



HAL
open science

Décryptage des mécanismes d'ubiquitylation régulant l'histone centromérique CenH3 chez *Saccharomyces cerevisiae*

Marie Le Boulch

► **To cite this version:**

Marie Le Boulch. Décryptage des mécanismes d'ubiquitylation régulant l'histone centromérique CenH3 chez *Saccharomyces cerevisiae*. Biologie cellulaire. Université de Rennes, 2019. Français. NNT : 2019REN1B009 . tel-03177184

HAL Id: tel-03177184

<https://theses.hal.science/tel-03177184>

Submitted on 23 Mar 2021

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : « Biologie Cellulaire, Biologie du Développement »

Par

Marie LE BOULCH

Décryptage des mécanismes d'ubiquitylation régulant l'histone centromérique CenH3 chez *Saccharomyces cerevisiae*

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 22 Mars 2019
Unité de recherche : UMR6290, CNRS – Université Rennes 1

Rapporteurs avant soutenance :

Laurence LEVY	Chargée de recherche, Centre de recherche St Antoine
Benoit PALANCADE	Directeur de recherche, Institut Jacques Monod

Composition du Jury :

Rapporteurs :	Laurence LEVY	Chargée de recherche, Centre de recherche St Antoine
	Benoit PALANCADE	Directeur de recherche, Institut Jacques Monod

Examineurs :	Emmanuelle FABRE	Directrice de recherche, Université Paris-Diderot
	Gilles SALBERT	Professeur d'Université, IGDR, Université de Rennes 1

Dir. de thèse :	Gwenaël RABUT	Chargé de recherche, IGDR, Université de Rennes 1
-----------------	---------------	---

REMERCIEMENTS :

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres de mon jury, les docteurs Laurence Levy, Benoît Palancade, Emmanuelle Fabre et le professeur Gilles Salbert d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

J'aimerais remercier Gwenaël Rabut pour m'avoir permis d'intégrer son équipe et m'avoir accordé sa confiance. Un grand merci pour ton aide et pour tout le temps que tu as pu me consacrer tout au long de ces trois années de thèse.

Un grand merci aux membres passés et présents de l'équipe « Ubiquitylation des protéines » : Gaëlle (pour son aide, sa bonne humeur, mais aussi ses techniques pour optimiser les manips), Aswani (pour m'avoir donné envie de voyager), Audrey (pour les échanges plus ou moins scientifiques dans notre bureau), Ewa (pour tous les conseils d'une ancienne thésarde) et aussi à tous les étudiants.

J'aimerais aussi remercier les membres de l'équipe Cycle Cellulaire pour leurs conseils notamment au début de ma thèse. En particulier, merci à Stéphanie Le Bras pour toutes les recommandations que tu as pu me donner. Merci à toute l'équipe de Michael Knop de m'avoir permis de venir dans leur laboratoire. Merci aux membres de mon comité de thèse pour leurs conseils et leurs remarques et aux plateformes MRic, Cytométrie en flux et Impacell pour leur aide.

Pour leur aide précieuse et leur bonne humeur, merci à tous les membres qui s'occupent des tâches communes : Gérard, Nathalie, Philippe, Stéphane, Svetlana et toute la « team Gestion ». Merci à Géraldine pour son aide et sa bonne humeur ! Et merci à tous ceux que j'oublie...

Merci à toutes les personnes, devenus amis, que j'ai rencontré lors de cette aventure. Un grand merci à Florian et Solenne, mes partenaires de thèse et plus encore. Vous avez été capable de me supporter dès le début et (presque) jusqu'à la fin. Merci d'avoir été là pour le meilleur et pour le pire ! Merci à Lucie, Guillaume, Lilian, Olivia, Julien : les ancêtres (!) qui étaient là avant moi et qui m'ont accueillie et mis dans le bain des doctorants. Merci aussi aux petits nouveaux (Maël, Alexandre, Anaïs et les autres) pour votre optimisme et votre joie d'être en doctorat ! Merci à Toto et ses verrines. Merci aux cruciverbistes et aux vnbistes. Merci les copains venus d'ailleurs (Arnaud, Blandine, Pierre, Victor et Yann). Merci à vous et à tous les autres (Céline et Julien, Anthony, Laura, Pierre, Mélanie, Yann, Domi, « les Filles »,...) d'avoir déjà partagé un verre, une raclette ou même des idées scientifiques. Merci pour tous ces moments passés (et à venir). Cœur, licorne et paillettes sur vous tous.

Merci à ma famille de m'avoir toujours encouragée et d'avoir soutenu deux doctorants à la fois. Merci à mon frère qui m'a un peu donné l'idée de faire de la biologie.

Merci à Vincent de m'avoir aidée, soutenue et supportée tout au long de ma thèse. Merci de faire partie de mes projets passés et surtout de ceux à venir.

LISTE DES ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION.....	12
I. L'ubiquitylation.....	12
1- Les rôles biologiques de l'ubiquitylation dans la cellule	12
a- Ubiquitylation protéolytique	12
Dégradation des protéines par le protéasome.....	12
Dégradation des protéines par le lysosome	13
b- Ubiquitylation non-protéolytique.....	14
c- Relation entre ubiquitylation protéolytique et non-protéolytique.....	14
2- Le mécanisme d'ubiquitylation	15
a- L'ubiquitine.....	15
b- La réaction d'ubiquitylation.....	16
c- Enzymes impliquées	18
Enzymes d'activation de l'ubiquitine (E1s).....	18
Enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (E2s)	20
Enzymes de ligation (E3s).....	22
Enzymes de déubiquitylation (DUBs).....	24
d- Les différents types d'ubiquitylation et leurs fonctions.....	25
Monoubiquitylation et multi-monoubiquitylation.....	27
Polyubiquitylation	27
3- L'implication de l'ubiquitylation dans des pathologies humaines.....	31
II. L'ubiquitylation dans la régulation de CenH3	34
1- La chromatine.....	34
a- Organisation de la chromatine	34
b- Plasticité de la chromatine	36
Facteurs de remodelage de la chromatine	36

Table des matières

Modifications post-traductionnelles des histones	36
Variants d'histones	37
c- La chromatine centromérique	37
Détermination épigénétique du centromère	37
Le variant d'histone centromérique CenH3	38
2- Implication de CenH3 ^{CENP-A} dans des pathologies.....	40
3- Régulation de la localisation de CenH3	41
a- Ubiquitylation protéolytique de Cse4 par Psh1	41
Contrôle de la localisation de Cse4 par l'ubiquitylation	41
Dégradation de Cse4 par ubiquitylation.....	42
Mécanisme d'ubiquitylation de Cse4 par Psh1	43
Régulation de l'ubiquitylation de Cse4 par Psh1	44
b- Ubiquitylation de Cse4 par d'autres ubiquitine ligases	45
Le complexe SCF ^{Rcy1}	45
L'E3 RING SUMO-dépendante : Slx5	46
L'E3 RING : Ubr1.....	46
c- Autres mécanismes de régulation de Cse4.....	49
d- Régulation de CenH3 dans d'autres organismes	50
OBJECTIFS DE LA THÈSE	53
1- Utilisation de la levure pour étudier les mécanismes d'ubiquitylation de CenH3 ...	53
2- Recherche des substrats de Psh1	54
3- Analyse des E2s fonctionnant avec Psh1	54
4- Analyse des E3s ubiquitylant Cse4 endogène.....	56
MATÉRIELS ET MÉTHODES	58

Table des matières

I.	Matériels.....	58
II.	Méthodes	63
1-	Milieux utilisés.....	63
a-	Milieux solides et liquides	63
b-	Milieux solides de sélection d'haploïdes sur plaques	63
c-	Milieu pour le SILAC	64
d-	Antibiotiques.....	64
2-	Construction de plasmides	65
3-	Obtention de souches de levures	65
4-	Conditions de culture	66
5-	Purification His-Ubiquitine	67
6-	SDS-PAGE et immunoblot	68
7-	Coloration au nitrate d'argent	68
8-	Couplage des anticorps anti-GlyGly	69
9-	SILAC	69
10-	Purification LgBiT-His	70
11-	Cytométrie en flux	71
12-	Analyse de la fluorescence.....	71
	RÉSULTATS	73
I.	Étude des substrats de Psh1	73
1-	Identification de substrats potentiels de Psh1	73
2-	Analyse de l'ubiquitylation de substrats potentiels.....	79
II.	Étude de l'ubiquitylation de Cse4 endogène.....	81
1-	Détection de l'ubiquitylation de Cse4 endogène et de ses effets	81
a-	Purification de Cse4 dans des souches « anchor-away ».....	81
b-	Complémentation de luminescence entre Cse4-LgBiT et SmBiT-Ubiquitine.....	87

Table des matières

c-	Utilisation d'un chronomètre fluorescent	89
2-	Effet de la position de l'étiquette sur la croissance et la localisation de Cse4.....	91
3-	Étude de l'ubiquitylation de Cse4 endogène étiquetée en interne	94
a-	Localisation et stabilité de Cse4 au cours du cycle cellulaire.....	94
b-	Localisation de Cse4 dans des mutants d'E2s et d'E3s	97
c-	Ubiquitylation de Cse4-LgBiT-His.....	102
d-	Ubiquitylation de Cse4 au cours du cycle cellulaire.....	105
e-	Mise en place d'un test pour analyser le type de chaînes d'ubiquitine assemblées sur Cse4	111
DISCUSSION		113
I.	Identification de nouveaux substrats d'ubiquitylation de Psh1	113
II.	Ubiquitylation de Cse4 endogène	116
1-	Expression endogène de Cse4 et fusion à une étiquette.....	116
2-	Quantification de l'ubiquitylation de Cse4	117
3-	Enzymes impliquées dans l'ubiquitylation de Cse4 endogène	119
a-	Les E3s.....	119
b-	Les E2s.....	121
c-	Ubiquitylation au cours du cycle cellulaire.....	122
d-	Le type de chaîne d'ubiquitine.....	123
CONCLUSION.....		125
BIBLIOGRAPHIE		126

Figure 1 : Structure de l'ubiquitine.....	15
Figure 2 : Le mécanisme d'ubiquitylation.	16
Figure 3 : Les réactions d'ubiquitylation et de déubiquitylation.....	17
Figure 4 : Fonctionnement de l'enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1).	19
Figure 5 : Représentation du réseau d'enzymes d'ubiquitylation.....	21
Figure 6 : Mécanisme de transfert de l'ubiquitine dans les différentes familles d'E3s. ..	23
Figure 7 : Estimation de la répartition des pools d'ubiquitine.	26
Figure 8 : Classification des différents types d'ubiquitylation.	28
Figure 9 : Niveau d'organisation de la chromatine.....	35
Figure 10 : Alignement des séquences protéiques de CenH3 chez différentes espèces....	39
Figure 11 : Organisation des domaines de Psh1.....	43
Figure 12 : Modèle de régulation de Cse4 chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
Figure 13 : Résultats préliminaires de complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC).....	55
Figure 14 : Principe des souches « anchor-away ».....	74
Figure 15 : Principe de l'expérience de SILAC, marquage des acides aminés grâce à des isotopes stables en culture cellulaire.....	76
Figure 16 : Résultats de l'expérience de SILAC.....	78
Figure 17 : Ubiquitylation de Spc105 exprimée à un niveau endogène.....	79
Figure 18 : Ubiquitylation de Cse4 exprimée à un niveau endogène.....	82
Figure 19 : Ubiquitylation de Cse4 au cours du cycle cellulaire.....	84
Figure 20 : Ubiquitylation de Cse4 dans les différents mutants d'E2s.	85
Figure 21 : Ubiquitylation de Cse4 dans les différents mutants <i>ubc4Δ</i> et <i>psh1Δ</i>	86
Figure 22 : Détection de l'ubiquitylation endogène de Cse4 par la méthode de reconstitution de luminescence SmBiT-LgBiT.....	88

Figure 23 : Détection de la quantité et du temps de demi-vie de Cse4 endogène par la méthode du "tandem fluorescent timer " (tFT).....	90
Figure 24 : Effet de la position de l'étiquette sur la croissance des levures et sur la localisation de Cse4.	92
Figure 25 : Effet de la composition du tFT sur la croissance des levures et sur la localisation de Cse4.	93
Figure 26 : Localisation et stabilité de Cse4 dans une souche <i>psh1Δ</i>	94
Figure 27 : Localisation et stabilité de Cse4-tFT ^{interne} au cours du cycle cellulaire.	96
Figure 28 : Abondance de Cse4-tFT(NG) ^{interne} au niveau du centromère dans des mutants d'E2.....	99
Figure 29 : Abondance de Cse4-tFT(NG) ^{interne} au niveau du centromère dans des mutants d'E3.....	100
Figure 30 : Localisation de Cse4-tFT(NG) ^{interne} dans des mutants d'E3 et d'E2 d'intérêt.	101
Figure 31 : Expression de la SmBiT-Ubiquitine lors de l'étude de Cse4-LgBiT-His ^{interne}	102
Figure 32 : Niveau d'ubiquitylation de Cse4-LgBiT-His ^{interne} endogène dans des mutants d'E3s.	104
Figure 33 : Niveau d'ubiquitylation de Cse4-LgBiT-His ^{interne} endogène au cours du cycle cellulaire.	105
Figure 34 : Niveau d'ubiquitylation de Cse4-LgBiT-His ^{interne} endogène après traitement à l' α -factor puis relargage dans le cycle cellulaire dans la souche sauvage.	107
Figure 35 : Niveau d'ubiquitylation de Cse4-LgBiT-His ^{interne} endogène après traitement à l' α -factor puis relargage dans le cycle cellulaire dans la souche sauvage et différents mutants d'E3s.	108
Figure 36 : Progression des différents mutant Cse4-LgBiT-His ^{interne} dans le cycle cellulaire.	110
Figure 37 : Identification du type de chaînes assemblées sur Cse4.	112

Index des tableaux

Tableau 1 : Types de chaînes d'ubiquitine et exemple de rôles associés.	30
Tableau 2 : Exemples de processus d'ubiquitylation dont les défauts sont associés à des maladies chez l'Homme.	33
Tableau 3 : Récapitulatif des enzymes d'ubiquitylation ciblant CenH3 dans différents organismes.	52
Tableau 4 : Souches de levures utilisées.	59
Tableau 5 : Plasmides utilisés.	60
Tableau 6 : Enzymes de restriction utilisées et fournisseur.	60
Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés.	62
Tableau 8 : Antibiotiques utilisés.	64
Tableau 9 : Antibiotiques et inhibiteurs utilisés.	65
Tableau 10 : Récapitulatif des données sur l'ubiquitylation de Cse4 endogène.	120

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide dé oxyribonucléique
AMP	Adénosine mon ophosphate
AMSH	Associated m olecule with the SH3 domain of STAM
APC/C	Anaphase- p romoting complex/cyclosome
ARN	Acide ri bonucléique
ARNi	ARN interference
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine tri phosphate
ATPase	Adénosine tri phosphatase
BCA	B icinchoninic acid
BiFC	B imolecular fluorescence complementation
BiT	B inary technology
BSA	B ovine serumalbumine
CAF-1	Chromatin a ssembly factor 1 complex
Cal1	Chromosome a lignment defect 1
Can1	Can avanine resistance 1
CATD	CENP- A targeting d omain
CCD	Catalytic c ystein d omain
Cdc34	Cell d ivision cycle 34
CDE	Centromere DNA element
CentH3	Centromeric h istone 3
CENP-A	Centromere p rotein A
Cezanne	Cellular z inc finger anti -NF- κ b
CID	Centromere i dentifier
Cka2	Casein k inase alpha subunit 2
Cse4	Chromosome s egregation protein 4
Cnp1	Centromere p rotein 1
COPS8	COP9 signalosome complex subunit 8
C-terminal	Carboxy- t erminal
CUL	C ullin
DAmP	D ecreased a bundance by mRNA p erturbation
Doa1	D egradation of alpha 1
DMP	D imethyl p imelimidate
DMSO	D iméthylsulfoxyde
DO₆₀₀	D ensité optique à 600 nm
DUB	Enzyme de dé ubiquitylation
DTT	D ithiothreitol
E1	Enzyme d'activation de l'ubiquitine

Liste des abréviations

E2	Enzyme de conjugaison de l'ubiquitine
E3	Enzyme de ligation de l'ubiquitine
E6-AP	E6-associated protein
ECL	Enhanced chemiluminescent reagent
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
FAT10	Human leukocyte antigen- F adjacent transcript 10
FACT	Facilitates Chromatin Transcription
FKBP12	FK506 binding protein 12
Fpr3	FK506-sensitive proline rotamase 3
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FRB	FKBP-rapamycin binding
GFP	Green fluorescent protein
HECT	Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus
Hel1	Histone E3 ligase 1
HFD	Histone fold domain
HIR	Histone regulation
HJURP	Holliday junction recognition protein
HPH	Hygromycine B phosphotransferase
HRP	Horseradish peroxydase
Hul	HECT ubiquitin ligase
IAP	Immunoaffinity purification Buffer
IAPs	Inhibitors of apoptosis protein
Itt1	Inhibitor of translation termination 1
JAMM	JAB1/PAD1/MPN-domain-containing metalloenzyme
Kan	Kanamycine A
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny broth
LgBiT	Large fragment of the NanoLuc luciferase
Lyp1	Lysine-specific permease 1
Mdm2	Murine double minute-2 gene
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
NAT	Nourseothricin N-acetyl transferase
NEDD8	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
N-terminal	Amino-terminal
NG	NeonGreen

Liste des abréviations

OTU	O varian t umour proteases
OTUB1	O tubain-1
p53	Tumor p rotein 53
PAGE	P olyacrylamide g el electrophoresis
Pat1	P rotein associated with t opoisomerase II 1
pb	P aire de b ase
PBS	P hosphate- b uffered saline
PCAF	p 300- C BP-associated f actor
PCR	P olymerase c hain r eaction
PEG	P olyéthylène g lycol
Ppa	P artner of p aired
Psh1	P ob3/ S pt16/ h istone-associated 1
PTM	P ost- t ranslational m odification
Rad6	R adiation sensitive 6
Rcy1	F -box protein involved in r ecycling 1
RBR	R ING- b etween- R ING
RBX1	R ING- b ox protein 1
RDX	R oadkill
RING	R eally interesting n ew g ene
Rpl13A	R ibosomal p rotein of the l arge subunit 13A
rpm	R otation p ar m inute
Rpn11	R egulatory p article n on-ATPase 11
Rsp5	R everses S pt- p henotype 5
Rub1	R elated to u biquitin 1
SAGA	S pt- A da- G cn5 a cetyltransferase
SCF	S kp1/ C ullin/ F -box
Scm3	S uppressor of c hromosome m issegregation 3
SD	S ynthetic d extrose medium
SDS	S odium d odecyl sulphate
SILAC	S table i sotope labeling by/with a mino acids in c ell culture
Slx5	S ynthetic l ethal of unknown [X] function 5
SmBiT	S mall fragment of the NanoLuc luciferase
Smt3	S uppressor of M if two 3
Spt	S uppressor of T y
Ste2	S terile 2
STUbL	S UMO-targeted u biquitine l igase
SUMO	S mall u biquitin-related m odifier
SWI/SNF	S witch/sucrose n on fermentable
TAP	T andem a ffinity p urification
TCA	T richloroacetic a cid
TFA	T rifluoroacetic a cid
tFT	T andem f luorescent t imer

Liste des abréviations

Tom1	Trigger of mitosis 1
ts	Thermosensible
u.a.	Unité arbitraire
Ub	Ubiquitine
Uba	Ubiquitin activating
Ubc	Ubiquitin conjugating
Ubl	Ubiquitin like protein
Ubr1	Ubiquitin protein ligase E3 component N-Recognin 1
Ubp8	Ubiquitin-specific processing protease 8
UCH	Ubiquitin C-terminal hydrolases
UFD	Ubiquitin-fold domain
Ufd4	Ubiquitin fusion degradation protein 4
UPS	Ubiquitin proteasome system
USP	Ubiquitin specific protease
UTR	Untranslated region
VHL	Von Hippel-Lindau
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WT	Wild type
YPD	Yeast peptone dextrose

INTRODUCTION

I. L'ubiquitylation

Les modifications post-traductionnelles (ou PTMs) consistent en la modification chimique d'un acide aminé d'une protéine. Chez les eucaryotes, plus de 300 types de PTMs ont été recensés, comme la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation ou encore l'ubiquitylation. Une même protéine peut donc se présenter sous différentes formes et un grand nombre de protéines sont modifiées de manière post-traductionnelle (Khoury et al., 2011). Ces PTMs permettent d'augmenter la complexité du protéome et jouent un rôle crucial dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques en modulant la localisation, la stabilité d'une protéine ou encore la régulation de l'activité enzymatique (Walsh et al.). À ce jour, chez l'Homme, environ 90 000 PTMs ont été détectées de manière expérimentale lors d'analyses à grande échelle ce qui souligne l'importance de ces modifications à l'échelle du protéome (Khoury et al., 2011).

Parmi ces PTMs, l'ubiquitylation est un mécanisme de régulation fondamentalement important. À titre de comparaison, le génome humain contient environ 656 kinases et 184 phosphatases contre environ 650 enzymes d'ubiquitylation et une centaine d'enzymes de déubiquitylation (Li et al., 2008; Nijman et al., 2005; Smoly et al., 2017). La présence d'une telle quantité d'enzymes impliquées dans l'ubiquitylation suggère que la complexité de la régulation des protéines par ubiquitylation est comparable à celle de la phosphorylation. De plus, chez l'Homme, environ 19 000 sites d'ubiquitylation ont été identifiés par spectrométrie de masse, ce qui classe l'ubiquitylation comme la seconde PTM la plus représentée après la phosphorylation où plus de 20 000 sites ont été identifiés (Kim et al., 2011; Olsen et al., 2010; Wagner et al., 2011).

1- Les rôles biologiques de l'ubiquitylation dans la cellule

a- Ubiquitylation protéolytique

Dégradation des protéines par le protéasome

La première fonction de l'ubiquitylation mise en évidence par Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose est la dégradation des protéines par le protéasome (Hershko et

Introduction

al., 1980). Le protéasome est un complexe protéique retrouvé chez tous les eucaryotes et hautement conservé au cours de l'évolution (Arrigo et al., 1987). Le protéasome 26S est formé par l'association de deux sous-complexes régulateurs 19S et d'un cœur catalytique 20S (Hough et al., 1987). Les sous-complexes régulateurs permettent la reconnaissance des protéines ubiquitylées et le cœur catalytique entraîne leur dégradation (Groll et al., 2000; Lander et al., 2012). La dégradation des protéines ubiquitylées par le protéasome sert tout d'abord de contrôle qualité en éliminant les protéines endommagées ou mal repliées. En effet, ces protéines détériorées peuvent être non-fonctionnelles et entraîner des dysfonctionnements ou peuvent former des agrégats de protéines qui sont liés à des maladies neurodégénératives comme Parkinson (Kitada et al., 1998). Le système ubiquitine protéasome (ou UPS) permet aussi d'assurer un niveau constant de protéines dans la cellule ou encore de réguler le temps de vie de protéines impliquées dans des voies de signalisation ou le contrôle du cycle cellulaire (Ciechanover et al., 1984; Finley et al., 1984). L'ubiquitylation protéolytique est donc impliquée à la fois dans la dégradation des protéines mais aussi dans la régulation cellulaire via leur dégradation.

Dégradation des protéines par le lysosome

L'ubiquitylation peut aussi entraîner la dégradation des protéines par le lysosome. Ce mécanisme de dégradation permet en particulier à la cellule de moduler les protéines membranaires présentes à sa surface pour s'adapter à des modifications de son environnement. L'ubiquitylation des protéines membranaires permet leur endocytose. Après l'endocytose, les protéines ubiquitylées sont concentrées dans des endosomes qui, en fusionnant avec les lysosomes, entraînent l'hydrolyse des protéines membranaires (Davies et al., 2009).

De plus, le lysosome est aussi impliqué dans la dégradation de protéines cytoplasmiques par un procédé appelé autophagie. Dans ce processus, l'ubiquitylation est souvent une condition préalable à la reconnaissance du substrat et détermine la spécificité (Shaid et al., 2013).

b- Ubiquitylation non-protéolytique

L'ubiquitylation des protéines n'est pas seulement un signal de dégradation protéolytique, elle peut aussi conduire à des procédés indépendants de la protéolyse. En effet, l'ubiquitylation, au même titre que la phosphorylation par exemple, permet de modifier la conformation, la localisation, l'activité ou encore les interactions de la protéine cible. Cela est impliqué dans la régulation de nombreux processus cellulaires comme la signalisation (Haglund and Dikic, 2005), la transcription (Robzyk et al., 2000) ou encore la réparation de l'ADN (Jentsch et al., 1987).

c- Relation entre ubiquitylation protéolytique et non-protéolytique

En résumé, deux types de signaux d'ubiquitylation peuvent être assemblés sur une protéine : (1) l'ubiquitylation protéolytique entraîne la dégradation des protéines ou une régulation cellulaire via leur dégradation et (2) l'ubiquitylation non-protéolytique induit une régulation de la protéine sans la dégrader. Selon les conditions une protéine peut donc être régulée par l'un ou l'autre type d'ubiquitylation, ce qui entraînera des processus de régulation différents.

Par exemple, l'analyse du facteur de transcription p53 illustre bien les différents types de régulation possible par ubiquitylation. Aussi appelée « gardien du génome », p53 joue un rôle crucial dans la réponse au stress génotoxique et sa régulation est primordiale (Vogelstein, 1990). Son expression est maintenue à un niveau basal et sa stabilité augmente significativement après des dommages à l'ADN. p53 est régulée par l'ubiquitine ligase Mdm2 (Murine Double Minute-2 gene) qui induit sa dégradation par ubiquitylation protéolytique pour maintenir un niveau basal de p53 (Honda et al., 1997). En plus de réguler la stabilité de p53, Mdm2 régule aussi l'activité du « gardien du génome ». En effet, Mdm2 est capable de mono-ubiquityler p53 de manière non-protéolytique, ce qui induit son export vers le cytoplasme en cas de stress cellulaire (Li et al., 2003). Mdm2 régule également sa propre dégradation en s'auto-ubiquitylant ou en étant ubiquitylée par l'enzyme PCAF (p300-CBP-associated factor) (Fang et al., 2000; Linares et al., 2007). Ces mécanismes sont contrebalancés par l'activité des enzymes de déubiquitylation USP2 (déubiquityle Mdm2) et USP7 (déubiquityle Mdm2 et p53) (Cummins et al., 2004; Stevenson et al., 2007). En plus de Mdm2, p53 est régulée par d'autres E3s ce qui illustre l'importance de l'ubiquitylation dans des phénomènes de régulation.

2- Le mécanisme d'ubiquitylation

a- L'ubiquitine

L'ubiquitylation consiste en la liaison d'une ubiquitine sur une protéine cible. L'ubiquitine est une petite protéine de 8,5 kDa et de 76 acides aminés qui tire son nom de sa présence ubiquitaire dans toutes les cellules eucaryotes (Figure 1) (Schlesinger et al., 1975). Sa séquence est hautement conservée avec seulement trois acides aminés différents entre la levure bourgeonnante et l'Homme. L'ubiquitine est présente dans le cytoplasme et dans le noyau avec environ 8×10^7 molécules par cellule humaine (Kaiser et al., 2011). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'ubiquitine est encodée sous forme de précurseurs par quatre gènes. Les gènes *UBI1*, *UBI2* et *UBI3* encodent l'ubiquitine en fusion avec les protéines du ribosome L40 et S31 (Finley et al., 1989). Le gène *UBI4*, qui est essentiel à la résistance au stress, encode pour une répétition en tandem de six ubiquitines (Finley et al., 1987; Özkaynak et al., 1984). L'activité des enzymes de déubiquitylation (ou DUBs) est essentielle pour synthétiser l'ubiquitine à partir de ces précurseurs.

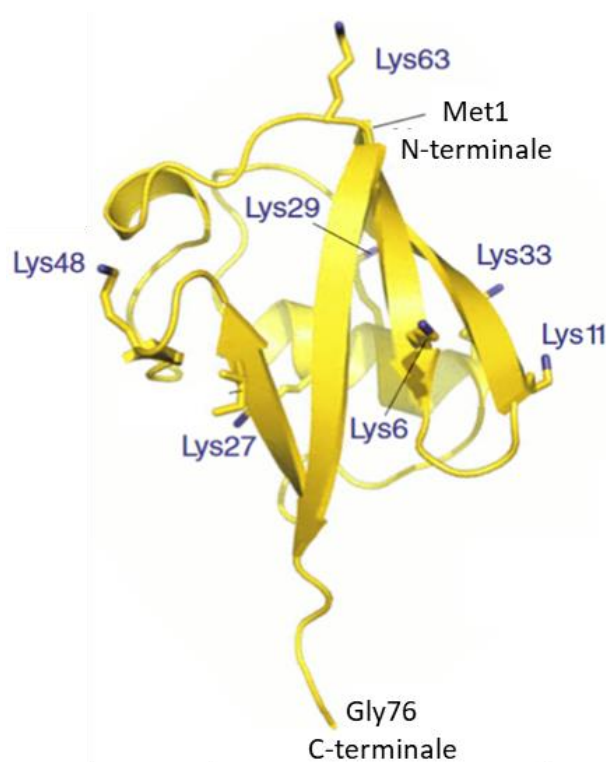


Figure 1 : Structure de l'ubiquitine.

Diagramme en ruban de la molécule d'ubiquitine (ID : 1UBQ). Les positions des sept lysines, de la glycine C-terminale (Gly76) et de la méthionine N-terminale sont mises en évidence par une représentation en bâton.

Figure adaptée de Traub et Lukacs, 2007.

L'ubiquitine est une protéine globulaire qui grâce à sa queue C-terminale saillante peut être liée de façon covalente et réversible à une lysine d'une protéine cible (Figure 1). Cette modification post-traductionnelle est appelée ubiquitylation (Busch and Goldknopf, 1981; Vijay-Kumar et al., 1985). Outre l'ubiquitine, chez l'Homme, il existe 17 ubiquitin-like protéines (Ubl) connues pour être conjuguées à d'autres protéines. Toutes les Ubls présentent leur propre machinerie enzymatique et sont impliquées dans des fonctions distinctes (Schulman and Harper, 2009). Par exemple, la protéine SUMO (Small ubiquitin-related modifier) se lie à une lysine d'une protéine par un mécanisme proche de l'ubiquitylation, appelé sumoylation.

b- La réaction d'ubiquitylation

L'ubiquitylation est un mécanisme en trois étapes qui met en jeu différentes familles d'enzymes appelées : E1s (enzymes d'activation de l'ubiquitine), E2s (enzymes de conjugaison de l'ubiquitine) et E3s (enzymes de ligation de l'ubiquitine ou ubiquitine ligases) (Hershko et al., 1983).

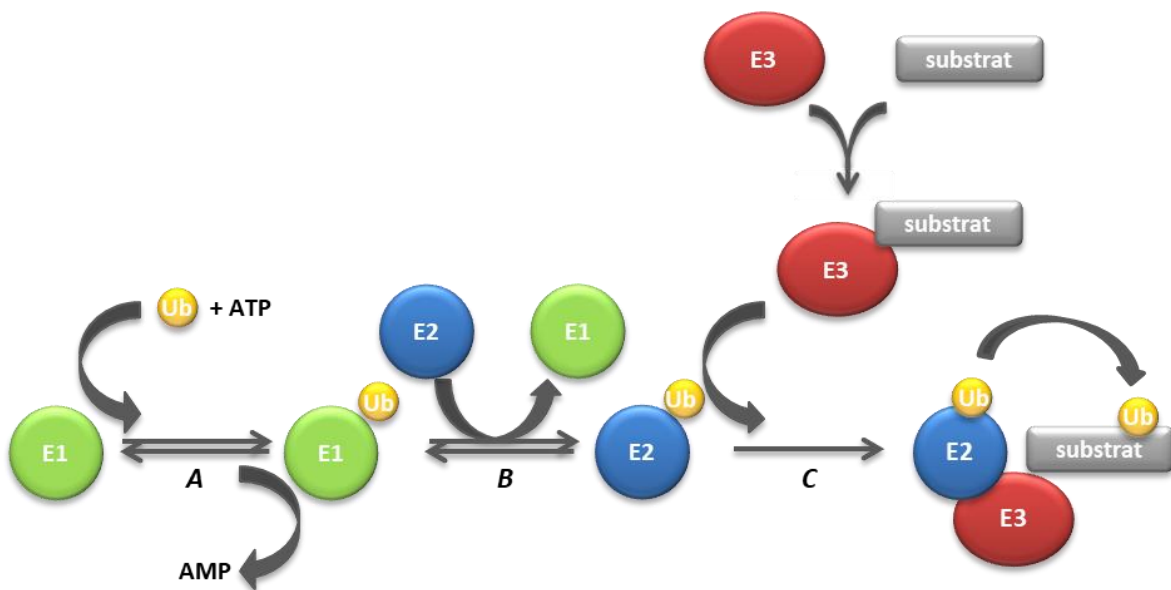


Figure 2 : Le mécanisme d'ubiquitylation.

L'ubiquitylation est un mécanisme catalysé par trois types d'enzymes.

(A) L'E1, enzyme d'activation de l'ubiquitine, active l'ubiquitine de manière ATP dépendante.

(B) L'ubiquitine active est transférée à l'E2, enzyme de conjugaison.

(C) L'E2 interagit avec une E3, enzyme de ligation, qui permet le transfert de l'ubiquitine sur le substrat.

Ub : ubiquitine

Introduction

Dans la première étape d'activation, qui nécessite une molécule d'ATP, l'E1 forme une liaison thioester avec la glycine C-terminale de l'ubiquitine (Gly76) (Figure 2.A). Cela entraîne un changement de conformation qui permet l'activation de l'ubiquitine (Ciechanover et al., 1981). Ensuite, l'ubiquitine activée est transférée sur une cystéine du site actif d'une E2 (Figure 2.B) (Haas et al., 1982). Puis, l'E3 est recrutée et définit la spécificité de l'attachement de l'ubiquitine au substrat (Figure 2.C) (Hershko et al., 1983). L'énergie stockée dans la liaison thioester permet la conjugaison de l'ubiquitine à une protéine cible. La dernière glycine de l'ubiquitine est alors liée de manière covalente à un résidu lysine de la protéine cible par la formation d'une liaison isopeptidique (Figure 3). L'ubiquitylation peut aussi avoir lieu en position amino-terminale, grâce au groupement NH₂ du premier acide aminé du substrat ou dans des cas très particuliers sur des cystéines, sérines ou thréonines (Breitschopf et al., 1998; Cadwell and Coscoy, 2005).

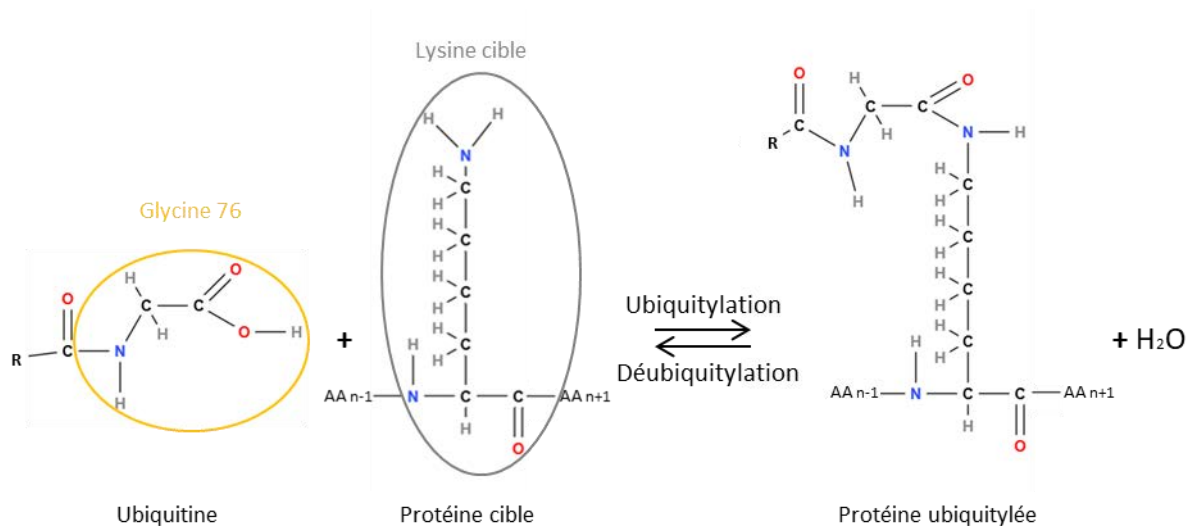


Figure 3 : Les réactions d'ubiquitylation et de déubiquitylation.

Au cours de l'ubiquitylation, une liaison isopeptidique est formée entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine (Gly76) et une lysine de la protéine cible. La déubiquitylation consiste en l'hydrolyse de cette liaison. AA_{n-1} et AA_{n+1} représentent respectivement les acides aminés avant et après la lysine destinée à être ubiquitylée.

Structure générée et adaptée à partir du logiciel Molview (<http://molview.org>).

c- Enzymes impliquées

Enzymes d'activation de l'ubiquitine (E1s)

Les enzymes E1s sont impliquées dans tous les mécanismes de liaison d'une ubiquitine ou d'une ubiquitine-like protéine à une protéine cible. Ici, nous nous intéresserons spécifiquement aux E1s impliquées dans la première étape de l'ubiquitylation permettant l'activation de l'ubiquitine. Les E1s impliquées dans l'ubiquitylation sont des protéines monomériques de 110 à 120 kDa qui contiennent trois domaines : (1) le domaine d'adénylation qui lie l'ATP et l'ubiquitine, (2) le domaine catalytique à cystéine (CCD) qui contient la cystéine du site actif et (3) le domaine C-terminal ubiquitin-fold (UFD) qui recrute l'E2 spécifique (Lee and Schindelin, 2008; Smith et al., 2016). Il existe deux E1s chez l'Homme (Uba1 et Uba6) qui partagent seulement 40 % d'identité de séquence. Uba1 et Uba6 ont été montrées comme pouvant activer *in vivo* différentes Ubls, respectivement NEDD8 et FAT10 (Bialas et al., 2015; Chiu et al., 2007; Leidecker et al., 2012). Chez la levure, Uba1 fonctionne seule et est essentielle. L'arginine 72 chez l'ubiquitine ou l'alanine 72 chez les autres Ubls permettent aux E1s de différencier l'ubiquitine des autres Ubls (Whitby et al., 1998).

L'activation de l'ubiquitine par l'E1 est un mécanisme en trois étapes (Figure 4). Premièrement, l'ubiquitine interagit avec le domaine d'adénylation en présence d'ATP pour être adénylée. Un changement de conformation permet à la cystéine du site actif de l'E1 de former une liaison thioester avec l'ubiquitine. Une seconde ubiquitine peut alors se lier au domaine d'adénylation et être adénylée. Deux molécules d'ubiquitine se retrouvent liées à la même E1, une de manière covalente au niveau du site actif et l'autre de manière non-covalente au domaine d'adénylation. L'E1 doublement chargée peut alors s'associer via son domaine UFD à une E2 et transférer l'ubiquitine de son site actif sur le site actif de l'E2 (Schulman and Harper, 2009).

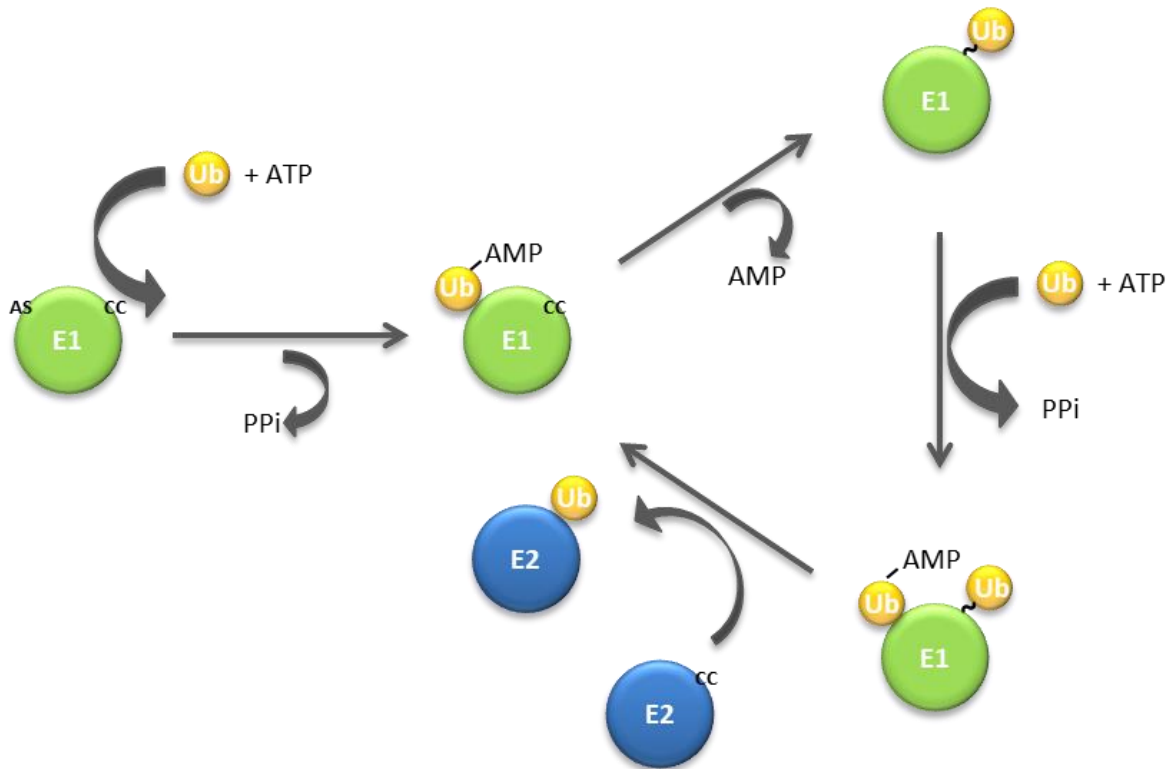


Figure 4 : Fonctionnement de l'enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1).

L'activation de l'ubiquitine par l'E1 est un mécanisme en trois étapes. Premièrement, l'ubiquitine interagit avec le site d'adénylation en présence d'ATP pour être adénylée. La cystéine du site actif de l'E1 forme alors une liaison thioester avec l'ubiquitine. Une seconde ubiquitine peut alors se lier au site d'adénylation et être adénylée. Enfin, l'E1 doublement chargée s'associe via son domaine UFD à une E2 et transfère l'ubiquitine de son site actif sur le site actif de l'E2.

Ub : ubiquitine

AS : site d'adénylation

cc : cystéine catalytique

~ : liaison thioester

PPi : pyrophosphate inorganique

Introduction

Enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (E2s)

Les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine se trouvent au centre de la réaction d'ubiquitylation. Elles interagissent avec les E1s liées à l'ubiquitine activée et avec les E3s. Après le chargement de l'ubiquitine, l'E1 subit un changement de conformation qui entraîne l'interaction avec une E2 et la formation d'une liaison thioesther entre l'ubiquitine et la cystéine du site actif de l'E2 (Haas et al., 1982). Les E2s permettent un transfert de l'ubiquitine de l'E1 vers le substrat en utilisant le même site d'interaction pour l'E1 et l'E3 (Eletr et al., 2005). Les E2s sont caractérisées par un domaine de liaison de l'ubiquitine (UBC) d'environ 150 à 200 acides aminés qui comprend la cystéine du site actif et permet la liaison de l'ubiquitine, mais aussi de l'E1 et l'E3 (Burroughs et al., 2008). Malgré leurs similarités, les E2s sont impliquées dans des fonctions biologiques distinctes. Les E2s sont classifiées en fonction de la présence ou non de domaine additionnel à l'UBC. Les E2s sans domaine supplémentaire constituent la classe I, celles avec une extension N-terminale ou C-terminale forment respectivement la classe II et III et les E2s avec les deux types d'extensions composent la classe IV (van Wijk and Timmers, 2010). Ces extensions peuvent contribuer à la reconnaissance du substrat par l'E2 ou à l'association avec l'E3. Par exemple, l'extension C-terminale hautement acide de Rad6 (aussi appelée Ubc2) permet une interaction *in vitro* avec des substrats basiques comme les histones (Sung et al., 1988). Les extensions peuvent aussi avoir un rôle dans la localisation cellulaire comme pour Ubc6 qui contient un domaine hydrophobe transmembranaire dans son domaine C-terminal, ce qui permet sa localisation au niveau du réticulum endoplasmique (Sommer and Jentsch, 1993).

Chez l'Homme, il existe une trentaine d'E2s réparties dans le génome et exprimées de manière ubiquitaire. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il n'existe que 13 E2s, aussi appelées Ubc (pour UBiquitin Conjugating) (Pickart, 2001). Ubc9 et Ubc12 ne conjuguent pas l'ubiquitine, mais des Ubls, appelées respectivement Smt3 (homologue de SUMO) et Rub1 (homologue de NEDD8) (Johnson and Blobel, 1997; Liakopoulos et al., 1998).

Les interactions E2/E3 sont souvent faibles et transitoires avec des constantes de dissociation proche du micromolaire. Une E2 peut coopérer avec plusieurs E3s pour participer à l'ubiquitylation de différents substrats et une E3 peut utiliser différentes E2s pour attacher différents types de signaux d'ubiquitylation sur un même substrat (Figure 5). Par exemple, le régulateur transcriptionnel MAT α 2 peut être ubiquitylé par quatre E2s différentes (Ubc4, Ubc5, Ubc6 et Ubc7) (Chen et al., 1993). Les E2s peuvent aussi opérer de façon séquentielle afin de poly-ubiquityler un substrat comme c'est le cas pour le complexe de promotion de

Introduction

l'anaphase (APC/C pour anaphase promoting complex/cyclosome) qui utilise Ubc4 pour modifier ses substrats et Ubc1 pour allonger leurs chaînes d'ubiquitine (Rodrigo-Brenni and Morgan, 2007). Les E2s jouent un rôle important dans le type de chaîne d'ubiquitylation attachée au substrat. Par exemple, Ubc13 est connue pour entraîner la formation de signaux d'ubiquitylation non-protéolytique (Hodge et al., 2016). Le type d'ubiquitylation assemblé est crucial pour le destin de la protéine cible comme il sera discuté dans la partie I-2-d « Les différents types d'ubiquitylation et leurs fonctions ».

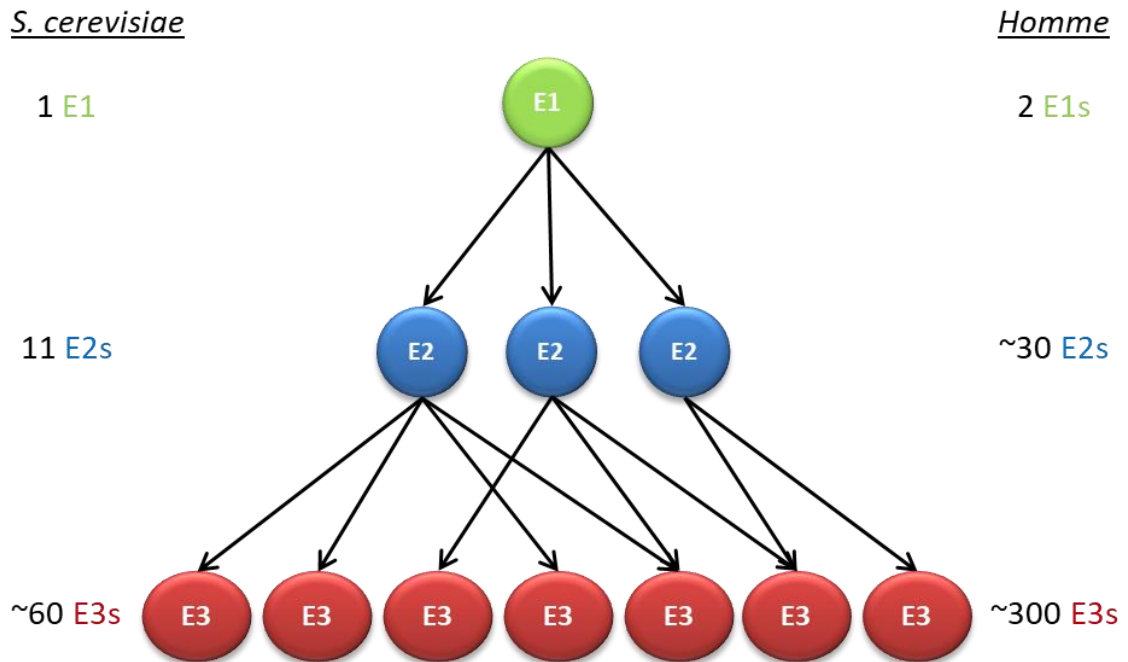


Figure 5 : Représentation du réseau d'enzymes d'ubiquitylation.

