étiquette ou sa position en C-terminal n'a pas rendu possible l'interaction entre RKIP et les fragments de Nf1.

Bien que les expériences d'immunoprécipitation fonctionnant, aucune interaction n'a pu être mise en évidence dans les conditions testées. Nous avons donc essayé de modifier certains paramètres de la lyse ou de l'activation de voies de signalisation cellulaire qui pourraient influencer l'interaction.

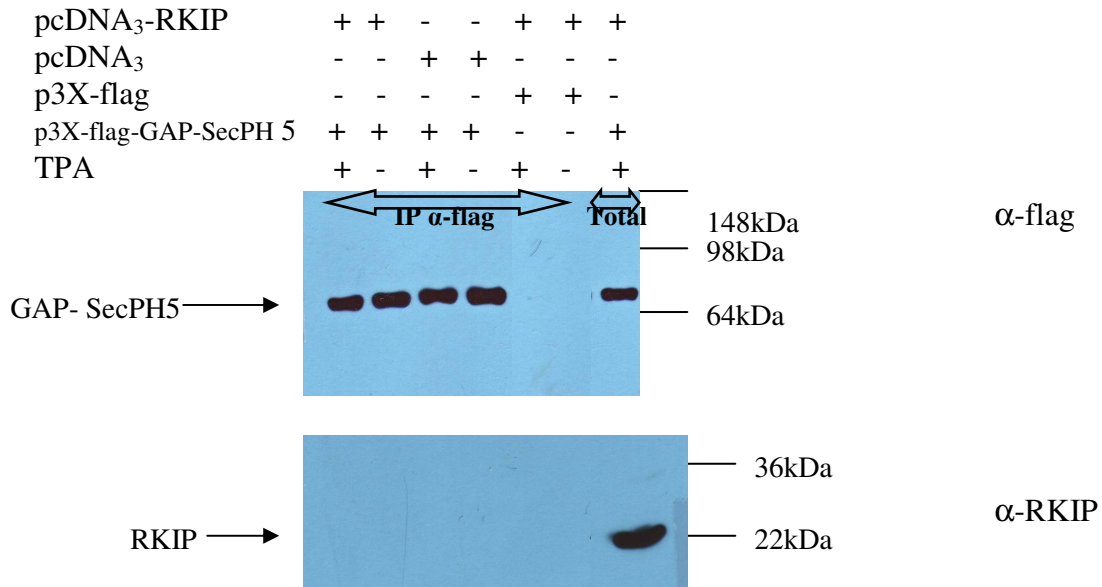
#### 3.1.1.3. Co-immunoprécipitation Nf1/RKIP avec des billes couplées à l'anticorps anti-flag dans des cellules COS-7 après activation de la PKC et lyse dans un tampon 0.1% Triton X-100

Plusieurs données dans la littérature nous ont conduits à nous interroger sur certaines conditions pendant nos expériences de co-immunoprécipitation et plus particulièrement sur les conditions de lyse des cellules. Notamment, il est décrit que l'interaction entre RKIP et Raf-1 est une interaction faible et labile (Yeung *et al.*, 1999). Aussi, cette interaction n'est visible que dans des conditions de lyse douces c'est à dire sans utiliser de détergent. Il faut donc jouer sur les conditions de lyse pour ne pas rompre l'interaction au moment où l'on récupère les protéines. Ces données ont suggéré que l'interaction entre RKIP et Nf1, si elle existe, peut être aussi fragile que celle entre RKIP et Raf-1. C'est pourquoi nous avons lysé les cellules en diminuant la concentration de Triton X-100 (en passant de 1% à 0.1%), mais également par sonication dans du PBS, sans détergent. De plus, Lorenz *et al.* (2003) ont montré que RKIP peut être phosphorylée par la PKC sur la sérine 153, ce qui provoque non seulement la dissociation du complexe Raf-1/RKIP mais également l'association de RKIP-S<sup>153</sup>P avec la kinase Grk2. Il est donc possible que ce soit sous sa forme phosphorylée que RKIP interagisse avec Nf1. La PKC est activée lorsque les cellules sont traitées avec un ester de phorbol : le TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol



**FIGURE 80 : Vérification de l'action du TPA**

Des extraits totaux de cellules COS-7 co-transfectées par les plasmides p3X-flag-GAP-SecPH7 et pcDNA<sub>3</sub>-RKIP ont été chargés sur gel d'acrylamide. Après transfert, la membrane de western blot est incubée avec l'anticorps anti-ERK pour vérifier la présence de la protéine dans les extraits totaux, et avec l'anticorps anti-phosphoERK pour voir si le TPA est actif en phosphorylant ERK. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à la peroxydase et les western blot sont révélés par chimioluminescence.



**FIGURE 81 : Co-immunoprécipitation RKIP/Nf1 après traitement au TPA dans des cellules COS-7 lysées dans un tampon 0.1% Triton X-100 (billes d'agarose couplées à un anticorps anti-flag)**

Des co-transfections de cellules COS-7 ont été réalisées avec 5µg de différents plasmides comme le montre le signe + dans le tableau ci-dessus. Après transfection, les cellules sont privées de sérum 16 heures avant le traitement au TPA (800nM, 30 min) puis la lyse est effectuée dans un tampon contenant du Triton X-100 0.1% et des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Une co-immunoprécipitation avec des billes d'agarose couplées à un anticorps anti-flag est effectuée. Après élution avec le peptide flag, une partie des échantillons (5µl) est chargée sur gel d'acrylamide 8%. Le western blot correspondant est incubé avec l'anticorps anti-flag pour vérifier l'efficacité de l'immunoprécipitation. L'autre partie des échantillons (25µl) est chargée sur gel d'acrylamide 15% et le western blot correspondant est incubé avec l'anticorps anti-RKIP afin de voir si RKIP est co-immunoprécipitée avec Nf1. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à la peroxydase et les western blot sont révélés par chimioluminescence.

Les doubles flèches indiquent les pistes correspondant aux immunoprécipités (IP α-flag) ou aux extraits totaux.

13-acetate). Corbit *et al.* (2003) ont réalisé la cinétique de production de RKIP après activation au TPA. La phosphorylation maximum semble être atteinte aux environs de 30 minutes.

La protéine Nf1 est également phosphorylée par la PKC (Mangoura *et al.*, 2006). Cependant, les sites putatifs de phosphorylation sont majoritairement en amont du domaine GAP dans le domaine CSRD. Il n'est pas exclu cependant que les fragments de Nf1 (SecPH et GAP-SecPH) soient phosphorylés par la PKC après activation de cette dernière. Mangoura *et al.* (2006) ont réalisé la cinétique de phosphorylation de Nf1 après activation au TPA. Il apparaît que cette dernière est très rapide et maximale après 5 minutes.

Nous avons donc co-transfecté des cellules COS-7 par p3X-flag-GAP-SecPH5 ou p3X-flag et pcDNA<sub>3</sub>-RKIP ou pcDNA<sub>3</sub>. 24 heures après l'électroporation, les cellules co-transfectées sont privées de sérum pendant 16 heures puis le TPA (800nM) est ajouté pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite lysées en conditions douce dans un tampon contenant 0.1% de Triton X-100.

L'action du TPA est vérifiée en analysant des extraits protéiques totaux. Si le TPA est actif, il doit avoir pour conséquence la phosphorylation de ERK, qui sera détectée par western blot avec l'anticorps anti-phosphoERK. Ces résultats sont présentés sur la figure 80 qui montre que le TPA utilisé est actif puisqu'il a été capable de provoquer la phosphorylation de ERK. Cet ester de phorbol sera donc utilisé dans nos expériences suivantes.

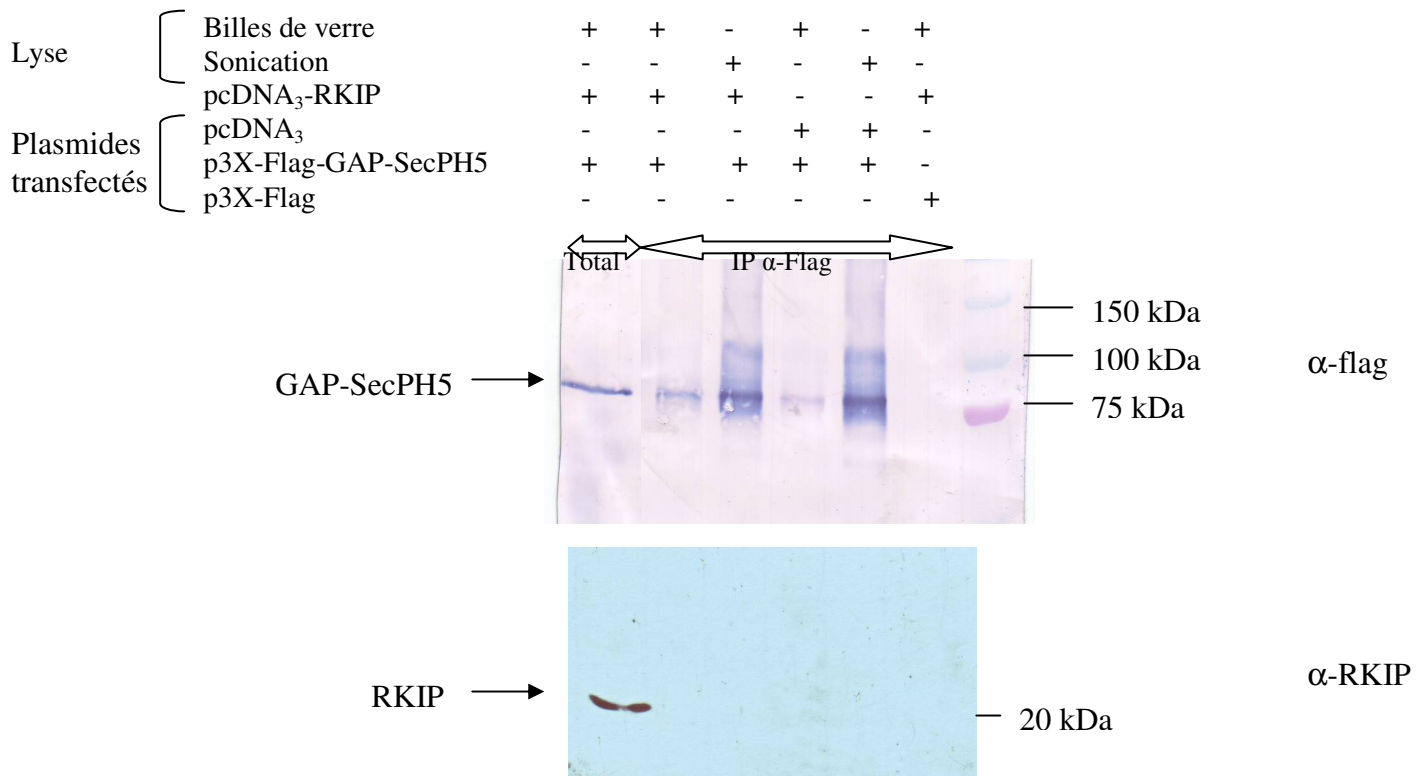
L'immunoprécipitation du domaine GAP-SecPH5 de Nf1 (FIGURE 81) est réalisée dans les conditions décrites dans l'expérience précédente, avec ou sans activation par le TPA. Malgré l'expression de *RKIP* dans les cellules (extraits totaux), RKIP n'est pas co-immunoprécipitée avec le domaine GAP-SecPH5 de Nf1. Par conséquent, la phosphorylation de RKIP n'a pas rendu l'interaction possible entre nos protéines.

Des résultats identiques ont été obtenus avec le domaine Sec-PH et GAP-SecPH7 (Résultats non montrés).

#### 3.1.1.4. Co-immunoprécipitation Nf1/RKIP avec des billes couplées à l'anticorps anti-flag dans des cellules COS-7 après activation de la PKC et lyse par sonication

Des conditions d'expérience identiques à l'expérience précédente ont été appliquées sur des cellules co-transfectées par pcDNA<sub>3</sub>-RKIP ou pcDNA<sub>3</sub> et p3X-Flag-GAP-SecPH5 ou p3X-Flag. Seuls la lyse et le tampon dans lequel la lyse est effectuée ont été modifiés. En effet, une lyse par sonication sera réalisée dans du PBS auquel est ajouté le





**FIGURE 82 : Co-immunoprécipitation RKIP/Nf1 dans des cellules COS-7 lysées par sonication ou par des billes de verre (IP avec des billes d’agarose couplées à un anticorps anti-flag)**

Des co-transfections de cellules COS-7 ont été réalisées avec 5µg de différents plasmides comme l’indique le signe + dans le tableau ci-dessus. Après incubations à 37°C des cellules transfectées, celles-ci sont lysées dans du PBS contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases par sonication (2 x 10 secondes) ou par des billes de verre (0.5mm ; 3min30 au vortex). Une co-immunoprécipitation avec des billes d’agarose couplées à un anticorps anti-flag est effectuée. Après élution avec le peptide flag, une partie des échantillons (5µl) est chargée sur gel d’acrylamide 8%. Le western blot correspondant est incubé avec l’anticorps anti-flag puis un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline. L’autre partie des échantillons (25µl) est chargée sur gel d’acrylamide 15% et le western blot correspondant est incubé avec l’anticorps anti-RKIP puis un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Ces western blots sont ensuite révélés soit par colorimétrie soit par chimioluminescence.

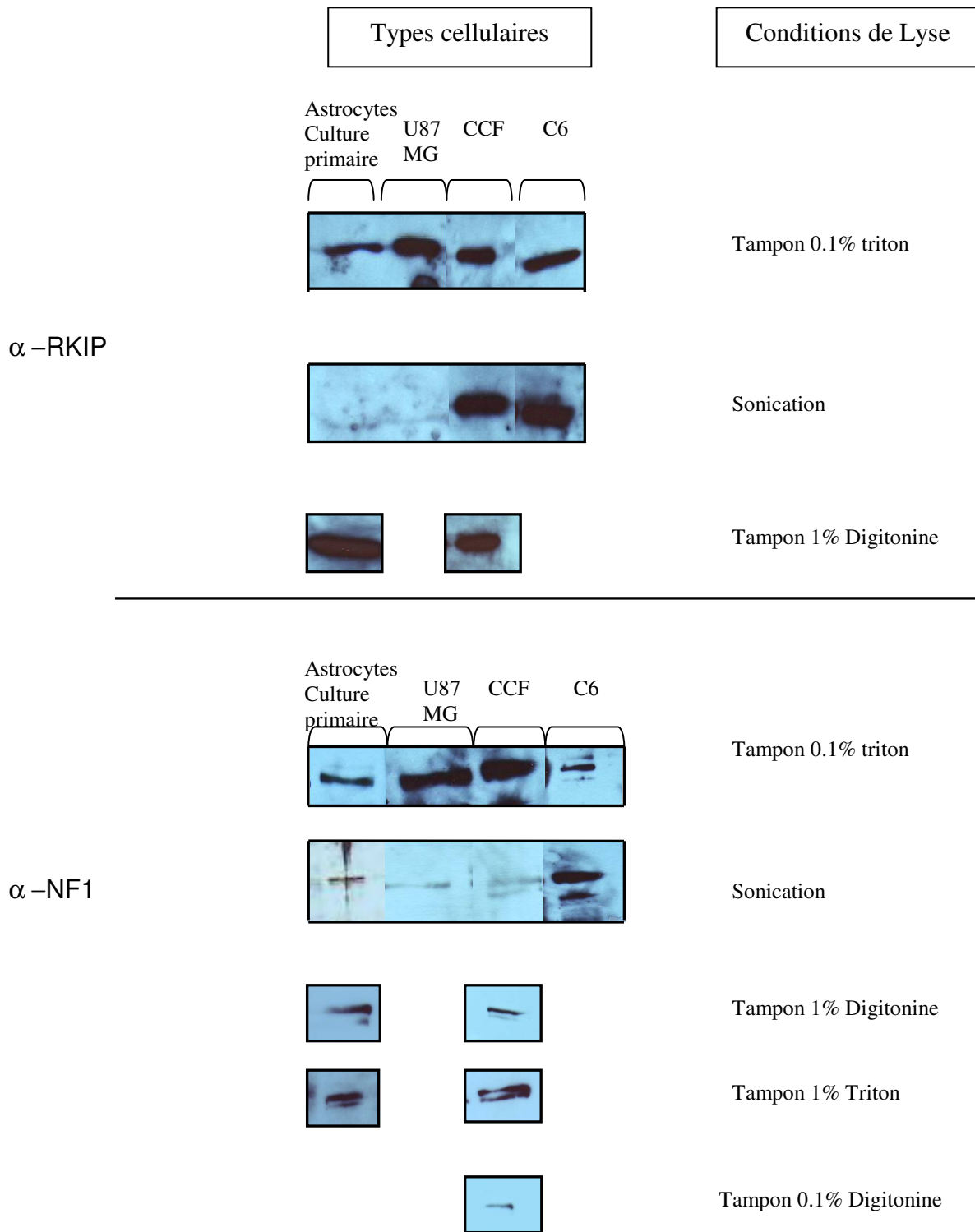
Les doubles flèches indiquent les pistes correspondant aux immunoprécipités (IP α-flag) ou aux extraits totaux.

mélange d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases comme dans le tampon de lyse précédent. Un essai sera réalisé dans ce même tampon mais en lysant les cellules avec des billes de verre (diamètre 0.5 mm, Biospec products, Inc) pendant 30 minutes.

Pour ces deux conditions, les résultats sont représentés sur la figure 82. Elle montre que RKIP et GAP-SecPH5 s'expriment dans les extraits totaux et que le fragment GAP-SecPH5 a été immunoprécipité spécifiquement. Cependant, il est à noter que l'immunoprécipitation est plus efficace quand les cellules sont lysées par sonication. Il est possible que la lyse par des billes de verre ne soit pas assez forte. La révélation des immunoprécipitats avec l'anticorps dirigé contre RKIP montre que RKIP n'est pas co-immunoprécipité avec le fragment GAP-SecPH5.

Ces conditions de lyse n'ont pas permis d'avoir des résultats de co-immunoprécipitation positifs entre RKIP et le fragment GAP-SecPH5 de Nf1 et ceci est reproductible avec les fragments GAP-SecPH7 et SecPH (résultats non montrés).

Devant les résultats négatifs obtenus après ces nombreux essais effectués dans les cellules COS-7, nous nous sommes interrogés sur le système cellulaire utilisé. Effectivement, les cellules COS-7 sont des cellules faciles à transfecter et à cultiver et qui ont permis de mettre en évidence de nombreuses interactions protéiques. Ainsi, l'interaction entre Raf-1 et RKIP a été mise en évidence dans des cellules COS-7 (Park *et al.*, 2005b ; Corbit *et al.*, 2003). Cependant, ces cellules ne constituent pas un type cellulaire spécialisé et ne sont pas forcément de bons modèles dans les voies de signalisation cellulaire. Il est donc possible que certaines interactions ne puissent pas être détectées dans ces cellules. D'autres problèmes pourraient concerner la protéine Nf1. En effet, nous avons travaillé jusqu'ici sur des morceaux de protéines et non sur la protéine entière ce qui pourrait empêcher l'interaction en raison d'une mauvaise conformation. De plus, il y a la présence ici d'une étiquette dont on ne peut s'affranchir puisque l'on travaille sur des morceaux de protéines. Ces étiquettes peuvent être responsables d'un encombrement qui pourrait empêcher les interactions protéine-protéine. L'objectif a donc été dans un deuxième temps de travailler sur un type cellulaire spécialisé dans lequel Nf1 et RKIP s'exprimeraient naturellement et de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation sur les protéines entières.



**FIGURE 83 : Tests de détection des protéines RKIP et Nf1 dans différents types cellulaires et différentes conditions de lyse**

Des astrocytes ont été cultivés en milieu DMEM complet. Les cellules ont été lysées dans différentes conditions (tampon contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases et du Triton X-100 0.1% ou 1%, ou de la digitonine 1% ou 0.1% ou en PBS suivi d'une lyse par sonication). Le lysat total est chargé sur gel d'acrylamide 8% ou 15% et les western blots correspondant sont incubés respectivement avec les anticorps anti-Nf1 ou anti-RKIP. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à la peroxydase et les western blots sont révélés par chimioluminescence.

### 3.1.2. Etude de l'interaction RKIP/Nf1 dans les astrocytes

Les cultures d'astrocytes ont été effectuées dans le laboratoire de Tobias Hévor (Orléans). Trois lignées cellulaires ont été testées : les C6 (astrocytome de rat), U87MG et CCF (astrocytomes humains) ainsi qu'une culture primaire d'astrocytes de rats.

#### 3.1.2.1. Test de détection de *RKIP* et *Nf1* dans différentes lignées d'astrocytes après lyse dans différentes conditions

Nous avons, dans un premier temps, regardé le niveau de détection de nos protéines d'intérêt dans les différentes lignées cellulaires à notre disposition selon le type de lyse utilisé.

Les différentes cellules ont été cultivées en milieu DMEM complet. Les cellules ont été lysées dans un tampon contenant du Triton X-100 (0.1% ou 1%) ou de la digitonine (0.1 ou 1%) et le mélange d'inhibiteur de protéases et de phosphatases. En effet, le Triton X-100 est remplacé par de la digitonine qui est un détergent ionique doux. Une lyse par sonication est aussi réalisée, le tampon de lyse est remplacé par du PBS 1X auquel on rajoute également le cocktail d'inhibiteurs. Les lysats sont analysés par Western Blot sur gel d'acrylamide 8% ou 15% pour détecter respectivement Nf1 et RKIP.

Les résultats présentés sur la figure 83 détaillent la détection de RKIP et Nf1 dans les différents types cellulaires après lyse dans diverses conditions. Ils suggèrent que RKIP est présente dans les astrocytes, quelque soit le type cellulaire. Cependant, on remarque que la lyse par sonication est une technique plus délicate puisqu'on ne détecte RKIP dans les astrocytes en culture primaire et dans les U87MG lorsque l'on expose le film plus longtemps (résultats non montrés).

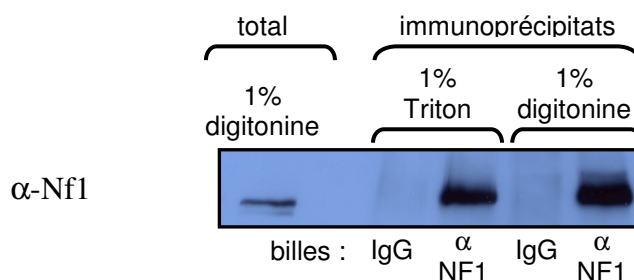
Concernant Nf1, la détection est plus délicate. La protéine Nf1 est détectée dans les extraits totaux après une lyse en 0.1% Triton X-100 dans tous les types cellulaires testés. La sonication semble poser problème également pour la détection de la neurofibromine puisqu'elle est détectée dans les C6 mais très faiblement dans les CCF, les U87MG et les astrocytes en culture primaire. En fait, il apparaît qu'une sonication de 2 fois 10 secondes est responsable d'une dégradation de la protéine Nf1 et l'anticorps dirigé contre Nf1 détecte surtout les fragments à 150 et 100kDa. Une lyse de 2 fois 5 secondes permet, en exposant longuement le film de détecter la protéine Nf1 entière.

La lyse utilisant la digitonine semble être une bonne condition car Nf1 est détectée dans les astrocytes en culture primaire et dans les CCF. De même, après une lyse dans un tampon

	0.1% Triton X-100	1% Triton X-100	0.1% Digitonine	1% Digitonine	Sonication
C6	IP $\alpha$ -Nf1 : +D RKIP : -	ND	ND	ND	IP $\alpha$ -Nf1 : +D RKIP : -
U87MG	IP $\alpha$ -Nf1 : + RKIP : -	ND	ND	ND	ND
CCF	IP $\alpha$ -Nf1 : -	IP $\alpha$ -Nf1 : + RKIP : -	IP $\alpha$ -Nf1 : + RKIP : -	IP $\alpha$ -Nf1 : + RKIP : -	ND
Astrocytes normaux	IP $\alpha$ -Nf1 : -	IP $\alpha$ -Nf1 : + RKIP : -	IP $\alpha$ -Nf1 : + RKIP : -	IP $\alpha$ -Nf1 : + RKIP : -	IP $\alpha$ -Nf1 : + RKIP : -

IP indique l'immunoprécipitation, le signe + indique un résultat positif alors que le signe - indique un résultat négatif ; ND (Non Déterminé) signifie que les tests n'ont pas été réalisés ; +D indique un résultat positif mais dégradé.

Table 10: Résultats des immunoprécipitations de Nf1 dans différentes lignées



**Figure 84: Immunoprécipitation de Nf1 en présence de 1% Triton X-100 ou 1% digitonine. Astrocytes de rat en culture primaire.**

Une culture primaire d'astrocytes de rat a été utilisée. Les cellules ont été lysées dans un tampon en présence soit de 1% Triton X-100 soit 1% Digitonine. Une quantité fixe de lysat est pré-incubée sur des billes d'agarose couplées à des IgG de lapin puis incubée avec des billes d'agarose anti-Nf1. Le témoin négatif de l'expérience correspond au lysat pré-incubé sur des billes d'agarose couplées à des IgG de lapin puis de nouveau sur des billes d'agarose couplées à des IgG de lapin (au lieu des billes couplées à Nf1). Les extraits totaux et les éluats sont analysés sur gel d'acrylamide 8%. Le western blot correspondant est incubé avec l'anticorps anti-Nf1 suivi d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase et il est révélé par chimioluminescence.

contenant 1% de Triton X-100, Nf1 est également détectée dans ces deux types cellulaires. Les autres types cellulaires n'ont pas été testés avec ce type de lyse.

Après avoir vérifié que *NF1* et *RKIP* s'expriment dans les astrocytes et sont détectées après la lyse des cellules dans différentes conditions, nous avons essayé de mettre au point les conditions d'immunoprécipitation des protéines.

### 3.1.2.2 Immunoprécipitation de Nf1

La neurofibromine étant une grosse protéine, il faut s'attendre à rencontrer des difficultés pour l'immunoprécipiter essentiellement à cause de la dégradation de la protéine. Nous avons donc testé différentes conditions incluant divers détergents et diverses concentrations de ces détergents résumées dans le tableau 10.

#### 3.1.2.2.1 Immunoprécipitation de Nf1 dans les astrocytes en culture primaire

Dans un premier temps, l'immunoprécipitation de Nf1 a été mise au point dans les astrocytes en culture primaire.

Une quantité identique de protéine est pré-incubée sur des billes d'agarose protéine A conjugué à des IgG de lapin. Le but de cette pré-incubation est d'éliminer toute fixation non spécifique aux billes d'agarose (Mangoura *et al.*, 2006). Le lysat est ensuite incubé avec des billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-Nf1. Le contrôle négatif correspond au lysat qui est pré-incubé puis incubé sur des billes d'agarose protéine A conjugué à des IgG de lapin (au lieu d'une incubation sur des billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-Nf1). Après élution, l'éluat est chargé sur gel d'acrylamide pour vérifier l'efficacité de l'immunoprécipitation.

L'immunoprécipitation a été réalisée dans ces conditions pour toutes les expériences, seules les conditions de lyse variaient. La figure 84 présente l'exemple de plusieurs immunoprécipitations avec les billes couplées à l'anticorps anti-Nf1 après lyse des cellules dans un tampon contenant 1% Triton X-100. Dans ces conditions, Nf1 est spécifiquement immunoprécipitée. Nous avons donc cherché à savoir si RKIP était co-immunoprécipitée. Malgré la présence de RKIP dans les extraits totaux, RKIP n'est pas détectée dans les immunoprécipitats (donnée non montrée).

Si l'interaction entre Nf1 et RKIP est fragile et labile comme l'est l'interaction entre Raf-1 et RKIP, il est envisageable que la lyse avec 1% Triton X-100 ait rompu cette interaction. Pour



cette raison, une immunoprécipitation a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment après lyse des cellules dans un tampon contenant 0.1% de Triton X-100. Dans ces conditions et malgré plusieurs essais, l'immunoprécipitation de Nf1 n'a pas pu être mise au point (donnée non montrée).

Des tests d'immunoprécipitation ont été réalisés après lyse des cellules avec un détergent moins fort comme la digitonine (1%). Comme le montre la figure 84, Nf1 est également immunoprécipitée de manière spécifique dans ces conditions car Nf1 n'est pas détectée dans le témoin négatif. Si on regarde dans ces conditions si RKIP est co-immunoprécipitée, on remarque que RKIP est détectée dans les extraits totaux mais pas dans les immunoprécipitats (donnée non montrée) révélant qu'il n'y a pas co-immunoprécipitation.

Des résultats identiques non montrés ont été obtenus en utilisant un tampon contenant 0.1% de digitonine.

Enfin, une dernière condition a été testée en immunoprécipitant Nf1 après lyse des cellules dans du PBS par sonication. L'immunoprécipitation fonctionne également dans ces conditions (FIGURE 86) mais RKIP ne co-immunoprécipite pas avec Nf1.

Récemment Mangoura et ses collaborateurs (2006) ont mis en évidence que la phosphorylation de la neurofibromine dépendante de la PKC induisait son association avec l'actine. De plus, l'analyse de la structure primaire de la neurofibromine révèle la présence de 45 sites de phosphorylation putatifs par la PKC.

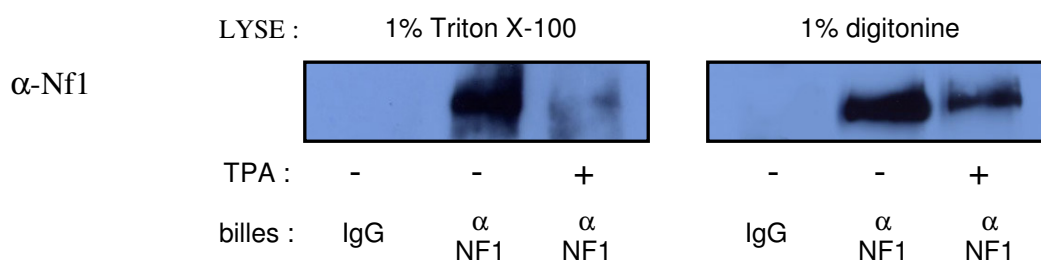
RKIP peut également être phosphorylée par la PKC sur la sérine 153 ((Lorenz *et al.*, 2003), ce qui provoque la dissociation du complexe Raf-1/RKIP et favorise l'association RKIP-P/GRK2.

Cette modification post-traductionnelle pourrait donc être requise pour une interaction éventuelle entre Nf1 et RKIP.

#### 3.1.2.2.2 *Immunoprécipitation de Nf1 dans les astrocytes après activation de la PKC*

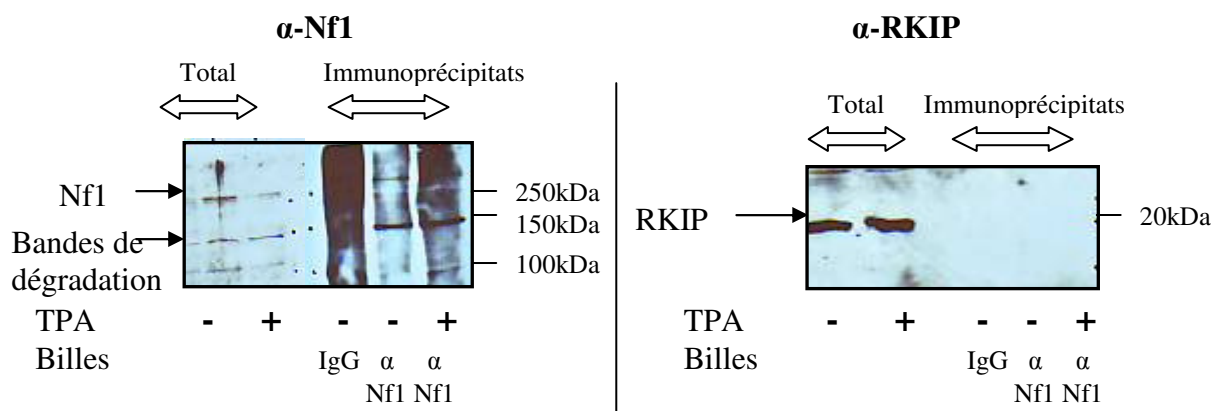
La majorité des sites de phosphorylation putatifs de Nf1 par la PKC est située dans la moitié N-terminale de la protéine, et plus particulièrement dans le domaine CSRD, riche en cystéine, de la neurofibromine.





**Figure 85 : Immunoprécipitation de Nf1 en présence de 1% Triton X-100 ou 1% digitonine sur des astrocytes de rat en culture primaire, activées ou non par le TPA.**

Une culture primaire d'astrocytes de rat est ensemencée. 16 heures avant la lyse, les cellules sont mises en carence dans un milieu DMEM avec 0.5% de sérum de veau fœtal (au lieu de 10%). Les cellules ont été lysées dans un tampon en présence soit de 1% Triton X-100 soit 1% Digitonine. Une quantité fixe de lysat est pré-incubée sur des billes d'agarose couplées à des IgG de lapin puis incubée avec des billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-Nf1. Le témoin négatif de l'expérience correspond au lysat pré-incubé sur des billes d'agarose couplées à des IgG de lapin puis de nouveau sur ces billes d'agarose couplées à des IgG de lapin (au lieu des billes couplées à Nf1). Les éluats sont analysés sur gel d'acrylamide 8%, le western blot correspondant est incubé avec l'anticorps anti-Nf1 suivi d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase puis révélé par chimioluminescence.



**FIGURE 86: Co-immunoprécipitation Nf1/RKIP sur des astrocytes de rat en culture primaire, lyse des cellules par sonication, activées ou non par le TPA**

Une culture primaire d'astrocytes est utilisée. 16 heures avant la lyse, les cellules sont privées de sérum de veau foetal (0.5% au lieu de 10%). Les cellules sont traitées au TPA (100nM, 5minutes), puis lysées dans du PBS contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases par sonication (2 fois 10 secondes). Une quantité fixe de lysat est pré-incubée sur des billes d'agarose couplées à des IgG de lapin puis incubée avec des billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-Nf1. Le témoin négatif correspond au lysat pré-incubé et incubé sur des billes d'agarose couplées à des IgG de lapin. Les extraits totaux et les éluats sont analysés sur gel d'acrylamide 8% et 15% et les western blot correspondant sont incubés respectivement avec l'anticorps anti-Nf1 ou anti-RKIP. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à la peroxydase ce qui permettra une révélation par chimioluminescence.

L'ester de phorbol Tétradécanoyl phorbol acétate (TPA), activateur direct de la PKC, provoque notamment une augmentation du taux de neurofibromine phosphorylée *in vivo* dans les neurones télencéphaliques et dans les cellules d'astrocytomes de rat (Mangoura *et al.*, 2006). Ces auteurs ont décrits que le taux de neurofibromine phosphorylée était maximal 5 minutes après l'ajout de 100nM de TPA. Dans un premier temps, ces conditions seront reprises dans notre expérience.

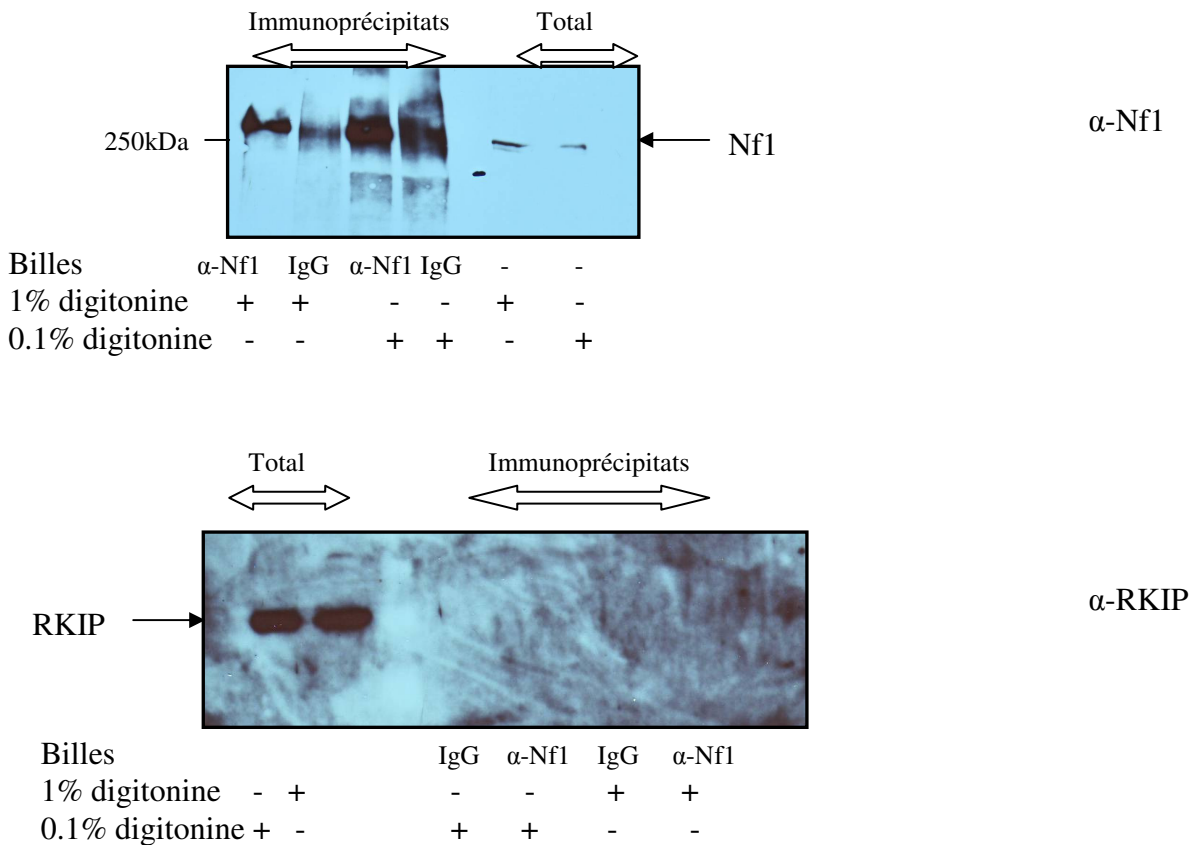
Les cellules ont donc été lysées dans un tampon contenant 1% Triton X-100 ou 1% digitonine car ces conditions avaient montré un bon enrichissement de la protéine Nf1. L'immunoprécipitation de Nf1 est effectuée dans des conditions identiques aux expériences précédentes.

L'immunoprécipitation dans cette nouvelle condition en activant la PKC a permis d'immunoprécipiter spécifiquement Nf1 (FIGURE 85). Cependant, on remarque que la protéine est enrichie plus faiblement en présence de TPA. L'immunoprécipitation de Nf1 sous sa forme phosphorylée serait donc rendue plus difficile.

Comme précédemment, Nf1 étant immunoprécipitée, nous avons cherché à savoir si RKIP pouvait co-immunoprécipiter avec la neurofibromine. Les éluats ont donc été chargés sur gel d'acrylamide 15% et le western blot correspondant a été incubé avec l'anticorps anti-RKIP. Ces conditions ne permettent toujours pas de mettre en évidence une interaction entre RKIP et Nf1 (donnée non montrée).

Une expérience identique a été réalisée, exception faite que la lyse est effectuée par sonication. Les résultats sont présentés sur la figure 86 et montrent que Nf1 est immunoprécipité dans ces conditions. La présence d'une bande de dégradation est détectée vers 150kDa, probablement due à la sonication. La révélation du western blot par l'anticorps anti-RKIP des immunoprécipitats ne permet pas de détecter RKIP. Il n'y a donc pas co-immunoprécipitation entre les deux protéines dans ces conditions.

Cependant, RKIP est également phosphorylée par la PKC au niveau de sa sérine 153. L'action du TPA (800nM) permet de phosphoryler RKIP au bout de 30 minutes (Corbit *et al.*, 2003). Ces conditions devront également être testées par la suite.



**FIGURE 87: Co-immunoprécipitation Nf1/RKIP sur une lignée d'astrocytes humains (CCF), lyse des cellules en présence de 0.1% ou 1% digitonine**

Une culture d'astrocytes CCF est utilisée. Les cellules sont lysées dans un tampon contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases et 0.1% ou 1% de digitonine. Une quantité fixe de lysat est pré-incubée sur des billes d'agarose couplées à des IgG de lapin puis incubée avec des billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-Nf1. Le témoin négatif correspond au lysat pré-incubé et incubé sur des billes d'agarose couplées à des IgG de lapin. Les extraits totaux et les éluats sont analysés sur gel d'acrylamide 8% et 15% et les western blots correspondant sont incubés respectivement avec l'anticorps anti-Nf1 ou anti-RKIP. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à la peroxydase ce qui permettra une révélation par chimioluminescence.

En parallèle de ces expériences sur les astrocytes normaux de rat en culture primaire, des manipulations similaires ont été effectuées sur des lignées d'astrocytomes humains ou de rats.

### 3.1.2.3 Immunoprécipitation de Nf1 dans différentes lignées d'astrocytomes

Des tests d'immunoprécipitation de Nf1 ont été réalisés sur trois lignées d'astrocytomes. Les conditions d'immunoprécipitations sont identiques aux expériences sur les astrocytes en culture primaire. Ce sont les conditions de lyse qui vont constituer le paramètre variant.

#### 3.1.2.3.1 Les lignées d'astrocytomes humains : CCF et U87MG

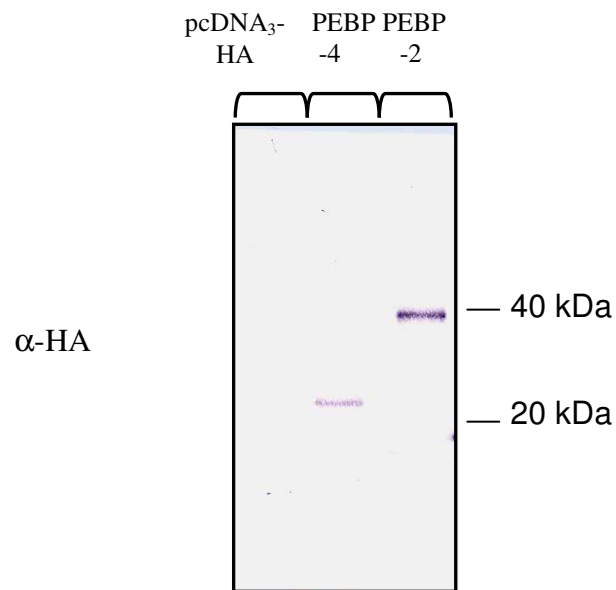
L'immunoprécipitation de Nf1 a été réalisée sur les CCF après lyse des cellules dans un tampon 0.1% ou 1% Triton X-100 ou 0.1% ou 1% digitonine. Seule l'immunoprécipitation après lyse des cellules dans un tampon contenant 0.1% de Triton X-100 n'a pas pu être mise au point.

La figure 87 montre les résultats obtenus après lyse des cellules dans un tampon contenant 0.1% ou 1% de digitonine suivi d'une immunoprécipitation anti-Nf1. Dans ces deux conditions, Nf1 a pu être immunoprécipitée sans qu'elle ne soit détectée dans le témoin négatif. Par contre, RKIP n'a pas été détectée dans les immunoprécipitats. Malgré la présence de RKIP dans les extraits totaux, RKIP ne co-immunoprécipite pas avec Nf1 dans ces conditions dans les CCF.

Concernant la lignée U87MG, une immunoprécipitation a été effectuée après lyse des cellules dans un tampon contenant 0.1% de Triton X-100. Bien que nous ayons réussi à immunoprécipiter spécifiquement Nf1, RKIP n'a pas été détecté dans les immunoprécipitats (résultats non montrés).

#### 3.1.2.3.2 Les C6

Dans cette lignée d'astrocytome de rat, nous avons essayé de lyser les cellules dans un tampon contenant 0.1% de Triton X-100 ou dans du PBS par sonication. L'immunoprécipitation anti-Nf1 réalisée dans les mêmes conditions que les expériences précédentes. Dans ces cellules, Nf1p a une forte tendance à être dégradée, même en présence d'inhibiteurs, si bien que nous n'avons pu visualiser par western blot que



**FIGURE 88 : Vérification de l'expression des PEBPs dans les cellules COS-**

7

Après transfection de cellules COS-7 par les plasmides pcDNA<sub>3</sub>-HA-*PEBP2*, pcDNA<sub>3</sub>-HA-*PEBP4* ou pcDNA<sub>3</sub>-HA les cellules sont lysées dans un tampon contenant du Triton X-100 1% et des inhibiteurs de protéases et de phosphatases appropriés. Les échantillons sont chargés sur gel d'acrylamide 15%, un anticorps anti-HA puis un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline sont utilisés et le western blot est révélé par colorimétrie.

l'immunoprécipitation de fragments de Nf1p (200 et 150kDa). La révélation des échantillons par un anticorps anti-RKIP ne permet de détecter aucune co-immunoprécipitation avec cette protéine.

Devant le grand nombre d'expérience mises en œuvre pour essayer de mettre en évidence une interaction entre RKIP et Nf1 dans les cellules COS-7 dans un premier temps, puis dans des cellules spécialisées tels que les astrocytes, il est envisageable que ce ne soit pas RKIP, la PEBP humaine la plus connue, mais hPEBP-2 ou hPEBP-4 qui interagissent avec Nf1.

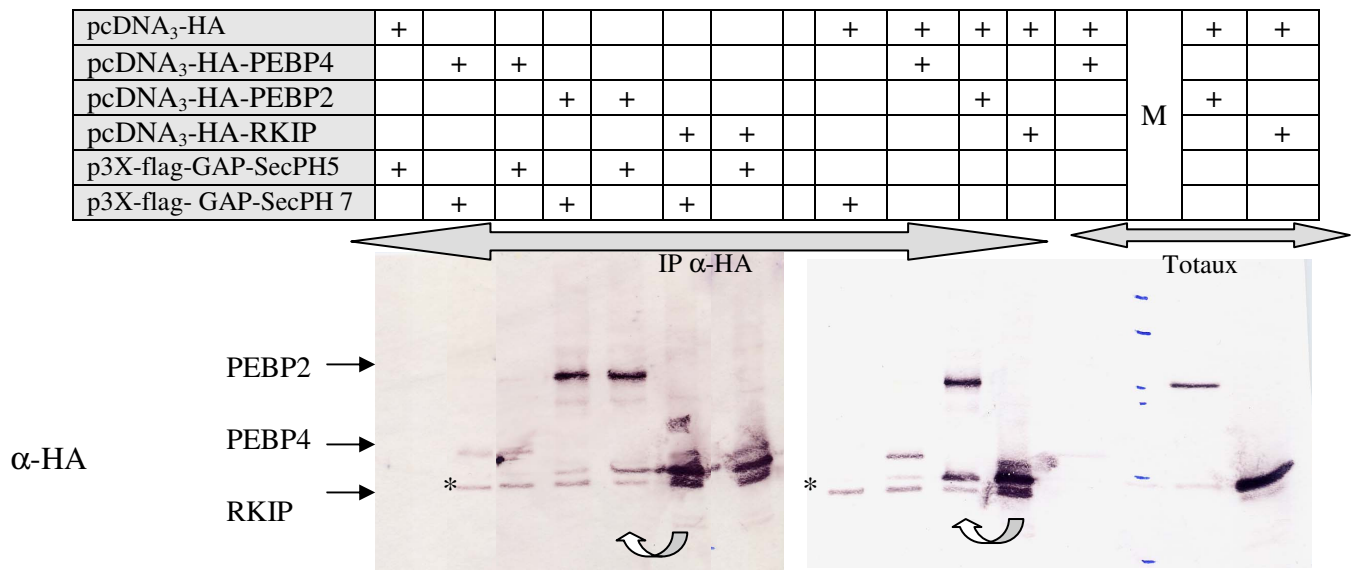
### **3.1.3 Etude de l'interaction hPEBP-2 et hPEBP-4 avec Nf1 dans les cellules COS-7**

Nous avons débuté cette étude dans les cellules COS-7. En effet, nous ne pouvons pas travailler sur les protéines naturelles car il n'existe pas d'anticorps dirigé contre hPEBP-2 ou hPEBP-4 et l'anticorps dirigé contre RKIP ne reconnaît pas ces protéines homologues (donnée non montrée). Il a donc fallu cloner les séquences correspondant aux gènes *hPEBP-2* et *hPEBP-4* dans le vecteur pcDNA<sub>3</sub>-HA.