Le nombre de chaque type d'enzymes (E1, E2 et E3) chez l'Homme et *Saccharomyces cerevisiae* est indiqué.

Enzymes de ligation (E3s)

Les enzymes d'ubiquitylation sont organisées en réseau à la complexité croissante, puisqu'une E1, onze E2s et une soixantaine d'E3s ont été identifiées chez la levure. Chez l'Homme, il existe plus de 300 E3s pour une trentaine d'E2s (Figure 5). Les E3s peuvent être des protéines monomériques ou des complexes multi-protéiques. Les 300 E3s comptabilisent seulement les protéines capables d'interagir avec des E2s, mais il existe en tout plus de 600 gènes codants pour des E3s ou des adaptateurs d'E3 chez l'Homme. Grâce à leur nombre, les E3s jouent un rôle essentiel dans la spécificité de la réaction en recrutant les substrats à ubiquityler. Les E3s sont réparties en trois familles : RING (Really Interesting New Gene), HECT (Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus) et RBR (RING-in-Between-RING).

Les E3s de la famille RING sont majoritaires et comportent un domaine RING ou un domaine apparenté comme par exemple le domaine U-box. Les E3s de type RING sont au nombre de 46 chez la levure dont deux protéines U-box (Prp19 et Ufd2). Elles ne possèdent pas d'activité catalytique leur permettant de former un intermédiaire covalent avec l'ubiquitine contrairement aux E3s de type HECT. Le domaine RING se lie à l'E2 et induit des changements structuraux qui permettent le transfert de l'ubiquitine de l'E2 directement au substrat (Figure 6.A) (Özkan et al., 2005). La reconnaissance de la protéine cible se fait généralement par le domaine de liaison au substrat ou en recrutant un adaptateur pour former un complexe multi-protéique RING comme c'est le cas par exemple pour la sous-famille des Cullines.

Les E3s de type HECT ont été nommées d'après leur premier membre découvert : E6-AP (Huibregtse et al., 1995). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il existe cinq E3s de type HECT : Rsp5, Ufd4, Hul4, Hul5 et Tom1. Ces enzymes de ligation sont caractérisées par un domaine HECT d'environ 350 acides aminés contenant une partie N-terminale qui lie l'E2 et un site actif en C-terminal (Huang et al., 1999). Les ubiquitine ligases de type HECT forment une liaison thioesther avec l'ubiquitine grâce à un résidu cystéine conservé présent dans le site actif et la transfèrent ensuite sur la lysine du substrat (Figure 6.B).

Les ligases RBR allient les deux mécanismes de ligation RING et HECT (Wenzel et al., 2011). Chez la levure, il existe deux ligases RBR : Hel1 et Itt1 (Eisenhaber et al., 2007). Ces E3s lient l'E2 avec un domaine RING et transfèrent l'ubiquitine sur le site actif cystéine d'un autre domaine RING (Figure 6.C). Elles forment donc un intermédiaire E3~ubiquitine avant de transférer l'ubiquitine sur leurs substrats.

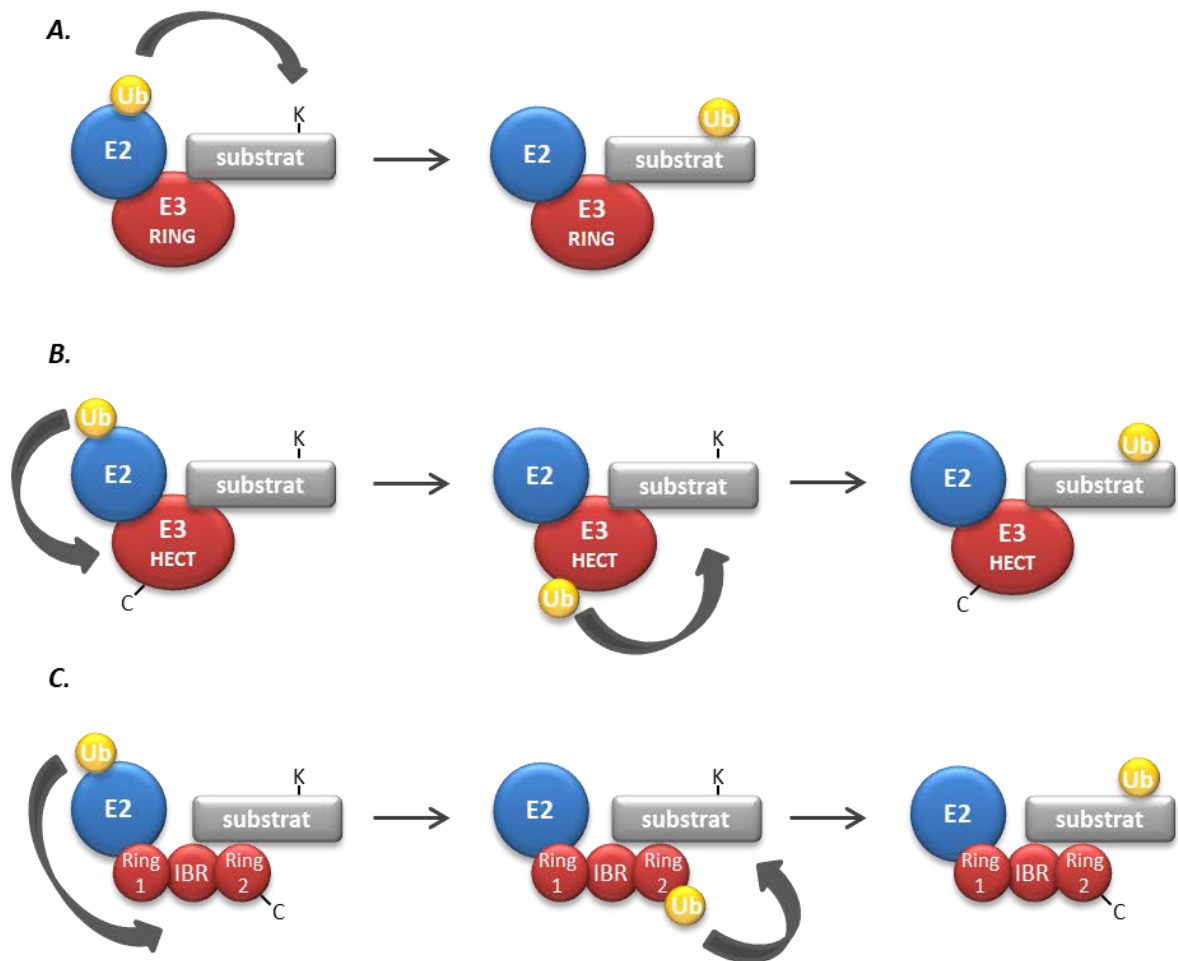


Figure 6 : Mécanisme de transfert de l'ubiquitine dans les différentes familles d'E3s.

(A) Les E3s de type RING se lient à l'E2 et induisent le transfert direct de l'ubiquitine sur le substrat.

(B) Après liaison à l'E2, les E3s de type HECT transfèrent d'abord l'ubiquitine sur une cystéine de leur domaine catalytique puis sur la lysine cible du substrat.

(C) Les E3s de type RBR lient l'E2 et transfèrent l'ubiquitine sur une cystéine d'un autre domaine RING puis sur la lysine cible du substrat.

K : lysine cible

C : cystéine du domaine catalytique

Enzymes de déubiquitylation (DUBs)

L'ubiquitylation est un mécanisme réversible, l'hydrolyse de la liaison ubiquitine est catalysée par les enzymes de déubiquitylation (DUBs) (Figure 3). Les DUBs permettent de retirer l'ubiquitine ou les chaînes d'ubiquitine des protéines cibles par hydrolyse de la liaison ubiquitine-substrat. Les 20 DUBs existantes chez la levure sont réparties en quatre familles selon leur structure et leur mécanisme catalytique : les USPs, comprenant 16 DUBs, les OTUs, avec deux DUBs, et un membre dans chacune des familles JAMM et UCH (Hutchins et al., 2013). Ces enzymes sont des protéases à thiol sauf celles de la famille JAMM, comme Rpn11 chez la levure, qui sont des métalloprotéases (Yao and Cohen, 2002).

Les protéases à thiol, ou protéases à cystéine, sont caractérisées par trois résidus (cystéine, histidine et aspartate) qui forment la triade catalytique (Bazan and Fletterick, 1988). L'activité enzymatique de ces protéases repose sur le groupement thiol de la cystéine du site actif qui par le biais d'une attaque nucléophile va permettre la formation d'une liaison covalente entre la DUB et la molécule d'ubiquitine. Une réaction de cet intermédiaire avec une molécule d'eau permet le recyclage de la DUB et de l'ubiquitine. Le mécanisme d'activation des métalloprotéases est différent, elles utilisent généralement une molécule d'eau polarisée liée à un ion Zn^{2+} pour générer un intermédiaire non-covalent avec le substrat (Nijman et al., 2005).

La spécificité de chaque DUB est due d'une part à la reconnaissance du substrat ubiquitylé, mais aussi à la reconnaissance conformationnelle des chaînes d'ubiquitine. En effet, les DUBs peuvent catalyser l'hydrolyse spécifique de certains types d'ubiquitylation. Par exemple AMSH (Associated Molecule with the SH3 domain of STAM) hydrolyse des signaux non-protéolytiques et n'affecte pas les signaux protéolytiques *in vitro* (plus exactement AMSH hydrolyse les chaînes K63, mais pas les chaînes K48 (McCullough et al., 2006). Les types de chaîne d'ubiquitine seront décrits en détail dans le chapitre I-2-d « Polyubiquitylation ». La reconnaissance des protéines cibles se fait par des domaines d'interaction protéique hors du domaine catalytique (Nijman et al., 2005). D'autres mécanismes, comme la localisation et l'interaction avec des partenaires, peuvent favoriser une spécificité de substrat. De plus, la régulation est essentielle car de nombreuses DUBs sont actives dès leur synthèse, hormis les UCHs et les USPs qui deviennent actives uniquement en présence d'ubiquitine. La régulation a lieu au niveau transcriptionnel et aussi post-transcriptionnel par l'intermédiaire de co-facteurs ou de PTMs comme la phosphorylation (Reiley et al., 2005).

Introduction

Les fonctions des enzymes de déubiquitylation sont diverses. Comme mentionné précédemment, les DUBs sont essentielles pour synthétiser l'ubiquitine libre à partir de ces précurseurs produits par les gènes *UBI1*, *UBI2*, *UBI3* et *UBI4*. Les DUBs ont aussi une fonction importante dans le recyclage de l'ubiquitine en déubiquitylant les protéines avant leur dégradation par le protéasome ce qui participe au maintien du pool constant d'ubiquitine libre (Swaminathan et al., 1999). Les DUBs sont aussi un moyen de corriger spécifiquement l'ubiquitylation d'une protéine ou d'antagoniser l'action d'une ubiquitine ligase et, par conséquent, de réguler le destin de la protéine cible.

d- Les différents types d'ubiquitylation et leurs fonctions

Il existe plusieurs types de modifications post-traductionnelles effectuées à partir de l'ubiquitine. La monoubiquitylation, la multi-monoubiquitylation et la polyubiquitylation diffèrent par le nombre d'ubiquitines ajoutées à la protéine cible. Cette large variété de modifications possibles par ubiquitylation est impliquée dans différents signaux cellulaires et forme le « code ubiquitine » (Komander and Rape, 2012). Dans des cellules de mammifères en culture, il a été estimé que 25 % de l'ubiquitine est présente sous forme non-conjuguée, 65 % sur des substrats monoubiquitylés et 11 % présentes sous forme de chaîne de polyubiquitine (Figure 7) (Kaiser et al., 2011).

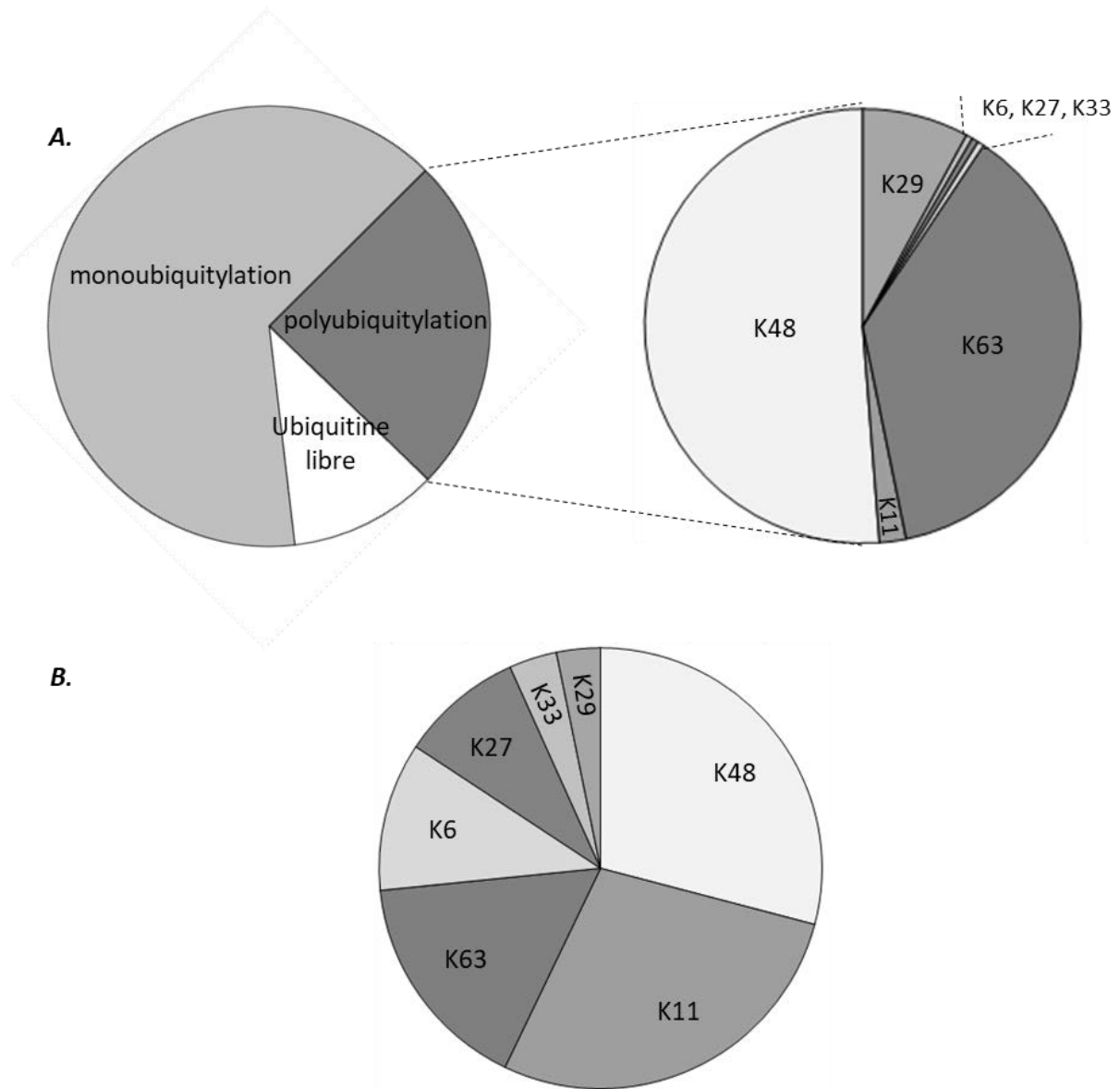


Figure 7 : Estimation de la répartition des pools d'ubiquitine.

(A) Dans des cellules de mammifères HEK293
(d'après Kaiser et al., 2011 et Dammer et al., 2011)

(B) Chez *Saccharomyces cerevisiae*
(d'après Xu et al., 2009)

Introduction

Monoubiquitylation et multi-monoubiquitylation

La monoubiquitylation correspond à l'attachement d'une seule ubiquitine à une protéine cible. Plusieurs lysines d'une même protéine peuvent aussi être ubiquitylées, on parle dans ce cas de multi-monoubiquitylation. La monoubiquitylation peut influencer l'activité des substrats ou leur localisation. Elle joue un rôle majeur dans de nombreux processus cellulaires essentiels comme par exemple la régulation des histones, la régulation de la transcription, l'endocytose ou encore la réparation de l'ADN (Nakagawa and Nakayama, 2015). La monoubiquitylation sert aussi de signal pour l'internalisation de protéines membranaires qui seront ensuite dégradées par le lysosome (Davies et al., 2009). Bien que ça ne soit pas leur rôle principal, la multi-monoubiquitylation, mais aussi la monoubiquitylation peuvent conduire à la dégradation par le protéasome (Boutet et al., 2007; Lu et al., 2015).

Polyubiquitylation

L'ubiquitine possède sept lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63) et une méthionine N-terminale (M1) qui peuvent elles-mêmes être des substrats pour l'ubiquitylation (Figure 1). L'addition successive de plusieurs ubiquitines peut alors former différents types de chaîne d'ubiquitine en fonction de la lysine de l'ubiquitine qui est utilisée. Si le substrat est modifié par des ubiquitines reliées par les mêmes résidus lysines, une chaîne homogène d'ubiquitine (aussi appelée chaîne homotypique) est formée. Si des lysines différentes sont utilisées dans une même chaîne d'ubiquitine, il s'agit d'une chaîne mixte (aussi appelée hétérotypique) ou branchée (Figure 8). Les chaînes mixtes jouent un rôle lors de l'endocytose et du signal immunitaire (Boname et al., 2010; Emmerich et al., 2013). Dans le cas des substrats du complexe APC/C, les chaînes branchées sont utiles pour améliorer leur reconnaissance par le protéasome (Meyer and Rape, 2014). Néanmoins, les substrats étant peu connus, les rôles des chaînes mixtes et branchées sont jusqu'ici mal décryptés dû notamment à un manque d'outils pour les étudier. Cette diversité de chaînes de poly-ubiquitine homotypiques ou hétérotypiques participe à la complexité du code ubiquitine.

Monoubiquitylation :

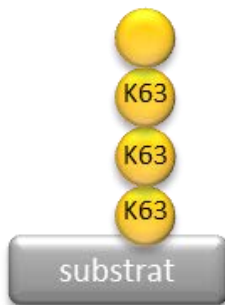


Multi-monoubiquitylation :

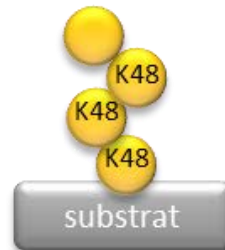


Polyubiquitylation homotypique :

Chaîne à la conformation ouverte
Ex : K63

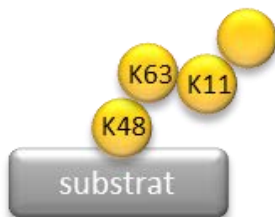


Chaîne à la conformation compacte
Ex : K48



Polyubiquitylation hétérotypique :

Chaîne mixte



Chaîne branchée



Figure 8 : Classification des différents types d'ubiquitylation.

Introduction

La quantité de chaque type de chaîne dépend de l'organisme et du type cellulaire. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'abondance de chaque liaison est de 29 % de chaîne K48, 28 % de K11, 16 % de K63, 11 % de K6, 9 % de K27 et un peu plus de 3 % de K33 et K29 (Figure 7.B) (Xu et al., 2009). Dans des cellules rénales embryonnaires humaines (lignée HEK293), les chaînes K48 et K63 sont les plus représentées (Figure 7.A) (Meierhofer et al., 2008). Il est intéressant de noter que l'abondance de chaque liaison est variable en fonction de l'espèce mais aussi du tissu et du stade de développement (Kaiser et al., 2011).

Certaines chaînes adoptent une conformation compacte, par exemple les chaînes K48 ou K11, ou une structure ouverte comme les chaînes K63 ou M1 (Figure 8). Ces différents types de conformation impactent leur reconnaissance et donc leur rôle. Par exemple, les chaînes K48 sont associées à la dégradation des protéines par le protéasome (Meierhofer et al., 2008; Xu et al., 2009). Une chaîne K48 de quatre ubiquitines a longtemps été pensée comme étant la longueur de chaîne idéale pour l'adressage au protéasome, mais des études récentes suggèrent que le nombre de chaînes K48 est plus important que la longueur de la chaîne (Lu et al., 2015; Thrower et al., 2000). Par exemple, la cycline B1 est dégradée plus rapidement lorsqu'elle est modifiée par deux chaînes K48 de di-ubiquitine que lorsqu'elle n'a qu'une seule chaîne K48 formée de quatre ubiquitine. Par ailleurs, les chaînes K63 régulent plutôt la signalisation cellulaire de manière non-protéolytique (Spence et al., 1995). Des exemples de rôles liés à chaque type d'ubiquitylation sont présentés dans le Tableau 1.

<i>Types de chaîne</i>	<i>Exemple de fonctions et E3s associées</i>
Met1	<ul style="list-style-type: none"> - Activation de la voie NF-κB (LUBAC) - Mort cellulaire (LUBAC) - Assemblage de l'inflammasome (LUBAC)
K6	<ul style="list-style-type: none"> - Réparation des dommages à l'ADN (BRCA1) - Mitophagie (Parkin)
K11	<ul style="list-style-type: none"> - Régulation du cycle cellulaire par dégradation de substrat (APC/C) - Adaptation cellulaire à l'hypoxie (CRL2^{VHL})
K27	<ul style="list-style-type: none"> - Recrutement d'intermédiaire en réponse aux dommages à l'ADN grâce à la polyubiquitylation de l'histone 2A (RNF168) - Réponse immunitaire (AMFR) - Régulation de la sécrétion protéique et du flux autophagique (HACE1)
K29	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition de la voie de signalisation Wnt (SMURF1) - Dégradation via le protéasome (UBE3C)
K33	<ul style="list-style-type: none"> - Signal anti-apoptotique (AREL1) - Trafic membranaire post-Golgi (CUL3^{KLHL20}) - Régulation négative du récepteur TCR (Cbl-b et Itch)
K48	<ul style="list-style-type: none"> - Dégradation médiée par le protéasome (E6-AP, SCF, gp78...) - Régulation de la voie NF-κB (SCF^{βTRCP}) - Régulation du cycle cellulaire (SCF^{skp2})
K63	<ul style="list-style-type: none"> - Endocytose de récepteurs membranaires (CBL) - Immunité innée (TRAF6) - Réponses aux dommages à l'ADN (RNF8)

Tableau 1 : Types de chaînes d'ubiquitine et exemple de rôles associés.

Les E3s impliquées dans chaque type de chaînes chez les mammifères sont indiquées en gras. (Akutsu et al., 2016; Swatek and Komander, 2016)

3- L'implication de l'ubiquitylation dans des pathologies humaines

Tel que mentionné dans le paragraphe précédent, les ubiquitylations protéolytiques et non-protéolytiques sont impliquées dans la régulation de nombreux processus cellulaires. Une dérégulation héréditaire ou acquise du système ubiquitine-protéasome peut donc avoir d'importantes conséquences au niveau de la cellule et provoquer de nombreuses maladies chez l'Homme (Petroski, 2008; Popovic et al., 2014). La plupart des mutations du système ubiquitine-protéasome associées à des maladies sont liées à une perte de fonction, cependant, des mutations de gain de fonction ont également été identifiées. Ces mutations peuvent conduire à une sur-activation ou une sous-activation d'une voie de signalisation, une diminution de l'interaction entre deux partenaires protéiques, une mauvaise localisation cellulaire ou encore à une accumulation de protéines.

De par ses fonctions dans la prolifération cellulaire notamment, la dérégulation de l'ubiquitylation est premièrement associée à de multiples types de cancers. Par exemple, la régulation du suppresseur de tumeurs p53, mentionnée précédemment, est cruciale pour le maintien de l'intégrité du génome. La balance entre ubiquitylation et déubiquitylation de p53 et ses partenaires a un rôle essentiel dans l'apparition de cancers (Cummins et al., 2004; Fang et al., 2000; Honda et al., 1997). Grâce à leur spécificité dans le système ubiquitine-protéasome, les ubiquitines ligases sont des cibles thérapeutiques intéressantes, mais leur action auprès de plusieurs substrats rend leur inhibition plus difficile. En effet, les E3s peuvent agir à la fois en tant que suppresseur de tumeur et en tant qu'oncogène. Par exemple, le complexe SCF cible à la fois des gènes suppresseurs de tumeurs (p21, p27,...), mais aussi des oncogènes (c-Myc,...) pour qu'ils soient dégradés par le protéasome (Kitagawa et al., 2009). Certaines DUBs jouent aussi un rôle dans la formation de tumeurs (Pereg et al., 2010; Schwickart et al., 2010). Par exemple, la DUB CYLD régule négativement la voie de signalisation NF- κ B en déubiquitylant plusieurs de ses acteurs. Des mutations de cette DUB sont associées au syndrome de Brooke–Spiegler prédisposant à des cancers de la peau.

L'ubiquitylation joue aussi un rôle important dans les maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson, d'Alzheimer ou d'Huntington caractérisées par la formation d'agrégats protéiques (Bennett et al., 2007; Kitada et al., 1998; Tai et al., 2012). En effet, une diminution de l'activité du protéasome ou d'une ubiquitine ligase amène une diminution de l'ubiquitylation et de la dégradation de protéines qui peut aboutir à la formation toxique d'agrégats. Par exemple, la ligase Parkin ubiquityle l' α -synucléine ce qui entraîne sa

Introduction

dégradation. Dans la maladie de Parkinson, une perte de fonction de Parkin entraîne une augmentation de la stabilité de l' α -synucléine ce qui favorise son agrégation et la mort des neurones dopaminergiques (Kitada et al., 1998). Certaines DUBs sont aussi impliquées dans des maladies neurodégénératives (Cartier et al., 2012; Das et al., 2006).

Des défauts dans l'ubiquitylation peuvent aussi altérer la voie de signalisation NF- κ B causant des troubles immunitaires (Boisson et al., 2012), être responsable d'une sous régulation du récepteur à l'insuline induisant une résistance à l'insuline (Rui et al., 2002) ou encore entraîner une dégradation excessive des protéines globales et en particulier du muscle pouvant causer une atrophie musculaire (Lecker et al., 1999).

Par ailleurs, les virus peuvent détourner le système ubiquitine protéasome pour faciliter leur propre propagation comme c'est le cas pour le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) ou l'hépatite B. Par exemple, deux protéines codées par le VIH, VIF et VPU, interagissent avec des ubiquitine ligases pour détourner leurs activités et favoriser l'ubiquitylation de protéines (Margottin et al., 1998; Yu et al., 2003). Des exemples de maladie impliquant le système ubiquitine-protéasome sont listés dans le Tableau 2.

<i>Pathologies :</i>	<i>Enzymes impliquées :</i>	<i>Substrats d'ubiquitylation</i>	<i>Fonctions de l'ubiquitylation :</i>
Cancers	Mdm2, Usp7	p53	Régulation de la stabilité du suppresseur de tumeur p53
	SCF, APC/C	CDK, p27, p21	Régulation du cycle cellulaire et la sortie de mitose
	A20	TRAF6, RIPK1	Inactivation de la voie NF-κB
	CYLD	Bcl-3	
	Rabex-5	Ras	Régulation de la localisation de Ras
	β-TrCP		Dégradation par le protéasome
	CBL	RTKs	Inactivation des récepteurs à tyrosine kinases
	IAPs	NIK	Régulation négative de la voie NF-κB
	BRCA1	Histones, ERα, NPM1, RPB1, TFIIIE, ...	Réparation des cassures double-brin
	RNF8, RNF168	H2A, H2AX	
Maladies associées à une prédisposition aux cancers	Von Hippel Lindau	VCB–Cul2–VHL	Régule la stabilité de HIF-1α empêchant l'angiogenèse
	Anémie de Fanconi	FANCL	Réparation des dommages à l'ADN
	Xeroderma pigmentosum	UV-DDB	
	Syndrome de Cockayne		
	Syndrome de Riddle	RNF168	Réparation des cassures double-brin
Inflammation, Amylopectinose, Infections	LUBAC	NEMO	Régulation de la voie NF-κB
Maladie de Crohn	XIAP	RIP2	Activation de la voie NF-κB
Maladies auto-immune	A20	TRAF6, RIPK1	Sous-régulation de la voie NF-κB
Parkinson	Parkin	Protéines de la membrane externe de la mitochondrie	Mitophagie
	NEDD4	α-synucléine	Régulation de l'α-synucléine
Maladies d'Alzheimer et de Huntington	Traf6, CHIP, Parkin	β-amyloïde, Tau, Huntingtin	Dégradation des agrégats protéiques
Atrophie musculaire	Atrogine	MyoD	Régulation de la quantité de protéines
	Murf1	Myofilaments	
	Trim32	Microfilaments	
Résistance à l'insuline	SOCS1/3, MG53, Fbw8	IRS2, IR, IRS1	Dégradation des récepteurs à l'insuline

Tableau 2 : Exemples de processus d'ubiquitylation dont les défauts sont associés à des maladies chez l'Homme.

Les E3s sont indiquées en noir et les DUBs en bleu (Petroski, 2008; Popovic et al., 2014).

II. L'ubiquitylation dans la régulation de CenH3

1- La chromatine

a- Organisation de la chromatine

Dans les noyaux des cellules eucaryotes, le matériel génétique est organisé sous forme de chromatine formée par l'association de l'ADN à des protéines histones et non-histones. La chromatine joue un rôle structural (en compactant l'ADN dans le noyau) et fonctionnel (en contrôlant l'accessibilité de l'ADN ce qui permet de réguler des processus nucléaires comme la transcription) (Knezetic and Luse, 1986). La chromatine est composée d'une structure répétée dans laquelle l'unité de base est appelée nucléosome. Un nucléosome correspond à l'enroulement d'environ 147 pb autour d'un cœur protéique et d'une région de taille variable appelée région inter-nucléosomale (Kornberg, 1974; Oudet et al., 1975). Le cœur protéique du nucléosome est composé d'un octamère d'histone qui contient deux copies de chacune des quatre histones canoniques H2A, H2B, H3, H4 (Luger et al., 1997). Des expériences de recouvrement de fluorescence après photo-blanchiment (ou FRAP pour Fluorescence Recovery After Photobleaching) sur des cellules de mammifères ont démontré que les histones du cœur protéique, en particulier H3 et H4, sont très stables (Kimura and Cook, 2001). Généralement, l'intégration des histones aux nucléosomes a lieu lors de la réplication de l'ADN pendant le cycle cellulaire.

L'enchaînement des nucléosomes le long de l'ADN sous la forme d'un « collier de perles » forme une fibre de 10 nm qui constitue le premier niveau de compaction de l'ADN (Figure 9). La compaction de cette fibre de 10 nm permet la formation d'un second niveau d'organisation de la chromatine, la fibre de 30 nm. Des structures encore plus compactes sont ensuite mises en place, telles les boucles ou les domaines nucléaires. Le taux de compaction maximal de la chromatine est obtenu dans les chromosomes mitotiques ce qui permet la ségrégation de l'ADN dans des cellules filles lors de la mitose (Figure 9) (Felsenfeld and Groudine, 2003). En plus de sa fonction structurale, la chromatine contrôle l'accès à l'ADN grâce à sa plasticité lors de processus tel que la réplication, la réparation ou la transcription.

Introduction

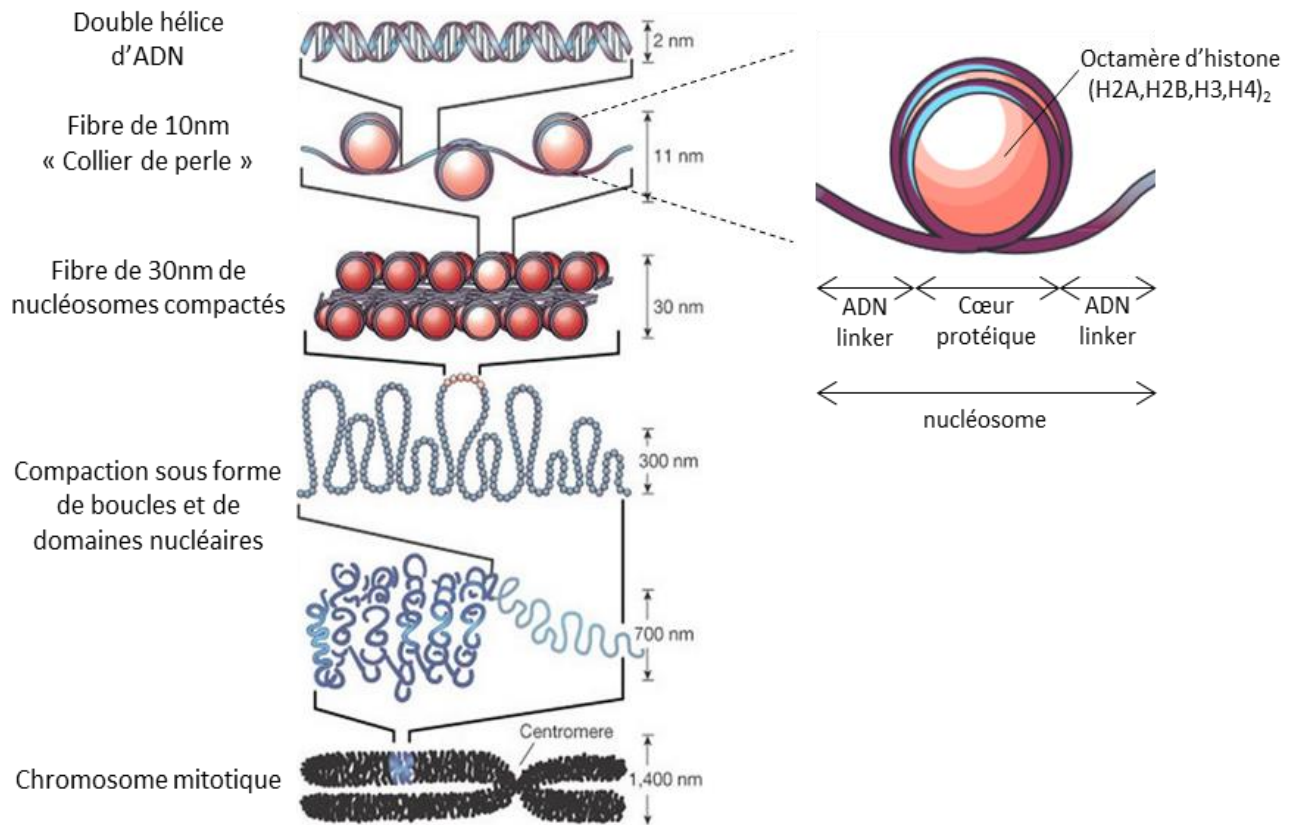


Figure 9 : Niveau d'organisation de la chromatine.

La double hélice d'ADN s'enroule autour de protéines histones pour former les nucléosomes qui s'organisent en fibre de 10nm puis de 30nm. Le dernier niveau de compaction correspond au chromosome mitotique.

(Figure adaptée de Felsenfeld and Groudine, 2003).

b- Plasticité de la chromatine

Facteurs de remodelage de la chromatine

Au cours de la vie d'une cellule, différentes machineries ont besoin d'accéder à l'ADN à travers les protéines de la chromatine. Pour ce faire, différents facteurs protéiques permettent de moduler l'organisation de la chromatine. Parmi eux, les facteurs de remodelage de la chromatine. Grâce à leur activité catalytique ATPase, les facteurs de remodelage sont capables de rompre les contacts ADN-histone et permettent le glissement, la modification ou l'éviction des nucléosomes (Clapier and Cairns, 2009). Ces facteurs de remodelage sont des complexes multi-protéiques recrutés à la chromatine grâce à des domaines capables de reconnaître certaines PTMs présentes au niveau des histones. En régulant l'accessibilité de l'ADN, ces facteurs sont essentiels à de nombreuses fonctions cellulaires.

Modifications post-traductionnelles des histones

En plus de ces facteurs de remodelage, d'autres régulations sont essentielles au contrôle de l'organisation de la chromatine comme par exemple les modifications post-traductionnelles des histones ou l'incorporation dans les nucléosomes de variants d'histones. Ces modifications de la chromatine n'impliquent aucun changement de la séquence d'ADN et sont appelées modifications épigénétiques.

Les histones sont des petites protéines d'environ 15 kDa riches en acides aminés basiques permettant une interaction avec les charges négatives de l'ADN. Les histones sont fortement conservées au cours de l'évolution et se composent de deux domaines : un domaine histone-fold responsable des interactions histone-histone ou histone-ADN et une extrémité amino-terminal fortement basique. Cette extrémité n'est pas structurée et dépasse à l'extérieur du cœur histone ce qui en fait la cible de nombreuses PTMs comme l'acétylation décrit dès 1964 (Allfrey et al., 1964). Il existe plusieurs types de modifications trouvées sur les histones : acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitylation,... (Huang et al., 2014). En changeant la charge électrostatique des histones, ces modifications jouent un rôle dans la structure de la chromatine et l'activité des gènes. De manière générale, l'acétylation des lysines des histones est associée à des gènes activement transcrits alors que le rôle des méthylations est plus variable (Shogren-Knaak et al., 2006). Les combinaisons de différentes PTMs sur la queue N-terminale des histones ont conduit à l'hypothèse d'une régulation grâce à un « code histone » (Strahl and Allis, 2000).

Introduction

Variants d'histones

Les histones majoritairement présentes au niveau des nucléosomes et intégrées au cours de la réplication sont appelées histones canoniques. Elles peuvent, dans certaines situations, être remplacées par des variants d'histones qui diffèrent des histones canoniques par leur séquence en acides aminés et confèrent de nouvelles propriétés aux nucléosomes. Les histones sont incorporées ou enlevées des nucléosomes grâce à l'interaction avec des chaperons d'histones. Les variants d'histone possèdent un domaine de repliement similaire à celui des histones canoniques, ils peuvent donc remplacer l'histone canonique correspondante dans l'octamère du nucléosome. Les variants d'histones sont présents chez tous les organismes eucaryotes. Chez l'Homme, il existe plusieurs variants de H2A, H2B et H3. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il n'en existe que deux : H2A.Z^{Htz1}, un variant de H2A qui régule l'activité transcriptionnelle, et Cse4, un variant de H3, qui permet la détermination du centromère (Jackson et al., 1996; Stoler et al., 1995).

c- La chromatine centromérique

Détermination épigénétique du centromère

Chez tous les eucaryotes, le centromère est le site d'attachement entre les chromatides sœurs et les microtubules. Le rôle essentiel du centromère est d'assurer une ségrégation correcte des chromosomes dupliqués lors de la mitose et de la méiose. La composition et la taille de l'ADN centromérique sont très variables d'une espèce à une autre. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les centromères sont génétiquement définis et composés de 120 pb divisées en trois parties appelées CDE (Centromere DNA Element) I, CDEII et CDEIII (Clarke and Carbon, 1980, 1983; Fitzgerald-Hayes et al., 1982). Chez les eucaryotes multicellulaires, le centromère peut atteindre des dizaines de mégabases (Schueler et al., 2001). La grande variabilité de l'ADN centromérique suggère que la fonction et la position du centromère ne sont pas déterminées par la séquence nucléotidique, mais plutôt par un mécanisme épigénétique.

La caractéristique commune à tous les centromères est la présence d'un variant d'histone centromérique, CenH3, aussi appelé Cse4 (Chromosome mis-SEgregation mutant 4) chez la levure bourgeonnante ou CENP-A (CENtromeric Protein A) chez l'Homme (Meluh et al., 1998; Palmer et al., 1987; Stoler et al., 1995). Le nom CenH3 (pour CENtromeric Histone 3) est utilisé pour désigner uniformément cette protéine indépendamment de l'espèce.

Introduction

Dans ce manuscrit, j'utiliserais le terme CenH3, éventuellement suivi du nom spécifique à l'espèce (par exemple CenH3^{CENP-A} pour l'Homme). Dans le cas de CenH3 de *Saccharomyces cerevisiae*, j'utiliserai le terme Cse4 pour simplifier la lecture.

CenH3 est nécessaire pour la formation et la maintenance du centromère. Elle permet l'assemblage des kinétochores qui lient les chromatides sœurs aux microtubules du fuseau mitotique lors de la ségrégation des chromosomes en mitose (Barnhart et al., 2011; Morey et al., 2004; Sart et al., 1997). Pour ces raisons, CenH3 est la marque épigénétique de la chromatine centromérique où elle remplace les histones H3 dans l'octamère d'histone (Karpen and Allshire, 1997).

Chez l'Homme, la chromatine centromérique est formée d'une alternance de régions contenant des nucléosomes CenH3^{CENP-A} et de nucléosomes canoniques (Blower et al., 2002). *Saccharomyces cerevisiae* possède 16 chromosomes dont chaque centromère est composé d'un seul nucléosome contenant Cse4 entraînant la formation d'un unique kinétochore (Furuyama and Biggins, 2007; Winey et al., 1995). Malgré une organisation simple, la composition du nucléosome centromérique chez la levure a été longtemps controversée. Cependant des travaux récents indiquent que le nucléosome centromérique est octamérique et contient deux molécules de Cse4 (Henikoff et al., 2000; Ichikawa et al., 2018; Wisniewski et al., 2014). Cse4 endogène est remplacée dans les nucléosomes centromériques en phase S et reste stable pendant le reste du cycle cellulaire (Nagpal and Fukagawa, 2016; Pearson et al., 2001; Wisniewski et al., 2014).

Le variant d'histone centromérique CenH3

CenH3 est hautement conservée chez tous les eucaryotes (Figure 10) (Buchwitz et al., 1999; Henikoff et al., 2000; Stoler et al., 1995; Sullivan et al., 1994). En plus de la conservation de séquence, il y a une conservation de fonction puisque Cse4 complète une déplétion par ARNi de CenH3^{CENP-A} (Wieland et al., 2004). Néanmoins, les tentatives de compensation des allèles nuls ou thermosensibles de Cse4 par l'expression à haut niveau de CenH3^{CENP-A} ont échoué (Stoler et al., 1995).

CenH3 est régulée par un chaperon d'histones appelé HJURP (Holliday Junction Recognition Protein) chez l'Homme ou Scm3 (Suppressor of Chromosome Missegregation 3) chez *Saccharomyces cerevisiae* (Camahort et al., 2007; Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009; Mizuguchi et al., 2007; Stoler et al., 2007). Scm3 interagit avec le dimère Cse4-H4 avec une affinité dix fois plus grande que le dimère H3-H4 grâce à une interaction spécifique avec le CATD (Dechassa et al., 2014; Shivaraju et al., 2011). Le chaperon assemble un tétramère (Cse4-H4)₂ à partir de deux dimères Cse4-H4 au niveau du domaine CDEII du centromère (Dechassa et al., 2014; Henikoff et al., 2014). Il a été montré récemment que CAF-1 (Chromatin Assembly Factor-1 complex) est aussi un chaperon pour Cse4 (Hewawasam et al., 2018).

Chez la levure, une surexpression de Cse4 entraîne sa localisation au niveau des promoteurs et une diminution de la présence de H2A.Z^{Htz1} dans ces nucléosomes (Camahort et al., 2009; Hildebrand and Biggins, 2016). Ce changement de la composition des nucléosomes conduit à une diminution de la transcription des gènes cibles. La régulation de la localisation de Cse4 est donc essentielle pour assurer une ségrégation correcte des chromosomes lors de la mitose, mais également pour empêcher une dérégulation de la transcription.

2- Implication de CenH3^{CENP-A} dans des pathologies

De par son rôle primordial dans l'assemblage du kinétochore, une altération de l'expression ou de la localisation de CenH3^{CENP-A} est susceptible de conduire à une aneuploïdie, conséquence de défauts de ségrégation des chromosomes. Il n'est donc pas surprenant de trouver CenH3^{CENP-A} surexprimée dans de nombreux cancers, tels que le cancer colorectal primaire (Tomonaga et al., 2003), les tumeurs germinales testiculaires invasives (Biermann et al., 2007), le carcinome hépatocellulaire (Li et al., 2007), l'adénocarcinome du poumon (Wu et al., 2012) et le cancer du sein (McGovern et al., 2012).

CenH3^{CENP-A} est également retrouvée dans des pathologies auto-immunes comme une cible des auto-anticorps. CenH3^{CENP-A} a d'ailleurs été identifiée en utilisant ces auto-anticorps provenant de patients souffrant du syndrome CREST, une sclérodermie auto-immune (Palmer et al., 1987).

La description des mécanismes régulant CenH3^{CENP-A} pourrait aider à mieux comprendre l'origine moléculaire de ces pathologies et permettre de cibler spécifiquement les acteurs de sa régulation.

3- Régulation de la localisation de CenH3

CenH3 est un élément essentiel de l'assemblage du kinétochore à la chromatine. Il est donc essentiel de réguler son niveau dans la cellule mais aussi sa localisation pour éviter des défauts dans la ségrégation des chromosomes. Les mécanismes de régulation de CenH3, dus notamment à l'ubiquitylation, ont été particulièrement décrits chez *Saccharomyces cerevisiae*. Dans les sous-parties suivantes, j'aborderais donc en détail la régulation de Cse4 par l'ubiquitylation, puis par d'autres PTMs. J'aborderais ensuite la régulation de CenH3 dans d'autres organismes.

Les mécanismes d'ubiquitylation de Cse4 ont généralement été montrés dans des conditions de surexpression. La façon d'exprimer Cse4 étant crucial lors de mon étude, je préciserai les expériences menées avec Cse4 exprimée de façon endogène ou en condition de surexpression.

a- Ubiquitylation protéolytique de Cse4 par Psh1

Contrôle de la localisation de Cse4 par l'ubiquitylation

Cse4 a été découverte pour la première fois lors d'un crible de mutants de la ségrégation chromosomique qui montre que Cse4 est essentielle à la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose (Stoler et al., 1995). Cse4-351, un mutant stable de Cse4, se retrouve localisée dans l'euchromatine, ce qui suggère que la protéolyse empêche la mauvaise localisation de Cse4 dans l'euchromatine (Collins et al., 2004). Le séquençage de ce mutant montre 14 modifications d'acides aminés le long de la séquence de Cse4.

Une surexpression modérée de Cse4-Myc entraîne sa localisation anormale au niveau des promoteurs, ce qui est sans doute dû au fort renouvellement des histones dans cette région (Krassovsky et al., 2012). Pour assurer une localisation correcte de Cse4, son expression doit donc être régulée précisément. Cette régulation est assurée en partie par la protéolyse médiée par l'ubiquitylation (Collins et al., 2004). En effet, lorsque la traduction est inhibée, la quasi-

Introduction

totalité de Cse4 exprimée à partir de son promoteur endogène et non-étiquetée se dégrade en environ 30 minutes, de manière dépendante du protéasome (Hewawasam et al., 2010; Ranjitkar et al., 2010). Malgré cela, Cse4 endogène est toujours présente au niveau du centromère après 60 min (Collins et al., 2004). De plus, l'ubiquitylation de Cse4-Myc endogène a été montrée directement par Western-blot (Collins et al., 2004; Hewawasam et al., 2014). Cette ubiquitylation de Cse4-Myc est plus importante dans des cellules en phase G2/M (Mishra et al., 2015). La surexpression du mutant non-ubiquitylable Myc-Cse4^{16R} entraîne la localisation de Cse4 au niveau de l'euchromatine (Collins et al., 2004). Par conséquent, le système ubiquitine-protéasome est un moyen de réguler la localisation de Cse4.

Dégradation de Cse4 par ubiquitylation

Psh1 est la première ubiquitine ligase identifiée dans l'ubiquitylation de Cse4 surexprimée qui permet de réduire sa mauvaise incorporation dans les régions non-centromériques via sa dégradation (Hewawasam et al., 2010; Ranjitkar et al., 2010). En effet, la surexpression de Cse4 étiquetée ou non dans des cellules où Psh1 est absente est toxique en raison de la mauvaise localisation de Cse4 (Hewawasam et al., 2010; Ranjitkar et al., 2010). Le contrôle de la localisation de Cse4 non-étiquetée par Psh1 a été montré dans des conditions de surexpression (Hewawasam et al., 2010). En plus de la régulation de la localisation, la dégradation de Cse4-Myc surexprimée et endogène par Psh1 a été montrée (Hewawasam et al., 2010). L'ubiquitylation par Psh1 de Cse4 surexprimée a été montrée directement par Western-blot (Ranjitkar et al., 2010). Cependant, l'ubiquitylation de Cse4 endogène par Psh1 n'a pas été mise en évidence. Une forme de Cse4 endogène migrant plus lentement sur gel est présente dans la souche sauvage et absente dans la souche *psh1Δ* (Ranjitkar et al., 2010). Néanmoins, le fait qu'il s'agisse d'une forme ubiquitylée de Cse4 n'a pas été montré directement. De plus, Hewawasam et al. n'observent pas de différence dans la quantité de Cse4-Myc endogène ubiquitylée dans une souche sauvage ou une souche *psh1Δ* (Hewawasam et al., 2014).

Mécanisme d'ubiquitylation de Cse4 par Psh1

Psh1 a été identifiée par spectrométrie de masse des protéines interagissant avec Cse4 purifiée (Krogan et al., 2002). Avant cela, Psh1 (pour Pob3/Spt16/Histone-associated), n'avait aucune fonction connue, à part le fait que cette protéine possède un domaine ubiquitine ligase de type RING. Il est désormais démontré que Psh1 a aussi un rôle dans la ségrégation des plasmides 2 μ m (Metzger et al., 2017). En plus de son domaine RING, Psh1 possède un domaine C4 zinc finger et un domaine hautement acide (Figure 11) (Hewawasam et al., 2010). De manière inhabituelle, le domaine RING de Psh1 interagit avec Cse4 et l'ubiquityle en collaboration avec le domaine C4 zinc finger (Hewawasam et al., 2010). Psh1 interagit avec Cse4 par le biais de son domaine spécifique CATD qui permet de la différencier de l'histone H3. En effet, Psh1 peut ubiquityler l'histone H3 supplémentée d'un domaine CATD, mais pas Cse4 privée de son domaine CATD (Ranjitkar et al., 2010).

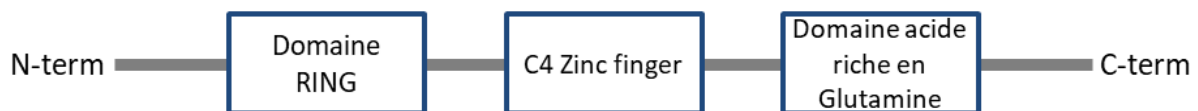


Figure 11 : Organisation des domaines de Psh1.

Psh1 contient un domaine RING, un C4 RING finger et un domaine hautement acide riche en glutamine. Ces trois motifs forment un motif tripartite spécifique des protéines TRIM. Le domaine RING de Psh1 interagit avec Cse4 et l'ubiquityle en collaboration avec le domaine C4 zinc finger.

La spectrométrie de masse et l'ubiquitylation *in vitro* révèlent que les lysines carboxy-terminales K131, K155, K163 et K172 dans le domaine histone-fold de Cse4 peuvent être les cibles de l'ubiquitylation par Psh1 (Figure 10) (Hewawasam et al., 2010). Ces résultats de spectrométrie de masse ont aussi révélé qu'environ un tiers des protéines Psh1 sont auto-ubiquitylées sur la lysine 303. De plus, d'après une expérience d'immunoprécipitation, Psh1 semble interagir *in vitro* avec l'enzyme de conjugaison Cdc34, aussi appelée Ubc3, ce qui suggère que cette E2 pourrait être impliquée dans l'ubiquitylation de Cse4 (Hewawasam et al., 2010).

Introduction

Malgré le fait que l'ubiquitylation de Cse4 surexprimée par Psh1 ait été démontrée dans plusieurs articles, la localisation de cette régulation protéolytique reste incertaine. Deux hypothèses sont envisagées : Psh1 peut limiter la mauvaise incorporation de Cse4 en contrôlant le niveau de Cse4 soluble et / ou cibler Cse4 qui est mal incorporée dans des régions non-centromériques afin d'entraîner sa dégradation.

Régulation de l'ubiquitylation de Cse4 par Psh1

Il a été montré par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine que Psh1 est aussi présente au niveau du centromère où Cse4 est stable (Hewawasam et al., 2010). L'interaction entre Cse4 et Psh1 doit donc être régulée par différents mécanismes. Premièrement, Psh1 est activée par la phosphorylation par Cka2 (Casein Kinase Alpha subunit) qui favorise son activité ubiquitine ligase (Hewawasam et al., 2014). De plus, un changement de la forme cis à la forme trans d'une proline de Cse4 est essentiel pour l'interaction et l'ubiquitylation entre Cse4 et Psh1. L'isomérisation de la proline 134 de Cse4 est induite par Fpr3 (Fk506-sensitive Proline Rotamase), une peptidyl prolyl cis-trans isomerase (Ohkuni et al., 2014). Fpr3 aurait par ailleurs un rôle indépendant de Psh1 dans la régulation de Cse4 (Ohkuni et al., 2014). Enfin, deux autres protéines améliorent l'interaction entre Cse4 et Psh1 : Spt16, une sous-unité du complexe FACT (Spt16p-Pob3p), qui est nécessaire pour déstabiliser les nucléosomes contenant Cse4 et qui permet donc la dégradation de Cse4 induite par Psh1 (Deyter and Biggins, 2014) et l'histone H4 via son arginine 36 qui facilite les interactions entre Cse4 et Psh1 (Deyter et al., 2017).

En plus de ces régulations, Cse4 est protégée de la dégradation au niveau du centromère. Lorsque Cse4 est fusionnée à un degron, la forme libre est dégradée rapidement alors que Cse4 centromérique est stable malgré la présence de Psh1 au centromère (Collins et al., 2004; Hewawasam et al., 2010). Plusieurs protéines protègent Cse4 centromérique de la dégradation. La première protéine est Ubp8, une sous-unité du complexe SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase). Cette DUB a été montrée comme exerçant une action inverse à Psh1, c'est-à-dire en hydrolysant de courtes chaînes d'ubiquitine et en stabilisant Cse4 au niveau du centromère (Canzonetta et al., 2015). Mais, de manière surprenante, Cse4 étiquetée de manière endogène est retrouvée mal localisée notamment au niveau des télomères et dans les régions ribosomales dans les souches *ubp8Δ* de la même façon que dans les souches *psh1Δ* (Canzonetta et al., 2015).

Introduction

De plus, le chaperon d'histones de Cse4, Scm3, qui permet l'incorporation de Cse4 au niveau du centromère, protège également Cse4 de la dégradation par Psh1 en s'associant avec l'histone au centromère (Hewawasam et al., 2010; Mishra et al., 2015). Pat1 (Protein Associated with Topoisomerase II), une protéine du kinétochore interne, assure aussi le maintien de Cse4 au centromère en le protégeant de l'ubiquitylation par Psh1 et en contrôlant la quantité de Scm3 au centromère (Mishra et al., 2015).

L'ubiquitylation de Cse4 par Psh1 est régulée de différentes manières, mais de façon surprenante, la délétion de *PSHI* n'entraîne aucun défaut de croissance sauf quand elle est couplée à une surexpression de Cse4 où cela entraîne des défauts de croissance et une mauvaise localisation de Cse4 (Hewawasam et al., 2010; Ranjitkar et al., 2010). De plus, Cse4 n'est pas complètement stabilisée dans des cellules avec une délétion de *PSHI* (Hewawasam et al., 2010). Ces deux observations suggèrent que d'autres mécanismes ou d'autres E3s permettent la régulation des niveaux et de la localisation de Cse4.

b- Ubiquitylation de Cse4 par d'autres ubiquitine ligases

Psh1 ubiquityle Cse4 au niveau de son domaine C-terminal *in vitro* (Hewawasam et al., 2010). Mais il a été montré que l'extrémité N-terminale de Cse4 surexprimée contribue également à sa protéolyse et que Psh1 ne participe que partiellement à cette protéolyse (Au et al., 2013). Ces résultats montrent que l'ubiquitylation de Cse4 surexprimée est régulée par Psh1 mais aussi par d'autres ubiquitine ligases. Les données présentées ci-dessous sont résumées dans le Tableau 3, page 52.

Le complexe SCF^{Rcy1}

Une autre E3 spécifique de l'ubiquitylation de Cse4 surexprimée a été identifiée lors d'un crible. Rcy1 (F-box protein involved in ReCYcling) est une protéine F-box qui est un adaptateur du complexe E3 SCF (pour Skp1-Cdc53-F box). Ce complexe SCF forme avec l'E3 RING Hrt1 un complexe ligase Culin-RING (Wiederkehr et al., 2000). Le complexe E3 étudié ici est donc appelé plus précisément SCF^{Rcy1}. La délétion de *RCY1* provoque la stabilisation de Cse4 surexprimée montrant que l'E3 SCF^{Rcy1} est aussi impliquée dans l'ubiquitylation protéolytique et la dégradation de Cse4 (Cheng et al., 2016). Ces données n'ont pas été confirmées pour une expression endogène de Cse4. En outre, Cse4 surexprimée

Introduction

est plus stable dans le mutant *psh1Δ rcy1Δ*, ce qui suggère une ubiquitylation parallèle de Cse4 par SCF^{Rcy1} et Psh1 (Cheng et al., 2016).

L'E3 RING SUMO-dépendante : Slx5

Suivant un mécanisme proche de l'ubiquitylation, Cse4 surexprimée est aussi sumoylée sur la lysine 65 par les enzymes de ligation de SUMO : Siz1 et Siz2 (Ohkuni et al., 2016, 2018). Cette sumoylation permet à la protéine Cse4 d'être ensuite reconnue par une SUMO-targeted ubiquitine ligase (STUbL ou ubiquitine ligase pour protéine sumoylée). Cette STUbL, Slx5 (Synthetic Lethal of unknown [X] function 5), en coopération avec l'E2 Ubc4, peut alors ubiquityler Cse4 surexprimée au niveau de la chaîne SUMO assemblée sur la lysine cible ce qui entraîne la dégradation de Cse4 (Cheng et al., 2017; Ohkuni et al., 2016, 2018). D'après la littérature, la délétion de *SLX5* entraîne une mauvaise localisation de Cse4 exprimée de façon endogène. Néanmoins, au vu de la description des souches, il semble que Cse4 n'est pas vraiment exprimée à partir de son promoteur endogène (Ohkuni et al., 2016). De plus, dans cette publication il n'est pas clair si Cse4 est étiquetée en position C- ou N-terminale (Ohkuni et al., 2016). L'ubiquitylation directe par Slx5 de Cse4 endogène n'a pas non plus été mise en évidence. Slx5 est connue pour fonctionner sous forme d'un dimère avec la protéine Slx8. Une hausse de la stabilité de Cse4 surexprimée est aussi observée dans une souche *slx8Δ*, ce qui souligne l'importance de l'hétérodimère Slx5 / Slx8. Contrairement à Psh1, Slx5 et Slx8 sont conservées au cours de l'évolution et la déplétion de leur homologue humain RNF4 entraîne des défauts de ségrégation (van de Pasch et al., 2013). Il est donc possible que RNF4 régule CenH3^{CENP-A} de manière similaire à Slx5. Dans les double mutants *psh1Δ slx5Δ* et *rcy1Δ slx5Δ*, Cse4 surexprimée est plus stable que chez un simple mutant, ce qui signifie que Slx5 et les autres E3s procèdent à l'ubiquitylation de Cse4 surexprimée par différentes voies (Cheng et al., 2017; Ohkuni et al., 2016).

L'E3 RING : Ubr1

Cependant, Cse4 surexprimée est encore dégradée dans le triple mutant *psh1Δ rcy1Δ slx5Δ* (Cheng et al., 2017). La dernière E3 montrée comme participant à l'ubiquitylation de Cse4 surexprimée est Ubr1 (UBiquitin protein ligase E3 component N-Recognin 1). En effet, le résultat de la spectrométrie de masse menant à l'identification de Psh1 a également permis la mise en évidence d'une autre ubiquitine ligase RING, Ubr1 (Cheng et al., 2017; Ranjitkar

et al., 2010). La délétion du gène *UBR1* entraîne la stabilisation de Cse4 exprimée de manière endogène et en surexpression. De la même manière que les autres E3s, Ubr1 a ensuite été identifiée comme ubiquitylant Cse4 surexprimée et cette ubiquitylation conduit à sa dégradation (Cheng et al., 2017). À nouveau, ces données d'ubiquitylation n'ont pas été confirmées avec Cse4 exprimée de façon endogène. Une nouvelle fois, Ubr1 semble fonctionner parallèlement à Psh1, SCF^{Rcy1} et Slx5 (Cheng et al., 2017).

Jusqu'à présent, quatre ubiquitine ligases ont été identifiées pour participer à l'ubiquitylation de Cse4 surexprimée. Malgré cela, dans le mutant *psh1Δ rcy1Δ slx5Δ ubr1Δ* Cse4 surexprimée est toujours ubiquitylée et n'est pas complètement stabilisée, ce qui suggère que d'autre(s) E3(s) peu(ven)t ubiquityler Cse4. Comme décrit précédemment, il n'est pas surprenant qu'une protéine essentielle comme Cse4 soit régulée par plusieurs E3s. Par exemple, l'histone H3 est connue pour être ubiquitylée par au moins cinq E3s différentes : Tom1, Hel1, Hel2, Pep5 et Snt2 (Singh et al., 2012). Il est toujours inconnu si chacune de ces E3s a un rôle spécifique ou si elles présentent des fonctions redondantes. Les souches mutantes *psh1Δ* ou *rcy1Δ* sont sensibles à la surexpression de Cse4, contrairement aux cellules *ubr1Δ* ou *slx5Δ*. Ces deux phénotypes distincts suggèrent un rôle différent pour Psh1 et SCF^{Rcy1} par rapport à Slx5 et Ubr1. Il est possible que ces multiples E3s régulent différents pools de Cse4 ou à des moments différents au cours du cycle cellulaire. Les mécanismes de régulation par ubiquitylation de Cse4 surexprimée sont résumés dans la Figure 12, page suivante et le Tableau 3, page 52.

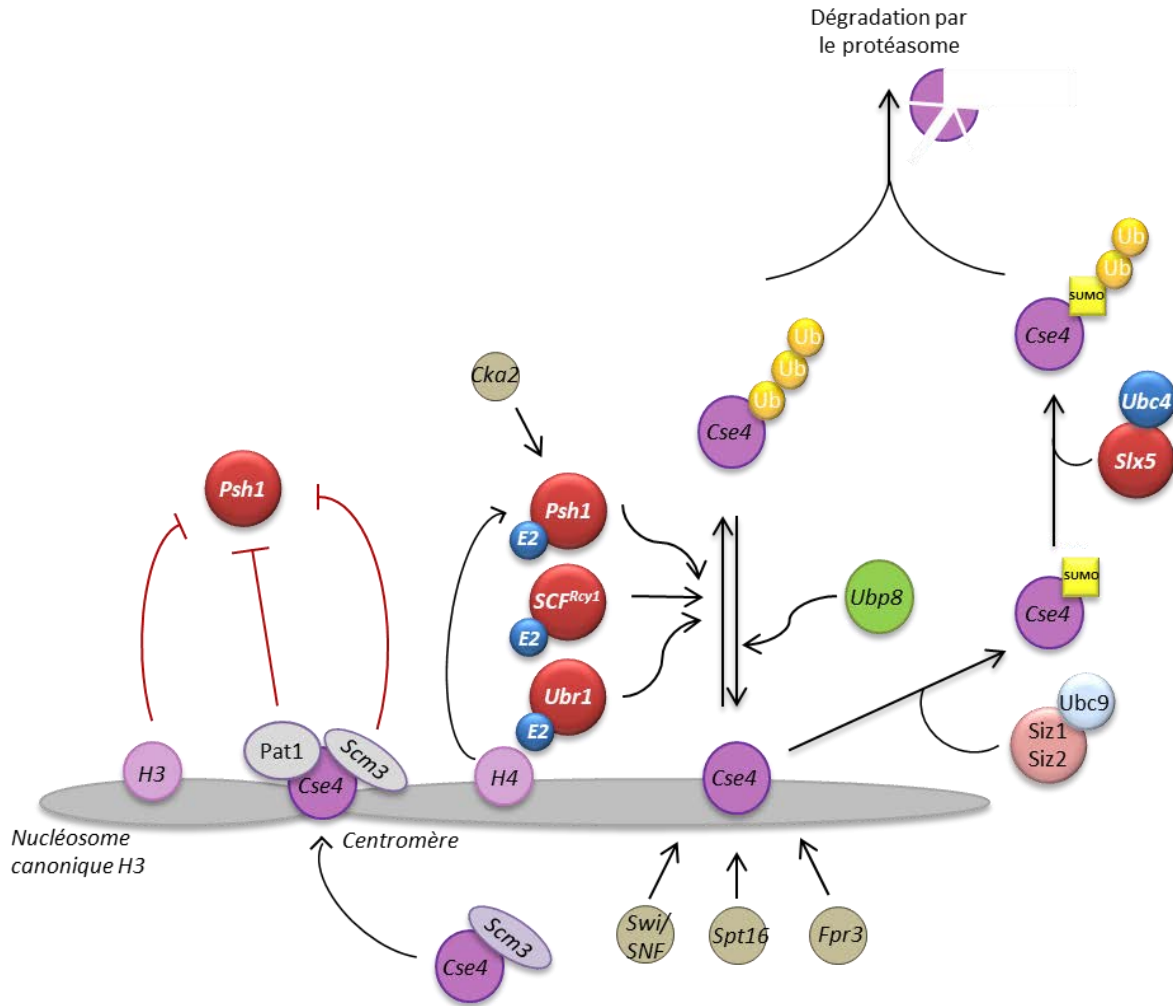


Figure 12 : Modèle de régulation de Cse4 chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Cse4 est ubiquitylée par différentes ubiquitine ligases : Psh1, SCF^{Rcy1}, Slx5 et Ubr1 ce qui mène à sa dégradation par le protéasome. Psh1 et Slx5 sont connues pour empêcher la localisation de Cse4 dans l'euchromatine. Slx5 ubiquityle Cse4 sumoylée par Siz1/Siz2. De nombreuses protéines favorisent l'ubiquitylation de Cse4 localisée dans l'euchromatine comme Spt16 (déstabilisation du nucléosome), Fpr3 (isomérisation d'une proline de Cse4 favorisant l'interaction entre Cse4 et Psh1),... Au contraire, Pat1 et l'histone chaperonne Scm3 protègent Cse4 centromérique de l'ubiquitylation.

c- Autres mécanismes de régulation de Cse4

Avec au moins quatre E3s agissant pour la dégradation de Cse4, l'ubiquitylation semble être le principal moyen de réguler Cse4 chez *Saccharomyces cerevisiae*. Un mutant de Cse4 où toutes les lysines sont remplacées par des arginines et avec une étiquette en position N-terminale a été étudié. Dans ce mutant (Myc-Cse4^{16R}) l'ubiquitylation des lysines ou de l'acide aminé en position amino-terminale n'est pas possible, malgré cela, Cse4 n'est pas complètement stable, indiquant que d'autres modes de régulation existent (Collins et al., 2004). Dans le mutant complètement stable de Cse4 (Cse4-351) qui présente des modifications sur 14 acides aminés, seules les lysines K4 et K65 sont modifiées (Collins et al., 2004).

Une analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier les sites de modifications post-traductionnelles de Cse4 (Boeckmann et al., 2013). Ainsi, les sérines 22, 33, 40 et 105 sont phosphorylées, l'arginine 37 est méthylée et la lysine 49 est acétylée. Tous ces acides aminés sont situés dans la partie N-terminale de Cse4 (Figure 10).

Il a été montré que le niveau de phosphorylation de Cse4 centromérique est augmenté en cas de défaut d'attachement ou de tension des microtubules (Boeckmann et al., 2013). De plus, l'absence de phosphorylation sur la sérine 33 entraîne une réduction des niveaux de Cse4 au centromère, ce qui suggère que la phosphorylation de la sérine 33 a un rôle dans la localisation au centromère de Cse4 (Hoffmann et al., 2018).

La méthylation de l'arginine 37 est quant à elle essentielle à la ségrégation des chromosomes (Samel et al., 2012). De plus, en l'absence d'acétylation de la lysine 49 et de méthylation de l'arginine 37, l'hétérodimère Okp1/Ame1 est recruté sur le domaine N-terminal de Cse4 et entraîne l'assemblage du kinétochore. Lorsque la lysine 49 est acétylée et l'arginine 37 est méthylée, l'interaction entre Cse4 et Okp1/Ame1 est réduite ce qui empêche l'assemblage du kinétochore (Anedchenko et al., 2019). L'acétylation de la lysine 49 et la méthylation de l'arginine 37 permettent donc de réguler la liaison entre le kinétochore et la chromatine assurant ainsi une bonne ségrégation des chromosomes.

Les autres PTMs montrées par spectrométrie de masse n'ont pas de rôle défini pour l'instant.

Un autre moyen de réguler Cse4 concerne les facteurs de remodelage de la chromatine ou les chaperons d'histones. Par exemple, le complexe SWI/SNF (Switch/Sucrose

Non Fermentable) déstabilise le nucléosome pour prévenir la mauvaise localisation de Cse4 (Gkikopoulos et al., 2011) et la suppression des chaperons d'histones CAF-1, de sous-unités du complexe HIR ou de Spt4 entraîne une mauvaise localisation de Cse4 au niveau des promoteurs (Ciftci-Yilmaz et al., 2018; Crotti and Basrai, 2004; Rosa et al., 2011; Sharp et al., 2002).

d- Régulation de CenH3 dans d'autres organismes

Chez *Saccharomyces Cerevisiae*, Cse4 est régulée par différentes E3s responsables d'une ubiquitylation protéolytique. Chez d'autres organismes, l'ubiquitylation a aussi été montrée comme étant responsable de la dégradation de CenH3 (Tableau 3, page 52). Chez *Drosophila melanogaster*, CenH3^{CID} est ubiquitylée et dégradée par la protéine F-box, Ppa (for Partner of PAired) (Moreno-Moreno et al., 2011). Chez *Schizosaccharomyces pombe*, CenH3^{CNP1} est aussi dégradée mais l'ubiquitine ligase responsable reste inconnue (Gonzalez et al., 2014).

En plus de ces régulations protéolytiques, CenH3 peut aussi être régulée par une ubiquitylation non-protéolytique (Tableau 3, page 52). Par exemple, chez l'Homme et la drosophile, des E3s ont été rapportées pour ubiquityler CenH3 de façon non-protéolytique. Chez *Drosophila melanogaster*, en plus de Ppa, une autre ubiquitine ligase s'est avérée ubiquityler CenH3^{CID}. Le facteur de charge Call (Chromosome ALignment defect 1) s'associe à CenH3^{CID} dans le cytoplasme et entraîne son chargement sur la chromatine centromérique (Chen et al., 2014). Comme Scm3 chez la levure, Call est important pour la stabilité de la protéine CenH3^{CID} (Erhardt et al., 2008). Il a été démontré que Call se lie spécifiquement à RDX, la protéine adaptatrice de Cul3 ce qui permet l'interaction indirecte entre Cul3 et Call. Cette interaction conduit à l'ubiquitylation de CenH3^{CID} par CUL3^{RDX}. Cette ubiquitylation est non-protéolytique et conduit à la stabilisation de CenH3^{CID} au centromère (Bade et al., 2014).

Chez l'Homme, le centromère est beaucoup plus grand et défini de manière épigénétique par CenH3^{CENP-A} plutôt que par une séquence spécifique (Palmer et al., 1987). Au niveau du centromère, les nucléosomes CenH3^{CENP-A} sont entrecoupés de nucléosomes H3 et, contrairement à la levure, le centromère se connecte à plusieurs microtubules (Blower et al., 2002). La mauvaise localisation des CenH3^{CENP-A} peut conduire à des chromosomes polycentriques et à une instabilité génomique (Amato et al., 2009; Au et al., 2008). Il n'est

Introduction

donc pas surprenant de trouver CenH3^{CENP-A} surexprimée dans de nombreux cancers. L'expression de CenH3^{CENP-A} est régulée au cours du cycle cellulaire. Elle commence en phase S et atteint son maximum à la fin de la phase G2 (Shelby et al., 1997). CenH3^{CENP-A} nouvellement synthétisée est recrutée au centromère juste après la sortie de la mitose, indépendamment de la réplication de l'ADN contrairement à Cse4 (Jansen et al., 2007). L'assemblage et la stabilisation des nucléosomes centromériques au centromère dépendent du chaperon humain homologue de Scm3 : HJURP (Bassett et al., 2012; Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009).

CenH3^{CENP-A} s'est avérée être ubiquitylée par le complexe CUL4A-RBX1-COPS8 sur la lysine 124 (Niikura et al., 2015). L'ubiquitylation de CenH3^{CENP-A} n'affecte pas la stabilité de la protéine. Le complexe CUL4A-RBX1-COPS8 n'est donc pas impliqué dans la protéolyse de CenH3^{CENP-A} induite par l'ubiquitylation, mais génère plutôt un signal non-protéolytique. Ce signal d'ubiquitylation est essentiel pour l'interaction entre CenH3^{CENP-A} et HJURP et serait nécessaire pour la localisation CenH3^{CENP-A} au centromère (Mouysset et al., 2015; Niikura et al., 2017). Néanmoins, une autre équipe a récemment démontré grâce au mutant de CenH3^{CENP-A} K124R que cette ubiquitylation n'était pas nécessaire à la localisation centromérique (Fachinetti et al., 2017).

La protéolyse de CenH3^{CENP-A} a été mise en évidence chez l'Homme dans des cellules sénescents ou infectées par le virus Herpès simplex de type 1 (Lomonte et al., 2001; Maehara et al., 2010). Jusqu'à présent aucune E3 n'a été identifiée comme étant responsable de la dégradation de CenH3^{CENP-A} via l'ubiquitylation, tandis que quatre ligases de l'ubiquitine E3s ont été identifiées pour l'ubiquityler Cse4 chez *Saccharomyces cerevisiae*. Parmi ces quatre E3s, Psh1 n'a pas d'homologue connu chez l'Homme mais Ubr1, Slx5 et SCF^{Rcy1} en possèdent et il serait intéressant de les étudier pour mieux comprendre la régulation protéolytique de CenH3^{CENP-A}. Cse4 présente un domaine N-terminal beaucoup plus long que CenH3^{CENP-A}, ce qui laisse imaginer une manière différente de réguler CenH3 entre la levure et l'Homme. Malgré cette différence, un mécanisme de reconnaissance similaire est utilisé pour discriminer CenH3 par les chaperons d'histones HJURP ou Scm3 et, par Psh1, ce qui suggère une similarité potentielle dans le contrôle de la stabilité de Cse4.

Toutes les ubiquitine ligases de CenH3 recensées dans chaque organisme sont récapitulées dans le Tableau 3, page suivante.

Introduction

<i>Organisme</i>	<i>Nom</i>	<i>E3</i>	<i>Famille</i>	<i>E2</i>	<i>Type d'ubiquitylation</i>	<i>Références</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Psh1	RING	Cdc34	Dégradation	(Hewawasam et al., 2010; Ranjitkar et al., 2010)
	Cse4	SCF ^{Rcy1}	Complexe RING SCF	?	Dégradation	(Cheng et al., 2016)
		Slx5	RING STUbL	Ubc4	Dégradation	(Cheng et al., 2017; Ohkuni et al., 2016)
		Ubr1	RING	?	Dégradation	(Cheng et al., 2017)
		...				
<i>Homo Sapiens</i>	CENP-A	Cul4A	Cullin-RING		Localisation	(Niikura et al., 2015)
					Dégradation	(Lomonte et al., 2001; Maehara et al., 2010)
<i>Drosophila melanogaster</i>	CID	Ppa	F-box protein, SCF component	?	Dégradation	(Moreno-Moreno et al., 2011)
		Cul3	Cullin-RING		Stabilisation	(Bade et al., 2014)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Cnp1	?			Dégradation	(Gonzalez et al., 2014)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Hcp-3	?				

Tableau 3 : Récapitulatif des enzymes d'ubiquitylation ciblant CenH3 dans différents organismes.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

La régulation de CenH3 par l'ubiquitylation a été découverte il y a une dizaine d'années chez la levure. Bien que plusieurs acteurs de cette régulation aient été identifiés, notamment l'E3 Psh1, de nombreuses questions subsistent. L'objectif global de mon projet de thèse était de tenter de répondre à certaines de ces questions.

1- Utilisation de la levure pour étudier les mécanismes d'ubiquitylation de CenH3

Pour analyser comment l'ubiquitylation régule l'activité de CenH3, nous avons choisi d'utiliser la levure bourgeonnante, *Saccharomyces cerevisiae*, comme modèle d'étude. En effet, l'ubiquitylation de CenH3 a principalement été décrite dans cet organisme. Lorsque j'ai commencé ma thèse, Psh1 était déjà connue pour ubiquityler Cse4 dans certaines conditions, en particulier en cas de surexpression (Hewawasam et al., 2010; Ranjitkar et al., 2010). Puis, d'autres E3s ont été montrées comme participant également à l'ubiquitylation de Cse4: Slx5, SCF^{Rcy1}, et plus récemment Ubr1 (Cheng et al., 2016, 2017; Ohkuni et al., 2016).

Les principales limitations du modèle levure pour l'étude des mécanismes d'ubiquitylation de CenH3 sont liées à l'organisation particulière des centromères dans cet organisme et au fait que Cse4 possède un domaine N-terminal plus long que CenH3^{CENP-A}. Il est donc possible que certains mécanismes d'ubiquitylation de Cse4 soient spécifiques à la levure et ne soient pas conservés dans d'autres organismes et en particulier chez l'Homme. Cependant, de nombreux aspects de la biologie des centromères sont conservés de la levure à l'Homme. Par exemple, un mécanisme de reconnaissance semblable est utilisé pour discriminer CenH3 par les chaperons d'histones HJURP chez l'Homme ou Scm3 chez la levure (Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009; Mizuguchi et al., 2007; Stoler et al., 2007). De plus, Cse4 peut compenser l'inhibition de la traduction de CenH3^{CENP-A} obtenue par ARNi ce qui suggère une conservation fonctionnelle (Wieland et al., 2004) même si la réciproque n'est pas vraie (Stoler et al., 1995). La machinerie et les mécanismes d'ubiquitylation sont également souvent bien conservés entre la levure et l'Homme. Par exemple, la déplétion de l'homologue humain de Slx5, RNF4, entraîne des défauts de ségrégation des chromosomes semblables à ceux observés dans des levures *slx5Δ*, ce qui laisse penser que Slx5 et RNF4

pourraient avoir une fonction conservée pour la régulation des centromères (van de Pasch et al., 2013). Nous espérons donc qu'une meilleure description des mécanismes d'ubiquitylation de Cse4 aide à élucider des principes généraux contrôlant la fonction et la localisation CenH3.

2- Recherche des substrats de Psh1

Au début de ma thèse, Cse4 était le seul substrat connu de Psh1. Cependant, les E3s ont souvent plusieurs substrats d'ubiquitylation. Chez la levure, c'est par exemple le cas du complexe APC/C qui régule la dégradation de multiples protéines au cours du cycle cellulaire (McLean et al., 2011). Chez l'Homme, on estime qu'il existe plus de 600 complexes E3s différents pour 19 000 sites d'ubiquitylation sur environ 5 000 protéines différentes (Kim et al., 2011; Wagner et al., 2011). Il est donc possible que Psh1 ait d'autres substrats que Cse4. L'identification de ces substrats pourrait aider à comprendre le fonctionnement moléculaire de Psh1, par exemple pour analyser les E2s fonctionnant avec Psh1. Le premier objectif de ma thèse a donc été de rechercher l'ensemble des substrats de Psh1 en utilisant une approche protéomique.

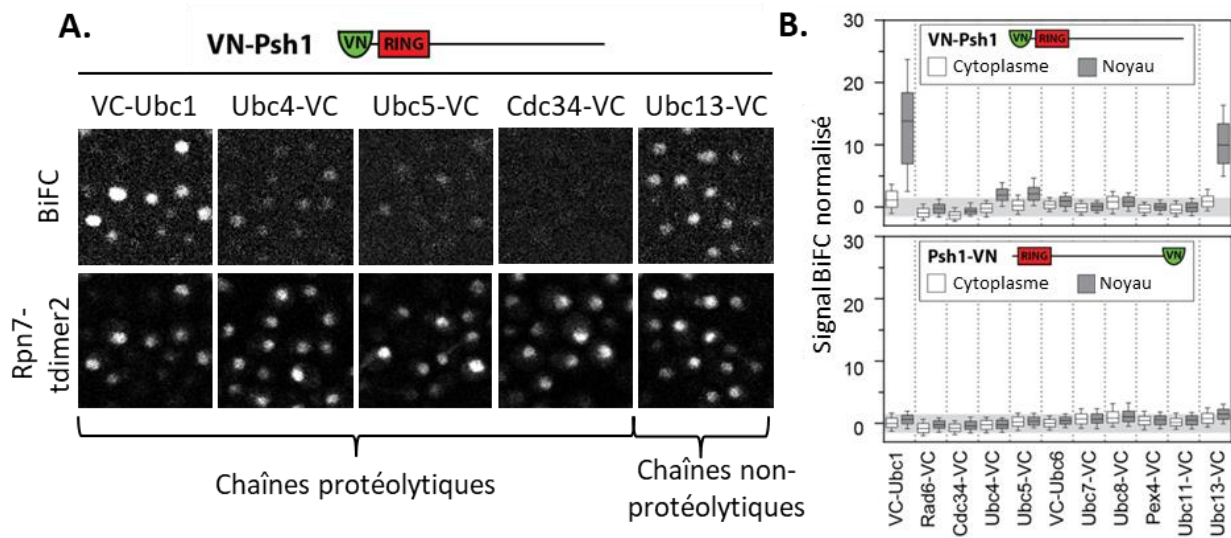
3- Analyse des E2s fonctionnant avec Psh1

Psh1 a été montrée comme co-immunoprécipitant avec l'E2 Cdc34 (Hewawasam et al., 2010). Cependant, aucune donnée fonctionnelle validant que Cdc34 est impliquée dans l'ubiquitylation de Cse4 n'avait été publiée jusqu'à très récemment (Kim et al., 2018). Des données préliminaires de l'équipe indiquent que Psh1 interagit avec plusieurs autres E2s *in vivo*. Ces résultats ont été obtenus par un crible utilisant la technique de complémentation de fluorescence (BiFC).

Dans cette technique, chaque E2 est fusionnée avec la moitié C-terminale de la protéine fluorescente Vénus (VC) et Psh1 avec la partie N-terminale (VN). En cas d'interaction entre Psh1 et une E2, les deux moitiés de la protéine Vénus se trouvent à proximité ce qui permet une reconstitution de Vénus dont la fluorescence peut être détectée par microscopie. Ces résultats n'ont pas permis de confirmer que Psh1 interagit avec Cdc34 (Figures 13.A et 13.B). Par contre, une fluorescence importante est détectée lorsque VN-Psh1 est exprimée en présence de VC-Ubc1 et Ubc13-VC et une fluorescence plus faible est également détectée en présence d'Ubc4-VC et Ubc5-VC (Figures 13.A et 13.B). Ces signaux sont spécifiques puisque aucune fluorescence n'est détectée lorsque la moitié VN est fusionnée à l'extrémité

Objectifs

C-terminale de Psh1, c'est-à-dire à distance du domaine RING qui est responsable de l'interaction avec les E2s (Figure 13.B). Ces résultats suggèrent donc que Psh1 interagit avec les E2s Ubc1, Ubc13, Ubc4 et Ubc5. Les interactions de Psh1 avec Ubc1, Ubc4 et Ubc13 ont également été confirmées de manière indépendante par des données de complémentation de luminescence entre E2s et E3s (données non présentées).



Objectifs

Ces résultats sont particulièrement intéressants car ces E2s sont décrites pour assembler différents types de chaînes d'ubiquitine sur leurs substrats. Ubc4 (et probablement Ubc5 qui est très proche d'Ubc4) forme des chaînes courtes qui peuvent contenir différents types de liaison ubiquitine-ubiquitine (Mansour et al., 2015; Rodrigo-Brenni and Morgan, 2007). Cdc34 et Ubc1 sont quant à elles connues pour former principalement des chaînes K48 ayant une fonction protéolytique (Petroski, 2008; Rodrigo-Brenni et al., 2010). Enfin, Ubc13 est hautement spécialisée dans l'assemblage de chaînes K63 non-protéolytiques (Eddins et al., 2006; Hodge et al., 2016). Si ces E2s fonctionnent avec Psh1 *in vivo*, elles pourraient donc réguler de différentes manières l'activité de Cse4 et d'éventuels autres substrats de Psh1. Un des objectifs de ma thèse a donc été de déterminer quelles E2s fonctionnent effectivement avec Psh1 pour l'ubiquitylation de Cse4 et de révéler la nature des chaînes d'ubiquitine assemblées sur Cse4.

4- Analyse des E3s ubiquitylant Cse4 endogène

Comme je l'ai déjà indiqué, quatre E3s (Psh1, Slx5, SCF^{Rcy1} et Ubr1) sont actuellement décrites pour ubiquityler Cse4. Néanmoins, l'inactivation de ces quatre E3s ne suffit pas à complètement supprimer l'ubiquitylation et la dégradation de HA-Cse4 surexprimée (Cheng et al., 2017). Il est donc possible que d'autres E3s participent à la régulation de Cse4. D'autre part, la majorité des données disponibles concernant l'ubiquitylation de Cse4 ont été obtenues dans des conditions artificielles de surexpression. Il a été montré que Psh1, Slx5 et Ubr1 ont un effet sur la localisation et/ou la dégradation de Cse4 endogène (Cheng et al., 2016; Hewawasam et al., 2010; Ohkuni et al., 2016; Ranjitkar et al., 2010), mais leur implication dans l'ubiquitylation de Cse4 n'a pas été montrée directement en absence de surexpression. L'ubiquitylation de Cse4-Myc endogène a été détectée de manière directe dans une souche sauvage, mais une inactivation de Psh1 dans cette souche ne semble pas entraîner de diminution du niveau d'ubiquitylation de Cse4-Myc (Hewawasam et al., 2014). L'effet des autres E3s (Slx5, SCF^{Rcy1} et Ubr1) sur l'ubiquitylation de Cse4 endogène n'a, à notre connaissance, pas été étudié.

Pour comprendre comment et dans quelles conditions l'ubiquitylation régule l'activité de Cse4, il nous a semblé essentiel d'examiner les mécanismes d'ubiquitylation de Cse4 dans des conditions aussi physiologiques que possible, en évitant toute surexpression de Cse4. Un objectif important de ma thèse a donc été de mettre au point des conditions permettant de

Objectifs

quantifier de manière fiable l'ubiquitylation de Cse4 exprimée à partir de son locus endogène. Cela s'est avéré être un défi difficile à relever du fait du faible niveau d'expression de Cse4. Nous avons ensuite cherché à identifier les E3s responsables de l'ubiquitylation de Cse4 endogène et à mettre en évidence les situations physiologiques dans lesquelles Cse4 est régulée par ubiquitylation.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériels

<i>Nom</i>	<i>Fond génétique</i>	<i>Génotype</i>	<i>Provenance</i>
scAB0104	W303	tor1-1 fpr1::NAT RPL13A-2xFKBP12::TRP1 Pre8-FRBGFP::kanMX6 ubc4::PAT	G. Rabut
scAB0173	BY4741	cse4::CSE4-LgBiT-10xHis-CSE4-URA	Cette étude (A. Brossard)
scAB0174	BY4745	lyp1::STE3pr-Nat can1::STE2pr-Sphis5 cse4::CSE4-LgBiT-10xHis-CSE4-URA	Cette étude (A. Brossard)
scAB0175	BY4741	cse4::CSE4-LgBiT-10xHis-CSE4-URA psh1::HPH	Cette étude (A. Brossard)
scEB0004	BY4745	lyp1D can1::STE2pr-Sphis5	G. Rabut
scEB0097	BY4741	ubc7::KAN	G. Rabut
scEB0098	BY4741	ubc8::KAN	G. Rabut
scEB0100	BY4741	ubc11::KAN	G. Rabut
scEB0253	BY4741	ubc6::KAN	G. Rabut
scGR0001	S288C	BY4741	G. Rabut
scGR0006		MAT Tester alpha	G. Rabut
scGR0007		MAT Tester A	G. Rabut
scGR0018	BY4741	ubc4::KAN	G. Rabut
scGR0019	BY4741	ubc5::KAN	G. Rabut
scGR0154	BY4741	cdc34-2::KAN	G. Rabut
scGR0397	BY4741	ubc13::KAN	G. Rabut
scGR0400	BY4741	rad6::KAN	G. Rabut
scGR1182	BY4741	URA3::CMV-tTA p-ubc1::KanMX4-TetO7-CYCTATA	G. Rabut
scGR1292	BY4741	psh1::HPH	G. Rabut
scGR1299	W303	tor1-1 fpr1::NAT RPL13A-2xFKBP12::TRP1 Pre8-FRBGFP::kanMX6 cse4::CSE4-TAP-His3	G. Rabut
scGR1301	W303	tor1-1 fpr1::NAT RPL13A-2xFKBP12::TRP1 Pre8-FRBGFP::kanMX6 cse4::CSE4-TAP-His3 psh1::HPH	G. Rabut
scGR1302	W303	tor1-1 fpr1::NAT RPL13A-2xFKBP12::TRP1 Pre8- FRBGFP::kanMX6 cse4::CSE4-TAP-His3 ubc4::HPH	G. Rabut
scGR1303	W303	tor1-1 fpr1::NAT RPL13A-2xFKBP12::TRP1 Pre8- FRBGFP::kanMX6 cse4::CSE4-TAP-His3 ubc13::HPH	G. Rabut
scGR1310	W303	tor1-1 fpr1::NAT RPL13A-2xFKBP12::TRP1 Pre8- FRBGFP::kanMX6 cse4::CSE4-TAP-His3 ubc8::HPH	G. Rabut
scGR1321	W303	tor1-1 fpr1::NAT RPL13A-2xFKBP12::TRP1 Pre8- FRBGFP::kanMX6 cse4::CSE4-TAP-His3 ubc5::HPH	G. Rabut
scGR1483	BY4741	cse4::CSE4-CBP-LgBiT-CaURA3	G. Rabut
scGR1484	BY4741	cse4::CSE4-CBP-LgBiT-CaURA3 psh1::HPH	G. Rabut
scMLB0034	W303	tor1-1 fpr1::NAT RPL13A-2xFKBP12::TRP1 Pre8- FRBGFP::kanMX6 cse4::CSE4-TAP-His3 ubc4::PAT	Cette étude

Matériels et méthodes

scMLB0002	W303	tor1-1 fpr1::NAT RPL13A-2xFKBP12::TRP1 Pre8-FRBGFP::kanMX6 lys2D0	Cette étude
scMLB0003	W303	tor1-1 fpr1::NAT RPL13A-2xFKBP12::TRP1 Pre8-FRBGFP::kanMX6 lys2D0 psh1::HPH	Cette étude
scMLB0035	W303	tor1-1 fpr1::NAT RPL13A-2xFKBP12::TRP1 Pre8-FRBGFP::kanMX6 cse4::CSE4-TAP-His3 psh1::HPH ubc4::PAT	Cette étude
scMLB0071	W303	tor1-1 fpr1::NAT RPL13A-2xFKBP12::TRP1 Pre8-FRBGFP::kanMX6 cse4::CSE4-TAP-His3 UBC13-FRB::hphMX4	Cette étude
scMLB0077	W303	tor1-1 fpr1::NAT RPL13A-2xFKBP12::TRP1 Pre8-FRBGFP::kanMX6 cse4::CSE4-TAP-His3 CDC34-FRB::hphMX4	Cette étude
scMLB0102	BY4741	CSE4- mCherry-sfGFP-NAT URA3::CMV-tTA p-ubc1::KanMX4-TetO7-CYCTATA	Cette étude
scMLB0103	BY4741	cse4::CSE4-mCherry-sfGFP-NAT rad6::KAN	Cette étude
scMLB0104	BY4741	cse4::CSE4-mCherry-sfGFP-NAT cdc34-ts::KAN	Cette étude
scMLB0105	BY4741	cse4::CSE4-mCherry-sfGFP-NAT ubc4::KAN	Cette étude
scMLB0106	BY4741	cse4::CSE4-mCherry-sfGFP-NAT ubc5::KAN	Cette étude
scMLB0107	BY4741	cse4::CSE4-mCherry-sfGFP-NAT ubc6::KAN	Cette étude
scMLB0108	BY4741	cse4::CSE4-mCherry-sfGFP-NAT ubc7::KAN	Cette étude
scMLB0109	BY4741	cse4::CSE4-mCherry-sfGFP-NAT ubc8::KAN	Cette étude
scMLB0111	BY4741	cse4::CSE4-mCherry-sfGFP-NAT ubc11::KAN	Cette étude
scMLB0112	BY4741	cse4::CSE4-mCherry-sfGFP-NAT ubc13::KAN	Cette étude
scMLB0118	BY4741	cse4::CSE4-mCherry-sfGFP-NAT	Cette étude
scMLB0127	BY4741	cse4::CSE4-mCherry-sfGFP-NAT psh1::HPH	Cette étude
scMLB0171	BY4741	lyp1::STE3pr-Nat can1::STE2pr-Sphis5	Cette étude
scMLB0173	BY4741	cse4::CSE4-LgBiT-URA-CSE4	Cette étude
scMLB0175	BY4741	cse4::CSE4-LgBiT-URA-CSE4 psh1::HPH	Cette étude
scMLB0176	BY4741	cse4::CSE4-mcherry-sfGFP-URA-CSE4	Cette étude
scMLB0177	BY4741	cse4::CSE4-mcherry-sfGFP-URA-CSE4 psh1::HPH	Cette étude
scMLB0178	BY4741	cse4::CSE4-TAP-URA-CSE4	Cette étude
scMLB0179	BY4741	cse4::CSE4-TAP-URA-CSE4 psh1::HPH	Cette étude
scMLB0182	BY4741	cse4::CSE4-NanoLuc-URA-CSE4	Cette étude
scMLB0183	BY4741	cse4::CSE4-NanoLuc-URA-CSE4 psh1::HPH	Cette étude
scMLB0185	BY4741	cse4::CSE4-mCherry-NG-URA-CSE4	Cette étude
scMLB0186	BY4741	cse4::CSE4-mCherry-NG-URA-CSE4 psh1::HPH	Cette étude
scMLB0187	BY4745	lyp1::STE3pr-Nat can1::STE2pr-Sphis5 cse4::CSE4-mcherry-NG-URA-CSE4	Cette étude
scMLB199	BY4745	lyp1::pPDC1-SmBiT-UBQ-Leu can1::STE2pr-Sphis5 cse4::CSE4-LgBiT-10xHis-CSE4-URA	Cette étude

Tableau 4 : Souches de levures utilisées.