#### **3.1.3.1. Vérification de l'expression de *hPEBP-2* et *hPEBP-4* dans les cellules COS-7**


Pour vérifier si *hPEBP-2* et *hPEBP-4* s'expriment dans les cellules COS-7, des transfections par électroporation sont réalisées avec 5µg de chaque plasmide dans 4 millions de cellules. Après 40 heures d'incubation, les cellules sont lysées dans un tampon contenant 1% de Triton X-100 et les extraits protéiques sont analysés par western blot (FIGURE 88). Les PEBPs ont pu être détectées à la taille attendue soit 40kDa pour hPEBP-2 et 25kDa pour hPEBP-4.

Après avoir vérifié l'expression des PEBPs dans les cellules COS-7 transfectées, des essais d'immunoprécipitation ont été amorcés.



**FIGURE 89 : Immunoprécipitation des PEBPs dans des cellules COS-7 (billes d'agarose couplées à un anticorps anti-HA)**

Des co-transfections de cellules COS-7 ont été réalisées avec 5µg de différents plasmides comme le montre le signe + dans le tableau ci-dessus. Une co-immunoprécipitation avec des billes d'agarose couplées à un anticorps anti-HA est effectuée. Après élution, une partie des échantillons (5µl) est chargée sur gel d'acrylamide 15%, la membrane est incubée avec l'anticorps anti-HA puis un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline et révélée par colorimétrie afin de vérifier si l'immunoprécipitation a fonctionné.

Les doubles flèches indiquent si les échantillons sont des extraits totaux ou des immunoprécipités (IP α-HA). Les simples flèches indiquent la taille des différentes PEBPs ; les flèches  indiquent qu'il y a eu une légère fuite dans la piste gauche adjacente ; \* indique une bande de bruit de fond.

#### 3.1.1.5. Co-Immunoprécipitation entre hPEBP-2 ou hPEBP-4 et les fragments de Nf1

Les premiers essais d'immunoprécipitation ont été réalisés avec des billes d'agarose couplées à un anticorps anti-HA. Des co-transfections dans des cellules COS-7 ont été réalisées avec 5µg de chaque plasmide dans 4 millions de cellules : chaque plasmide ayant la séquence codante d'une des PEBP (pcDNA<sub>3</sub>-HA-PEBP2, pcDNA<sub>3</sub>-HA-PEBP4 et pcDNA<sub>3</sub>-HA-RKIP) sera co-transfecté avec chaque plasmide ayant la séquence codante d'un des différents fragments de Nf1 (p3X-flag-GAP-SecPH5 ou p3X-flag-GAP-SecPH7). De plus, pour chaque fragment de Nf1 et pour chaque PEBP, une transfection a été réalisée avec un plasmide vide, pcDNA<sub>3</sub>-HA.

La figure 89 montre les résultats des immunoprécipitations anti-HA qui visaient à enrichir les PEBPs. Elle montre clairement que l'immunoprécipitation des PEBPs étiquetées avec l'épitope HA a fonctionné puisqu'une bande est révélée chaque fois à la taille de chacune des PEBPs. Sur ce western blot, on peut noter la très faible détection de la protéine hPEBP-4 dans les extraits totaux. Ainsi, c'est seulement une faible quantité de hPEBP-4 qui est détectée et immunoprécipitée. Nous pensons que cela peut provenir d'une électroporation défectueuse par les plasmides codant pour hPEBP-4 vraisemblablement en raison de la qualité de la préparation plasmidique.

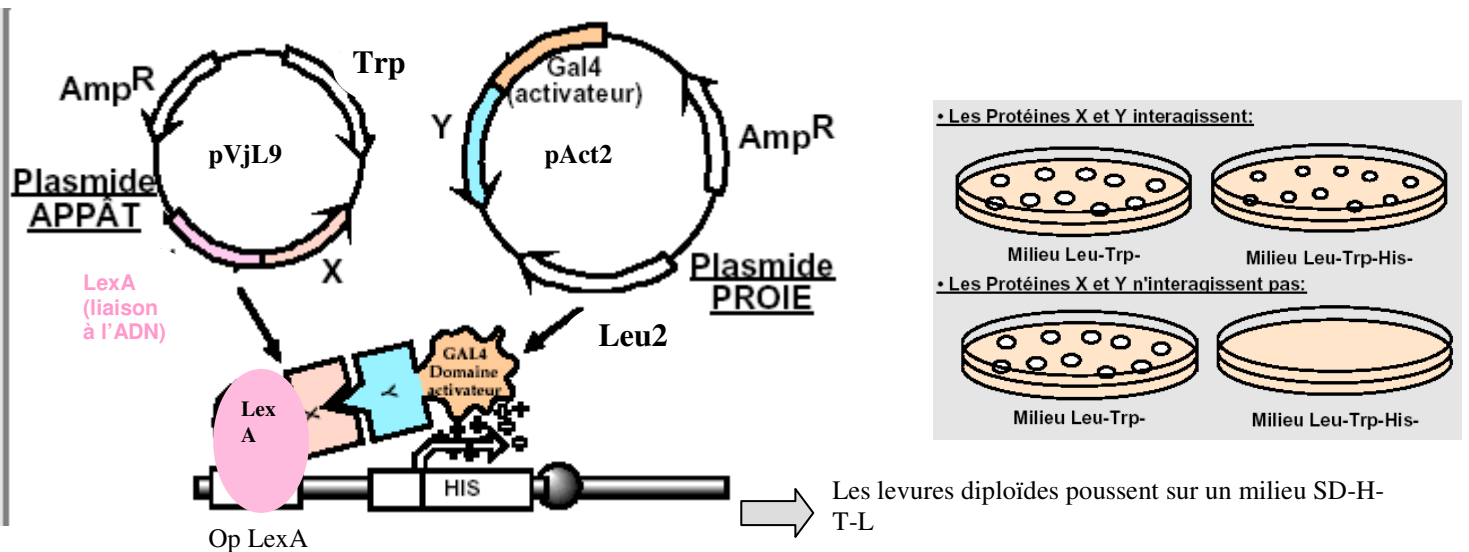
Dans un deuxième temps, nous avons regardé si des fragments de Nf1 avaient été co-immunoprécipités avec une des PEBPs. La co-immunoprécipitation a été analysée par Western blot en utilisant un anticorps primaire anti-flag, puis un anticorps secondaire couplé à la peroxydase suivi d'une révélation par chimioluminescence (résultat non montré).

Les premiers résultats obtenus suggèrent une interaction non spécifique.

Ces résultats sont préliminaires, et l'expérience n'a pu être réalisée qu'une seule fois et uniquement avec GAP-SecPH par manque de temps. Cependant, d'autres essais seront à réaliser pour mettre au point les conditions d'immunoprécipitation.

Devant le grand nombre d'expériences mises en œuvre pour essayer de mettre en évidence une interaction entre RKIP et Nf1 dans les cellules COS-7 dans un premier temps, puis dans des cellules spécialisées telles que les astrocytes et cela, sans succès, nous avons décidé de rechercher de nouveaux partenaires de la neurofibromine.





**FIGURE 90 : Principe du Double hybride**

Le plasmide appât (pVjL9) exprime une protéine X fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de LexA. Le plasmide proie (pAct2) exprime une protéine Y ou dans notre cas des fragments de la banque d'ADNc, fusionnée au domaine Gal4 activateur de la transcription. Si X et Y interagissent, l'intégrité fonctionnelle d'un facteur de transcription est restaurée et le gène rapporteur *HIS3* est exprimé permettant aux levures de se multiplier sur un milieu dépourvu d'histidine.

### **3.2 Mise en évidence de nouveaux partenaires de la neurofibromine**

Une stratégie de choix pour l'identification de partenaires pour une protéine donnée est la technique du double hybride dont le principe est relaté sur la figure 90. Nous avons développé un crible double hybride sur Nf1. Cependant, Nf1 étant une très grosse protéine, nous avons travaillé avec des domaines de la protéine. La séquence correspondant au domaine SecPH de Nf1 et celles correspondant aux domaines GAP-SecPH5 et 7 ont été clonées dans le vecteur pVjL9 en aval de la séquence de liaison à l'ADN de LexA. Pour ne pas alourdir le travail, nous avons choisi de travailler dans un premier temps sur une seule des constructions constituant « l'appât » du système double hybride : le domaine SecPH de Nf1.

Les partenaires potentiels sont recherchés dans une banque d'ADNc de cerveau humain contenant  $3,5 \cdot 10^6$  clones indépendants et clonée dans le vecteur pAct2. Chaque fragment de la banque est inséré en phase avec la séquence du domaine activateur de transcription de Gal4.

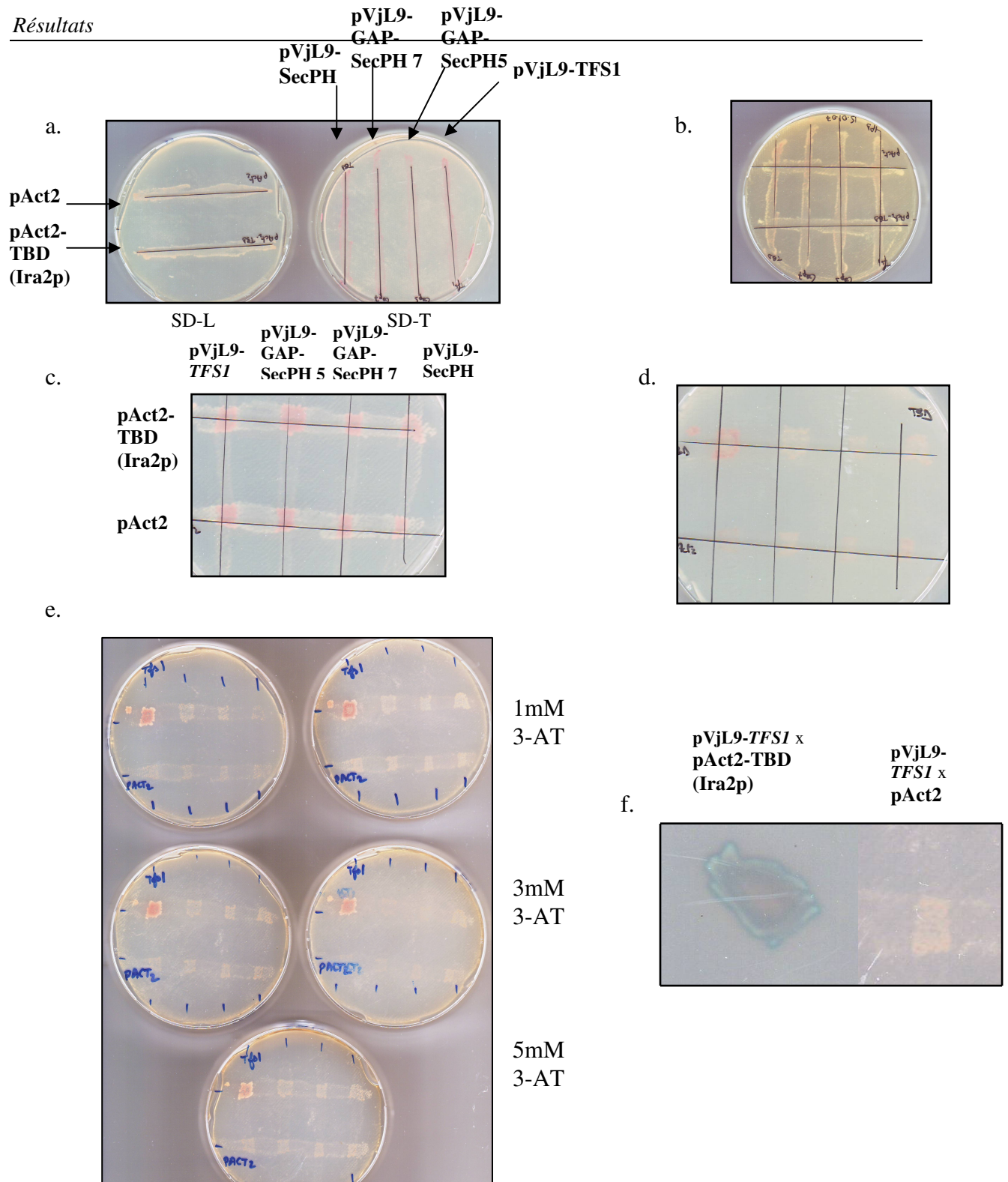
Si une protéine de la banque interagit avec le domaine SecPH de Nf1, on aura un rapprochement des domaines LexA et Gal4 permettant la reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel (FIGURE 90). Ce facteur pourra permettre la transcription des gènes rapporteurs *HIS3* et *LACZ* qui sont présents en aval de l'opérateur LexA dans la souche de levure utilisée.

#### **3.2.1 Validation du système double hybride**

Afin de valider notre système, nous avons cloné la séquence du gène *TFS1* dans le vecteur pVjL9 et la séquence correspondante au domaine TBD d'Ira2p dans le vecteur pAct2 car Chautard *et al.* (2004) ont mis en évidence que Tfs1p interagissait par double hybride avec le domaine TBD d'Ira2p. Ainsi, si notre système double hybride fonctionne correctement, nous devrions retrouver cette interaction.

Nous avons d'autre part vérifié que les protéines fusions LexA-SecPH, LexA-GAP-SecPH5 et LexA-GAP-SecPH7 n'induisaient pas non spécifiquement la transcription des gènes rapporteurs.

Le crible est effectué par croisement de souches de levures de type sexuel opposé ( $a$  et  $\alpha$ ) qui contiennent chacune, soit un vecteur dérivé de pVjL9, soit un vecteur



**FIGURE 91 : Validation du système Double hybride**

Chaque plasmide d'intérêt est transformé dans la souche adéquate.

- Les transformants sont étalés sur milieu minimum sous forme de ligne
- Croisements les levures sur milieu complet YPD
- Réplique du croisement sur milieu minimum SD-T-L afin que les diploïdes croissent
- Réplique du croisement sur milieu minimum SD-T-L-H, seuls les clones positif croissent ; l'ordre est identique à la boîte c.
- Test de concentration de 3-AT ; réplique des diploïdes sur milieu SD-T-L-H + 3-AT ; l'ordre est identique à la boîte c.
- Test de coloration au X-Gal

dérivé de pAct2. La souche diploïde résultante possède, sur ses chromosomes, le gène *HIS3* en aval de 4 opérateurs LexA et le gène *LAC Z* en aval de 8 opérateurs LexA. Ces gènes sont les rapporteurs de l'interaction. La sélection des clones positifs est basée sur le choix du milieu sélectif.

La figure 91 détaille la stratégie appliquée pour valider le système double hybride que l'on va utiliser pour cribler une banque d'ADNc de cerveau humain (Kolonin *et al.*, 2000). Les plasmides pVjL9-SecPH (Nf1), pVjL9-GAP-SecPH5 (Nf1), pVjL9-GAP-SecPH7 (Nf1) et pVjL9-TFS1 sont transformés dans la souche L40ΔGal4. Les transformants sont sélectionnés sur milieu minimum SD-T. Les plasmides pAct2-TBD (Ira2p) et pAct2 sont transformés dans la souche Y187 et les transformants sont sélectionnés sur milieu minimum SD-L (FIGURE 91a). Après croisement des levures L40ΔGal4 (type a) et Y187 (type α) sur milieu complet (milieu YPD) (FIGURE 91b), les diploïdes se multiplient sur milieu restrictif SD-T-L (FIGURE 91c). La sélection se fait ensuite sur milieu SD-T-L-H puisque la souche L40ΔGal4 amène le gène de sélection *HIS3* (FIGURE 91d). S'il y a interaction entre une protéine fusionnée à Gal4 et une protéine fusionnée à LexA, il y a expression du gène *HIS3* et la souche de levure diploïde pourra croître sur un milieu SD-T-L-H (FIGURE 90).

L'interaction entre Tfs1p et le domaine TBD d'Ira2p est validée par notre système. En effet, la transcription du gène *HIS3* est activée puisque la souche diploïde obtenue après le croisement croît sur SD-T-L-H (FIGURE 91d). La transcription du gène *LACZ* est elle aussi activée puisque sur un milieu contenant du X-Gal, la souche de levure devient bleue (FIGURE 91f).

Les témoins issus de croisements avec le vecteur vide pAct2 et les fragments de Nf1 ou le domaine TBD d'Ira2p sont négatifs. En effet, ils se multiplient très faiblement ou pas du tout sur milieu SD-T-L-H (FIGURE 91d) et restent blancs en présence de X-Gal (FIGURE 91f ; données non montrées). En fait, ces témoins négatifs croissent légèrement sur milieu SD-T-L-H alors qu'ils ne devraient pas théoriquement. Ce bruit de fond peut poser problème pour la sélection des interactions positives lorsque nous travaillerons avec la banque d'ADNc. Pour pallier à ce problème qui provient du fait que, même sans interaction, un peu de protéine His3 est synthétisée rendant possible la synthèse *de novo* d'histidine dans les levures, l'alternative est d'ajouter au milieu de sélection une drogue qui entre en compétition avec l'histidine, le 3-AT. Ainsi, il est nécessaire de titrer la croissance des levures avec le 3-AT afin de déterminer la concentration à laquelle le bruit de fond est atténué et la croissance du témoin positif est



maintenue. La concentration qui sera choisie pour réaliser le crible sera 3mM de 3-AT (FIGURE 91e).

### 3.2.2 Crible de la banque d'ADNc

Parmi les clones sélectionnés sur SD-T-L-H + 3-AT (3mM) après transformation de la souche avec la banque, 1563 clones positifs ont été isolés. Ces clones sont tous capables de croître après repiquage sur un milieu minimum SD-T-L-H + 3mM 3-AT. Après coloration au X-Gal observée sur 24 heures, 126 clones sont restés blancs et ont pu être éliminés ce qui fait un total de **1464** clones positifs. Cette coloration nous a permis de classer les clones positifs selon l'intensité de la coloration bleue après 2, 12 et 24 heures.

L'efficacité du croisement a été déterminée au cours de ce crible, elle équivaut à 70%.

Parmi ces 1464 clones, 111 clones ont pu être identifiés pour l'instant soit environ 8%. Ces 111 clones codent pour un total de 17 protéines différentes.

Il apparaît que certaines des protéines identifiées sont très peu connues, peu d'informations sont alors disponibles dans la littérature. D'autres, par contre, sont bien décrites et sont activement étudiées.

### 3.2.3 Conclusion

Trois cibles intéressantes, qui peuvent avoir un lien fonctionnel avec la neurofibromine, ont donc pu être identifiées grâce au crible double hybride d'une banque d'ADNc de cerveau humain. L'intérêt de travailler avec ces nouvelles protéines interagissant avec Nf1 est que l'on dispose d'anticorps commerciaux dirigés contre les protéines d'intérêt. Ces anticorps pourront être utiles à la validation par voie biochimique (co-immunoprécipitation) des interactions découvertes par double hybride.

Pour l'instant, seulement 8% des clones ont pu être identifiés, ce qui laisse présager d'autres protéines potentiellement intéressantes à mettre en évidence.



*DISCUSSION ET  
PERSPECTIVES*





## 1. CARACTERISATION DES BASES MOLECULAIRES DE L'INTERACTION Tfs1p/Ira2p

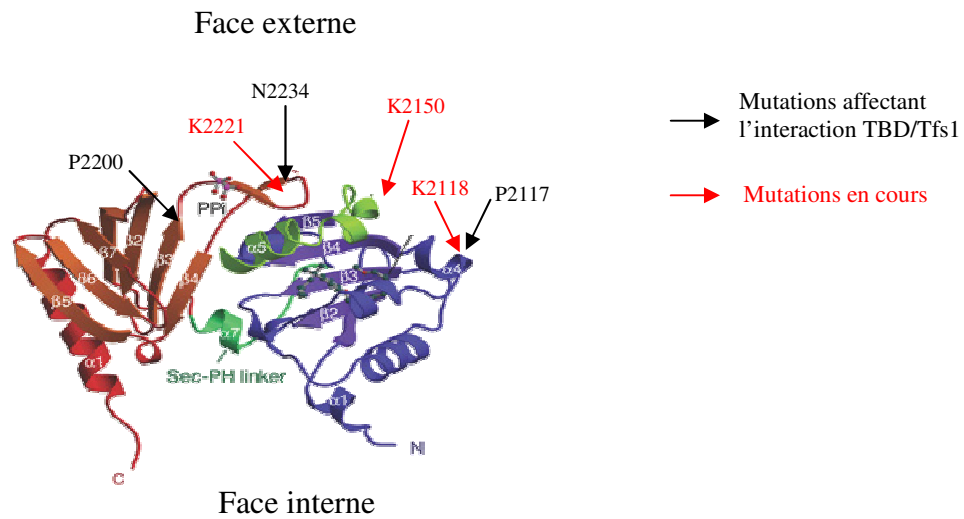
L'interaction entre Tfs1p et le domaine TBD d'Ira2p a été mise en évidence par double hybride puis validée par co-précipitation (Chautard *et al.*, 2004). Le domaine d'interaction d'Ira2p a pu être précisé par double hybride mais les régions de Tfs1p impliquées dans cette interaction demeuraient inconnues. Nous avons cherché à préciser les bases moléculaires de l'interaction et à identifier les régions de Tfs1p qui y participaient.

La protéine Tfs1p appartient à la famille très conservée des PEBP, caractérisée par une cavité de fixation aux ligands anioniques. Des mutants ponctuels de cette cavité ont été construits par mutagenèse dirigée : P<sub>99</sub>L, H<sub>111</sub>A, R<sub>162</sub>A ou F<sub>109</sub>V. L'histidine 111, intervient directement dans l'interaction entre la PEBP bovine et ses ligands (phosphoryléthanolamine (Serre *et al.*, 1998) et acétate (Banfield *et al.*, 1998)) et elle est placée sur la paroi de la cavité. La mutation H<sub>111</sub>A conduit à l'élimination d'un site de liaison pour les ligands chargés négativement. La proline 99 est sur le coude de la cavité ; le mutant P<sub>99</sub>L affecte l'accessibilité de la cavité. L'arginine 162 est en interaction avec l'extrémité N-terminale et avec trois résidus de la cavité. Le mutant R<sub>162</sub>A pourrait avoir un effet indirect sur le site de fixation des ligands grâce aux contacts établis avec les résidus de la cavité.

Les résultats d'interaction et d'activité vis à vis d'Ira2p montrent que ces 3 mutants de la cavité sont incapables d'interagir et d'inhiber Ira2p. En effet, les mutations ont un effet direct ou indirect sur l'accessibilité ou les propriétés de liaison de la cavité. Seul le mutant F<sub>109</sub>V, qui provoque un déplacement de la boucle L2 vers le centre de la cavité provoquant ainsi une réduction de l'accessibilité de la cavité, est capable d'interagir faiblement avec Ira2p. Par contre, il est incapable d'inhiber cette protéine.

La cavité de surface et les résidus qui la composent sont donc des éléments primordiaux pour l'interaction entre Tfs1p et le domaine TBD d'Ira2p.

La protéine Tfs1p a une protéine homologue chez la levure, Ylr179cp, qui présente 40% d'identité. Ces protéines n'ont pas les mêmes caractéristiques fonctionnelles. L'alignement des séquences protéiques de Tfs1p et Ylr179cp a permis de mettre en évidence des régions variables et homologues entre les deux protéines. Des protéines mutantes ont été construites en échangeant des régions variables ou homologues de Tfs1p par celles de



**FIGURE 92 : Mutations du TBD d'Ira2p et rôle dans l'interaction Tfs1p/Ira2p**

En ce qui concerne les bases moléculaires de l'interaction entre Tfs1p et Ira2p, plusieurs mutants de TBD affectés dans les boucles de surface du domaine s'avèrent ne plus interagir avec Tfs1 (flèches noires). D'autres mutants affectant des résidus chargés de cette surface sont en cours de construction (flèches rouges). Les faces interne et externe sont indiquées.

Ylr179cp. L'analyse structurale et fonctionnelle de ces mutants a montré que d'autres régions de Tfs1p étaient importantes pour l'interaction Tfs1p/Ira2p. Il s'agit du domaine N-terminal et d'une région plus large, chargée électropositivement, qui englobe la face de la molécule contenant la cavité et le domaine N-terminal. Cette région pourrait constituer une zone de contact entre les deux partenaires.

Afin de compléter les informations obtenues sur les bases moléculaires de l'interaction Tfs1p/Ira2p, une solution de choix serait de résoudre la structure 3D du complexe Tfs1p/TBD d'Ira2p comme D'Angelo *et al.* (2005) l'on fait en cristallisant le complexe Tfs1p/CPY. Cependant, la purification de Tfs1p et du domaine TBD d'Ira2p ont posé de nombreux problèmes techniques. La purification de la protéine Tfs1p à partir de la bactérie a été un échec. En effet, elle est inactivée par les étiquettes et son spectre dichroïque montre qu'elle est non structurée après purification. Des essais de purification à partir de la levure sont en cours. Le domaine minimum d'interaction d'Ira2p avec Tfs1p (SecPH) a été étiqueté par 6 histidines et produit puis purifié chez *E.coli*. Après sa purification, le domaine SecPH d'Ira2p a tendance à précipiter lorsqu'on le concentre. Nous pensons que l'addition de Tfs1p purifiée et la formation du complexe permettrait d'empêcher son aggrégation.

Les expériences de modélisation et d'analyse de protéines hybrides entre Tfs1p et Ylr179cp ont donc été une alternative qui nous a permis d'élucider certains paramètres de l'interaction en attendant de pouvoir résoudre la structure 3D du complexe Tfs1p/TBD d'Ira2p.

Le domaine SecPH d'Ira2p a été modélisé à partir de celui de Nf1 par F. Vovelle (Equipe RMN et modélisation moléculaire de protéines et de peptides, CBM). Des expériences de modélisation moléculaire permettant de déterminer l'orientation préférentielle du domaine SecPH d'Ira2p pour la formation du complexe avec Tfs1p (expériences de docking) ont été effectuées en tenant compte des données obtenues sur les domaines de Tfs1p impliqués dans l'interaction Tfs1p/Ira2p. Afin de trancher entre les différents modèles, des lysines exposées sur la face externe du SecPH ont été mutées et l'interaction Tfs1p/SecPH va être testée. Cela permettra de savoir si c'est la face interne ou externe du SecPH qui est en contact avec Tfs1p (FIGURE 92).



## 2. SIGNIFICATION PHYSIOLOGIQUE DU ROLE DE Tfs1p

Deux rôles ont pu clairement être attribués à la protéine Tfs1p : l'inhibition de la carboxypeptidase Y (Bruun *et al.*, 1998), protéase à sérine vacuolaire, et l'inhibition d'une protéine GAP de Ras, Ira2p, qui induit indirectement l'activation de la voie de signalisation Ras/AMPC/PKA (Chautard *et al.*, 2004).

### 2.1 Dualité des fonctions de Tfs1p

La signification physiologique du rôle de l'inhibition de CPY par Tfs1p reste assez floue. En effet, la CPY est une protéine maturée dans l'appareil de Golgi, clivée pour donner une enzyme active présente uniquement dans la vacuole. Tfs1p, elle, est une protéine décrite comme cytoplasmique. Lorsqu'elle est fusionnée à la GFP, on la détecte à la fois dans le cytoplasme et le noyau des cellules lorsqu'elles sont en phase exponentielle de croissance mais Tfs1p est clairement exclue de la vacuole (Résultats non publiés – Hélène Chautard). D'autres inhibiteurs cytoplasmiques de protéases vacuolaires comme les protéinases A et B ont déjà été décrites dans la littérature (Bunning & Holzer, 1977). Il est possible que les inhibiteurs cytoplasmiques de ces protéases exercent leur activité en cas de dommages accidentels de la membrane vacuolaire afin de protéger les protéines cytoplasmiques de la dégradation. Cependant, des arguments réfutent cette théorie car une des fonctions importantes de la vacuole est de maintenir la stabilité osmotique et électrolytique de la cellule. Une détérioration de la paroi vacuolaire conduirait à la libération des protéases et hydrolases dans le cytoplasme mais également à une modification importante de l'équilibre des sels et du pH. Aucune donnée ne prouve qu'une cellule puisse survivre à de tels changements.

Plus récemment, Caesar & Blomberg (2004), qui ont mis en évidence que Tfs1p était le substrat de l'acétyl transférase NatB, ont proposé une autre hypothèse permettant d'établir un lien entre les deux fonctions de Tfs1p. Ira2p pourrait être sélectivement dégradée dans la vacuole par CPY et ce phénomène dépendrait de l'interaction physique de Tfs1p avec à la fois Ira2p et CPY. Aucun résultat expérimental n'étaye pour l'instant cette hypothèse. Il est cependant clair que les deux fonctions inhibitrices de Tfs1p sont indépendantes l'une de l'autre. En effet, Tfs1p est toujours un suppresseur multicopie de *cdc25-1* dans un contexte *Δprc1*.



(Mima *et al.*, 2006) ont étudié précisément la localisation cellulaire de Tfs1p durant la croissance cellulaire après avoir étiqueté Tfs1p par la GFP. Ils démontrent clairement que Tfs1p-GFP est présente dans le cytoplasme pendant la phase exponentielle de croissance des cellules et qu'elle se relocalise à la membrane de la vacuole et dans le lumen pendant la phase stationnaire. Compte tenu de l'affinité de Tfs1p pour les phospholipides anioniques, Mima *et al.* (2006) ont émis l'hypothèse d'un changement de la composition phospholipidique de la membrane vacuolaire au moment de la phase stationnaire. Tfs1p serait par la suite dirigé vers le lumen de la vacuole afin de réguler les activités de CPY à travers la formation d'un complexe. L'interaction avec Ira2p serait propre à des cellules en phase exponentielle et constituerait en quelque sorte une régulation de la localisation cytoplasmique de Tfs1p. De nombreuses hypothèses sont donc émises pour expliquer la dualité des fonctions attribuées à Tfs1p mais rien n'a clairement été élucidé à ce jour.

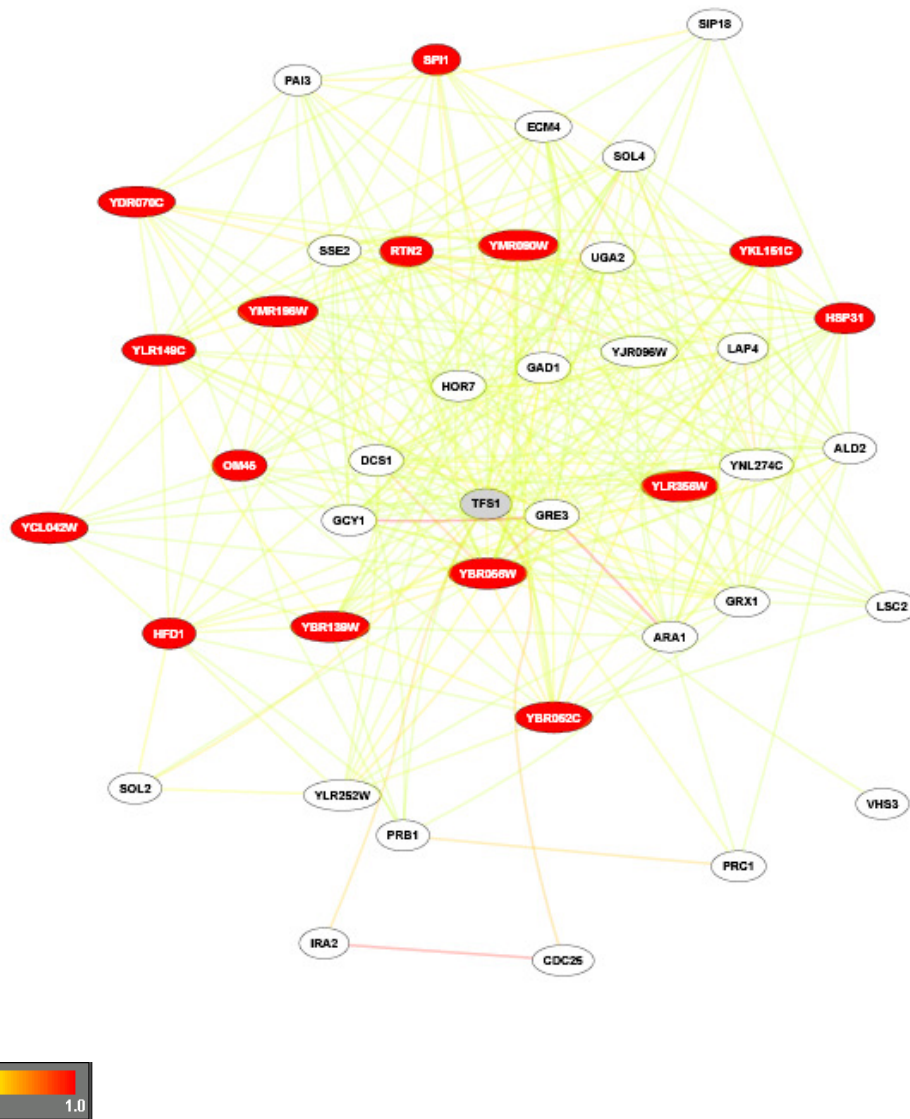
Afin d'éclaircir cette dualité de fonction, deux mutants ponctuels ont été utilisés : le mutant P<sub>99</sub>L (mutant de la cavité conservée des PEBP) et N<sub>2</sub>K (mutant de l'extrémité N-terminale). Une analyse complète des mutants révèle que le mutant P<sub>99</sub>L est incapable d'interagir et d'inhiber Ira2p alors qu'il est actif sur CPY ; le mutant N<sub>2</sub>K est quant à lui, inactif sur CPY mais toujours capable d'interagir et d'inhiber Ira2p. Ce sont donc des mutants de choix permettant de dissocier les deux fonctions de Tfs1p.

Des tests systématiques phénotypiques ont été mis en place en collaboration avec l'équipe d'A. Blomberg (Université de Göteborg, Suède), spécialiste de ce type d'approche systématique. Les résultats révèlent que Tfs1p pourrait intervenir dans une troisième fonction cellulaire distincte des inhibitions d'Ira2p et de CPY et que l'inhibition d'Ira2p serait prédominante par rapport à l'inhibition de CPY lorsque Tfs1p est surproduite dans les cellules.

## **2.2 Une troisième fonction de Tfs1p**

Afin d'étoffer l'hypothèse d'une troisième fonction de Tfs1p, une analyse du gène *TFS1* a été réalisée par le logiciel bioPIXIE qui est un nouveau système de probabilité permettant l'intégration et la visualisation d'informations biologiques à l'échelle du génome. Ce logiciel permet de mettre en évidence des réseaux d'interactions et des voies auxquels un gène d'intérêt participe (Myers *et al.*, 2005). L'idée, en utilisant ce programme, serait de





**FIGURE 93 : Les interactions de Tfs1p (réalisé avec le logiciel bioPIXIE)**

La bulle grise indique le gène d'intérêt ; les bulles rouges représentent les gènes non caractérisés et les bulles blanches indiquent les gènes caractérisés. Les lignes représentent les interactions et la couleur de la ligne indique la probabilité de l'interaction (vert pour une probabilité faible d'interaction et rouge pour une probabilité forte) comme l'indique le diagramme de couleur.

pouvoir prédire de nouveaux composants constituant les réseaux fonctionnels associés à Tfs1p.

La figure 93 présente le réseau d'interaction de Tfs1p obtenu par bioPIXIE. Ce programme a mis en évidence un réseau d'une quarantaine de protéines. Ira2p y apparaît en 2<sup>ème</sup> position alors que CPY est seulement en 13<sup>ème</sup> position (FIGURE 94).

Parmi les partenaires, 4 classes fonctionnelles ont été identifiées : des protéines impliquées dans le catabolisme des protéines vacuolaires (CPY, Prb1p, Pai3p, Lap4p et Ybr139Wp), des protéines impliquées dans le catabolisme des alcools (Yjr096Wp, Gcy1p, Gre3p, Sol4p), des protéines impliqués dans le catabolisme des sucres (Yjr096Wp, Gcy1p, Gre3p et Ara1p) et des protéines impliquées dans la dégradation du glutamate ou la réponse au stress oxydant (Gad1p, Grx1p, Uga2p).

Nous ne connaissons pas les fonctions moléculaires de Tfs1p la reliant à ce nouveau réseau de protéines. Il est clair, toutefois, que le réseau des protéines impliquées dans le catabolisme des alcools et des sucres a un lien avec les phénotypes mis en évidence par les tests systématiques sur les mutants de Tfs1p : faible vitesse de croissance sur mélibiose, arabinose, glycérol et éthanol.

Ainsi, la troisième fonction de Tfs1p pourrait avoir un lien avec ce nouveau réseau de protéines impliquées dans la voie des pentoses et il serait intéressant de tester l'interaction de Tfs1p avec ces protéines afin de confirmer cette hypothèse et de comprendre le mode d'action de Tfs1p.

### **2.3 L'inhibition d'Ira2p est prédominante par rapport à l'inhibition de CPY lorsque Tfs1p est surproduite**

Après avoir montré que Tfs1p serait impliquée dans une troisième fonction dans des conditions normales, des tests phénotypiques systématiques ont été effectués dans des conditions de surproduction de Tfs1p. Ces tests révèlent que la fonction prépondérante de Tfs1p est l'inhibition d'Ira2p par rapport à l'inhibition de CPY.

Cette constatation nous a permis de suggérer l'implication de Tfs1p dans la réponse au stress via son inhibition sur Ira2p et notamment dans la boucle de rétrocontrôle négatif de la réponse au stress. En effet, de nombreuses études ont montré que Tfs1p est surproduite en réponse à un stress (Gasch *et al.*, 2000 ; Jelensky & Samson, 2000 ; Fauchon *et al.*, 2002 ; Hasan *et al.*, 2002). Or, la réponse au stress est régulée par la voie Ras/AMPC/PKA

Gène 1	Gène2	Probabilité
TFS1	CDC25	0.654546
TFS1	IRA2	0.616455
TFS1	GAD1	0.543182
TFS1	YMR196W	0.543182
SOL2	TFS1	0.543181
GRX1	TFS1	0.452889
TFS1	YMR090W	0.452889
YBR056W	TFS1	0.452889
RTN2	TFS1	0.452889
TFS1	HOR7	0.452888
SSE2	TFS1	0.452888
ECM4	TFS1	0.452888
TFS1	PRC1	0.382828
OM45	TFS1	0.338258
TFS1	YLR356W	0.338258
LSC2	TFS1	0.338258
YBR052C	TFS1	0.338258
YKL151C	TFS1	0.338258
TFS1	HFD1	0.338258
LAP4	TFS1	0.338258
YDR070C	TFS1	0.338258
HSP31	TFS1	0.338258
GRE3	TFS1	0.338258
YJR096W	TFS1	0.338258
TFS1	YLR252W	0.338258
UGA2	TFS1	0.338258
TFS1	DCS1	0.338258
TFS1	YNL274C	0.338257
ARA1	TFS1	0.338257
TFS1	SIP18	0.338257
TFS1	VHS3	0.257085
TFS1	YNL200C	0.238888
YCL042W	TFS1	0.238888
YBR139W	TFS1	0.238888
TFS1	YOR285W	0.238888
SPI1	TFS1	0.238888
PRB1	TFS1	0.238888
TFS1	PAI3	0.238888
PRX1	TFS1	0.238888
TFS1	PEP4	0.238888

**FIGURE 100 : Partenaires de Tfs1p (logiciel bioPIXIE)**

Tableau récapitulatif des 40 premières interactions entre Tfs1p et ses partenaires d'après le logiciel bioPIXIE. Le nom des deux gènes est indiqué ainsi que l'indice de probabilité de l'interaction (chiffre correspondant à la couleur de la ligne de l'interaction sur la figure 105). La probabilité de l'interaction va de 0 à 1. En rose, sont représentées les interactions déjà connues et en vert l'interaction à confirmer.

et une forte activité de cette voie régule négativement la réponse au stress en inhibant les facteurs de transcription spécifiques de cette réponse, Msn2p et Msn4p. Comme Tfs1p active la voie Ras/AMPC/PKA par son inhibition d'Ira2p, sa surproduction pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'extinction de la réponse au stress.

## **2.4 Tfs1p et la boucle de réponse au stress**

La protéine Tfs1p est une protéine surproduite en réponse à un stress en raison de la présence d'éléments STRE dans son promoteur. Ces éléments sont reconnus par des facteurs de transcription, Msn2p et Msn4p, spécifiques de la réponse générale aux stress.

Lors d'un stress, Tfs1p est donc surproduite et va ainsi activer la voie Ras/AMPC/PKA. L'effet du stress ne devant pas durer dans la cellule, il est possible que la PKA ainsi activée aille inactiver les facteurs de transcription Msn2p et Msn4p en phosphorylant leur NLS ce qui favorisait une localisation cytoplasmique de ces derniers pour éteindre la réponse au stress. Ce phénomène constituerait une boucle de rétrocontrôle négatif de la réponse au stress.

Nous nous sommes demandés si Tfs1p et Ira2p ne pouvaient pas être des acteurs de cette boucle. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la cinétique de la réponse à un choc thermique en présence ou en absence de Tfs1p en effectuant des dosages du taux d'AMPC dans la cellule et des expériences de Northern blot.

Les résultats obtenus nous ont permis de conclure à l'implication de Tfs1p dans cette boucle de rétrocontrôle puisque cette dernière est modifiée selon si Tfs1p est surproduit ou absent. Les expériences de dosage d'AMPC révèlent une absence du pic d'AMPC en condition de stress quand Tfs1p est absent. Tfs1p serait donc le seul responsable du pic d'AMPC dans la cellule après un choc thermique. Ainsi, Tfs1p serait le seul acteur de la boucle de rétrocontrôle agissant aussi haut dans la voie Ras/AMPC/PKA.

En ce qui concerne les expériences de Northern blot, on remarque que la réponse au stress est légèrement modifiée selon la façon dont Tfs1p est affectée (réponse prolongée en absence de Tfs1p ; réponse décalée et plus rapidement éteinte quand *TFS1* est surexprimée). Le rôle de Tfs1p dans l'extinction de la réponse au stress est donc toujours perceptible mais son effet n'est pas aussi net que sur l'AMPC.

Cela est dû au fait que d'autres facteurs, tels que la dégradation de Msn2p après phosphorylation par Srb10p (Lallet *et al.*, 2006) interviennent dans l'extinction de la réponse au stress et ces facteurs sont situés en aval de l'AMPC.



### 3. LA REGULATION DE LA NEUROFIBROMINE

#### 3.1 Arguments en faveur de la conservation du mécanisme de régulation de la levure à l'homme

La neurofibromatose de type 1, maladie génétique caractérisée par une grande variabilité de son expression clinique, est provoquée par des mutations du gène *NF1*. Il s'agit d'une des maladies génétiques autosomales dominantes les plus fréquentes et le syndrome de prédisposition au cancer le plus commun. La protéine codée par ce gène, la neurofibromine, est une grosse protéine cytoplasmique de 2818 résidus. Il est donc un enjeu de taille de s'intéresser à l'étude de la régulation de la neurofibromine (Nf1). Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Nf1 a deux protéines homologues Ira1p et Ira2p qui sont, comme Nf1, des protéines GAP de Ras.

En 2004, dans l'équipe, Chautard *et al.* (2004) ont mis en évidence une interaction entre Ira2p et une protéine de la famille des PEBP, Tfs1p. Comme cela a été décrit dans l'introduction, l'homologue humain le mieux caractérisé de Tfs1p est la protéine RKIP, qui joue des rôles clés dans plusieurs voies de signalisation cellulaire.

Plusieurs arguments convergent vers une conservation potentielle des résultats obtenus chez la levure en imaginant un rôle supplémentaire de RKIP qui serait d'inhiber Nf1 :

(1) La levure étant un organisme eucaryote unicellulaire, de nombreuses interactions mises en évidence chez la levure sont retrouvées chez l'homme.

(2) Lorsque Nf1 est exprimée dans la levure, elle est capable de supprimer le phénotype de sensibilité au choc thermique d'un mutant *ira2* (Ballester *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1990). Nf1 est ainsi capable de remplacer Ira2p au niveau fonctionnel et d'inhiber les protéines Ras de levure.

(3) L'activité GAP de Nf1 et Ira2p sur Ras est inhibée *in vitro* par la tubuline ce qui constitue un exemple de mécanisme partagé de régulation de l'activité GAP d'Ira2p et de Nf1 (Bollag *et al.*, 1993; Parrini *et al.*, 1995).

(4) De plus, il apparaît que RKIP et les protéines 14-3-3 interagissent avec le même domaine de Raf-1 (Li *et al.*, 1995a; Yeung *et al.*, 1999) et que 14-3-3 interagit avec des motifs peptidiques contenant une sérine phosphorylée (Muslin *et al.*, 1996). Or, Feng *et al.* (2004) ont montré que 14-3-3 interagit avec Nf1 après que cette dernière ait été phosphorylée par la PKA et que cette interaction inhibe l'activité de Nf1. Ces données sont à rapprocher des interactions de RKIP et 14-3-3 avec Raf-1 et suggèrent que RKIP pourrait interagir avec Nf1.



### **3.2 Conservation du mécanisme d'interaction et d'inhibition chez l'homme ?**

L'équipe dans laquelle j'ai réalisé ce travail s'était déjà posée cette question avant mon arrivée. Pour tenter d'y répondre, un test double hybride avait été réalisé entre RKIP et un domaine de Nf1 homologue au domaine TBD d'Ira2p (identifié par alignement de séquences) puisque la structure 3D du domaine SecPH n'était pas encore résolue. Ce test s'est avéré négatif mais le système utilisé à cette époque était LexA-B42 et le moyen de sélection était la fluorescence. Ce système de détection est peut être moins fiable que la coloration au X-Gal. De plus, un test en double hybride négatif ne signifie pas forcément que l'interaction est inexistante.