<i>Nom</i>	<i>Détails</i>	<i>Résistance bactérienne</i>	<i>Résistance chez la levure</i>	<i>Provenance</i>
pAB0003	pGEX4TG-yNanoLuc	AmpR	-	G. Rabut
pAB0009	pSD-C2v2-yLgBiT-10x His	AmpR	KAN	G. Rabut
pAB0011	Prom Cse4-Cse4-linker-LgBiT-10xHis-Linker-Cse4-Term Cse4-URA-Term Cse4	AmpR	URA3	Cette étude (A. Brossard)
pAC0002	pFA6-natMX4	AmpR	NAT	G. Rabut
pEB0053	pUC57_yp1::STE3pr-HPH	AmpR	HPH	G. Rabut
pGLD0002	pFA6a-Htb2 K124R-CBP-linker-NanoBiT-T-CaURA3	AmpR	URA3	G. Rabut
pGLD0012	yp1::pPDC1-SmBiT-UBQ-Leu	AmpR	LEU2	G. Rabut
pGR0295	pG15tef1_His-Ubq	AmpR	LEU2	G. Rabut
pGR0507	pFA6-hphMX4	AmpR	HPH	G. Rabut
pGR0619	pFA6a-FRB-KanMX6	AmpR	KAN	G. Rabut
pGR0789	pFA6a_VN-to-TAP_His3	AmpR	HIS	G. Rabut
pGR0819	pFA6a_mCherry-sfGFP-natNT2	AmpR	NAT	G. Rabut
pGR0853	pG15tef1_SmBiT-Ubq	AmpR	LEU2	G. Rabut
pGR0890	pGEX4TG-yLgBiT	AmpR	-	G. Rabut
pGR0892	pG25tef1_SmBiT-Ubq	AmpR	LEU2	G. Rabut
pMLB0004	pFA6a-FRB-hphMX4	AmpR	HPH	Cette étude
pMLB0009	pUC57_yp1::STE3pr-NAT	AmpR	NAT	Cette étude
pMLB0011	Cse4-linker-LgBiT-Linker-Cse4-URA	AmpR	URA	Cette étude
pMLB0012	Cse4-linker-LgBiT-Linker-Cse4-URA-Cse4 terminator	AmpR	URA	Cette étude
pMLB0014	Cse4-linker-tFT-Linker-Cse4-URA Cse4 terminator	AmpR	URA	Cette étude
pMLB0015	Cse4-linker-TAP-Linker-Cse4-URA Cse4 terminator	AmpR	URA	Cette étude
pMLB0018	Cse4-linker-NanoLuc-Linker-Cse4-URA Cse4 terminator	AmpR	URA	Cette étude
pMLB0020	Cse4-linker-mCherry-NeonGreen-Linker-Cse4 URA Cse4 term	AmpR	URA	Cette étude

Tableau 5 : Plasmides utilisés.

<i>Enzyme de restriction</i>	<i>fournisseur</i>	<i>Enzyme de restriction</i>	<i>fournisseur</i>	<i>Enzyme de restriction</i>	<i>fournisseur</i>
BamHI-HF	NEB	HindIII	NEB	SacI	NEB
BglII	NEB	NotI-HF	NEB	SpeI-HF	NEB
DpnI-HF	NEB	PmeI	NEB	XhoI	NEB
EcoRV	NEB	PstI	NEB		

Tableau 6 : Enzymes de restriction utilisées et fournisseur.

Nom	Description	Séquence 5' → 3'
oAB0044	LEU2(5'UTR)-f	cgtaagatgcaagagttcgaatc
oEB0018	Ubc4(3'UTR)-r	aacgttgacgctccctcgac
oEB0021	Ubc4(5'UTR)-f	acggatccagctcaccttgaaagccctggc
oEB0029	Ubc4(5'UTR)-f	caaatggccgagcaacagg
oEB0030	Ubc4(3'UTR)-r	cgcgcttgctgcatgtaac
oEB0069	LYP1(5'UTR)-f	cgtagtgcgctttcattgac
oEB0070	LYP1(3'UTR)-r	gaacatcgtgataatgacc
oEB0089	URA3(5'UTR)-f	agatctgtttagcttgccctg
oEB0116	Cse4(3'UTR)-r	atcaacaagtttgtacaatgtcaagtaacaacaatgggtag
oEB0117	Cse4(5'UTR)-f	ttctcattatagtaattcttttgcacgc
oGLD0013	SmBiT-Ubq(ORF)-r	cccacagttgtaaacgacggccagtgagc
oGR0006	pGEX-r	catgtgtcagaggtttcaccgctc
oGR0007	T7-f	taatacactcactataggg
oGR0019	MX4 prom-r	ctgcagcgaggagccgtaac
oGR0020	MX4 term-f	cctcgacatcatctgccc
oGR0045	Cdc34(5'UTR)-f	atcggccgctatgaaactgaaagtactggagcag
oGR0073	Cdc34(5'UTR)-f	gcgtcccgaattggtccttg
oGR0201	TEF term-f	gcaaaactaagacaataaaaagattcttgttttc
oGR0273	Psh1(5'UTR)-f	ggttaaggcgtgagactgttaac
oGR0374	FRB(ORF)-r	atctcatgccagaggatgctag
oGR0419	Ubc13(ORF)-f	agaaatgaagactgagaaattagtaagtacc
oGR0511	mCherry-sfGFP(ORF)-r	tcttcttctcgcccttgctcaccatg
oGR0549	ADH1 term-f	tggtctcactaaggcgcgccacttctaataag
oGR0552	Cse4(3'UTR)-r	cagaagtatcccttaacagctctg
oGR0556	Ubc13(3'UTR)-r	gcttacattagtgtaggacg
oGR0557	Ubc13(3'UTR)-r	cgagtaagcgaatgaaatctgg
oGR0559	Ubc13(3'UTR)-r	ttcgtgccactcttcttgg
oGR0561	Cse4(ORF)-f	cctagtgaattagctctgtacg
oGR0562	Cse4(3'UTR)-r	cgcgatgaagctccaaatca
oGR0580	CDC34(3'UTR)_r	acttagaaactattagtgaggacg
oGR0621	UBC13(ORF)-f	aagggggccgcatcattaccaagagaataac
oGR0658	Amp prom (3'UTR)-f	cttcgttcgctcctaagaaccattattatcatg
oGR0673	TEF1(ORF)-r	agcgaccagcattcacatac
oGR0692	LgBiT(ORF)-r	atttggccatctgatcagc
oGR0707	TAP(ORF)-r	gacggctatgaaattcttttccatc
oGR0798	NanoLuc(ORF)-f	gtggatccgtatttacattagaagatttcg
oMLB0012	Ubc13-FRB(ORF)-f	aaggetcgcgaatggacgaaattgtatgcaaagaagaaccggagggtcgac ggatccccgggtaattaac
oMLB0013	Ubc13-FRB(3'UTR)-r	gtaatgatataatttatattcagttgagaaaactatacagaaatgacagtatag cgaccagattcac
oMLB0014	Cdc34-FRB(ORF)-f	gaaagtgaagatgtggaggatgtagaaagagttcaaagaaaataggtcgacg gatccccgggtaattaac
oMLB0015	Cdc34-FRB(3'UTR)-r	tgagctgaatatgtttgttaaattttgtcttcttcttactgttctttcagtatagcgac cagcattcac
oMLB0038	mCherry(5'UTR)-f	gaagaaagacatgcaactagcaagaagaatcaggggacagttattcgtacgc tcaggtcgac
oMLB0039	ADH1(3'UTR)-r	accccgaaaaagggaaaaatcggctccagccctgaagcacaataatcactaa tcgatgaattcgagctcg
oMLB0040	STE3 prom-NAT-f	aaggcaaaactactataaaaatttcatgggtaccactcttgacgacac
oMLB0041	Lyp1 term-NAT-r	tgcaagaggttctgtgattaggggagggcagctgct
oMLB0042	Lyp1 term-f	tcacagaacctcttgatgcctt
oMLB0043	Ste3 prom-r	gaaaattttgatagattttgcctttcctacaaaatttaattgc
oMLB0050	pMLB0011, V-f	aaactcgtatgtgatgatacataaggttatgtatfaattgtagccgcgttctaac gacaatag

oMLB0051	pMLB0011, V-r	aatactataagatccgctagggataacagggtaatatagatctgtttagcttgcc tcgtccccgccggg
oMLB0052	pMLB0011, F1-f	ctacaattaatacataaccttatgtatcatacacatacagagtttaaacagaaaaca tctcttaaaaacagt
oMLB0053	pMLB0011, F1-r	agagctccccgccaccgccggaccctccgccccctgaacttctgaattacct gcttggtcttcgta
oMLB0054	pMLB0011, F2-f	caggaagttcagggggcggagggtccggcgggtggcgggagctctggtgga tccgtattacattagaagatttcgttg
oMLB0055	pMLB0011, F2-r	agcgtgctcttgattctgaaccgttctgaggattttccctcctcgaggctat ttattgtcactctgaa
oMLB0056	pMLB0011, F3-f	ggaaaatcctcaggaagcgggtcagaatccaagagcacgctagaaatcgag acagaaaatgaagaagaagct
oMLB0057	pMLB0011, F3-r	tctatattaccctgttatccctagcggatcttatagattgtacttgctcctaaagttt attgtcaatcacac
oMLB0060	Cse4term-f	gcgccgcgttaaacagtattgtacttgctcctaaag
oMLB0061	Cse4term-r	actagttcagggtggagccgattttc
oMLB0062	mCherry(ORF)-f	atggatccatggtgagcaagggcgagga
oMLB0063	sfGFP(ORF)-r	atctcgagtccttataaagctcgtccattccgtga
oMLB0064	TAP(ORF)-f	atggatccaagagaagatggaaaaagaa
oMLB0065	TAP(ORF)-r	atctcgagattcgcgtctactttcg
oMLB0069	NanoLuc(ORF)-f	atctcgagagctaatattctctcacaaa
oMLB0070	NanoLuc(ORF)-r	tatattctacttaccagcagcagatccactagtgccctatgc
oMLB0074	pMLB0012 V-f	ggccactagtggatctgatcatcg
oMLB0075	pMLB0012 V-r	tatgcgccgcggatctg
oMLB0076	Cse4(5'UTR)-f	tcttgatcccactgtgtcgc
oMLB0077	Cse4(3'UTR)-r	catacttctgttcgcacgg
oMLB0079	NeonGreen(ORF)-r	ataggatccctgtacaattcgtccatacc
oMLB0080	pMLB0020-F1-f	acccttagaaaccattgtccagcaccagcaccagcacct
oMLB0081	pMLB0020-F2-f	gtgctggtgctggagcaatggttctaagggtgaaga
oMLB0083	pMLB0020, V-r	acggatccaccagagctccccgc
oMLB0084	pMLB0020, V-f	gcctcgaggagggaaaatcctc
oMLB0085	pMLB0020-F1-f	ttcagggggcggagggtccggcgggtggcgggagctctggtatggtgagcaag tggattctgaaccgcttctgaggattttccctcctcgagctgtacaattcgtcc ataccataacg
oMLB0086	pMLB0020-F2-r	

Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés.

(Integrated DNA Technologies).

II. Méthodes

1- Milieux utilisés

a- Milieux solides et liquides

- Milieu YPD : 1 % bacto yeast extract, 2 % bacto peptone, 2 % dextrose.
- Milieu minimum (SD) : 0,17 % Difco yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 0,5 % ammonium sulfate, 2 % dextrose. Les acides aminés en solution 10X sont ajoutés après stérilisation en autoclave.
- Milieu pour la microscopie (SD+Ade) : 0,17 % Difco yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 0,5 % ammonium sulfate, 2 % dextrose, 5 % adénine. Les acides aminés en solution 10X sont ajoutés après stérilisation en autoclave.
- Milieu ZnSPO : 0,0025 % zinc acetate, 2 % d'agar rincé à l'eau. Les acides aminés en solution 10X sont ajoutés après stérilisation en autoclave.
- Milieu α -aminoadipate : 0,17 % Difco yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 4 % solution d' α -aminoadipate, 2 % lysine, 2 % dextrose. Les acides aminés en solution 10X sont ajoutés après stérilisation en autoclave. Ce milieu permet de contre-sélectionner le marqueur LYS.
- Solution d' α -aminoadipate : 5 % de poudre d' α -aminoadipate, ajouter 1M de KOH jusqu'à l'obtention d'un pH \approx 6.
- Solution stock d'acides aminés 10X : 0,02 % adénine, 0,02 % uracile, 0,02 % histidine, 0,03 % lysine, 0,06 % leucine, 0,02 % méthionine, 0,02 % tryptophane. Pour la sélection et selon les marqueurs auxotrophiques de souches, des acides aminés peuvent être retirés.

Tous les milieux et la solution stock d'acides aminés et de suppléments sont complétés avec de la ddH₂O puis stérilisés par autoclavage en cycle court. Les milieux solides sont obtenus en ajoutant 2 % d'agar au milieu liquide avant autoclavage.

b- Milieux solides de sélection d'haploïdes sur plaques

- Milieu YPD : 1 % bacto yeast extract, 2 % bacto peptone, 2 % dextrose.
- SC(MSG) : 0,17 % Difco yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 0,5 % ammonium sulfate, 0,2 % mix d'acides aminés, 2 % dextrose. Le mix d'acides aminés en poudre est ajouté après stérilisation en autoclave.

Matériels et méthodes

- Milieu de sporulation pauvre : 2 % agar, 2 % acétate de potassium.
- Mix d'acides aminés : 2,5 g adénine, 10 g alanine, 10 g asparagine, 10 g acide aspartique, 10 g cystéine, 10 g glutamine, 10 g glycine, 10 g inositol, 10 g isoleucine, 10 g méthionine, 1 g 4-aminobenzoic acide, 10 g phénylalanine, 10 g proline, 10 g sérine, 10 g thréonine, 10 g tryptophane, 10 g tyrosine, 10 g valine. Pour la sélection et selon les marqueurs auxotrophiques de souches, des acides aminés peuvent être retirés.

Tous les milieux sont complétés avec de la ddH₂O puis stérilisés par autoclavage en cycle court. Le mix d'acides aminés est ajouté à posteriori, puis le milieu est filtré ou autoclavé en cycle court. Les milieux solides sont obtenus en ajoutant 1 % d'agarose au milieu liquide avant autoclavage.

c- Milieu pour le SILAC

- Milieu minimum (SD) : 0,17 % Difco yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 0,5 % ammonium sulfate, 2 % dextrose. Les acides aminés en solution 5X sont ajoutés après stérilisation en autoclave.
- Solution stock d'acides aminés 5X : 0,9 % adénine, 3,8 % alanine, 3,8 % arginine, 3,8 % asparagine, 3,8 % acide aspartique, 3,8 % cystéine, 3,8 % glutamine, 3,8 % acide glutamique, 3,8 % glycine, 3,8 % histidine, 3,8 % myo-inositol, 3,8 % isoleucine, 3,8 % méthionine, 4 % 4-aminobenzoic acide, 3,8 % phénylalanine, 3,8 % proline, 3,8 % sérine, 3,8 % thréonine, 3,8 % tryptophane, 3,8 % tyrosine, 3,8 % uracile, 3,8 % valine.

d- Antibiotiques

Antibiotiques	Concentration stock (H ₂ O)	Dilution dans les milieux liquides ou agar	Dilution dans les milieux avec agarose	Marqueur de résistance
Généticine	200 mg.mL ⁻¹	1/1000	1/8000	Kan
Nourseothricine	100 mg.mL ⁻¹	1/1000	1/4000	Nat
Hygromycine B	300 mg.mL ⁻¹	1/1000	1/4000	Hph
Bialaphos	200 mg.mL ⁻¹	1/1000	-	Pat
Canavanine	50 mg.mL ⁻¹	1/1000	1/4000	<i>can1Δ</i>
Thialysine	50 mg.mL ⁻¹	1/1000	1/2000	<i>lyp1Δ</i>
Ampicilline	100 mg.mL ⁻¹	1/1000	-	Amp (bactérie)
Tétracycline	10 mg.mL ⁻¹	1/1000	-	

Tableau 8 : Antibiotiques utilisés.

Inhibiteurs	Concentration stock	Concentration finale	Rôle	Provenance
α-factor	5 mg.mL ⁻¹ (H ₂ O)	1/1000	Synchronisation en G1	GenScript
Hydroxyurée	-	15 mg.mL ⁻¹	Synchronisation en S Note : dissoudre la poudre directement dans le milieu	Euromedex
Nocodazole	5 mg.mL ⁻¹ (DMSO)	1/500	Synchronisation en M/G2	Medchem Tronica
Rapamycine	1 mg.mL ⁻¹ (DMSO)	1/1000	Induction du complexe FRB-FKBP12	LC laboratories

Tableau 9 : Antibiotiques et inhibiteurs utilisés.

2- Construction de plasmides

Les plasmides ont été obtenus par ligation de fragments d'ADN grâce à la T4 DNA ligase (Takara) ou par la technique d'assemblage Gibson (NEB) en utilisant un ratio insert/vecteur de 3/1. Les fragments d'ADN sont obtenus par PCR (Polymerase chain reaction) ou par digestion. Les PCRs sont réalisées avec la polymérase Phusion High Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (NEB) et le thermo-cycleur T100™ (Bio-Rad). La température d'annealing est calculée grâce au NEB Tm Calculator. Les fragments issus d'ADN génomique sont purifiés sur gel d'agarose 0,8 % GelRed 1 : 20 000 et les fragments issus de plasmide sont traités avec l'enzyme DpnI. Les digestions enzymatiques sont réalisées grâce aux enzymes listées dans le Tableau 6 pendant au moins une heure à 37°C dans le tampon recommandé. Après ligation, les plasmides sont amplifiés par transformation de bactéries compétentes DH5 α sélectionnées sur boîte LB + ampicilline préchauffée à 37°C. Les purifications d'ADN génomique, les purifications sur gel et les extractions plasmidiques sont réalisées grâce aux kits Machery-Nagel. Les plasmides sont séquencés en utilisant un kit de séquençage (BigDye, Thermo Fisher) et le séquenceur Applied Biosystems 3130 XL.

3- Obtention de souches de levures

Pour obtenir de nouvelles souches, des fragments d'ADN linéaires (produits de PCR ou plasmides linéarisés) ont été introduits dans le génome de la levure et ciblés au locus souhaité par recombinaison homologue. Les transformations sont réalisées d'après la méthode décrite dans Gietz et Woods, 2002. Les souches de levures sont inoculées dans un milieu YPD à 30°C. Le lendemain, les cellules sont diluées 20 fois et cultivées pendant 3 à 5 heures. Après centrifugation, les levures sont lavées dans du LiAc mix (Tris 10 mM pH 8, 0,1 M acétate de

lithium, 1 mM EDTA) puis resuspendues dans 100 μ L de LiAc mix + 700 μ L de PEG mix (400 g.L^{-1} Polyethyleneglycol 3350 dans du LiAc mix) + 30 μ L d'ADN de sperme de saumon à 10 mg/mL préalablement chauffé à 95°C pendant 5 min + ADN d'intérêt (25 μ L d'une digestion ou 50 μ L d'un produit de PCR). Un choc thermique est ensuite réalisé à 42°C pendant 40 min avec agitation. Après centrifugation, les levures sont resuspendues dans 100 μ L d'eau stérile et étalées sur un milieu de sélection approprié. Par cette méthode, il est aussi possible de transformer les levures avec un plasmide circulaire qui comporte sa propre origine de réplication en utilisant environ 500 ng.

Les autres souches ont été obtenues par croisement et sélection des haploïdes d'après Tong et Boone, 2007. Les cellules sont manipulées en plaque solide 96 colonies grâce au ROTOR HDA (Singer). Les souches scMLB0187 (Cse4-tFT(NG)^{interne}) et scMLB0199 (Cse4-LgBiT-10-HIS^{interne} + SmBiT-Ubiquitine) ont été croisées avec une collection de levures délétées pour des gènes d'E2 ou d'E3 présentes sur une plaque 96 puits provenant du laboratoire de Michael Knop (Heidelberg, Allemagne). Ces souches comportent les mutations *lyp1Δ* et *can1Δ* qui leur apportent respectivement une résistance à la thialysine et à la canavanine. De plus, elles expriment le marqueur d'auxotrophie SpHIS5 sous le contrôle du promoteur STE2. Grâce à ce promoteur, seules les cellules MAT-a seront capables de pousser sur un milieu dépourvu d'histidine. Après croisement, les diploïdes sont sélectionnés sur YPD + G418 + NAT puis mis à sporuler pendant 5 à 7 jours sur milieu de sporulation pauvre. Trois sélections successives sont ensuite réalisées pour sélectionner les levures haploïdes MAT-a sur milieu SC (MSG) -Arg / Lys / Ura / His + canavanine + thialysine + G418 pour les croisements avec scMLB0187 et SC (MSG) -Arg / Lys / Ura / His / Leu + canavanine + thialysine + G418 pour ceux avec scMLB0199. Dans ces conditions, les diploïdes sont hétérozygotes pour les mutations *lyp1Δ* et *can1Δ* et ne sont donc pas résistants à la canavanine et la thialysine. Les haploïdes MAT- α ne sont pas capables d'exprimer le marqueur SpHIS5 et donc de pousser sur un milieu dépourvu d'histidine. Sur les milieux sélectifs utilisés, seul les haploïdes MAT-a peuvent pousser, ce qui nous permet de les sélectionner.

4- Conditions de culture

Les souches obtenues sont cultivées à 30°C sous agitation en milieu YPD ou en milieu minimum afin de maintenir leur plasmide répliatif. Lors de toutes les expériences, les cultures mises à pousser pendant la nuit sont diluées à une DO₆₀₀ de 0,2 ou 0,3 puis la DO₆₀₀

est suivie régulièrement pour ne pas dépasser 1 afin que les levures soient dans une phase de croissance exponentielle. Les souches « anchor-away » sont traitées pendant 5 heures avec la rapamycine à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour induire l'export des protéasomes nucléaires en dehors du noyau. Les traitements avec les inhibiteurs du cycle cellulaire sont réalisés pendant 90 minutes ou 5 heures aux concentrations indiquées dans le Tableau 9. Lors des expériences de relargage dans le cycle cellulaire, les cellules sont synchronisées pendant 90 min avec de l' α -factor. Elles sont ensuite collectées par filtration, rincées 3 fois au PBS et relarguées dans un milieu YPD. Dans certaines conditions, de l'hydroxyurée est ajoutée au milieu de relargage.

Les tests de croissance sur gélose sont réalisés en déposant $5 \mu\text{L}$ de dilution en série de cultures à une DO_{600} de 0,2 puis des dilutions au $\frac{1}{4}$ sont réparties sur des plaques YPD et incubées à 30 ou 37°C .

5- Purification His-Ubiquitine

La purification His-Ubiquitine permet d'enrichir les protéines ubiquitylées afin de les analyser. Après culture, 100 DO_{600} sont resuspendues dans du TCA 20 % et broyées mécaniquement pendant 3 min avec des billes de verre et le Disrupter Genie homogenizer (Scientific Industries). Après précipitation, les protéines sont resuspendues dans 3 mL de tampon de purification (6 M GndHCl, 100 mM Tris-HCl pH 9, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0,2 % Triton X-100, 5 mM chloroacetamide) et clarifiées par centrifugation 30 min à 13 500 rpm. Les protéines sont quantifiées avec le kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific) et incubées dans les mêmes quantités (environ 10 mg) pendant 90 min à température ambiante avec $30 \mu\text{L}$ de résine d'affinité (TALON® Clontech). La résine est lavée deux fois avec $500 \mu\text{L}$ de tampon 8 M Urée, 100 mM phosphate de sodium pH 7, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole, 0,2 % Triton X-100, 5 mM chloroacétamide, puis deux fois avec le même tampon supplémenté de 0,2 % SDS. Les protéines His-Ubiquitine sont éluées dans un volume de $50 \mu\text{L}$ de solution d'éluion 8 M Urée, 100 mM phosphate de sodium pH 7, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 0,2 % Triton X-100, 5 mM chloroacétamide. Les protéines totales et éluats sont analysées par SDS-PAGE et immunoblot.

6- SDS-PAGE et immunoblot

Les extraits de protéines totales sont préparés grâce à une précipitation au TCA 20 % de 100 µg de protéines. Après un lavage à l'acétone, le culot de protéines est resuspendu dans 90 µL de tampon dénaturant (Tris 450 mM pH 8,8, SDS 1 %, EDTA 2 mM, glycérol 15 %) et 10 µL de dithiotretiol (DTT 1M) et incubé 5 min à 95°C. Les éluats sont additionnés de tampon Laemmli 4X (Tris 250 mM pH 6,8, glycérol 25 %, SDS 8 %) et 10 % de DTT (1 M) et incubés 15 min à 30°C. 5 µL des extraits totaux et 10 µL des éluats sont chargés sur deux gels de polyacrylamide 4-20 % (Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gels, BioRad). Les protéines et le marqueur de taille (Precision Plus protein standards All Blue or unstained, BioRad) sont migrés pendant 30 min environ à 200 V avec le Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Biorad) dans un tampon Tris-Glycine-SDS. Le premier gel sert de contrôle, les niveaux de protéines totales sont révélés par une coloration au nitrate d'argent (décrite ultérieurement) pour les éluats ou en utilisant la coloration Stain-Free™ avec un appareil Gel Doc™ EZ (Biorad) pour les extraits totaux. Le second gel est utilisé pour transférer les protéines sur une membrane de nitrocellulose 0,2 µm grâce à un transfert semi-sec avec le TransBlot Turbo™ (Biorad). Après le transfert, la membrane est bloquée 1 h avec du PBS 0,1 % Tween 5 % lait, puis incubée avec un anticorps contre l'étiquette TAP lié à la HRP (PAP, 1 : 1000, Sigma) pendant une nuit à 4°C. La membrane est ensuite lavée et révélée par l'ECL SuperSignal West Femto Substrate (Thermo Scientific) et en utilisant des films autoradiographiques (CP-BU, Agfa) développés par la Curix 60 developing machine (Agfa).

7- Coloration au nitrate d'argent

Le gel de polyacrylamide est incubé pendant 10 min dans une solution de fixation (acide acétique à 10 % et éthanol 40 %) puis lavé successivement dans une solution d'éthanol 50 % et d'éthanol 30 % pendant 10 min. La sensibilisation est réalisée pendant une minute dans une solution de Na₂S₂O₃ 0,8 mM. Après lavage dans de l'eau distillée, le gel est incubé 30 min dans une solution de nitrate d'argent (2 g.L⁻¹ AgNO₃, 0,026 % formaldéhyde). Après lavage à l'eau distillée, la révélation est réalisée dans une solution 3 % Na₂CO₃, 0,0185 % formaldéhyde, 16 µM Na₂S₂O₃. La révélation est arrêtée en ajoutant une solution d'acide acétique 10 %.

8- Couplage des anticorps anti-GlyGly

Les billes et les anticorps anti-GlyGly du kit PTMScan ®Ubiquitin Remnant Motif (K-ε-GG) (Cell Signaling Technology) sont lavés deux fois avec 500 µL de 100 mM borate de sodium pH 9. Le couplage est réalisé en incubant pendant 30 min avec 500 µL de 20 mM diméthyl pimélimidate (DMP) préparé extemporanément dans du borate de sodium. Les billes sont lavées deux fois avec 500 µL de 200 µM éthanolamine pH 8 et bloquées pendant une nuit à 4°C en présence d'éthanolamine. Les billes et l'anticorps sont lavés et resuspendus dans le tampon IAP (50 mM MOPS pH 7,2, 10 mM Sodium Phosphate, 50mM NaCl) et conservés à 4°C pendant au moins une nuit.

9- SILAC

La technique de SILAC (Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture) est adaptée afin de pouvoir comparer l'ubiquitylation des protéines dans une souche sauvage et une souche mutante. Les deux souches utilisées (scMLB0002 et scMLB0003) sont cultivées dans un milieu SILAC - Leu - Lys + tétracycline pendant environ 48 heures à 30°C sous agitation. Lors de la culture, les cellules sont diluées régulièrement pour les maintenir dans une phase exponentielle de croissance. La rapamycine est ajoutée 5 heures avant l'extraction des protéines. Afin de marquer différemment les protéines, la souche sauvage est cultivée dans un milieu contenant de la lysine légère $^{12}\text{C}_6$ alors que la souche *psh1Δ* est cultivée dans un milieu contenant de la lysine lourde $^{13}\text{C}_6$. Les levures comportent la mutation *lys2Δ* afin qu'elles utilisent la lysine présente dans le milieu de culture. Après culture, la DO_{600} de chaque souche est mesurée et les deux cultures sont mélangées à un ratio de 1 : 1. Les cellules sont centrifugées 3 min à 9000 rpm, puis à l'aide d'une seringue, des billes sont formées à partir des culots et plongées dans l'azote liquide pour une conservation à -80°C. Les billes de cellules obtenues sont broyées en condition cryogénique grâce au CryoMill (Retsch). La poudre obtenue est lavée et resuspendue dans du TCA 20 %. Le protocole est ensuite le même que celui de la purification His-Ubiquitine en adaptant les volumes. Après élution, les échantillons sont analysés sur un gel de polyacrylamide et coloration à l'argent puis concentrés dans un tampon de digestion (50 mM Tris pH 8, 6 M urée, 2 M thiourée) en utilisant un filtre à centrifuger Amicon®Ultra Ultracel®-3K system (Merk Millipore). Puis les échantillons sont réduits (DTT à 5 mM final pendant 30 min à 20°C), alkylés (Chloroacétamide à 50 mM final pendant 30 min à 20°C) et digérés par la Lys-C (45 µg.mL⁻¹

pendant 3 heures à 20°C) et la trypsine (15 µg.mL⁻¹ pendant une nuit à 20°C) afin de produire des peptides qui sont reconnus spécifiquement par l'anticorps anti-GlyGly. Après acidification à l'acide formique (0,5 % final) pour stopper la digestion, les échantillons sont dessalés grâce aux colonnes SEP-Pak®Vac tC18 Cartridge (Waters), congelés à -80°C, puis lyophilisés avec le Heto Drywinner. Les peptides obtenus sont resuspendus dans du tampon IAP (50 mM MOPS pH 7,2, 10 mM Sodium Phosphate, 50 mM NaCl) puis incubés pendant la nuit avec les anticorps anti-GlyGly précédemment couplés aux billes. Les billes sont lavées trois fois avec du PBS puis de l'eau et les peptides sont élués deux fois avec du TFA 0,15 %. Les échantillons ont ensuite été analysés par la plateforme de protéomique de l'Institut Jacques Monod à Paris.

10- Purification LgBiT-His

Après culture, 40 DO₆₀₀ sont resuspendues dans du TCA 20 % et broyées mécaniquement pendant 3 min avec des billes de verre et le Disrupter Genie homogenizer (Scientific Industries). Après précipitation, les protéines sont resuspendues dans 3 mL de tampon de purification sans imidazole (6 M GndHCl, 100 mM Tris-HCl pH 9, 300 mM NaCl, 0,2 % Triton X-100, 5 mM chloroacetamide), clarifiées par centrifugation 30 min à 13 500 rpm. Les protéines sont quantifiées avec le kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific) et incubées dans les mêmes quantités (environ 4 mg) pendant 90 min à température ambiante avec 30 µL de résine d'affinité (TALON® Clontech). La résine est lavée deux fois avec 500 µL de tampon de purification puis deux fois avec un tampon 2 M Urée, 100 mM phosphate de sodium pH 7, 300 mM NaCl. Les protéines His-Ubiquitine sont éluées avec 50 µL d'une solution d'éluion 2 M Urée, 100 mM phosphate de sodium pH 7, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole. En cas de traitement avec des DUBs, après incubation de 90 min, la résine est lavée deux fois avec le tampon de purification puis deux fois avec un tampon natif 50 mM Tris pH 7,5, 100 mM phosphate de sodium pH 7,5 mM β-mercaptoéthanol. Les billes sont resuspendues dans le tampon natif avec les DUBs aux concentrations suivantes : USP2 1 µM, AMSH 0,2 µM, Cezanne 0,25 µM, OTUB1 2,5 µM. L'incubation a lieu pendant la nuit à 37°C (ou 1 h à 37°C pour USP2). Mis à part USP2 (Enzo life Sciences), toutes les DUBs ont été produites et purifiées dans le laboratoire.

Les éluats sont répartis en duplicata de 20 µL dans une microplaque 96 demi-puits en polystyrène blanc (Greiner). Sur la même plaque, la quantité de protéines Cse4-LgBiT est

mesurée grâce au peptide HiBiT qui possède une forte affinité pour le LgBiT. Le peptide HiBiT a été synthétisé par ProtéoGenix à partir de sa séquence. Un mix contenant 4 μL d'éluat, 10 μL HiBiT à 10 μM et 36 μL de PBS 0,1 % BSA est réalisé et réparti en deux fois 20 μL dans la plaque. Afin d'éviter toute interférence lors de la lecture de la plaque, les éluats et les échantillons HiBiT sont espacés sur la plaque. Dans chaque puits est ajouté 20 μL de furimazine (1/200 de Nano-Glo® Substrate (Promega) dans du PBS 0,1 % BSA). La luminescence est mesurée pendant 0,3 seconde avec le luminomètre Xenius XL (SAFAS).

11- Cytométrie en flux

0,5 mL de culture à 1 DO_{600} est centrifugé, resuspendu dans 250 μL d'eau et fixé dans 5 mL d'éthanol à 75 % avant d'être conservé une nuit à 4°C. Les cellules sont ensuite centrifugées et le culot est resuspendu dans 500 μL de PBS, puis dans 250 μL de RNase (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 10 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl) et incubé pendant 1 heure à 37°C. Après une nouvelle centrifugation, le culot est resuspendu avec 100 μL de protéinase K (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans du PBS), soniqué et incubé 1h à 50°C. Les cellules sont à nouveau resuspendues dans 250 μL de PBS puis soniquées 2 min et additionnées d'iodure propidium à une concentration finale de 0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La fluorescence de l'iodure de propidium à 614 nm renseigne sur la quantité d'ADN présent et donc sur la phase du cycle cellulaire des cellules. Les échantillons sont analysés grâce au trieur FACSariaII (BD). Lors de ces analyses, le nombre d'évènements collectés est de 10 000.

12- Analyse de la fluorescence

La fluorescence des cellules est analysée soit par lecture de la fluorescence de colonies cultivées sur gélose, soit par microscopie. Les plaques de gélose sont réalisées en milieu SD + Ade. La fluorescence est lue grâce au lecteur de plaque Infinite M1000 (Tecan). Pour la GFP et NeonGreen, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement autour de 485 et 510 nm. Pour la mCherry, elles sont respectivement de 587 et 610 nm.

Pour la microscopie, les cellules sont cultivées dans un milieu liquide SD + Ade. Les cellules sont transférées dans des chambres LabTek 8 puits (Dutscher) et cultivées pendant 3 heures à 25°C sans agitation. Les images sont prises grâce au microscope confocal AiryScan Zeiss LSM 880 avec un objectif 63X à huile. L'acquisition des images est réalisée

Matériels et méthodes

grâce au logiciel ZEN (Zeiss) et les images sont analysées grâce au logiciel ImageJ. L'intensité au centromère est définie grâce à une macro qui lisse l'image grâce à un filtre « band-pass » puis quantifie les signaux qui se trouvent au-dessus d'un seuil et d'une taille définis. Le bruit de fond du cytoplasme de la cellule correspondante est soustrait pour obtenir la fluorescence au centromère.

RÉSULTATS

I. Étude des substrats de Psh1

1- Identification de substrats potentiels de Psh1

Notre équipe a montré par BiFC que Psh1 interagit avec différentes E2s. Ces différentes E2s pourraient servir pour l'ubiquitylation de plusieurs substrats. Afin d'identifier ces substrats potentiels de Psh1, nous avons mis en place une technique de protéomique quantitative dans le laboratoire.

L'ubiquitylation est un procédé complexe à étudier, car la plupart des protéines sont dégradées rapidement après ubiquitylation. Afin d'enrichir les échantillons en protéines ubiquitylées dans le noyau, nous utilisons des souches basées sur la technique « anchor-away » (Haruki et al., 2008). Dans ces souches, une sous-unité du protéasome (Pre8) est fusionnée avec le domaine FRB et une sous-unité du ribosome (Rp113A) est fusionnée à FKBP12 (Figure 14). En présence de rapamycine, FKBP12 et FRB s'hétérodimérisent et sont exportées vers le cytoplasme grâce au flux ribosomique transitant par le noyau lors du processus d'assemblage des particules 40S et 60S du ribosome. Cet export du complexe FRB-FKBP12 entraîne la relocalisation de la sous-unité du protéasome dans le cytoplasme et donc l'inactivation des protéasomes nucléaires. Notre équipe a précédemment confirmé qu'un traitement à la rapamycine permet d'extraire la sous-unité Pre8 du noyau ce qui entraîne une accumulation de protéines nucléaires ubiquitylées (données non présentées obtenues par Emeline Pasquier).

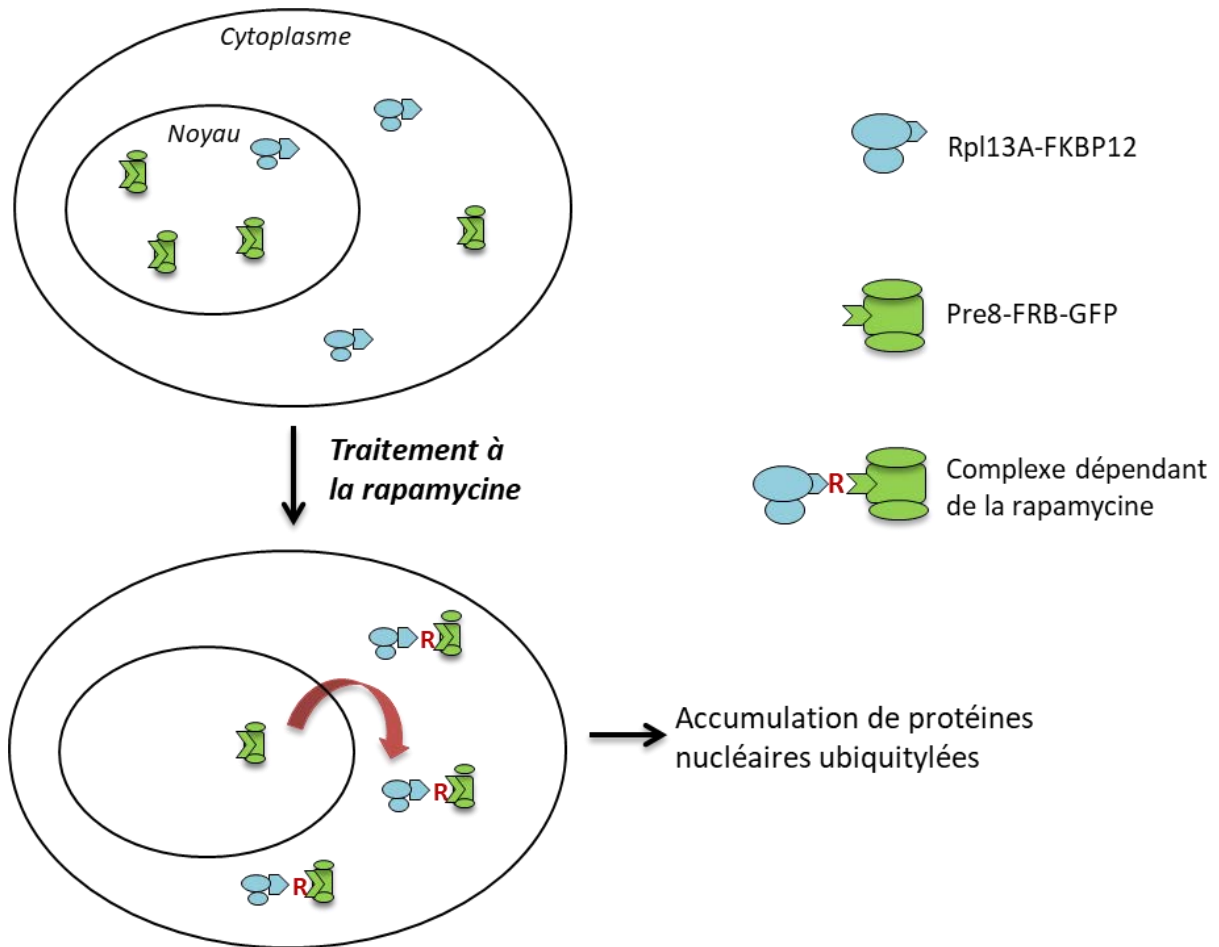


Figure 14 : Principe des souches « anchor-away ».

La sous-unité Rpl13A du ribosome et la sous-unité Pre8 du protéasome sont fusionnées respectivement au domaine FKBP12 et FRB-GFP. Un complexe se forme entre FRB et FKBP12 après addition de rapamycine. Une fois formé, ce complexe sera exporté vers le cytoplasme grâce au flux ribosomique transitant par le noyau au cours du processus d'assemblage des particules 40S et 60S du ribosome.

Résultats

Afin d'identifier des substrats potentiels de Psh1, une technique de SILAC a été mise au point dans le laboratoire en utilisant les souches « anchor-away ». La technique de SILAC (Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture) est une méthode de protéomique quantitative qui permet de comparer le protéome de cellules cultivées dans différentes conditions (Ong et al., 2002). Ici, l'objectif est de comparer l'ubiquitylation des protéines dans une souche sauvage et dans une souche *psh1Δ* (Figure 15). Les cellules sont cultivées en présence d'acides aminés marqués qui sont incorporés dans toutes les protéines nouvellement synthétisées. Dans notre cas, les levures sont cultivées dans un milieu contenant de la lysine légère pour la souche sauvage ou de la lysine lourde pour la souche *psh1Δ*. Afin que les cellules utilisent la lysine présente dans le milieu, des souches auxotrophes à la lysine sont utilisées. Après purification des protéines ubiquitylées, les protéines sont digérées avec la trypsine (clivage en C-terminal des résidus arginine et lysine) et la lys-C (clivage en C-terminal des résidus lysine). Cette double digestion permet de produire des peptides branchés GlyGly au niveau des résidus ubiquitylés (Figure 15). Ces peptides sont ensuite purifiés à l'aide d'un anticorps spécifique et identifiés par spectrométrie de masse. Le marquage des lysines assure que l'ensemble des peptides ubiquitylés issus du clivage tryptique contient au moins une lysine marquée.

L'analyse par spectrométrie de masse permet de détecter une différence de masse entre les peptides GlyGly marqués avec la lysine légère et ceux marqués avec la lysine lourde, et donc d'identifier la culture d'origine des peptides. Le ratio des intensités des peptides légers/lourds est utilisé pour obtenir la quantification relative des protéines ubiquitylées entre les deux cultures. Ainsi, une protéine ubiquitylée de la même façon dans la souche sauvage et la souche *psh1Δ* aura un ratio léger/lourd proche de 1. Une protéine davantage ubiquitylée dans la souche sauvage (milieu léger) que dans la souche *psh1Δ* (milieu lourd) aura un ratio léger/lourd supérieur à 1 et inversement (Figure 15).

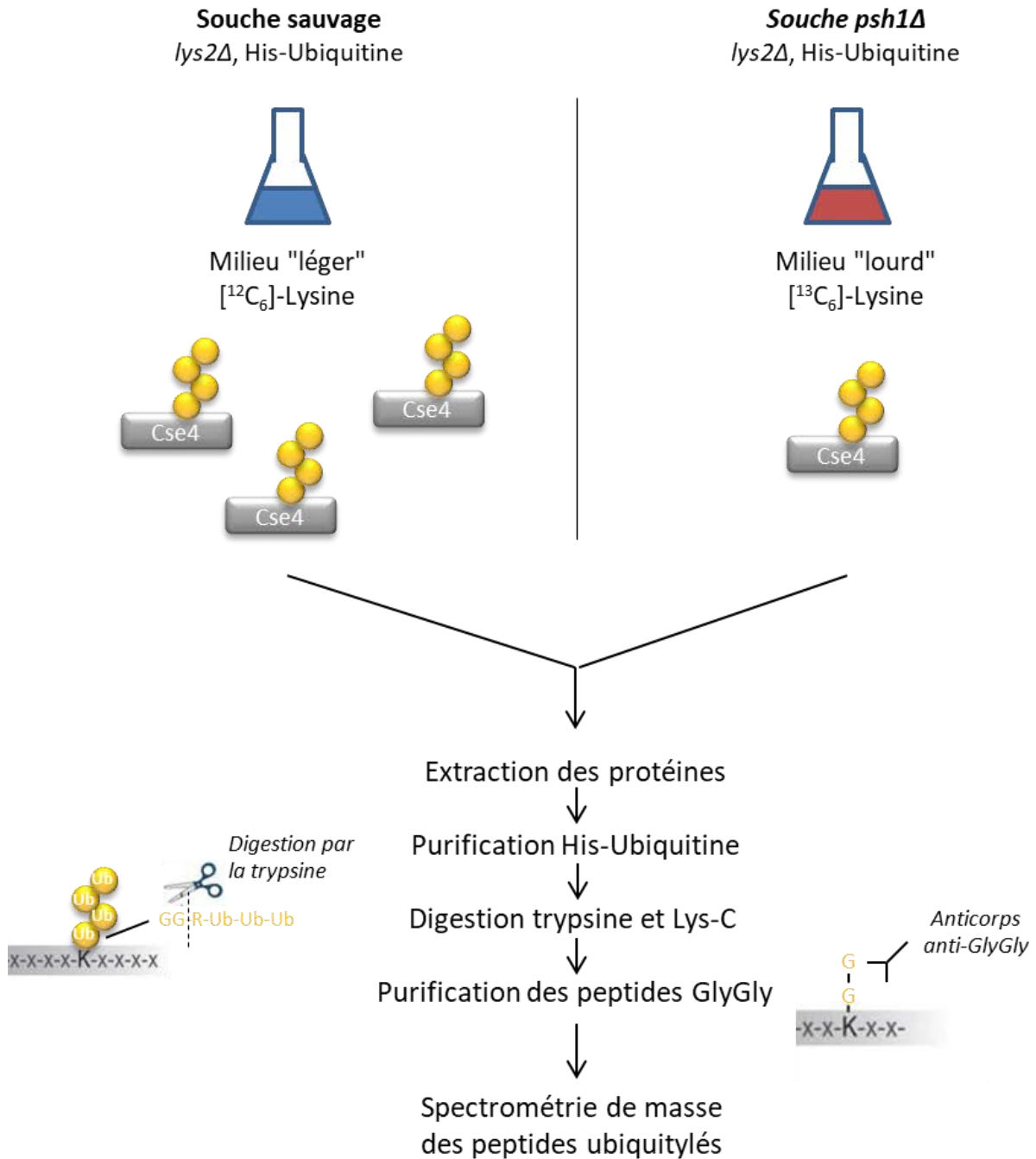


Figure 15 : Principe de l'expérience de SILAC, marquage des acides aminés grâce à des isotopes stables en culture cellulaire.

Les levures sont cultivées dans un milieu contenant de la lysine légère ou lourde. Après extraction des protéines et purification de l'étiquette His, les protéines purifiées sont digérées par la trypsine et la Lys-C pour donner des peptides. Ceux-ci sont ensuite purifiés avec un anticorps anti-GlyGly reconnaissant le site de branchement de l'ubiquitine sur ses substrats. Les peptides purifiés sont ensuite analysés par spectrométrie de masse.

Un récapitulatif des peptides identifiés lors du SILAC est présenté en Figure 16. A. Au total, plus de 4 800 peptides ont été identifiés par spectrométrie de masse appartenant à 2237 protéines différentes. Certains ne sont pas des peptides uniques, c'est-à-dire que leur séquence se retrouve dans plusieurs protéines, il est donc impossible de connaître la protéine dont ils sont issus. Ici nous nous intéresseront uniquement aux peptides uniques quantifiés qui présentent une modification GlyGly, soit 3694 peptides. Nous nous attendons à ce qu'un substrat de Psh1 soit davantage ubiquitylé dans la souche sauvage que dans la souche *psh1Δ* ce qui correspond à un ratio léger/lourd supérieur à 1. Plus de cent peptides modifiés GlyGly montrent un ratio supérieur à 2 et seulement 60 peptides ont un ratio supérieur à 4. À l'inverse, 161 peptides montrent un ratio léger/lourd inférieur à 0,5 et 32 un ratio inférieur à 0,25. Nous n'observons donc pas d'enrichissement des peptides présentant un ratio deux fois supérieur par rapport aux peptides présentant un ratio deux fois inférieur. Par contre, les peptides présentant un ratio 4 fois plus grand sont plus nombreux que ceux avec un ratio 4 fois plus petits. Nous avons donc choisis d'étudier les 60 peptides, provenant de 54 protéines différentes, présentant un ratio supérieur à 4.