J'ai à mon tour tenté de répondre à cette question. De nombreux tests de co-immunoprécipitation ont été réalisés pour essayer de mettre en évidence une interaction entre RKIP et Nf1. Après co-transfection de plasmide portant les séquences d'intérêt (*RKIP* et *NF1*) dans des cellules COS-7, des co-immunoprécipitations ont été effectuées. Aucune interaction n'a pu être mise en évidence. Des expériences similaires ont été entreprises dans des cellules spécialisées du cerveau : les astrocytes. En travaillant avec ce type cellulaire cela nous permettait de nous affranchir des étiquettes et de travailler sur les protéines endogènes car RKIP et Nf1 sont fortement exprimés. Des tests sur les conditions de lyse, plus ou moins douces, et sur l'activation de voies de signalisation cellulaire permettant l'activation de kinases ont également été réalisés. Ces essais nous ont permis d'obtenir de bons signaux d'immunoprécipitation spécifiques de Nf1 mais aucune interaction n'a pu être mise en évidence avec RKIP.

Les résultats négatifs de ces tests effectués ne signifient pas que l'interaction entre RKIP et Nf1 n'existe pas. Simplement, d'autres paramètres peuvent rentrer en ligne de compte.

(1) RKIP et Nf1 sont deux protéines fortement exprimées dans le cerveau et notamment dans les neurones, les astrocytes, les cellules de Schwann et les oligodendrocytes (Daston *et al.*, 1992; Gutmann *et al.*, 1991). Nous avons choisi de travailler sur les astrocytes en collaboration avec l'équipe de T.Hévor à l'université d'Orléans, spécialiste de ces cellules. Cependant, ce type cellulaire utilisé n'est peut être pas le meilleur et il est possible que l'interaction ait lieu dans d'autres types cellulaires tels que les cellules de Schwann, les neurones ou les cellules souches neurales.

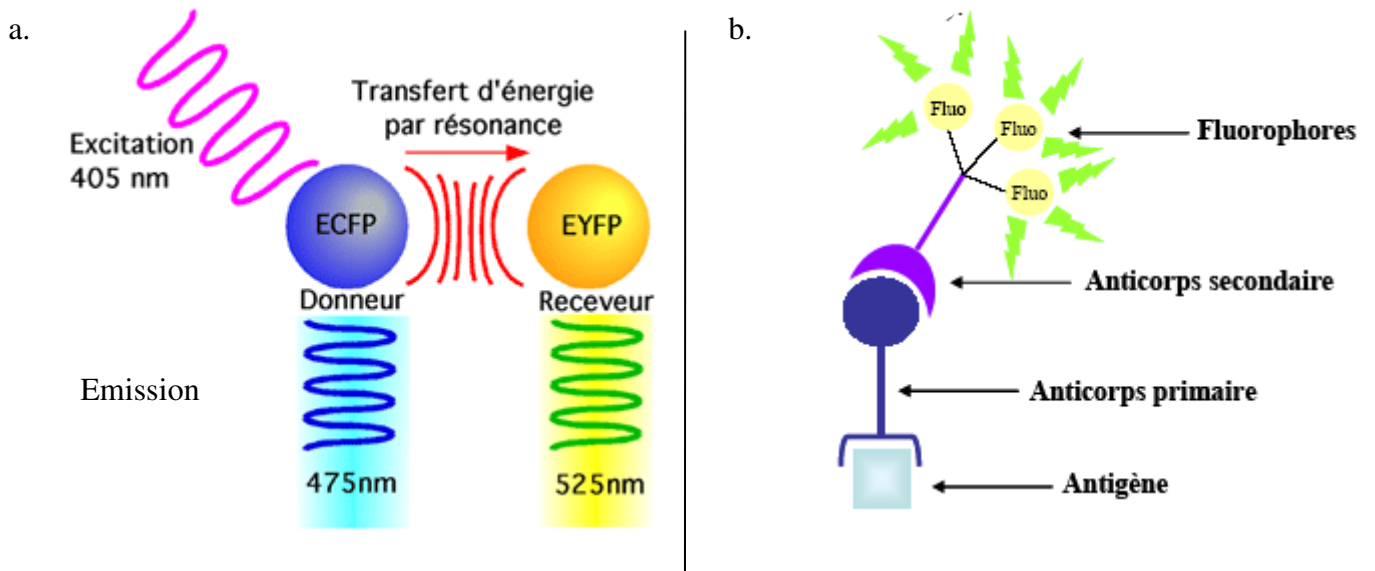




(2) Une autre possibilité est que cette interaction survienne au cours du développement dans des cellules encore non différenciées. Or, nous avons travaillé jusqu'ici sur des cellules différenciées (cellules COS-7, astrocytes). Si l'interaction a lieu pendant les premiers stades de développement, en cours de différenciation, nous n'arriverons jamais à l'observer dans de telles conditions. Une solution qui pourrait pallier à ce problème serait de travailler sur des cellules souches neurales ou neurosphères. Ces cellules sont obtenues dans la région mésencéphalique d'embryons de rat au stade E14. Elles sont capables de proliférer *in vitro* en présence d'EGF et de FGF et de se différencier en neurones et cellules gliales en leur absence. Une collaboration a été entreprise avec les équipes d'Anne DUITTOZ (INRA de Nouzilly, Tours) et de C. ANDRES (U619-INSERM, TOURS) afin de travailler sur ces cellules. Une autre solution serait de travailler sur des broyats de cerveaux d'embryon de souris à différents stades de développement et d'effectuer des expériences d'immunoprécipitation, ce qui nous permettrait d'avoir un mélange de toutes les cellules du cerveau à des stades de développement variés. Ces expériences sont programmées en collaboration avec l'équipe d'A. DUITTOZ.

(3) Enfin, il existe un autre point sensible aux expériences de co-immunoprécipitation que nous avons effectuées : la lyse. En effet, il semble que cette partie de la manipulation puisse poser problème car l'interaction entre RKIP et Raf-1 avait été mise en évidence dans des conditions douces de lyse (Yeung *et al.*, 1999) c'est à dire sans détergent mais en soniquant les cellules eucaryotes. Nous avons reproduit ces conditions mais elles semblent relativement drastiques car elles provoquent un cassage de la protéine Nf1. Il est donc envisageable que la simple lyse que nous effectuons puisse rompre l'interaction éventuelle. De plus, la lyse constitue, en elle-même, un stress aux cellules ce qui peut annuler l'interaction dès le début et dans ce cas-là, aucune interaction ne pourra être visualisée à n'importe quel stade de développement.

L'un des moyens qui nous permettrait d'éviter le processus de lyse des cellules serait de réaliser des expériences de co-localisation *in situ* des protéines. Pour cela, des expériences de co-immunolocalisation sont en cours au CBM en collaboration avec Sandrine VILLETTE (Equipe spectroscopie de biomolécules *in vivo* et *in vitro*, CBM) et avec l'équipe de Patrick MIDOUX (Equipe Transfert de gènes par des vecteurs synthétiques, CBM). Des expériences de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) sont aussi en cours de réalisation. Le FRET est une technique qui permet de mettre en évidence la proximité de deux molécules fluorescentes (FIGURE 101). En ce sens, c'est une technique plus puissante que la co-immunolocalisation parce que deux protéines peuvent être co-localisées sans interagir alors



**FIGURE 101 : Techniques alternatives pour la mise en évidence d'interaction protéines-protéines**

- a. le FRET : transfert d'énergie entre une molécule « donneuse » (ECFP) et une molécule « receveuse » (EYFP)
- b. L'immunofluorescence consiste à localiser un antigène à l'aide d'un anticorps spécifique, puis d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome

que l'existence d'un FRET entre deux molécules est la preuve de leur interaction. La première molécule (dite "donneuse") est excitée par une longueur d'onde  $\lambda_1$ . Le donneur va libérer des photons de longueur d'onde  $\lambda_2$ , que l'on peut détecter. Il peut aussi transférer par résonance une partie de son énergie d'émission à la seconde molécule fluorescente (dite "receveuse") qui ainsi excitée à la longueur d'onde  $\lambda_2$  libérera à son tour des photons, mais à une longueur d'onde d'émission qui lui est propre,  $\lambda_3$ .

Pour mener à bien ces expériences, j'ai fusionné RKIP à la GFP (clonage de RKIP dans le vecteur pEGFP) et la séquence codant pour le domaine GAP-SecPH5 et GAP-SecPH7 de Nf1 à la protéine fluorescente CHERRY (clonage de GAP-SecPH5 et GAP-SecPH7 de Nf1 dans le plasmide pm-Cherry). Dans notre cas, l'un des inconvénients du FRET est que l'on ne pourra pas travailler sur la protéine Nf1 entière parce qu'elle est trop grosse.

Les premiers résultats obtenus par immunolocalisation avec des anticorps dirigés contre le domaine N ou C terminal de Nf1 dans des astrocytes montrent une double localisation de Nf1 à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau avec une localisation majoritaire dans le noyau. Cela est tout à fait surprenant parce que Nf1 agit sur Ras et l'adénylate cyclase qui sont localisés au niveau de la membrane plasmique et du cytosquelette, localisé dans le cytoplasme. Toutefois, il existe une séquence NLS dans le domaine C-terminal de Nf1 et Vandembroucke *et al.* (2004) ont montré que des fragments de Nf1 fusionnés à la GFP et contenant le NLS étaient activement transportés dans le noyau. On pourrait aussi très bien imaginer que la neurofibromine ait un ou des rôles spécifiques dans le noyau qui sont méconnus pour l'instant.

(4) Enfin, une autre hypothèse pourrait être envisagée pour expliquer que nous ne détectons pas d'interaction entre RKIP et Nf1. Effectivement nous nous sommes focalisés sur l'interaction entre RKIP et Nf1 car RKIP est le membre des PEBP le mieux étudié mais il est possible que Nf1 interagisse avec une des deux autres PEBP. Quelques essais préliminaires ont été effectués sur les cellules COS-7, avec des PEBPs étiquetées, mais je n'ai pas eu assez de temps pour mettre au point les conditions d'immunoprécipitations et pour pouvoir conclure.

L'ensemble de ces nouvelles stratégies est actuellement en train d'être mis en place pour tenter de mettre en évidence une interaction PEBP/Nf1 et finaliser le travail concernant la conservation de l'interaction observée chez la levure.



De même, j'ai fusionné les séquences de hPEBP-2 et 4 à la GST afin d'effectuer des expériences de co-précipitation, mais je n'ai pas eu assez de temps pour les réaliser.

D'autres moyens sont mis en œuvre afin d'obtenir des données supplémentaires sur la régulation de la neurofibromine.

### **3.3 Mise en évidence de nouveaux partenaires de la neurofibromine**

L'étude de la fonction d'une protéine implique souvent la mise en évidence de ses partenaires d'interaction. Une des techniques les plus utilisées est le double hybride qui consiste à détecter les interactions *in vivo* chez la levure. Malgré le grand nombre de faux positifs, de faux négatifs et le caractère fastidieux de cette technique, elle est très puissante pour détecter les interactions protéine-protéine.

Dans le but de découvrir de nouveaux partenaires de la protéine Nf1, l'équipe a décidé de rechercher de façon systématique les partenaires du domaine SecPH de Nf1. La structure 3D de ce domaine vient d'être résolue (D'Angelo *et al.*, 2006) et montre qu'il est composé de deux modules d'interaction protéine-protéine (Sec et PH). Ainsi, ce domaine pourrait interagir avec plusieurs protéines. Nous avons donc mis en place le crible d'une banque d'ADNc de cerveau humain en utilisant le domaine SecPH de Nf1 comme « appât ».

Après sélection, **1464** clones positifs ont été isolés et doivent maintenant être identifiés. Seul 8% des clones ont pu être identifiés pour l'instant. Sur 111 clones, 17 cibles différentes ont été identifiées ce qui indique une redondance importante. Trois de ces cibles apparaissent être particulièrement intéressantes au niveau physiologique.

La première étape d'identification par double hybride de nouveaux partenaires de la neurofibromine a été réalisée, il faut maintenant valider ces interactions et caractériser leur rôle physiologique au sein de la cellule.



# *CONCLUSION*





Durant ce travail de thèse, j'ai mené de front une étude basée sur la compréhension des mécanismes moléculaires régulant l'activité de la neurofibromine (Nf1), protéine impliquée dans une des maladies génétiques les plus fréquentes, la neurofibromatose de type 1, et une étude homologue chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Afin d'étudier la régulation de la neurofibromine et sur le modèle des données obtenues chez la levure, nous avons cherché à mettre en évidence une interaction entre Nf1 et la protéine RKIP, car leurs homologues chez la levure interagissent (Chautard *et al.*, 2004). Malgré de nombreux essais de co-immunoprécipitation dans divers types cellulaires et en modifiant les conditions de lyse, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction. Ces résultats ne signifient pas que l'interaction n'existe pas mais nous n'avons pas été en mesure de la détecter. Des essais de co-localisation par immunofluorescence et par FRET et des expériences sur des cellules souches neurales vont être développées et devraient permettre de déterminer si l'interaction existe ou non.

La recherche de partenaires protéiques d'une protéine donnée est très informative dans le cadre de l'étude de la régulation de l'activité de cette protéine. Dans cet objectif, nous avons criblé par double hybride une banque d'ADNc de cerveau humain en utilisant comme « appât » le domaine SecPH de Nf1 (correspondant au domaine d'interaction entre Tfs1p et Ira2p). Actuellement, seulement 8% des clones positifs ont été identifiés permettant de mettre en évidence 17 cibles différentes. Parmi elles, 3 cibles ont d'ores et déjà attiré notre attention : LIMK2 (sérine-thréonine kinase impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine), Pax6 (facteur de transcription impliqué dans l'embryogénèse de l'œil) et LINGO1 (protéine transmembranaire spécifique du système nerveux). La validation par voie biochimique des interactions doit dans un premier temps être mise en œuvre. Nous étudierons ensuite le rôle physiologique de ces interactions.

En parallèle de cette recherche concernant la régulation de la neurofibromine, j'ai poursuivi l'étude qui était déjà engagée dans l'équipe sur Ira2p, l'homologue de Nf1. Chautard *et al.* (2004) ont montré qu'Ira2p interagissait avec une protéine de la famille très conservée des PEBPs, Tfs1p et que cette dernière l'inhibait. Afin de caractériser plus précisément cette interaction et dans l'objectif d'obtenir des informations sur les bases moléculaires de l'interaction qui pourraient être transposable par la suite chez l'homme, des mutants ont été construits et une analyse fonctionnelle et structurale a été entreprise. Il apparaît que la cavité conservée des PEBP dans Tfs1p constitue un premier site d'interaction avec Ira2p. L'extrémité N-terminale de Tfs1p ainsi qu'une large région



électropositive entourant la cavité sont aussi nécessaires pour l'interaction entre Tfs1p et Ira2p. La structure 3D du domaine SecPH d'Ira2p a été modélisée à partir de la structure 3D du SecPH de Nf1 et des mutants sont actuellement construits afin de déterminer la face de ce domaine en interaction avec Tfs1p. Cependant, seule l'étude par cristallographie du complexe Tfs1p/Ira2p, permettra de comprendre avec précision les mécanismes qui gouvernent cette interaction, comme cela a été réalisé entre Tfs1p et CPY.

Enfin, après la caractérisation moléculaire de l'interaction de Tfs1p/Ira2p, nous avons voulu déterminer le rôle physiologique de l'interaction et de l'inhibition d'Ira2p par Tfs1p. Pour cela, l'étude de mutants permettant de dissocier les fonctions de Tfs1p (inhibition de Ira2p et inhibition de CPY) a été réalisée. Cette étude a fortement suggéré l'existence d'une troisième fonction pour Tfs1p. L'équipe travaille actuellement à son identification. D'autre part, cette étude a montré que la fonction inhibitrice d'Ira2p était prédominante dans la cellule par rapport à l'inhibition de CPY pourvu que Tfs1p soit surproduite. Tfs1p étant surproduite dans des conditions de stress, ces résultats ont suggéré que l'inhibition d'Ira2p par Tfs1p pourrait jouer un rôle important dans la réponse au stress et notamment dans son rétrocontrôle négatif via l'activation de la voie Ras/AMPC/PKA. Des expériences de dosage d'AMPC et de Northern blot après un stress ont confirmé cette hypothèse et montré que Tfs1p participait à une boucle de rétrocontrôle négatif de la réponse au stress.

L'équipe s'intéresse d'autre part à la façon dont Tfs1p inhibe l'activité GAP d'Ira2p. Outre les expériences visant à déterminer la structure 3D d'un complexe Tfs1p/SecPH d'Ira2p, des expériences relatives à la stabilité d'une protéine Ira2p étiquetée par HA sur le chromosome sont en cours afin de déterminer si Tfs1p ne pourrait pas inhiber la protéine en la déstabilisant.



*REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES*

- Ahmadian, M. R., Kiel, C., Stege, P. & Scheffzek, K. (2003).** Structural fingerprints of the Ras-GTPase activating proteins neurofibromin and p120GAP. *J Mol Biol.* **329**, 699-710.
- Ahn, J. H., Miller, D., Winter, V. J., Banfield, M. J., Lee, J. H., Yoo, S. Y., Henz, S. R., Brady, R. L. & Weigel, D. (2006).** A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *Embo J.* **25**, 605-614. Epub 2006 Jan 2019.
- Amano, T., Tanabe, K., Eto, T., Narumiya, S. & Mizuno, K. (2001).** LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. *Biochem J.* **354**, 149-159.
- Ammerer, G., Hunter, C. P., Rothman, J. H., Saari, G. C., Valls, L. A. & Stevens, T. H. (1986).** PEP4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Mol Cell Biol.* **6**, 2490-2499.
- Andersen, L. B., Ballester, R., Marchuk, D. A., Chang, E., Gutmann, D. H., Saulino, A. M., Camonis, J., Wigler, M. & Collins, F. S. (1993).** A conserved alternative splice in the von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene produces two neurofibromin isoforms, both of which have GTPase-activating protein activity. *Mol Cell Biol.* **13**, 487-495.
- Aravind, L., Neuwald, A. F. & Ponting, C. P. (1999).** Sec14p-like domains in NF1 and Dbl-like proteins indicate lipid regulation of Ras and Rho signaling. *Curr Biol.* **9**, R195-197.
- Ardley, H. C. & Robinson, P. A. (2005).** E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem* **41**, 15-30.
- Arnold, R. J., Polevoda, B., Reilly, J. P. & Sherman, F. (1999).** The action of N-terminal acetyltransferases on yeast ribosomal proteins. *J Biol Chem.* **274**, 37035-37040.
- Bajenaru, M. L., Donahoe, J., Corral, T., Reilly, K. M., Brophy, S., Pellicer, A. & Gutmann, D. H. (2001).** Neurofibromatosis 1 (NF1) heterozygosity results in a cell-autonomous growth advantage for astrocytes. *Glia.* **33**, 314-323.
- Bajenaru, M. L., Hernandez, M. R., Perry, A., Zhu, Y., Parada, L. F., Garbow, J. R. & Gutmann, D. H. (2003).** Optic nerve glioma in mice requires astrocyte Nf1 gene inactivation and Nf1 brain heterozygosity. *Cancer Res.* **63**, 8573-8577.
- Ballester, R., Marchuk, D., Boguski, M., Saulino, A., Letcher, R., Wigler, M. & Collins, F. (1990).** The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell.* **63**, 851-859.
- Banfield, M. J. & Brady, R. L. (2000).** The structure of Antirrhinum centroradialis protein (CEN) suggests a role as a kinase regulator. *J Mol Biol.* **297**, 1159-1170.
- Banfield, M. J., Barker, J. J., Perry, A. C. & Brady, R. L. (1998).** Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction. *Structure.* **6**, 1245-1254.
- Barker, D., Wright, E., Nguyen, K., Cannon, L., Fain, P., Goldgar, D., Bishop, D. T., Carey, J., Baty, B., Kivlin, J. & et al. (1987).** Gene for von Recklinghausen

neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosome 17. *Science*. **236**, 1100-1102.

**Basu, T. N., Gutmann, D. H., Fletcher, J. A., Glover, T. W., Collins, F. S. & Downward, J. (1992).** Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature*. **356**, 713-715.

**Battle, M., Lu, A., Green, D. A., Xue, Y. & Hirsch, J. P. (2003).** Krh1p and Krh2p act downstream of the Gpa2p G(alpha) subunit to negatively regulate haploid invasive growth. *J Cell Sci*. **116**, 701-710.

**Beck, T. & Hall, M. N. (1999).** The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*. **402**, 689-692.

**Behnia, R., Panic, B., Whyte, J. R. & Munro, S. (2004).** Targeting of the Arf-like GTPase Arl3p to the Golgi requires N-terminal acetylation and the membrane protein Sys1p. *Nat Cell Biol*. **6**, 405-413. Epub 2004 Apr 2011.

**Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P. A. & Hilger, F. (1991).** The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **7**, 475-477.

**Bernards, A., Snijders, A. J., Hannigan, G. E., Murthy, A. E. & Gusella, J. F. (1993).** Mouse neurofibromatosis type 1 cDNA sequence reveals high degree of conservation of both coding and non-coding mRNA segments. *Hum Mol Genet*. **2**, 645-650.

**Bernier, I. & Jolles, P. (1984).** Purification and characterization of a basic 23 kDa cytosolic protein from bovine brain. *Biochim Biophys Acta*. **790**, 174-181.

**Bernier, I., Tresca, J. P. & Jolles, P. (1986).** Ligand-binding studies with a 23 kDa protein purified from bovine brain cytosol. *Biochim Biophys Acta*. **871**, 19-23.

**Bhoite, L. T., Yu, Y. & Stillman, D. J. (2001).** The Swi5 activator recruits the Mediator complex to the HO promoter without RNA polymerase II. *Genes Dev*. **15**, 2457-2469.

**Blachly-Dyson, E. & Stevens, T. H. (1987).** Yeast carboxypeptidase Y can be translocated and glycosylated without its amino-terminal signal sequence. *J Cell Biol*. **104**, 1183-1191.

**Black, A. R., Black, J. D. & Azizkhan-Clifford, J. (2001).** Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol*. **188**, 143-160.

**Bollag, G. & McCormick, F. (1991).** Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities. *Nature*. **351**, 576-579.

**Bollag, G., McCormick, F. & Clark, R. (1993).** Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits Ras GAP activity. *Embo J*. **12**, 1923-1927.

**Bose, S., Dutko, J. A. & Zitomer, R. S. (2005).** Genetic factors that regulate the attenuation of the general stress response of yeast. *Genetics*. **169**, 1215-1226. Epub 2004 Nov 1215.



**Boy-Marcotte, E., Damak, F., Camonis, J., Garreau, H. & Jacquet, M. (1989).** The C-terminal part of a gene partially homologous to CDC 25 gene suppresses the *cdc25-5* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. **77**, 21-30.

**Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H. & Jacquet, M. (1998).** Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **180**, 1044-1052.

**Boy-Marcotte, E., Lagniel, G., Perrot, M., Bussereau, F., Boudsocq, A., Jacquet, M. & Labarre, J. (1999).** The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Mol Microbiol.* **33**, 274-283.

**Bradley, D., Ratcliffe, O., Vincent, C., Carpenter, R. & Coen, E. (1997).** Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science*. **275**, 80-83.

**Bradley, D., Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Rothstein, S. & Coen, E. (1996).** Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature*. **379**, 791-797.

**Brannan, C. I., Perkins, A. S., Vogel, K. S., Ratner, N., Nordlund, M. L., Reid, S. W., Buchberg, A. M., Jenkins, N. A., Parada, L. F. & Copeland, N. G. (1994).** Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes Dev.* **8**, 1019-1029.

**Breviario, D., Hinnebusch, A. G. & Dhar, R. (1988).** Multiple regulatory mechanisms control the expression of the RAS1 and RAS2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* **7**, 1805-1813.

**Broek, D., Samiy, N., Fasano, O., Fujiyama, A., Tamanoi, F., Northup, J. & Wigler, M. (1985).** Differential activation of yeast adenylate cyclase by wild-type and mutant RAS proteins. *Cell*. **41**, 763-769.

**Broek, D., Toda, T., Michaeli, T., Levin, L., Birchmeier, C., Zoller, M., Powers, S. & Wigler, M. (1987).** The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell*. **48**, 789-799.

**Brooks, D. E. (1985).** Characterization of a 22 kDa protein with widespread tissue distribution but which is uniquely present in secretions of the testis and epididymis and on the surface of spermatozoa. *Biochim Biophys Acta.* **841**, 59-70.

**Bruun, A. W., Svendsen, I., Sorensen, S. O., Kielland-Brandt, M. C. & Winther, J. R. (1998).** A high-affinity inhibitor of yeast carboxypeptidase Y is encoded by TFS1 and shows homology to a family of lipid binding proteins. *Biochemistry.* **37**, 3351-3357.

**Bucquoy, S., Jolles, P. & Schoentgen, F. (1994).** Relationships between molecular interactions (nucleotides, lipids and proteins) and structural features of the bovine brain 21-kDa protein. *Eur J Biochem.* **225**, 1203-1210.

- Budovskaya, Y. V., Stephan, J. S., Deminoff, S. J. & Herman, P. K. (2005).** An evolutionary proteomics approach identifies substrates of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 13933-13938. Epub 12005 Sep 13919.
- Bunning, P. & Holzer, H. (1977).** Natural occurrence and chemical modification of proteinase B inhibitors from yeast. *J Biol Chem.* **252**, 5316-5323.
- Caesar, R. & Blomberg, A. (2004).** The stress-induced Tfs1p requires NatB-mediated acetylation to inhibit carboxypeptidase Y and to regulate the protein kinase A pathway. *J Biol Chem.* **279**, 38532-38543. Epub 32004 Jun 38530.
- Caesar, R., Warringer, J. & Blomberg, A. (2006).** Physiological importance and identification of novel targets for the N-terminal acetyltransferase NatB. *Eukaryot Cell.* **5**, 368-378.
- Calderon, R. O. & DeVries, G. H. (1997).** Lipid composition and phospholipid asymmetry of membranes from a Schwann cell line. *J Neurosci Res.* **49**, 372-380.
- Cameron, S., Levin, L., Zoller, M. & Wigler, M. (1988).** cAMP-independent control of sporulation, glycogen metabolism, and heat shock resistance in *S. cerevisiae*. *Cell.* **53**, 555-566.
- Camonis, J. H., Kalekine, M., Gondre, B., Garreau, H., Boy-Marcotte, E. & Jacquet, M. (1986).** Characterization, cloning and sequence analysis of the CDC25 gene which controls the cyclic AMP level of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* **5**, 375-380.
- Camus, C., Geymonat, M., Garreau, H., Baudet-Nessler, S. & Jacquet, M. (1997).** Dimerization of Cdc25p, the guanine-nucleotide exchange factor for Ras from *Saccharomyces cerevisiae*, and its interaction with Sdc25p. *Eur J Biochem.* **247**, 703-708.
- Cannon, J. F. & Tatchell, K. (1987).** Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol.* **7**, 2653-2663.
- Carey, D. J. (1997).** Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J.* **327**, 1-16.
- Carim-Todd, L., Escarceller, M., Estivill, X. & Sumoy, L. (2003).** LRRN6A/LERN1 (leucine-rich repeat neuronal protein 1), a novel gene with enriched expression in limbic system and neocortex. *Eur J Neurosci.* **18**, 3167-3182.
- Castle, B., Baser, M. E., Huson, S. M., Cooper, D. N. & Upadhyaya, M. (2003).** Evaluation of genotype-phenotype correlations in neurofibromatosis type 1. *J Med Genet.* **40**, e109.
- Cawthon, R. M., O'Connell, P., Buchberg, A. M., Viskochil, D., Weiss, R. B., Culver, M., Stevens, J., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. & White, R. (1990).** Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of EVI2 and mapping of other transcripts. *Genomics.* **7**, 555-565.

**Cawthon, R. M., Andersen, L. B., Buchberg, A. M., Xu, G. F., O'Connell, P., Viskochil, D., Weiss, R. B., Wallace, M. R., Marchuk, D. A., Culver, M. & et al. (1991).** cDNA sequence and genomic structure of EV12B, a gene lying within an intron of the neurofibromatosis type 1 gene. *Genomics*. **9**, 446-460.

**Chatterjee, D., Bai, Y., Wang, Z., Beach, S., Mott, S., Roy, R., Braastad, C., Sun, Y., Mukhopadhyay, A., Aggarwal, B. B., Darnowski, J., Pantazis, P., Wyche, J., Fu, Z., Kitagawa, Y., Keller, E. T., Sedivy, J. M. & Yeung, K. C. (2004).** RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *J Biol Chem*. **279**, 17515-17523. Epub 12004 Feb 17516.

**Chautard, H., Jacquet, M., Schoentgen, F., Bureau, N. & Benedetti, H. (2004).** Tfs1p, a member of the PEBP family, inhibits the Ira2p but not the Ira1p Ras GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. **3**, 459-470.

**Chen, R. A., Michaeli, T., Van Aelst, L. & Ballester, R. (2000).** A role for the noncatalytic N terminus in the function of Cdc25, a *Saccharomyces cerevisiae* Ras-guanine nucleotide exchange factor. *Genetics*. **154**, 1473-1484.

**Cherry, J. R., Johnson, T. R., Dollard, C., Shuster, J. R. & Denis, C. L. (1989).** Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates the yeast transcriptional activator ADR1. *Cell*. **56**, 409-419.

**Chevtzoff, C., Vallortigara, J., Averet, N., Rigoulet, M. & Devin, A. (2005).** The yeast cAMP protein kinase Tpk3p is involved in the regulation of mitochondrial enzymatic content during growth. *Biochim Biophys Acta*. **1706**, 117-125.

**Chi, N. & Epstein, J. A. (2002).** Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet*. **18**, 41-47.

**Chi, Y., Huddleston, M. J., Zhang, X., Young, R. A., Annan, R. S., Carr, S. A. & Deshaies, R. J. (2001).** Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. *Genes Dev*. **15**, 1078-1092.

**Chidiac, P. & Ross, E. M. (1999).** Phospholipase C-beta1 directly accelerates GTP hydrolysis by Galphaq and acceleration is inhibited by Gbeta gamma subunits. *J Biol Chem*. **274**, 19639-19643.

**Cichowski, K., Santiago, S., Jardim, M., Johnson, B. W. & Jacks, T. (2003).** Dynamic regulation of the Ras pathway via proteolysis of the NF1 tumor suppressor. *Genes Dev*. **17**, 449-454.

**Cichowski, K., Shih, T. S., Schmitt, E., Santiago, S., Reilly, K., McLaughlin, M. E., Bronson, R. T. & Jacks, T. (1999).** Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science*. **286**, 2172-2176.

**Ciechanover, A., Orian, A. & Schwartz, A. L. (2000).** Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays*. **22**, 442-451.

**Clark, G. J., Westwick, J. K. & Der, C. J. (1997).** p120 GAP modulates Ras activation of Jun kinases and transformation. *J Biol Chem.* **272**, 1677-1681.

**Clark, G. J., Quilliam, L. A., Hisaka, M. M. & Der, C. J. (1993).** Differential antagonism of Ras biological activity by catalytic and Src homology domains of Ras GTPase activation protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 4887-4891.

**Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S. & Barrell, B. G. (1998).** Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature.* **393**, 537-544.

**Colicelli, J., Birchmeier, C., Michaeli, T., O'Neill, K., Riggs, M. & Wigler, M. (1989).** Isolation and characterization of a mammalian gene encoding a high-affinity cAMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**, 3599-3603.

**Colombo, S., Ronchetti, D., Thevelein, J. M., Winderickx, J. & Martegani, E. (2004).** Activation state of the Ras2 protein and glucose-induced signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **279**, 46715-46722. Epub 42004 Aug 46731.

**Colombo, S., Ma, P., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., Nauwelaers, D., de Winde, J. H., Gorwa, M. F., Colavizza, D. & Thevelein, J. M. (1998).** Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* **17**, 3326-3341.

**Corbit, K. C., Soh, J. W., Yoshida, K., Eves, E. M., Weinstein, I. B. & Rosner, M. R. (2000).** Different protein kinase C isoforms determine growth factor specificity in neuronal cells. *Mol Cell Biol.* **20**, 5392-5403.

**Corbit, K. C., Trakul, N., Eves, E. M., Diaz, B., Marshall, M. & Rosner, M. R. (2003).** Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem.* **278**, 13061-13068. Epub 12003 Jan 13027.

**Costa, R. M., Federov, N. B., Kogan, J. H., Murphy, G. G., Stern, J., Ohno, M., Kucherlapati, R., Jacks, T. & Silva, A. J. (2002).** Mechanism for the learning deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Nature.* **415**, 526-530. Epub 2002 Jan 2002.

**Crawford, A. H. & Schorry, E. K. (1999).** Neurofibromatosis in children: the role of the orthopaedist. *J Am Acad Orthop Surg.* **7**, 217-230.

**Crechet, J. B., Jacquet, E., Bernardi, A. & Parmeggiani, A. (2000).** Analysis of the role of the hypervariable region of yeast Ras2p and its farnesylation in the interaction with exchange factors and adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* **275**, 17754-17761.

**Cui, Z., Shiraki, T., Hirata, D. & Miyakawa, T. (1998).** Yeast gene YRR1, which is required for resistance to 4-nitroquinoline N-oxide, mediates transcriptional activation of the multidrug resistance transporter gene SNQ2. *Mol Microbiol.* **29**, 1307-1315.

**Cutler, R. E., Jr. & Morrison, D. K. (1997).** Mammalian Raf-1 is activated by mutations that restore Raf signaling in *Drosophila*. *Embo J.* **16**, 1953-1960.

**Damak, F., Boy-Marcotte, E., Le-Roscouet, D., Guilbaud, R. & Jacquet, M. (1991).** SDC25, a CDC25-like gene which contains a RAS-activating domain and is a dispensable gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **11**, 202-212.

**D'Angelo, I., Welti, S., Bonneau, F. & Scheffzek, K. (2006).** A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein. *EMBO Rep.* **7**, 174-179.

**Dasgupta, B., Dugan, L. L. & Gutmann, D. H. (2003).** The neurofibromatosis 1 gene product neurofibromin regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-mediated signaling in astrocytes. *J Neurosci.* **23**, 8949-8954.

**Daston, M. M. & Ratner, N. (1992).** Neurofibromin, a predominantly neuronal GTPase activating protein in the adult, is ubiquitously expressed during development. *Dev Dyn.* **195**, 216-226.

**Daston, M. M., Scrabble, H., Nordlund, M., Sturbaum, A. K., Nissen, L. M. & Ratner, N. (1992).** The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron.* **8**, 415-428.

**Davies, B. J., Pickard, B. S., Steel, M., Morris, R. G. & Lathe, R. (1998).** Serine proteases in rodent hippocampus. *J Biol Chem.* **273**, 23004-23011.

**De Schepper, S., Boucneau, J. M., Westbroek, W., Mommaas, M., Onderwater, J., Messiaen, L., Naeyaert, J. M. & Lambert, J. L. (2006).** Neurofibromatosis type 1 protein and amyloid precursor protein interact in normal human melanocytes and colocalize with melanosomes. *J Invest Dermatol.* **126**, 653-659.

**De Vendittis, E., Vitelli, A., Zahn, R. & Fasano, O. (1986).** Suppression of defective RAS1 and RAS2 functions in yeast by an adenylate cyclase activated by a single amino acid change. *Embo J.* **5**, 3657-3663.

**De Wever, V., Reiter, W., Ballarini, A., Ammerer, G. & Brocard, C. (2005).** A dual role for PP1 in shaping the Msn2-dependent transcriptional response to glucose starvation. *Embo J.* **24**, 4115-4123. Epub 2005 Nov 4110.

**DeClue, J. E., Cohen, B. D. & Lowy, D. R. (1991).** Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 protein product. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 9914-9918.

**DeClue, J. E., Papageorge, A. G., Fletcher, J. A., Diehl, S. R., Ratner, N., Vass, W. C. & Lowy, D. R. (1992).** Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell.* **69**, 265-273.

- DeFeo-Jones, D., Scolnick, E. M., Koller, R. & Dhar, R. (1983).** ras-Related gene sequences identified and isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. **306**, 707-709.
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R. & Brown, P. O. (1997).** Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*. **278**, 680-686.
- Dietzel, C. & Kurjan, J. (1987).** Pheromonal regulation and sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* SST2 gene: a model for desensitization to pheromone. *Mol Cell Biol*. **7**, 4169-4177.
- Dihazi, H., Kessler, R. & Eschrich, K. (2003).** Glucose-induced stimulation of the Ras-cAMP pathway in yeast leads to multiple phosphorylations and activation of 6-phosphofructo-2-kinase. *Biochemistry*. **42**, 6275-6282.
- Dugoff, L. & Sujansky, E. (1996).** Neurofibromatosis type 1 and pregnancy. *Am J Med Genet*. **66**, 7-10.
- Durchschlag, E., Reiter, W., Ammerer, G. & Schuller, C. (2004).** Nuclear localization destabilizes the stress-regulated transcription factor Msn2. *J Biol Chem*. **279**, 55425-55432. Epub 52004 Oct 55422.
- Ebinger, M., Senf, L., Wachowski, O. & Scheurlen, W. (2005).** No aberrant methylation of neurofibromatosis 1 gene (NF1) promoter in pilocytic astrocytoma in childhood. *Pediatr Hematol Oncol*. **22**, 83-87.
- Edelman, A. M., Blumenthal, D. K. & Krebs, E. G. (1987).** Protein serine/threonine kinases. *Annu Rev Biochem* **56**, 567-613.
- Elion, E. A. (1998).** Routing MAP kinase cascades. *Science*. **281**, 1625-1626.
- Ellison-Wright, Z., Heyman, I., Frampton, I., Rubia, K., Chitnis, X., Ellison-Wright, I., Williams, S. C., Suckling, J., Simmons, A. & Bullmore, E. (2004).** Heterozygous PAX6 mutation, adult brain structure and fronto-striato-thalamic function in a human family. *Eur J Neurosci*. **19**, 1505-1512.
- Endo, M., Ohashi, K. & Mizuno, K. (2007).** LIM kinase and slingshot are critical for neurite extension. *J Biol Chem*. **282**, 13692-13702. Epub 12007 Mar 13613.
- Engelberg, D., Simchen, G. & Levitzki, A. (1990).** In vitro reconstitution of cdc25 regulated *S. cerevisiae* adenylyl cyclase and its kinetic properties. *Embo J*. **9**, 641-651.
- Estruch, F. (2000).** Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev*. **24**, 469-486.
- Estruch, F. & Carlson, M. (1993).** Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **13**, 3872-3881.
- Eves, E. M., Shapiro, P., Naik, K., Klein, U. R., Trakul, N. & Rosner, M. R. (2006).** Raf kinase inhibitory protein regulates aurora B kinase and the spindle checkpoint. *Mol Cell*. **23**, 561-574.

**Fahsold, R., Hoffmeyer, S., Mischung, C., Gille, C., Ehlers, C., Kucukceylan, N., Abdel-Nour, M., Gewies, A., Peters, H., Kaufmann, D., Buske, A., Tinschert, S. & Nurnberg, P. (2000).** Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *Am J Hum Genet.* **66**, 790-818.

**Fauchon, M., Lagniel, G., Aude, J. C., Lombardia, L., Soularue, P., Petat, C., Marguerie, G., Sentenac, A., Werner, M. & Labarre, J. (2002).** Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol Cell.* **9**, 713-723.

**Feng, L., Yunoue, S., Tokuo, H., Ozawa, T., Zhang, D., Patrakitkomjorn, S., Ichimura, T., Saya, H. & Araki, N. (2004).** PKA phosphorylation and 14-3-3 interaction regulate the function of neurofibromatosis type I tumor suppressor, neurofibromin. *FEBS Lett.* **557**, 275-282.

**Ferner, R. E., Hughes, R. A. & Weinman, J. (1996).** Intellectual impairment in neurofibromatosis 1. *J Neurol Sci.* **138**, 125-133.

**Ficarro, S. B., McClelland, M. L., Stukenberg, P. T., Burke, D. J., Ross, M. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. & White, F. M. (2002).** Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol.* **20**, 301-305.

**Fields, S. & Song, O. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* **340**, 245-246.

**Fishbein, L., Eady, B., Sanek, N., Muir, D. & Wallace, M. R. (2005).** Analysis of somatic NF1 promoter methylation in plexiform neurofibromas and Schwann cells. *Cancer Genet Cytogenet.* **157**, 181-186.

**Foletta, V. C., Moussi, N., Sarmiere, P. D., Bamburg, J. R. & Bernard, O. (2004).** LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Exp Cell Res.* **294**, 392-405.

**Friedman, J. M. & Birch, P. (1997).** An association between optic glioma and other tumours of the central nervous system in neurofibromatosis type 1. *Neuropediatrics.* **28**, 131-132.

**Fu, Z., Smith, P. C., Zhang, L., Rubin, M. A., Dunn, R. L., Yao, Z. & Keller, E. T. (2003).** Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst.* **95**, 878-889.

**Fu, Z., Kitagawa, Y., Shen, R., Shah, R., Mehra, R., Rhodes, D., Keller, P. J., Mizokami, A., Dunn, R., Chinnaiyan, A. M., Yao, Z. & Keller, E. T. (2006).** Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer. *Prostate.* **66**, 248-256.

**Fukada, H., Mima, J., Nagayama, M., Kato, M. & Ueda, M. (2007).** Biochemical analysis of the yeast proteinase inhibitor (IC) homolog ICh and its comparison with IC. *Biosci Biotechnol Biochem.* **71**, 472-480.

- Garreau, H., Camonis, J. H., Guitton, C. & Jacquet, M. (1990).** The *Saccharomyces cerevisiae* CDC25 gene product is a 180 kDa polypeptide and is associated with a membrane fraction. *FEBS Lett.* **269**, 53-59.
- Garreau, H., Geymonat, M., Renault, G. & Jacquet, M. (1996).** Membrane-anchoring domains of Cdc25p, a *Saccharomyces cerevisiae* ras exchange factor. *Biol Cell.* **86**, 93-102.
- Garreau, H., Hasan, R. N., Renault, G., Estruch, F., Boy-Marcotte, E. & Jacquet, M. (2000).** Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* **146**, 2113-2120.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D. & Brown, P. O. (2000).** Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell.* **11**, 4241-4257.
- Gautschi, M., Just, S., Mun, A., Ross, S., Rucknagel, P., Dubaquié, Y., Ehrenhofer-Murray, A. & Rospert, S. (2003).** The yeast N(alpha)-acetyltransferase NatA is quantitatively anchored to the ribosome and interacts with nascent polypeptides. *Mol Cell Biol.* **23**, 7403-7414.
- Geissenhoner, A., Weise, C. & Ehrenhofer-Murray, A. E. (2004).** Dependence of ORC silencing function on NatA-mediated Nalpha acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **24**, 10300-10312.
- Gems, D., Ferguson, C. J., Robertson, B. D., Nieves, R., Page, A. P., Blaxter, M. L. & Maizels, R. M. (1995).** An abundant, trans-spliced mRNA from *Toxocara canis* infective larvae encodes a 26-kDa protein with homology to phosphatidylethanolamine-binding proteins. *J Biol Chem.* **270**, 18517-18522.
- George, A. J., Holsinger, R. M., McLean, C. A., Tan, S. S., Scott, H. S., Cardamone, T., Cappai, R., Masters, C. L. & Li, Q. X. (2006).** Decreased phosphatidylethanolamine binding protein expression correlates with Abeta accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* **27**, 614-623. Epub 2005 Jun 2006.
- Gerst, J. E., Ferguson, K., Vojtek, A., Wigler, M. & Field, J. (1991).** CAP is a bifunctional component of the *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase complex. *Mol Cell Biol.* **11**, 1248-1257.
- Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. (1998).** NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**, 225-260.
- Gibbons, R., Adeoya-Osiguwa, S. A. & Fraser, L. R. (2005).** A mouse sperm decapacitation factor receptor is phosphatidylethanolamine-binding protein 1. *Reproduction.* **130**, 497-508.
- Gibbs, C. S., Knighton, D. R., Sowadski, J. M., Taylor, S. S. & Zoller, M. J. (1992).** Systematic mutational analysis of cAMP-dependent protein kinase identifies unregulated catalytic subunits and defines regions important for the recognition of the regulatory subunit. *J Biol Chem.* **267**, 4806-4814.



- Gilbert, A. & Brockman, R. (1995).** Congenital pseudarthrosis of the tibia. Long-term followup of 29 cases treated by microvascular bone transfer. *Clin Orthop Relat Res.*, 37-44.
- Gitler, A. D., Brown, C. B., Kochilas, L., Li, J. & Epstein, J. A. (2002).** Neural crest migration and mouse models of congenital heart disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **67**, 57-62.
- Gitler, A. D., Zhu, Y., Ismat, F. A., Lu, M. M., Yamauchi, Y., Parada, L. F. & Epstein, J. A. (2003).** Nf1 has an essential role in endothelial cells. *Nat Genet.* **33**, 75-79. Epub 2002 Dec 2009.
- Glattard, E., Muller, A., Aunis, D., Metz-Boutigue, M. H., Stefano, G. B. & Goumon, Y. (2006).** Rethinking the opiate system? Morphine and morphine-6-glucuronide as new endocrine and neuroendocrine mediators. *Med Sci Monit.* **12**, SR25-27. Epub 2006 May 2029.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J. M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M. B. & Labarre, J. (1998).** The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **273**, 22480-22489.
- Gorner, W., Schuller, C. & Ruis, H. (1999).** Being at the right place at the right time: the role of nuclear transport in dynamic transcriptional regulation in yeast. *Biol Chem.* **380**, 147-150.
- Gorner, W., Durchschlag, E., Wolf, J., Brown, E. L., Ammerer, G., Ruis, H. & Schuller, C. (2002).** Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *Embo J.* **21**, 135-144.
- Gorner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H. & Schuller, C. (1998).** Nuclear localization of the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* **12**, 586-597.
- Goumon, Y., Angelone, T., Schoentgen, F., Chasserot-Golaz, S., Almas, B., Fukami, M. M., Langley, K., Welters, I. D., Tota, B., Aunis, D. & Metz-Boutigue, M. H. (2004).** The hippocampal cholinergic neurostimulating peptide, the N-terminal fragment of the secreted phosphatidylethanolamine-binding protein, possesses a new biological activity on cardiac physiology. *J Biol Chem.* **279**, 13054-13064. Epub 12004 Jan 13014.
- Goumon, Y., Muller, A., Glattard, E., Marban, C., Gasnier, C., Strub, J. M., Chasserot-Golaz, S., Rohr, O., Stefano, G. B., Welters, I. D., Van Dorsselaer, A., Schoentgen, F., Aunis, D. & Metz-Boutigue, M. H. (2006).** Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules. *J Biol Chem.* **281**, 8082-8089. Epub 2006 Jan 8024.
- Goyal, P., Pandey, D. & Siess, W. (2006).** Phosphorylation-dependent regulation of unique nuclear and nucleolar localization signals of LIM kinase 2 in endothelial cells. *J Biol Chem.* **281**, 25223-25230. Epub 22006 Jul 25224.
- Gregory, P. E., Gutmann, D. H., Mitchell, A., Park, S., Boguski, M., Jacks, T., Wood, D. L., Jove, R. & Collins, F. S. (1993).** Neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) associates with microtubules. *Somat Cell Mol Genet.* **19**, 265-274.