Psh1 est principalement localisée au niveau du noyau. Afin de trouver ses substrats potentiels, nous avons choisi de nous intéresser uniquement aux protéines présentant un ratio supérieur à 4 et ayant une localisation nucléaire. Nous avons trouvé deux protéines connues pour localiser au niveau du kinétochore et qui nous paraissait des substrats potentiels de Psh1 : Cbf2 et Spc105 (Figure 16.B). De plus, nous nous sommes aussi intéressés à la protéine YOR111W, qui a une localisation et une fonction inconnue.

Cse4 présente un ratio léger/lourd de 1,26. Ce ratio légèrement supérieur à 1 semble confirmer qu'il s'agit d'un substrat de Psh1, mais aussi que d'autres ubiquitine ligases sont impliquées et que Cse4 est toujours ubiquitylée dans la souche *psh1Δ*. Ces résultats montrent aussi que Cse4 est ubiquitylée *in vivo* sur les lysines 131, 155 et 163. De plus, il est intéressant de noter qu'Ubc4 présente un ratio léger/lourd de 0,24, elle est donc quatre fois moins ubiquitylée dans la souche sauvage que dans la souche *psh1Δ* (Figure 16.B).

A.

	Nombre de peptides (protéines correspondantes)
Peptides totales identifiés	4865 (correspondant à 2237 protéines)
Peptides uniques quantifiés modifiés GlyGly	3694 (correspondant à 1209 protéines)
Peptides avec ratio léger/lourd > 4 et modification GlyGly	60 (correspondant à 54 protéines)
Peptides avec ratio léger/lourd > 2 et modification GlyGly	128 (correspondant à 101 protéines)
Peptides avec ratio léger/lourd < 0,5 et modification GlyGly	181 (correspondant à 131 protéines)
Peptides avec ratio léger/lourd < 0,25 et modification GlyGly	35 (correspondant à 29 protéines)

B.

	Ratio léger/lourd de la protéine	Ratio léger/lourd des différents peptides GlyGly			Localisation
Cse4	1.26	1,2	1,5	1,2	Centromère
Cbf2	100		100		Kinétochore
Spc105	100		100		Kinétochore
Yor111W	6.6	1,3		10,4	?
Ubc4	0.24				Cytoplasme et noyau

Figure 16 : Résultats de l'expérience de SILAC.

(A) Résultats généraux du nombre de peptides et protéines identifiés par spectrométrie de masse.

(B) Exemple de protéines montrant un changement de la quantité de peptides GlyGly dans la souche *psh1Δ* comparé à la souche sauvage. Un ratio léger/lourd > 1 est attendu pour un substrat potentiel de Psh1. Un ratio de 100 indique que le peptide ou la protéine n'ont été quantifiés que dans la souche sauvage.

2- Analyse de l'ubiquitylation de substrats potentiels

Trois substrats potentiels de Psh1 ont été retenus après l'expérience de SILAC. Afin de tester s'il s'agit de substrats de Psh1, l'ubiquitylation de ces protéines a été étudiée par Western-blot. Chacun des substrats Spc105, Cbf2 et YOR111W ont été fusionnés de manière endogène avec l'étiquette TAP dans une souche « anchor-away » exprimant l'ubiquitine fusionnée à une étiquette His. Après purification des protéines ubiquitylées grâce à l'étiquette His, les protéines purifiées sont détectées par marquage des protéines totales ou grâce à un anticorps anti-TAP.

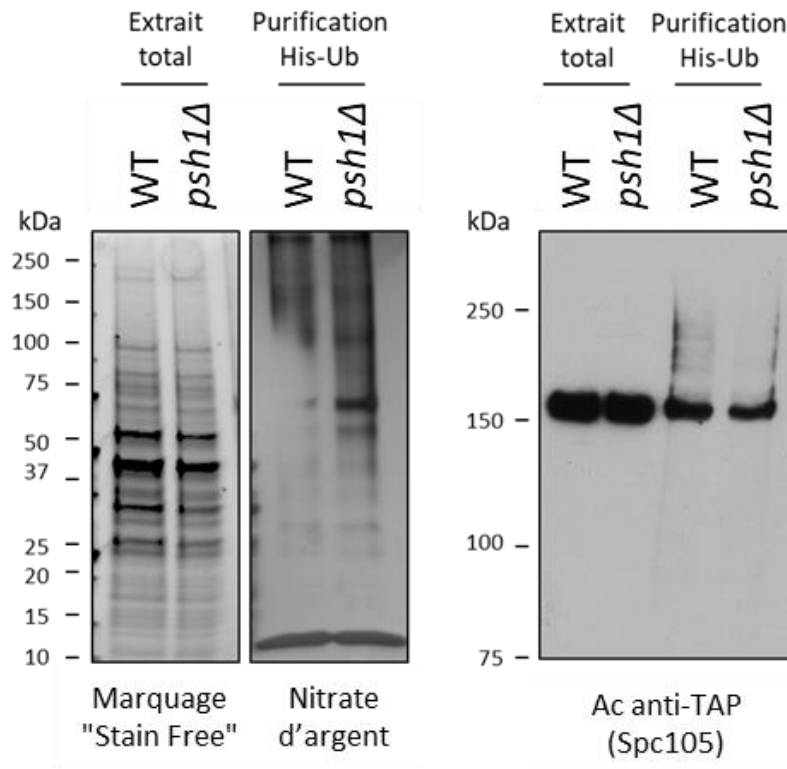


Figure 17 : Ubiquitylation de Spc105 exprimée à un niveau endogène.

Visualisation des protéines présentes dans l'extrait total et dans la purification His-Ubiquitine à partir de cellules exprimant Spc105-TAP endogène et le plasmide His-Ubiquitine. Les cellules ont subi un traitement de 5 heures à la rapamycine avant extraction des protéines afin d'extraire le protéasome du noyau. Le panel de gauche montre l'ensemble des protéines par marquage fluorescent "Stain Free" ou par coloration au nitrate d'argent et le panel de droite l'incubation avec un anticorps anti-TAP pour révéler Spc105-TAP.

Résultats

Le résultat de l'analyse de l'ubiquitylation de Spc105-TAP est présenté Figure 17. Les résultats de ce type d'expérience seront toujours présentés de la même manière. Les premiers puits de chaque panel représentent l'extrait protéique total et les derniers la purification His-Ubiquitine. Le panel de gauche montre l'ensemble des protéines par marquage des tryptophanes avec un composé fluorescent (marquage « Stain Free ») ou grâce à une coloration au nitrate d'argent et le panel de droite l'incubation avec un anticorps anti-TAP pour révéler la protéine d'intérêt, ici Spc105-TAP. La révélation des protéines totales montrent une quantité semblable entre les extraits totaux et entre les fractions enrichies en ubiquitine. Après révélation anti-TAP, dans l'extrait total, Spc105 migre en une bande simple, alors que dans la fraction enrichie en ubiquitine, Spc105 est présente en échelle de plus haut poids moléculaire caractéristique des protéines modifiées par l'ubiquitine. Dans le mutant *psh1Δ*, nous ne détectons pas d'augmentation de la quantité totale de Spc105, ni de diminution claire de Spc105 ubiquitylée. De plus, la forme non-ubiquitylée de Spc105 est présente dans la purification His-Ubiquitine ce qui montre que la purification n'est pas complète. Ces résultats et ceux des autres Western-blots réalisés ne permettent pas de mettre en évidence l'ubiquitylation de Spc105 par Psh1. De la même façon, l'ubiquitylation des autres substrats potentiels de Psh1 qui ont été trouvés par spectrométrie de masse n'a pas pu être confirmée.

II. Étude de l'ubiquitylation de Cse4 endogène

1- Détection de l'ubiquitylation de Cse4 endogène et de ses effets

Cse4 est une protéine peu exprimée dans la cellule. Le premier objectif lors de l'étude des mécanismes d'ubiquitylation de Cse4 a été de mettre en place des techniques permettant de visualiser et quantifier l'ubiquitylation de Cse4 exprimée de manière endogène ainsi que ses effets sur la stabilité de Cse4. Trois techniques ont donc été mises en place :

- La purification des protéines ubiquitylées dans des souches « anchor-away »
- La complémentation de luminescence Cse4-LgBiT et SmBiT-Ubiquitine
- L'utilisation d'un chronomètre fluorescent (tFT) permettant de détecter l'effet d'une ubiquitylation protéolytique de Cse4

Dans chacune des trois sous-parties suivantes, je détaillerai donc ces techniques ainsi que des résultats obtenus dans chacun des cas.

a- Purification de Cse4 dans des souches « anchor-away »

La première technique utilisée consiste à détecter Cse4 par Western-blot après purification des protéines ubiquitylées. Pour cela, des souches de levure « anchor-away » permettant l'exportation des protéasomes nucléaires ont été construites. Dans ces souches, Cse4 est fusionnée de manière endogène avec l'étiquette TAP et l'ubiquitine est fusionnée à une étiquette His (Figure 14 et 18.A). Cse4 est étiquetée en position C-terminale dans la plupart des publications étudiant l'ubiquitylation de Cse4 (Cheng et al., 2016, 2017; Collins et al., 2004; Hewawasam et al., 2010; Ohkuni et al., 2016; Ranjitkar et al., 2010). Nous avons donc choisi de fusionner Cse4 en position C-terminale avec l'étiquette TAP. Dans toutes les expériences de Western-blot présentées ci-dessous des souches de type « anchor-away » sont utilisées avec un traitement à la rapamycine pour exclure une sous-unité du protéasome du noyau. Comme expliqué précédemment, le panel de gauche montre l'ensemble des protéines par marquage fluorescent des tryptophanes ou grâce à une coloration au nitrate d'argent et le panel de droite l'incubation avec un anticorps anti-TAP pour révéler la protéine d'intérêt, ici Cse4-TAP (Figure 18.B).

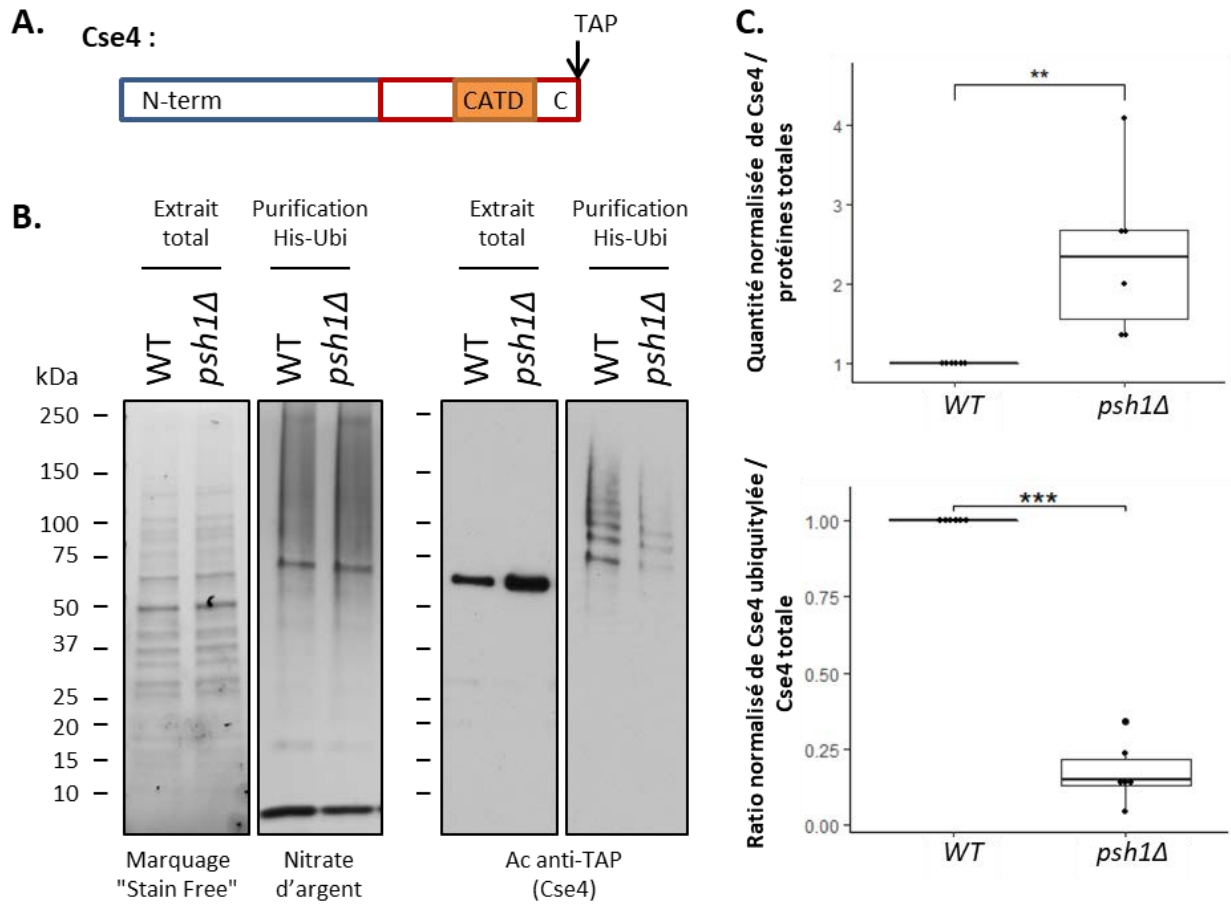


Figure 18 : Ubiquitylation de Cse4 exprimée à un niveau endogène.

(A) Localisation de l'étiquette TAP au C-terminus de Cse4. La position est indiquée par une flèche.

(B) Détection des protéines présentes dans l'extrait total et après purification His-Ubiquitine à partir de cellules exprimant Cse4-TAP endogène et le plasmide His-Ubiquitine. Les cellules ont subi un traitement de 5 heures à la rapamycine avant extraction des protéines afin d'extraire le protéasome du noyau. Le panel de gauche montre toutes les protéines par marquage fluorescent "Stain Free" ou par coloration au nitrate d'argent et le panel de droite l'incubation avec un anticorps anti-TAP pour révéler Cse4.

(C) La quantification des deux panels est montrée sous forme de graphique à droite. Les ratios ont été normalisés à 1 pour la souche WT. L'écart type et les P-values définies grâce à un test T de Student sont indiqués, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Résultats

Dans l'extrait total, Cse4 migre en une bande simple, alors que dans la fraction enrichie en ubiquitine, Cse4 est présente en échelle de plus haut poids moléculaire caractéristique des protéines modifiées par l'ubiquitine. Le panel de gauche montre que les quantités de protéines totales présentes dans les extraits et les échantillons purifiés sont identiques. La quantification des Western-blot est présentée Figure 18.C. Dans le mutant *psh1Δ*, une augmentation significative de la quantité totale de Cse4 et une diminution de Cse4 ubiquitylée est observée par rapport à la souche sauvage. Ces résultats démontrent que Psh1 contrôle le niveau d'expression et l'ubiquitylation de Cse4-TAP exprimée à partir de son locus endogène. Ils montrent également que Cse4 est ubiquitylée en l'absence de Psh1, ce qui indique que d'autres ubiquitine ligases sont impliquées dans la régulation de Cse4-TAP.

Malgré ces résultats prometteurs le signal d'ubiquitylation obtenu par cette méthode est assez faible et les expériences se sont avérées difficiles à reproduire. Nous avons donc regardé si l'ubiquitylation variait au cours du cycle cellulaire afin d'identifier des conditions dans lesquelles nous puissions détecter l'ubiquitylation de Cse4 de manière robuste. Dans des conditions de surexpression, une augmentation de la quantité de Cse4 ubiquitylée a été observée en mitose (Mishra et al., 2015). Nous avons donc souhaité étudier l'ubiquitylation de Cse4 en mitose après synchronisation des cellules par traitement au nocodazole. La distribution dans le cycle cellulaire des cellules traitées ou non a été vérifiée par cytométrie en flux grâce à la quantité d'ADN présent dans chaque cellule (Figure 19.A). Sans traitement, les levures sont réparties dans le cycle cellulaire avec une majorité en phase G2/M, presque un quart en phase G1 et le reste en phase S. Le traitement à la rapamycine utilisé pour l'exportation des protéasomes nucléaires n'influe que très peu sur la distribution des cellules dans le cycle. Le traitement au nocodazole couplé à la rapamycine permet de synchroniser les cellules en phase G2/M (85% de cellules). Ce traitement au nocodazole a été utilisé pour étudier l'ubiquitylation de Cse4 endogène en phase G2/M par Western-blot (Figure 19.B). De la même façon que précédemment, dans le mutant *psh1Δ*, la quantité totale de Cse4 augmente alors que Cse4 ubiquitylée diminue par rapport à la souche sauvage. Après traitement au nocodazole de la souche sauvage, la purification révèle davantage de Cse4 ubiquitylée pour une même quantité de Cse4. Ces données sont cohérentes avec la littérature qui a montré une augmentation de l'ubiquitylation de Cse4 surexprimée après purification de l'ubiquitine (Mishra et al., 2015). De plus, la quantité de Cse4 ubiquitylée diminue fortement dans la condition *psh1Δ* + nocodazole. Cependant, ce Western-blot montre une perte d'ubiquitine libre dans la condition *psh1Δ* + nocodazole (Cadre rouge, Figure 19.B). Cette perte

d'ubiquitine libre dans cet échantillon rend difficile l'interprétation de cette expérience. En conclusion, Cse4 est donc ubiquitylée de manière plus importante en phase G2/M mais il n'est pas clair si cette augmentation est liée à l'augmentation de l'activité de Psh1 ou non.

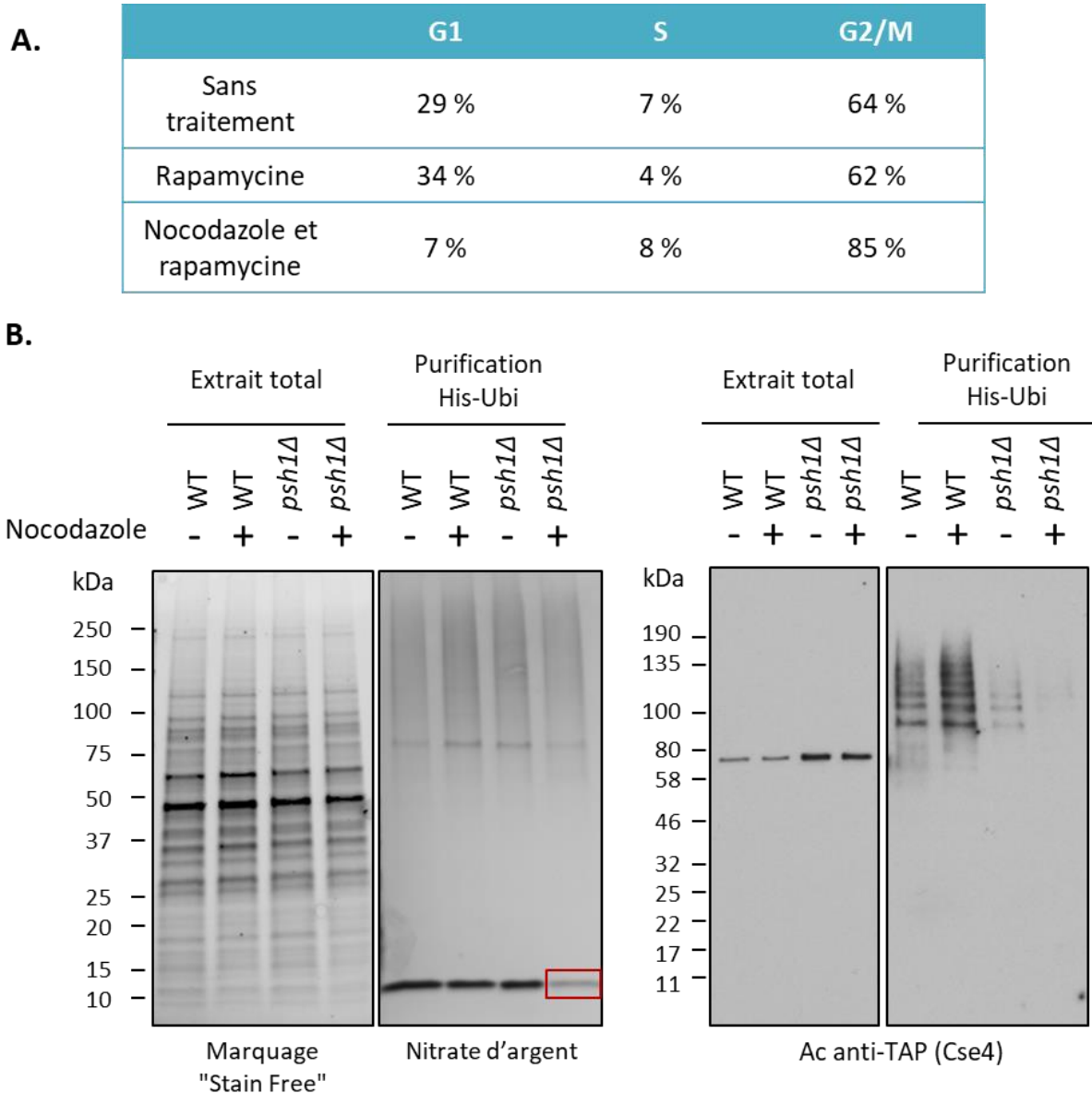


Figure 19 : Ubiquitylation de Cse4 au cours du cycle cellulaire.

(A) Distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire observée par cytométrie en flux. Les cellules sont traitées ou non avec de la rapamycine et du nocodazole pendant 5 heures.

(B) Détection des protéines présentes dans l'extrait total et après purification His-Ubiquitine à partir de cellules exprimant Cse4-TAP endogène et le plasmide His-Ubiquitine. Avant extraction des protéines, les cellules ont subi un traitement de 5 heures à la rapamycine et au nocodazole si indiqué. Le panel de gauche montre toutes les protéines par marquage fluorescent "Stain Free" ou par coloration au nitrate d'argent et le panel de droite l'incubation avec un anticorps anti-TAP pour révéler Cse4. Une perte d'ubiquitine libre dans la condition *psh1Δ* + nocodazole est mise en évidence par un cadre rouge.

Résultats

Le traitement au nocodazole nous offre un signal plus intense pour étudier l'ubiquitylation de Cse4. Nous avons décidé de nous placer dans ces conditions pour tester cette méthode et analyser les E2s qui contribuent à l'ubiquitylation de Cse4. Des Western-blots avec des mutants de toutes les E2s ont été réalisés, mais aucune délétion testée ne montre de diminution claire de l'ubiquitylation de Cse4 (Figure 20, données non présentées pour les autres mutants d'E2s). De plus, la purification des chaînes d'ubiquitine ainsi que de l'ubiquitine libre ne se déroule pas correctement dans certains mutants (Cadre rouge Figure 20 pour *ubc13Δ* et données non présentées *p-ubc1*). Nous avons pensé que ce problème pouvait être lié à la délétion totale ou la forte diminution de l'expression de certaines E2. Pour pallier ce problème, nous avons essayé une délétion conditionnelle en étiquetant les E2s avec le domaine FRB et en utilisant le système « anchor-away » mais cela n'a pas résolu le problème de purification (données non présentées). Ces expériences n'ont donc pas permis d'identifier la ou les E2(s) qui contribue(nt) à l'ubiquitylation de Cse4.

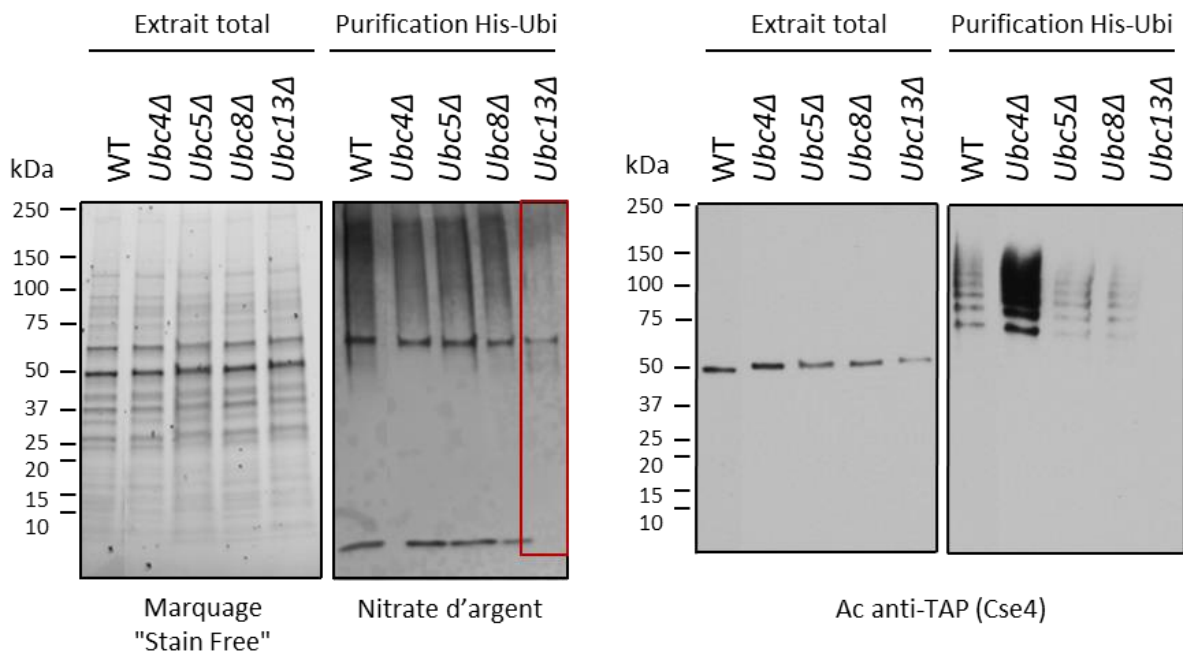


Figure 20 : Ubiquitylation de Cse4 dans les différents mutants d'E2s.

Détection des protéines présentes dans l'extrait total et après purification His-Ubiquitine à partir de souche sauvage ou mutante pour une E2 et exprimant Cse4-TAP endogène et le plasmide His-Ubiquitine. Les cellules ont subi un traitement à la rapamycine et au nocodazole pendant 5 heures avant extraction des protéines afin d'augmenter l'ubiquitylation de Cse4. Le panel de gauche montre toutes les protéines par marquage fluorescent "Stain Free" ou par coloration au nitrate d'argent et le panel de droite l'incubation avec un anticorps anti-TAP pour révéler Cse4. Pour faciliter la lecture, certains puits intermédiaires ne sont pas présentés.

De manière intéressante, une délétion d'*UBC4* entraîne une augmentation de l'ubiquitylation de Cse4 (Figure 20). Nous nous sommes demandé si cette ubiquitylation était dépendante de Psh1. Cette hypothèse a été testée en visualisant l'ubiquitylation de la souche *psh1Δ ubc4Δ* par Western-blot (Figure 21). La quantité de Cse4 est plus importante dans les mutants *psh1Δ* et *ubc4Δ* par rapport à la souche sauvage, mais pas dans le mutant *psh1Δ ubc4Δ*. De plus, l'augmentation de l'ubiquitylation n'est visible que dans le mutant *ubc4Δ* et pas dans le mutant *psh1Δ ubc4Δ*. L'augmentation de l'ubiquitylation de Cse4 est donc dépendante de Psh1. Nous n'avons pas exploré le mécanisme qui conduit à cette augmentation par la suite.

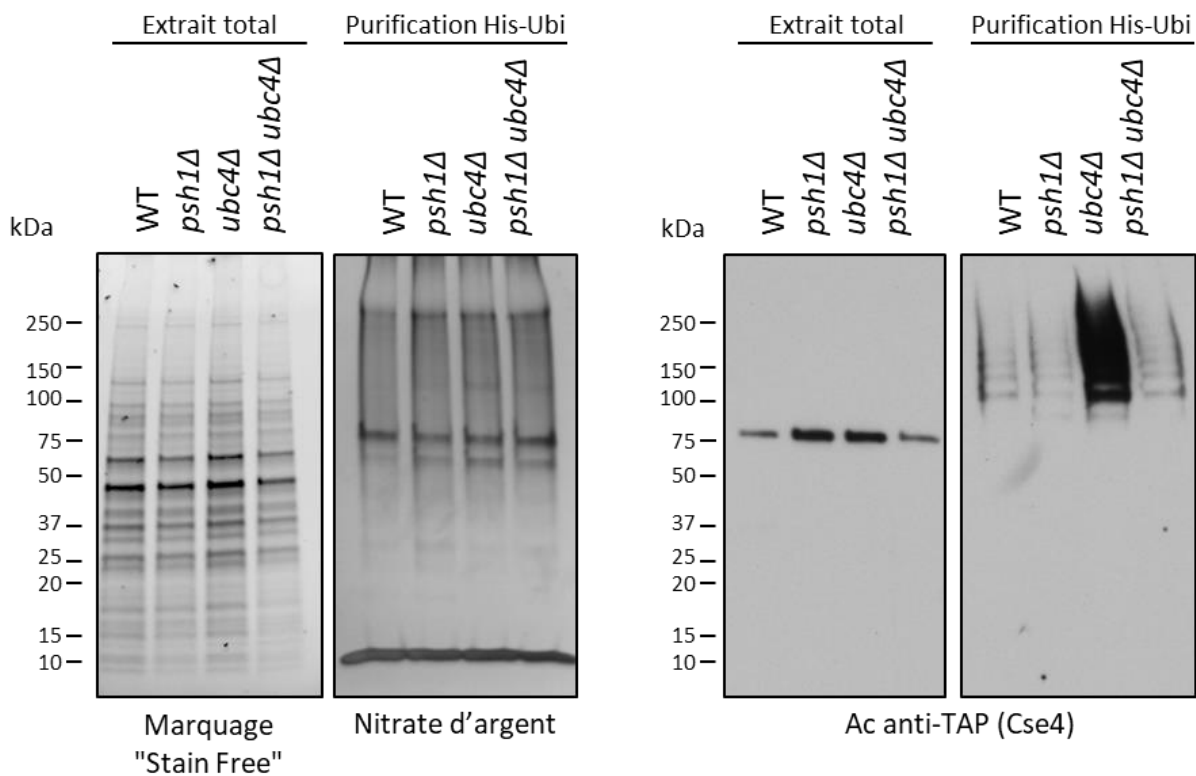


Figure 21 : Ubiquitylation de Cse4 dans les différents mutants *ubc4Δ* et *psh1Δ*.

Détection des protéines présentes dans l'extrait total et après purification His-Ubiquitine à partir de souches sauvage ou mutantes pour Ubc4 et Psh1 exprimant Cse4-TAP endogène et le plasmide His-Ubiquitine. Les cellules ont subi un traitement à la rapamycine et au nocodazole pendant 5 heures avant extraction des protéines afin d'augmenter l'ubiquitylation de Cse4. Le panel de gauche montre toutes les protéines par marquage fluorescent "Stain Free" ou par coloration au nitrate d'argent et le panel de droite l'incubation avec un anticorps anti-TAP pour révéler Cse4.

***b- Complémentation de luminescence entre Cse4-LgBiT
et SmBiT-Ubiquitine***

Même si les résultats obtenus par Western-blot permettent de visualiser l'ubiquitylation de Cse4-TAP exprimée à partir de son locus endogène, ils sont relativement difficiles à (re)produire et nécessitent l'utilisation d'une grande quantité de cellules, car Cse4 est faiblement exprimée (une centaine de copies par cellule (Kulak et al., 2014)). De plus, les défauts de purification de His-Ubiquitine dans certaines souches empêchent l'interprétation de certaines expériences. Nous avons donc cherché à utiliser une approche alternative permettant d'obtenir des résultats sensibles et robustes.

Pour cela, nous avons mis au point un test de complémentation de luminescence qui repose sur la fusion de Cse4 et l'ubiquitine avec deux fragments complémentaires de la luciférase NanoLuc appelés LgBiT et SmBiT (Figure 22.A). Les deux fragments séparés sont inactifs, mais lorsqu'ils sont à proximité, la luciférase se replie dans sa structure native et son activité enzymatique est reconstituée (Figure 22.B). Cette méthode a été testée et validée dans notre équipe avec d'autres substrats comme Stp2 et H2B (données non présentées). Dans les souches utilisées, Cse4-LgBiT fusionnée en position C-terminale est exprimée à partir de son promoteur endogène et la SmBiT-Ubiquitine à partir d'un plasmide avec une origine de répllication 2 μ . Dans le cas où Cse4 est ubiquitylée, nous nous attendons donc à détecter un signal de luminescence. D'autre part, il est également possible de mesurer les quantités de Cse4-LgBiT en rajoutant aux extraits un peptide appelé HiBiT ayant une forte affinité pour la partie LgBiT (Figure 22.C). Cette mesure permet d'homogénéiser les résultats obtenus en calculant le ratio de luminescence reconstituée / quantité totale de Cse4-LgBiT.

Les premières mesures de luminescence obtenues montrent une augmentation de la quantité de Cse4-LgBiT dans la souche *psh1* Δ (Figure 22.D). Ces résultats sont corrélés à une diminution du ratio de complémentation de luminescence rapportée à la quantité de Cse4-LgBiT. Cette technique peut donc être utilisée pour quantifier l'ubiquitylation de Cse4 et confirmer que Psh1 régule la quantité et l'ubiquitylation de Cse4 exprimée à partir de son promoteur endogène.

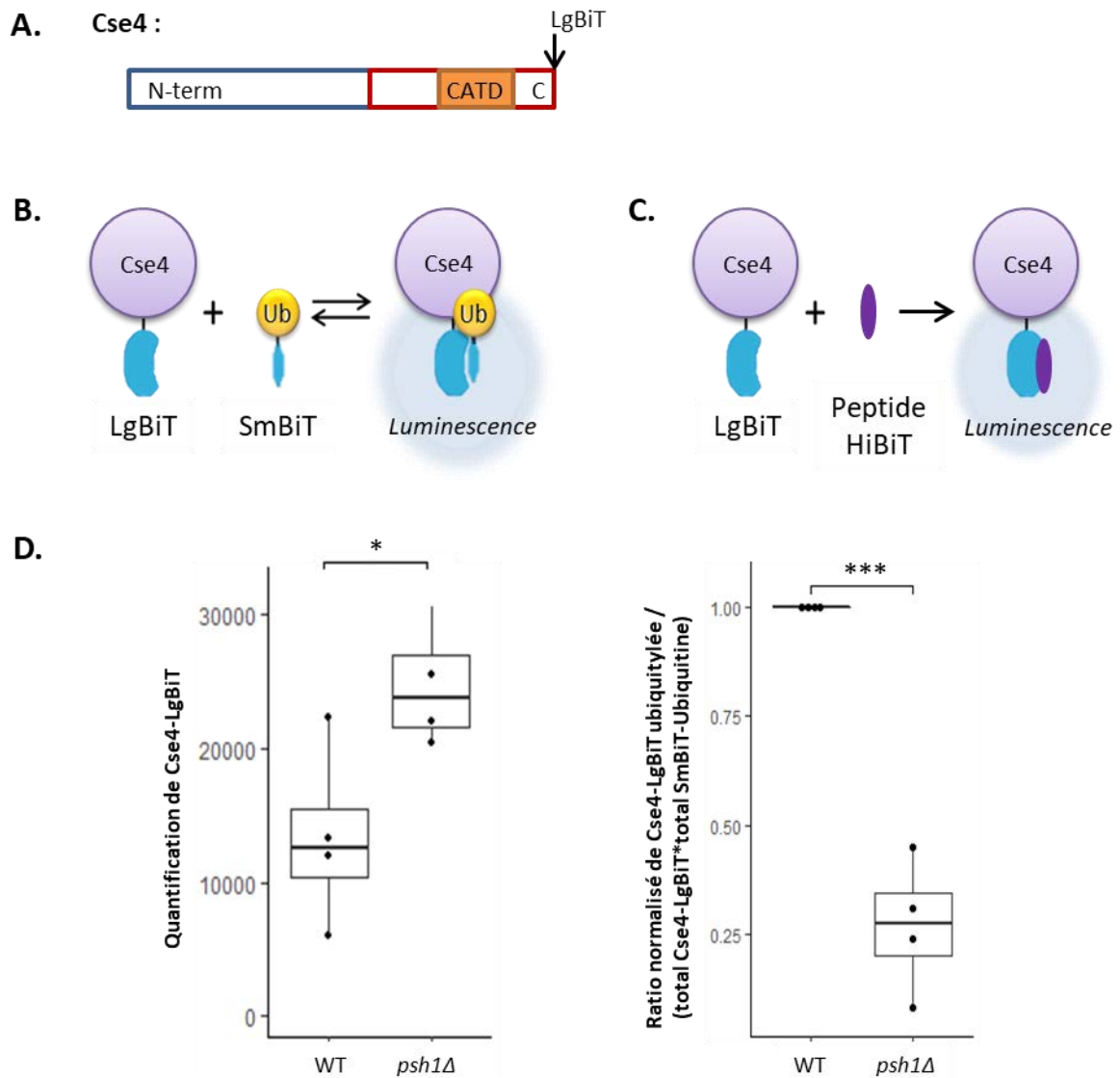


Figure 22 : Détection de l'ubiquitylation endogène de Cse4 par la méthode de reconstitution de luminescence SmBiT-LgBiT.

(A) Localisation de l'étiquette LgBiT au C-terminus de Cse4. La position est indiquée par une flèche.

(B) Cse4 et l'ubiquitine sont fusionnées avec SmBiT et LgBiT des fragments complémentaires de la luciférase NanoLuc. L'ubiquitylation de Cse4 permet de reconstituer la NanoLuc et est détectée par lecture de la luminescence.

(C) Le peptide HiBiT possède une très grande affinité pour le LgBiT. Ajouté dans l'extrait protéique, l'ajout de peptide HiBiT permettra de reconstituer une luminescence proportionnelle à la quantité de Cse4-LgBiT

(D) Quantification de la luminescence dans les souches Cse4-LgBiT transformées avec le plasmide SmBiT-Ubiquitine. L'histogramme de gauche montre la quantification de Cse4 grâce au peptide HiBiT. L'histogramme de droite montre le niveau de luminescence reconstitué par Cse4-LgBiT-SmBiT-Ubiquitine par rapport à la quantité de Cse4-LgBiT et SmBiT-Ubiquitine. Ce ratio a été normalisé à 1 pour la souche WT. L'écart type et les P-values définies grâce à un test T de Student sont indiqués, * p < 0,05 et *** p < 0,001.

c- Utilisation d'un chronomètre fluorescent

En plus de la complémentation de luminescence, nous avons utilisé une autre technique pour étudier la dégradation de Cse4, le chronomètre fluorescent tFT (tandem Fluorescent Timer). Grâce à cette technique nous ne visualisons pas directement l'ubiquitylation, mais cela nous renseigne sur la quantité et le temps de demi-vie de Cse4 endogène. Le tFT a été développé dans l'équipe de Michael Knop (Heidelberg, Allemagne) et est composé des protéines fluorescentes mCherry et sfGFP organisées en tandem (Figure 23.A). Les deux fluorophores ne possèdent pas le même temps de maturation, la mCherry devient fluorescente plus lentement que la sfGFP (environ 30 et 5 minutes respectivement) (Khmelinskii et al., 2012). Ce tandem de fluorophores a l'avantage de permettre de mesurer non seulement la quantité de la protéine à laquelle il est fusionné grâce à sfGFP, mais également son âge en utilisant le ratio mCherry/sfGFP. La lecture de la fluorescence peut être mesurée par microscopie ou directement sur les colonies de levures cultivées sur gélose, ce qui permet de réaliser des mesures rapidement dans un grand nombre de mutants.

Pour tester cette méthode, Cse4 a été fusionnée en C-terminal avec l'étiquette tFT dans différents mutants d'E2s et les quantités de fluorescence de sfGFP et mCherry ont été mesurées directement sur colonies (Figure 23.B). Il n'y a pas d'augmentation significative de la quantité de sfGFP dans les mutants. Par contre le ratio mCherry/sfGFP est plus élevé dans les souches dans lesquelles *UBC13* a été délété (*ubc13Δ*) ou dans lesquelles le promoteur d'Ubc1 a été muté (*p-ubc1*), ce qui traduit une augmentation de la stabilité de Cse4. La quantité de Cse4-tFT^{C-term} ne semble donc pas modifiée dans les différents mutants d'E2, mais Cse4-tFT^{C-term} apparaît plus stable dans les mutants d'Ubc1 et Ubc13 (Figure 23.B). Cette technique permet donc de mesurer la quantité de Cse4 mais aussi de quantifier sa durée de vie ce qui est un moyen complémentaire pour analyser les conséquences de l'ubiquitylation de Cse4.

A. Cse4-tFT^{C-term} :



m-cherry : protéine fluorescente rouge à maturation lente
 sfGFP ou NG : protéine fluorescente verte à maturation rapide

B.

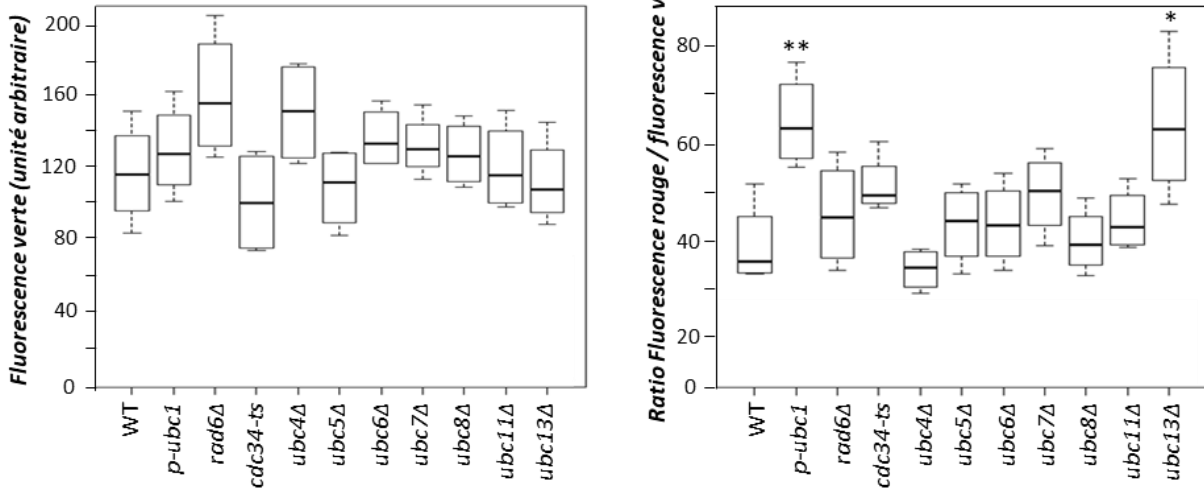


Figure 23 : Détection de la quantité et du temps de demi-vie de Cse4 endogène par la méthode du "tandem fluorescent timer " (tFT).

(A) Cse4 est fusionnée avec le tFT composé d'un fluorophore vert (sfGFP ou NeonGreen) et rouge (mCherry) en tandem. Le fluorophore vert a un temps de maturation court alors que le fluorophore rouge a une maturation plus longue. La quantité de fluorescence^{Verte} dépend de la quantité de Cse4 et le ratio fluorescence^{Rouge} / fluorescence^{Verte} dépend du temps de demi-vie de Cse4.

(B) Comparaison de la quantité de fluorescence sfGFP (panel de gauche) et du ratio fluorescence^{Rouge} / fluorescence^{Verte} (panel de droite) dans des souches Cse4-tFT^{C-term} mutantes ou non pour une E2. La fluorescence est lue directement sur les colonies cultivées sur gélose. L'écart type et les P-values définies grâce à un test T de Student sont indiqués, * p < 0.05, ** p < 0,01.

2- Effet de la position de l'étiquette sur la croissance et la localisation de Cse4

Après avoir mis au point les techniques pour détecter l'ubiquitylation de Cse4 endogène et de ses effets, notre objectif était d'utiliser ces techniques pour étudier les E2s et E3s participant à l'ubiquitylation de Cse4. Cependant, nous avons observé que les souches dans lesquelles Cse4 est étiquetée en C-terminal ont un défaut de croissance (Figure 24.B). Par exemple, la souche Cse4-LgBiT^{C-term} ne montre aucun phénotype à 30°C, mais sa croissance est ralentie à 37°C par rapport à la souche sauvage (BY4741). Une délétion de *PSH1* dans une souche dans laquelle Cse4 est fusionnée à une étiquette C-terminale entraîne des défauts de croissance à 30 et 37°C. Les souches présentant d'autres étiquettes en position C-terminale montrent des profils de croissance similaires et la souche Cse4-tFT^{C-term} *psh1Δ* n'est pas viable (données non présentées).

Nous avons également observé la localisation de Cse4 fusionnée à une étiquette C-terminale. Dans les souches exprimant Cse4-tFT^{C-term}, Cse4 est localisée dans tout le noyau et pas seulement au niveau du centromère (Figure 24.C). De plus, le marquage mCherry est difficilement détectable alors que Cse4 est décrite pour être stable au niveau du centromère.

Au vu de ces données de croissance et de localisation, il nous a semblé essentiel de modifier la façon d'étiqueter Cse4 de sorte que la croissance ne soit pas affectée et que la localisation soit uniquement centromérique. D'après un article préalablement publié, toutes les souches ont été étiquetées de manière interne, au niveau de la leucine 81 du domaine N-terminal (Figure 24.A) (Wisniewski et al., 2014). Après insertion des différentes étiquettes utilisées pour chaque expérience, les souches ne montrent plus de différences de croissance comparée à la souche sauvage mises à part la souche Cse4-tFT^{inteme} *psh1Δ* (Figure 24.B). De plus, la localisation de Cse4-tFT^{inteme} se restreint au centromère et la fluorescence mCherry montre que cette forme de Cse4 est plus stable au niveau des centromères (Figure 24.C).

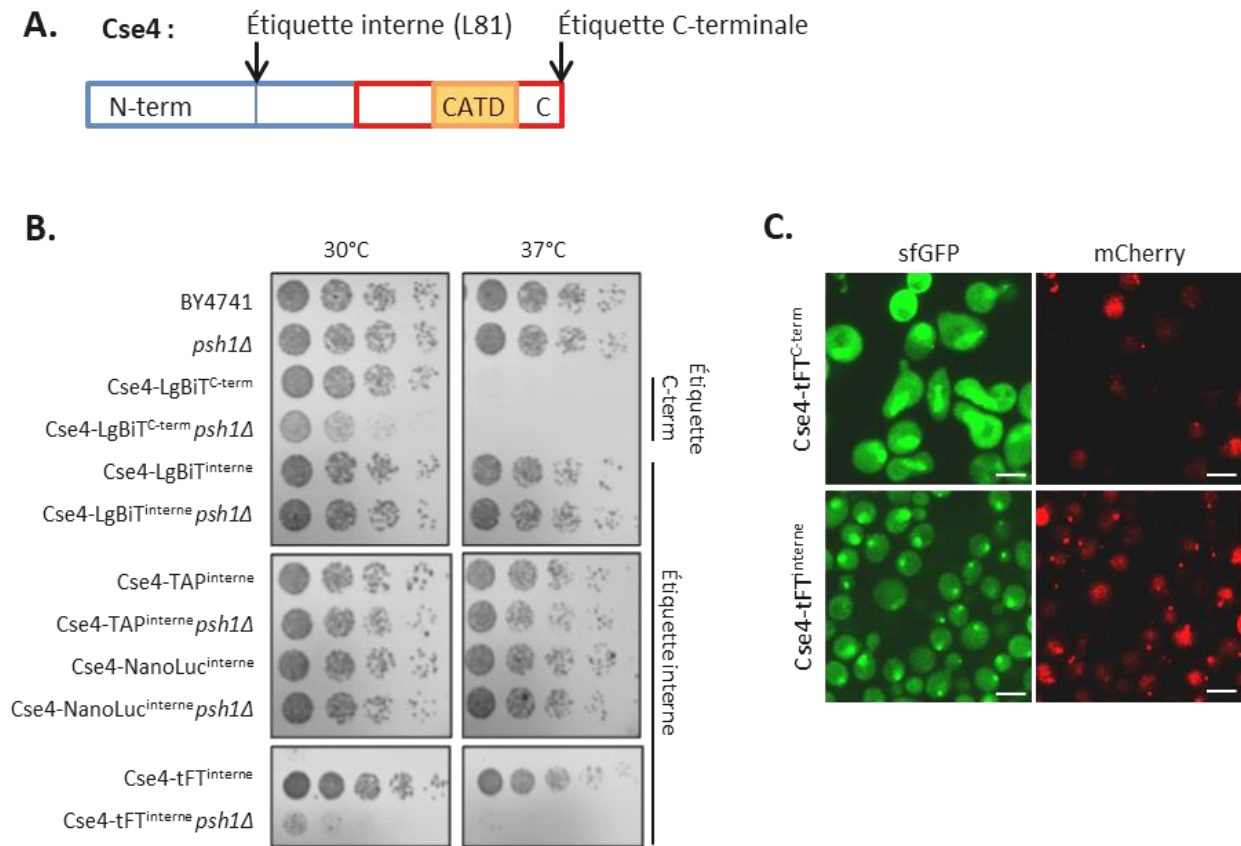


Figure 24 : Effet de la position de l'étiquette sur la croissance des levures et sur la localisation de Cse4.

(A) La localisation de l'étiquette interne au niveau de la leucine 81 ou au C-terminus de Cse4 est indiquée par des flèches.

(B) Test de croissance des souches de levures indiquées exprimant Cse4 avec une étiquette interne ou C-terminale. Les levures ont été cultivées à 30°C ou 37°C tel qu'indiqué.

(C) Localisation de Cse4 fusionnée avec mCherry et sfGFP en tandem (tFT) en position interne ou C-term. La barre d'échelle représente 5 µM.

Résultats

Seule la souche Cse4-tFT^{interne} *psh1Δ* présente encore un défaut de croissance malgré l'absence de modification C-terminale (Figure 24.B). Nous avons pensé à un problème de taille de l'étiquette insérée, mais l'insertion d'une étiquette de taille similaire au tFT (tdEos) en interne n'entraîne pas de défaut de croissance (Wisniewski et al., 2014, données non présentées). Il a été montré que dans le cas d'un tandem de fluorophore, la sfGFP pouvait perturber la dégradation des protéines auxquelles elle est fusionnée (Khmelninskii et al., 2016). La présence de Cse4 résiduelle non ou partiellement dégradée pourrait entraîner le défaut de croissance observé dans les souches *psh1Δ*. La sfGFP a donc été remplacée par NeonGreen dans le tandem de fluorophore de ces souches. Après changement, la souche Cse4-tFT(NG)^{interne} ne présente plus de défaut de croissance à 30°C (Figure 25.A). De plus, alors que Cse4-tFT^{interne} est présent au centromère, mais aussi dans le noyau de manière diffuse, la localisation de Cse4-tFT(NG)^{interne} est présente uniquement au niveau du centromère (Figure 25.B).

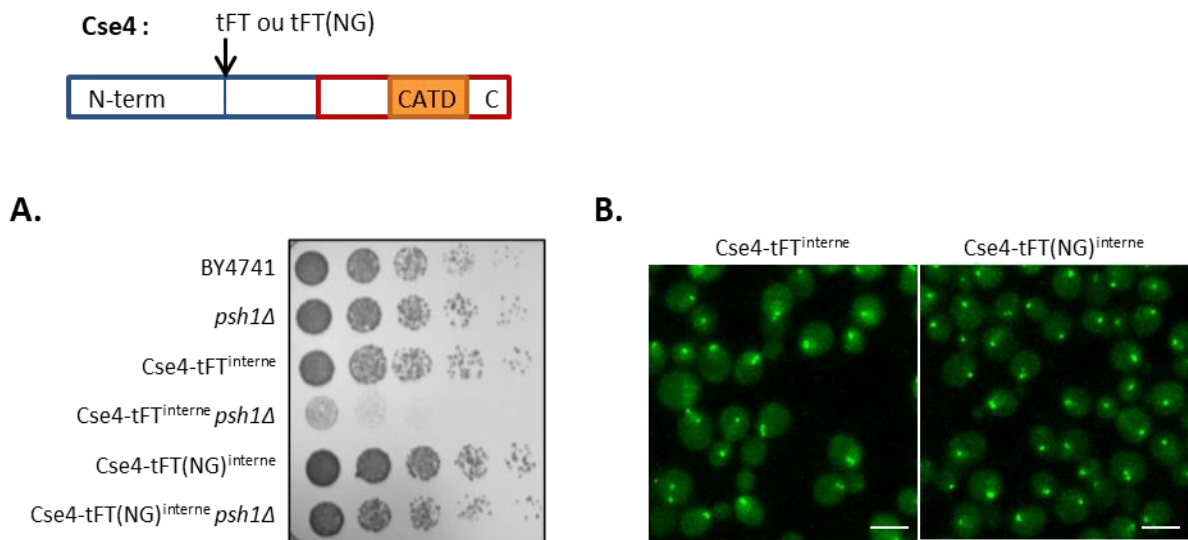


Figure 25 : Effet de la composition du tFT sur la croissance des levures et sur la localisation de Cse4.

(A) Test de croissance des souches de levures indiquées exprimant Cse4 fusionnée en interne avec mCherry et sfGFP (tFT) ou NeonGreen (tFT(NG)). Les levures ont été cultivées à 30°C.

(B) Localisation de Cse4 fusionnée en interne avec mCherry et sfGFP (tFT) ou NeonGreen (tFT(NG)). La barre d'échelle représente 5 μ M.

Les souches avec Cse4 étiquetée en interne ne présentent pas de défaut de croissance apparent et peuvent être utilisées pour élucider les mécanismes d'ubiquitylation qui régulent Cse4. Nous avons donc utilisé des souches avec Cse4 exprimée à partir de son locus endogène et étiquetée en interne pour la suite de l'étude.

3- Étude de l'ubiquitylation de Cse4 endogène étiquetée en interne

a- Localisation et stabilité de Cse4 au cours du cycle cellulaire

Grâce à ces nouveaux outils et ces nouvelles souches, nous avons pu commencer à étudier le réseau d'enzymes impliquées dans l'ubiquitylation de Cse4. Nous avons tout d'abord regardé la localisation et la stabilité de Cse4-tFT(NG)^{interne} au centromère. Dans la souche sauvage, Cse4 a une localisation restreinte au centromère tandis que la localisation est plus étendue dans le noyau dans une souche *psh1Δ* (Figure 26.A). Après mesure des intensités de fluorescence, la quantité de Cse4 est plus importante au centromère dans la souche *psh1Δ*. Nous détectons également une légère augmentation du ratio mCherry/NG dans la souche *psh1Δ* mais la différence avec la souche sauvage n'est pas significative (Figure 26.B). Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus précédemment avec les étiquettes C-terminales, à savoir que Psh1 contrôle la quantité et la stabilité de Cse4 endogène.

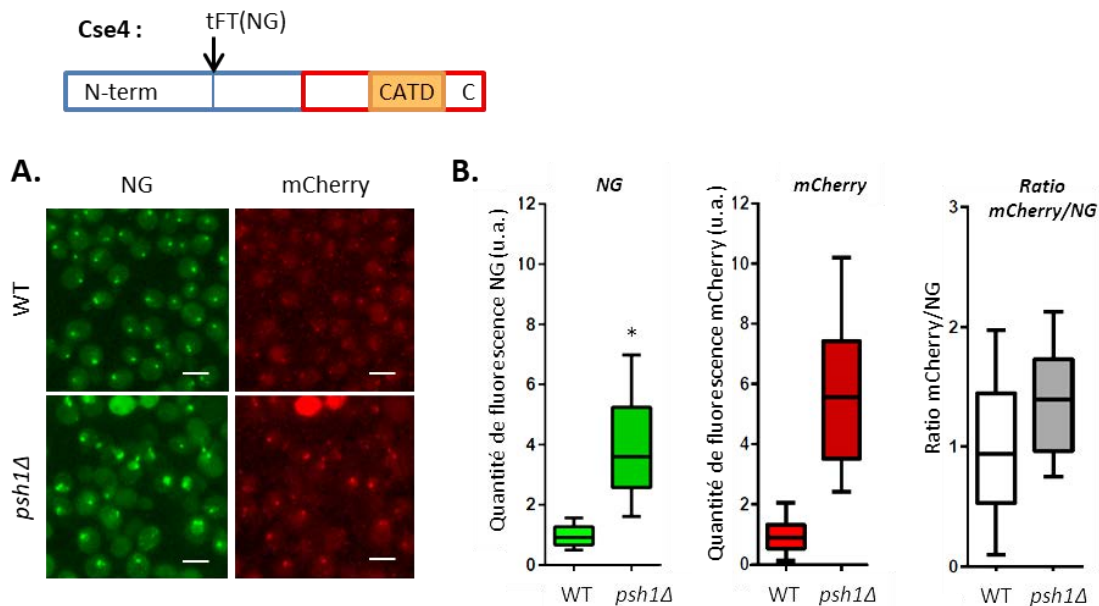


Figure 26 : Localisation et stabilité de Cse4 dans une souche *psh1Δ*.

(A) Localisation de Cse4 fusionnée en interne avec mCherry-NeonGreen en tandem (tFT(NG)^{interne}). La barre d'échelle représente 5 μM.

(B) Quantification des données de microscopie présentées en (A). La quantité de fluorescence en mCherry, en NeonGreen ainsi que le ratio mCherry/NG est représentée. L'écart type et les P-values définies grâce à un test T de Student sont indiqués, * p < 0.05.

Résultats

Pendant la durée de ma thèse, je n'ai pas eu le temps d'utiliser la souche exprimant Cse4-tFT(NG)^{interne} pour analyser la régulation de Cse4 au cours du cycle cellulaire. Cependant, j'ai obtenu les résultats avec la souche exprimant Cse4-tFT^{interne}. Ces résultats sont présentés Figure 27. Pour synchroniser les cellules dans différentes phases du cycle, des traitements à l' α -factor (synchronisation à la transition G1-S), à l'hydroxyurée (synchronisation en phase S) et au nocodazole (synchronisation en phase M) sont utilisés. Les cellules sont observées en microscopie et la fluorescence au centromère est quantifiée à partir des images obtenues (Figure 27.A et 27.B). Après traitement au nocodazole ou à l' α -factor, la quantité de Cse4-tFT^{interne} est comparable à celle mesurée dans une population asynchrone. Par contre, le traitement à l'hydroxyurée entraîne une diminution statistiquement significative de 20 % de la quantité de Cse4. Ces résultats sont cohérents avec le modèle actuel qui propose que chez la levure Cse4 est dégradée et remplacée en phase S (Wisniewski et al., 2014). Pour déterminer si Psh1 était impliquée dans cette régulation de Cse4 au cours du cycle cellulaire, nous avons analysé l'effet d'une délétion de *PSH1* sur la quantité et la localisation de Cse4. Une augmentation importante de la quantité de Cse4-tFT^{interne} est observée dans des cellules *psh1 Δ* . Cette augmentation est retrouvée dans toutes les phases du cycle cellulaire et est couplée à un défaut de localisation de Cse4 au centromère (Figure 27.A et 27.B). Ces résultats indiquent que les effets d'une délétion de Psh1 sont détectables tout au long du cycle cellulaire et montrent qu'il est possible d'observer par microscopie les conséquences de défauts d'ubiquitylation de Cse4 sur son abondance et sa localisation subcellulaire. Néanmoins, ces résultats ont été obtenus en utilisant la souche Cse4-tFT^{interne} et mériteraient d'être confirmés dans la souche Cse4-tFT(NG)^{interne}.

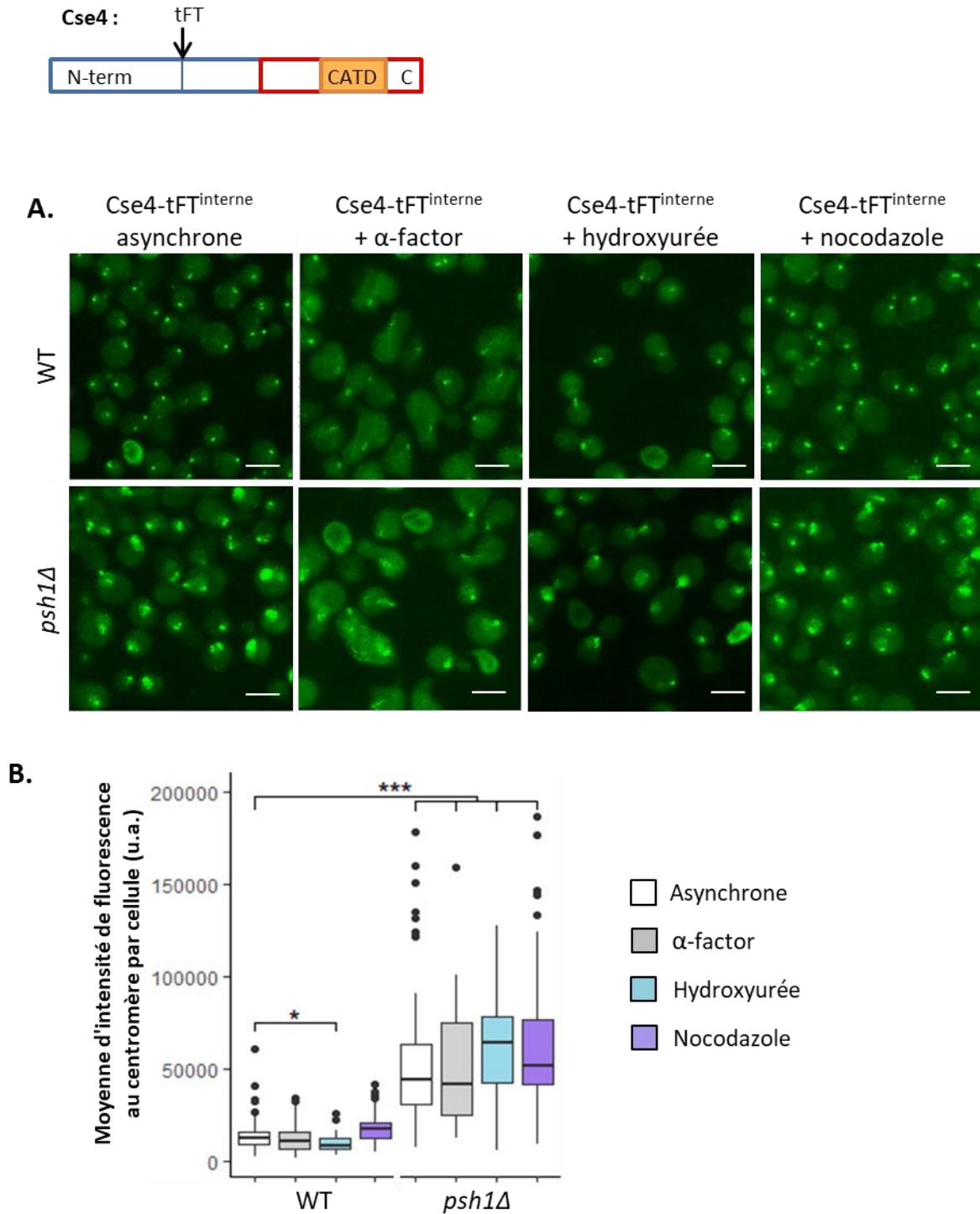


Figure 27 : Localisation et stabilité de Cse4-tFT^{interne} au cours du cycle cellulaire.

(A) Localisation de Cse4 fusionnée en position C-terminale avec le tFT dans la souche WT et *psh1Δ*. Les cellules sont non traitées, traitées pendant 3 heures avec de l' α -factor ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), de l'hydroxyurée (15mg.mL^{-1}), ou du nocodazole ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$). La barre d'échelle représente $5 \mu\text{M}$.

(B) Quantification de la moyenne d'intensité de fluorescence au centromère des données présentes en (A) reportée sous forme de graphique. L'écart type et les P-values définies grâce à un test T de Student sont indiqués, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

b- Localisation de Cse4 dans des mutants d'E2s et d'E3s

L'utilisation de Cse4-tFT(NG)^{interne} nous permet de mesurer les quantités de Cse4 au niveau du centromère. Nous nous attendons à ce que l'inactivation d'une enzyme (E2 ou E3) impliquée dans l'ubiquitylation protéolytique de Cse4 entraîne une augmentation de la quantité de Cse4-tFT(NG)^{interne} au niveau du centromère. Nous avons utilisé Cse4-tFT(NG)^{interne} dans différents mutants d'E2 et d'E3 afin d'identifier les enzymes entraînant son accumulation au centromère et donc potentiellement impliquées dans l'ubiquitylation de Cse4.

La souche Cse4-tFT(NG)^{interne} a été croisée avec la collection de mutants du système ubiquitine-protéasome provenant du laboratoire de Michael Knop. Ce croisement a permis d'obtenir 12 mutants d'E2 et 37 mutants d'E3 qui ont été comparés à deux souches sauvages (WT1 et WT2). Nous avons observé par microscopie la fluorescence au centromère dans chaque souche puis quantifié les images obtenues. La fluorescence de la plupart des mutants a été mesurée lors de cinq expériences indépendantes (représentée par un point sur les Figures 28 et 29). Pour chacune de ces expériences, plus d'une cinquantaine de cellules ont été quantifiées. Des images représentatives de certaines souches sont présentées Figure 30.

Dans la plupart des mutants d'E2, aucun changement significatif n'est observé (Figure 28). Le mutant *ubc9-ts* n'a été réalisé qu'une seule fois à température restrictive, mais la fluorescence a été mesurée dans une cinquantaine de cellules. La quantité de Cse4 au centromère augmente de manière significative dans le mutant *ubc1(DAmP)* par rapport à la souche sauvage (Figures 28 et 30). Dans l'autre mutant d'*UBC1*, *p-ubc1*, l'augmentation est moins importante ce qui peut s'expliquer par la différence de ces deux souches. En effet, *UBC1* est essentiel dans le fond génétique utilisé, nous n'utilisons donc pas une délétion mais une diminution de l'expression du gène. Dans le cas de *p-ubc1*, le gène est sous le contrôle d'un promoteur inductible. En l'absence d'induction, la transcription du gène est induite à un niveau minimal. Dans le cas d'*ubc1(DAmP)*, la stratégie DAmP est utilisée (Decreased Abundance by mRNA Perturbation). Cette stratégie repose sur la perturbation de la région 3' UTR avec une cassette de résistance, ce qui déstabilise le transcrit et réduit les niveaux d'ARNm. La différence d'expression d'*Ubc1* n'a pas été comparée dans ces deux souches mais pourrait expliquer la différence observée par microscopie.

Comme pour les E2s, la quantité de Cse4 au centromère est stable dans la plupart des mutants d'E3s étudiés (Figures 29 et 30). La fluorescence augmente de manière significative

Résultats

pour les mutants *slx5Δ* et *tfb3(C16Y)*. Le fait que la quantité de Cse4 soit importante dans les mutants *ubc9-ts* et *slx5Δ* est cohérent avec une ubiquitylation protéolytique SUMO-dépendante de Cse4, comme décrit précédemment avec Cse4 surexprimée (Ohkuni et al., 2016). Le mutant *psh1Δ* entraîne une légère augmentation de la quantité de Cse4, mais celle-ci n'est pas significative. De plus, aucun changement n'est visible dans la souche *ubr1Δ*. En conclusion, nous observons donc une augmentation significative de la quantité de Cse4 dans les mutants *ubc1(DAmP)*, *slx5Δ* et *tfb3(C16Y)*. Les données pour *ubc9-ts* sont prometteuses mais auraient besoin d'être répétées.

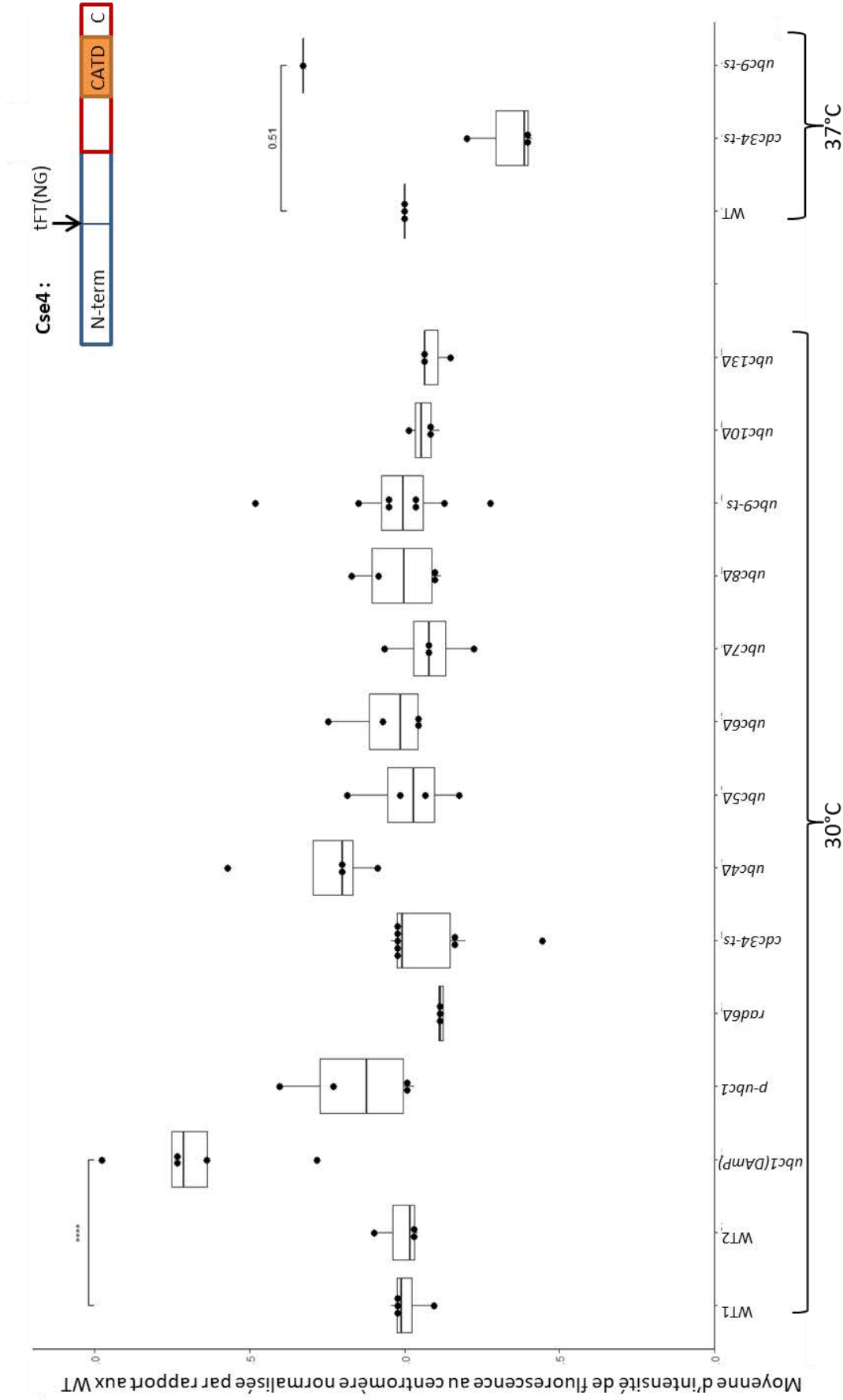


Figure 28 : Abondance de Cse4-tFT(NG)^{interne} au niveau du centromère dans des mutants d'E2.

Quantification de la moyenne d'intensité de fluorescence au centromère reportée sous forme de graphique. L'écart type et les P-values définies grâce à un test ANOVA sont indiqués, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

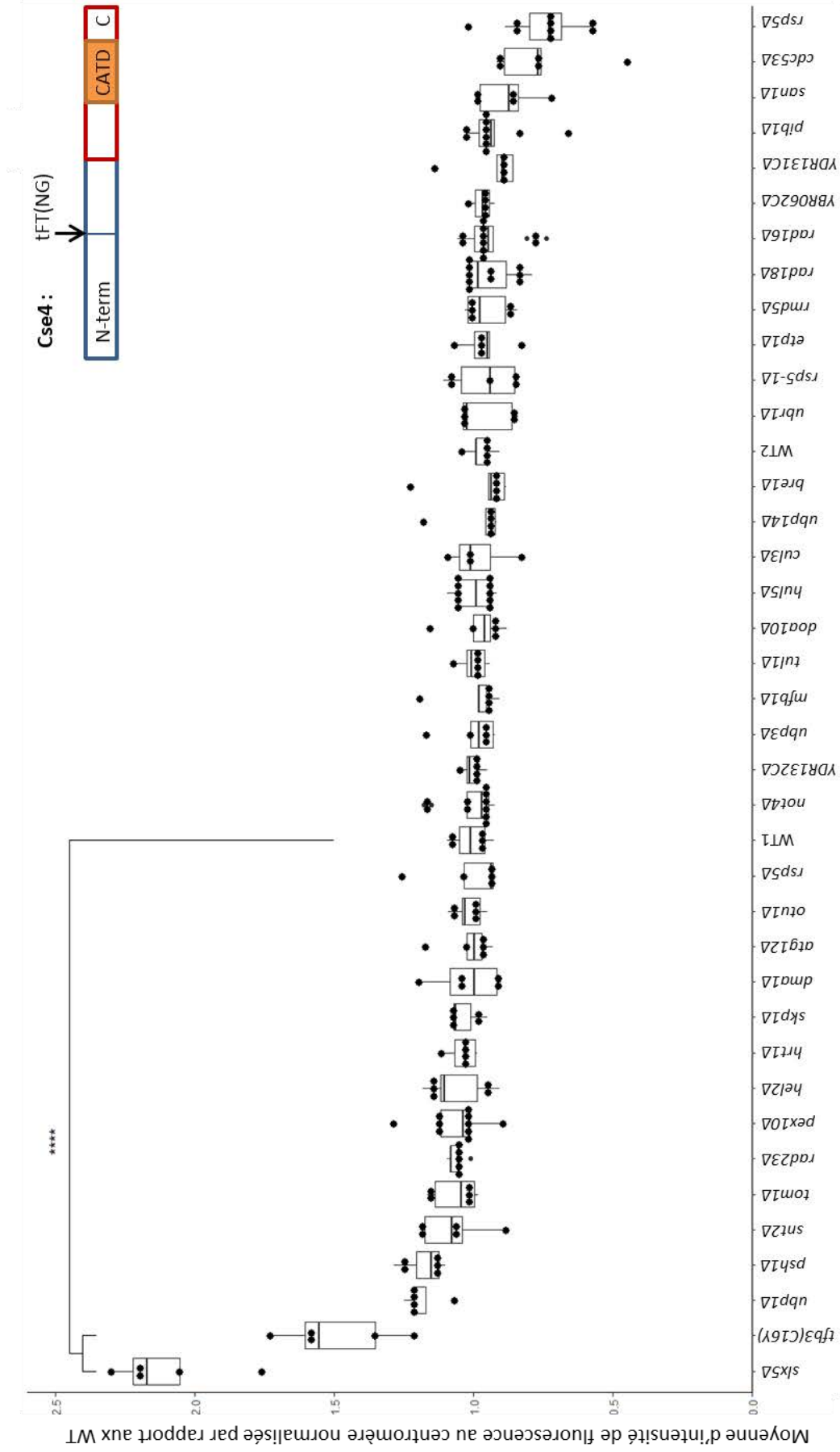


Figure 29 : Abondance de Cse4-tFT(NG)^{interne} au niveau du centromère dans des mutants d'E3.

Quantification de la moyenne d'intensité de fluorescence au centromère reportée sous forme de graphique. L'écart type et les P-values définies grâce à un test ANOVA sont indiqués, **** $p < 0,0001$.

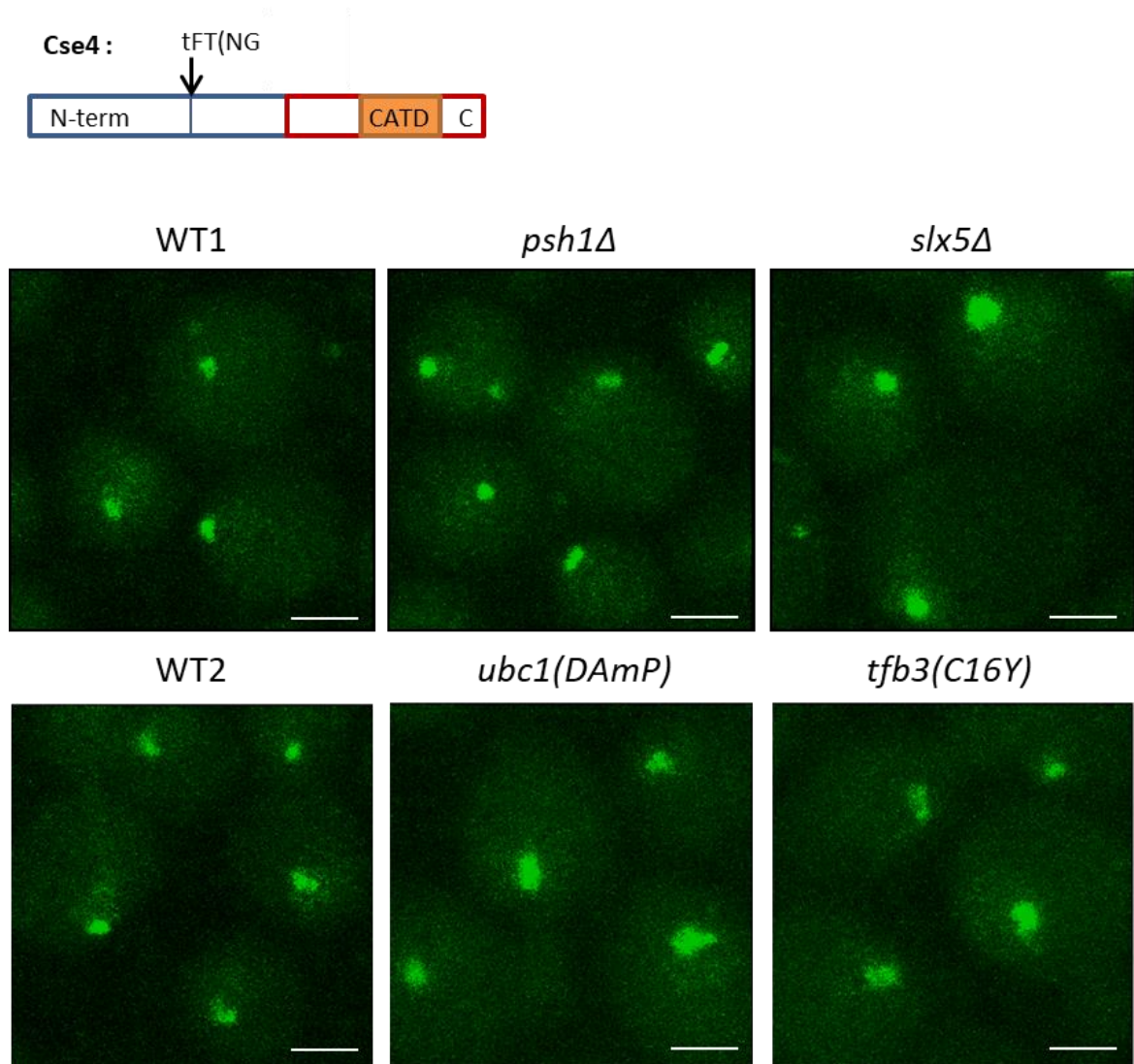


Figure 30 : Localisation de Cse4-tFT(NG)^{interne} dans des mutants d'E3 et d'E2 d'intérêt.
La barre d'échelle représente 2 μ M.

c- Ubiquitylation de Cse4-LgBiT-His

Nous avons ensuite voulu étudier l'ubiquitylation de Cse4 en utilisant la technique de complémentation de luminescence entre Cse4-LgBiT et SmBiT-Ubiquitine. Cse4 endogène étiquetée en interne étant plus faiblement exprimée dans les cellules, une étiquette His a été ajoutée au niveau du LgBiT interne ce qui permet de purifier Cse4-LgBiT-HIS^{interne} pour mieux détecter son ubiquitylation (Figure 31.A). D'autre part, il est possible de faire agir des DUBs sur Cse4-LgBiT-HIS^{interne} après sa purification. Cette étape est optionnelle et sera décrite ultérieurement.

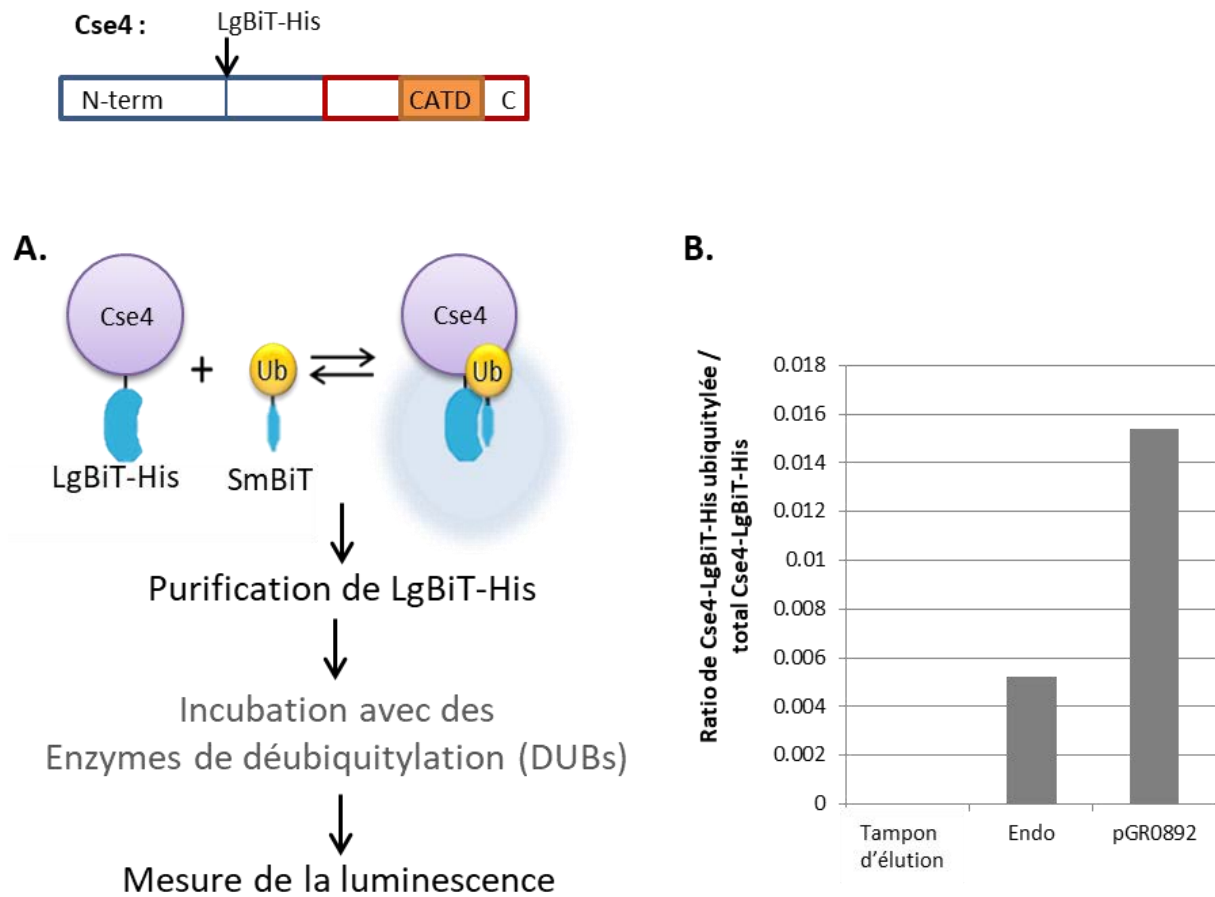


Figure 31 : Expression de la SmBiT-Ubiquitine lors de l'étude de Cse4-LgBiT-His^{interne}.

(A) Protocole de purification des protéines étiquetées LgBiT-His^{interne}. Cse4 et l'ubiquitine sont fusionnée à des fragments complémentaires de la luciférase (respectivement LgBiT-His et SmBiT). La luminescence est mesurée après purification des protéines LgBiT-His. L'ubiquitylation de Cse4 permet une reconstitution de la luminescence. L'étape d'incubation avec les DUBs est optionnelle.

(B) Comparaison du niveau de luminescence du plasmide SmBiT-Ubiquitine avec une origine de réplication 2μ (pGR0892) ou de la SmBiT-Ubiquitine intégrée au locus *Lyp1* et sous le contrôle du promoteur de *PDC1*. Le ratio représente le niveau de luminescence reconstitué par Cse4-LgBiT-His-SmBiT-Ubiquitine par rapport à la quantité de Cse4-LgBiT-His.

Résultats

Les niveaux de luminescence détectés avec cette technique dépendent du niveau d'expression de SmBiT-Ubiquitine par rapport à l'ubiquitine endogène. Pour que la SmBiT-Ubiquitine soit exprimée à des niveaux constants dans toutes les cellules, une construction a été introduite dans le génome de la levure. Le niveau de luminescence reconstituée de Cse4-LgBiT-HIS^{interne} et SmBiT-Ubiquitine obtenu avec l'expression génomique est plus faible que celui obtenu à partir d'un plasmide, mais le niveau d'expression de SmBiT-Ubiquitine est plus constant dans les différents mutants (Figure 31.B et données non présentées). Nous avons choisi d'utiliser cette méthode d'expression génomique de la SmBiT-Ubiquitine pour la suite de nos expériences.

Grâce à cette technique, nous avons étudié l'ubiquitylation de Cse4 par les E3s déjà décrites dans la littérature pour contribuer à l'ubiquitylation de Cse4 surexprimée. Un test de croissance a été réalisé sur la souche sauvage et chaque mutant d'E3 (*psh1Δ*, *rcy1Δ*, *slx5Δ*, *ubr1Δ*) (Figure 32.A). Les différentes souches ne montrent pas de défauts de croissance important à 30°C. Seule la souche *slx5Δ* semble présenter un léger défaut de croissance. Les niveaux de luminescence reconstituée sont mesurés dans chaque souche et sont rapportés à la quantité totale de Cse4-LgBiT. Les ratios obtenus sont présentés Figure 32.B. Une diminution significative du ratio de luminescence est observée dans les quatre mutants (*psh1Δ*, *rcy1Δ*, *slx5Δ* et *ubr1Δ*) par rapport à la souche sauvage. Ces données montrent que les E3s Psh1, SCF^{Rcy1}, Slx5 et Ubr1 sont impliquées dans l'ubiquitylation de Cse4 exprimée de façon endogène. L'ubiquitylation a aussi été étudiée dans un mutant *tfb3(C16Y)* de manière indépendante mais aucune variation significative n'a été observée (données non présentées)

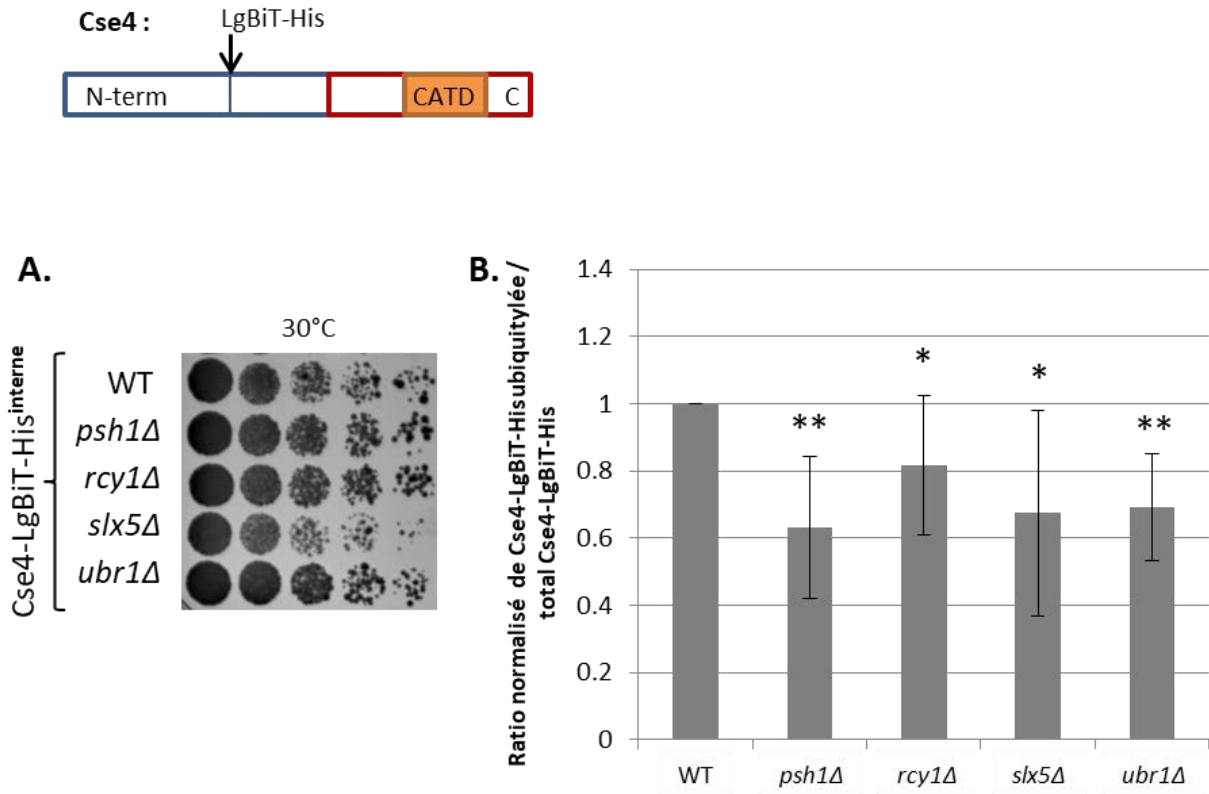


Figure 32 : Niveau d'ubiquitylation de Cse4-LgBiT-His^{interne} endogène dans des mutants d'E3s.

(A) Test de croissance des différentes souches de levures exprimant Cse4 étiquetée en interne avec LgBiT-HIS. Les levures sont incubées à 30°C.

(B) Quantification de la luminescence dans les souches Cse4-LgBiT-His PDC1-SmBiT-Ubiquitine. Le ratio représente le niveau de luminescence reconstitué par Cse4-LgBiT-His-SmBiT-Ubiquitine par rapport à la quantité de Cse4-LgBiT et SmBiT-Ubiquitine. Ce ratio a été normalisé à 1 pour la souche WT. L'écart type et les P-values définies grâce à un test T de Student sont indiqués, * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

d- Ubiquitylation de Cse4 au cours du cycle cellulaire

À partir de ce protocole nous avons voulu étudier la régulation de l'ubiquitylation de Cse4 pendant le cycle cellulaire. Le traitement à l'hydroxyurée entraîne une diminution de la quantité de Cse4-tFT^{interne} au niveau du centromère (Figure 27). Nous avons voulu vérifier si cette diminution était due à l'ubiquitylation de Cse4 ou si d'autres changements dans l'ubiquitylation de Cse4 étaient visibles au cours du cycle cellulaire. Pour synchroniser les cellules dans différentes phases du cycle, nous avons utilisé des traitements à l' α -factor (transition G1-S), à l'hydroxyurée (phase S) et au nocodazole (phase M). Avec ces différents traitements, aucune différence dans les ratios de luminescence n'est observée (Figure 33). Cela suggère qu'il n'y a pas de différence d'ubiquitylation dans ces conditions contrairement aux données obtenues avec l'étiquette C-terminale qui montrait une augmentation de l'ubiquitylation en phase M (Figure 19).

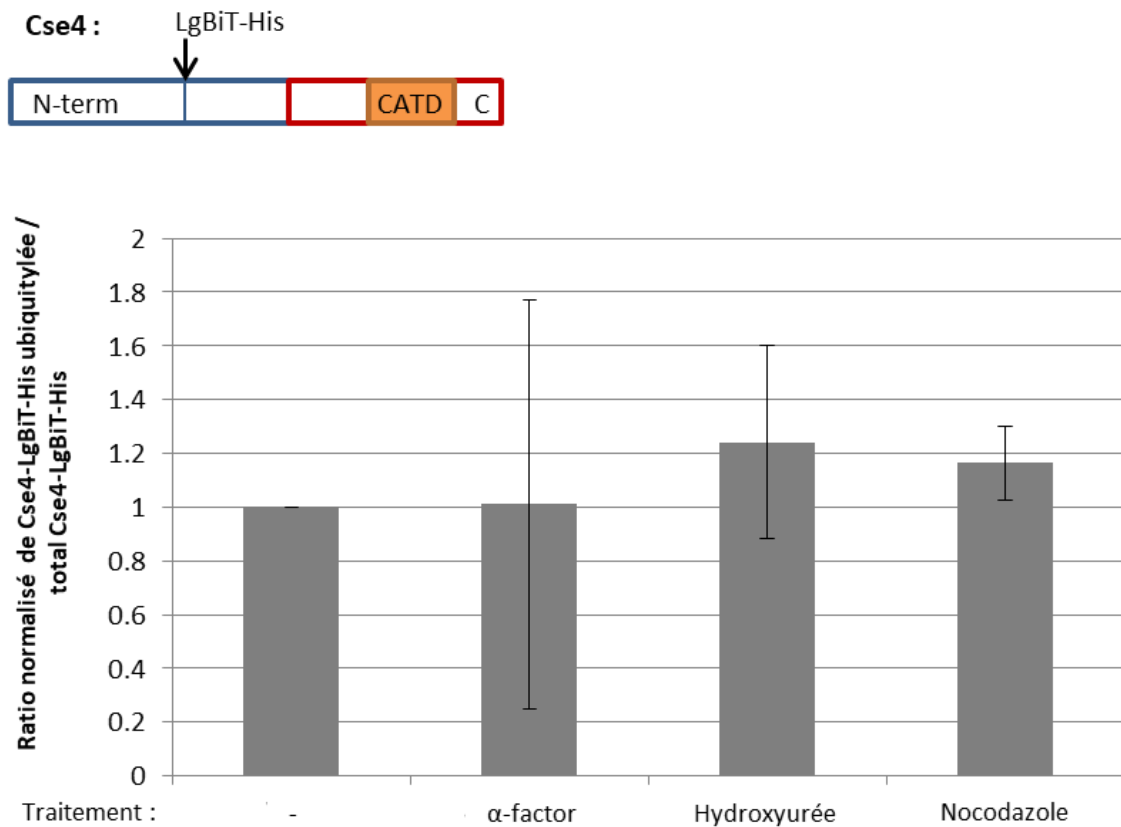


Figure 33 : Niveau d'ubiquitylation de Cse4-LgBiT-His^{interne} endogène au cours du cycle cellulaire.

Quantification de la luminescence dans les souches Cse4-LgBiT-His pPDC1-SmBiT-Ubiquitine après traitement de 90 min à l' α -factor, hydroxyurée ou nocodazole. Le ratio représente le niveau de luminescence reconstitué par Cse4-LgBiT-His SmBiT-Ubiquitine par rapport à la quantité de Cse4-LgBiT et SmBiT-Ubiquitine. Ce ratio a été normalisé à 1 pour la souche WT.

Résultats

Pourtant, les données de microscopie obtenues montrant une diminution de la quantité de Cse4-tFT^{interne} sont en accord avec le remplacement de Cse4 en phase S précédemment montré (Wisniewski et al., 2014, Figure 27). Nous avons posé l'hypothèse que si cette dégradation était due à l'ubiquitylation de Cse4, elle pouvait avoir lieu à un à moment précis au cours du cycle cellulaire qui n'était pas forcément visible dans des cellules arrêtées dans une phase particulière. Pour tester cette hypothèse, les cellules ont été synchronisées avec l' α -factor en fin de phase G1 puis relarguées dans un milieu YPD afin qu'elles reprennent leur progression dans le cycle cellulaire. La luminescence est mesurée avant et à différents temps après relargage (Figure 34). Le ratio de luminescence reconstituée sur la quantité totale de Cse4-LgBiT augmente au cours du temps, atteint un maximum 60 minutes après le relargage des cellules, puis diminue à nouveau. Après 100 minutes de relargage, la luminescence retourne au niveau de départ. Ces résultats suggère que Cse4 serait ubiquitylée environ 60 minutes après le relargage de phase G1. Pour déterminer si cette ubiquitylation dépend de la progression des cellules en phase S, les cellules ont été synchronisées avec l' α -factor puis relarguées dans un milieu contenant de l'hydroxyurée pour empêcher leur progression en phase S. Dans ces conditions, le ratio de luminescence n'augmente pas après relargage des cellules. L'ensemble de ces données nous indique que Cse4 est ubiquitylée au cours de la phase S.