- Griffioen, G., Swinnen, S. & Thevelein, J. M. (2003).** Feedback inhibition on cell wall integrity signaling by Zds1 involves Gsk3 phosphorylation of a cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit. *J Biol Chem.* **278**, 23460-23471. Epub 22003 Apr 23418.
- Griffioen, G., Anghileri, P., Imre, E., Baroni, M. D. & Ruis, H. (2000).** Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **275**, 1449-1456.
- Griffioen, G., Branduardi, P., Ballarini, A., Anghileri, P., Norbeck, J., Baroni, M. D. & Ruis, H. (2001).** Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain. *Mol Cell Biol.* **21**, 511-523.
- Gros, R., Benovic, J. L., Tan, C. M. & Feldman, R. D. (1997).** G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *J Clin Invest.* **99**, 2087-2093.
- Gross, A., Winograd, S., Marbach, I. & Levitzki, A. (1999).** The N-terminal half of Cdc25 is essential for processing glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry.* **38**, 13252-13262.
- Gross, E., Marbach, I., Engelberg, D., Segal, M., Simchen, G. & Levitzki, A. (1992).** Anti-Cdc25 antibodies inhibit guanyl nucleotide-dependent adenylyl cyclase of *Saccharomyces cerevisiae* and cross-react with a 150-kilodalton mammalian protein. *Mol Cell Biol.* **12**, 2653-2661.
- Guo, H. F., The, L., Hannan, F., Bernardis, A. & Zhong, Y. (1997).** Requirement of *Drosophila* NF1 for activation of adenylyl cyclase by PACAP38-like neuropeptides. *Science.* **276**, 795-798.
- Guo, H. F., Tong, J., Hannan, F., Luo, L. & Zhong, Y. (2000).** A neurofibromatosis-1-regulated pathway is required for learning in *Drosophila*. *Nature.* **403**, 895-898.
- Gutmann, D. H., Wood, D. L. & Collins, F. S. (1991).** Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 9658-9662.
- Gutmann, D. H., Zhang, Y. & Hirbe, A. (1999).** Developmental regulation of a neuron-specific neurofibromatosis 1 isoform. *Ann Neurol.* **46**, 777-782.
- Gutmann, D. H., Geist, R. T., Wright, D. E. & Snider, W. D. (1995).** Expression of the neurofibromatosis 1 (NF1) isoforms in developing and adult rat tissues. *Cell Growth Differ.* **6**, 315-323.
- Gutmann, D. H., Wu, Y. L., Hedrick, N. M., Zhu, Y., Guha, A. & Parada, L. F. (2001).** Heterozygosity for the neurofibromatosis 1 (NF1) tumor suppressor results in abnormalities in cell attachment, spreading and motility in astrocytes. *Hum Mol Genet.* **10**, 3009-3016.
- Hajra, A., Martin-Gallardo, A., Tarle, S. A., Freedman, M., Wilson-Gunn, S., Bernardis, A. & Collins, F. S. (1994).** DNA sequences in the promoter region of the NF1 gene are highly conserved between human and mouse. *Genomics.* **21**, 649-652.

- Hakimi, M. A., Speicher, D. W. & Shiekhatar, R. (2002).** The motor protein kinesin-1 links neurofibromin and merlin in a common cellular pathway of neurofibromatosis. *J Biol Chem.* **277**, 36909-36912. Epub 32002 Aug 36920.
- Haney, S. A. & Broach, J. R. (1994).** Cdc25p, the guanine nucleotide exchange factor for the Ras proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, promotes exchange by stabilizing Ras in a nucleotide-free state. *J Biol Chem.* **269**, 16541-16548.
- Hannan, F., Ho, I., Tong, J. J., Zhu, Y., Nurnberg, P. & Zhong, Y. (2006).** Effect of neurofibromatosis type I mutations on a novel pathway for adenylyl cyclase activation requiring neurofibromin and Ras. *Hum Mol Genet.* **15**, 1087-1098. Epub 2006 Mar 1082.
- Harashima, T. & Heitman, J. (2002).** The Galpha protein Gpa2 controls yeast differentiation by interacting with kelch repeat proteins that mimic Gbeta subunits. *Mol Cell.* **10**, 163-173.
- Harashima, T., Anderson, S., Yates, J. R., 3rd & Heitman, J. (2006).** The kelch proteins Gpb1 and Gpb2 inhibit Ras activity via association with the yeast RasGAP neurofibromin homologs Ira1 and Ira2. *Mol Cell.* **22**, 819-830.
- Hartwell, L. H., Culotti, J. & Reid, B. (1970).** Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **66**, 352-359.
- Hasan, R., Leroy, C., Isnard, A. D., Labarre, J., Boy-Marcotte, E. & Toledano, M. B. (2002).** The control of the yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol.* **45**, 233-241.
- Henderson, R. A., Williamson, K., Cumming, S., Clarke, M. P., Lynch, S. A., Hanson, I. M., FitzPatrick, D. R., Sisodiya, S. & van Heyningen, V. (2007).** Inherited PAX6, NF1 and OTX2 mutations in a child with microphthalmia and aniridia. *Eur J Hum Genet.* **15**, 898-901. Epub 2007 Apr 2004.
- Hengst, U., Albrecht, H., Hess, D. & Monard, D. (2001).** The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *J Biol Chem.* **276**, 535-540.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998).** The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479.
- Hiatt, K. K., Ingram, D. A., Zhang, Y., Bollag, G. & Clapp, D. W. (2001).** Neurofibromin GTPase-activating protein-related domains restore normal growth in Nf1<sup>-/-</sup> cells. *J Biol Chem.* **276**, 7240-7245. Epub 2000 Nov 7215.
- Hickox, D. M., Gibbs, G., Morrison, J. R., Sebire, K., Edgar, K., Keah, H. H., Alter, K., Loveland, K. L., Hearn, M. T., de Kretser, D. M. & O'Bryan, M. K. (2002).** Identification of a novel testis-specific member of the phosphatidylethanolamine binding protein family, pebp-2. *Biol Reprod.* **67**, 917-927.

- Hiraoka, J., Okano, I., Higuchi, O., Yang, N. & Mizuno, K. (1996).** Self-association of LIM-kinase 1 mediated by the interaction between an N-terminal LIM domain and a C-terminal kinase domain. *FEBS Lett.* **399**, 117-121.
- Hitchcock, A. L., Auld, K., Gygi, S. P. & Silver, P. A. (2003).** A subset of membrane-associated proteins is ubiquitinated in response to mutations in the endoplasmic reticulum degradation machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 12735-12740. Epub 12003 Oct 12713.
- Hixson, C. S. & Krebs, E. G. (1980).** Characterization of a cyclic AMP-binding protein from bakers' yeast. Identification as a regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* **255**, 2137-2145.
- Ho, I. S., Hannan, F., Guo, H. F., Hakker, I. & Zhong, Y. (2007).** Distinct functional domains of neurofibromatosis type 1 regulate immediate versus long-term memory formation. *J Neurosci.* **27**, 6852-6857.
- Hofmann, F., Martelli, F., Livingston, D. M. & Wang, Z. (1996).** The retinoblastoma gene product protects E2F-1 from degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **10**, 2949-2959.
- Hofsteenge, J. & Stone, S. R. (1987).** The effect of thrombomodulin on the cleavage of fibrinogen and fibrinogen fragments by thrombin. *Eur J Biochem.* **168**, 49-56.
- Hood, J. K. & Silver, P. A. (2000).** Diverse nuclear transport pathways regulate cell proliferation and oncogenesis. *Biochim Biophys Acta.* **1471**, M31-41.
- Houben, R., Michel, B., Vetter-Kauczok, C. S., Pfohler, C., Laetsch, B., Wolter, M. D., Leonard, J. H., Trefzer, U., Ugurel, S., Schrama, D. & Becker, J. C. (2006).** Absence of classical MAP kinase pathway signalling in Merkel cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* **126**, 1135-1142.
- Hsueh, Y. P., Roberts, A. M., Volta, M., Sheng, M. & Roberts, R. G. (2001).** Bipartite interaction between neurofibromatosis type I protein (neurofibromin) and syndecan transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *J Neurosci.* **21**, 3764-3770.
- Huang, S., Elliott, R. C., Liu, P. S., Koduri, R. K., Weickmann, J. L., Lee, J. H., Blair, L. C., Ghosh-Dastidar, P., Bradshaw, R. A., Bryan, K. M. & et al. (1987).** Specificity of cotranslational amino-terminal processing of proteins in yeast. *Biochemistry.* **26**, 8242-8246.
- Hurley, J. H., Lee, S. & Prag, G. (2006).** Ubiquitin-binding domains. *Biochem J.* **399**, 361-372.
- Hyman, S. L., Shores, A. & North, K. N. (2005).** The nature and frequency of cognitive deficits in children with neurofibromatosis type 1. *Neurology.* **65**, 1037-1044.
- Ikebe, C., Ohashi, K. & Mizuno, K. (1998).** Identification of testis-specific (Limk2t) and brain-specific (Limk2c) isoforms of mouse LIM-kinase 2 gene transcripts. *Biochem Biophys Res Commun.* **246**, 307-312.

**Inoue, H., Lin, L., Lee, X., Shao, Z., Mendes, S., Snodgrass-Belt, P., Sweigard, H., Engber, T., Pepinsky, B., Yang, L., Beal, M. F., Mi, S. & Isacson, O. (2007).** Inhibition of the leucine-rich repeat protein LINGO-1 enhances survival, structure, and function of dopaminergic neurons in Parkinson's disease models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 14430-14435. Epub 12007 Aug 14428.

**Izawa, I., Tamaki, N. & Saya, H. (1996).** Phosphorylation of neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) by cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* **382**, 53-59.

**Jacquet, M., Renault, G., Lallet, S., De Mey, J. & Goldbeter, A. (2003).** Oscillatory behavior of the nuclear localization of the transcription factors Msn2 and Msn4 in response to stress in yeast. *ScientificWorldJournal* **3**, 609-612.

**Jazirehi, A. R., Vega, M. I., Chatterjee, D., Goodglick, L. & Bonavida, B. (2004).** Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab. *Cancer Res.* **64**, 7117-7126.

**Jelinsky, S. A. & Samson, L. D. (1999).** Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 1486-1491.

**Jeong, C. J., Yang, S. H., Xie, Y., Zhang, L., Johnston, S. A. & Kodadek, T. (2001).** Evidence that Gal11 protein is a target of the Gal4 activation domain in the mediator. *Biochemistry.* **40**, 9421-9427.

**Johnson, M. R., Ferner, R. E., Bobrow, M. & Hughes, R. A. (2000).** Detailed analysis of the oligodendrocyte myelin glycoprotein gene in four patients with neurofibromatosis 1 and primary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **68**, 643-646.

**Jones, H. E., Harwood, J. L., Bowen, I. D. & Griffiths, G. (1992).** Lipid composition of subcellular membranes from larvae and prepupae of *Drosophila melanogaster*. *Lipids.* **27**, 984-987.

**Jones, S., Vignais, M. L. & Broach, J. R. (1991).** The CDC25 protein of *Saccharomyces cerevisiae* promotes exchange of guanine nucleotides bound to ras. *Mol Cell Biol.* **11**, 2641-2646.

**Kaplon, T. & Jacquet, M. (1995).** The cellular content of Cdc25p, the Ras exchange factor in *Saccharomyces cerevisiae*, is regulated by destabilization through a cyclin destruction box. *J Biol Chem.* **270**, 20742-20747.

**Kataoka, T., Powers, S., McGill, C., Fasano, O., Strathern, J., Broach, J. & Wigler, M. (1984).** Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 genes. *Cell.* **37**, 437-445.

**Kikkawa, R., Koya, D. & Haneda, M. (2003).** Progression of diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis.* **41**, S19-21.

**Kim, E. A., Noh, Y. T., Ryu, M. J., Kim, H. T., Lee, S. E., Kim, C. H., Lee, C., Kim, Y. H. & Choi, C. Y. (2006).** Phosphorylation and transactivation of Pax6 by homeodomain-interacting protein kinase 2. *J Biol Chem.* **281**, 7489-7497. Epub 2006 Jan 7489.

- Kim, H. A., Ling, B. & Ratner, N. (1997).** Nf1-deficient mouse Schwann cells are angiogenic and invasive and can be induced to hyperproliferate: reversion of some phenotypes by an inhibitor of farnesyl protein transferase. *Mol Cell Biol.* **17**, 862-872.
- Kim, H. A., Rosenbaum, T., Marchionni, M. A., Ratner, N. & DeClue, J. E. (1995).** Schwann cells from neurofibromin deficient mice exhibit activation of p21ras, inhibition of cell proliferation and morphological changes. *Oncogene.* **11**, 325-335.
- Kimura, Y., Takaoka, M., Tanaka, S., Sassa, H., Tanaka, K., Polevoda, B., Sherman, F. & Hirano, H. (2000).** N(alpha)-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20 S proteasome. *J Biol Chem.* **275**, 4635-4639.
- King, A. J., Sun, H., Diaz, B., Barnard, D., Miao, W., Bagrodia, S. & Marshall, M. S. (1998).** The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature.* **396**, 180-183.
- Kinney, A. J. & Carman, G. M. (1988).** Phosphorylation of yeast phosphatidylserine synthase in vivo and in vitro by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**, 7962-7966.
- Knudson, A. G., Jr. (1971).** Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **68**, 820-823.
- Kobayashi, N. & McEntee, K. (1993).** Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **13**, 248-256.
- Kolch, W. (2000).** Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* **2**, 289-305.
- Kolch, W. (2005).** Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 827-837.
- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D. & Rapp, U. R. (1993).** Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature.* **364**, 249-252.
- Kolonin, M. G., Zhong, J. & Finley, R. L. (2000).** Interaction mating methods in two-hybrid systems. *Methods Enzymol* **328**, 26-46.
- Korf, BR. (1998).** The *NF1* Genetic Analysis Consortium. Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Bios scientific publishers*, 57-63
- Krupnick, J. G. & Benovic, J. L. (1998).** The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**, 289-319.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V.,**

- Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A. & et al. (1997).** The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. **390**, 249-256.
- Kuret, J., Johnson, K. E., Nicolette, C. & Zoller, M. J. (1988).** Mutagenesis of the regulatory subunit of yeast cAMP-dependent protein kinase. Isolation of site-directed mutants with altered binding affinity for catalytic subunit. *J Biol Chem*. **263**, 9149-9154.
- Kuroda, S., Fukata, M., Kobayashi, K., Nakafuku, M., Nomura, N., Iwamatsu, A. & Kaibuchi, K. (1996).** Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *J Biol Chem*. **271**, 23363-23367.
- Lallet, S., Garreau, H., Poisier, C., Boy-Marcotte, E. & Jacquet, M. (2004).** Heat shock-induced degradation of Msn2p, a *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor, occurs in the nucleus. *Mol Genet Genomics*. **272**, 353-362. Epub 2004 Sep 2016.
- Lallet, S., Garreau, H., Garmendia-Torres, C., Szeszakowska, D., Boy-Marcotte, E., Quevillon-Cheruel, S. & Jacquet, M. (2006).** Role of Gal11, a component of the RNA polymerase II mediator in stress-induced hyperphosphorylation of Msn2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. **62**, 438-452.
- Le, L. Q. & Parada, L. F. (2007).** Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs. *Oncogene*. **26**, 4609-4616. Epub 2007 Feb 4612.
- Ledbetter, D. H., Rich, D. C., O'Connell, P., Leppert, M. & Carey, J. C. (1989).** Precise localization of NF1 to 17q11.2 by balanced translocation. *Am J Hum Genet*. **44**, 20-24.
- Lee, Y. C., Park, J. M., Min, S., Han, S. J. & Kim, Y. J. (1999).** An activator binding module of yeast RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol*. **19**, 2967-2976.
- Lemmon, M. A. (2004).** Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem Soc Trans*. **32**, 707-711.
- Levy, F., Bulet, P. & Ehret-Sabatier, L. (2004).** Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*. *Mol Cell Proteomics*. **3**, 156-166. Epub 2003 Nov 2028.
- Li, C., Cheng, Y., Gutmann, D. A. & Mangoura, D. (2001).** Differential localization of the neurofibromatosis 1 (NF1) gene product, neurofibromin, with the F-actin or microtubule cytoskeleton during differentiation of telencephalic neurons. *Brain Res Dev Brain Res*. **130**, 231-248.
- Li, S., Janosch, P., Tanji, M., Rosenfeld, G. C., Waymire, J. C., Mischak, H., Kolch, W. & Sedivy, J. M. (1995a).** Regulation of Raf-1 kinase activity by the 14-3-3 family of proteins. *Embo J*. **14**, 685-696.
- Li, W., Cui, Y., Kushner, S. A., Brown, R. A., Jentsch, J. D., Frankland, P. W., Cannon, T. D. & Silva, A. J. (2005).** The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin reverses the learning and attention deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Curr Biol*. **15**, 1961-1967.

- Li, Y., O'Connell, P., Breidenbach, H. H., Cawthon, R., Stevens, J., Xu, G., Neil, S., Robertson, M., White, R. & Viskochil, D. (1995b).** Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1). *Genomics*. **25**, 9-18.
- Lin, Y. L. & Hsueh, Y. P. (2008).** Neurofibromin interacts with CRMP-2 and CRMP-4 in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*. **369**, 747-752. Epub 2008 Feb 2029.
- Lin, Y. L., Lei, Y. T., Hong, C. J. & Hsueh, Y. P. (2007).** Syndecan-2 induces filopodia and dendritic spine formation via the neurofibromin-PKA-Ena/VASP pathway. *J Cell Biol*. **177**, 829-841.
- Llorens, F., Gil, V., Iraola, S., Carim-Todd, L., Marti, E., Estivill, X., Soriano, E., Del Rio, J. A. & Sumoy, L. (2008).** Developmental analysis of Lingo-1/Lern1 protein expression in the mouse brain: Interaction of its intracellular domain with Myt1l. *Dev Neurobiol*. **68**, 521-541.
- Lorenz, K., Lohse, M. J. & Quitterer, U. (2003).** Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature*. **426**, 574-579.
- Lorenz, M. C., Pan, X., Harashima, T., Cardenas, M. E., Xue, Y., Hirsch, J. P. & Heitman, J. (2000).** The G protein-coupled receptor gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **154**, 609-622.
- Lu, A. & Hirsch, J. P. (2005).** Cyclic AMP-independent regulation of protein kinase A substrate phosphorylation by Kelch repeat proteins. *Eukaryot Cell*. **4**, 1794-1800.
- Lush, M. E., Li, Y., Kwon, C. H., Chen, J. & Parada, L. F. (2008).** Neurofibromin is required for barrel formation in the mouse somatosensory cortex. *J Neurosci*. **28**, 1580-1587.
- Ma, P., Wera, S., Van Dijck, P. & Thevelein, J. M. (1999).** The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling. *Mol Biol Cell*. **10**, 91-104.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. & Narumiya, S. (1999).** Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*. **285**, 895-898.
- Maki, M., Matsukawa, N., Yuasa, H., Otsuka, Y., Yamamoto, T., Akatsu, H., Okamoto, T., Ueda, R. & Ojika, K. (2002).** Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. **61**, 176-185.
- Mancini, D. N., Singh, S. M., Archer, T. K. & Rodenhiser, D. I. (1999).** Site-specific DNA methylation in the neurofibromatosis (NF1) promoter interferes with binding of CREB and SP1 transcription factors. *Oncogene*. **18**, 4108-4119.
- Marchler, G., Schuller, C., Adam, G. & Ruis, H. (1993).** A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *Embo J*. **12**, 1997-2003.



**Marchuk, D. A., Saulino, A. M., Tavakkol, R., Swaroop, M., Wallace, M. R., Andersen, L. B., Mitchell, A. L., Gutmann, D. H., Boguski, M. & Collins, F. S. (1991).** cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product. *Genomics*. **11**, 931-940.

**Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F. & Gruss, P. (2001).** Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell*. **105**, 43-55.

**Martegani, E., Baroni, M. & Wanoni, M. (1986).** Interaction of cAMP with the CDC25-mediated step in the cell cycle of budding yeast. *Exp Cell Res*. **162**, 544-548.

**Martin, G. A., Yatani, A., Clark, R., Conroy, L., Polakis, P., Brown, A. M. & McCormick, F. (1992).** GAP domains responsible for ras p21-dependent inhibition of muscarinic atrial K<sup>+</sup> channel currents. *Science*. **255**, 192-194.

**Martin, G. A., Viskochil, D., Bollag, G., McCabe, P. C., Crosier, W. J., Haubruck, H., Conroy, L., Clark, R., O'Connell, P., Cawthon, R. M. & et al. (1990).** The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell*. **63**, 843-849.

**Martinez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. & Estruch, F. (1996).** The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *Embo J*. **15**, 2227-2235.

**Mason, C. S., Springer, C. J., Cooper, R. G., Superti-Furga, G., Marshall, C. J. & Marais, R. (1999).** Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *Embo J*. **18**, 2137-2148.

**Matsukawa, N., Tooyama, I., Kimura, H., Yamamoto, T., Tsugu, Y., Oomura, Y. & Ojika, K. (1999).** Increased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide-related components and their messenger RNAs in the hippocampus of aged senescence-accelerated mice. *Neuroscience*. **88**, 79-92.

**Matsumoto, K., Uno, I., Oshima, Y. & Ishikawa, T. (1982).** Isolation and characterization of yeast mutants deficient in adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **79**, 2355-2359.

**Mattocks, C., Baralle, D., Tarpey, P., French-Constant, C., Bobrow, M. & Whittaker, J. (2004).** Automated comparative sequence analysis identifies mutations in 89% of NF1 patients and confirms a mutation cluster in exons 11-17 distinct from the GAP related domain. *J Med Genet*. **41**, e48.

**Mayer, B. J., Ren, R., Clark, K. L. & Baltimore, D. (1993).** A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell*. **73**, 629-630.

**Mazon, M. J., Behrens, M. M., Morgado, E. & Portillo, F. (1993).** Low activity of the yeast cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Tpk3 is due to the poor expression of the TPK3 gene. *Eur J Biochem*. **213**, 501-506.

- Mc Henry, K. T., Ankala, S. V., Ghosh, A. K. & Fenteany, G. (2002).** A non-antibacterial oxazolidinone derivative that inhibits epithelial cell sheet migration. *Chembiochem.* **3**, 1105-1111.
- Messiaen, L. M., Callens, T., Mortier, G., Beysen, D., Vandenbroucke, I., Van Roy, N., Speleman, F. & Paepe, A. D. (2000).** Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum Mutat.* **15**, 541-555.
- Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., Allaire, N., Perrin, S., Sands, B., Crowell, T., Cate, R. L., McCoy, J. M. & Pepinsky, R. B. (2004).** LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci.* **7**, 221-228. Epub 2004 Feb 2015.
- Mi, S., Miller, R. H., Lee, X., Scott, M. L., Shulag-Morskaya, S., Shao, Z., Chang, J., Thill, G., Levesque, M., Zhang, M., Hession, C., Sah, D., Trapp, B., He, Z., Jung, V., McCoy, J. M. & Pepinsky, R. B. (2005).** LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci.* **8**, 745-751. Epub 2005 May 2015.
- Mima, J., Suzuki, H., Takahashi, M. & Hayashi, R. (2002).** Overexpression and functional characterization of a serine carboxypeptidase inhibitor (I(C)) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem.* **132**, 967-973.
- Mima, J., Fukada, H., Nagayama, M. & Ueda, M. (2006).** Specific membrane binding of the carboxypeptidase Y inhibitor I(C), a phosphatidylethanolamine-binding protein family member. *Febs J.* **273**, 5374-5383. Epub 2006 Oct 5331.
- Mima, J., Hayashida, M., Fujii, T., Hata, Y., Hayashi, R. & Ueda, M. (2004).** Crystallization and preliminary X-ray analysis of carboxypeptidase Y inhibitor IC complexed with the cognate proteinase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **60**, 1622-1624. Epub 2004 Aug 1626.
- Mima, J., Hayashida, M., Fujii, T., Narita, Y., Hayashi, R., Ueda, M. & Hata, Y. (2005).** Structure of the carboxypeptidase Y inhibitor IC in complex with the cognate proteinase reveals a novel mode of the proteinase-protein inhibitor interaction. *J Mol Biol.* **346**, 1323-1334. Epub 2005 Jan 1325.
- Mintzer, K. A. & Field, J. (1999).** The SH3 domain of the *S. cerevisiae* Cdc25p binds adenylyl cyclase and facilitates Ras regulation of cAMP signalling. *Cell Signal.* **11**, 127-135.
- Mitake, S., Katada, E., Otsuka, Y., Matsukawa, N., Iwase, T., Tsugu, T., Fujimori, O. & Ojika, K. (1996).** Possible implication of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP)-related components in Hirano body formation. *Neuropathol Appl Neurobiol.* **22**, 440-445.
- Mitts, M. R., Bradshaw-Rouse, J. & Heideman, W. (1991).** Interactions between adenylylate cyclase and the yeast GTPase-activating protein IRA1. *Mol Cell Biol.* **11**, 4591-4598.

- Moodie, S. A., Willumsen, B. M., Weber, M. J. & Wolfman, A. (1993).** Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science*. **260**, 1658-1661.
- Moore, C., Perry, A. C., Love, S. & Hall, L. (1996).** Sequence analysis and immunolocalisation of phosphatidylethanolamine binding protein (PBP) in human brain tissue. *Brain Res Mol Brain Res*. **37**, 74-78.
- Moskvina, E., Schuller, C., Maurer, C. T., Mager, W. H. & Ruis, H. (1998).** A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast*. **14**, 1041-1050.
- Mosyak, L., Wood, A., Dwyer, B., Buddha, M., Johnson, M., Aulabaugh, A., Zhong, X., Presman, E., Benard, S., Kelleher, K., Wilhelm, J., Stahl, M. L., Kriz, R., Gao, Y., Cao, Z., Ling, H. P., Pangalos, M. N., Walsh, F. S. & Somers, W. S. (2006).** The structure of the Lingo-1 ectodomain, a module implicated in central nervous system repair inhibition. *J Biol Chem*. **281**, 36378-36390. Epub 32006 Sep 36327.
- Mullen, J. R., Kayne, P. S., Moerschell, R. P., Tsunasawa, S., Gribskov, M., Colavito-Shepanski, M., Grunstein, M., Sherman, F. & Sternglanz, R. (1989).** Identification and characterization of genes and mutants for an N-terminal acetyltransferase from yeast. *Embo J*. **8**, 2067-2075.
- Muratani, M., Kung, C., Shokat, K. M. & Tansey, W. P. (2005).** The F box protein Dsg1/Mdm30 is a transcriptional coactivator that stimulates Gal4 turnover and cotranscriptional mRNA processing. *Cell*. **120**, 887-899.
- Murthy, A. E., Bernardis, A., Church, D., Wasmuth, J. & Gusella, J. F. (1996).** Identification and characterization of two novel tetratricopeptide repeat-containing genes. *DNA Cell Biol*. **15**, 727-735.
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M. & Shaw, A. S. (1996).** Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*. **84**, 889-897.
- Myers, C. L., Robson, D., Wible, A., Hibbs, M. A., Chiriac, C., Theesfeld, C. L., Dolinski, K. & Troyanskaya, O. G. (2005).** Discovery of biological networks from diverse functional genomic data. *Genome Biol*. **6**, R114. Epub 2005 Dec 2019.
- Nagata, K., Ohashi, K., Yang, N. & Mizuno, K. (1999).** The N-terminal LIM domain negatively regulates the kinase activity of LIM-kinase 1. *Biochem J* **1**, 99-105.
- Nakafuku, M., Itoh, H., Nakamura, S. & Kaziro, Y. (1987).** Occurrence in *Saccharomyces cerevisiae* of a gene homologous to the cDNA coding for the alpha subunit of mammalian G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84**, 2140-2144.
- Nakafuku, M., Obara, T., Kaibuchi, K., Miyajima, I., Miyajima, A., Itoh, H., Nakamura, S., Arai, K., Matsumoto, K. & Kaziro, Y. (1988).** Isolation of a second yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene (GPA2) coding for guanine nucleotide-binding regulatory protein: studies on its structure and possible functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**, 1374-1378.

- Nikawa, J., Cameron, S., Toda, T., Ferguson, K. M. & Wigler, M. (1987).** Rigorous feedback control of cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **1**, 931-937.
- Nishiya, N., Sabe, H., Nose, K. & Shibamura, M. (1998).** The LIM domains of hic-5 protein recognize specific DNA fragments in a zinc-dependent manner in vitro. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4267-4273.
- Nishizuka, Y. (1992).** Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* **258**, 607-614.
- Nordlund, M., Gu, X., Shipley, M. T. & Ratner, N. (1993).** Neurofibromin is enriched in the endoplasmic reticulum of CNS neurons. *J Neurosci.* **13**, 1588-1600.
- North, K. N., Riccardi, V., Samango-Sprouse, C., Ferner, R., Moore, B., Legius, E., Ratner, N. & Denckla, M. B. (1997).** Cognitive function and academic performance in neurofibromatosis. 1: consensus statement from the NF1 Cognitive Disorders Task Force. *Neurology.* **48**, 1121-1127.
- O'Brien, R. M., Halmi, N., Stromstedt, P. E., Printz, R. L. & Granner, D. K. (1995).** Expression cloning of a zinc-finger cyclic AMP-response-element-binding protein. *Biochem J.* **312**, 17-21.
- Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S. & Mizuno, K. (2000).** Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J Biol Chem.* **275**, 3577-3582.
- Ohshima, S., Murata, M., Sakamoto, W., Ogura, Y. & Motoyoshi, F. (1997).** Cloning and molecular analysis of the Arabidopsis gene Terminal Flower 1. *Mol Gen Genet.* **254**, 186-194.
- Ojika, K. & Appel, S. H. (1984).** Neurotrophic effects of hippocampal extracts on medial septal nucleus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**, 2567-2571.
- Ojika, K., Mitake, S., Kamiya, T., Kosuge, N. & Taiji, M. (1994).** Two different molecules, NGF and free-HCNP, stimulate cholinergic activity in septal nuclei in vitro in a different manner. *Brain Res Dev Brain Res.* **79**, 1-9.
- Otsuka, Y. & Ojika, K. (1996).** Demonstration and characterization of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) processing enzyme activity in rat hippocampus. *Neurochem Res.* **21**, 369-376.
- Pan, X. & Heitman, J. (2000).** Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Mol Cell Biol.* **20**, 8364-8372.
- Pardo, L. A., Sanchez, L. M., Lazo, P. S. & Ramos, S. (1991).** In vitro activation of the *Saccharomyces cerevisiae* Ras/adenylate cyclase system by glucose and some of its analogues. *FEBS Lett.* **290**, 43-48.
- Park, J. B., Yiu, G., Kaneko, S., Wang, J., Chang, J., He, X. L., Garcia, K. C. & He, Z. (2005a).** A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron.* **45**, 345-351.

- Park, J. I., Collinson, E. J., Grant, C. M. & Dawes, I. W. (2005b).** Rom2p, the Rho1 GTP/GDP exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae*, can mediate stress responses via the Ras-cAMP pathway. *J Biol Chem.* **280**, 2529-2535. Epub 2004 Nov 2515.
- Park, S., Yeung, M. L., Beach, S., Shields, J. M. & Yeung, K. C. (2005c).** RKIP downregulates B-Raf kinase activity in melanoma cancer cells. *Oncogene.* **24**, 3535-3540.
- Park, S., Rath, O., Beach, S., Xiang, X., Kelly, S. M., Luo, Z., Kolch, W. & Yeung, K. C. (2006).** Regulation of RKIP binding to the N-region of the Raf-1 kinase. *FEBS Lett.* **580**, 6405-6412. Epub 2006 Nov 6403.
- Parrini, M. C., Jacquet, E., Bernardi, A., Jacquet, M. & Parmeggiani, A. (1995).** Properties and regulation of the catalytic domain of Ira2p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTPase-activating protein of Ras2p. *Biochemistry.* **34**, 13776-13783.
- Patrakitkomjorn, S., Kobayashi, D., Morikawa, T., Wilson, M. M., Tsubota, N., Irie, A., Ozawa, T., Aoki, M., Arimura, N., Kaibuchi, K., Saya, H. & Araki, N. (2008).** Neurofibromatosis Type 1 (NF1) Tumor Suppressor, Neurofibromin, Regulates the Neuronal Differentiation of PC12 Cells via Its Associating Protein, CRMP-2. *J Biol Chem.* **283**, 9399-9413. Epub 2008 Jan 9323.
- Peeters, T., Louwet, W., Gelade, R., Nauwelaers, D., Thevelein, J. M. & Versele, M. (2006).** Kelch-repeat proteins interacting with the Galpha protein Gpa2 bypass adenylate cyclase for direct regulation of protein kinase A in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 13034-13039. Epub 12006 Aug 13021.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D. & Gygi, S. P. (2003).** A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol.* **21**, 921-926. Epub 2003 Jul 2020.
- Petersen, C. C. (2007).** The functional organization of the barrel cortex. *Neuron.* **56**, 339-355.
- Petitjean, A., Hilger, F. & Tatchell, K. (1990).** Comparison of thermosensitive alleles of the CDC25 gene involved in the cAMP metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **124**, 797-806.
- Phillips, S. E., Sha, B., Topalof, L., Xie, Z., Alb, J. G., Klenchin, V. A., Swigart, P., Cockcroft, S., Martin, T. F., Luo, M. & Bankaitis, V. A. (1999).** Yeast Sec14p deficient in phosphatidylinositol transfer activity is functional in vivo. *Mol Cell.* **4**, 187-197.
- Pikielny, C. W., Hasan, G., Rouyer, F. & Rosbash, M. (1994).** Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron.* **12**, 35-49.
- Pinson, S. & Wolkenstein, P. (2005).** [Neurofibromatosis type 1 or Von Recklinghausen's disease]. *Rev Med Interne.* **26**, 196-215.

- Pnueli, L., Gutfinger, T., Hareven, D., Ben-Naim, O., Ron, N., Adir, N. & Lifschitz, E. (2001).** Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell*. **13**, 2687-2702.
- Polevoda, B. & Sherman, F. (2000).** N-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Biol Chem*. **275**, 36479-36482.
- Polevoda, B. & Sherman, F. (2003).** N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for N-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Mol Biol*. **325**, 595-622.
- Polevoda, B., Norbeck, J., Takakura, H., Blomberg, A. & Sherman, F. (1999).** Identification and specificities of N-terminal acetyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*. **18**, 6155-6168.
- Polevoda, B., Cardillo, T. S., Doyle, T. C., Bedi, G. S. & Sherman, F. (2003).** Nat3p and Mdm20p are required for function of yeast NatB N-terminal acetyltransferase and of actin and tropomyosin. *J Biol Chem*. **278**, 30686-30697. Epub 32003 Jun 30683.
- Ponder, B. A. (1992).** Neurofibromatosis: from gene to phenotype. *Semin Cancer Biol*. **3**, 115-120.
- Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K. E. & Blake, D. J. (1997).** PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays*. **19**, 469-479.
- Portela, P., Zarembek, V. & Moreno, S. (2001).** Evaluation of in vivo activation of protein kinase A under non-dissociable conditions through the overexpression of wild-type and mutant regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. **147**, 1149-1159.
- Powers, S., Kataoka, T., Fasano, O., Goldfarb, M., Strathern, J., Broach, J. & Wigler, M. (1984).** Genes in *S. cerevisiae* encoding proteins with domains homologous to the mammalian ras proteins. *Cell*. **36**, 607-612.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., McCartney, R. R., Schmidt, M. C., Rachidi, N., Lee, S. J., Mah, A. S., Meng, L., Stark, M. J., Stern, D. F., De Virgilio, C., Tyers, M., Andrews, B., Gerstein, M., Schweitzer, B., Predki, P. F. & Snyder, M. (2005).** Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*. **438**, 679-684.
- Rath, O., Park, S., Tang, H. H., Banfield, M. J., Brady, R. L., Lee, Y. C., Dignam, J. D., Sedivy, J. M., Kolch, W. & Yeung, K. C. (2008).** The RKIP (Raf-1 Kinase Inhibitor Protein) conserved pocket binds to the phosphorylated N-region of Raf-1 and inhibits the Raf-1-mediated activated phosphorylation of MEK. *Cell Signal*. **20**, 935-941. Epub 2008 Jan 2024.
- Rautureau, G., Jouvencal, L., Decoville, M., Locker, D., Vovelle, F. & Schoentgen, F. (2006).** Cloning, high yield over-expression, purification, and characterization of CG18594, a new PEBP/RKIP family member from *Drosophila melanogaster*. *Protein Expr Purif*. **48**, 90-97. Epub 2006 Feb 2020.

- Reff, M. E., Carner, K., Chambers, K. S., Chinn, P. C., Leonard, J. E., Raab, R., Newman, R. A., Hanna, N. & Anderson, D. R. (1994).** Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. **83**, 435-445.
- Resat, H., Straatsma, T. P., Dixon, D. A. & Miller, J. H. (2001).** The arginine finger of RasGAP helps Gln-61 align the nucleophilic water in GAP-stimulated hydrolysis of GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 6033-6038.
- Riccardi, V. M. (1992).** The prenatal diagnosis of NF-1 and NF-2. *J Dermatol*. **19**, 885-891.
- Riccardi, V. M., Womack, J. E. & Jacks, T. (1994).** Neurofibromatosis and related tumors. Natural occurrence and animal models. *Am J Pathol*. **145**, 994-1000.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. & Seraphin, B. (1999).** A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*. **17**, 1030-1032.
- Robinson, L. C. & Tatchell, K. (1991).** TFS1: a suppressor of cdc25 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. **230**, 241-250.
- Robinson, L. C., Gibbs, J. B., Marshall, M. S., Sigal, I. S. & Tatchell, K. (1987).** CDC25: a component of the RAS-adenylate cyclase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. **235**, 1218-1221.
- Rolland, F., De Winde, J. H., Lemaire, K., Boles, E., Thevelein, J. M. & Winderickx, J. (2000).** Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol Microbiol*. **38**, 348-358.
- Roth, F. P., Hughes, J. D., Estep, P. W. & Church, G. M. (1998).** Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantitation. *Nat Biotechnol*. **16**, 939-945.
- Rubin, J. B. & Gutmann, D. H. (2005).** Neurofibromatosis type 1 - a model for nervous system tumour formation? *Nat Rev Cancer*. **5**, 557-564.
- Ruis, H. & Schuller, C. (1995).** Stress signaling in yeast. *Bioessays*. **17**, 959-965.
- Scheffzek, K., Lautwein, A., Kabsch, W., Ahmadian, M. R. & Wittinghofer, A. (1996).** Crystal structure of the GTPase-activating domain of human p120GAP and implications for the interaction with Ras. *Nature*. **384**, 591-596.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. & Wittinghofer, A. (1997).** The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*. **277**, 333-338.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Wiesmuller, L., Kabsch, W., Stege, P., Schmitz, F. & Wittinghofer, A. (1998).** Structural analysis of the GAP-related domain from neurofibromin and its implications. *Embo J*. **17**, 4313-4327.

- Schneider, R., Brugger, B., Sandhoff, R., Zellnig, G., Leber, A., Lampl, M., Athenstaedt, K., Hrastnik, C., Eder, S., Daum, G., Paltauf, F., Wieland, F. T. & Kohlwein, S. D. (1999).** Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J Cell Biol.* **146**, 741-754.
- Schoentgen, F., Saccoccio, F., Jolles, J., Bernier, I. & Jolles, P. (1987).** Complete amino acid sequence of a basic 21-kDa protein from bovine brain cytosol. *Eur J Biochem.* **166**, 333-338.
- Schonwasser, D. C., Marais, R. M., Marshall, C. J. & Parker, P. J. (1998).** Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol.* **18**, 790-798.
- Schuijter, M. M., Bataille, F., Weiss, T. S., Hellerbrand, C. & Bosserhoff, A. K. (2006).** Raf kinase inhibitor protein is downregulated in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* **16**, 451-456.
- Scott, R. W. & Olson, M. F. (2007).** LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J Mol Med.* **85**, 555-568. Epub 2007 Feb 2010.
- Seddiqi, N., Segretain, D., Bucquoy, S., Pineau, C., Jegou, B., Jolles, P. & Schoentgen, F. (1996).** Characterization and localization of the rat, mouse and human testicular phosphatidylethanolamine binding protein. *Experientia.* **52**, 101-110.
- Seeds, N. W., Basham, M. E. & Haffke, S. P. (1999).** Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 14118-14123.
- Seizinger, B. R., Rouleau, G. A., Lane, A. H., Farmer, G., Ozelius, L. J., Haines, J. L., Parry, D. M., Korf, B. R., Pericak-Vance, M. A., Faryniarz, A. G. & et al. (1987).** Linkage analysis in von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) with DNA markers for chromosome 17. *Genomics.* **1**, 346-348.
- Serre, L., Vallee, B., Bureaud, N., Schoentgen, F. & Zelwer, C. (1998).** Crystal structure of the phosphatidylethanolamine-binding protein from bovine brain: a novel structural class of phospholipid-binding proteins. *Structure.* **6**, 1255-1265.
- Serre, L., Pereira de Jesus, K., Zelwer, C., Bureaud, N., Schoentgen, F. & Benedetti, H. (2001).** Crystal structures of YBHB and YBCL from *Escherichia coli*, two bacterial homologues to a Raf kinase inhibitor protein. *J Mol Biol.* **310**, 617-634.
- Setty, S. R., Strohlic, T. I., Tong, A. H., Boone, C. & Burd, C. G. (2004).** Golgi targeting of ARF-like GTPase Arl3p requires its Nalpha-acetylation and the integral membrane protein Sys1p. *Nat Cell Biol.* **6**, 414-419. Epub 2004 Apr 2011.
- Sha, B., Phillips, S. E., Bankaitis, V. A. & Luo, M. (1998).** Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein. *Nature.* **391**, 506-510.



**Shalin, S. C., Egli, R., Birnbaum, S. G., Roth, T. L., Levenson, J. M. & Sweatt, J. D. (2006).** Signal transduction mechanisms in memory disorders. *Prog Brain Res* **157**, 25-41.

**Shannon, K. M., O'Connell, P., Martin, G. A., Paderanga, D., Olson, K., Dinndorf, P. & McCormick, F. (1994).** Loss of the normal NF1 allele from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloid disorders. *N Engl J Med.* **330**, 597-601.

**Shao, Z., Browning, J. L., Lee, X., Scott, M. L., Shulga-Morskaya, S., Allaire, N., Thill, G., Levesque, M., Sah, D., McCoy, J. M., Murray, B., Jung, V., Pepinsky, R. B. & Mi, S. (2005).** TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron.* **45**, 353-359.

**Sheela, S., Riccardi, V. M. & Ratner, N. (1990).** Angiogenic and invasive properties of neurofibroma Schwann cells. *J Cell Biol.* **111**, 645-653.

**Sherman, L. S., Atit, R., Rosenbaum, T., Cox, A. D. & Ratner, N. (2000).** Single cell Ras-GTP analysis reveals altered Ras activity in a subpopulation of neurofibroma Schwann cells but not fibroblasts. *J Biol Chem.* **275**, 30740-30745.

**Shima, F., Yamawaki-Kataoka, Y., Yanagihara, C., Tamada, M., Okada, T., Kariya, K. & Kataoka, T. (1997).** Effect of association with adenylyl cyclase-associated protein on the interaction of yeast adenylyl cyclase with Ras protein. *Mol Cell Biol.* **17**, 1057-1064.

**Silva, A. J., Frankland, P. W., Marowitz, Z., Friedman, E., Laszlo, G. S., Cioffi, D., Jacks, T. & Bourtschuladze, R. (1997).** A mouse model for the learning and memory deficits associated with neurofibromatosis type I. *Nat Genet.* **15**, 281-284.

**Simister, P. C., Banfield, M. J. & Brady, R. L. (2002).** The crystal structure of PEBP-2, a homologue of the PEBP/RKIP family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **58**, 1077-1080. Epub 2002 May 1029.

**Simpson, T. I. & Price, D. J. (2002).** Pax6; a pleiotropic player in development. *Bioessays.* **24**, 1041-1051.

**Singer, J. M. & Shaw, J. M. (2003).** Mdm20 protein functions with Nat3 protein to acetylate Tpm1 protein and regulate tropomyosin-actin interactions in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 7644-7649. Epub 2003 Jun 7613.

**Singer, J. M., Hermann, G. J. & Shaw, J. M. (2000).** Suppressors of mdm20 in yeast identify new alleles of ACT1 and TPM1 predicted to enhance actin-tropomyosin interactions. *Genetics.* **156**, 523-534.

**Sivak, J. M., Mohan, R., Rinehart, W. B., Xu, P. X., Maas, R. L. & Fini, M. E. (2000).** Pax-6 expression and activity are induced in the reepithelializing cornea and control activity of the transcriptional promoter for matrix metalloproteinase gelatinase B. *Dev Biol.* **222**, 41-54.

**Smith, A., Ward, M. P. & Garrett, S. (1998).** Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *Embo J.* **17**, 3556-3564.

**Staub, O. & Rotin, D. (2006).** Role of ubiquitylation in cellular membrane transport. *Physiol Rev.* **86**, 669-707.

**Stevens, T., Esmon, B. & Schekman, R. (1982).** Early stages in the yeast secretory pathway are required for transport of carboxypeptidase Y to the vacuole. *Cell.* **30**, 439-448.

**Strachan, T. & Read, A. P. (1994).** PAX genes. *Curr Opin Genet Dev.* **4**, 427-438.

**Suau, F., Girard, N., Archer, F., Cottin, V., Croze, S., Mornex, J-F. & Leroux, C. (2006).** JSRV (jaagsiekte sheep retrovirus) et cancer du poumon associé au mouton. *Virologie.* **10**, 297-299

**Sumi, T., Matsumoto, K., Takai, Y. & Nakamura, T. (1999).** Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J Cell Biol.* **147**, 1519-1532.

**Sun, L. & Chen, Z. J. (2004).** The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol.* **16**, 119-126.

**Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. & Ohsumi, Y. (1992).** Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol.* **119**, 301-311.

**Tanaka, K., Matsumoto, K. & Toh, E. A. (1989).** IRA1, an inhibitory regulator of the RAS-cyclic AMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **9**, 757-768.

**Tanaka, K., Nakafuku, M., Tamanoi, F., Kaziro, Y., Matsumoto, K. & Toh-e, A. (1990a).** IRA2, a second gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein with a domain homologous to mammalian ras GTPase-activating protein. *Mol Cell Biol.* **10**, 4303-4313.

**Tanaka, K., Nakafuku, M., Satoh, T., Marshall, M. S., Gibbs, J. B., Matsumoto, K., Kaziro, Y. & Toh-e, A. (1990b).** *S. cerevisiae* genes IRA1 and IRA2 encode proteins that may be functionally equivalent to mammalian ras GTPase activating protein. *Cell.* **60**, 803-807.

**The, I., Hannigan, G. E., Cowley, G. S., Reginald, S., Zhong, Y., Gusella, J. F., Hariharan, I. K. & Bernards, A. (1997).** Rescue of a *Drosophila* NF1 mutant phenotype by protein kinase A. *Science.* **276**, 791-794.