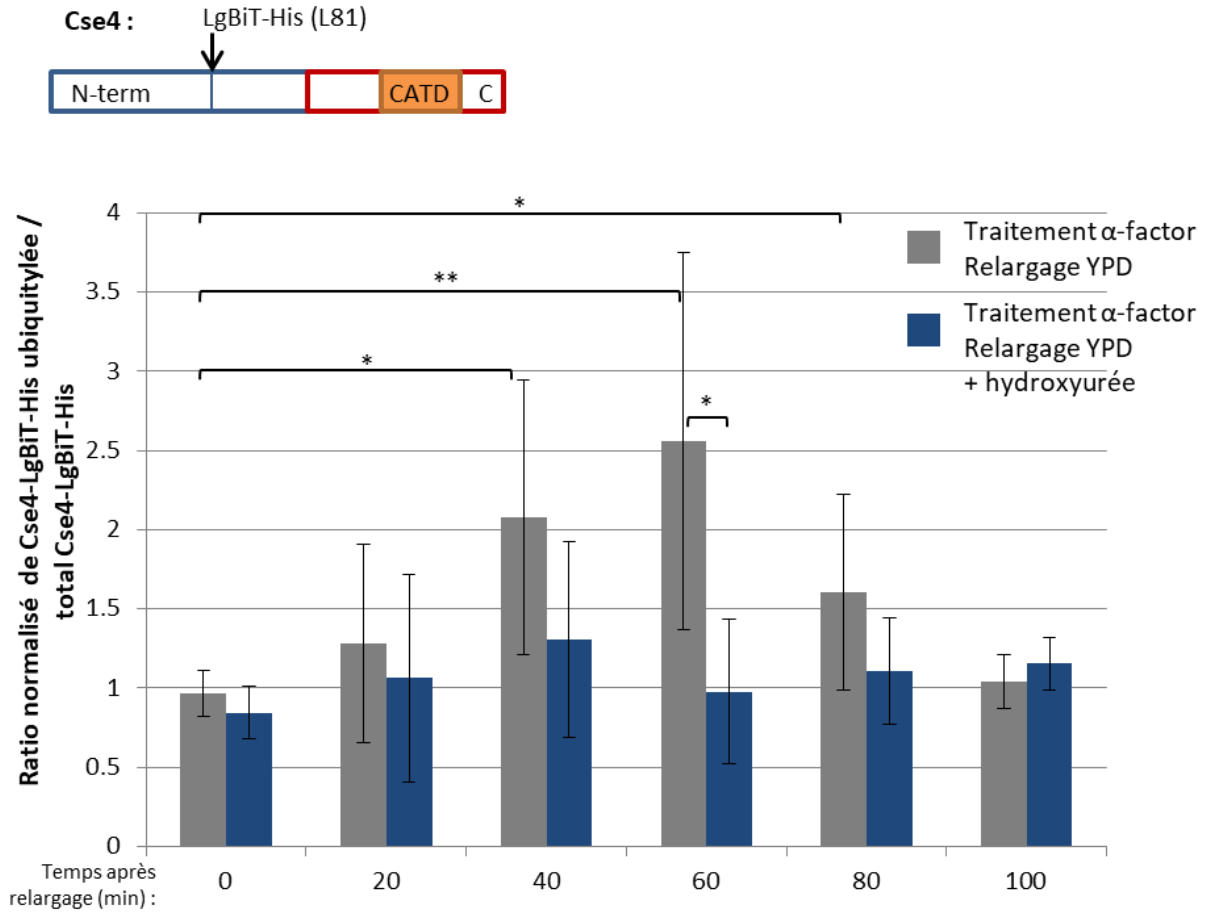


Figure 34 : Niveau d'ubiquitylation de Cse4-LgBiT-His^{interne} endogène après traitement à l' α -factor puis relargage dans le cycle cellulaire dans la souche sauvage.

Quantification de la luminescence dans les souches Cse4-LgBiT-His pPDC1-SmBiT-Ubiquitine. Après un traitement de 90 min à l' α -factor ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), les levures sont lavées puis relarguées dans du YPD ou du YPD avec 15 mg.mL^{-1} d'hydroxyurée. Les extraits protéiques sont réalisés à différents temps après le relargage. Le ratio représente le niveau de luminescence reconstitué par Cse4-LgBiT-His SmBiT-Ubiquitine par rapport à la quantité de Cse4-LgBiT et SmBiT-Ubiquitine. Ce ratio a été normalisé à 1 pour la souche WT. L'écart type et les P-values définies grâce à un test T de Student sont indiqués, * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Nous avons ensuite cherché à déterminer quelle(s) E3(s) ubiquitylante(s) Cse4 en phase S. Pour cela les différents mutants ont été synchronisés avec l' α -factor, puis relargués dans le cycle cellulaire. Les cellules ont ensuite été prélevées avant et 60 minutes après le relargage. Dans ces conditions, nous n'observons pas d'augmentation du signal de luminescence dans les souches *psh1Δ* et *slx5Δ* contrairement à la souche sauvage (Figure 35). Pour les souches *rcy1Δ* et *ubr1Δ* les signaux obtenus 60 minutes après relargage sont comparables à ceux obtenus dans la souche sauvage. Cependant, le signal d'ubiquitylation de Cse4-LgBiT-HIS^{interne} détecté dans les cellules synchronisées avec de l' α -factor est plus important dans ces mutants que dans les cellules sauvages.

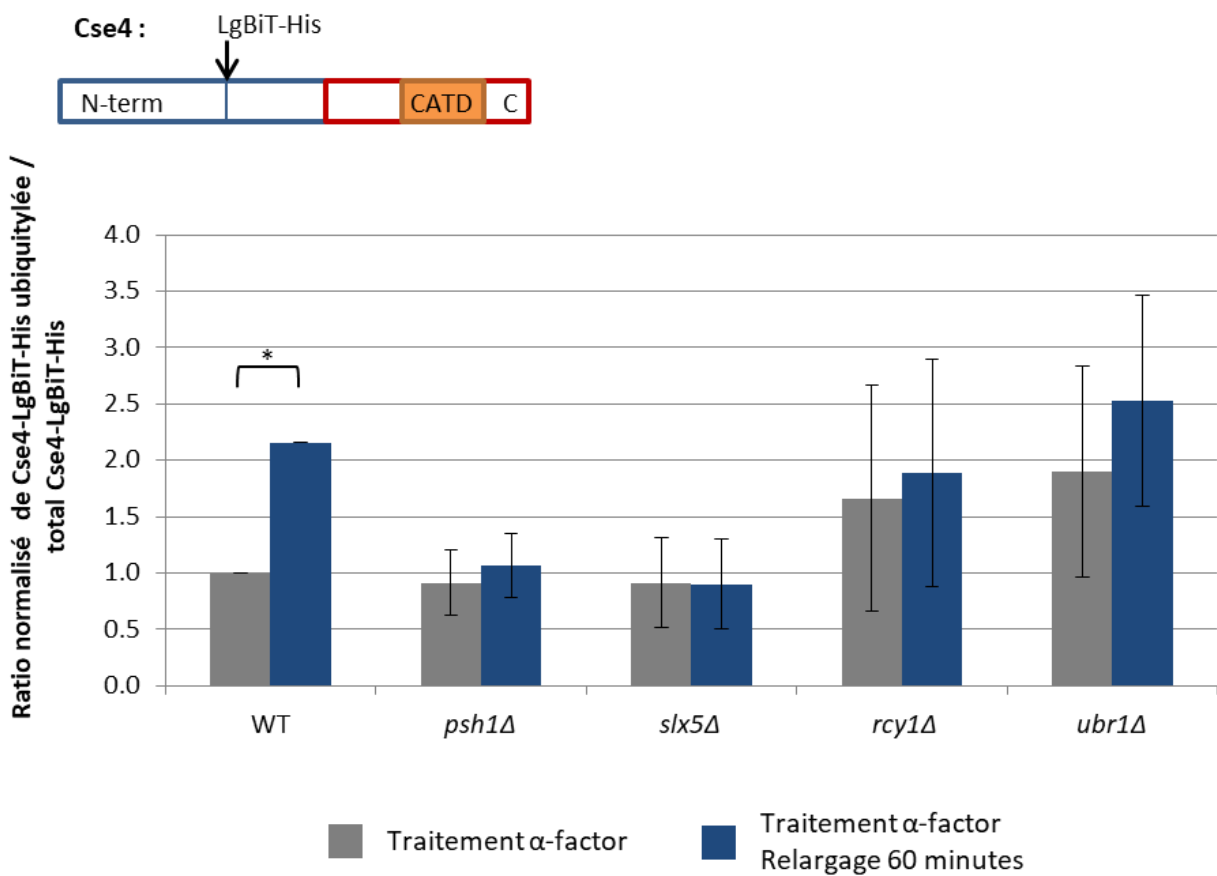


Figure 35 : Niveau d'ubiquitylation de Cse4-LgBiT-His^{interne} endogène après traitement à l' α -factor puis relargage dans le cycle cellulaire dans la souche sauvage et différents mutants d'E3s.

Quantification de la luminescence dans les souches Cse4-LgBiT-His pPDC1-SmBiT-Ubiquitine déletées ou non d'E3s. Après traitement de 90 min à l' α -factor ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), les levures sont lavées puis relarguées dans du YPD. Les extraits protéiques sont réalisés avant et 60 minutes après le relargage. Le ratio représente le niveau de luminescence reconstitué par Cse4-LgBiT-His-SmBiT-Ubiquitine par rapport à la quantité de Cse4-LgBiT et SmBiT-Ubiquitine. Ce ratio a été normalisé à 1 pour la souche WT. L'écart type et les P-values définies grâce à un test T de Student sont indiqués, * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Résultats

En parallèle, nous avons voulu vérifier que la progression dans le cycle cellulaire était la même pour chacun des mutants utilisés. L'évolution de la quantité d'ADN après relargage a donc été mesurée par cytométrie en flux (Figure 36). Les cellules asynchrones sont réparties en deux populations différant par leur contenu en ADN. La première population (pic 1N, Figure 36) est constituée des cellules en phase G0/G1. La seconde population (pic 2N, Figure 36) a un contenu en ADN doublé, il s'agit donc des cellules en phase G2/M. Les cellules présentes entre les deux sont en cours de duplication de leur contenu d'ADN et donc en phase S. À $t=0$, les cellules de chaque mutant sont synchronisées en phase G1 grâce à l' α -factor. Après relargage, les cellules évoluent vers la phase G2 au cours du temps. La souche sauvage, *psh1Δ*, *rcy1Δ* et *ubr1Δ* présentent toutes un profil et une évolution dans le cycle cellulaire semblables. De manière surprenante, la souche *slx5Δ* montre un contenu en acide nucléique (ADN et ARN) supérieur aux autres souches (pic 2N et 4N, Figure 36). La souche présente dans la collection utilisée présentait déjà ce défaut dans la quantité en ADN qui n'est pas présent dans d'autres souches *slx5Δ* disponibles dans l'équipe (données non présentées). De plus, la souche *slx5Δ* présente un retard de progression dans le cycle cellulaire par rapport à la souche sauvage, ce qui est cohérent avec une croissance plus lente observée lors des cultures (Figure 32.A). Le défaut d'ubiquitylation observé dans cette souche peut donc être dû à un défaut de croissance et pas à un effet direct de Slx5.

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, Psh1 est la seule ubiquitine ligase qui pourrait être impliquée dans l'ubiquitylation de Cse4 en phase S.

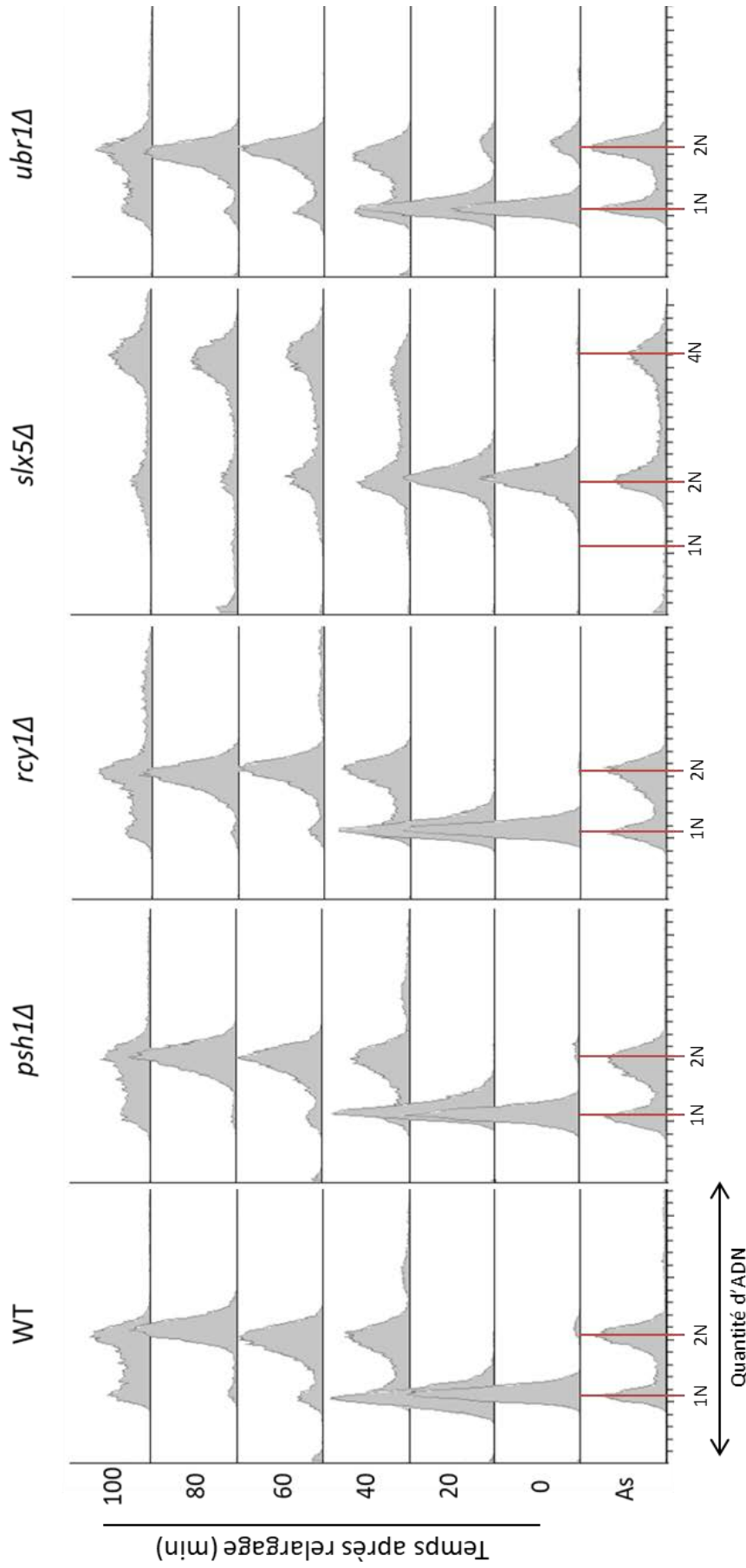


Figure 36 : Progression des différents mutant Cse4-LgBiT-His^{interne} dans le cycle cellulaire.

Après synchronisation de 90 min à l' α -factor ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), les cellules sont lavées et relarguées dans un milieu YPD sans traitement. Toutes les 20 minutes, un aliquot de cellules est récolté, fixé et marqué à l'iode de propidium. Des cellules asynchrones (AS) sont aussi fixées et marquées. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie de flux. Le nombre de cellules est représenté en fonction de la fluorescence de l'iode de propidium.

e- Mise en place d'un test pour analyser le type de chaînes d'ubiquitine assemblées sur Cse4

Pour comprendre comment les E2s et E3s impliquées dans l'ubiquitylation de Cse4 contrôlent son activité, nous avons cherché à analyser la nature des chaînes d'ubiquitine assemblées sur Cse4. Cela est possible en utilisant le test de complémentation de luminescence suivi d'un traitement des éluats avec des enzymes de déubiquitylation. Les enzymes de déubiquitylation permettent l'hydrolyse des chaînes d'ubiquitine de façon non-spécifique ou spécifique d'un type de chaîne. Usp2 est une enzyme de déubiquitylation non-spécifique qui entraîne la dégradation de tous les types de chaînes. Tandis que l'enzyme AMSH est spécifique des chaînes K63, OTUB1 des chaînes K48 et Cezanne des chaînes K11. La spécificité de chacune des DUBs utilisées a été vérifiée dans le laboratoire en utilisant des tetra-ubiquitines K11, K48 ou K63 spécifiques (données non présentées).

L'incubation de Cse4-LgBiT-His^{interne} purifiées avec Usp2 entraîne une diminution importante du ratio signal de luminescence reconstituée par rapport à la quantité de Cse4-LgBiT-His (Figure 37.A). Cela confirme que le signal mesuré est bien dû à l'ubiquitylation de Cse4. Les échantillons ont ensuite été incubés avec les DUBs spécifiques d'un type de chaîne (Figure 37.B). L'incubation avec l'enzyme Amsh n'entraîne pas de changement du ratio de luminescence mesurée. Après incubation avec OTUB1 et Cezanne, les ratios de luminescence montrent une diminution de respectivement 70 % et 60 % du signal initial. Des chaînes d'ubiquitine K48 et K11 semblent donc être assemblées sur Cse4.

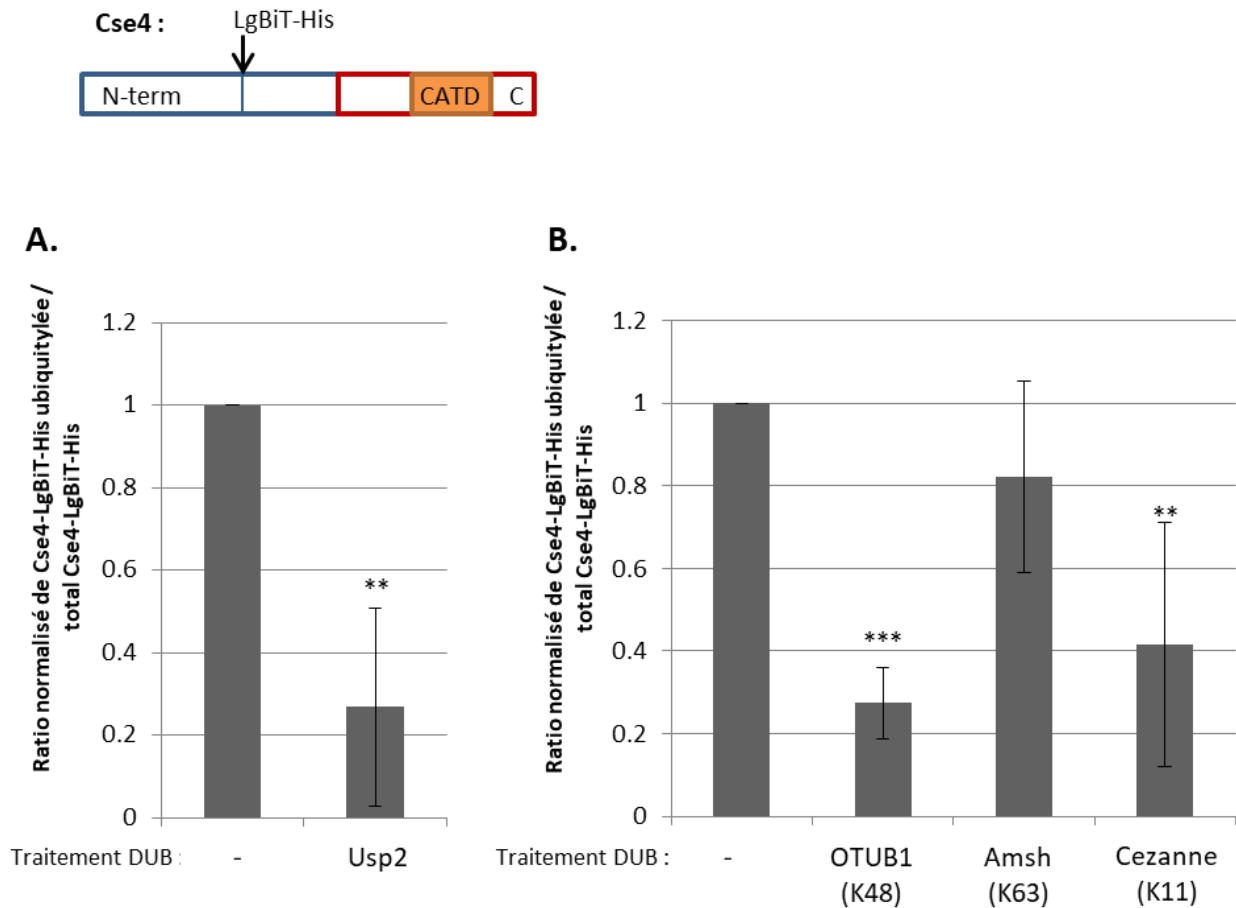


Figure 37 : Identification du type de chaînes assemblées sur Cse4.

(A) Quantification de la luminescence après purification de Cse4-LgBiT-His^{interne} et traitement des éluats en présence ou absence de l'enzyme Usp2.

(B) Quantification de la luminescence après purification de Cse4-LgBiT-His^{interne} et traitement des éluats en présence ou absence de DUBs spécifique d'un type de chaîne. L'écart type et les P-values définies grâce à un test T de Student sont indiqués : ** p < 0,01 et *** p < 0,001

DISCUSSION

I. Identification de nouveaux substrats d'ubiquitylation de Psh1

Le premier objectif de ma thèse était d'identifier de nouveaux substrats d'ubiquitylation par Psh1. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser la stratégie « anchor-away », permettant d'inactiver de manière conditionnelle les protéasomes nucléaires, couplée à une technique de protéomique quantitative (SILAC).

D'une manière générale, les événements d'ubiquitylation protéolytiques peuvent être difficiles à mettre en évidence car les protéines cibles sont dégradées rapidement après leur modification. En permettant une inactivation spécifique des protéasomes dans le noyau, la technique « anchor-away » nous permet de stabiliser le pool de protéines nucléaires ubiquitylées de façon protéolytique et de les identifier plus facilement. Notre équipe a déjà utilisé cette technique avec succès, par exemple pour mettre en évidence l'ubiquitylation du facteur de transcription Stp2 par le complexe Asi1/Asi3 (Khmelniskii et al., 2014). D'autres équipes ont également utilisé des approches similaires pour inactiver spécifiquement les protéasomes dans le noyau (Koch et al., 2019, in press ; Tsuchiya et al., 2013). Psh1 ayant une localisation strictement nucléaire, cette technique nous a semblé être particulièrement adaptée pour identifier ses substrats. Nous aurions également pu inactiver les protéasomes en utilisant un mutant thermosensible du protéasome ou un inhibiteur chimique comme le MG132. Cependant, ces approches ont l'inconvénient d'entraîner une accumulation importante de protéines ubiquitylées dans le cytoplasme qui conduit à une déplétion de l'ubiquitine libre et une perte d'ubiquitylation de certaines protéines nucléaires comme H2B (Dantuma et al., 2006). Nous avons donc pensé que l'utilisation de la technique « anchor away » était préférable. Toutefois, cette technique ne permet pas d'enrichir les événements d'ubiquitylation non-protéolytiques. Si Psh1 catalyse l'assemblage de chaînes d'ubiquitine K63 sur certains de ses substrats, nous risquons d'avoir du mal à les détecter.

La technique de protéomique quantitative SILAC présente de nombreux avantages. Nous l'avons choisi car elle limite les biais qui pourraient être introduits pendant la préparation des échantillons à analyser. En effet, les cellules que l'on souhaite comparer (sauvage et *psh1Δ* dans notre cas) sont mélangées avant la lyse cellulaire et la purification des protéines ubiquitylées (Figure 15). La principale source d'erreur de cette technique provient

d'un mélange inégal des cellules avant leur lyse, mais ce biais systématique peut être facilement détecté et corrigé lors de l'analyse des résultats.

Les résultats de spectrométrie de masse ont permis d'identifier plusieurs protéines ubiquitylées de manière différentielle dans des cellules sauvages et dans la souche *psh1Δ*. En tenant compte de la localisation nucléaire attendue des substrats de Psh1, nous avons retenu trois candidats potentiels (Spc105, Cbf2, Yor111W), mais aucun n'a pu être confirmé par Western-blot (Figure 17). Les deux candidats Cbf2 et Spc105 semblaient particulièrement intéressants, car ces protéines fonctionnent au kinétochore et qu'aucun peptide ubiquitylé n'avait été détecté pour ces protéines dans la souche *psh1Δ*. Néanmoins, ces protéines sont peu abondantes (moins de 300 copies par cellule d'après Kulak et al., 2014) et les quantités de peptides ubiquitylés détectés dans la souche sauvage étaient faibles. Nous avons donc conclu que ces protéines n'étaient probablement pas des substrats de Psh1.

Au début de ma thèse, le seul substrat connu de Psh1 était Cse4. L'expérience de SILAC a permis de détecter plusieurs sites d'ubiquitylation de Cse4, confirmant que Cse4 endogène est régulée par ubiquitylation (Figure 16). Les sites d'ubiquitylation de Cse4 détectés par SILAC sont les lysines K131, K155 and K163. Ils correspondent à ceux qui avaient été identifiés lors d'une expérience d'ubiquitylation *in vitro* par Psh1 (Hewawasam et al., 2010), excepté le site K172 qui a été détecté *in vitro*, mais pas par SILAC. Ces trois sites d'ubiquitylation ont été quantifiés aussi bien dans la souche sauvage que dans la souche *psh1Δ*, avec un ratio léger/lourd moyen de 1,26. Ce résultat confirme que Psh1 n'est pas la seule E3 capable d'ubiquityler Cse4 endogène. Il est intéressant de noter que parmi ces sites d'ubiquitylation, la K155 est conservée chez l'Homme (Figure 10).

Une publication très récente a identifié deux autres protéines dont la dégradation dépend de Psh1 lorsqu'elles sont surexprimées : Pgd1 et Rps22a (Kim et al., 2018). L'expérience de SILAC a permis d'identifier des peptides ubiquitylés uniquement pour Rps22a, mais leur ratio léger/lourd proche de 1 (1,15 et 1,773) ne nous avait pas conduits à les sélectionner parmi les substrats potentiels de Psh1. Une autre publication avait identifié d'autres substrats potentiels de Psh1 en utilisant une approche originale appelée UBAIT (O'Connor et al., 2015). Plusieurs peptides ubiquitylés ont été identifiés pour ces protéines lors de notre expérience de SILAC, mais aucun n'avait un ratio léger/lourd supérieur à 4 et nous ne les avons donc pas analysés par Western-blot.

Discussion

Ces résultats illustrent que même si les progrès des techniques de protéomique ont grandement facilité l'identification des protéines ubiquitylées, il est souvent difficile d'identifier les substrats d'une E3 d'intérêt. Cela peut être dû à de multiples facteurs comme la redondance des E3s, la faible abondance des substrats ou le fait que l'ubiquitylation n'a lieu que dans certaines conditions, par exemple à un moment particulier du cycle cellulaire. La validation des candidats identifiés par protéomique est souvent fastidieuse car la détection des protéines ubiquitylées par Western-blot n'est pas facile à mettre en œuvre à grande échelle. C'est en partie pour cette raison que nous avons développé dans notre équipe la technique de quantification de l'ubiquitylation par luminescence. Cette technique semble prometteuse, elle est plus sensible et plus simple à réaliser que les Western-blots. Une collection de souches de levure avec la plupart des protéines de levure fusionnées LgBiT-HIS et la SmBiT-ubiquitine endogène est désormais disponible au laboratoire. Nous pensons que cette collection permettra de confirmer plus facilement l'ubiquitylation des substrats potentiels de Psh1.

II. Ubiquitylation de Cse4 endogène

1- Expression endogène de Cse4 et fusion à une étiquette

Chez la levure, la surexpression de Cse4 entraîne sa mauvaise localisation au niveau des promoteurs (Krassovsky et al., 2012). La délétion de *PSH1* n'a pas d'effet sauf en cas de surexpression de Cse4 (Hewawasam et al., 2010; Ranjitkar et al., 2010). De plus, dans des conditions endogènes, les souches *psh1Δ* et *ubr1Δ* montrent la même progression dans le cycle cellulaire que la souche sauvage alors qu'elles montrent un délai court pour *ubr1Δ* et de 100 min pour la souche *psh1Δ* lorsque Cse4 est surexprimée (Cheng et al., 2017). Ces différents phénotypes témoignent d'une différence de métabolisme en condition endogène et en condition de surexpression, ce qui pourrait biaiser les observations réalisées sur l'ubiquitylation de Cse4. En effet, la surexpression de Cse4 et sa mauvaise localisation induite pourraient entraîner une augmentation de la régulation protéolytique impliquant des E3s qui ne sont normalement pas recrutées dans des conditions endogènes. Par exemple, chez l'Homme, Mdm2 surexprimée s'auto-ubiquityle, sa dégradation est donc dépendante de son propre domaine RING. Cependant, à des niveaux d'expression physiologiques, Mdm2 est seulement ubiquitylée par une acetyl-transférase PCAF qui possède aussi une activité intrinsèque d'ubiquitylation (de Bie and Ciechanover, 2011). La surexpression de Mdm2, entraîne donc une ubiquitylation qui n'est pas présente dans des conditions physiologiques. Afin d'étudier le réseau d'ubiquitylation de Cse4 et de limiter les artéfacts, nous avons décidé de nous placer dans des conditions aussi physiologiques que possible. Toutes nos expériences ont été réalisées en utilisant des formes de Cse4 exprimées à partir de son locus chromosomique endogène.

Lors de notre étude, nous avons remarqué que la fusion d'une étiquette C-terminale à Cse4 entraîne des défauts importants de croissance des levures allant jusqu'à la létalité (Figure 24.B). Ces défauts de croissance sont corrélés à une accumulation extra-centromérique de Cse4 (Figure 24.C). Les acides aminés présents à l'extrémité C-terminale de Cse4 sont connus pour être essentiels à la reconnaissance par Mif2, l'homologue de levure de la protéine du kinétochore interne CENP-C (Kato et al., 2013). Il est donc possible qu'une étiquette C-terminale empêche l'interaction avec Mif2 et altère la mise en place du kinétochore. Étonnamment, la plupart données connues dans la littérature sur l'ubiquitylation de Cse4 ont été obtenues en utilisant une étiquette C-terminale. De plus, Cse4 était surexprimée dans la majorité des cas. Ces résultats sont à interpréter avec précaution

puisque'ils ont été obtenus en utilisant une forme de Cse4 dont la fonction est altérée et qui a été exprimée à un niveau anormal. Il se peut donc que certains des mécanismes d'ubiquitylation de Cse4 mis en évidence dans ces publications ne soient pas impliqués dans la régulation de Cse4 dans des conditions physiologiques.

Pour résoudre ce problème, nous avons choisi de fusionner Cse4 à des étiquettes internes. Une publication précédente avait montré que l'insertion d'une étiquette après la leucine 81 de Cse4 n'affecte ni la localisation de Cse4, ni la croissance des levures (Wisniewski et al., 2014). Nos résultats confirment que les étiquettes insérées à cette position n'entraînent en général pas de défaut majeur de la fonction de Cse4 (Figure 24).

2- Quantification de l'ubiquitylation de Cse4

Au cours de ma thèse, nous avons mis en place plusieurs méthodes permettant d'étudier l'ubiquitylation de Cse4 exprimée de manière endogène. La première technique utilisée consiste en une purification des protéines ubiquitylées suivie d'un Western-blot révélant Cse4 fusionnée à une étiquette TAP. Cette technique nous a permis de visualiser l'ubiquitylation de Cse4-TAP exprimée de façon endogène (Figure 18). Cette ubiquitylation dépend de Psh1 et est augmentée lorsque les cellules sont synchronisées phase G2/M (Figure 19.B). L'ubiquitylation de Cse4-TAP est encore visible dans une souche *psh1Δ*, ce qui indique que d'autres E3s peuvent ubiquityler cette forme de Cse4. Ce résultat est cohérent avec ceux de spectrométrie de masse et les données publiées avec Cse4 surexprimée.

Bien que les résultats obtenus avec cette méthode soient cohérents, elle n'était pas totalement satisfaisante :

- Les Western-blots manquaient souvent de sensibilité et produisaient des résultats de qualité variable et pas toujours facilement reproductibles et quantifiables.
- La purification de l'ubiquitine n'a pas bien fonctionné dans certaines souches de levures (en particulier les mutants de *UBC1* et *UBC13*, voir Figure 19 et 20) ce qui rend certaines expériences ininterprétables.
- La surexpression de HIS-Ubiquitine peut conduire à une ubiquitylation excessive de résidus qui ne sont normalement pas ubiquitylés dans les cellules (Chen et al., 2003; Haglund et al., 2003).

Discussion

- Enfin, dans cette expérience, les souches « anchor-away » utilisées pour cette technique sont bien adaptées pour détecter les événements d'ubiquitylation protéolytique ayant lieu dans le noyau, mais pas forcément pour mettre en évidence d'autres types d'ubiquitylation.

Au vu de ces limitations, nous avons cherché à mettre au point d'autres approches permettant d'étudier l'ubiquitylation de Cse4. Premièrement, nous avons développé l'étiquette NeonGreen-mCherry (tFT(NG)) pour mesurer la quantité de Cse4 au centromère ainsi que sa durée de vie. Cette technique ne permet pas de montrer directement l'ubiquitylation de Cse4. Cependant, une accumulation de Cse4 au centromère suggère un défaut d'ubiquitylation protéolytique. Cette technique m'a permis de quantifier Cse4 dans une collection de mutants d'enzymes d'ubiquitylation. L'ubiquitylation peut ensuite être analysée par d'autres techniques.

En particulier, nous avons utilisé une technique de complémentation de luminescence basée sur les fragments SmBiT et LgBiT de la luciférase NanoLuc. Cse4 est fusionnée en interne avec LgBiT et l'ubiquitine est fusionnée avec SmBiT et exprimée à partir d'un promoteur constitutif. Cette technique a été validée dans l'équipe en utilisant des protéines (H2B et Stp2) dont les mécanismes d'ubiquitylation sont bien caractérisés (données non présentées). Dans le cas de Cse4, le signal de luminescence est réduit après traitement avec la DUB Usp2, ce qui confirme que c'est bien l'ubiquitylation qui est détectée (Figure 37).

Cette technique nous offre de nombreux avantages. Elle est plus sensible et plus rapide à mettre en œuvre que le Western-blot, ce qui permet de détecter plus facilement l'ubiquitylation de protéines peu exprimées comme Cse4. D'autre part, les mesures de luminescence sont quantitatives, il est possible de mesurer des variations d'ubiquitylation dans différentes conditions. Sa principale limite est que, contrairement au Western-blot, elle ne permet pas de visualiser le changement de poids moléculaire des protéines ubiquitylées. Il est donc nécessaire de bien contrôler que le signal de luminescence détecté provient bien de l'ubiquitylation de la protéine d'intérêt fusionnée à LgBiT.

3- Enzymes impliquées dans l'ubiquitylation de Cse4 endogène

a- Les E3s

Pour identifier la ou les E3(s) participant à la régulation de Cse4 endogène, nous avons croisé la souche Cse4-tFT(NG)^{interne} à une collection de mutants d'E3 et mesuré la quantité de Cse4 présente aux centromères dans ces différents mutants. Le mutant *rcy1Δ* était absent de la collection et n'a donc pas été analysé. La fluorescence mCherry étant faible comparée à l'autofluorescence des cellules, elle n'a pas pu être utilisée pour mesurer la stabilité de Cse4. Les niveaux de Cse4 localisée en dehors du centromère étant faible dans les souches exprimant Cse4-tFT(NG)^{interne}, nous n'avons pas non plus cherché à mesurer la quantité de Cse4 dans le reste de la cellule.

Ce crible nous a permis d'observer une augmentation significative de la quantité de Cse4 aux centromères uniquement dans les souches *slx5Δ* et *tfb3(C16Y)* (Figures 29 et 30). Le fait que nous n'observions pas d'augmentation significative de la quantité de Cse4 dans la souche *psh1Δ* est surprenant. En effet, avant de réaliser le crible, nous avons construit de manière indépendante une souche *psh1Δ* exprimant Cse4-tFT(NG)^{interne} et observé une nette augmentation de Cse4 au centromère dans cette souche (Figure 26). Nous avons vérifié que la souche produite au cours du crible est correcte (elle comporte bien la délétion de *PSHI*) et nous n'avons pas réussi à comprendre pourquoi ces deux expériences donnent des résultats contradictoires. L'interprétation des résultats de ce crible est donc difficile. Le fait que nous observions un doublement de la quantité de Cse4 aux centromères dans la souche *slx5Δ* nous a initialement fait penser que Slx5 pouvait être impliquée dans le contrôle de Cse4 endogène, conformément à ce qui a été décrit dans (Ohkuni et al., 2016). Cependant, nous avons ensuite réalisé que la souche *slx5Δ* utilisée pour le crible a une quantité d'ADN double par rapport à une souche haploïde normale (Figure 36). Il est donc probable que l'augmentation de la quantité de Cse4 dans cette souche ne soit pas due à l'absence de Slx5, mais à un doublement de la quantité d'ADN centromérique. L'effet de la mutation *tfb3(C16Y)* est également difficile à interpréter. En effet, Tfb3 est une sous-unité essentielle du complexe TFIIH qui a un rôle majeur dans le contrôle de la transcription (Feaver et al., 1997). Il est donc possible que l'augmentation de la quantité de Cse4 dans le mutant *tfb3(C16Y)* soit un effet indirect d'un défaut de transcription.

Nous avons ensuite étudié l'ubiquitylation de Cse4 endogène en utilisant la technique de complémentation de luminescence. Nos résultats suggèrent que les quatre E3s Psh1,

Discussion

SCF^{Rcy1}, Slx5 et Ubr1 participent à l'ubiquitylation de Cse4 endogène (Figure 32). Ceci est en accord avec les données de la littérature concernant le rôle de ces E3s dans la régulation de Cse4. L'inactivation de chacune de ces E3s a un effet relativement faible sur le niveau d'ubiquitylation de Cse4 (diminution de ~ 20 % à ~ 40 % du signal de luminescence). Ceci suggère que l'absence d'une E3 pourrait être compensée, au moins en partie, par d'autres E3s. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer le niveau d'ubiquitylation de Cse4 dans des doubles ou triples mutants de ces E3s. Ceci pourrait aussi expliquer le fait qu'aucune accumulation de Cse4 au centromère n'est détectée dans la souche *ubr1Δ* (Figure 29). Le fait qu'Ubr1 n'influe pas sur la quantité de Cse4, mais qu'elle ubiquityle Cse4 pourrait aussi indiquer qu'il s'agit d'une ubiquitylation non-protéolytique. Par la suite, il serait intéressant d'étudier le profil de dégradation de Cse4 dans les différents mutants d'E3s pour comprendre quel type d'ubiquitylation elles assemblent sur Cse4.

L'ubiquitylation de Cse4 a aussi été étudiée dans un mutant *tfb3(C16Y)*, mais aucune variation significative du signal de luminescence n'a été observée (données non présentées). Ce résultat suggère que l'effet de la mutation *tfb3(C16Y)* sur la quantité de Cse4 au centromère n'est pas dû à un défaut d'ubiquitylation de Cse4 par Tfb3. Les données sur l'ubiquitylation de Cse4 endogène précédemment publiées et celles obtenues lors de cette étude sont synthétisées dans le Tableau 10.

		Psh1	SCF ^{Rcy1}	Slx5	Ubr1	Tfb3
Données obtenues avec Cse4^{C-term}						
Littérature	Ubiquitylation	Non	NR	NR	NR	NR
	Dégradation	Oui	NR	NR	Oui	NR
	Mauvaise localisation	Oui	NR	Oui ?	NR	NR
	E2s	Cdc34	NR	Ubc4	NR	Non
Cette étude	Ubiquitylation (Figure 18)	Oui	NR	NR	NR	NR
	E2s (Figure 13)	Ubc1, Ubc13, Ubc4 et Ubc5	NR	NR	NR	NR
Données obtenues avec Cse4^{interne}						
Cette étude	Quantité au centromère (Figure 26 et 29)	Contradictoire	NR	?	Non	Oui
	Ubiquitylation (Figure 32)	Oui	Oui	Oui	Oui	Non

Tableau 10 : Récapitulatif des données sur l'ubiquitylation de Cse4 endogène.

Les données obtenues par surexpression de Cse4 ne sont pas présentées dans ce tableau.

NR : non renseigné.

b- Les E2s

Nous avons aussi mesuré la quantité de Cse4 au centromère dans des mutants d'E2s (Figure 28 et 30). Nous avons observé une accumulation significative de Cse4-tFT(NG)^{interne} dans le mutant *ubc1(DAmP)* mais pas dans le mutant *p-ubc1*. Comme expliqué précédemment, cela pourrait être dû à une différence d'expression d'Ubc1 dans ces mutants. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait comparer la quantité d'Ubc1 dans ces deux souches par Western-blot.

Ce résultat est intéressant car il suggère qu'Ubc1 participe à la régulation de Cse4. Ubc1 avait été identifiée comme un partenaire potentiel de Psh1 lors du crible BiFC (Figure 13). D'autre part, nous avons observé en utilisant la technique de complémentation de luminescence, une diminution d'environ 50 % de l'ubiquitylation de Cse4 dans le mutant *ubc1(DAmP)* (données non présentées). Il est donc possible qu'Ubc1 et Psh1 collaborent pour ubiquityler Cse4. Toutefois, le fait que la quantification de Cse4 dans des souches *psh1Δ* ait donné des résultats contradictoires rend difficile l'interprétation de ces résultats. Il est aussi possible qu'Ubc1 fonctionne avec plusieurs E3s impliquées dans la régulation de Cse4. Cependant, parmi les E3s qui ont pour l'instant été impliquées dans l'ubiquitylation de Cse4 aucune ne semble fonctionner avec Ubc1. Slx5 est connue pour fonctionner avec Ubc4 (Ciftci-Yilmaz et al., 2018), les complexes SCF avec Cdc34 et Ubc4 (Kus et al., 2004) et Ubr1 avec Rad6 (Dohmen et al., 1991). Par la suite, il serait donc intéressant d'étudier les couples d'E2s et d'E3s qui fonctionnent ensemble pour l'ubiquitylation de Cse4.

En plus d'Ubc1, nous avons observé une augmentation de la quantité de Cse4 au centromère dans la souche *ubc9-ts* (Figure 28). Ce résultat est très préliminaire, mais il est cohérent avec le rôle possible de la sumoylation et de Slx5 dans la régulation de Cse4 (Ohkuni et al., 2016). Il serait donc important de répéter cette expérience pour valider ou non l'implication de la sumoylation dans la régulation de Cse4 endogène. Il serait aussi intéressant de tester si l'inactivation d'Ubc9 induit une diminution de l'ubiquitylation de Cse4 mesurée par complémentation de luminescence.

Nous avons également observé une série de résultats intéressants dans plusieurs expériences réalisées avec l'E2 Ubc4 :

- Ubc4 semble interagir avec Psh1 (expérience de BiFC validée ensuite par complémentation de luminescence, Figure 13 et données non présentées).

- Ubc4 semble moins ubiquitylée en absence de Psh1 (expérience de SILAC, Figure 16).
- L'ubiquitylation de Cse4-TAP augmente en absence d'Ubc4 (Western-blot, Figure 20). Cette augmentation de l'ubiquitylation est dépendante de Psh1 (Western-blot, Figure 21).
- La quantité de Cse4 au centromère semble augmenter légèrement en absence d'Ubc4 (données de microscopie, Figure 28).

Le fait que l'inactivation d'Ubc4 entraîne une augmentation de l'ubiquitylation de Cse4-TAP suggère que cette E2 pourrait participer à une boucle de rétrocontrôle inhibant l'ubiquitylation de Cse4 par Psh1. Des expériences *in vitro* ont montré que Psh1 peut s'auto-ubiquityler sur la lysine 303 (Hewawasam et al., 2010). Comme Ubc4 interagit avec Psh1, nous avons émis l'hypothèse qu'Ubc4 pourrait être impliquée dans l'(auto-)ubiquitylation de Psh1. Pour tester cette hypothèse, nous avons regardé l'ubiquitylation de Psh1-TAP dans une souche sauvage et dans une souche *ubc4Δ*. Ces expériences ne nous ont cependant pas permis de détecter l'ubiquitylation de Psh1 (données non présentées). Des expériences complémentaires devront donc être réalisées pour clarifier si Ubc4 régule l'activité de Psh1.

c- Ubiquitylation au cours du cycle cellulaire

Grâce aux outils mis en place, nous avons aussi étudié l'ubiquitylation de Cse4 endogène au cours du cycle cellulaire. En effet, certaines données publiées suggèrent que l'ubiquitylation de Cse4 pourrait varier à différents moments du cycle cellulaire. En utilisant une forme surexprimée de Cse4, Mishra et al. ont observé une diminution de l'ubiquitylation de Cse4 pendant les phases G1 et S et une augmentation en mitose (Mishra et al., 2015). Nous avons également observé une augmentation de l'ubiquitylation de Cse4-TAP en mitose (Figure 19). D'autre part Wiesniewski et al, ont montré que le pool centromérique de Cse4 est remplacé en phase S, mais l'ubiquitylation de Cse4 n'a pas été étudiée (Wisniewski et al., 2014).

Nos résultats, en utilisant la technique de complémentation de luminescence, n'ont pas permis de mettre en évidence des différences de niveau d'ubiquitylation dans des cellules bloquées en mitose ou dans d'autres phases du cycle cellulaire (Figure 33). Par contre, nous avons observé un pic d'ubiquitylation lorsque des cellules synchronisées progressent en phase S (Figure 34). Ce pic d'ubiquitylation a lieu 60 minutes après la transition G1/S, ce qui

correspond au moment où le pool de Cse4 centromérique est remplacé (Wisniewski et al., 2014). Ces résultats sont confortés par le fait qu'il n'y a pas de variation de la quantité de Cse4 au centromère en mitose, mais que l'on observe une légère diminution en phase S (Figure 27). Cette dernière observation a toutefois été obtenue en utilisant l'étiquette tFT^{interne} qui perturbe le fonctionnement de Cse4 et devra être confirmée en utilisant l'étiquette tFT(NG)^{interne}. L'ubiquitylation de Cse4 en phase S dépend de Psh1 (Figure 35). Les autres E3s responsables de l'ubiquitylation de Cse4 ont aussi été testées, mais il est difficile de conclure quant à leur implication. Le niveau d'ubiquitylation de Cse4 60 minutes après la transition G1/S est identique dans des cellules sauvages et dans des cellules *rcy1Δ* ou *ubr1Δ* ce qui suggère que SCF^{Rcy1} et Ubr1 ne sont pas impliquées dans l'ubiquitylation de Cse4 en phase S. Les cellules *slx5Δ* présentent un défaut d'ubiquitylation similaire aux cellules *psh1Δ*, mais l'analyse par cytométrie en flux montre que ces cellules ont un retard de croissance. Il est donc possible que le défaut d'ubiquitylation dans ces cellules soit lié à un défaut de progression en phase S.

Ces résultats suggèrent que l'ubiquitylation de Cse4 endogène catalysée par Psh1 participe à la régulation du renouvellement de la chromatine centromérique pendant la réplication. Plusieurs scénarios non-exclusifs sont envisageables. Comme il a été décrit que les molécules de Cse4 associées au centromère sont remplacées pendant la phase S par des protéines néo-synthétisées (Wisniewski et al., 2014), Psh1 pourrait ubiquityler et entraîner la dégradation des anciennes molécules de Cse4. Psh1 pourrait également ubiquityler les molécules de Cse4 surnuméraires ou incorporées par erreur dans de la chromatine extra-centromérique.

d- Le type de chaîne d'ubiquitine

La technique de complémentation de luminescence nous a aussi permis d'étudier le type de chaîne d'ubiquitine assemblées sur Cse4 (Figure 37). La digestion par différentes DUBs nous permet de mettre en évidence le type de chaînes assemblées. La spécificité des conditions de digestion avait préalablement été vérifiée en utilisant des chaînes synthétiques de tetra-ubiquitine, mais aussi en étudiant des substrats dont le type de chaîne était connu (données non présentées). Les données obtenues montrent la présence de chaînes K48 et K11 sur Cse4. La digestion par Amsh, spécifique des liaisons K63, ne semble pas induire une diminution significative de la complémentation de luminescence. Cse4 est donc

Discussion

principalement régulée par ubiquitylation protéolytique. Le fait qu'OTUB1 (spécifique des liaisons K48) et Cezanne (spécifique des liaisons K11) entraînent toutes les deux une diminution importante de la luminescence suggère que les chaînes assemblées sur Cse4 sont hétérotopiques. Des digestions multiples ou séquentielles nous permettraient d'en savoir plus sur l'architecture de ces chaînes. Ces données sont cohérentes avec les données de la littérature et les données présentées ici qui indiquent que l'ubiquitylation de Cse4 régule sa dégradation.

CONCLUSION

En conclusion, mes travaux ont permis de montrer que la façon d'étiqueter Cse4 est critique pour l'étude de cette histone. L'utilisation d'une étiquette C-terminale entraîne une localisation extra-centromérique anormalement élevée de Cse4 couplée à une augmentation de son ubiquitylation et à des défauts de croissance des cellules. Ces phénotypes sont semblables à ceux observés lors d'une surexpression de Cse4. L'utilisation d'une étiquette interne permet de limiter ces défauts et est donc plus adaptée pour analyser les mécanismes de régulation de Cse4.

En utilisant Cse4 étiquetée en interne, nous avons pu mettre en évidence une variation de l'ubiquitylation de Cse4 au cours du cycle cellulaire. L'ubiquitylation de Cse4 augmente en cours de phase S, au moment où le pool de Cse4 centromérique est renouvelé. Cette ubiquitylation dépend de l'ubiquitine ligase Psh1. D'autre part, nous avons montré que Cse4 est modifiée par des chaînes d'ubiquitine de type protéolytique. Ensemble, ces résultats suggèrent que Psh1 contrôle le bon renouvellement de la chromatine centromérique lors de la réplication de l'ADN et font l'objet d'un manuscrit en préparation.

BIBLIOGRAPHIE

Akutsu, M., Dikic, I., and Bremm, A. (2016). Ubiquitin chain diversity at a glance. *J Cell Sci* 129, 875–880.

Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 51, 786–794.

Amato, A., Schillaci, T., Lentini, L., and Leonardo, A.D. (2009). CENPA overexpression promotes genome instability in pRb-depleted human cells. *Mol. Cancer* 8, 119.

Anedchenko, E.A., Samel-Pommerencke, A., Nguyen, T.M.T., Shahnejat-Bushehri, S., Pöpsel, J., Lauster, D., Herrmann, A., Rappsilber, J., Cuomo, A., Bonaldi, T., et al. (2019). The kinetochore module Okp1CENP-Q/Ame1CENP-U is a reader for N-terminal modifications on the centromeric histone Cse4CENP-A. *EMBO J.* 38, e98991.

Arrigo, A.P., Simon, M., Darlix, J.L., and Spahr, P.F. (1987). A 20S particle ubiquitous from yeast to human. *J. Mol. Evol.* 25, 141–150.

Au, W.-C., Crisp, M.J., DeLuca, S.Z., Rando, O.J., and Basrai, M.A. (2008). Altered dosage and mislocalization of histone H3 and Cse4p lead to chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 179, 263–275.

Au, W.C., Dawson, A.R., Rawson, D.W., Taylor, S.B., Baker, R.E., and Basrai, M.A. (2013). A novel role of the N terminus of budding yeast histone H3 variant Cse4 in ubiquitin-mediated proteolysis. *Genetics* 194, 513–518.

Bade, D., Pauleau, A.-L., Wendler, A., and Erhardt, S. (2014). The E3 ligase CUL3/RDX controls centromere maintenance by ubiquitylating and stabilizing CENP-A in a CAL1-dependent manner. *Dev. Cell* 28, 508–519.

Barnhart, M.C., Kuich, P.H.J.L., Stellfox, M.E., Ward, J.A., Bassett, E.A., Black, B.E., and Foltz, D.R. (2011). HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore. *J. Cell Biol.* 194, 229–243.

Bassett, E.A., DeNizio, J., Barnhart-Dailey, M.C., Panchenko, T., Sekulic, N., Rogers, D.J., Foltz, D.R., and Black, B.E. (2012). HJURP uses distinct CENP-A surfaces to recognize and to stabilize CENP-A/histone H4 for centromere assembly. *Dev. Cell* 22, 749–762.

Bazan, J.F., and Fletterick, R.J. (1988). Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7872–7876.

Bennett, E.J., Shaler, T.A., Woodman, B., Ryu, K.-Y., Zaitseva, T.S., Becker, C.H., Bates, G.P., Schulman, H., and Kopito, R.R. (2007). Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature* 448, 704–708.

Bialas, J., Groettrup, M., and Aichele, A. (2015). Conjugation of the Ubiquitin Activating Enzyme UBE1 with the Ubiquitin-Like Modifier FAT10 Targets It for Proteasomal Degradation. *PLoS ONE* 10.

- de Bie, P., and Ciechanover, A. (2011). Ubiquitination of E3 ligases: self-regulation of the ubiquitin system via proteolytic and non-proteolytic mechanisms. *Cell Death Differ.* *18*, 1393–1402.
- Biermann, K., Heukamp, L.C., Steger, K., Zhou, H., Franke, F.E., Guetgemann, I., Sonnack, V., Brehm, R., Berg, J., Bastian, P.J., et al. (2007). Gene expression profiling identifies new biological markers of neoplastic germ cells. *Anticancer Res.* *27*, 3091–3100.
- Black, B.E., Foltz, D.R., Chakravarthy, S., Luger, K., Woods, V.L., and Cleveland, D.W. (2004). Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature* *430*, 578–582.
- Blower, M.D., Sullivan, B.A., and Karpen, G.H. (2002). Conserved Organization of Centromeric Chromatin in Flies and Humans. *Dev. Cell* *2*, 319–330.
- Boeckmann, L., Takahashi, Y., Au, W.-C., Mishra, P.K., Choy, J.S., Dawson, A.R., Szeto, M.Y., Waybright, T.J., Heger, C., McAndrew, C., et al. (2013). Phosphorylation of centromeric histone H3 variant regulates chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *24*, 2034–2044.
- Boisson, B., Laplantine, E., Prando, C., Giliani, S., Israelsson, E., Xu, Z., Abhyankar, A., Israël, L., Trevejo-Nunez, G., Bogunovic, D., et al. (2012). Immunodeficiency, autoinflammation and amylopectinosis in humans with inherited HOIL-1 and LUBAC deficiency. *Nat. Immunol.* *13*, 1178–1186.
- Boname, J.M., Thomas, M., Stagg, H.R., Xu, P., Peng, J., and Lehner, P.J. (2010). Efficient internalization of MHC I requires lysine-11 and lysine-63 mixed linkage polyubiquitin chains. *Traffic Cph. Den.* *11*, 210–220.
- Boutet, S.C., Disatnik, M.-H., Chan, L.S., Iori, K., and Rando, T.A. (2007). Regulation of Pax3 by Proteasomal Degradation of Monoubiquitinated Protein in Skeletal Muscle Progenitors. *Cell* *130*, 349–362.
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A., and Ciechanover, A. (1998). A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J.* *17*, 5964–5973.
- Buchwitz, B.J., Ahmad, K., Moore, L.L., Roth, M.B., and Henikoff, S. (1999). A histone-H3-like protein in *C. elegans*. *Nature* *401*, 547–548.
- Burroughs, A.M., Jaffee, M., Iyer, L.M., and Aravind, L. (2008). Anatomy of the E2 ligase fold: implications for enzymology and evolution of ubiquitin/Ub-like protein conjugation. *J. Struct. Biol.* *162*, 205–218.
- Busch, H., and Goldknopf, I.L. (1981). Ubiquitin — protein conjugates. *Mol. Cell. Biochem.* *40*, 173–187.
- Cadwell, K., and Coscoy, L. (2005). Ubiquitination on Nonlysine Residues by a Viral E3 Ubiquitin Ligase. *Science* *309*, 127–130.
- Camahort, R., Li, B., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., and Gerton, J.L. (2007). Scm3 is essential to recruit the histone h3 variant cse4 to centromeres and to maintain a functional kinetochore. *Mol. Cell* *26*, 853–865.

Bibliographie

- Camahort, R., Shivaraju, M., Mattingly, M., Li, B., Nakanishi, S., Zhu, D., Shilatifard, A., Workman, J.L., and Gerton, J.L. (2009). Cse4 is Part of an Octameric Nucleosome in Budding Yeast. *Mol. Cell* *35*, 794–805.
- Canzonetta, C., Vernarecci, S., Iuliani, M., Marracino, C., Belloni, C., Ballario, P., and Filetici, P. (2015). SAGA DUB-Ubp8 Deubiquitylates Centromeric Histone Variant Cse4. G3 Bethesda Md.
- Cartier, A.E., Ubhi, K., Spencer, B., Vazquez-Roque, R.A., Kosberg, K.A., Fourgeaud, L., Kanayson, P., Patrick, C., Rockenstein, E., Patrick, G.N., et al. (2012). Differential Effects of UCHL1 Modulation on Alpha-Synuclein in PD-Like Models of Alpha-Synucleinopathy. *PLoS ONE* *7*.
- Chen, C.-C., Dechassa, M.L., Bettini, E., Ledoux, M.B., Belisario, C., Heun, P., Luger, K., and Mellone, B.G. (2014). CAL1 is the *Drosophila* CENP-A assembly factor. *J Cell Biol* *204*, 313–329.
- Chen, H., Polo, S., Di Fiore, P.P., and De Camilli, P.V. (2003). Rapid Ca²⁺-dependent decrease of protein ubiquitination at synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 14908–14913.
- Chen, P., Johnson, P., Sommer, T., Jentsch, S., and Hochstrasser, M. (1993). Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the in vivo degradation of the yeast MAT alpha 2 repressor. *Cell* *74*, 357–369.
- Chen, Y., Baker, R.E., Keith, K.C., Harris, K., Stoler, S., and Fitzgerald-Hayes, M. (2000). The N Terminus of the Centromere H3-Like Protein Cse4p Performs an Essential Function Distinct from That of the Histone Fold Domain. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 7037–7048.
- Cheng, H., Bao, X., and Rao, H. (2016). The F-box Protein Rcy1 Is Involved in the Degradation of Histone H3 Variant Cse4 and Genome Maintenance. *J. Biol. Chem.* *291*, 10372–10377.
- Cheng, H., Bao, X., Gan, X., Luo, S., and Rao, H. (2017). Multiple E3s promote the degradation of histone H3 variant Cse4. *Sci. Rep.* *7*, 8565.
- Chiu, Y.-H., Sun, Q., and Chen, Z.J. (2007). E1-L2 Activates Both Ubiquitin and FAT10. *Mol. Cell* *27*, 1014–1023.
- Ciechanover, A., Heller, H., Katz-Etzion, R., and Hershko, A. (1981). Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *78*, 761–765.
- Ciechanover, A., Finley, D., and Varshavsky, A. (1984). Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* *37*, 57–66.
- Ciftci-Yilmaz, S., Au, W.-C., Mishra, P.K., Eisenstatt, J.R., Chang, J., Dawson, A.R., Zhu, I., Rahman, M., Bilke, S., Costanzo, M., et al. (2018). A Genome-Wide Screen Reveals a Role for the HIR Histone Chaperone Complex in Preventing Mislocalization of Budding Yeast CENP-A. *Genetics* *210*, 203–218.

Bibliographie

- Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 273–304.
- Clarke, L., and Carbon, J. (1980). Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* 287, 504–509.
- Clarke, L., and Carbon, J. (1983). Genomic substitutions of centromeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 305, 23–28.
- Collins, K.A., Furuyama, S., and Biggins, S. (2004). Proteolysis contributes to the exclusive centromere localization of the yeast Cse4/CENP-A histone H3 variant. *Curr. Biol. CB* 14, 1968–1972.
- Crotti, L.B., and Basrai, M.A. (2004). Functional roles for evolutionarily conserved Spt4p at centromeres and heterochromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 23, 1804–1814.
- Cummins, J.M., Rago, C., Kohli, M., Kinzler, K.W., Lengauer, C., and Vogelstein, B. (2004). Tumour suppression: Disruption of *HAUSP* gene stabilizes p53. *Nature* 428, 486.
- Dantuma, N.P., Groothuis, T.A.M., Salomons, F.A., and Neefjes, J. (2006). A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling. *J. Cell Biol.* 173, 19–26.
- Das, C., Hoang, Q.Q., Kreinbring, C.A., Luchansky, S.J., Meray, R.K., Ray, S.S., Lansbury, P.T., Ringe, D., and Petsko, G.A. (2006). Structural basis for conformational plasticity of the Parkinson's disease-associated ubiquitin hydrolase UCH-L1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4675–4680.
- Davies, B.A., Lee, J.R.E., Oestreich, A.J., and Katzmann, D.J. (2009). Membrane protein targeting to the MVB/Lysosome. *Chem. Rev.* 109, 1575–1586.
- Dechassa, M.L., Wyns, K., and Luger, K. (2014). Scm3 deposits a (Cse4–H4)₂ tetramer onto DNA through a Cse4–H4 dimer intermediate. *Nucleic Acids Res.* 42, 5532–5542.
- Deyter, G.M.R., and Biggins, S. (2014). The FACT complex interacts with the E3 ubiquitin ligase Psh1 to prevent ectopic localization of CENP-A. *Genes Dev.* 28, 1815–1826.
- Deyter, G.M.R., Hildebrand, E.M., Barber, A.D., and Biggins, S. (2017). Histone H4 Facilitates the Proteolysis of the Budding Yeast CENP-ACse4 Centromeric Histone Variant. *Genetics* 205, 113–124.
- Dohmen, R.J., Madura, K., Bartel, B., and Varshavsky, A. (1991). The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7351–7355.
- Dunleavy, E.M., Roche, D., Tagami, H., Lacoste, N., Ray-Gallet, D., Nakamura, Y., Daigo, Y., Nakatani, Y., and Almouzni-Pettinotti, G. (2009). HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell* 137, 485–497.
- Eddins, M.J., Carlile, C.M., Gomez, K.M., Pickart, C.M., and Wolberger, C. (2006). Mms2–Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 915–920.

Bibliographie

- Eisenhaber, B., Chumak, N., Eisenhaber, F., and Hauser, M.-T. (2007). The ring between ring fingers (RBR) protein family. *Genome Biol.* 8, 209.
- Eletr, Z.M., Huang, D.T., Duda, D.M., Schulman, B.A., and Kuhlman, B. (2005). E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 933–934.
- Emmerich, C.H., Ordureau, A., Strickson, S., Arthur, J.S.C., Pedrioli, P.G.A., Komander, D., and Cohen, P. (2013). Activation of the canonical IKK complex by K63/M1-linked hybrid ubiquitin chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 15247–15252.
- Erhardt, S., Mellone, B.G., Betts, C.M., Zhang, W., Karpen, G.H., and Straight, A.F. (2008). Genome-wide analysis reveals a cell cycle-dependent mechanism controlling centromere propagation. *J. Cell Biol.* 183, 805–818.
- Fachinetti, D., Logsdon, G.A., Abdullah, A., Selzer, E.B., Cleveland, D.W., and Black, B.E. (2017). CENP-A Modifications on Ser68 and Lys124 Are Dispensable for Establishment, Maintenance, and Long-Term Function of Human Centromeres. *Dev. Cell* 40, 104–113.
- Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H., and Weissman, A.M. (2000). Mdm2 Is a RING Finger-dependent Ubiquitin Protein Ligase for Itself and p53. *J. Biol. Chem.* 275, 8945–8951.
- Feaver, W.J., Henry, N.L., Wang, Z., Wu, X., Svejstrup, J.Q., Bushnell, D.A., Friedberg, E.C., and Kornberg, R.D. (1997). Genes For Tfb2, Tfb3, and Tfb4 Subunits of Yeast Transcription/Repair Factor IIIH HOMOLOGY TO HUMAN CYCLIN-DEPENDENT KINASE ACTIVATING KINASE AND IIIH SUBUNITS. *J. Biol. Chem.* 272, 19319–19327.
- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448–453.
- Finley, D., Ciechanover, A., and Varshavsky, A. (1984). Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* 37, 43–55.
- Finley, D., Ozkaynak, E., and Varshavsky, A. (1987). The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* 48, 1035–1046.
- Finley, D., Bartel, B., and Varshavsky, A. (1989). The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* 338, 394–401.
- Fitzgerald-Hayes, M., Clarke, L., and Carbon, J. (1982). Nucleotide sequence comparisons and functional analysis of yeast centromere DNAs. *Cell* 29, 235–244.
- Foltz, D.R., Jansen, L.E.T., Bailey, A.O., Yates, J.R., Bassett, E.A., Wood, S., Black, B.E., and Cleveland, D.W. (2009). Centromere specific assembly of CENP-A nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* 137, 472–484.
- Furuyama, S., and Biggins, S. (2007). Centromere identity is specified by a single centromeric nucleosome in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14706–14711.

Bibliographie

- Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* *350*, 87–96.
- Gkikopoulos, T., Singh, V., Tsui, K., Awad, S., Renshaw, M.J., Scholfield, P., Barton, G.J., Nislow, C., Tanaka, T.U., and Owen-Hughes, T. (2011). The SWI/SNF complex acts to constrain distribution of the centromeric histone variant Cse4. *EMBO J.* *30*, 1919–1927.
- Gonzalez, M., He, H., Dong, Q., Sun, S., and Li, F. (2014). Ectopic Centromere Nucleation by CENP-A in Fission Yeast. *Genetics* *198*, 1433–1446.
- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 1062–1067.
- Haas, A.L., Warms, J.V., Hershko, A., and Rose, I.A. (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J. Biol. Chem.* *257*, 2543–2548.
- Haglund, K., and Dikic, I. (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J.* *24*, 3353–3359.
- Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P., and Dikic, I. (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat. Cell Biol.* *5*, 461–466.
- Haruki, H., Nishikawa, J., and Laemmli, U.K. (2008). The anchor-away technique: rapid, conditional establishment of yeast mutant phenotypes. *Mol. Cell* *31*, 925–932.
- Henikoff, S., Ahmad, K., Platero, J.S., and van Steensel, B. (2000). Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 716–721.
- Henikoff, S., Ramachandran, S., Krassovsky, K., Bryson, T.D., Codomo, C.A., Brogaard, K., Widom, J., Wang, J.-P., and Henikoff, J.G. (2014). The budding yeast Centromere DNA Element II wraps a stable Cse4 hemisome in either orientation in vivo. *ELife* *3*.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., and Rose, I.A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 1783–1786.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* *258*, 8206–8214.
- Hewawasam, G., Shivaraju, M., Mattingly, M., Venkatesh, S., Martin-Brown, S., Florens, L., Workman, J.L., and Gerton, J.L. (2010). Psh1 is an E3 ubiquitin ligase that targets the centromeric histone variant Cse4. *Mol. Cell* *40*, 444–454.
- Hewawasam, G.S., Mattingly, M., Venkatesh, S., Zhang, Y., Florens, L., Workman, J.L., and Gerton, J.L. (2014). Phosphorylation by casein kinase 2 facilitates Psh1 protein-assisted degradation of Cse4 protein. *J. Biol. Chem.* *289*, 29297–29309.

Bibliographie

- Hewawasam, G.S., Dhatchinamoorthy, K., Mattingly, M., Seidel, C., and Gerton, J.L. (2018). Chromatin assembly factor-1 (CAF-1) chaperone regulates Cse4 deposition into chromatin in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* *46*, 4440–4455.
- Hildebrand, E.M., and Biggins, S. (2016). Regulation of Budding Yeast CENP-A levels Prevents Misincorporation at Promoter Nucleosomes and Transcriptional Defects. *PLoS Genet.* *12*, e1005930.
- Hodge, C.D., Spyrapoulos, L., and Glover, J.N.M. (2016). Ubc13: the Lys63 ubiquitin chain building machine. *Oncotarget* *7*, 64471–64504.
- Hoffmann, G., Samel-Pommerenke, A., Weber, J., Cuomo, A., Bonaldi, T., and Ehrenhofer-Murray, A.E. (2018). A role for CENP-A/Cse4 phosphorylation on serine 33 in deposition at the centromere. *FEMS Yeast Res.* *18*.
- Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* *420*, 25–27.
- Hough, R., Pratt, G., and Rechsteiner, M. (1987). Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* *262*, 8303–8313.
- Huang, H., Sabari, B.R., Garcia, B.A., Allis, C.D., and Zhao, Y. (2014). SnapShot: Histone Modifications. *Cell* *159*, 458–458.e1.
- Huang, L., Kinnucan, E., Wang, G., Beaudenon, S., Howley, P.M., Huibregtse, J.M., and Pavletich, N.P. (1999). Structure of an E6AP-UbcH7 Complex: Insights into Ubiquitination by the E2-E3 Enzyme Cascade. *Science* *286*, 1321–1326.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P.M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 2563–2567.
- Hutchins, A.P., Liu, S., Diez, D., and Miranda-Saavedra, D. (2013). The Repertoires of Ubiquitinating and Deubiquitinating Enzymes in Eukaryotic Genomes. *Mol. Biol. Evol.* *30*, 1172–1187.
- Ichikawa, Y., Saitoh, N., and Kaufman, P.D. (2018). An asymmetric centromeric nucleosome. *ELife* *7*.
- Jackson, J.D., Falciano, V.T., and Gorovsky, M.A. (1996). A likely histone H2A.F/Z variant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 466–467.
- Jansen, L.E.T., Black, B.E., Foltz, D.R., and Cleveland, D.W. (2007). Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J. Cell Biol.* *176*, 795–805.
- Jentsch, S., McGrath, J.P., and Varshavsky, A. (1987). The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* *329*, 131–134.
- Johnson, E.S., and Blobel, G. (1997). Ubc9p Is the Conjugating Enzyme for the Ubiquitin-like Protein Smt3p. *J. Biol. Chem.* *272*, 26799–26802.

Bibliographie

- Kaiser, S.E., Riley, B.E., Shaler, T.A., Trevino, R.S., Becker, C.H., Schulman, H., and Kopito, R.R. (2011). Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools. *Nat. Methods* 8, 691–696.
- Karpen, G.H., and Allshire, R.C. (1997). The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet.* 13, 489–496.
- Kato, H., Jiang, J., Zhou, B.-R., Rozendaal, M., Feng, H., Ghirlando, R., Xiao, T.S., Straight, A.F., and Bai, Y. (2013). A Conserved Mechanism for Centromeric Nucleosome Recognition by Centromere Protein CENP-C. *Science* 340, 1110–1113.
- Khmelinskii, A., Keller, P.J., Bartosik, A., Meurer, M., Barry, J.D., Mardin, B.R., Kaufmann, A., Trautmann, S., Wachsmuth, M., Pereira, G., et al. (2012). Tandem fluorescent protein timers for in vivo analysis of protein dynamics. *Nat. Biotechnol.* 30, 708–714.
- Khmelinskii, A., Blaszczyk, E., Pantazopoulou, M., Fischer, B., Omnus, D.J., Le Dez, G., Brossard, A., Gunnarsson, A., Barry, J.D., Meurer, M., et al. (2014). Protein quality control at the inner nuclear membrane. *Nature* 516, 410–413.
- Khmelinskii, A., Meurer, M., Ho, C.-T., Besenbeck, B., Füller, J., Lemberg, M.K., Bukau, B., Mogk, A., and Knop, M. (2016). Incomplete proteasomal degradation of green fluorescent proteins in the context of tandem fluorescent protein timers. *Mol. Biol. Cell* 27, 360–370.
- Khoury, G.A., Baliban, R.C., and Floudas, C.A. (2011). Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci. Rep.* 1.
- Kim, J.-M., Seok, O.-H., Ju, S., Heo, J.-E., Yeom, J., Kim, D.-S., Yoo, J.-Y., Varshavsky, A., Lee, C., and Hwang, C.-S. (2018). Formyl-methionine as an N-degron of a eukaryotic N-end rule pathway. *Science* eaat0174.
- Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., et al. (2011). Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol. Cell* 44, 325–340.
- Kimura, H., and Cook, P.R. (2001). Kinetics of Core Histones in Living Human Cells. *J. Cell Biol.* 153, 1341–1354.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998). Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605–608.
- Kitagawa, K., Kotake, Y., and Kitagawa, M. (2009). Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products. *Cancer Sci.* 100, 1374–1381.
- Knezetic, J.A., and Luse, D.S. (1986). The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro. *Cell* 45, 95–104.
- Koch, B.A., Jin, H., Tomko Jr., R.J., and Yu, H.-G. (2019). The anaphase-promoting complex regulates the degradation of the inner nuclear membrane protein Mps3. *J. Cell Biol.*
- Komander, D., and Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 203–229.

Bibliographie

- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* *184*, 868–871.
- Krassovsky, K., Henikoff, J.G., and Henikoff, S. (2012). Tripartite organization of centromeric chromatin in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 243–248.
- Krogan, N.J., Kim, M., Ahn, S.H., Zhong, G., Kobor, M.S., Cagney, G., Emili, A., Shilatifard, A., Buratowski, S., and Greenblatt, J.F. (2002). RNA Polymerase II Elongation Factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a Targeted Proteomics Approach. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 6979–6992.
- Kulak, N.A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014). Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat. Methods* *11*, 319–324.
- Kus, B.M., Caldon, C.E., Andorn-Broza, R., and Edwards, A.M. (2004). Functional interaction of 13 yeast SCF complexes with a set of yeast E2 enzymes in vitro. *Proteins* *54*, 455–467.
- Lander, G.C., Estrin, E., Matyskiela, M.E., Bashore, C., Nogales, E., and Martin, A. (2012). Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* *482*, 186–191.
- Lecker, S.H., Solomon, V., Mitch, W.E., and Goldberg, A.L. (1999). Muscle Protein Breakdown and the Critical Role of the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *J. Nutr.* *129*, 227S–237S.
- Lee, I., and Schindelin, H. (2008). Structural Insights into E1-Catalyzed Ubiquitin Activation and Transfer to Conjugating Enzymes. *Cell* *134*, 268–278.
- Leidecker, O., Matic, I., Mahata, B., Pion, E., and Xirodimas, D.P. (2012). The ubiquitin E1 enzyme Ube1 mediates NEDD8 activation under diverse stress conditions. *Cell Cycle* *11*, 1142–1150.
- Li, M., Brooks, C.L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R., and Gu, W. (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* *302*, 1972–1975.
- Li, W., Bengtson, M.H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V.A., Orth, A., Chanda, S.K., Batalov, S., and Joazeiro, C.A.P. (2008). Genome-Wide and Functional Annotation of Human E3 Ubiquitin Ligases Identifies MULAN, a Mitochondrial E3 that Regulates the Organelle's Dynamics and Signaling. *PLoS ONE* *3*.
- Li, Y., Liu, X., Cao, X., Wang, L., and Zhu, M. (2007). [Expression of centromere protein A in hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* *36*, 175–178.
- Liakopoulos, D., Doenges, G., Matuschewski, K., and Jentsch, S. (1998). A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *EMBO J.* *17*, 2208–2214.
- Linares, L.K., Kiernan, R., Triboulet, R., Chable-Bessia, C., Latreille, D., Cuvier, O., Lacroix, M., Le Cam, L., Coux, O., and Benkirane, M. (2007). Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2. *Nat. Cell Biol.* *9*, 331–338.

Bibliographie

- Lomonte, P., Sullivan, K.F., and Everett, R.D. (2001). Degradation of nucleosome-associated centromeric histone H3-like protein CENP-A induced by herpes simplex virus type 1 protein ICP0. *J. Biol. Chem.* *276*, 5829–5835.
- Lu, Y., Lee, B., King, R.W., Finley, D., and Kirschner, M.W. (2015). Substrate degradation by the proteasome: a single-molecule kinetic analysis. *Science* *348*, 1250834.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251–260.
- Maehara, K., Takahashi, K., and Saitoh, S. (2010). CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 2090–2104.
- Mansour, W., Nakasone, M.A., von Delbrück, M., Yu, Z., Krutauz, D., Reis, N., Kleifeld, O., Sommer, T., Fushman, D., and Glickman, M.H. (2015). Disassembly of Lys11 and Mixed Linkage Polyubiquitin Conjugates Provides Insights into Function of Proteasomal Deubiquitinases Rpn11 and Ubp6. *J. Biol. Chem.* *290*, 4688–4704.
- Margottin, F., Bour, S.P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K., and Benarous, R. (1998). A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol. Cell* *1*, 565–574.
- McCullough, J., Row, P.E., Lorenzo, O., Doherty, M., Beynon, R., Clague, M.J., and Urbé, S. (2006). Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr. Biol. CB* *16*, 160–165.
- McGovern, S.L., Qi, Y., Pusztai, L., Symmans, W.F., and Buchholz, T.A. (2012). Centromere protein-A, an essential centromere protein, is a prognostic marker for relapse in estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* *14*, R72.
- McLean, J.R., Chaix, D., Ohi, M.D., and Gould, K.L. (2011). State of the APC/C: Organization, function, and structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *46*, 118–136.
- Meierhofer, D., Wang, X., Huang, L., and Kaiser, P. (2008). Quantitative Analysis of global Ubiquitination in HeLa Cells by Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* *7*, 4566–4576.
- Meluh, P.B., Yang, P., Glowczewski, L., Koshland, D., and Smith, M.M. (1998). Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* *94*, 607–613.
- Metzger, M.B., Scales, J.L., Dunklebarger, M.F., and Weissman, A.M. (2017). The Ubiquitin Ligase (E3) Psh1p Is Required for Proper Segregation of both Centromeric and Two-Micron Plasmids in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 GenesGenomesGenetics* *7*, 3731–3743.
- Meyer, H.-J., and Rape, M. (2014). Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains. *Cell* *157*, 910–921.
- Mishra, P.K., Guo, J., Dittman, L.E., Haase, J., Yeh, E., Bloom, K., and Basrai, M.A. (2015). Pat1 protects centromere-specific histone H3 variant Cse4 from Psh1-mediated ubiquitination. *Mol. Biol. Cell* *26*, 2067–2079.

Bibliographie

- Mizuguchi, G., Xiao, H., Wisniewski, J., Smith, M.M., and Wu, C. (2007). Nonhistone Scm3 and histones CenH3-H4 assemble the core of centromere-specific nucleosomes. *Cell* *129*, 1153–1164.
- Moreno-Moreno, O., Medina-Giró, S., Torras-Llort, M., and Azorín, F. (2011). The F Box Protein Partner of Paired Regulates Stability of *Drosophila* Centromeric Histone H3, CenH3CID. *Curr. Biol.* *21*, 1488–1493.
- Morey, L., Barnes, K., Chen, Y., Fitzgerald-Hayes, M., and Baker, R.E. (2004). The Histone Fold Domain of Cse4 Is Sufficient for CEN Targeting and Propagation of Active Centromeres in Budding Yeast. *Eukaryot. Cell* *3*, 1533–1543.
- Mouysset, J., Gilberto, S., Meier, M.G., Lampert, F., Belwal, M., Meraldi, P., and Peter, M. (2015). CRL4RBBP7 is required for efficient CENP-A deposition at centromeres. *J Cell Sci* *128*, 1732–1745.
- Nagpal, H., and Fukagawa, T. (2016). Kinetochore assembly and function through the cell cycle. *Chromosoma* *125*, 645–659.
- Nakagawa, T., and Nakayama, K. (2015). Protein monoubiquitylation: targets and diverse functions. *Genes Cells* *20*, 543–562.
- Niikura, Y., Kitagawa, R., Ogi, H., Abdulle, R., Pagala, V., and Kitagawa, K. (2015). CENP-A K124 Ubiquitylation Is Required for CENP-A Deposition at the Centromere. *Dev. Cell* *32*, 589–603.
- Niikura, Y., Kitagawa, R., and Kitagawa, K. (2017). CENP-A Ubiquitylation Is Required for CENP-A Deposition at the Centromere. *Dev. Cell* *40*, 7–8.
- Nijman, S.M.B., Luna-Vargas, M.P.A., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M.G., Sixma, T.K., and Bernards, R. (2005). A Genomic and Functional Inventory of Deubiquitinating Enzymes. *Cell* *123*, 773–786.
- O'Connor, H.F., Lyon, N., Leung, J.W., Agarwal, P., Swaim, C.D., Miller, K.M., and Huijbregtse, J.M. (2015). Ubiquitin-Activated Interaction Traps (UBAITs) identify E3 ligase binding partners. *EMBO Rep.* *16*, 1699–1712.
- Ohkuni, K., Abdulle, R., and Kitagawa, K. (2014). Degradation of centromeric histone H3 variant Cse4 requires the Fpr3 peptidyl-prolyl Cis-Trans isomerase. *Genetics* *196*, 1041–1045.
- Ohkuni, K., Takahashi, Y., Fulp, A., Lawrimore, J., Au, W.-C., Pasupala, N., Levy-Myers, R., Warren, J., Strunnikov, A., Baker, R.E., et al. (2016). SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase (STUbL) Slx5 regulates proteolysis of centromeric histone H3 variant Cse4 and prevents its mislocalization to euchromatin. *Mol. Biol. Cell*.
- Ohkuni, K., Levy-Myers, R., Warren, J., Au, W.-C., Takahashi, Y., Baker, R.E., and Basrai, M.A. (2018). N-terminal Sumoylation of Centromeric Histone H3 Variant Cse4 Regulates Its Proteolysis To Prevent Mislocalization to Non-centromeric Chromatin. *G3 GenesGenomesGenetics* *8*, 1215–1223.

Bibliographie

- Olsen, J.V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M.L., Jensen, L.J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T.S., Nigg, E.A., et al. (2010). Quantitative Phosphoproteomics Reveals Widespread Full Phosphorylation Site Occupancy During Mitosis. *Sci Signal* 3, ra3–ra3.
- Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 1, 376–386.
- Oudet, P., Gross-Bellard, M., and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4, 281–300.
- Özkan, E., Yu, H., and Deisenhofer, J. (2005). Mechanistic insight into the allosteric activation of a ubiquitin-conjugating enzyme by RING-type ubiquitin ligases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18890–18895.
- Özkaynak, E., Finley, D., and Varshavsky, A. (1984). The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature* 312, 663–666.
- Palmer, D.K., O’Day, K., Wener, M.H., Andrews, B.S., and Margolis, R.L. (1987). A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J. Cell Biol.* 104, 805–815.
- van de Pasch, L.A.L., Miles, A.J., Nijenhuis, W., Brabers, N.A.C.H., van Leenen, D., Lijnzaad, P., Brown, M.K., Ouellet, J., Barral, Y., Kops, G.J.P.L., et al. (2013). Centromere binding and a conserved role in chromosome stability for SUMO-dependent ubiquitin ligases. *PLoS One* 8, e65628.
- Pearson, C.G., Maddox, P.S., Salmon, E.D., and Bloom, K. (2001). Budding Yeast Chromosome Structure and Dynamics during Mitosis. *J. Cell Biol.* 152, 1255–1266.
- Pereg, Y., Liu, B.Y., O’Rourke, K.M., Sagolla, M., Dey, A., Komuves, L., French, D.M., and Dixit, V.M. (2010). Ubiquitin hydrolase Dub3 promotes oncogenic transformation by stabilizing Cdc25A. *Nat. Cell Biol.* 12, 400–406.
- Petroski, M.D. (2008). The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC Biochem.* 9, S7.
- Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 503–533.
- Popovic, D., Vucic, D., and Dikic, I. (2014). Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat. Med.* 20, 1242–1253.
- Ranjitkar, P., Press, M.O., Yi, X., Baker, R., MacCoss, M.J., and Biggins, S. (2010). An E3 ubiquitin ligase prevents ectopic localization of the centromeric histone H3 variant via the centromere targeting domain. *Mol. Cell* 40, 455–464.
- Reiley, W., Zhang, M., Wu, X., Granger, E., and Sun, S.-C. (2005). Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by I κ B kinase γ -dependent phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3886–3895.

Bibliographie

- Robzyk, K., Recht, J., and Osley, M.A. (2000). Rad6-Dependent Ubiquitination of Histone H2B in Yeast. *Science* 287, 501–504.
- Rodrigo-Brenni, M.C., and Morgan, D.O. (2007). Sequential E2s drive polyubiquitin chain assembly on APC targets. *Cell* 130, 127–139.
- Rodrigo-Brenni, M.C., Foster, S.A., and Morgan, D.O. (2010). Catalysis of Lysine 48-Specific Ubiquitin Chain Assembly by Residues in E2 and Ubiquitin. *Mol. Cell* 39, 548–559.
- Rosa, J.L. da, Holik, J., Green, E.M., Rando, O.J., and Kaufman, P.D. (2011). Overlapping Regulation of CenH3 Localization and Histone H3 Turnover by CAF-1 and HIR Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 187, 9–19.
- Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., and White, M.F. (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J. Biol. Chem.* 277, 42394–42398.
- Samel, A., Cuomo, A., Bonaldi, T., and Ehrenhofer-Murray, A.E. (2012). Methylation of CenH3 arginine 37 regulates kinetochore integrity and chromosome segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 9029–9034.
- Sart, D. du, Cancilla, M.R., Earle, E., Mao, J., Saffery, R., Tainton, K.M., Kalitsis, P., Martyn, J., Barry, A.E., and Choo, K.H.A. (1997). A functional neo-centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA. *Nat. Genet.* 16, 144–153.
- Schlesinger, D.H., Goldstein, G., and Niall, H.D. (1975). The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry* 14, 2214–2218.
- Schueler, M.G., Higgins, A.W., Rudd, M.K., Gustashaw, K., and Willard, H.F. (2001). Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* 294, 109–115.
- Schulman, B.A., and Harper, J.W. (2009). Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 319–331.
- Schwickart, M., Huang, X., Lill, J.R., Liu, J., Ferrando, R., French, D.M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., et al. (2010). Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 463, 103–107.
- Shaid, S., Brandts, C.H., Serve, H., and Dikic, I. (2013). Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ.* 20, 21–30.
- Sharp, J.A., Franco, A.A., Osley, M.A., and Kaufman, P.D. (2002). Chromatin assembly factor I and Hir proteins contribute to building functional kinetochores in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* 16, 85–100.
- Shelby, R.D., Vafa, O., and Sullivan, K.F. (1997). Assembly of CENP-A into Centromeric Chromatin Requires a Cooperative Array of Nucleosomal DNA Contact Sites. *J. Cell Biol.* 136, 501–513.

Bibliographie

- Shivaraju, M., Camahort, R., Mattingly, M., and Gerton, J.L. (2011). Scm3 Is a Centromeric Nucleosome Assembly Factor. *J. Biol. Chem.* *286*, 12016–12023.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.-M., Pazin, M.J., Davie, J.R., and Peterson, C.L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* *311*, 844–847.
- Singh, R.K., Gonzalez, M., Kabbaj, M.-H.M., and Gunjan, A. (2012). Novel E3 Ubiquitin Ligases That Regulate Histone Protein Levels in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* *7*.
- Smith, G.A., Tomlinson, D.C., Harrison, M.A., and Ponnambalam, S. (2016). Chapter Eight - Ubiquitin-Mediated Regulation of Cellular Responses to Vascular Endothelial Growth Factors. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, S.K. Shenoy, ed. (Academic Press), pp. 313–338.
- Smoly, I., Shemesh, N., Ziv-Ukelson, M., Ben-Zvi, A., and Yeager-Lotem, E. (2017). An Asymmetrically Balanced Organization of Kinases versus Phosphatases across Eukaryotes Determines Their Distinct Impacts. *PLOS Comput. Biol.* *13*, e1005221.
- Sommer, T., and Jentsch, S. (1993). A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* *365*, 176–179.
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L., and Finley, D. (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 1265–1273.
- Stevenson, L.F., Sparks, A., Allende-Vega, N., Xirodimas, D.P., Lane, D.P., and Saville, M.K. (2007). The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2. *EMBO J.* *26*, 976–986.
- Stoler, S., Keith, K.C., Curnick, K.E., and Fitzgerald-Hayes, M. (1995). A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev.* *9*, 573–586.
- Stoler, S., Rogers, K., Weitze, S., Morey, L., Fitzgerald-Hayes, M., and Baker, R.E. (2007). Scm3, an essential *Saccharomyces cerevisiae* centromere protein required for G2/M progression and Cse4 localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 10571–10576.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* *403*, 41–45.
- Sullivan, K.F., Hechenberger, M., and Masri, K. (1994). Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J. Cell Biol.* *127*, 581–592.
- Sung, P., Prakash, S., and Prakash, L. (1988). The RAD6 protein of *Saccharomyces cerevisiae* polyubiquitinates histones, and its acidic domain mediates this activity. *Genes Dev.* *2*, 1476–1485.
- Swaminathan, S., Amerik, A.Y., and Hochstrasser, M. (1999). The Doa4 Deubiquitinating Enzyme Is Required for Ubiquitin Homeostasis in Yeast. *Mol. Biol. Cell* *10*, 2583–2594.

Bibliographie

- Swatek, K.N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Res.* 26, 399–422.
- Tai, H.-C., Serrano-Pozo, A., Hashimoto, T., Frosch, M.P., Spires-Jones, T.L., and Hyman, B.T. (2012). The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. *Am. J. Pathol.* 181, 1426–1435.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19, 94–102.
- Tomonaga, T., Matsushita, K., Yamaguchi, S., Oohashi, T., Shimada, H., Ochiai, T., Yoda, K., and Nomura, F. (2003). Overexpression and Mistargeting of Centromere Protein-A in Human Primary Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 63, 3511–3516.
- Tong, A.H.Y., and Boone, C. (2007). 16 High-Throughput Strain Construction and Systematic Synthetic Lethal Screening in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Methods in Microbiology*, I. Stansfield, and M.J. Stark, eds. (Academic Press), pp. 369–707.
- Tsuchiya, H., Arai, N., Tanaka, K., and Saeki, Y. (2013). Cytoplasmic proteasomes are not indispensable for cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 436, 372–376.
- Vermaak, D., Hayden, H.S., and Henikoff, S. (2002). Centromere Targeting Element within the Histone Fold Domain of Cid. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7553–7561.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C.E., Wilkinson, K.D., and Cook, W.J. (1985). Three-dimensional structure of ubiquitin at 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 3582–3585.
- Vogelstein, B. (1990). Cancer. A deadly inheritance. *Nature* 348, 681–682.
- Wagner, S.A., Beli, P., Weinert, B.T., Nielsen, M.L., Cox, J., Mann, M., and Choudhary, C. (2011). A Proteome-wide, Quantitative Survey of In Vivo Ubiquitylation Sites Reveals Widespread Regulatory Roles. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 10.
- Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S., and Gatto, G.J. Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 7342–7372.
- Wenzel, D.M., Lissounov, A., Brzovic, P.S., and Klevit, R.E. (2011). UbcH7 reactivity profile reveals Parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature* 474, 105–108.
- Whitby, F.G., Xia, G., Pickart, C.M., and Hill, C.P. (1998). Crystal structure of the human ubiquitin-like protein NEDD8 and interactions with ubiquitin pathway enzymes. *J. Biol. Chem.* 273, 34983–34991.
- Wiederkehr, A., Avaro, S., Prescianotto-Baschong, C., Haguenaer-Tsapis, R., and Riezman, H. (2000). The F-Box Protein Rcy1p Is Involved in Endocytic Membrane Traffic and Recycling Out of an Early Endosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 149, 397–410.
- Wieland, G., Orthaus, S., Ohndorf, S., Diekmann, S., and Hemmerich, P. (2004). Functional complementation of human centromere protein A (CENP-A) by Cse4p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6620–6630.

Bibliographie

van Wijk, S.J.L., and Timmers, H.T.M. (2010). The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *24*, 981–993.

Winey, M., Mamay, C.L., O'Toole, E.T., Mastronarde, D.N., Giddings, T.H., McDonald, K.L., and McIntosh, J.R. (1995). Three-dimensional ultrastructural analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic spindle. *J. Cell Biol.* *129*, 1601–1615.

Wisniewski, J., Hajj, B., Chen, J., Mizuguchi, G., Xiao, H., Wei, D., Dahan, M., and Wu, C. (2014). Imaging the fate of histone Cse4 reveals de novo replacement in S phase and subsequent stable residence at centromeres. *ELife* *3*, e02203.

Wu, Q., Qian, Y.M., Zhao, X.L., Wang, S.M., Feng, X.J., Chen, X.F., and Zhang, S.H. (2012). Expression and prognostic significance of centromere protein A in human lung adenocarcinoma. *Lung Cancer Amst. Neth.* *77*, 407–414.

Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., and Peng, J. (2009). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* *137*, 133–145.

Yao, T., and Cohen, R.E. (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* *419*, 403–407.

Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., and Yu, X.-F. (2003). Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* *302*, 1056–1060.

Titre : Décryptage des mécanismes d'ubiquitylation régulant l'histone centromérique CenH3 chez *Saccharomyces cerevisiae*

Mots clés : Ségrégation chromosomique, centromère, CenH3, ubiquitylation, enzymes E2 / E3

Résumé :

L'ubiquitylation consiste en l'attachement covalent de l'ubiquitine sur d'autres protéines. Ce processus fait intervenir successivement trois familles d'enzymes : d'activation (E1s), de conjugaison (E2s) et de ligation (E3s) de l'ubiquitine.

Lors de ma thèse, je m'intéresse au réseau d'enzymes d'ubiquitylation qui régule Cse4, l'histone variant localisée spécifiquement au centromère. Cse4 est une protéine essentielle qui permet une ségrégation correcte des chromosomes. Lorsqu'elle est trop exprimée, Cse4 peut se localiser sur la chromatine non-centromérique ce qui entraîne une instabilité génétique observée dans de nombreux cancers.

Chez la levure, l'ubiquitylation empêche cette mauvaise localisation en menant à la dégradation de Cse4, mais les mécanismes précis ne sont pas connus et les données ont été obtenues en surexprimant Cse4. Notre hypothèse est que chez la levure, Cse4 endogène pourrait être régulée différemment grâce à plusieurs couples d'enzymes E2/E3.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse est de réaliser une étude détaillée du réseau d'enzymes impliqué dans l'ubiquitylation de Cse4 exprimée de façon endogène afin de mieux comprendre sa régulation. Nous avons pu notamment mettre en évidence une variation de l'ubiquitylation de Cse4 au cours de la phase S dépendant de l'E3 Psh1.

Title : Deciphering the ubiquitylation mechanisms that regulate the centromeric histone CenH3 in *Saccharomyces cerevisiae*

Keywords : Chromosomal segregation, centromere, CenH3, ubiquitylation, E2 / E3 enzymes

Abstract :

Ubiquitylation consists of the covalent attachment of ubiquitin to other proteins. This process successively involves three families of enzymes: activation (E1s), conjugation (E2s) and ligation (E3s) enzymes.

In my thesis, I am interested in the ubiquitylation network that regulates endogenous Cse4, the variant histone specifically located at the centromere. Cse4 is an essential protein that allows proper segregation of chromosomes. When Cse4 is over-expressed, it can localize on non-centromeric chromatin resulting in genetic instability observed in many cancers.

In budding yeast, ubiquitylation prevents mislocalisation of Cse4 by leading to its degradation, but precise mechanisms are not known and data were obtained by overexpressing Cse4. Our hypothesis is that in yeast, endogenous Cse4 could be regulated differently thanks to several pairs of E2 / E3 enzymes. In this context, the goal of my thesis is to carry out a detailed study of the network of enzymes involved in endogenously expressed Cse4 ubiquitylation in order to better understand its regulation. In particular, we have been able to show a variation of the ubiquitylation during S phase dependent of the E3 Psh1.