**Thevelein, J. M. (1994).** Signal transduction in yeast. *Yeast.* **10**, 1753-1790.

**Thongboonkerd, V. (2004).** Proteomics in nephrology: current status and future directions. *Am J Nephrol.* **24**, 360-378. Epub 2004 Jun 2016.

**Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. & Pickart, C. M. (2000).** Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J.* **19**, 94-102.

- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. & Wigler, M. (1987).** Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell*. **50**, 277-287.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K. & Wigler, M. (1985).** In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell*. **40**, 27-36.
- Tohdoh, N., Tojo, S., Agui, H. & Ojika, K. (1995).** Sequence homology of rat and human HCNP precursor proteins, bovine phosphatidylethanolamine-binding protein and rat 23-kDa protein associated with the opioid-binding protein. *Brain Res Mol Brain Res*. **30**, 381-384.
- Tokuo, H., Yunoue, S., Feng, L., Kimoto, M., Tsuji, H., Ono, T., Saya, H. & Araki, N. (2001).** Phosphorylation of neurofibromin by cAMP-dependent protein kinase is regulated via a cellular association of N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *FEBS Lett*. **494**, 48-53.
- Tong, J., Hannan, F., Zhu, Y., Bernards, A. & Zhong, Y. (2002).** Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. *Nat Neurosci*. **5**, 95-96.
- Tong, J. J., Schriener, S. E., McCleary, D., Day, B. J. & Wallace, D. C. (2007).** Life extension through neurofibromin mitochondrial regulation and antioxidant therapy for neurofibromatosis-1 in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet*. **39**, 476-485. Epub 2007 Mar 2018.
- Trahey, M. & McCormick, F. (1987).** A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science*. **238**, 542-545.
- Trakul, N., Menard, R. E., Schade, G. R., Qian, Z. & Rosner, M. R. (2005).** Raf kinase inhibitory protein regulates Raf-1 but not B-Raf kinase activation. *J Biol Chem*. **280**, 24931-24940. Epub 22005 May 24910.
- Trimble, R. B., Maley, F. & Chu, F. K. (1983).** GlycoProtein biosynthesis in yeast. protein conformation affects processing of high mannose oligosaccharides on carboxypeptidase Y and invertase. *J Biol Chem*. **258**, 2562-2567.
- Trottein, F. & Cowman, A. F. (1995).** The primary structure of a putative phosphatidylethanolamine-binding protein from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. **70**, 235-239.
- Trovo-Marqui, A. B. & Tajara, E. H. (2006).** Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet*. **70**, 1-13.
- Tsugu, Y., Ojika, K., Matsukawa, N., Iwase, T., Otsuka, Y., Katada, E. & Mitake, S. (1998).** High levels of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) in the CSF of some patients with Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. **5**, 561-569.
- Turgeon, V. L. & Houenou, L. J. (1997).** The role of thrombin-like (serine) proteases in the development, plasticity and pathology of the nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*. **25**, 85-95.

- Uchida, I., Makino, S., Sasakawa, C., Yoshikawa, M., Sugimoto, C. & Terakado, N. (1993).** Identification of a novel gene, *dep*, associated with depolymerization of the capsular polymer in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol.* **9**, 487-496.
- Ueda, Y., Hirai, S., Osada, S., Suzuki, A., Mizuno, K. & Ohno, S. (1996).** Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem.* **271**, 23512-23519.
- Ungerer, M., Bohm, M., Elce, J. S., Erdmann, E. & Lohse, M. J. (1993).** Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation.* **87**, 454-463.
- Vallee, B. S., Tauc, P., Brochon, J. C., Maget-Dana, R., Lelievre, D., Metz-Boutigue, M. H., Bureaud, N. & Schoentgen, F. (2001).** Behaviour of bovine phosphatidylethanolamine-binding protein with model membranes. Evidence of affinity for negatively charged membranes. *Eur J Biochem.* **268**, 5831-5841.
- Valls, L. A., Winther, J. R. & Stevens, T. H. (1990).** Yeast carboxypeptidase Y vacuolar targeting signal is defined by four propeptide amino acids. *J Cell Biol.* **111**, 361-368.
- Vance, J. E. (2003).** Molecular and cell biology of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **75**, 69-111.
- Vandenbroucke, I., Callens, T., De Paepe, A. & Messiaen, L. (2002).** Complex splicing pattern generates great diversity in human NF1 transcripts. *BMC Genomics.* **3**, 13. Epub 2002 May 2024.
- Vandenbroucke, I., Van Oostveldt, P., Coene, E., De Paepe, A. & Messiaen, L. (2004).** Neurofibromin is actively transported to the nucleus. *FEBS Lett.* **560**, 98-102.
- Vanoni, M., Vavassori, M., Frascotti, G., Martegani, E. & Alberghina, L. (1990).** Overexpression of the CDC25 gene, an upstream element of the RAS/adenylyl cyclase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, allows immunological identification and characterization of its gene product. *Biochem Biophys Res Commun.* **172**, 61-69.
- Varela, J. C., Praekelt, U. M., Meacock, P. A., Planta, R. J. & Mager, W. H. (1995).** The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Mol Cell Biol.* **15**, 6232-6245.
- Vaughan, P. J., Pike, C. J., Cotman, C. W. & Cunningham, D. D. (1995).** Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. *J Neurosci.* **15**, 5389-5401.
- Vierstraete, E., Verleyen, P., Baggerman, G., D'Hertog, W., Van den Bergh, G., Arckens, L., De Loof, A. & Schoofs, L. (2004).** A proteomic approach for the analysis of instantly released wound and immune proteins in *Drosophila melanogaster* hemolymph. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 470-475. Epub 2004 Jan 2005.

- Vierula, M. E., Araki, Y., Rankin, T. L., Tulsiani, D. R. & Orgebin-Crist, M. C. (1992).** Immunolocalization of a 25-kilodalton protein in mouse testis and epididymis. *Biol Reprod.* **47**, 844-856.
- Viskochil, D., Cawthon, R., O'Connell, P., Xu, G. F., Stevens, J., Culver, M., Carey, J. & White, R. (1991).** The gene encoding the oligodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. *Mol Cell Biol.* **11**, 906-912.
- Viskochil, D., Buchberg, A. M., Xu, G., Cawthon, R. M., Stevens, J., Wolff, R. K., Culver, M., Carey, J. C., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & et al. (1990).** Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell.* **62**, 187-192.
- Walker, J. A., Tchoudakova, A. V., McKenney, P. T., Brill, S., Wu, D., Cowley, G. S., Hariharan, I. K. & Bernardis, A. (2006).** Reduced growth of *Drosophila* neurofibromatosis 1 mutants reflects a non-cell-autonomous requirement for GTPase-Activating Protein activity in larval neurons. *Genes Dev.* **20**, 3311-3323. Epub 2006 Nov 3317.
- Wallace, M. R., Marchuk, D. A., Andersen, L. B., Letcher, R., Odeh, H. M., Saulino, A. M., Fountain, J. W., Brereton, A., Nicholson, J., Mitchell, A. L. & et al. (1990).** Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science.* **249**, 181-186.
- Wang, K. C., Koprivica, V., Kim, J. A., Sivasankaran, R., Guo, Y., Neve, R. L. & He, Z. (2002).** Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature.* **417**, 941-944. Epub 2002 Jun 2016.
- Wang, L., Renault, G., Garreau, H. & Jacquet, M. (2004a).** Stress induces depletion of Cdc25p and decreases the cAMP producing capability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* **150**, 3383-3391.
- Wang, X., Connelly, J. J., Wang, C. L. & Sternglanz, R. (2004b).** Importance of the Sir3 N terminus and its acetylation for yeast transcriptional silencing. *Genetics.* **168**, 547-551.
- Wang, X., Li, N., Li, H., Liu, B., Qiu, J., Chen, T. & Cao, X. (2005).** Silencing of human phosphatidylethanolamine-binding protein 4 sensitizes breast cancer cells to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and cell growth arrest. *Clin Cancer Res.* **11**, 7545-7553.
- Wang, X., Li, N., Liu, B., Sun, H., Chen, T., Li, H., Qiu, J., Zhang, L., Wan, T. & Cao, X. (2004c).** A novel human phosphatidylethanolamine-binding protein resists tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathway activation and phosphatidylethanolamine externalization. *J Biol Chem.* **279**, 45855-45864. Epub 2004 Aug 45859.
- Warringer, J. & Blomberg, A. (2003).** Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **20**, 53-67.
- Wegner, M. (2000).** Transcriptional control in myelinating glia: flavors and spices. *Glia.* **31**, 1-14.

**Welch, D. R. & Rinker-Schaeffer, C. W. (1999).** What defines a useful marker of metastasis in human cancer? *J Natl Cancer Inst.* **91**, 1351-1353.

**Welti, S., Fraterman, S., D'Angelo, I., Wilm, M. & Scheffzek, K. (2007).** The sec14 homology module of neurofibromin binds cellular glycerophospholipids: mass spectrometry and structure of a lipid complex. *J Mol Biol.* **366**, 551-562. Epub 2006 Nov 2018.

**Werner-Washburne, M., Brown, D. & Braun, E. (1991).** Bcy1, the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in yeast, is differentially modified in response to the physiological status of the cell. *J Biol Chem.* **266**, 19704-19709.

**Wieser, R., Adam, G., Wagner, A., Schuller, C., Marchler, G., Ruis, H., Krawiec, Z. & Bilinski, T. (1991).** Heat shock factor-independent heat control of transcription of the CTT1 gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **266**, 12406-12411.

**Williams, J. A., Su, H. S., Bernards, A., Field, J. & Sehgal, A. (2001).** A circadian output in *Drosophila* mediated by neurofibromatosis-1 and Ras/MAPK. *Science.* **293**, 2251-2256.

**Wittinghofer, A. & Pai, E. F. (1991).** The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem Sci.* **16**, 382-387.

**Wolkenstein, P., Freche, B., Zeller, J. & Revuz, J. (1996).** Usefulness of screening investigations in neurofibromatosis type 1. A study of 152 patients. *Arch Dermatol.* **132**, 1333-1336.

**Wu, B. L., Austin, M. A., Schneider, G. H., Boles, R. G. & Korf, B. R. (1995).** Deletion of the entire NF1 gene detected by the FISH: four deletion patients associated with severe manifestations. *Am J Med Genet.* **59**, 528-535.

**Wu, J., Williams, J. P., Rizvi, T. A., Kordich, J. J., Witte, D., Meijer, D., Stemmer-Rachamimov, A. O., Cancelas, J. A. & Ratner, N. (2008).** Plexiform and dermal neurofibromas and pigmentation are caused by Nf1 loss in desert hedgehog-expressing cells. *Cancer Cell.* **13**, 105-116.

**Xu, G., O'Connell, P., Stevens, J. & White, R. (1992).** Characterization of human adenylate kinase 3 (AK3) cDNA and mapping of the AK3 pseudogene to an intron of the NF1 gene. *Genomics.* **13**, 537-542.

**Xu, G. F., Lin, B., Tanaka, K., Dunn, D., Wood, D., Gesteland, R., White, R., Weiss, R. & Tamanoi, F. (1990).** The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of *S. cerevisiae*. *Cell.* **63**, 835-841.

**Xu, H. & Gutmann, D. H. (1997).** Mutations in the GAP-related domain impair the ability of neurofibromin to associate with microtubules. *Brain Res.* **759**, 149-152.

**Xue, Y., Batlle, M. & Hirsch, J. P. (1998).** GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Galpha subunit and functions in a Ras-independent pathway. *Embo J.* **17**, 1996-2007.

- Yang, N. & Mizuno, K. (1999).** Nuclear export of LIM-kinase 1, mediated by two leucine-rich nuclear-export signals within the PDZ domain. *Biochem J.* **338**, 793-798.
- Yeung, K., Janosch, P., McFerran, B., Rose, D. W., Mischak, H., Sedivy, J. M. & Kolch, W. (2000).** Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol.* **20**, 3079-3085.
- Yeung, K., Seitz, T., Li, S., Janosch, P., McFerran, B., Kaiser, C., Fee, F., Katsanakis, K. D., Rose, D. W., Mischak, H., Sedivy, J. M. & Kolch, W. (1999).** Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature.* **401**, 173-177.
- Yeung, K. C., Rose, D. W., Dhillon, A. S., Yaros, D., Gustafsson, M., Chatterjee, D., McFerran, B., Wyche, J., Kolch, W. & Sedivy, J. M. (2001).** Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol.* **21**, 7207-7217.
- Yip-Schneider, M. T., Miao, W., Lin, A., Barnard, D. S., Tzivion, G. & Marshall, M. S. (2000).** Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. *Biochem J.* **351**, 151-159.
- Yuasa, H., Ojika, K., Mitake, S., Katada, E., Matsukawa, N., Otsuka, Y., Fujimori, O. & Hirano, A. (2001).** Age-dependent changes in HCNP-related antigen expression in the human hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res.* **127**, 1-7.
- Yunoue, S., Tokuo, H., Fukunaga, K., Feng, L., Ozawa, T., Nishi, T., Kikuchi, A., Hattori, S., Kuratsu, J., Saya, H. & Araki, N. (2003).** Neurofibromatosis type I tumor suppressor neurofibromin regulates neuronal differentiation via its GTPase-activating protein function toward Ras. *J Biol Chem.* **278**, 26958-26969. Epub 22003 May 26952.
- Zhang, F., Sumibcay, L., Hinnebusch, A. G. & Swanson, M. J. (2004).** A triad of subunits from the Gal11/tail domain of Srb mediator is an in vivo target of transcriptional activator Gcn4p. *Mol Cell Biol.* **24**, 6871-6886.
- Zhang, W., Cveklova, K., Oppermann, B., Kantorow, M. & Cvekl, A. (2001).** Quantitation of PAX6 and PAX6(5a) transcript levels in adult human lens, cornea, and monkey retina. *Mol Vis* **7**, 1-5.
- Zheng, H., Chang, L., Patel, N., Yang, J., Lowe, L., Burns, D. K. & Zhu, Y. (2008).** Induction of abnormal proliferation by nonmyelinating schwann cells triggers neurofibroma formation. *Cancer Cell.* **13**, 117-128.
- Zhu, S., Mc Henry, K. T., Lane, W. S. & Fenteany, G. (2005).** A chemical inhibitor reveals the role of Raf kinase inhibitor protein in cell migration. *Chem Biol.* **12**, 981-991.
- Zhu, Y. & Parada, L. F. (2002).** The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat Rev Cancer.* **2**, 616-626.
- Zhu, Y., Ghosh, P., Charnay, P., Burns, D. K. & Parada, L. F. (2002).** Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science.* **296**, 920-922.

**Zhu, Y., Romero, M. I., Ghosh, P., Ye, Z., Charnay, P., Rushing, E. J., Marth, J. D. & Parada, L. F. (2001).** Ablation of NF1 function in neurons induces abnormal development of cerebral cortex and reactive gliosis in the brain. *Genes Dev.* **15**, 859-876.

**Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C. D., Fasch, E. V., Kohlwein, S. D., Paltauf, F. & Daum, G. (1991).** Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **173**, 2026-2034.

**Zou, M. X., Butcher, D. T., Sadikovic, B., Groves, T. C., Yee, S. P. & Rodenhiser, D. I. (2004).** Characterization of functional elements in the neurofibromatosis (NF1) proximal promoter region. *Oncogene.* **23**, 330-339.





# *ANNEXES*



# *ANNEXE 1*



# Molecular Basis of the Tfs1/Ira2 Interaction: A Combined Protein Engineering and Molecular Modelling Study

Aurélie Gombault<sup>1</sup>, Fabienne Godin<sup>1</sup>, Denise Sy<sup>1</sup>, Baptiste Legrand<sup>2</sup>  
Hélène Chautard<sup>3</sup>, Béatrice Vallée<sup>1</sup>, Françoise Vovelle<sup>1</sup> and  
Hélène Bénédicti<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de Biophysique  
Moléculaire, Centre National  
de la Recherche Scientifique  
UPR 4301, affiliated to the  
University of Orléans and to  
INSERM, rue Charles Sadron  
45071 ORLEANS Cedex 2  
France

<sup>2</sup>Equipe RMN-ILP, PRISM  
IFR140, CS34317, Campus  
de Villejean, 35043 RENNES  
Cedex, France

<sup>3</sup>Société Biométhodes, 4 rue  
Pierre Fontaine, 91000 EVRY  
France

Received 10 May 2007;  
received in revised form  
19 September 2007;  
accepted 19 September 2007  
Available online  
26 September 2007

Edited by J. Karn

Tfs1p and Ylr179cp are yeast proteins belonging to the PEBP family. Tfs1p, but not Ylr179cp, has been shown to interact with and inhibit Ira2p, a GTPase-activating protein of Ras. Tfs1p has been shown to be a specific inhibitor of the CPY protease and the 3D structure of the complex has been resolved. To shed light on the molecular determinants of Tfs1p involved in the Tfs1/Ira2 interaction, the 3D structure of Ylr179cp has been modelled and compared to that of Tfs1p. Tfs1p point mutants and Tfs1 hybrid proteins combining regions of Tfs1p and Ylr179cp were also designed and their function was tested. Results, interpreted from a structural point of view, show that the accessibility of the surface pocket of Tfs1p, its N-terminal region and the specific electrostatic properties of a large surface region containing these two elements, play a crucial role in this interaction.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** protein engineering; 3D structure modelling; PEBP/RKIP homologs; GTPase activating protein; *Saccharomyces cerevisiae*

## Introduction

The PEBP family is a large group of conserved proteins having homologues in a wide variety of organisms.<sup>1</sup>

The crystal structure of different PEBP homologues has been resolved,<sup>2–7</sup> and it appears that the PEBP family is characterized by a typical fold comprising a central  $\beta$ -sheet structure flanked by a

second smaller  $\beta$ -sheet on one side and an  $\alpha$ -helix on the other side. The proteins share a surface pocket able to accommodate various anionic groups and that is thought to be the ligand-binding site of these proteins. One of the PEBP members, RKIP, is a multifunctional protein. It has been shown to control different signalling pathways in human and mouse by interacting and inhibiting a series of kinases.<sup>7–9</sup> This protein has been shown (i) to inhibit serine proteases,<sup>10</sup> (ii) to bind lipids,<sup>1</sup> (iii) to be the precursor of a neurostimulatory peptide (HCNP) that is important in the development of hippocampus and cardiac physiology,<sup>11,12</sup> (iv) to affect heterotrimeric G protein-dependent signalling,<sup>13</sup> (v) to suppress metastasis in prostate cancer,<sup>14</sup> and (vi) to sensitize prostate and breast cancer cells to drug-induced

\*Corresponding author. E-mail address:

benedetti@cnrs-orleans.fr.

Abbreviations used: PEBP, phosphatidylethanolamine-binding protein; RKIP, Raf kinase inhibitor protein; TBD, Tfs1 binding domain; PKA, protein kinase A.

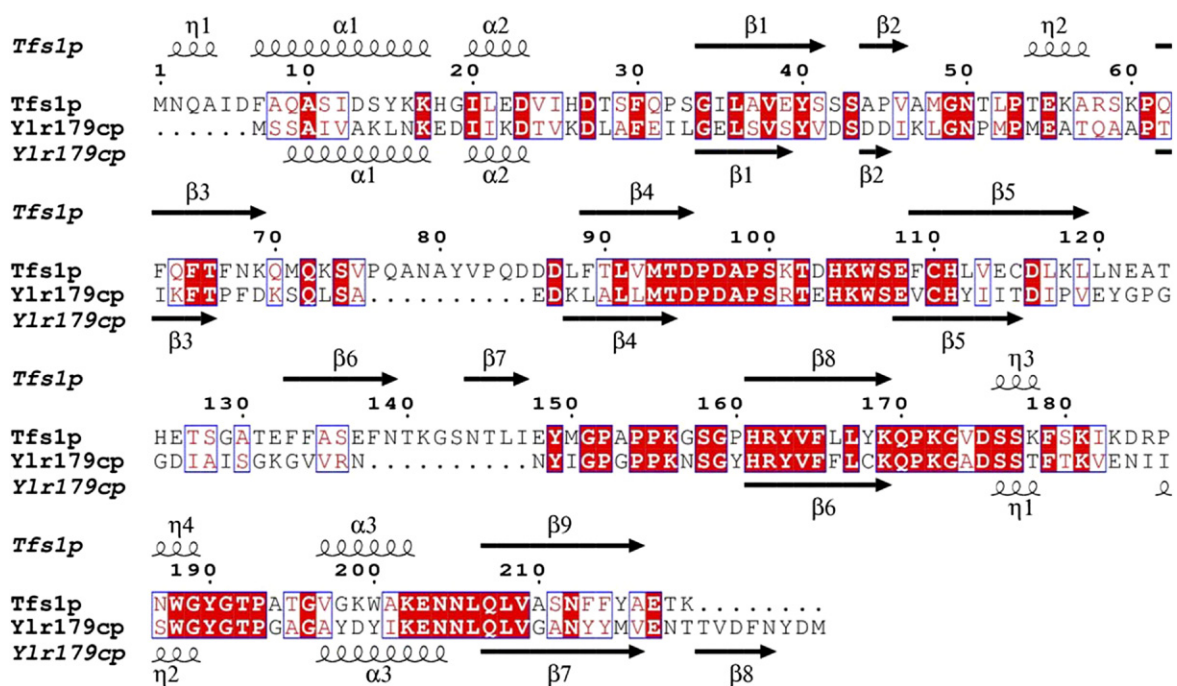
apoptosis.<sup>15</sup> In yeast, one of the two PEBPs, Tfs1p, has been shown to interact with and inhibit the serine protease CPY.<sup>16</sup> The molecular mechanisms involved in this inhibition have been demonstrated by the resolution of the 3D structure of the Tfs1/CPY complex by X-ray crystallography.<sup>17</sup> Our group has shown recently that Tfs1p interacts with and inhibits Ira2p, a GTPase-activating protein controlling Ras negatively.<sup>18</sup> A second yeast PEBP, Ylr179cp, shares 39% sequence identity with Tfs1p but does not interact or inhibit CPY or Ira2p.

The aim of this study is to shed light on the molecular determinants of Tfs1p involved in the Tfs1/Ira2 interaction. For this purpose, we first established a model of Ylr179cp 3D-structure. By comparing it to that of Tfs1p, we noticed significant differences between the two structures that could account for the specific binding properties of Tfs1p. In order to determine more precisely the molecular features of Tfs1p involved in its interaction with Ira2p, different point mutants of Tfs1p were constructed and Tfs1/Ylr179cp hybrid proteins were obtained by exchanging key regions of Tfs1p and Ylr179cp. The ability of each of these mutants to interact with Ira2p and to inhibit it was then tested. The results obtained were interpreted from a structural point of view by analysing the molecular models of the different mutants. Our results suggest strongly the existence of at least two distinct binding sites between Tfs1p and Ira2p: the surface cavity and the N-terminal domain. A large surface region containing these two elements may also constitute a contact zone between the two molecules.

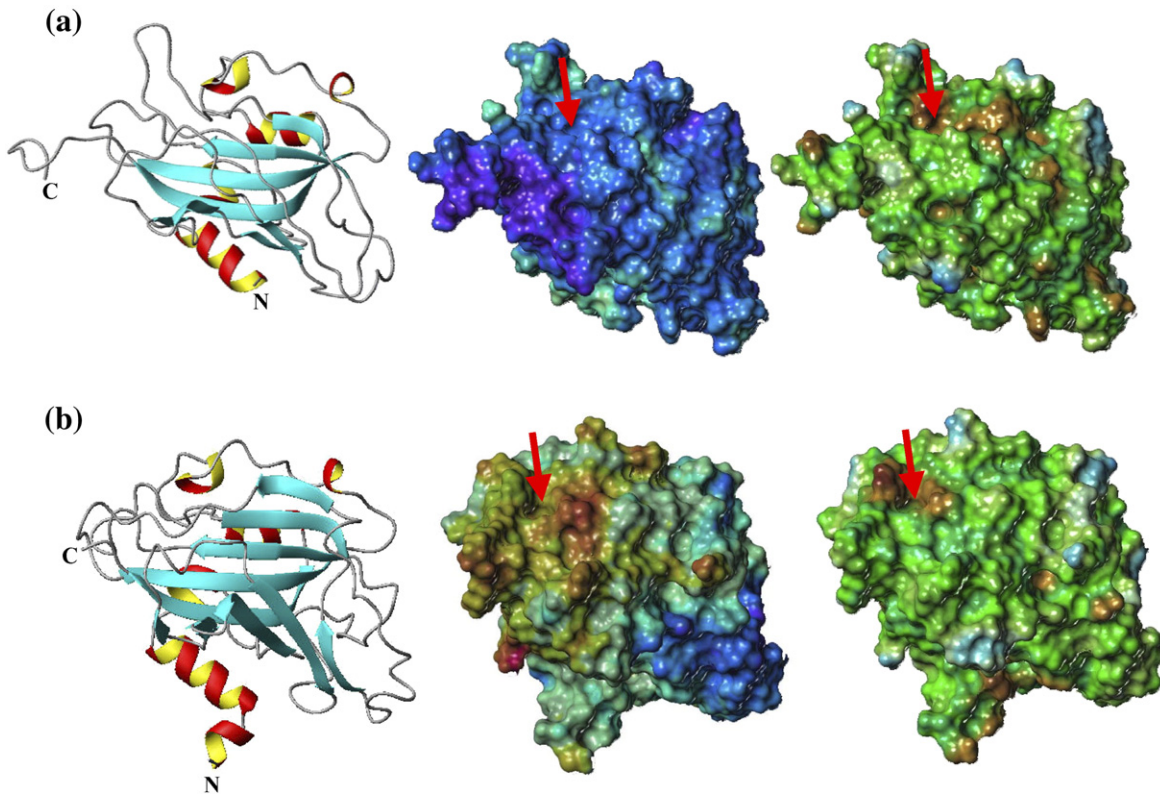
## Results and Discussion

### Structural features of the Ylr179cp model

Data banks analysis using Blast and mGenThreader revealed, as expected, that Tfs1p, which shares 39% sequence identity with Ylr179cp and whose 3D-structure has been resolved recently in complex with CPY,<sup>17</sup> is the best template for 3D structure modelling of Ylr179cp. However, the Tfs1p 3D structure contains two unidentified segments corresponding to residues Lys73–Ala78 and Glu122–Ala130, which are supposed to form flexible loops on the surface of the molecule. In a first approach, these loops were modelled using the strategy described in Materials and Methods. Tfs1p and Ylr179cp sequences were then aligned using CLUSTAL W, and Ylr179cp secondary structures were predicted using PSIPRED. Figure 1, obtained with the ESPRIPT software, shows that the predicted secondary structures of Ylr179cp are aligned with those of Tfs1p in the original CLUSTAL W alignment. The 3D structure of Ylr179cp was built with MODELLER as described in Materials and Methods. The best model was selected after evaluation by VERIFY3D, ANOLEA and PROCHECK. A MOLMOL representation of the global architecture of the protein (Figure 2(a), left-hand panel) shows that the C-terminal region of the model is obviously misfolded and comes out of the global structure of the protein. Indeed, this region of Ylr179cp does not align with the Tfs1p C-terminal domain implying that MODELLER has



**Figure 1.** Sequence alignment of Tfs1p and Ylr179cp and secondary structure predictions of Ylr179cp. The alignment was designed using CLUSTAL W and represented using ESPrIPT. Identical residues are represented as white letters on a red background while similar residues are represented as red letters. The  $\alpha$ -helices,  $\beta$ -strands and  $\beta$ -turns of Tfs1p, and those predicted by PSIPRED for Ylr179cp are represented as squiggles, arrows, and TT, respectively.



**Figure 2.** Global fold and surface properties of Ylr179cp model and of Tfs1p structure. (a) Ylr179cp model. Left-hand panel: MOLMOL representation of Ylr179cp global fold. The  $\beta$ -sheets are coloured cyan, helices are in red and yellow. This orientation was subsequently chosen to represent the molecular surfaces in Figures 7 and 8. N indicates the N terminus and C indicates the C terminus. Middle panel: Electrostatic potential at the molecular surface of Ylr179cp. The surface is coloured with increasing electrostatic potentials, from blue ( $-100 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) to red ( $+300 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Right-hand panel: lipophilic potential at the molecular surface of Ylr179cp. The surface is coloured with increasing hydrophobicity, from blue ( $-0.2$  arbitrary units) to brown ( $+0.1 \text{ au}$ ). The cavity is indicated by a red arrow. (b) Tfs1p structure: colours as for Ylr179cp.

no model to correctly fold this region. Except for this region, ANOLEA and VERIFY3D profiles were indicative of a good quality model with a positive mean force potential for VERIFY3D and a negative one for ANOLEA (data not shown). The Ramachandran map of the model obtained after minimisation was excellent with no residue in the forbidden zones and more than 90% of the residues in the most-favoured or allowed regions (data not shown).

The global fold of Ylr179cp is very similar to that of Tfs1p (Figure 2(b), left-hand panel). Using the nomenclature of the X-ray structure of Tfs1p,<sup>17</sup> the N-terminal  $3_{10}$ -helix ( $\eta_1$ ) and the  $\beta_7$  strand of Tfs1p, corresponding to deletions in Ylr179cp, are therefore absent from this protein. Some strands ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$ ) are somewhat shorter in Ylr179cp than in Tfs1p and  $\beta_6$ , as predicted by PSIPRED, is not formed in Ylr179cp. The  $\alpha$ -helices are well preserved and, globally, there is a good agreement between the secondary structure of Ylr179cp model and those predicted by PSIPRED (Figure 1).

An examination of the surface properties of Ylr179cp reveals marked differences with Tfs1p (Figure 2(a) and (b), middle and right-hand panels).

The molecular surface is entirely electronegative (the global charge is  $-6$ ) and globally, the distribution of hydrophobic potential is also affected. The 3D structure of the Tfs1p/CPY complex revealed that the binding interface between Tfs1p and CPY involved two characteristic binding sites of Tfs1p: the N-terminal seven residues (the primary CPY-binding site) and residues located in the  $\alpha_1$  helix and in the four  $\beta$  strands:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ , and  $\beta_6$  (the secondary CPY-binding site).<sup>17</sup> At this binding interface, the electrostatic and lipophilic properties are rather well preserved in Ylr179cp, but the seven N-terminal residues constituting the primary CPY-binding site, are deleted in Ylr179cp. Furthermore, some residues of the secondary binding site are replaced by residues with different physical properties, such as H18/E12 or I35/E29. Such sequence modifications at the level of the interaction sites probably account for the lack of interaction between Ylr179cp and CPY.<sup>19</sup> These marked differences between Tfs1p and Ylr179cp: surface properties and N-terminal domain, may explain the lack of interaction between Ylr179cp and Ira2p. We have taken into account these elements to design our mutant and hybrid proteins.



### The surface cavity of Tfs1p is important for the interaction with Ira2p

All members of the PEBP family are characterized by a conserved ligand-binding site for negatively charged molecules (sulphate ion for Tfs1p, acetate or phosphate for RKIP). In Tfs1p, this site appears on the molecular surface as a small cavity (Figure 2(b), middle and right-hand panels) and includes residues D95, A98, P99, F109 and H111 in the long loop between the  $\beta 4$  and  $\beta 5$  strands, and residues M150, A153, P154, P155, H161 and Y163 in the loop situated between the  $\beta 7$  and  $\beta 8$  strands. This small cavity and the surrounding residues delineate a highly cationic region at the surface of the molecule. The surface of Tfs1p is globally positive (net charge +3). There is a large electronegative area due to an accumulation of negatively charged residues opposite the cavity: the D triplet (D85, D86, D87), E122, E126 and D175 (Figure 2(b), middle panel). The ligand-binding site region is also characterized by a marked hydrophobicity (Figure 2(b), right-hand panel) while the rest of Tfs1p surface is more hydrophilic.

We have shown that Tfs1p interacts with Ira2p and inhibits its activity on Ras proteins *in vivo*. The interaction involves a specific domain of Ira2p that we have named the Tfs1 binding domain (TBD). This interaction has been demonstrated using the two-hybrid system and by coprecipitation experiments.<sup>18</sup> The inhibitory activity of Tfs1p on Ira2p has been shown indirectly *in vivo*, first by evaluating the suppressive effect of Tfs1p overproduction on the thermosensitive *cdc25-1* mutation affecting the antagonist of Ira2p, and second by showing that Tfs1p overproduction is responsible for heat shock sensitivity as a result of an activation of the Ras/cAMP/PKA pathway.<sup>18</sup>

Two point mutations at residues conserved in all PEBPs (P99L and H111A) have been shown to disrupt the Tfs1/Ira2 interaction and prevent the inhibition of Ira2p by Tfs1p.<sup>18</sup> According to the Tfs1p 3D-structure, these residues participate in the

active site architecture, accessibility or binding properties. P99 is the conserved *cis*-proline inducing the hook-like conformation of the loop located between  $\beta 4$  and  $\beta 5$ . The O atom of P99 peptidic bond is hydrogen bonded to N<sup>ε2</sup> of His169 and this bond is conserved among mammalian PEBPs. P99 is located in a turn at the border of the cavity and maintains the positioning of H169 on the wall of the cavity. The P99L mutation affects the architecture and thus the binding properties of the residues forming the cavity with various ligands. H111, located on the edge of the cavity, is involved directly in the interaction with the sulphate ion in the X-ray structure.<sup>17</sup> Its mutation to A disrupts the binding ability for negatively charged ligands.

To further confirm the importance of the surface pocket in the Tfs1/Ira2 interaction and in the inhibition of Ira2p by Tfs1p, another point mutation, F109V, was performed. The F109V mutation corresponds to the replacement of the F109 residue of Tfs1p by the corresponding valine residue of Ylr179cp (Figure 1). F109 is located in the loop linking  $\beta 4$  to  $\beta 5$ , at the border of the cavity, its side-chain is packed close to the side-chains of His111 and Met150. When F109 is mutated to valine, if we assume that the global architecture of the site is not altered, one of the valine methyl groups fills in the gap left by the ring of the F residue, while the other one is inserted into the cavity in contact with A98. This considerably reduces the size and the accessibility of the cavity. F109V lowers the Tfs1/Ira2 interaction without totally preventing it. Indeed, the two-hybrid test and the coimmunoprecipitation experiment are faintly positive between Tfs1F109V and Ira2 (Table 1; Figure 3). Figure 4 shows that Tfs1F109V does not suppress the *cdc25-1* mutation when overproduced. Furthermore, Tfs1F109V does not induce a heat shock sensitivity of cells overproducing it (data not shown). Therefore Tfs1F109V is unable to inhibit Ira2p *in vivo*. We have shown that these three cavity mutants (Tfs1P99L, Tfs1H111A, Tfs1F109V) display an intact inhibitory activity on CPY

**Table 1.** Structural and functional analysis of Tfs1p point and hybrid mutants

Protein	Two hybrid interaction with Ira2 <sup>a</sup>	Coimmunoprecipitation <sup>a</sup>	Ira2 inhibition ( <i>cdc25-1</i> suppression) <sup>b</sup>	Surface cavity		Electrostatic properties		N-terminal region	
				Access <sup>c</sup>	Hydroph <sup>d</sup>	Net charge	Potential on the surface of the putative contact site <sup>e</sup>	Access <sup>c</sup>	Hydroph <sup>d</sup>
Tfs1	+	+	+	WT	WT	+3	WT	WT	WT
Tfs1Δ2	+	ND	ND	WT	WT	+3	WT	-	-
Tfs1F109V	-/+	-/+	-	-	WT	+3	WT	WT	WT
Tfs1N2K	+	+	ND	WT	WT	+4	WT	WT	WT
Tfs1N2Q	+	+	ND	WT	WT	+3	WT	WT	WT
Tfs1ΔN2	ND	+	ND	WT	WT	+3	WT	-	-
Tfs1-1Y	-	-	-	WT	WT	+2	WT	-	-
Tfs1-BCY	-	-	-	-	-	+1	-	-	-
Tfs1-CY	-	-	-	+/-	WT	+1	-	WT	WT

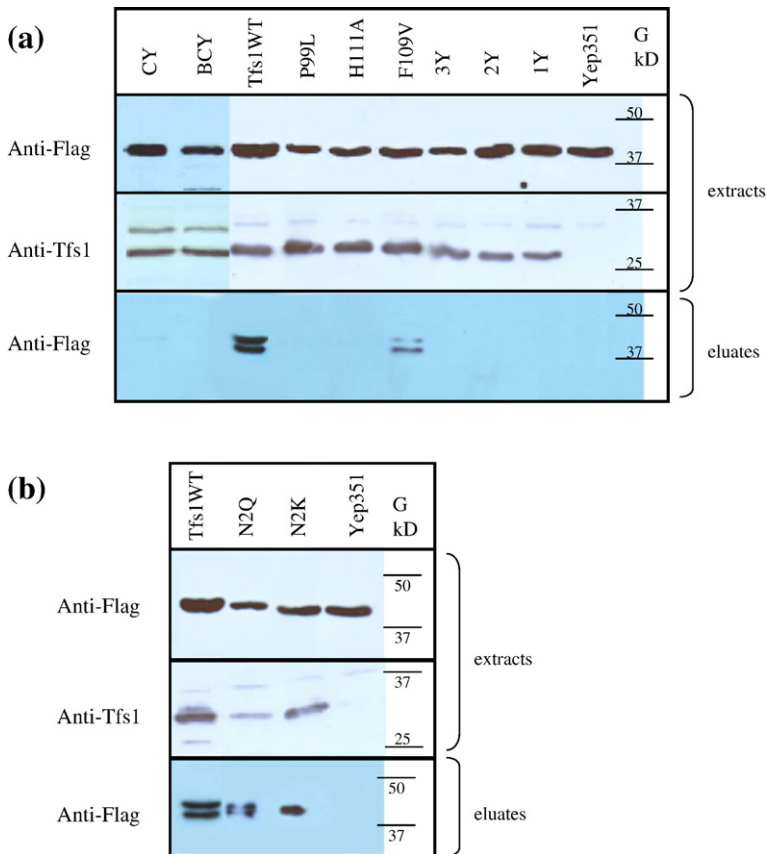
<sup>a</sup> +, interaction; -, no interaction.

<sup>b</sup> +, inhibition; -, no inhibition.

<sup>c</sup> WT, full accessibility; -, restricted accessibility; --, no accessibility.

<sup>d</sup> WT, hydrophobicity (Hydroph) comparable to the WT; - hydrophobicity different from the WT.

<sup>e</sup> WT, like the WT; -, different from the WT; --, very different from the WT; ND, not determined.



**Figure 3.** Coimmunoprecipitation experiments between Ira2-TBD and Tfs1p mutants. Extracts of BY4742 $\Delta$ T cells co-transformed with pESC-TBD and Yep351 derivatives carrying various forms of *TFS1* were analyzed by Western blot using anti-Flag (upper panel) and anti-Tfs1 (middle panel) antibodies. Extracts were immunoprecipitated with anti-Tfs1 antibodies cross-linked to protein G beads. The material eluted from the beads was analyzed by Western blot using anti-Flag antibodies (lower panel). Molecular mass markers are indicated at the right. (a) BY4742 $\Delta$ T cells co-transformed with pESC-TBD and Yep351, Yep351T, Yep351T1Y, 2Y, 3Y, 4Y, BCY, CY, P99L, H111A, and F109V. (b) BY4742 $\Delta$ T cells co-transformed with pESC-TBD and Yep351, Yep351T, Yep351TN2K and N2Q.

indistinguishable from the wild-type form, thereby attesting their correct folding (unpublished results).

Concerning Ylr179cp, the residues constituting the binding site of Tfs1p are well conserved in its sequence, and on the modelled structure the binding site architecture is well preserved, as observed for other PEBPs of known structure. This leads to a conservation of the cavity even if its size may vary from one model to the other, depending on the modelled orientation of the side-chains. However, the surface properties in this region differ drastically between the two proteins. The large electropositive area observed on the Tfs1p surface becomes totally negative in Ylr179cp (Figure 2(a) and (b), middle panel). Furthermore, the hydrophobic area around the cavity of Tfs1p has partly disappeared from Ylr179cp (Figure 2(a) and (b), right-hand panel). These data further confirm the key role of the accuracy of the cavity (architecture, size and residue nature) and underline the crucial role of the electropositive area surrounding it for the interaction with Ira2p.

#### Other determinants essential to the Tfs1/Ira2 interaction

The alignment of Tfs1p and Ylr179cp sequences (Figure 5(a)) allowed us to define different regions in the two proteins. Regions 1 to 4 display noticeable sequence differences between the two proteins and are called variable regions. On the other hand, regions A to C are rather homologous and are called

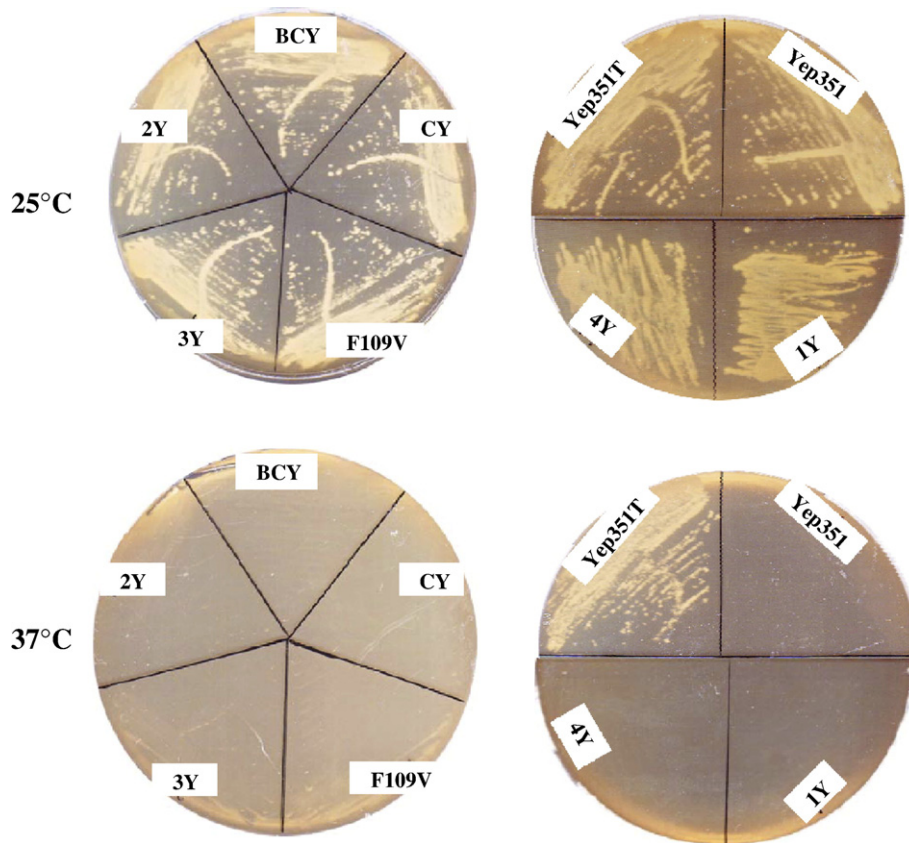
homologous regions. These regions are labelled in Figure 5(a).

In order to gain new insights into the regions important for the Tfs1/Ira2 interaction, six hybrid proteins between Tfs1p and Ylr179cp were constructed (Figure 5(b)). Each variable region of Tfs1p was replaced by the corresponding region of Ylr179cp, yielding four hybrid proteins Tfs1-1Y, Tfs1-2Y, Tfs1-3Y, and Tfs1-4Y. The replacement of some "homologous" regions was also undertaken, and Tfs1-BCY and Tfs1-CY were constructed. Tfs1-BCY comprises the B and C regions of Ylr179cp and Tfs1-CY comprises the C region of Ylr179cp.

None of the hybrid proteins interacted with Ira2p or restored *cdc25-1* growth at 37 °C (Table 1; Figures 3 and 4) although the proteins were well produced and stable (Figure 3). Among the six hybrids, only two, Tfs1BCY and Tfs1CY, were able to inhibit CPY essentially as the wild-type Tfs1p (data not shown).

Using the Tfs1p 3D structure and the Ylr179cp structural model, a 3D structure model was built for each hybrid protein (Figure 5(c)). The results concerning Tfs1-4Y are difficult to interpret, as its 3D structure model is rather hypothetical due to the high degree of uncertainty concerning the secondary and tertiary structures, and the spatial locations of region 4 in Ylr179cp.

Three hypotheses were first proposed to explain the loss of Ira2p binding and inhibition by the Tfs1 hybrids: (i) the stability of the whole protein and the global fold of the hybrid may be affected; (ii) the



**Figure 4.** Effect of Tfs1 mutant overproduction on the suppression of *cdc25-1* mutation. LRB27 cells were transformed with the following plasmids: Yep351, Yep351T, Yep351TF109V (F109V), Yep351T-1Y (1Y), Yep351T-2Y (2Y), Yep351T-3Y (3Y), Yep351T-4Y (4Y), Yep351T-BCY (BCY) and Yep351T-CY (CY). They were then streaked out for single colonies at 25 °C or at the restrictive temperature of 37 °C on YPD medium.

active site, which is known to be involved in Ira2p interaction, may be modified; and (iii) the electrostatic properties of the hybrids, which could affect the recognition process (dipolar moment, net charge) or the contact zone between the two molecules (electrostatic potential on the surface), may be altered.

For the first hypothesis, the correct folding of the hybrids was initially assessed by testing their ability to inhibit CPY. If so, this experiment attested a correct folding. If not, CD spectroscopic analyses were performed in order to conclude. Answers to the two last hypotheses were discussed on the basis of the analysis of the 3D structure model of each hybrid.

Tfs1BCY and Tfs1CY hybrids were able to inhibit CPY as efficiently as the wild-type Tfs1p and were therefore likely to be folded correctly (data not

shown). In contrast, Tfs1-1Y, Tfs1-2Y and Tfs1-3Y were unable to inhibit CPY. These hybrids were His<sub>6</sub>-tagged, purified, and their CD spectra were determined and compared to that of purified His<sub>6</sub>-tagged Ylr179cp. CD spectroscopic analysis of Tfs1-1Y is in favour of a correct folding because it shows a folding similar to that of Ylr179cp (Figure 6). In contrast, the CD spectroscopic spectrum of Tfs1-3Y suggests that Tfs1-3Y is unfolded (Figure 6). This has to be correlated to the inability of Tfs1-3Y to inhibit CPY, although neither the primary nor the secondary sites of interaction between Tfs1p and CPY are affected. The CD spectroscopic spectrum of Tfs1-2Y suggests that Tfs1-2Y has a different folding compared to Ylr179cp (Figure 6). In addition, the 3D structure model of Tfs1-2Y reveals drastic changes in its electrostatic properties compared to Tfs1p with a net charge of +6 (data not

**Figure 5.** Sequence alignment and Tfs1/Ylr179c hybrid constructions. (a) Sequence alignment of Tfs1p and Ylr179cp: Residues of the variable regions (1, 2, 3 and 4) are in red, pink, yellow and blue, respectively. Residues of the homologous regions (A, B and C) are in black. Residues conserved between Tfs1p and Ylr179cp are framed in grey. Asterisks mark the residues that have been site-directed mutagenized. Residues of the various secondary structure elements of Tfs1p ( $\beta$ -strands and  $\alpha$ -helices) are underlined and in bold letters. The putative elements of secondary structure of Ylr179cp are written in italics, underlined and in bold letters. (b) Tfs1/Ylr179c hybrid constructions: Regions of Tfs1p and Ylr179cp are indicated by an opened box and a filled box, respectively. Bold numbers correspond to the limits of Tfs1p regions and italic numbers correspond to the limits of Ylr179cp regions. (c) Hybrid protein models. The Tfs1p and Ylr179cp regions are coloured yellow and red, respectively.

shown). These differences are localized principally on the face of Tfs1-2Y model including the active site (surface cavity) and the N-terminal region. For these reasons, it was rather difficult to draw any

conclusions from the results and the models obtained with Tfs1-2Y and 3Y hybrids.

For Tfs1-1Y, CY and BCY, the characteristics of the surface cavity and the electrostatic properties

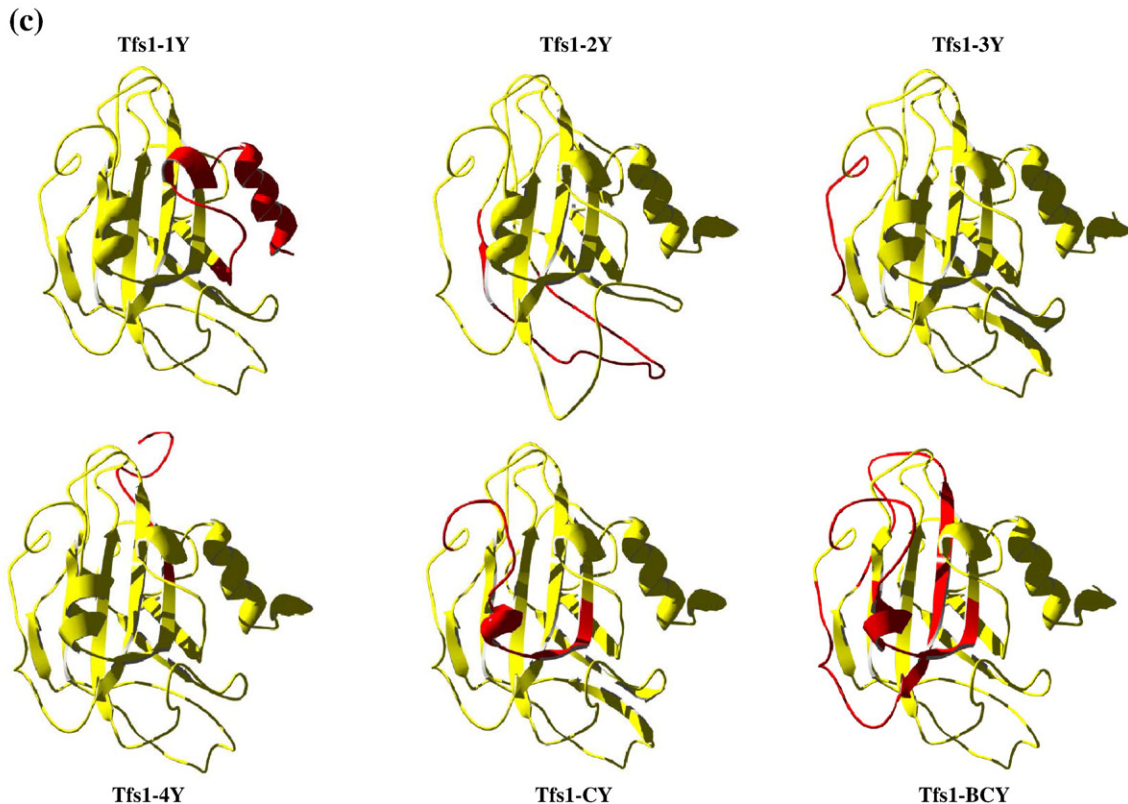
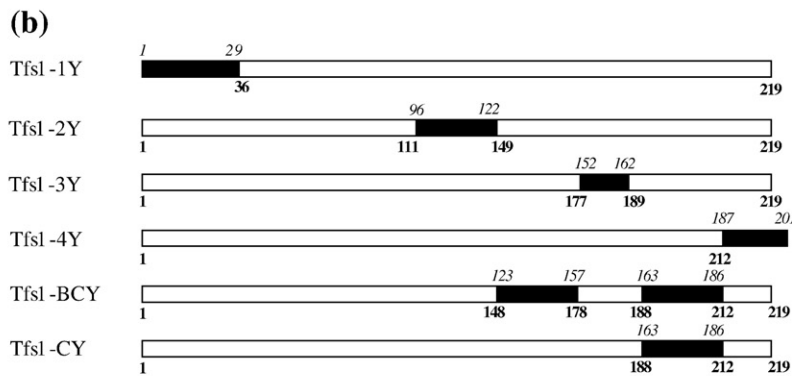
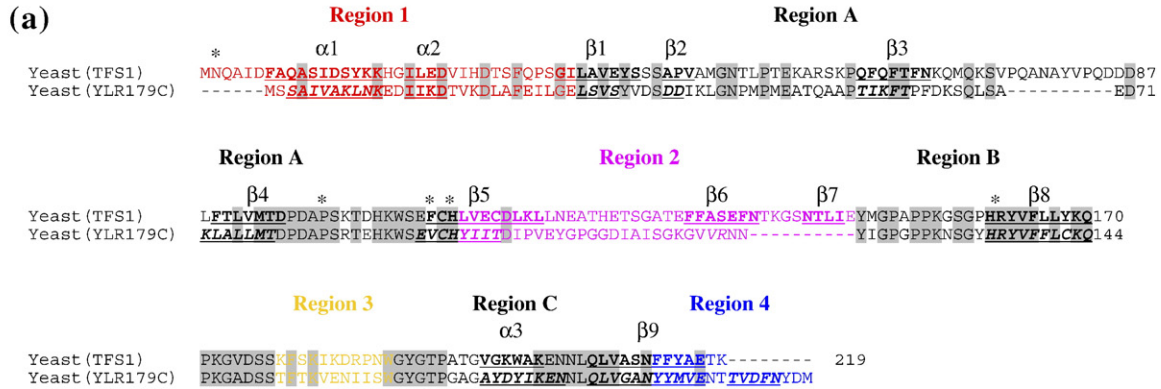
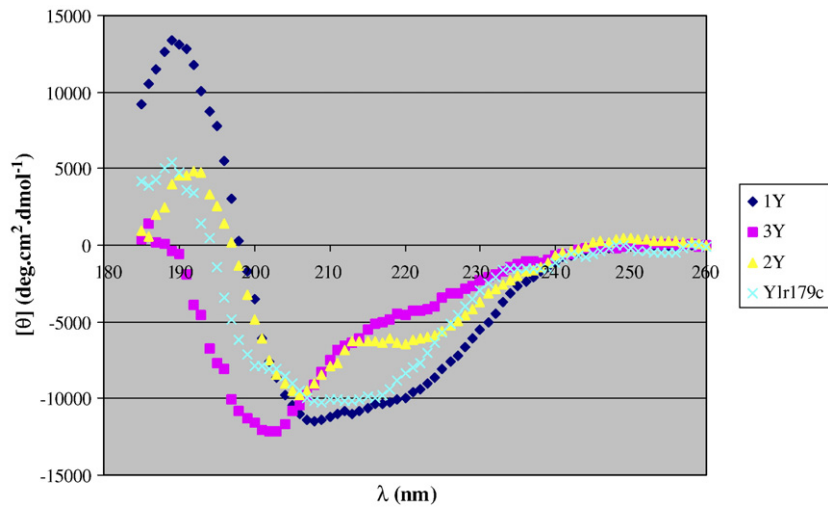


Figure 5 (legend on previous page)

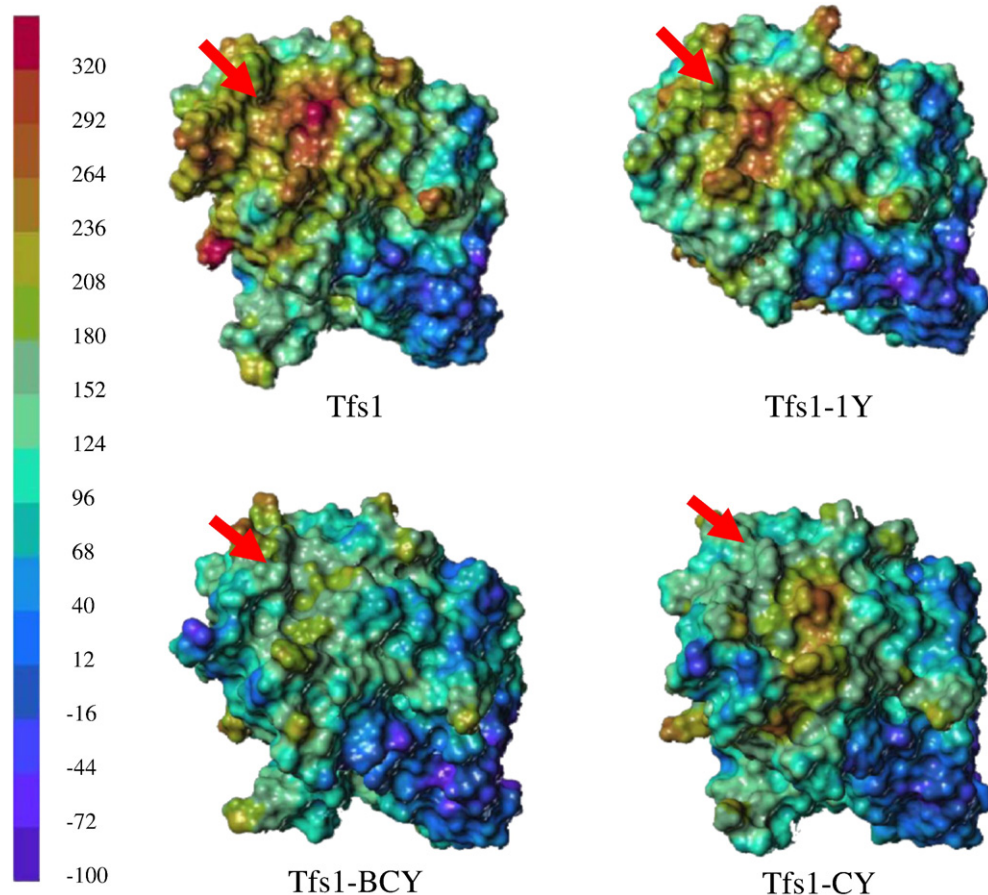


**Figure 6.** Circular dichroism spectra of 6Histidine-tagged purified Ylr179c and Tfs1/Ylr179c hybrid proteins. His<sub>6</sub>-tagged versions of Ylr179c, Tfs1-1Y, 2Y, and 3Y were produced and purified from *E. coli*. They were concentrated at 0.3 mg/ml in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 8) and CD measurements were recorded on a Jasco J-810 CD spectropolarimeter. Spectra were measured in the far-UV range (185–260 nm) in 1 mm path-length quartz cells at 5 °C. Each spectrum was the average of five consecutive scans, and all spectra were corrected by subtracting the buffer baseline. The results were expressed in terms of mean residue ellipticity  $[\theta]$  in units of  $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ .

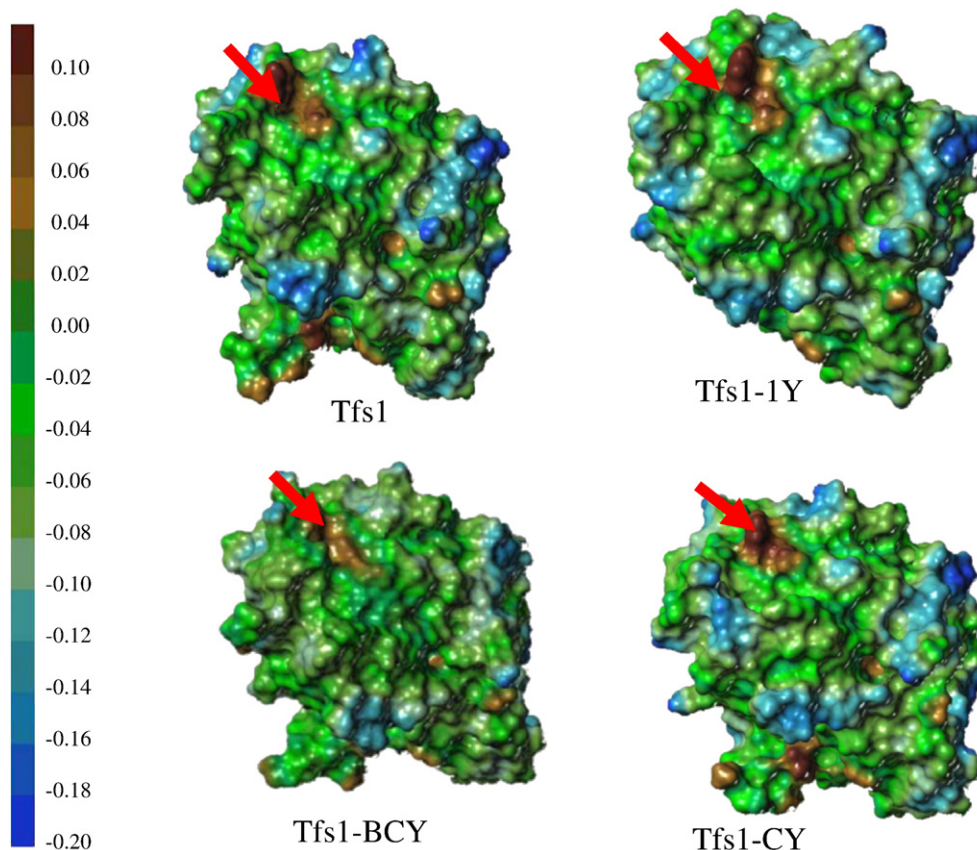
are reported in Table 1. The electrostatic and lipophilic potentials at the molecular surface are compared to those of Tfs1p in Figures 7 and 8.

Tfs1-1Y appeared to be an interesting mutant, as it provides new information concerning the determi-

nants necessary for the interaction between Tfs1p and Ira2p. The conservation of the sequence of the anionic binding site leads to the preservation of its global geometry and of the surface cavity. In addition, the global electrostatic properties that



**Figure 7.** Electrostatic potential on the surface of the Tfs1 and the Tfs1 hybrid models near the active site. The MOLCAD surface of the Tfs1p, the Tfs1-1Y, Tfs1-BCY and Tfs1-CY are displayed in the orientation of Figure 2 and coloured with increasing electrostatic potentials, from blue to red according to the ramp on the left. The active site is indicated by a red arrow.



**Figure 8.** Lipophilic potential on the surface of the Tfs1 and the Tfs1 hybrid models. The MOLCAD surface of the Tfs1p, the Tfs1-1Y, Tfs1-BCY and Tfs1-CY are displayed in the orientation of Figure 2 and coloured with increasing hydrophobicity, from blue to brown according to the ramp on the left. The marked hydrophobicity of the cavity region is indicated by a red arrow.

could affect the recognition process are not modified (Table 1). The only difference between Tfs1p and Tfs1-1Y that could account for the disruption of the Tfs1/Ira2 interaction is the replacement of Tfs1p N-terminal region by that of Ylr179cp. Therefore, our data show that the Tfs1p N-terminal region is required for the Tfs1/Ira2 interaction.

Taking this result into account, the accessibility of the N terminus as well as the electrostatic and hydrophobic properties of the face including the active site and the N-terminal region were examined in each of the hybrids studied (Table 1; Figures 7 and 8). Several models were considered to ensure that our results were not model-dependent.

The active site area of Tfs1-BCY is clearly modified, the cavity is very small and its environment becomes less electropositive than it is in the native protein (Figure 7). The hydrophobicity is also reduced slightly. (Figure 8). The active site and its environment are therefore likely to be responsible for the inability of the Tfs1-BCY hybrid to interact with Ira2p.

In Tfs1-CY, the depth of surface cavity is somewhat reduced but the lipophilic properties are not much affected compared to Tfs1p. The molecule is less electropositive and the charge distribution is modified, so that the environment of the active site becomes less cationic (Figures 7 and 8). These data indicate that the electropositive region surrounding

the cavity is important for the Tfs1/Ira2 interaction. This is in good accordance with the behaviour of the R162A mutant, which is unable to interact with Ira2p or to inhibit it.<sup>18</sup> Indeed, R162 forms a salt-bridge with D23 in the Tfs1p structure, an interaction also well preserved among PEBP structures. The R162A mutation hinders the formation of this salt-bridge and therefore might reduce the protein stability. However, the resulting Tfs1 mutant is not misfolded, since it is perfectly active on CPY (unpublished results). The R162A mutation rather modifies the electrostatic and the hydrophobic properties on the face of Tfs1p, including the cavity and the N terminus.

Therefore, the entire face of Tfs1p, including the active site and the N-terminal region, may constitute a contact zone with Ira2p and therefore may have an important role in their interaction.

#### The extremity of Tfs1p N-terminal region is not involved in the Tfs1/Ira2 interaction

The first seven residues of Tfs1p, constituting the  $\eta_1$  helix, have been shown to be essential for the Tfs1/CPY interaction and they constitute the inhibitory reactive site towards CPY.<sup>17</sup> Among these seven residues, the acetylation of M1 has been shown to be required for an efficient inhibition of

CPY. Furthermore, the Ac-M1 and N2 residues play a crucial role in the Tfs1/CPY interaction by establishing hydrophobic interactions (Ac-M1) and hydrogen bonds (Ac-M1 and N2) with CPY. We used different mutations in order to gain insights into the role of M1 acetylation and M1 and N2 residues in Tfs1/Ira2 interaction.

Tfs1p has been shown to be acetylated by the NatB system on its first methionine residue<sup>20</sup>. NatB-dependent acetylation acts cotranslationally on proteins with Met-Glu- or Met-Asp- termini and subclasses of proteins with Met-Asn- and Met-Met-termini. Tfs1p has a Met-Asn- N terminus. The Tfs1N2Q mutant was constructed in order to gain insights into Tfs1p acetylation. This mutation impairs Tfs1p acetylation but should not greatly modify the properties of the second Asn residue. Tfs1N2Q appeared to be able to interact with Ira2p using two hybrid or co-immunoprecipitation experiments (Figure 3; Table 1), suggesting that Tfs1p acetylation is not required for the interaction with Ira2p. Using a specific NatB mutant, we have confirmed that Tfs1p N-terminal acetylation is not required for the interaction with Ira2p and demonstrated that it is not required for its inhibition (unpublished results). In the Tfs1N2K mutant, the short polar asparagine residue is mutated into a positively charged and larger lysine residue, thereby affecting the spatial and electrostatic properties of the second residue of Tfs1p. In Tfs1 $\Delta$ N2, the asparagine is deleted. The last Tfs1p mutant, Tfs1 $\Delta$ 2 has been deleted of the M1 and N2 residues and fused to *lexA* for two-hybrid tests. These three mutants were able to interact with Ira2p (Figure 3, data not shown; Table 1), demonstrating that Tfs1p acetylation and its two first residues are not involved in the interaction with Ira2p. Together, these results demonstrate that, although the Tfs1p N-terminal region is involved in both CPY and Ira2p interactions, different residues play the key roles in each interaction.

## Conclusion

The results of this study demonstrate that the surface cavity at the active site of Tfs1p and the N-terminal region of Tfs1p are both important for the Tfs1/Ira2 interaction. These latter most probably constitute two binding sites of Ira2p on Tfs1p. The electrostatic properties of a large surface area containing the cavity and the N-terminal domain of Tfs1p are also essential for the interaction with Ira2p, and suggest strongly the existence of a specific contact zone between Tfs1p and Ira2p on this molecular face. In contrast to the interaction with CPY and its inhibition, the extremity of the N-terminal region of Tfs1p (acetylated Met1 and Asn2) does not seem to be involved in the Tfs1/Ira2 interaction.

This study is a prerequisite to further detailed structural studies of the complex between Tfs1p and its binding domain in Ira2p, the TBD. Indeed, some of the mutants described in this work will be extremely valuable tools to fully understand the mechanisms of

interaction and inhibition of Ira2p by Tfs1p. To this end, we are actually attempting to purify the TBD domain of Ira2p in order to resolve its 3D structure in complex with different Tfs1 mutants.

In conclusion, two distinct interaction sites are involved in the interaction of Tfs1p with its partners CPY and Ira2p. One of them, the N-terminal region, is common to both interactions although implying different specificities of interaction. The existence of these two distinct interaction sites is in good accordance with what is known for RKIP, one of the human homologue of Tfs1p. Indeed, RKIP has been shown to interact and inhibit different kinases: Raf-1, GRK-2, TAK and NIK<sup>7-9</sup> and Yeung *et al.*<sup>21</sup> have suggested that the surface cavity of RKIP could be involved in the interaction with Raf-1. However, this site is not the only region of RKIP important for this interaction, since the phosphorylation of S153, localized in H1 far from the active site, abolishes the interaction with Raf-1,<sup>22</sup> while it promotes the interaction with GRK-2.<sup>9</sup> Therefore, it is likely that these two partners of RKIP need two distinct binding sites to interact with it, similar to the two partners of Tfs1p. For RKIP and its two partners, the surface cavity might constitute a primary binding site, whereas a second binding site, localized somewhere else on the surface of the molecule, would vary depending on the partner.

## Materials and Methods

### Structure calculation

The fold recognition program mGenTHREADER<sup>†,23,24</sup> was run to detect the best template for comparative modelling. All alignments were produced with CLUSTAL W, using the BLOSUM 62 similarity matrix and default parameters.<sup>25</sup> Secondary structure predictions were performed via PSI-PRED<sup>‡,26</sup> a simple and reliable method, incorporating four feed-forward neural networks that perform an analysis on output obtained from PSI-BLAST<sup>§</sup>. Homology models of Ylr179cp and of the Tfs1/Ylr179c hybrid proteins were built using MODELLER 6.2 software.<sup>27</sup> MODELLER is a program based on the satisfaction of spatial restraints generated on the target sequence from its alignment with the 3D structure of the templates. The loop modelling protocol of MODELLER 6.2<sup>28</sup> was used to refine all loops of the homology models, and to build the two regions (Lys73-Ala78 and Glu122-Ala130) of low electron density missing from the PDB file of Tfs1p (1WPX). Starting with random conformations, 40 structures were built for each loop. The convergence was attested using energy and RMSD criteria as recommended by Fiser *et al.*<sup>28</sup> The PROCHECK program was used to assess the stereochemical quality of the structures.<sup>29</sup> Additional evaluations were completed by various profile programs: ANOLEA<sup>||,30,31</sup> and VERIFY3D<sup>¶,32</sup> and by

† <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

‡ <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

§ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

|| <http://swissmodel.expasy.org/anolea/>

¶ [http://www.doe-mbi.ucla.edu/Services/Verify\\_3D/](http://www.doe-mbi.ucla.edu/Services/Verify_3D/)

examination of the structure on a graphic display. Using these assessments, a representative model was selected and energy minimised with the SYBYL software (TRIPOS Inc., St Louis, MO). The secondary structures of the model were analysed and represented with the MOLMOL program.<sup>33</sup> Hydrophobic and electrostatic potentials on the molecular surfaces were calculated with the MOLCAD option implemented in SYBYL.

### Strains, media and general methods

*Escherichia coli* C600 ( $F^- [e14^- (McrA^-)]$  or  $e14^+ (McrA^+)$  *thr-14 leuB6 thi-1 lacY1 glnV44 supE44 rbfD1 flnA21*) was used for all plasmid amplifications and isolations. Different yeast strains were used in this study. BY4742ΔTY (*MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lysΔ0, ura3Δ0, tfs1, ylr179c::kan*)<sup>18</sup> was used to check the production of the mutant proteins. BY4742ΔT (*MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lysΔ0, ura3Δ0, tfs1::kan*)<sup>18</sup> was used for the coimmunoprecipitation experiments between Tfs1 mutants and the TBD domain of Ira2p. LRB27 (*MATα, his4, leu2, ura3, cdc25-1*) (L. Robinson) was used to check the effect of overproduction of the different mutants on the suppression of the *cdc25-1* mutation. EGY48 (*MATα, trp1, his3, ura3, leu2::6 LexAop-LEU2*) (MoBiTec) was used in the two-hybrid assays.

Yeast and bacterial strain cultures, DNA manipulations and transformations were performed as described.<sup>34,35</sup>

### Plasmids and oligonucleotides

The plasmids and oligonucleotides used are listed in Tables 2 and 3, respectively.

To construct pESC-TBD, the fragment of *IRA2* encoding the TBD domain was PCR-amplified from yeast genomic DNA with oligonucleotides HB57 and HB58 and cloned into the pESC-Flag plasmid opened with BglII and PacI sites.

Genes encoding the Tfs1 hybrid proteins required a two-step construction. The first step consisted in the amplification of different portions of the *TFS1* and *YLR179C* genes encoding individual regions of the corresponding proteins by PCR using the oligonucleotide pairs described in Table 4. The second step allowed the amplification of the full-length hybrid genes by mixing the overlapping gene fragments previously obtained and using the appropriate external primers. Amplification of *TFS1* fragments was performed with the Yep351T plasmid as a template, whereas *YLR179C* fragments were obtained using the Yep352Y plasmid as a matrix.

The N2K site-directed mutagenesis in Tfs1p will be described elsewhere. The F109V and N2Q mutagenesis were performed by PCR with overlapping extension using the mutagenic primer pairs HB40/HB41 and HB46/HB47, respectively. The external primers were HB3 and HB38. The full-length hybrid and point mutant genes were cloned as a SacI/PstI DNA fragment in the Yep351 plasmid opened at the same sites.

For pADNSTAN2, *TFS1* deleted of its second codon was amplified by PCR with the primer pair HB59/HB60. After digestion with NotI/Sac2, the PCR fragment was ligated into pADNS opened with the same sites.<sup>36</sup>

To perform the two-hybrid assays, each hybrid or mutated gene was inserted into the pEG202 plasmid in frame with the *lexA* gene. For this purpose, the primer pair HB52/HB2 was used for Tfs1, Tfs1-CY, Tfs1-BCY, and Tfs1F109V. HB52/HB15 was used for Tfs1-4Y, HB44/HB2 for Tfs1-1Y, HB55/HB2 for Tfs1N2Q, and HB13/HB2 for

**Table 2.** Plasmids used in this study

Plasmids	Description	Source/reference
Yep352	2 μ, <i>URA3</i>	39
Yep352Y	Yep352, <i>YLR179c</i>	18
Yep351	2 μ, <i>LEU2</i>	39
Yep351T	Yep351, <i>TFS1</i>	18
Yep351TP99L	Yep351, <i>TFS1</i> (P99L)	See the text
Yep351TH111A	Yep351, <i>TFS1</i> (H111A)	See the text
Yep351TR162A	Yep351, <i>TFS1</i> (R162A)	See the text
Yep351TF109V	Yep351, <i>TFS1</i> (F109V)	See the text
Yep351TN2K	Yep351, <i>TFS1</i> (N2K)	Unpublished
Yep351TN2Q	Yep351, <i>TFS1</i> (N2Q)	See the text
Yep351T-BCY	Yep351, <i>TFS1</i> -BCY	See the text
Yep351T-CY	Yep351, <i>TFS1</i> -CY	See the text
Yep351T-1Y	Yep351, <i>TFS1</i> -1Y	See the text
Yep351T-2Y	Yep351, <i>TFS1</i> -2Y	See the text
Yep351T-3Y	Yep351, <i>TFS1</i> -3Y	See the text
Yep351T-4Y	Yep351, <i>TFS1</i> -4Y	See the text
pADNSTAN2	pADNS, <i>TFS1ΔN2</i>	H. Benedetti
pEG202	2 μ, <i>HIS3, LexA</i> DBD, NLS	MoBiTec
pEG202T	pEG202, <i>TFS1</i>	18
pEG202Δ2	pEG202, <i>TFS1Δ2</i>	See the text
pEG202TP99L	pEG202, <i>TFS1</i> (P99L)	18
pEG202TH111A	pEG202, <i>TFS1</i> (H111A)	18
pEG202TR162A	pEG202, <i>TFS1</i> (R162A)	18
pEG202TF109V	pEG202, <i>TFS1</i> (F109V)	See text
pEG202TN2K	pEG202, <i>TFS1</i> (N2K)	Unpublished
pEG202TN2Q	pEG202, <i>TFS1</i> (N2Q)	See the text
pEG202T-1Y	pEG202, <i>TFS1</i> -1Y	See the text
pEG202T-2Y	pEG202, <i>TFS1</i> -2Y	See the text
pEG202T-3Y	pEG202, <i>TFS1</i> -3Y	See the text
pEG202T-4Y	pEG202, <i>TFS1</i> -4Y	See the text
pEG202T-BCY	pEG202, <i>TFS1</i> -BCY	See the text
pEG202T-CY	pEG202, <i>TFS1</i> -CY	See the text
pEG202Y	pEG202, <i>YLR179c</i>	18
pJG4-5	2 μ, <i>TRP1</i> , transcriptional AD	MoBiTec
pJIra2TBD	pJG4-5, <i>IRA2</i> TBD	18
pGNG	2 μ, <i>URA3, LexAop-GFP</i>	MoBiTec
pESC-Flag	2 μ, <i>URA3, TPI</i> pro	Invitrogen
pESC-TBD	pESC-Flag, <i>IRA2</i> TBD	See the text
pET14-b	Amp <sup>r</sup> , pT7-His <sub>6</sub>	Novagen
pET14-Ylr179c	pET14-b, pT7-His <sub>6</sub> - <i>YLR179C</i>	H. Benedetti
pET14T-1Y	pET14-b, pT7-His <sub>6</sub> - <i>TFS1</i> -1Y	See the text
pET14T-2Y	pET14-b, pT7-His <sub>6</sub> - <i>TFS1</i> -2Y	See the text
pET14T-3Y	pET14-b, pT7-His <sub>6</sub> - <i>TFS1</i> -3Y	See the text
pCR2.1 TOPO	Amp <sup>r</sup> , Kn <sup>r</sup> , 3'-I, topol-activated	Invitrogen

Tfs1Δ2. The construction of pEG202TN2K will be described elsewhere.

To construct pET14T-1Y, pET14T-2Y and pET14T-3Y, PCR fragments encoding TFS1-1Y, TFS1-2Y and TFS1-3Y were first amplified from the Yep351T-1Y, Yep351T-2Y and Yep352-3Y plasmids, respectively. The oligonucleotide pair HB56/HB2 was used to amplify TFS1-1Y and HB1/HB2 was used to amplify TFS1-2Y and TFS1-3Y. After digestion with NdeI/XhoI, the PCR fragments were ligated into pET14-b opened with the same sites.

The construction of pET14-Ylr179c will be described elsewhere.

### Protein purification and analysis

His<sub>6</sub>-Ylr179c, His<sub>6</sub>-Tfs1-1Y, His<sub>6</sub>-Tfs1-2Y and His<sub>6</sub>-Tfs1-3Y were purified as described for His<sub>6</sub>-Tfs1.<sup>18</sup>

Cell extracts were prepared by a method adapted from Yaffe and Schatz.<sup>37</sup> Western blots were performed as described previously and were probed with primary anti-LexA (a kind gift from R. Llobès), anti-Tfs1 rabbit antibodies,<sup>18</sup> and anti-HA rat antibodies.



**Table 3.** Oligonucleotides used in this study

Name	Sequence 5'-3'
HB1	GATCATATGAACCAAGCAATAGACTTCGCAC
HB2	ACTCGAGGATCCTTATTTCCGTTCCGCATAGAAGAA
HB3	GCAGAGCTCGAGTTGAATCCGAAGTTA
HB13	TAGCGGCCGCAAGCAATAGACTTCGCACAAG
HB15	ACTCGAGGATCCTTACATGTCATAGTTGAAATCA
HB38	CCCTGCAGGGTGCAGCAACCCGGCTCGTATAG
HB39	CGCGCGGAGCTCCTATTTCCGTTCCGCATAGAAGAAATTGG
HB40	CGCATTTACCCAGTGGCATACTTCAGACCACTTGTGATCTG
HB41	CAGATCACAAGTGGTCTGAAGTATGCCACTTGGTAGAATGCC
HB44	GCAATGCGGCCGCTTCTAGTGCCATCGTTGCTAAA
HB46	TGCTTGTGCGAAGTCTATTGCTTGTTCATGTTTTTTCGTTTTCTCTTGTTC
HB47	GAACAAGAGAACAAGCAAAAAACATGCACAACAAGCAATAGACTTCGCACAAGCA
HB48	TGCTTGTGCGAAGTCTATTGCTTGGTGCATGTTTTTTCGTTTTCTCTTGTTC
HB49	GAACAAGAGAACAAGCAAAAAACATGCACAACAAGCAATAGACTTCGCACAAGCA
HB52	TAGCGGCCGCCATGAACCAAGCAATAGACTTCG
HB54	TAGCGGCCGCCATGCACAACAAGCAATAGACTTCG
HB55	TAGCGGCCGCCATGCACAACAAGCAATAGACTTCG
HB56	GATCATATGCTAGTGCCATCGTTGCTAAA
HB57	CGCGCGAGATCTTAGGCCAATTAGGCCAACCTAAAATGGAA
HB58	GCGCGCTTAATTAATCAGGCAGCTATTAGGTTATACGAACTG
HB59	CAGCGGCCGCATGCAAGCAATAGACTTCGCACAA
HB60	CACCGCGCTATTTCCGTTCCGCATAGAAG
Thyb1	GATTTCAACTATGACATGTAGGTATATATATATATATATGTATATGTA
Thyb2	TACATATACATATATATATATATACCTACATGTCATAGTTGAAATCAACGGTCGTG
Thyb3	GTTTTTCGACCATGTAATAATTGGAGGCAACTAGTTGCAGGTTG
Thyb4	GGAAAACAACCTGCAACTAGTTGCCTCAATTATACATGGTCGAAAACACGACCC
Thyb5	GAGAACATTATCTCTGGGGTTACGGCACCCCTGCCACCCGT
Thyb6	GCCAAACCCGTTGGCAGGGGTGCCGTAACCCAGGAGATAATGTTCTCAAC
Thyb7	CTCAACCTTGGTAAAAGTAGATGAGTCCACGCCCTTAGGCTGC
Thyb8	TATAAGCAGCCTAAGGGCGTGGACTCATCTACTTTACCAAGGTTGAGAAC
Thyb9	GGTGTCTGTGAGAAATAACTATATGGGACCAGCTCCACCCAAG
Thyb10	TGGAGCTGGTCCCATATAGTTATTTCTCACGACACCCCTCCC
Thyb11	AATATCAGTGATGTAGTGGCAGAATTCAGACCACTTGTG
Thyb12	TGGTCTGAATTCTGCCACTACATCATCTGATATTCTCTGTC
Thyb13	TTCGAGATTCTGGTGGAGCTTGGCCGTAGAGTACTCATCAAGT
Thyb14	TGAGTACTTACGGCAAGCTCACCAAGAATCTCGAACGCCAA
Thyb15	AGCAACGATGGCACTAGACATGTTTTTTCGTTCTCTTGTCTTGT
Thyb16	CAAGAGAACAAGCAAAAAACATGCTAGTGCCATCGTTGCTAAA
Yhyb7	TTCTCGAAAATTAAGGATAGACCGAAGTGGGGTACGGTACTCTGGTGGGGT
Yhyb8	ACCCGACCCAGGAGTACCGTACCCCGATTCGGTCTATCCTAATTTTCGAGAA
Yhyb11	ACGAAGGGCTCGAACACACTAATAGAATATATTGGGCCTGGTCCACCAAGAACTCC
Yhyb12	GTTCTTTGGTGGACCAGGCCAATATATTTCTATTAGTGTGTTTCGAGCCCTTCGTATTG

**Two-hybrid assays**

The LexA-based version of the yeast two-hybrid system developed by Fields and Song<sup>38</sup> was used. For these

assays, the plasmids (pEG202, pJG4-5, and pGNG) and the strain EGY48 were purchased from MoBiTec GmbH (Göttingen, Germany), and all assays were carried out as recommended by the manufacturer.

**Table 4.** Oligonucleotides pairs used for construction of hybrid genes

Oligonucleotide pair	Individual DNA regions amplified by PCR	Full-length protein
HB38/Thyb15	<i>TFS1</i> promoter	
Thyb16/Thyb14	Ylr179c region1	Tfs1-1Y
Thyb13/HB3	Tfs1 regions A, 2, B, 3, C, and 4 and <i>TFS1</i> terminator	
HB38/Thyb11	<i>TFS1</i> promoter and Tfs1 regions 1 and A	
Thyb12/Thyb10	Ylr179c region 2	Tfs1-2Y
Thyb9/HB3	Tfs1 regions B, 3, C, and 4 and <i>TFS1</i> terminator	
HB38/Thyb7	<i>TFS1</i> promoter and Tfs1 regions 1, A, 2, and B	
Thyb8/Thyb6	Ylr179c region 3	Tfs1-3Y
Thyb5/HB3	Tfs1 regions C and 4 and <i>TFS1</i> terminator	
HB38/Thyb3	<i>TFS1</i> promoter and Tfs1 regions 1, A, 2, B, 3, and C	
Thyb4/Thyb2	Ylr179c region 4	Tfs1-4Y
Thyb1/HB3	<i>TFS1</i> terminator	
HB38/Yhyb12	<i>TFS1</i> promoter, Tfs1 regions 1, A and 2 and a portion of Ylr179c region B	Tfs1-BCY
HB39/Yhyb11	Tfs1 regions 4 and 3, Ylr179c region C and a portion of Ylr179c region B	
HB38/Yhyb8	<i>TFS1</i> promoter, Tfs1 regions 1, A, 2 and B	Tfs1-CY
HB39/Yhyb9	Tfs1 regions 4 and 3 and Ylr179c region C	

## Coimmunoprecipitation

BY4742ΔT cells were first transformed with the pESC-TBD plasmid and then with Yep351 carrying various forms of *TFS1*. Cells were grown in Gal/Raf selective medium until an absorbance at 600 nm of 0.8, and then cell extracts were prepared with glass beads as described in PBS (0.02 M sodium phosphate (pH 7.4), 150 mM NaCl) containing 10% (v/v) glycerol and 1% (w/v) BSA. Tfs1 and Tfs1 hybrids were immunoprecipitated in the lysis buffer using protein G beads cross-linked to anti-Tfs1p antibodies (Pierce). The protocol used was that described by the manufacturer, and the material eluted from the beads was analyzed by Western blot using anti-Flag and anti-Tfs1p antibodies.

## Acknowledgements

We thank G. Massart, L. Cobret and T. Langlois for their help in the construction of some Tfs1p mutants, L. Jouvansal for the MOLMOL representations, and M. Doudeau for helpful discussions. We thank A. Blomberg and R. Caesar for testing the inhibitory activity of Tfs1 mutants on CPY activity, and J.C. Maurizot for his expertise in the use of the Jasco J-810 CD spectropolarimeter and in the interpretation of the CD spectra. This work was supported by "la Ligue Départementale contre le Cancer, Comité du Loiret" and the Protéomique et Génie des Protéines program of the CNRS. H. Chautard was the recipient of a CNRS/Region Centre fellowship and of a short-term fellowship from the ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer).

## References

- Schoentgen, F. & Jolles, P. (1995). From structure to function: possible biological roles of a new widespread protein family binding hydrophobic ligands and displaying a nucleotide binding site. *FEBS Letters*, **369**, 22–26.
- Serre, L., Vallee, B., Bureaud, N., Schoentgen, F. & Zelwer, C. (1998). Crystal structure of the phosphatidylethanolamine-binding protein from bovine brain: a novel structural class of phospholipid-binding proteins. *Structure*, **6**, 1255–1265.
- Banfield, M. J., Barker, J. J., Perry, A. C. & Brady, R. L. (1998). Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction. *Structure*, **6**, 1245–1254.
- Banfield, M. J. & Brady, R. L. (2000). The structure of Antirrhinum centroradialis protein (CEN) suggests a role as a kinase regulator. *J. Mol. Biol.* **297**, 1159–1170.
- Serre, L., Pereira de Jesus, K., Zelwer, C., Bureaud, N., Schoentgen, F. & Benedetti, H. (2001). Crystal structures of YBHB and YBCL from *Escherichia coli*, two bacterial homologues to a Raf kinase inhibitor protein. *J. Mol. Biol.* **310**, 617–634.
- Simister, P. C., Banfield, M. J. & Brady, R. L. (2002). The crystal structure of PEBP-2, a homologue of the PEBP/RKIP family. *Acta Crystallogr. sect. D*, **58**, 1077–1080.
- Yeung, K., Seitz, T., Li, S., Janosch, P., McFerran, B., Kaiser, C. *et al.* (1999). Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature*, **401**, 173–177.
- Yeung, K. C., Rose, D. W., Dhillon, A. S., Yaros, D., Gustafsson, M., Chatterjee, D. *et al.* (2001). Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol. Cell Biol.* **21**, 7207–7217.
- Lorenz, K., Lohse, M. J. & Quitterer, U. (2003). Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature*, **426**, 574–579.
- Hengst, U., Albrecht, H., Hess, D. & Monard, D. (2001). The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *J. Biol. Chem.* **276**, 535–540.
- Tohdoh, N., Tojo, S., Agui, H. & Ojika, K. (1995). Sequence homology of rat and human HCNP precursor proteins, bovine phosphatidylethanolamine-binding protein and rat 23-kDa protein associated with the opioid-binding protein. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **30**, 381–384.
- Goumon, Y., Angelone, T., Schoentgen, F., Chasserot-Golaz, S., Almas, B., Fukami, M. M. *et al.* (2004). The hippocampal cholinergic neurostimulating peptide, the N-terminal fragment of the secreted phosphatidylethanolamine-binding protein, possesses a new biological activity on cardiac physiology. *J. Biol. Chem.* **279**, 13054–13064.
- Krosiak, T., Koch, T., Kahl, E. & Holtt, V. (2001). Human phosphatidylethanolamine-binding protein facilitates heterotrimeric G protein-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* **276**, 39772–39778.
- Fu, Z., Smith, P. C., Zhang, L., Rubin, M. A., Dunn, R. L., Yao, Z. & Keller, E. T. (2003). Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J. Natl Cancer. Inst.* **95**, 878–889.
- Chatterjee, D., Bai, Y., Wang, Z., Beach, S., Mott, S., Roy, R. *et al.* (2004). RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 17515–17523.
- Bruun, A. W., Svendsen, I., Sorensen, S. O., Kielland-Brandt, M. C. & Winther, J. R. (1998). A high-affinity inhibitor of yeast carboxypeptidase Y is encoded by TFS1 and shows homology to a family of lipid binding proteins. *Biochemistry*, **37**, 3351–3357.
- Mima, J., Hayashida, M., Fujii, T., Narita, Y., Hayashi, R., Ueda, M. & Hata, Y. (2005). Structure of the carboxypeptidase Y inhibitor IC in complex with the cognate proteinase reveals a novel mode of the proteinase-protein inhibitor interaction. *J. Mol. Biol.* **346**, 1323–1334.
- Chautard, H., Jacquet, M., Schoentgen, F., Bureaud, N. & Benedetti, H. (2004). Tfs1p, a member of the PEBP family, inhibits the Ira2p but not the Ira1p Ras GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, **3**, 459–470.
- Fukada, H., Mima, J., Nagayama, M., Kato, M. & Ueda, M. (2007). Biochemical analysis of the yeast proteinase inhibitor (I(C)) homolog I(C)h and its comparison with I(C). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 472–480.
- Caesar, R. & Blomberg, A. (2004). The stress-induced Tfs1p requires NatB-mediated acetylation to inhibit carboxypeptidase Y and to regulate the protein kinase A pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 38532–38543.
- Yeung, K., Janosch, P., McFerran, B., Rose, D. W., Mischak, H., Sedivy, J. M. & Kolch, W. (2000).

- Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol. Cell Biol.* **20**, 3079–3085.
22. Corbit, K. C., Trakul, N., Eves, E. M., Diaz, B., Marshall, M. & Rosner, M. R. (2003). Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 13061–13068.
  23. Jones, D. T., Tress, M., Bryson, K. & Hadley, C. (1999). Successful recognition of protein folds using threading methods biased by sequence similarity and predicted secondary structure. *Proteins: Struct. Funct. Genet. Suppl.* **3**, 104–111.
  24. McGuffin, L. J., Bryson, K. & Jones, D. T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, **16**, 404–405.
  25. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673–4680.
  26. Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292**, 195–202.
  27. Sali, A. & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779–815.
  28. Fiser, A., Do, R. K. & Sali, A. (2000). Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci.* **9**, 1753–1773.
  29. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R. & Thornton, J. M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR*, **8**, 477–486.
  30. Sippl, M. J. (1990). Calculation of conformational ensembles from potentials of mean force. An approach to the knowledge-based prediction of local structures in globular proteins. *J. Mol. Biol.* **213**, 859–883.
  31. Melo, F. & Feytmans, E. (1998). Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *J. Mol. Biol.* **277**, 1141–1152.
  32. Luthy, R., Bowie, J. U. & Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, **356**, 83–85.
  33. Koradi, R., Billeter, M. & Wuthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **14**, 51–55.
  34. Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edit. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  35. Guthrie, C. a. F., G. R. (1991). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Academic Press, New York, NY.
  36. Colicelli, J., Birchmeier, C., Michaeli, T., O'Neill, K., Riggs, M. & Wigler, M. (1989). Isolation and characterization of a mammalian gene encoding a high-affinity cAMP phosphodiesterase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 3599–3603.
  37. Yaffe, M. P. & Schatz, G. (1984). Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **81**, 4819–4823.
  38. Fields, S. & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245–246.
  39. Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J. & Tzagoloff, A. (1986). Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast*, **2**, 163–167.

# *ANNEXE 2*

## **A phenotypic study of *TFS1* mutants differentially altered in the inhibition of Ira2p or CPY**

Aurélie Gombault<sup>1</sup>, Jonas Warringer<sup>2</sup>, Robert Caesar<sup>3</sup>, Fabienne Godin<sup>1</sup>, Béatrice Vallée<sup>1</sup>,  
Michel Doudeau<sup>1</sup>, Anders Blomberg<sup>2\*</sup>, and Hélène Bénédicti<sup>1\*</sup>

1 : Centre de Biophysique Moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, UPR 4301, affiliated to the University of Orléans and to INSERM, rue Charles Sadron, 45071 ORLEANS Cedex 2, France

2 : Department of Cell and Molecular Biology, Lundberg Laboratory, Göteborg University, Medicinaregatan 9c, 413 90 Göteborg, Sweden.

### **\* Corresponding authors:**

*Hélène Bénédicti :*

*Centre de Biophysique Moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, UPR 4301, rue Charles Sadron, 45071 ORLEANS Cedex 2, France.*

Tel: 00 33 2 38 25 55 84

Fax: 00 33 2 38 63 15 17

*E mail:* [benedett@cnrs-orleans.fr](mailto:benedett@cnrs-orleans.fr)

*Anders Blomberg:*

Department of Cell and Molecular Biology, Lundberg Laboratory, Göteborg University,  
Medicinaregatan 9c, 413 90 Göteborg, Sweden.

*Tel:* +46 31 7732589

*Fax:* +46 31 7732599

*E mail:* [anders.blomberg@gmm.gu.se](mailto:anders.blomberg@gmm.gu.se)

Running title: **A phenotypic study of *TFS1* mutants**

## ABSTRACT

The *Saccharomyces cerevisiae* protein Tfs1p independently inhibits the serine protease carboxypeptidase Y (CPY) and Ira2p, a GTPase-activating protein of Ras. The conserved surface cavity of Tfs1p is involved in Ira2p inhibition but not in CPY inhibition. In contrast, the N-terminal acetylation of Tfs1p is required for CPY inhibition but not for Ira2p inhibition. Based on these data, chromosomally integrated *TFS1* mutants which are specifically affected into one of the two inhibitions have been constructed. These mutants have subsequently been used, in a wild-type or *prc1Δ* context, to determine the role of each Tfs1p activity. For this purpose, large scale systematic tests evaluating the rate of growth, the efficiency of growth and the adaptation time were evaluated for each strain in different environmental conditions. The results obtained strongly suggest the existence of a third Tfs1p function which would be affected in both Tfs1p point mutants and which would play a predominant role in the conditions tested. The relative importance of the two inhibitory functions of Tfs1p was also estimated under conditions where Tfs1p was overproduced, thereby mimicking the natural conditions occurring after activation of the general stress response. Our results indicate that the inhibition of Ira2p by Tfs1p is predominant over the inhibition of CPY thereby suggesting that this function might play an important physiological role in the feedback regulation of the general stress response via the activation of the Ras/cAMP/PKA pathway.

## INTRODUCTION

*TFS1* was originally identified as a multicopy suppressor of the *cdc25-1* mutation in *Saccharomyces cerevisiae* (29). Cdc25p is a guanine exchange factor (GEF) which promotes the GDP/GTP exchange reaction on the two Ras proteins of yeast (Ras1p and Ras2p) and thereby activates them. Ras proteins activate the cAMP/PKA pathway which controls metabolism, stress resistance, growth and meiosis (1), (33), (34).

In 1998, Bruun et al. (2) showed that Tfs1p is a specific inhibitor of carboxypeptidase Y (CPY), a vacuolar serine protease. This inhibition was then further characterized by Mima et al. (23), (24), (25) and its precise molecular mechanism was revealed by the 3D-structure determination of the Tfs1p-CPY complex (22). CPY inhibition and *cdc25-1* suppression have been shown to be two independent phenomena (2).

Our group characterized the molecular mechanism of *cdc25-1* suppression and showed that Tfs1p interacts with Ira2p, a GTPase-activating protein (GAP) of Ras (4). By favoring the Ras-GDP form, Ira2p inhibits the Ras proteins and antagonizes Cdc25p function. We demonstrated a straight correlation between the Tfs1p/Ira2p interaction, the *cdc25-1* suppression and the activation of the PKA-pathway, thereby strongly suggesting an inhibitory function of Tfs1p on Ira2p (4).

Therefore Tfs1p appears to be a dual inhibitory protein with two independent functions. This is in accordance with the membership of Tfs1p to the PEBP (phosphatidylethanolamine binding proteins) family. These proteins are present in many organisms such as mammals, plants, worms, *Drosophila*, yeast and bacteria (30), (31), (16) and play multiple roles. For instance, the mammalian PEBP have been shown to be multifunctional with functions as various as: (i) lipid binding (30), (ii) inhibition of serine proteases (15), (iii) being the precursor of a neurostimulatory peptide (HCNP) which is important in the development of hippocampus (35), (iv) inhibition of the Raf-1 kinase and the MAP kinase Raf/MEK/ERK signaling pathway (since this study the protein was called RKIP for Raf kinase inhibitor protein) (40), (v) inhibition of two kinases involved in the NFκB activation pathway (41), (vi) affecting heterotrimeric G protein-dependent signaling by inhibiting GRK-2 (G-protein-coupled receptor kinase 2) (19), (20), (vii) suppressing metastasis in prostate and breast cancer (8), (13), and (viii) stimulating motility in epithelial cells (42).

In this study we investigate the role of each Tfs1p activity. For this purpose, Tfs1p mutants with only one of the two inhibitory activities preserved have been constructed and characterized. We show that, in contrast with CPY inhibition, the N-terminal acetylation of

Tfs1p is not required for Ira2p inhibition while conserved residues at the surface cavity of Tfs1p are necessary for Ira2p inhibition but not CPY inhibition. *TFS1* point mutants affected in only one of the two inhibitions were chromosomally integrated and used to perform a large series of systematic tests evaluating the growth rate, the efficiency of growth and the adaptation time of cells cultivated in fifty one different environmental conditions. The most striking observation was the gain of function phenotypes of each Tfs1p mutant as compared to the *tfs1Δ* strain. In parallel, the same tests were performed on *prc1Δ* cells expressing wild-type or mutant Tfs1p. The phenotypes observed are in favor of the existence of a third Tfs1p function which might be implicated in arsenite sensitivity and growth on arabinose, glycerol, and ethanol. This function, affected in both Tfs1p mutant, is responsible for the most remarkable phenotypes of the TFS1 related strains and seems to play a predominant role in the conditions tested.

When the general stress response is activated, Tfs1p is overproduced and its inhibitory function on Ira2p might play an important role on the extinction of this response after a transient stress via the stimulation of the Ras/cAMP/PKA pathway. In order to test this hypothesis, native Tfs1p and Tfs1p point mutants affected in only one of the two inhibitions (Ira2p and CPY) were overproduced in a *tfs1Δ* strain and subjected to lower scale systematic phenotypic analyses. The results obtained show that in these specific conditions of Tfs1p overproduction, Tfs1p inhibition of Ira2p exhibits a stronger impact on phenotypes than the inhibition of CPY.



## MATERIAL AND METHODS

Strains, media and general methods:

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (*endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) gln V44 thi-1 recA1 gyrA (Nal<sup>r</sup>) relA1 $\Delta$ (lacIZYA-argF) U169 deoR ( $\phi$ 80dlac $\Delta$ (lacZ)M15)) was used for all plasmid amplifications and isolations. The yeast strains used in this study are listed in Table 1. BY4742prc $\Delta$ 1tfs1 $\Delta$  (*prc1 $\Delta$ tfs1 $\Delta$* ), LRB27prc1 $\Delta$ , and LRB27nat3 $\Delta$  were obtained by mating and dissecting BY4741tfs1 $\Delta$  with BY4742prc1 $\Delta$  (*prc1 $\Delta$* ), LRB26 with BY4742prc1 $\Delta$  (*prc1 $\Delta$* ), and LRB26 with BY4742nat3 $\Delta$  (*nat3 $\Delta$* ), respectively. The cultivation of yeast and bacterial strains, DNA manipulations and transformations were performed as described previously (21), (12). The DyAzymeII<sup>TM</sup> DNA polymerase (Finnzyme) or the Expand High Fidelity PCR System (Roche) were used for PCR. Yeast cells were cultured on YPD or on synthetic dropout media lacking the supplements required to maintain plasmids. The carbon source was glucose (2%).*

### **Automated microcultivation for phenotypic profiling**

For high resolution phenotype profiling, strains were cultivated in 350 $\mu$ l cultures (synthetic medium as described above) in a Bioscreen analyzer C (Growth Curve Oy, Helsinki, Finland) as previously described (38). Phenotype profiling was performed in duplicates with 8 wild-types as internal controls for each growth condition.

All inhibitors used for phenotypic enhancement were of highest available grade (Sigma Aldrich). Concentrations were adjusted to give a 15% - 150% reduction in the rate of growth on the wild type. For the large scale phenotypic analysis of the *prc1 $\Delta$* , and *ira2 $\Delta$*  strains, and chromosomally modified TFS1 related strains in a wild-type or *prc1 $\Delta$*  context, the environment conditions tested are indicated in Table 1. For the smaller scale phenotypic analysis of the *tfs1 $\Delta$*  strains overproducing native or mutant Tfs1p, the conditions tested were the following: NaCl 0.85M, 1M; 6-acauracil 200 $\mu$ g/ml, 300 $\mu$ g/ml; Diamide 1.4mM, 1.7mM; DTT 2.1mM; Hydroxyurea 8mg/ml; MnCl<sub>2</sub> 20mM; LiCl 150mM; Ethidium bromide 45 $\mu$ g/ml, 90 $\mu$ g/ml; 1,10 Phenanthroline 2 $\mu$ M; Myriocin 2 $\mu$ g/ml, 3 $\mu$ g/ml; Caffeine 1mg/ml; Paraquat 300 $\mu$ g/ml, 600 $\mu$ g/ml; 2,3 Butandione monoxime 15mM, 25mM; 4-nitroquinolone (4NQO) 0.24 $\mu$ g/ml, 0.34 $\mu$ g/ml; EDTA 22mM, 45mM; and DMSO 3%(v/v).

### **Plasmids and oligonucleotides:**

The N2K site directed mutagenesis in Tfs1p was performed by PCR with overlapping extension using the mutagenic primer pair HB50/HB51 and Yep351T as a template. The external primers were HB3 and HB38. The resulting fragment was digested with *SacI* and *PstI* and inserted into the Yep351 plasmid opened with the same sites.

To construct pEG202TN2K, the gene encoding Tfs1N2K was amplified by PCR using the HB53/HB2 primer pair and Yep351TN2K as a template. After digestion with *NotI* and *XhoI*, the resulting fragment was inserted in-frame downstream of LexA into pEG202 opened with the same sites.

PURT was obtained by cloning into the *KpnI* and *BamHI* sites of pUR a 660-bp PCR fragment corresponding to the region immediately upstream of the *TFS1* gene. This fragment was amplified with the HB27 and HB4 primers which introduced the *KpnI* and *BamHI* sites at its extremities. pRAT contains a 770-bp DNA fragment corresponding to a DNA region localized immediately downstream of the *TFS1* gene. This fragment was amplified using primers HB28 and HB29. After cutting with *XmaI/BamHI*, the resulting fragment was cloned into pRA.

### **Strain construction:**

In order to integrate *TFS1* point mutants at the locus of *TFS1* in BY4742 and *prc1Δ* strains, *TFS1* was first deleted from these strains by ‘split-marker’ recombination using pURT and pRAT (5). In the resulting disrupted strains, *tfs1ΔUra* and *prc1ΔUra*, *TFS1* was replaced by the *URA3* gene. These strains were then transformed by PCR fragments containing each *TFS1* mutant gene with 5’ and 3’ extensions. The PCR fragments were amplified from Yep351TN2K and Yep351TP99L with the oligonucleotides pairs HC3/HB38 (extensions of 280 pb in 5’ and 130 pb in 3’) and HC3/HB4 (extensions of 650 pb in 5’ and 130 pb in 3’), respectively. 5-FOA was used to select the strains with integrated *TFS1* mutations. Three selection levels were performed to obtain successful mutant strains: (i) no growth on SD-Ura medium, (ii) PCR fragments of the expected size after amplification of their genomic DNA with different oligonucleotides surrounding or being located inside the *TFS1* gene, (iii) entire sequencing their *TFS1* gene from PCR fragments amplified from their genomic DNA.

## **CPY activity measurement**

CPY activity was determined essentially as described previously by Caesar and Blomberg (3). Briefly, whole cell protein extracts from a *tfs1Δ* strain transformed with Yep351 carrying various forms of *TFS1* were prepared. A quantitative analysis of Tfs1p and Tfs1p point mutants was performed by western-blot by using actin as an internal standard and anti-Tfs1p and anti-actin antibodies. Different amounts of extract were mixed with a fixed amount of commercially available CPY (Sigma, 21943). CPY activity was determined by measuring hydrolysis of N-(3-{2-furyl}acryloyl)-Phe-Phe (FA-Phe-Phe) (Sigma).

### **Two-hybrid assays:**

We used the LexA-based version of the yeast two-hybrid system originally developed by Fields and Song (7). The components used for these assays (pEG202, pJG4-5, and pGNG plasmids and the EGY48 strain) were obtained from MoBiTec GmbH (Göttingen, Germany) and all assays were carried out as suggested by the manufacturer. In the assays performed, the baits were encoded by: pEG202TN2K and pEG202T. The preys were encoded by pJGIra2TBD and pJG4-5 as a negative control.

## **Protein analysis**

All cell extracts were prepared by a method adapted from Yaffe and Schatz. Cells were grown to an OD<sub>600</sub> of 1 and then centrifuged and resuspended in 500 μl water containing the Complete protease inhibitor cocktail (Roche) and PMSF (1 mM). We then added 150 μl of freshly prepared 2M NaOH and 8% β-mercaptoethanol was added to the cells and after incubating for 10 minutes on ice, TCA (10% final) was added. After further 10-min incubation on ice, samples were centrifuged for 10 min at 10,000g. The pellet was then resuspended in 50 μl of SDS-PAGE sample buffer and boiled for 5 min. Western blots were performed as described previously (36) and were probed with anti-actin ? antibodies (Roche) or anti-Tfs1p rabbit antibodies. Bound antibodies were detected using anti-rabbit or anti-? secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Promega). The presence of these secondary antibodies was revealed using the chemiluminescent substrate SuperSignal West Pico (Pierce) as described by the manufacturer (Promega).

## **Calculation of Growth Variables and Growth Ratios**

Growth rate was calculated as described elsewhere (38). To quantify the growth behaviour of each strain compared to a reference strain, a Logarithmic Coefficient, *LSC*, was calculated. The *LSC* value describes the growth of the mutant in relation to the growth of the wild-type with negative values indicating reduced growth. *LSC* is calculated by subtracting the value of the logarithmic growth variable (e.g. growth rate) of the strain to be characterized from the value of the logarithmic growth variable of wild-type (39).

Logarithmic Phenotypic Indexes, *LPI*, which describes the sensitivity of the strain for a specific inhibitor in relation with the response to this inhibitor in the wild type (thus normalizing for any general growth defect already in basal growth medium), were calculated according to the equation:



Significance was calculated on the LPI level in a two step procedure that resulted in an overall significance level of  $p < 0.001$  i) student t-test ( $p < 0.05$ ) and ii) the LPI level should be at least 0.2 (resistance) or less than 0.2 (sensitivity).

## RESULTS

Mutations affecting the surface cavity of Tfs1p abolish Ira2p inhibition but not CPY inhibition

Point mutants in the TFS1 gene affecting conserved residues (P99L, H111A, R162A and F109V) have been shown earlier to influence the ability of Tfs1p to interact with and inhibit Ira2p (4), (10). All of them are affected in the accessibility or the electrostatic properties of the surface cavity of Tfs1p. The inhibitory activity on CPY was tested for each of these mutants using crude cell extracts of BY4742 *prc1* cells producing or not (Yep351) wild-type (Yep351T) or Tfs1p mutants (Yep351P99L, Yep351TH111A, Yep351TR162A and Yep351TF109V). Strikingly, all four mutants displayed an unaltered inhibitory activity on CPY compared to wild-type (Fig. 1).

Construction of a TFS1 mutant – Tfs1N2K - affected in its ability to inhibit CPY but able to inhibit Ira2p

It has been demonstrated that the N-terminal acetylation of Tfs1p is essential for CPY inhibition (3), (25), (22). Based on the observation that the protein expression profile in a *nat3* strain, unable to acetylate Tfs1p, closely resembled protein expression in strains with low PKA activity we have previously postulated that the N-terminal acetylation is also important for the inhibition of Ira2p (3). To extend our understanding of the importance for this protein modification, we examined the suppressibility of unacetylated Tfs1p on the heat sensitive *cdc25-1* mutation. *Acdc25-1* strain deleted for the *NAT3* gene (which encodes the catalytic subunit of the N-terminal acetyltransferase NatB) was constructed. Since *nat3* can not normally grow at 37°C, we also introduced a point mutant of tropomyosin *tp(m1-5)* which is able to rescue the heat sensitivity of a *nat3* strain by transforming the cells with the pAB2865 plasmid (27).

In this genetic background, TFS1 overexpression suppressed the *cdc25-1* mutation (Fig. 2). The same results were obtained in *cdc25-1* mutant deleted for the *MDM20* gene which encodes the other subunit of the NatB acetyltransferase (data not shown). This indicated that the N-terminal acetylation of Tfs1p was not essential for the inhibition of Ira2p.

In yeast, N-terminal acetylation is catalyzed by different N-terminal acetyltransferases specific for different groups of substrates (28), (32). Tfs1p has previously been shown to be acetylated by the NatB system in order to obtain a TFS1 mutant

affected in CPY inhibition but not in Ira2p inhibition, we mutated the penultimate asparagine residue of Tfs1p, which has been shown to directly participate in CPY interaction and inhibition (22) and to be important for NatB mediated acetylation. Asn2 was mutated into a Lys which does not seem to be recognized by any of the acetyltransferase systems. Two hybrid and coimmunoprecipitation experiments showed that Tfs1N2K interacts with the TBD (Tfs1 Binding Domain) domain of Ira2p (10). Fig.3 shows that the overproduction of Tfs1N2K in a *cdc25-1* mutant suppresses its heat sensitivity. Furthermore, as wild-type Tfs1p, Tfs1N2K overproduction sensitizes *tfs1Δ* cells to heat shock what was not observed for Tfs1P99L. These data suggest that Tfs1p N-terminal acetylation plays no role in Ira2p inhibition. In contrast, the CPY inhibitory activity of Tfs1N2K is almost completely abolished (Fig.1).

Large scale phenotypic analyses of the two types of *TFS1* mutants indicate that Tfs1p might be implicated in a third function

**In order to get insights on the physiological role played by the two Tfs1p mediated inhibitions (Ira2p and CPY), a wide array of environmental conditions were tested for their ability to enhance phenotypic effects in strains where the exclusive Tfs1p form expressed was the wild-type form or one of the two point mutant forms previously described (Tfs1P99L or Tfs1N2K). The environmental conditions comprised: (i) nutritional variations, (ii) metal ion stress variations, (3i) environmental hazards, and (4i) specific inhibitors having an impact on a wide spectrum of cellular features e.g. caffeine and rapamycine (signalling pathways), hydroxyurea (DNA replication), cisplatin and MMS (DNA reparation), paraquat (oxidative stress systems), cycloheximide and paramomycin (translation), DNP (oxidative phosphorylation), etc.. Thirty one different conditions were screened (for the list, see materials and methods) and for many of them, two different concentrations of chemicals were administered, giving in total fifty one environmental conditions. The agents were administered in concentrations resulting in minor effects on growth to avoid pathological effects on cell physiology. Three physiological growth variables: adaptation time, growth rate and growth efficiency were calculated from obtained growth curves. Growth variables were normalized to the behaviour of a reference strain and for this purpose, a Logarithmic coefficient (LSC), was calculated. A negative LSC indicates strain sensitivity while a positive LSC indicates strain resistance.**

Phenotypic profiles of *prc1Δ* and *ira2Δ* strains were generated and compared to those of the TFS1 related strains (*tfs1Δ*, Tfs1P99L, and Tfs1N2K). The most significant differences affected variables measuring the growth rate (Fig. 4A, 4B, 4C). Since Tfs1p inhibits Ira2p and CPY, phenotypes of the *tfs1Δ* strain were expected to exhibit opposite phenotypes to those presented by the *prc1Δ* and *ira2Δ* strains. Fig. 4B shows that this is not the case. Furthermore, the phenotypic profiles corresponding to Tfs1 point mutant strains were strikingly more severe than those corresponding to the *tfs1Δ* strain. We were expecting *tfs1Δ* phenotypes to be the sum of both point mutant phenotypes. Indeed, *tfs1Δ* strain exhibits a reduced growth rate on arabinose and melibiose as both mutants, it is slightly resistant to paramomycin as the Tfs1N2K strain and it is slightly resistant to DNP as the Tfs1P99L strain (Fig. 4B). From these data, it is then tempting to speculate a mixed dependence on the reduced growth rate on arabinose and melibiose from the Ira2p and CPY inhibition or the existence of a third Tfs1p function which would be impaired in both point mutant. Both mutants also exhibit new phenotypes as compared to *tfs1Δ*. Some of these phenotypes are common to both mutants: poor growth rate on ethanol and sensitivity to arsenite. Others are specific to each mutant: sensitivity to CoCl<sub>2</sub> and cycloheximide for Tfs1N2K and poor growth on glycerol for Tfs1P99L (Fig. 4B). These gain of function phenotypes might be explained by a disequilibria between the two inhibitory functions of Tfs1p on Ira2p and CPY being responsible of an enhanced remaining function and giving rise to phenotypes absent from the *tfs1Δ* strain. Along this line, the arsenite, tunicamycin and cycloheximide sensitivities of the Tfs1N2K strain can be compared to those of the *ira2Δ* strain and might reflect an increased ability of Tfs1N2K to inhibit Ira2p because of its possible higher cellular disponibility. On the other hand, the poor growth of the Tfs1P99L strain on glycerol and its enhanced growth problems on arabinose, melibiose and ethanol as compared to Tfs1N2K might be related to its impaired function on Ira2p. Indeed, the mutation might be responsible of a less active Ras/cAMP/PKA pathway and since PKA enhances the activity of several enzymes of the glycolytic pathway, the glycolytic pathway of the Tfs1P99L mutant might be affected. However, since most of these phenotypes are also present in the Tfs1N2K mutant, the reduced activity of the Ras/cAMP/PKA pathway in Tfs1P99L most likely account for an amplification of these phenotypes only.

*prc1Δ* Tfs1N2K and *prc1Δ* Tfs1P99L strains were also generated and compared to the strains previously described. If the only functions of Tfs1p were the inhibition of Ira2p

and CPY, then the phenotype of the *prc1Δ* Tfs1N2K strain should resemble that of the *prc1Δ* strain since the impairment in CPY inhibition cannot affect this strain anymore. This is not what is observed. Indeed, specific phenotypes are exhibited by the *prc1Δ* Tfs1N2K strain as compared to the *prc1Δ* strain: poor growth on arabinose, glycerol, ethanol and sensitivity to arsenite. These phenotypes are also observed for the *prc1Δ*Tfs1P99L strain which is impaired in the Ira2p inhibition. The most probable hypothesis to explain these phenotypes is the existence of a third Tfs1p function which would be impaired in both point mutants. It has to be noted that sensitivity to CoCl<sub>2</sub> and cycloheximide which might reflect a disequilibria between the two inhibitory functions of Tfs1p disappear in the *prc1Δ* context. As expected, the *prc1Δ* Tfs1P99L strain exhibits the same phenotypes as the Tfs1P99L strain with some subtle differences (slight resistance to rapamycin and hydroxyurea) which might be specific of the *prc1Δ* context. It has to be noted that sensitivity to arsenite is stronger for Tfs1N2K than for Tfs1P99L and absent for *tfs1Δ*. This sensitivity, which might be linked to the third function of Tfs1p, would be lowered by the inability of Tfs1P99L and *tfs1Δ* to inhibit Ira2p.

The most remarkable phenotypes of the TFS1 related strains are a lower growth rate and efficiency of growth on arabinose and melibiose but also on ethanol and glycerol and in the presence of arsenite depending on the genetic background. These phenotypes are most probably related to a third Tfs1p function which then seems predominant among the conditions tested. The inhibitory function on CPY might be responsible for the slight resistance to paramomycin and sensitivity to CoCl<sub>2</sub>, while the inhibitory function on Ira2p might be responsible for the slight sensitivity to DNP and slight resistance to rapamycin and hydroxyurea in a *prc1Δ* context.

In order to get insights on the third function of Tfs1p, we questioned the bioPIXIE system which is a general probabilistic system which integrates diverse genomic data to propose and visualize process-specific networks (26). The idea was that this system would be able to predict novel components constituting Tfs1p-associated networks.

Fig.5 presents the bioPIXIE output corresponding to Tfs1p query. As expected, Tfs1p is functionally linked to the cAMP/PKA pathway via its direct interaction with Ira2p (4) and its phenotypic suppression of *cdc25-1* mutations (29). Tfs1p is also functionally linked to the vacuolar catabolism since it is a specific inhibitor of CPY (Prc1p). This is the reason why other vacuolar proteases such as Prb1p, Pai3p, Lap4p, and Ybr139Wp



appear in the Tfs1p-associated networks. Tfs1p also appeared functionally linked to unexpected proteins involved in alcohol catabolism (Yjr096Wp, Gcy1p, Gre3p, Sol4p), carbohydrate catabolism (Yjr096Wp, Gcy1p, Gre3p, Ara1p), glutamate catabolism and oxidative stress resistance (Gad1, Grx1p, Uga2p). We don't know the molecular function linking Tfs1p to this new network of proteins. However, it is clear that this latter is related to the phenotypes of lower growth rate and efficiency on melibiose, arabinose, glycerol and ethanol which argue in favour of a third Tfs1p function.

#### Hierarchical clustering of *TFS1* mutant strains

To provide a more easily digestible overview of the data, hierarchical clustering was performed on the basis of all available growth data (Fig.6A and 6B). To allow an easier visualisation and dissection of the data, the phenotypic categories (lag, rate, efficiency) are displayed separately (Fig.6B).

It appears that the most similar phenotypes are shared by Tfs1P99L and *prc1Δ* Tfs1N2K strains. Indeed, the putative third function of Tfs1p is impaired in both mutant, furthermore, the inability of Tfs1P99L to inhibit Ira2p might enhance the inhibitory function of the protein on CPY and might confer to the strain phenotypes similar to the *prc1Δ* strain. This similarity between Tfs1P99L and *prc1Δ* Tfs1N2K phenotypes indicates that the default of Ira2p inhibition which is specific to Tfs1P99L might induce only subtle phenotypic changes in the conditions tested.

The phenotypes of the *prc1Δ* Tfs1P99L strain are also close to those of the two latter strains (Tfs1P99L and *prc1Δ* Tfs1N2K) indicating that phenotypes linked to *PRC1* disruption are not responsible of drastic changes.

Surprisingly, the Tfs1N2K strain appeared to be the more distant of the TFS1 related strains. The only difference between Tfs1N2K and Tfs1P99L, *prc1Δ* Tfs1N2K, and *prc1Δ* Tfs1P99L is the default in CPY inhibition. Therefore, such a default might induce important changes in phenotypes. Another difference possibly accounting for the gain of function phenotypes of Tfs1N2K strain as compared to the *tfs1Δ* strain is the disequilibria between the two inhibitory functions of Tfs1p on Ira2p and CPY which might enhance the inhibitory activity on Ira2p. This latter hypothesis is confirmed by the similar phenotypes of Tfs1N2K and *ira2Δ* in regard to the lag time in the presence of

**mannose, CuCl<sub>2</sub>, t-butyl, and cycloheximide (low concentration), and to the growth efficiency in the presence of caffeine (low concentration), NiCl<sub>2</sub> and CoCl<sub>2</sub> (Fig. 6B).**

When Tfs1p is overproduced, its inhibition of Ira2p is predominant over its inhibition of CPY

Many studies have shown that Tfs1p is overproduced when the cells are subjected to stresses (9), (18), (6), (14). In fact, Tfs1p is overproduced when the general stress response, mediated by the two transcription factors Msn2p and Msn4p, is activated. Indeed, *TFS1* promoter harbours two STRE boxes which are recognized by Msn2p and Msn4p. By its inhibitory action on Ira2p, Tfs1p stimulates the cAMP/PKA pathway and PKA activity. Hence, PKA is involved in extinction of Msn2p/Msn4p mediated stress response. Indeed, PKA has been shown to directly phosphorylate the NLS of Msn2p thereby blocking its translocation into the nucleus and its role as a transcription factor (11). Therefore, Tfs1p appears as a potential candidate to link the Msn2p/Msn4p mediated stress response pathway to the cAMP-PKA pathway and to participate to the extinction of the general stress response. According to this hypothesis, the overexpression of Tfs1p would be important for this function to be played.

The large scale phenotypic analyses of the two types of *TFS1* mutants we have described above have been performed without any Tfs1p overproduction. Therefore, the phenotypic consequences of Tfs1p-induced Ira2p inhibition might be underestimated. For this reason, we performed another set of phenotypic analyses on strains overproducing wild-type or mutated Tfs1p. These experiments were not dedicated to be compared to the previous analyses and were just performed to compare the variation of phenotypes when wild-type or mutant Tfs1p were overproduced. Consequently, the array of environmental conditions tested was less wide than previously and comprised only environmental hazards and specific inhibitors having an impact on a wide spectrum of cellular features.

A total of sixteen different chemicals were screened (for the list of chemicals see materials and methods) and many of them were administered at two different concentrations giving in total 25 environmental conditions. As previously, chemicals were administered in concentrations resulting in minor effects on growth to avoid pathological effects on cell physiology. The same physiological growth variables: adaptation time, growth rate and growth efficiency were calculated from obtained growth curves and logarithmic phenotypic index (LPI) were measured. We first filtered out conditions where the overexpression of the wild-type *TFS1* resulted in a significant phenotype compared to the *tfs1* strain ( $p < 0.001$ ).

Overexpression of the wild-type form of *TFS1* drastically slowed down the growth rate in phenantroline (Fig. 7). This *TFS1*-dependent increase in phenantroline sensitivity was mimicked by the strain overproducing the Tfs1N2K mutant (the form with only inhibition of Ira2p), while overproduction of Tfs1R162A (only inhibition of CPY) did not result in any change in growth behaviour (similar effect as in the *tfs1* strain). This indicates that the *TFS1*-dependent phenantroline response is more or less solely a consequence of the inhibition of Ira2p. Overexpression of the wild-type form of Tfs1p also induced a strong phenotype which corresponded to a shorter adaptation time in the presence of EGTA. This effect also appeared to be solely dependent on altered activity of the PKA pathway (via Ira2p inhibition). However, for the significant phenotypic effects in the presence of DMSO and NQO, the PKA-dependence was less pronounced, which we interpret as a mixed dependence on the phenotype from both the Ira2-pathway and the CPY-pathway or a dependence on the third Tfs1p function which is affected in both point mutant.

We next integrated the phenotypic responses obtained on all tested chemicals to take all recorded growth effects into account, even the ones that did not pass our initial significance threshold. We did so by creating a variance index (Table 4) which represents the overall phenotypic difference in the overexpression response by comparing the mutated Tfs1 forms to the wild type form. This procedure is justified by the high precision in our measurements with correlation coefficients in the range 2- 10%. We found that Tfs1p inhibition of Ira2p appeared generally to be more important than Tfs1p inhibition of CPY in determining the phenotypic consequences. This was evident since the phenotypic effects caused by overproduction of Tfs1N2K (only inhibiting Ira2p) and those caused by overproduction of wild type Tfs1p were generally quite similar as indicated by a generally low variance index (Table 4). In contrast, the phenotypic effects caused by overproduction of Tfs1R162A (only inhibiting CPY) differed consistently from those caused by overproduction of wild-type Tfs1p. This tendency was seen for all three growth variables, (growth rate, efficiency of growth and adaptation time; data not shown). The greater phenotypic importance of Tfs1R162A compared to Tfs1N2K was also persistent in the wild-type strain and it can be seen that the phenotypic variance index was about 2 – 4 fold greater for Tfs1R162A in either the *tfs1* or the wild-type strain background.

In addition, overexpression of the different Tfs1p variants in the *prc1* or *ira2* strains was revealing; in these genetic backgrounds the corresponding down-stream targets for Tfs1p inhibitions are absent. Overexpression in the *prc1* strain (where we only study the impact on Ira2p inhibition) resulted in that the R162A form exhibited an almost 10-fold

higher phenotypic variance index compared to the N2K form. On the other hand, overexpression in the *ira2* background (where we only study the impact on CPY inhibition) revealed that the phenotypic consequence was rather similar for the two Tfs1p forms (the ratio of the variance index was 0.7). Thus, we conclude that in the 25 environmental conditions tested so far and when Tfs1p is overproduced, the Ira2p inhibition by Tfs1p seems to be of substantially greater general physiological importance. This observation might be relevant to the physiological role played by Tfs1p on the feedback regulation of the general stress response after it has been overproduced due to activation of this same response.

## DISCUSSION

In 1998, Bruun et al. (2) showed that Tfs1p is a CPY inhibitor. Our group has reported that Tfs1p also interacts with and inhibits Ira2p (4) explaining the dose-dependent suppression of the *cdc25-1* mutation which originally allowed the identification of the *TFS1* gene (29). Bruun et al. also showed that a *PRC1* deletion does not suppress the *cdc25-1* mutation, thereby demonstrating that CPY inhibition and *cdc25-1* suppression are two independent functions of Tfs1p. We confirmed these data by showing that *TFS1* overexpression still suppressed the *cdc25-1* mutation in a *prc1* context (data not shown). It is therefore clear that Tfs1p acts independently on its two targets CPY and Ira2p.

Tfs1p has been shown to stimulate the PKA-pathway by sensitizing the cells to heat and oxidative stress (4). This inhibition is also consistent with the suppression of the *cdc25-1* mutation. In contrast, the phenotypic consequences of the CPY inhibition are unknown. Cytoplasmic inhibitors of lysosomal and vacuolar proteases are widespread in nature but their physiological role remains unclear (37).

Tfs1p point mutants specifically affected in the inhibition of one of the two targets were constructed and a systematic study of their phenotypes was undertaken to decipher the effect caused by CPY inhibition and Ira2p inhibition, respectively.

For each mutant studied, the inhibitory activities on CPY and Ira2p were first evaluated. The inhibitory activity on CPY can be clearly and easily measured by an enzymatic test. In contrast, such a test has not yet been developed to assay the inhibitory activity on Ira2p. However, different criteria can be taken into account to estimate the inhibitory activity of the mutants on Ira2p: (i) their ability to physically interact with Ira2p, (ii) their ability to suppress the *cdc25-1* mutation, (iii) their ability to induce a stress sensitive phenotype. All these characteristics have been demonstrated to be directly related (4), (10) and constitute indirect data in favour of Ira2p inhibition.

Point mutants affected in the properties of the Tfs1p surface cavity have previously been shown to be affected in the Ira2p inhibition (4). Indeed, these mutants are unable to interact with the TBD domain of Ira2p and their overproduction does not suppress the *cdc25-1* mutation (10), (4). Furthermore, strains overproducing these mutants did not induce heat shock hypersensitivity like strains overproducing wild-type Tfs1p. Instead they caused a slight, but reproducible, heat shock resistance (data not shown, Fig.3B) . In contrast, we show that their inhibitory activity on CPY was intact. This is in accordance with the 3D-structure of the Tfs1p-CPY complex which shows that the surface cavity of Tfs1p is located at the opposite of the region in contact with CPY (22).

Tfs1p is acetylated on its N-terminal methionine by the NatB system (3) and this modification has been shown to be required for CPY inhibition (3), (25). The 3D-structure of the Tfs1p-CPY complex explains at the molecular level such a requirement showing the direct interaction of the acetylated methionine with the active site of CPY in a non-substrate-like manner (22). Previous experiments suggested that Tfs1p acetylation was most likely not required for its interaction with the TBD domain of Ira2p since the interaction takes place in the two hybrid system and with an N-terminal 6 Histidine tagged Tfs1p purified from *E. coli* (4). Using the *cdc25-1* suppression test, we showed that the N-terminal acetylation is absolutely not required for Ira2p inhibition by Tfs1p. This suppression test is, however, only qualitative and does not exclude that Tfs1p acetylation is not required for an optimal Ira2p inhibition. This could explain why *nat3Δ* cells exhibited a low PKA-pathway protein profile even if Tfs1p acetylation is not essential for Ira2p inhibition (3). It is, of course, also possible that low PKA activity in *nat3* results from the loss of some other functionally important NatB mediated N-terminal acetylation.

To design a Tfs1p mutant able to inhibit Ira2p but unable to inhibit CPY, the Asn2 residue was mutated into a Lys. As expected, this mutant interacted with Ira2p, suppressed the *cdc25-1* mutation, and induced heat-shock sensitivity (Fig. 3B) but was unable to inhibit CPY.

Large scale phenotypic analyses were performed on the *tfs1Δ* strain and the two types of *TFS1* mutants (Tfs1N2K and Tfs1P99L) for fifty one environmental conditions. Phenotypic defects were screened for at three different levels: rate of growth, efficiency of growth, and adaptation time. *tfs1Δ* phenotypes were expected to be the sum of both point mutant phenotypes. However, the most striking observation was the differences between the strong and diverse phenotypes associated to the point mutants as compared to the faint ones

associated to the disruption mutant. Such a difference might be explained by a disequilibria between the two inhibitory functions of Tfs1p on Ira2p and CPY in the point mutants, resulting in an enhancement of the remaining function and the emergence of new phenotypes.

Large scale phenotypic analyses were also performed on the *prc1Δ* strain harbouring or not the two *TFS1* point mutations. The phenotypes of the *prc1ΔTfs1N2K* mutant were expected to be the same as the *prc1Δ* strain. However, they were different, strongly suggesting the existence of a third Tfs1p function which would be involved in arsenite resistance and growth on arabinose, glycerol, and ethanol. The bioPIXIE prediction of the Tfs1p-associated networks is in favour of this new function affecting growth on arabinose, glycerol and ethanol because Tfs1p is predicted to be functionally linked to proteins involved in alcohol and carbohydrate catabolism. This third Tfs1p function would be affected by both point mutation and a defect in this function would be responsible for the most remarkable phenotypes of the *TFS1* related strains while defects in the inhibition of Ira2p and CPY would only be responsible of discrete phenotypes.

What could be the physiological significance and accordance of the different functions of Tfs1p? One possibility is that Tfs1p does not play its three roles at the same time but might exert each one in specific conditions. Large scale phenotypic analysis have been performed in conditions where the inhibitions of Ira2p and CPY don't seem to play fundamental roles in contrast to Tfs1p third function which seems predominant.

There are specific cell growth conditions where Tfs1p is overproduced: at the diauxic shift or after different kind of stress, all being conditions resulting in the activation of the general stress response. By its inhibitory action on Ira2p, Tfs1p stimulates the cAMP/PKA pathway and PKA activity which are known to be involved in the extinction of the general stress response. Therefore, Tfs1p overproduction and inhibitory function on Ira2p might be important in the extinction of the general stress response. In order to have an idea of the importance of this function of Tfs1p and to compare it to the inhibition of CPY, we have performed another set of phenotypic analysis in conditions where Tfs1p was overproduced. Phenotypes associated with the overproduction of the two *Tfs1N2K* and *Tfs1R162A* mutants were systematically tested and compared to those induced by the overproduction of wild-type Tfs1p in a *tfs1Δ* strain. Less environmental conditions were tested than previously and no comparisons could be made with the large scale phenotypic analyses performed in the absence of Tfs1p overproduction.

Conditions responsible for the most significant phenotypes related to Tfs1p overproduction were filtered out and examined carefully. The phenotypes observed can be classified into two types i) those for which the Tfs1N2K mutant behaves as wild-type Tfs1p and Tfs1R162A as a null mutant, and ii) those for which Tfs1N2K behaves as a null mutant but Tfs1R162A induces a phenotype opposite to the wild-type Tfs1p. In the first set of conditions, it is clear that the Ira2p inhibitory function of Tfs1p is preponderant. In the other conditions, the observed phenotypes might be interpreted as a mixed dependence of the two inhibitions or a dependence of the third Tfs1p function. The relative importance of the two inhibitory functions of Tfs1p was assessed by making a “sum-presentation” by constructing a variance index of all the phenotypic data obtained. The results show that the growth behaviour of Tfs1N2K resembles wild-type Tfs1p more closely than the growth behaviour of Tfs1P99L does. This is particularly clear for the adaptation time (data not shown). This suggests that in conditions where Tfs1p is overproduced, its role in the inhibition of Ira2p is predominant over its role in the inhibition of CPY. Tfs1p is overproduced when the general stress response is induced. An attracting hypothesis is that the inhibition of Ira2p by Tfs1p plays an important role in stress conditions. This role might be the feedback inhibition of the stress response via the activation of the Ras/cAMP/PKA pathway and the inhibition of the Msn2p/Msn4p general stress response-specific transcription factors.

Conditions prevailing to a predominant role of the CPY inhibition have to be identified. They might correspond to the stationary phase since in these conditions, Mima et al. have shown a relocalization of Tfs1p to the vacuolar membrane and lumen. Another hypothesis linking the two inhibitory functions of Tfs1p is a model where mislocalized cytoplasmic CPY is inhibited by Tfs1p after severe stress thereby preventing the potentially deleterious effect caused by CPY. The trapping of Tfs1p in a Tfs1p-CPY complex will initially prevent Tfs1p to inhibit Ira2p and the stress response will persist. When all CPY would have been complexed with overproduced Tfs1p, free Tfs1p will be able to bind to Ira2p and down-regulate the stress response. Our efforts are now aimed at characterizing the third Tfs1p function and understanding the coordination of its different functions.

## **Acknowledgments**

This work was supported by “la Ligue Départementale contre le Cancer, Comité du Loiret”, the «Protéomique et Génie des Protéines» program of the CNRS, and the foundation of strategic research (SSF). A. Gombault was the recipient of a MENRT fellowship.

We are very grateful to L. Robinson for the LRB27 strain and B. Polevoda and F. Sherman for the pAB2865 plasmid. We also thank H. Chautard who initiated this work.



## FIGURE LEGENDS

Figure 1:

A/ Quantitative analysis of Tfs1p point mutants **Various amount of whole cell protein extracts from *prc1Δtfs1Δ* transformed with Yep351, Yep351T (filled diamonds), Yep351TH111A (filled squares), Yep351TR162A (filled triangles), Yep351TP99L (open squares), Yep351TF109V (open triangles) or Yep351TN2K (open squares) were prepared and mixed with a fixed amount of purified CPY. CPY activity on FA-Phe-Phe was determined. The activity measured was plotted as a function of the amount of protein extract. Protein extracts were of equal concentrations.**

B/ CPY inhibitory activity of Tfs1p mutants

The same amount of exponentially growing *prc1Δtfs1Δ* cells transformed with Yep351T, Yep351TN2K, Yep351TP99L or Yep351TF109V, Yep351TH111A, Yep351TR162A was lysed and the obtained cell extracts were analyzed by western-blot using anti-Tfs1 and anti-actin antibodies (actin was used as a reference). Molecular weight markers are indicated on the right.

Figure 2: Suppression of the *cdc25-1* mutation in a *nat3 tpm1-5* context

**An LRB27Δ*nat3* strain was co-transformed with the pAB2865 plasmid encoding the *tpm1-5* allele and the Yep351T plasmid (or the Yep351 plasmid as a negative control). Transformed cells were streaked out for single colonies and grown at 25°C or at the restrictive temperature of 37°C on YPD medium.**

Figure 3: Tfs1N2K inhibits Ira2p

A/ Tfs1N2K suppresses the *cdc25-1* mutation

**LRB27 cells were transformed with Yep351 (as a negative control), Yep351T (positive control), and Yep351TN2K. Cells were streaked out for single colonies and grown at 25°C or at the restrictive temperature of 37°C on YPD medium.**

B/ Survival after heat shock of *tfs1Δ* cells transformed with different plasmids

*tfs1Δ* cells transformed with Yep351, Yep351T, Yep351TN2K, and Yep351TP99L were grown to saturation, incubated at 37°C for 45 min and then at 52°C for 25 min. They were then cooled down and 10-fold serial dilutions were plated on YPD to compare survival.

Figure 4: Phenotypic profiles of TFS1 related strains

**Profiles are based on LSC values (n=2). Standard deviations are displayed. Dotted line indicate LSC in normal conditions. A negative LSC indicates strain sensitivity, a positive LSC indicates strain resistance.**

A/ Lag Phase

B/ Growth rate

C/ Growth efficiency

Figure 5: BioPIXIE output for *TFS1*

**Nodes represent genes and edges represent functional links between them. The gene entered as input is in grey (*TFS1*). Red nodes indicate uncharacterised genes. Edge color indicates the confidence of the links ordered by color from red (highest confidence), to green (lower confidence).**

Figure 6: Hierarchical clustering (weighted according to variance, uncentered clustering, pearson correlation coefficient, average linkage) of LSC data

A/ Hierarchical clustering tree

B/ clustergram of lag, rate, and efficiency phenotypes

**Green: sensitivity as compared to BY4742, red: resistance as compared to BY4742.**

Figure 7: Conditions where overexpression of wild-type TFS1 strongly influences the phenotype

**BY4742ΔT strain transformed with Yep351, Yep351T, Yep351TN2K, or Yep351TP99L were cultivated in thirty-six environmental conditions. Logarithmic Phenotypic Indexes**

(LPI) were calculated for growth rate, adaptation time and growth efficiency. Environments where the expression level of wild-type *TFS1* exhibited a strong impact (LPI>0.2 and p<0.05) on growth were filtered out and are displayed in the figure. Samples were analysed in duplicates.

Table 1: Environmental conditions applied in the large scale phenotypic analysis

Stress	Stress level	Cellular effect
KCl	2, 1.45 M	Potassium ion toxicity, chloride ion toxicity
NaCl	1.25, 0.65 M	Sodium ion toxicity, chloride ion toxicity
LiCl	0.225, 0.15 M	Lithium ion toxicity
CdCl <sub>2</sub>	0.15, 0.1 mM	Cadmium ion toxicity
CuCl <sub>2</sub>	0.75, 0.375 mM	Copper ion toxicity
NiCl <sub>2</sub>	0.75, 0.375 mM	Nickel ion toxicity
NaAsO <sub>2</sub>	5, 3.5 mM	Arsenite toxicity
CoCl <sub>2</sub>	0.015, 0.01 mM	Cobalt ion toxicity
Ethanol stress	10, 7, 5%	Ethanol stress
Acidic pH <sup>1</sup>	pH 2, 3.5	Acidic pH stress
Superoxide/paraquat	400, 250 µg/ml	Oxidative stress caused by generation of superoxide
Galactose <sup>2</sup>	2 %	Galactose as carbon source
Mannose <sup>2</sup>	2 %	Mannose as carbon source
Fructose <sup>2</sup>	2 %	Fructose as carbon source
Sucrose <sup>2</sup>	2 %	Sucrose as carbon source
Raffinose <sup>2</sup>	2 %	Raffinose as carbon source
Melibiose <sup>2</sup>	2 %	Melibiose as carbon source
Arabinose <sup>2</sup>	2 %	Arabinose as carbon source
Ethanol growth <sup>2</sup>	2 %	Ethanol as carbon source
Glycerol growth <sup>2</sup>	2 %	Glycerol as carbon source
Low glucose <sup>2</sup>	0.5 %	Low glucose concentrations
High glucose <sup>2</sup>	16 %	High glucose concentrations
MMS	0.01, 0.005 %	DNA methylation
Hydroxyurea	15, 10 mg/ml	Inhibition of ribonucleotide reductase <i>RNR4</i>
Cisplatin	0.15, 0.1 mg/ml	DNA crosslinking
Caffeine	2.25, 1.5 mg/ml	Inhibition of cAMP phosphodiesterase <i>PDE1/2</i>
Tunicamycin	1.5, 1 µg/ml	Inhibition of glycosylation <i>ALG7</i>
Rapamycin	1, 0.5 µg/ml	Inhibition of <i>TOR1/2</i>
Cykloheximide	0.1, 0.05 µg/ml	Translational inhibition
Paramomycin	15, 10 µg/ml	Translational inhibition
2, 4 Dinitrophenol (DNP)	0.2 mg/ml	Uncouples oxidative phosphorylation

Table 2: Yeast strains used in this study

<i>Strain</i>	<i>Genotype</i>	<i>Source</i>
BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3 1, leu2 0, lys 0, ura3 0</i>	EUROSCARF
<i>tfs1</i> $\Delta$ URA	BY4742, <i>tfs1::URA3</i>	This study
<i>tfs1</i>	BY4742, <i>tfs1::kanMX4</i>	(4)
<i>prc1</i>	BY4742, <i>prc1::kanMX4</i>	EUROSCARF
<i>prc1 tfs1</i>	BY4742, <i>prc1::kanMX4, tfs1::kaMX4n</i>	This study
<i>ira2</i>	BY4742, <i>ira2::kanMX4</i>	EUROSCARF
BYTfs1P99L	BY4742, <i>tfs1P99L</i>	This study
BYTfs1N2K	BY4742, <i>tfs1N2K</i>	This study
LRB26	<i>MAT<math>\alpha</math>, his4, leu2, ura3, cdc25-1</i>	L. Robinson
LRB27	<i>MAT<math>\alpha</math>, his4, leu2, ura3, cdc25-1</i>	L. Robinson
LRB27 nat3	LRB27, <i>nat3::kanMX4</i>	This study
LRB27 prc1	LRB27, <i>prc1::kanMX4</i>	This study
<i>prc1 tfs1</i> $\Delta$ URA	BY4742, <i>prc1::kanMX4, tfs1::URA3</i>	This study
<i>prc1</i> Tfs1P99L	<i>prc1 , tfs1P99L</i>	This study
<i>prc1</i> Tfs1N2K	<i>prc1 , tfs1N2K</i>	This study
EGY48	<i>MAT<math>\alpha</math>, trp1, his3, ura3, leu2:: 6 LexAop-LEU2</i>	MoBiTec
BY4741	<i>MAT<math>\alpha</math> his3 1, leu2 0, met15 0, ura3 0,</i>	EUROSCARF
BY4741 T	BY4741, <i>tfs1 ::kanMX4</i>	EUROSCARF

**Table 3: Plasmids used in this study**

<i>Plasmids</i>	<i>Description</i>	<i>Source/reference</i>
Yep351	2 $\mu$ , <i>LEU2</i>	(17)
Yep351T	Yep351, <i>TFS1</i>	(10)
Yep351TP99L	Yep351, <i>TFS1</i> (P99L)	(10)
Yep351TH111A	Yep351, <i>TFS1</i> (H111A)	(10)
Yep351TR162A	Yep351, <i>TFS1</i> (R162A)	(10)
Yep351TF109V	Yep351, <i>TFS1</i> (F109V)	(10)
Yep351TN2K	Yep351, <i>TFS1</i> (N2K)	See text
pESC TBD	2 $\mu$ , <i>URA3</i>	(10)
pEG202	2 $\mu$ , <i>HIS3</i> , <i>LexA</i> DBD, NLS	MoBiTec
pEG202T	pEG202, <i>TFS1</i>	(4)
pEG202TN2K	pEG202, <i>TFS1</i> (N2K)	See text
pJG4-5	2 $\mu$ , <i>TRP1</i> , transcriptional AD	MoBiTec
pJGIra2TBD	pJG4-5, <i>IRA2</i> TBD	(4)
pGNG	2 $\mu$ , <i>URA3</i> , <i>LexAop-GFP</i>	MoBiTec
pUR	<b>URA3'</b>	(5)
pRA	<b>'URA3</b>	(5)
pURT	pUR, <i>TFS1'</i>	See text
pRAT	pRA, <i>'TFS1</i>	See text
pAB2865	CEN, <i>TPM1-5</i> , <i>URA3</i>	(27)

Table 4: Oligonucleotides used in this study

Name	Sequence 5' – 3'
HB2	ACTCGAGGATCCTTATTTTCGTTTCCGCATAGAAGAA
HB3	GCAGAGCTCGAGTTGAATCCGAAGTTA
HB4	ACTGCAGACTGACCCGGACGCGCCC
HB27	CTGGTACCGTCTATTGCTTGGTTCAT
HB28	ACCCGGGGAGTTGAATCCGAAGTTA
HB29	CGGATCCGAAACGAAATAGGTATAT
HB38	CCCTGCAGGGTGCAGCAACCGGCTCGTATAG
HB50	TGCTTGTGCGAAGTCTATTGCTTGCTTCATGTTTTTTGCGTTTTTCTCTTGTTT
HB51	GAACAAGAGAACAAGCAAAAAACATGAAGCAAGCAATAGACTTCGCACA- -AGCA
HB53	TAGCGGCCGCCCATGAAGCAAGCAATAGACTTCG
<b>HC3</b>	<b>GACATTACTCCCTACAAAC</b>

Table 5: Phenotypic similarities of the mutant forms to the wild-type TFS1 form when including all tested conditions.

The difference in growth phenotypes, indicated as a variance index, between strains overexpressing wild-type Tfs1p and strains overexpressing either the R162A form of Tfs1p (unable to inhibit Ira2p), or the N2K form of Tfs1p (unable to inhibit CPY). The overall difference in phenotypes when including all growth conditions were calculated as a phenotypic variance index which is the average over all conditions of the variance in each conditions between the wild type and one of the mutant TFS1 forms. A mean value of the variance for all conditions was first calculated for each strain background and for each growth parameter, which was finally combined to an average over all three growth variables. Variances were calculated on logarithmic growth variables. High values indicate large differences in phenotype effect between the mutant form and the wild-type form. The ratio between the variance indexes are also displayed – R162A/N2K.

Strain background	Phenotypic variance index		Index ratio
	TFS1 vs R162A	TFS1 vs N2K	R162A/N2K
WT	0.0093	0.0022	4.2
tfs1 $\Delta$	0.0100	0.0043	2.3
prc1 $\Delta$	0.0128	0.0014	9.4
ira2 $\Delta$	0.0037	0.0054	0.7

## References

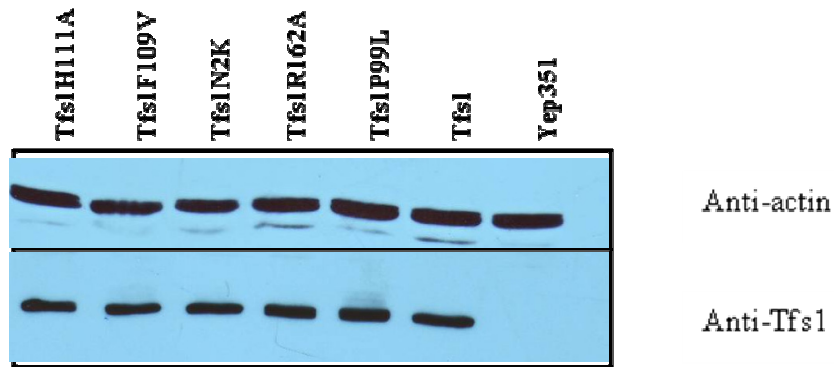
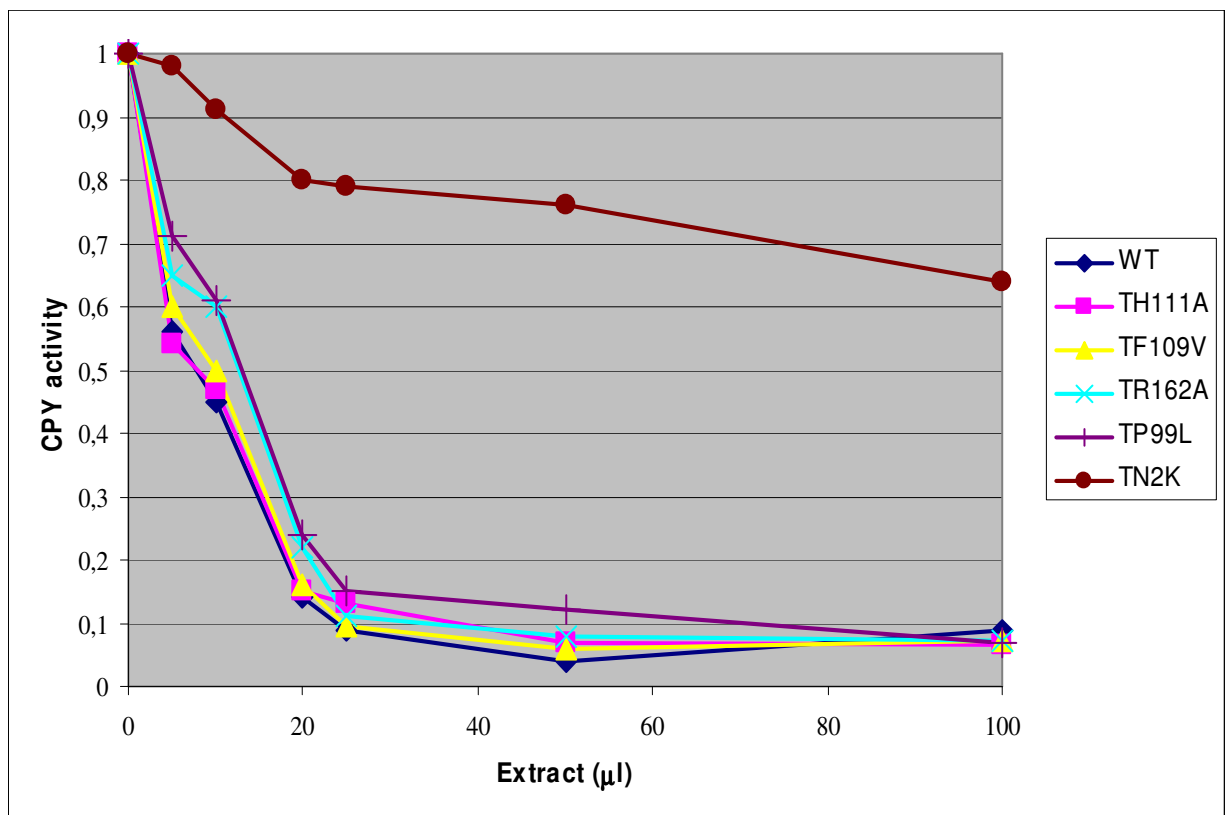
1. **Broach, J. R.** 1991. Ras-regulated signaling processes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Genet Dev* **1**:370-377.
2. **Bruun, A. W., I. Svendsen, S. O. Sorensen, M. C. Kielland-Brandt, and J. R. Winther.** 1998. A high-affinity inhibitor of yeast carboxypeptidase Y is encoded by TFS1 and shows homology to a family of lipid binding proteins. *Biochemistry* **37**:3351-3357.
3. **Caesar, R., and A. Blomberg.** 2004. The stress-induced Tfs1p requires NatB-mediated acetylation to inhibit carboxypeptidase Y and to regulate the protein kinase A pathway. *J Biol Chem* **279**:38532-38543.
4. **Chautard, H., M. Jacquet, F. Schoentgen, N. Bureaud, and H. Benedetti.** 2004. Tfs1p, a member of the PEBP family, inhibits the Ira2p but not the Ira1p Ras GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **3**:459-470.
5. **Fairhead, C., B. Llorente, F. Denis, M. Soler, and B. Dujon.** 1996. New vectors for combinatorial deletions in yeast chromosomes and for gap-repair cloning using 'split-marker' recombination. *Yeast* **12**:1439-1457.
6. **Fauchon, M., G. Lagniel, J. C. Aude, L. Lombardia, P. Soularue, C. Petat, G. Marguerie, A. Sentenac, M. Werner, and J. Labarre.** 2002. Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol Cell* **9**:713-723.
7. **Fields, S., and O. Song.** 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**:245-246.
8. **Fu, Z., P. C. Smith, L. Zhang, M. A. Rubin, R. L. Dunn, Z. Yao, and E. T. Keller.** 2003. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* **95**:878-889.
9. **Gasch, A. P., P. T. Spellman, C. M. Kao, O. Carmel-Harel, M. B. Eisen, G. Storz, D. Botstein, and P. O. Brown.** 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**:4241-4257.
10. **Gombault, A., F. Godin, D. Sy, B. Legrand, H. Chautard, B. Vallee, F. Vovelle, and H. Benedetti.** 2007. Molecular basis of the Tfs1/Ira2 interaction: a combined protein engineering and molecular modelling study. *J Mol Biol* **374**:604-617.
11. **Gorner, W., E. Durchschlag, J. Wolf, E. L. Brown, G. Ammerer, H. Ruis, and C. Schuller.** 2002. Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J* **21**:135-144.
12. **Guthrie, C. a. F., G.R.** 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. Academic Press, New York, N.Y.
13. **Hagan, S., F. Al-Mulla, E. Mallon, K. Oien, R. Ferrier, B. Gusterson, J. J. Garcia, and W. Kolch.** 2005. Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* **11**:7392-7397.
14. **Hasan, R., C. Leroy, A. D. Isnard, J. Labarre, E. Boy-Marcotte, and M. B. Toledano.** 2002. The control of the yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol* **45**:233-241.
15. **Hengst, U., H. Albrecht, D. Hess, and D. Monard.** 2001. The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *J Biol Chem* **276**:535-540.
16. **Hickox, D. M., G. Gibbs, J. R. Morrison, K. Sebire, K. Edgar, H. H. Keah, K. Alter, K. L. Loveland, M. T. Hearn, D. M. de Kretser, and M. K. O'Bryan.** 2002.



Identification of a novel testis-specific member of the phosphatidylethanolamine binding protein family, pebp-2. *Biol Reprod* **67**:917-927.

17. **Hill, J. E., A. M. Myers, T. J. Koerner, and A. Tzagoloff.** 1986. Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**:163-167.
18. **Jelinsky, S. A., P. Estep, G. M. Church, and L. D. Samson.** 2000. Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. *Mol Cell Biol* **20**:8157-8167.
19. **Kroslak, T., T. Koch, E. Kahl, and V. Holtt.** 2001. Human phosphatidylethanolamine-binding protein facilitates heterotrimeric G protein-dependent signaling. *J Biol Chem* **276**:39772-39778.
20. **Lorenz, K., M. J. Lohse, and U. QUITTERER.** 2003. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature* **426**:574-579.
21. **Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N. Y.
22. **Mima, J., M. Hayashida, T. Fujii, Y. Narita, R. Hayashi, M. Ueda, and Y. Hata.** 2005. Structure of the carboxypeptidase Y inhibitor IC in complex with the cognate proteinase reveals a novel mode of the proteinase-protein inhibitor interaction. *J Mol Biol* **346**:1323-1334.
23. **Mima, J., T. Kondo, and R. Hayashi.** 2002. N-terminal acetyl group is essential for the inhibitory function of carboxypeptidase Y inhibitor (I(C)). *FEBS Lett* **532**:207-210.
24. **Mima, J., Y. Narita, H. Chiba, and R. Hayashi.** 2003. The multiple site binding of carboxypeptidase Y inhibitor (IC) to the cognate proteinase. Implications for the biological roles of the phosphatidylethanolamine-binding protein. *J Biol Chem* **278**:29792-29798.
25. **Mima, J., H. Suzuki, M. Takahashi, and R. Hayashi.** 2002. Overexpression and functional characterization of a serine carboxypeptidase inhibitor (I(C)) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem (Tokyo)* **132**:967-973.
26. **Myers, C. L., D. Robson, A. Wible, M. A. Hibbs, C. Chiriack, C. L. Theesfeld, K. Dolinski, and O. G. Troyanskaya.** 2005. Discovery of biological networks from diverse functional genomic data. *Genome Biol* **6**:R114.
27. **Polevoda, B., T. S. Cardillo, T. C. Doyle, G. S. Bedi, and F. Sherman.** 2003. Nat3p and Mdm20p are required for function of yeast NatB Nalpha-terminal acetyltransferase and of actin and tropomyosin. *J Biol Chem* **278**:30686-30697.
28. **Polevoda, B., and F. Sherman.** 2003. Composition and function of the eukaryotic N-terminal acetyltransferase subunits. *Biochem Biophys Res Commun* **308**:1-11.
29. **Robinson, L. C., and K. Tatchell.** 1991. TFS1: a suppressor of *cdc25* mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **230**:241-250.
30. **Schoentgen, F., and P. Jolles.** 1995. From structure to function: possible biological roles of a new widespread protein family binding hydrophobic ligands and displaying a nucleotide binding site. *FEBS Lett* **369**:22-26.
31. **Serre, L., K. Pereira de Jesus, C. Zelwer, N. Bureaud, F. Schoentgen, and H. Benedetti.** 2001. Crystal structures of YBHB and YBCL from *Escherichia coli*, two bacterial homologues to a Raf kinase inhibitor protein. *J Mol Biol* **310**:617-634.
32. **Song, O. K., X. Wang, J. H. Waterborg, and R. Sternglanz.** 2003. An Nalpha-acetyltransferase responsible for acetylation of the N-terminal residues of histones H4 and H2A. *J Biol Chem* **278**:38109-38112.
33. **Thevelein, J. M.** 1994. Signal transduction in yeast. *Yeast* **10**:1753-1790.
34. **Thevelein, J. M., and J. H. de Winde.** 1999. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **33**:904-918.

35. **Tohdoh, N., S. Tojo, H. Agui, and K. Ojika.** 1995. Sequence homology of rat and human HCNP precursor proteins, bovine phosphatidylethanolamine-binding protein and rat 23-kDa protein associated with the opioid-binding protein. *Brain Res Mol Brain Res* **30**:381-384.
36. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4354.
37. **Turk, V., and W. Bode.** 1991. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* **285**:213-219.
38. **Warringer, J., and A. Blomberg.** 2003. Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **20**:53-67.
39. **Warringer, J., E. Ericson, L. Fernandez, O. Nerman, and A. Blomberg.** 2003. High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:15724-15729.
40. **Yeung, K., T. Seitz, S. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K. D. Katsanakis, D. W. Rose, H. Mischak, J. M. Sedivy, and W. Kolch.** 1999. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* **401**:173-177.
41. **Yeung, K. C., D. W. Rose, A. S. Dhillon, D. Yaros, M. Gustafsson, D. Chatterjee, B. McFerran, J. Wyche, W. Kolch, and J. M. Sedivy.** 2001. Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* **21**:7207-7217.
42. **Zhu, S., K. T. Mc Henry, W. S. Lane, and G. Fenteany.** 2005. A chemical inhibitor reveals the role of Raf kinase inhibitor protein in cell migration. *Chem Biol* **12**:981-991.

**A/****B**

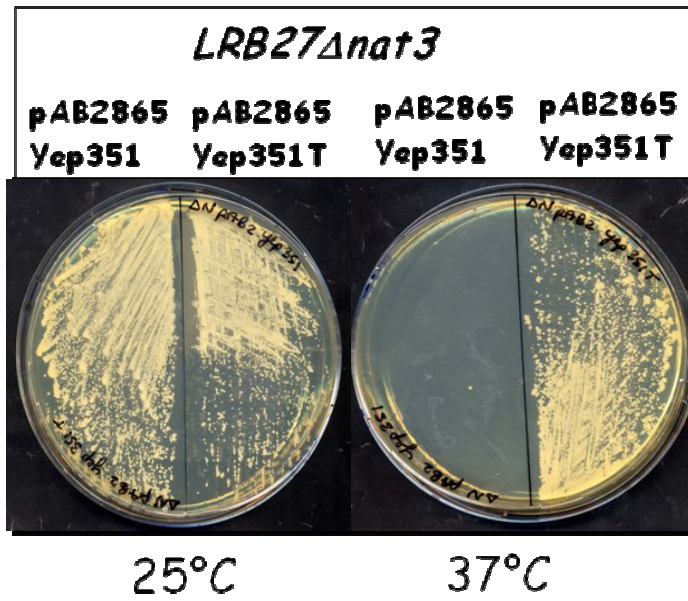
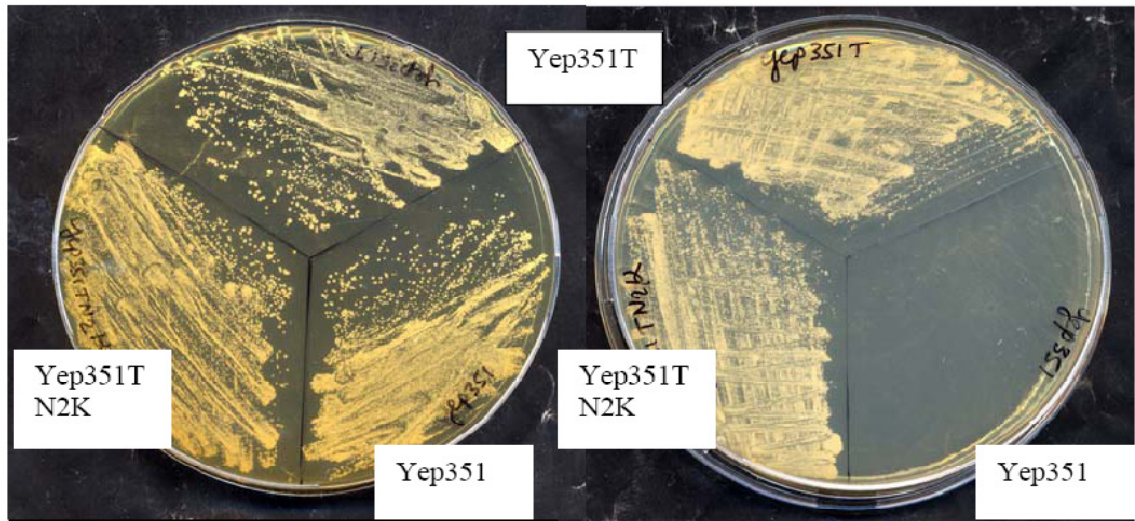


FIGURE 2

A/



B:

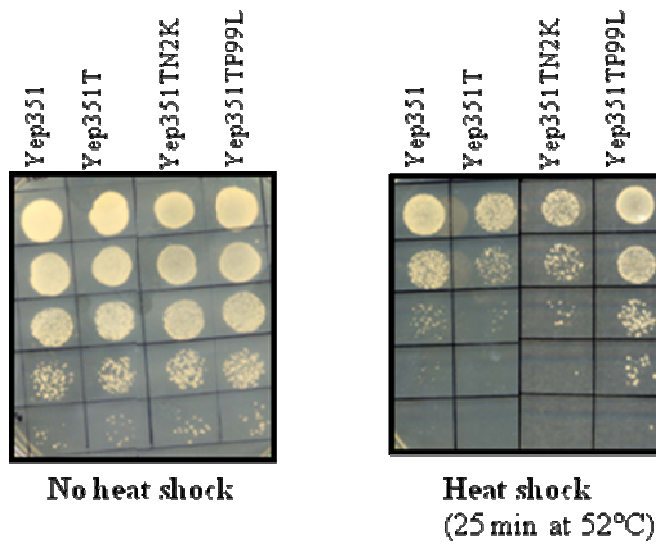


FIGURE 3

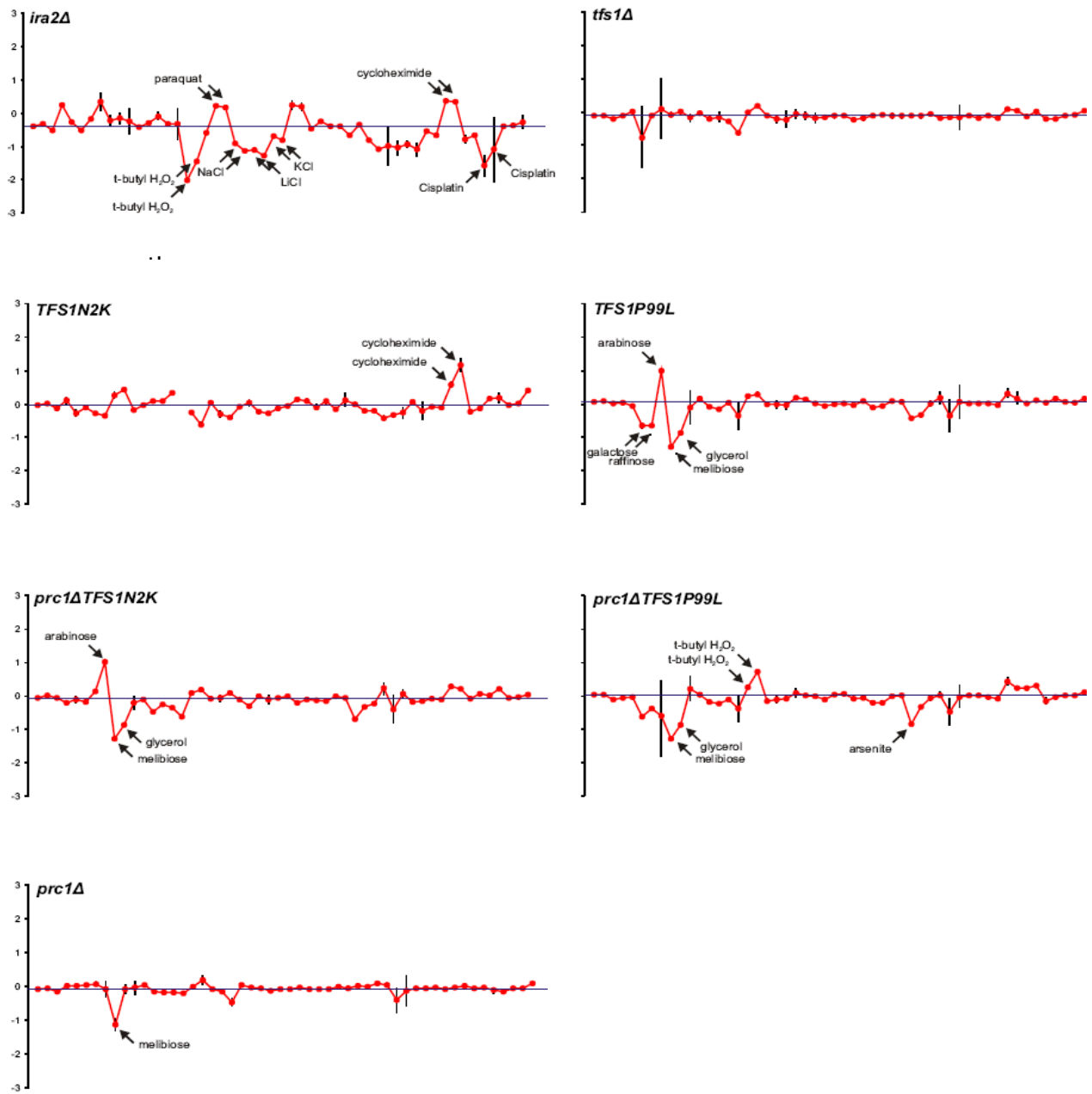


Fig.4A Lag phenotypic profiles

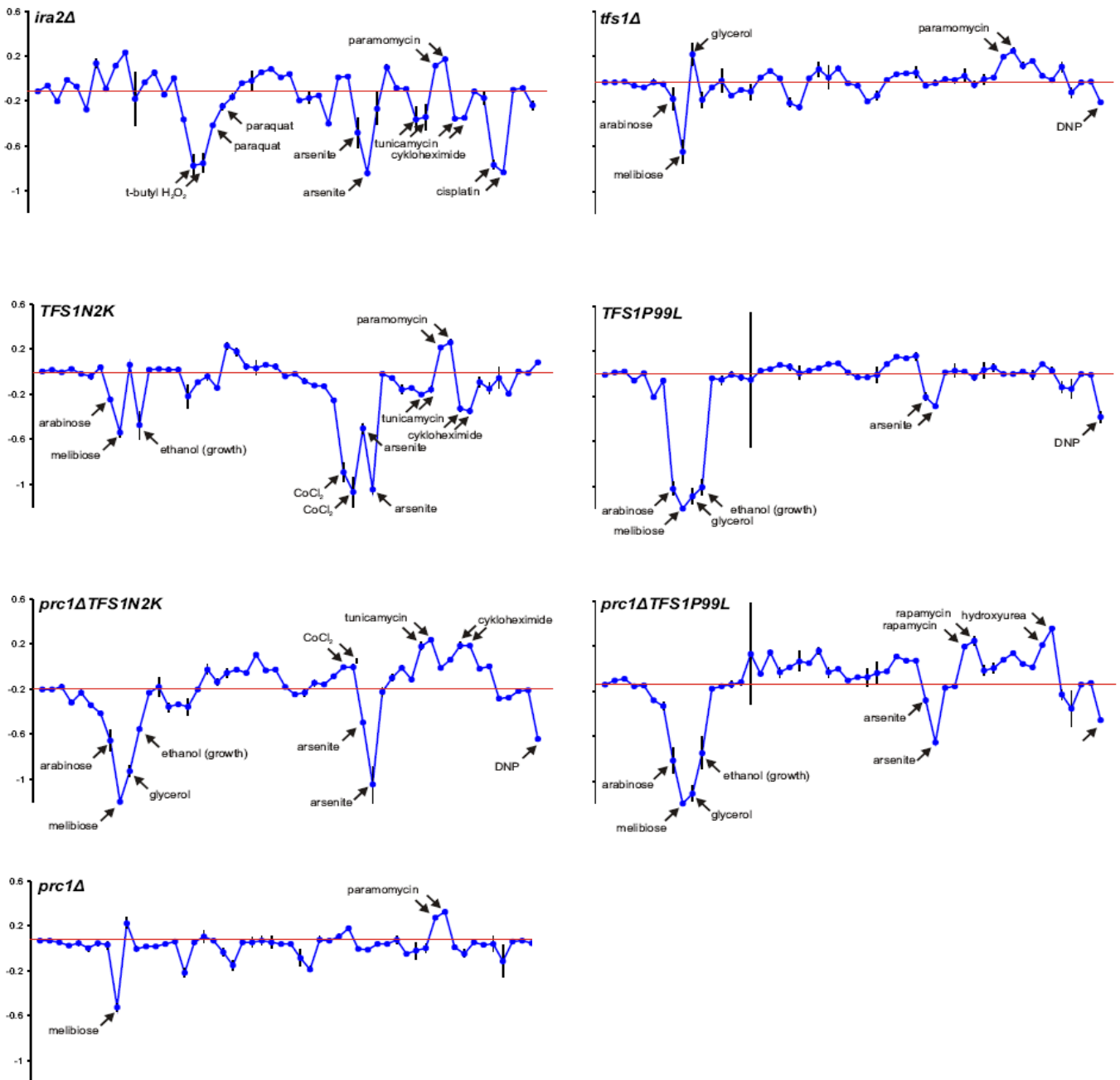


Fig. 4B Rate phenotypic profiles

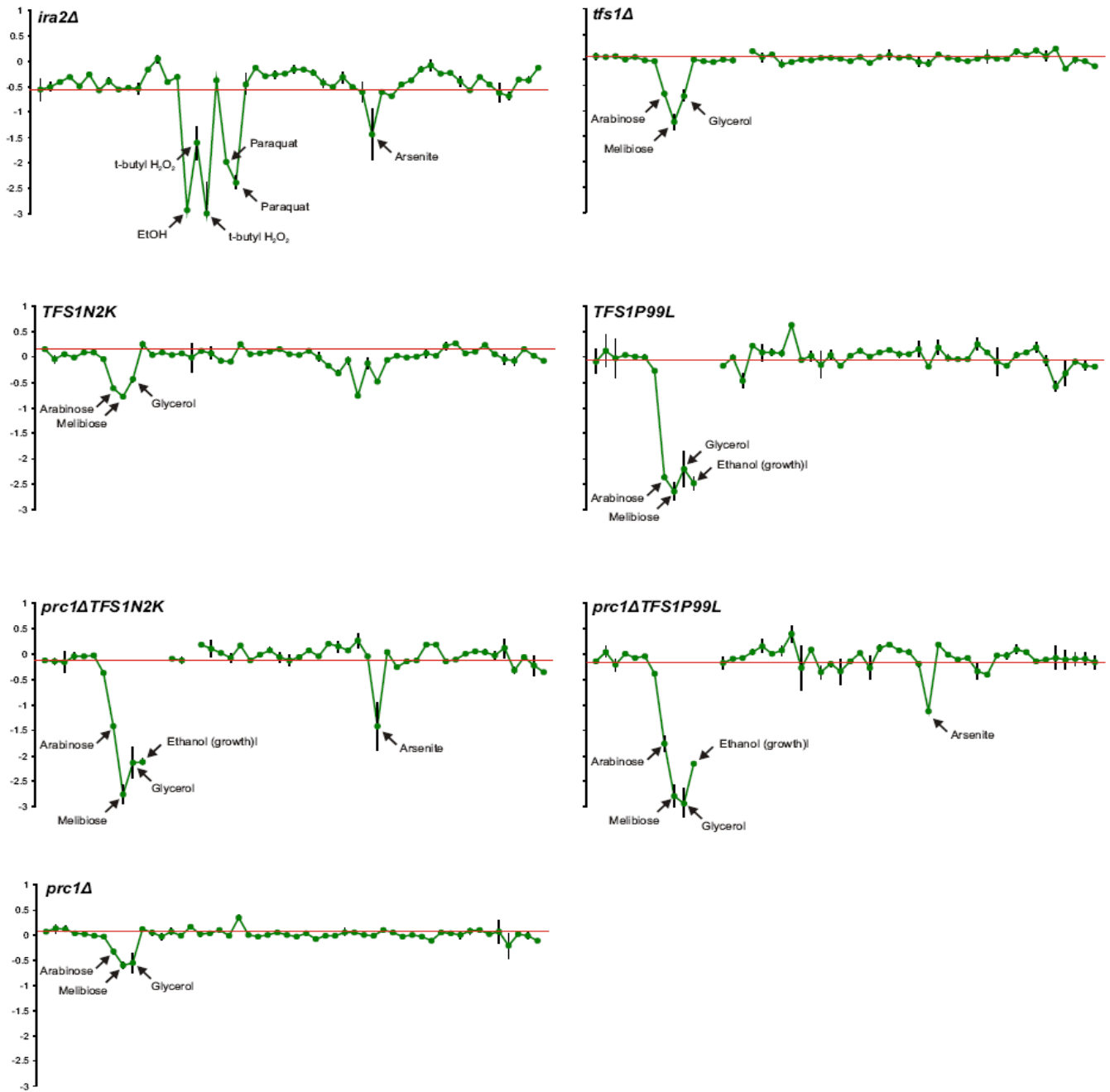


Fig.4C efficiency phenotypic profiles



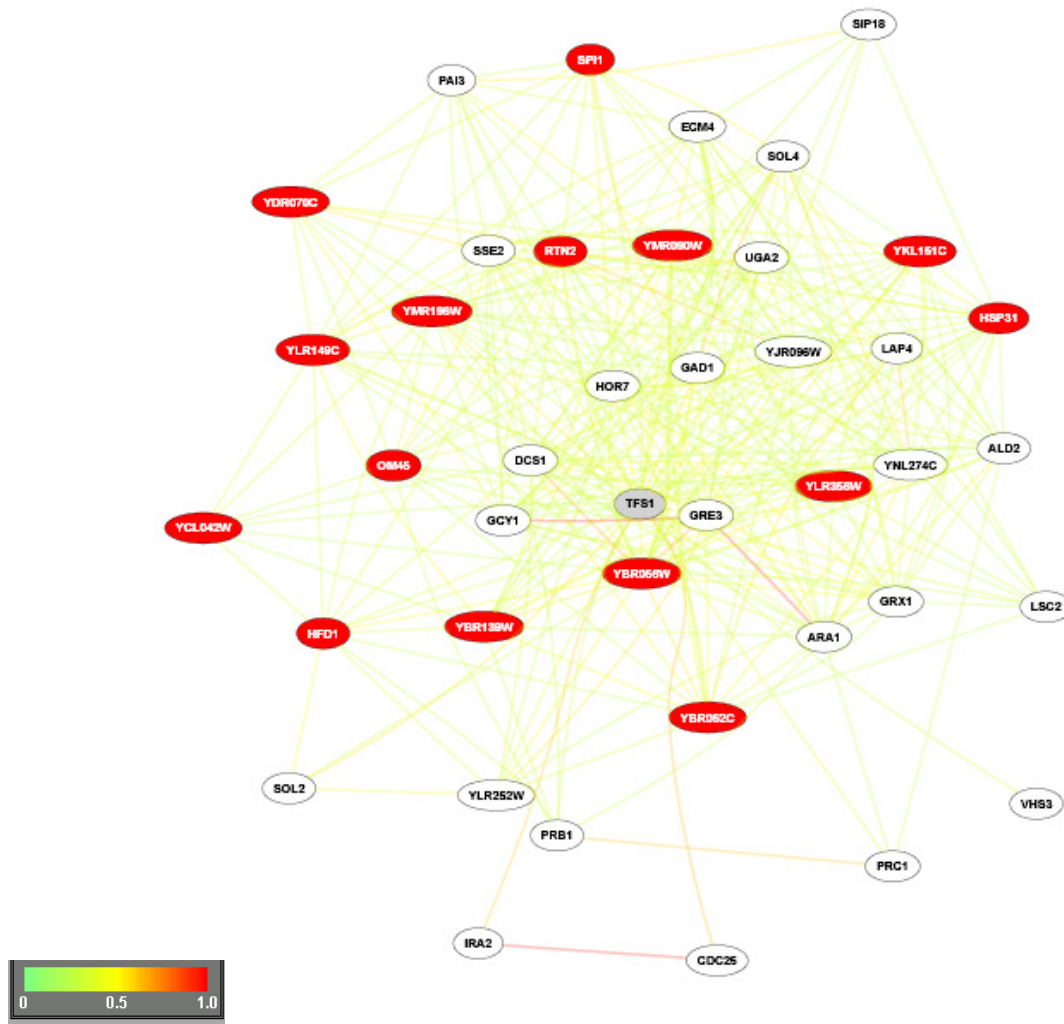


FIGURE 5

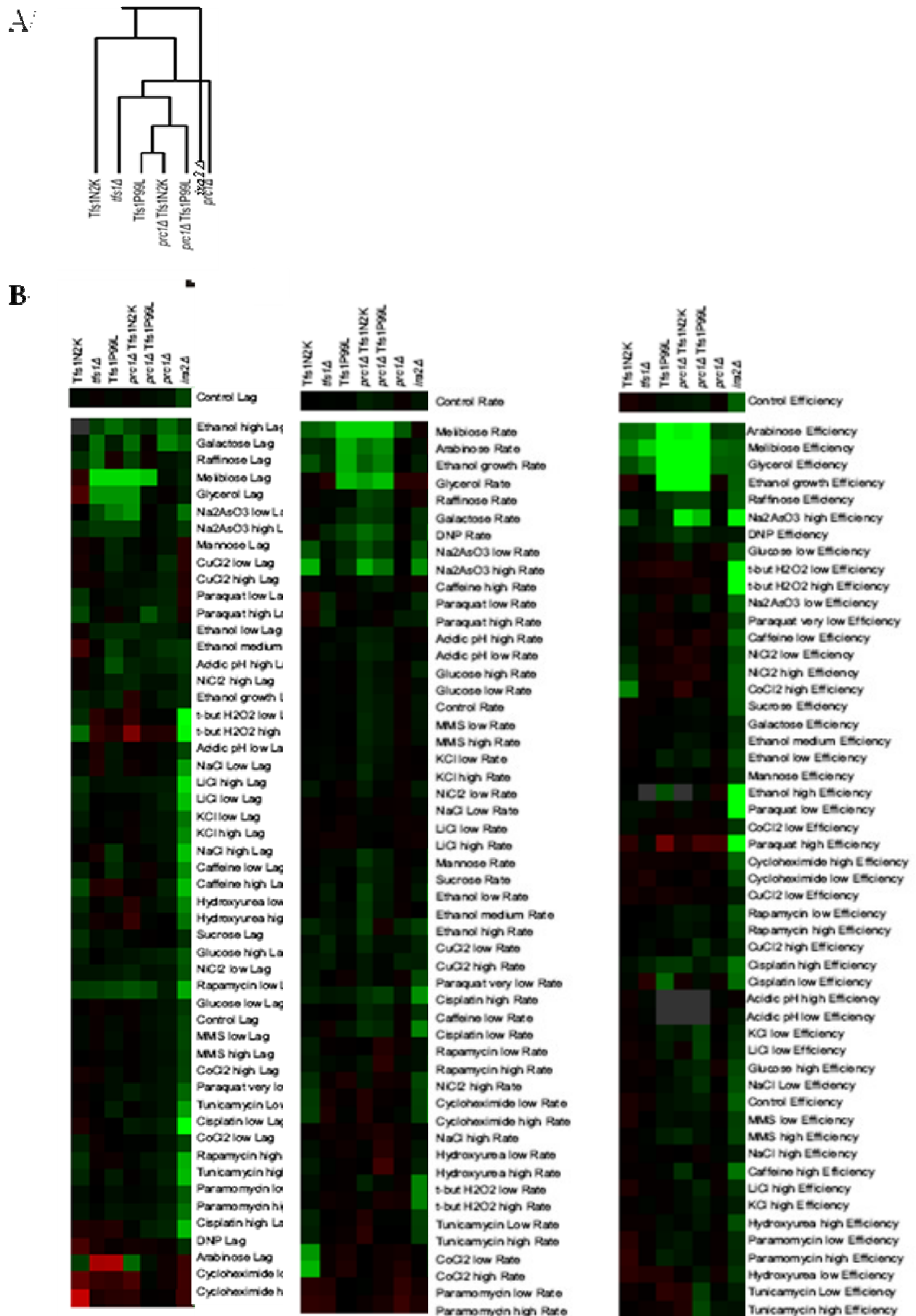


FIGURE 6

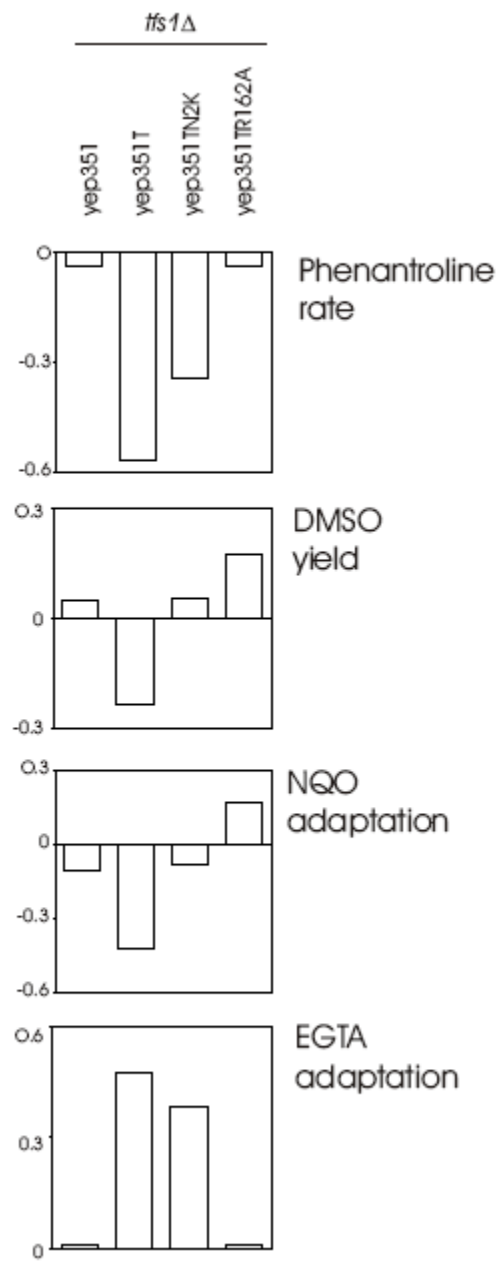


FIGURE 7



**Aurélie GOMBAULT**

**ETUDE DE LA REGULATION D'UNE PROTEINE GAP  
DE Ras DE LA LEVURE A L'HOMME**

**Résumé**

La neurofibromatose de type 1 est une maladie génétique fréquente puisqu'elle touche 1 individu sur 3500. Le gène responsable de la maladie a été identifié et code pour une protéine, la neurofibromine (Nf1), exprimée de manière ubiquitaire mais plus abondamment dans les neurones, les astrocytes, les cellules de Schwann et les oligodendrocytes. Il est un enjeu de taille de comprendre la régulation de cette protéine.

Une étude modèle a été développée chez la levure afin de caractériser les bases moléculaires de l'interaction entre l'homologue de Nf1, Ira2p, et une protéine qui l'inhibe, Tfs1p. Cette étude a permis d'identifier les régions de Tfs1p importantes pour l'interaction à savoir l'extrémité N-terminale, la cavité de surface, ainsi qu'une région électropositive contenant ces deux déterminants. Nous nous sommes intéressés ensuite au rôle physiologique de Tfs1p dans les cellules. Des études systématiques ont suggéré un rôle prédominant de l'inhibition d'Ira2p dans des conditions de surproduction de Tfs1p. Ce rôle a été précisé et nous avons montré que Tfs1p participait, via cette inhibition, à la boucle de rétrocontrôle négatif de la réponse au stress.

Sur la base de cette étude, nous avons cherché à savoir si l'interaction Ira2p/Tfs1p était conservée chez l'homme entre Nf1 et RKIP, homologue de Tfs1p. Nous avons en parallèle développé un crible double hybride sur Nf1 dans une banque d'ADNc de cerveau humain afin de mettre en évidence de nouveaux régulateurs de ses fonctions. 1464 candidats positifs ont été isolés. Actuellement, sur 8% de candidats identifiés 3 partenaires intéressants ont déjà pu être mis en évidence.

**Mots-clés** : Neurofibromine, double hybride, régulateurs, GAP, stress, interactions protéine-protéine, bases moléculaires.

**REGULATION OF A Ras-GAP FROM YEAST TO  
HUMAN**

**Abstract**

The human disease neurofibromatosis type 1 is one of the most common genetic disorders because it has a *de novo* incidence of one in 3500 individuals. The *NF1* gene has been identified and it has been demonstrated to be a tumor suppressor. It encodes a protein called neurofibromin (Nf1), which is ubiquitously expressed but most abundant in neurons, astrocytes, Schwann cells and oligodendrocytes. It is of great interest to understand the regulation of this protein.

A model study has been developed in yeast in order to characterize the molecular basis of the interaction between Ira2p, the Nf1 homologue, and Tfs1p, a protein which inhibits it. We identified the molecular determinants of Tfs1p involved in the Tfs1p/Ira2p interaction: the accessibility of the surface pocket, its N-terminal region and the specific electrostatic properties of a large surface region containing these two elements. The physiological role of Tfs1p in cells has also been studied. Systematic studies suggest that when Tfs1p is over produced its most important function is the inhibition of Ira2p. We have shown that this inhibitory role is implicated in a negative feedback control of the stress response.

On the basis of this study, we wanted to know if the Ira2p/Tfs1p interaction was conserved in human between Nf1 and RKIP, the human homologue of Tfs1p. In parallel, we have performed a two-hybrid screen between Nf1 and a cDNA library of human brain in order to identify new regulators of its functions. 1464 candidates have been isolated. Actually, 8% of the candidates have been identified and we have brought into light three interesting targets.

**Keywords** : Neurofibromin, two-hybrid screen, regulators, GAP, stress, protein-protein interactions, molecular basis

Centre de Biophysique Moléculaire  
Rue Charles SADRON  
45071 ORLEANS CEDEX