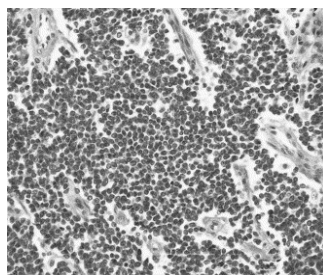


COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE  
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE  
FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBLoux

**Etude fonctionnelle d'un oncogène humain impliqué dans le  
Sarcome d'Ewing, *oncTre210*, homologue à deux gènes levuriens,  
*MSB3* et *MSB4***

Christophe DECHAMPS

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade  
de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique



Promoteurs: Pr Micheline VANDENBOL et Pr Daniel PORTETELLE

2009



**Dechamps Christophe (2008).** Etude fonctionnelle d'un oncogène humain impliqué dans le Sarcome d'Ewing, *oncTre210*, homologue à deux gènes levuriens, *MSB3* et *MSB4* (thèse de doctorat). Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, 173 p., 12 tabl., 40 fig.

**Résumé :** Le produit de l'oncogène humain *oncTre210* est apparenté, par sa structure primaire, aux protéines Ypt/Rab GAP (*GTPase Activating Proteins* spécifiques des Ypt/Rab GTPases). En effet, sa région N-terminale, qui est fortement homologue aux deux GAP de *Saccharomyces cerevisiae* Msb3p et Msb4p, renferme le domaine catalytique TBC, hautement conservé, des Ypt/Rab GAP. Les protéines Msb3p et Msb4p de *Saccharomyces cerevisiae* font partie de la famille des GTPase activating protein (GAP) spécifique aux Ypt/Rab GTPase. Elles sont primordiales au trafic vésiculaire et sont impliquées dans la régulation de l'exocytose et dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Mais, leurs rôles biologiques exacts n'ont jamais été déterminés. La délétion simultanée des 2 gènes *MSB3* et *MSB4* dans la levure *S. cerevisiae* induit une inhibition de croissance de la levure sur un milieu de culture contenant du DMSO et/ou de la caféine, perturbe l'organisation du cytosquelette d'actine, produit une anomalie de bourgeonnement dans la levure diploïde et affecte la ségrégation des noyaux. Pour trouver des composants qui interagissent génétiquement avec les produits des gènes *MSB3* et *MSB4*, nous avons criblé une banque génomique pour des suppresseurs homologues extragéniques multicopies restaurant la croissance du double mutant levurien *msb3 msb4* en présence de DMSO et/ou de caféine. Sept gènes ont ainsi été identifiés après une série de vérifications. Ces 7 suppresseurs peuvent être classés pour la fonction biologique de leurs produits en plusieurs classes : transport vésiculaire, cycle cellulaire, chaperon moléculaire, protéasome et ARN ribosomal. Ces résultats nous permettent d'identifier les voies physiologiques où les deux protéines Msb3p et Msb4p seraient impliquées. Le produit de l'oncogène *oncTre210* est impliqué dans différents cancers humains dont le sarcome d'Ewing. Pour l'étude des partenaires interagissant avec l'une ou l'autre des deux parties de la protéine de fusion *oncTre210p*, nous avons utilisé le système double-hybride en levure en utilisant différentes banques d'expression. Un grand nombre de partenaires protéiques a été isolé comme interagissant avec l'oncoprotéine. Deux protéines impliquées dans l'organisation et la structure du cytosquelette ont été choisies parmi les partenaires de l'oncoprotéine pour être étudiées. L'interaction de ces deux protéines avec la partie GAP de *oncTre210p* a été confirmée par les techniques de GST pulldown, de co-immunoprécipitation et de co-localisation. Ces protéines identifiées comme interagissant avec la partie GAP sont la chaîne légère régulatrice de la myosine II (Myl2) et LOC91256, protéine contenant des motifs ankyrine. A partir de ces observations un nouveau rôle de l'oncoprotéine *oncTre210p* a été suggéré. L'ensemble de nos résultats ainsi que des données expérimentales acquises par d'autres équipes internationales nous a permis de proposer un modèle d'action pour l'oncoprotéine *oncTre210p*.

---

**Dechamps Christophe (2008).** Functional study of an oncogene implicated in Ewing's sarcoma, *oncTre210*, a human homologue of two yeast genes, *MSB3* and *MSB4* (Thesis in French). Gembloux, Belgium, Gembloux Agricultural University, 173 p., 12 tabl., 40 fig.

**Summary :** The *oncTre210* oncogene product is structurally related to the Ypt/Rab GTPase-Activating Proteins (Ypt/Rab GAPs). Particularly, the N-terminal region of the oncoprotein shares with the yeast proteins Msb3p and Msb4p the highly conserved TBC domain, forming the catalytically active domain of Ypt/Rab GAPs. The Msb3p and Msb4p proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the Ypt/Rab-specific GTPase activating protein (GAP) family. They are important to vesicular trafficking and involved in the regulation of exocytosis and in the organization of the actin cytoskeleton, but their exact biological roles have yet to be determined. The *msb3 msb4* yeast double mutation causes growth inhibition in the presence of DMSO and/or caffeine, affects the organization of the actin cytoskeleton, produces a random budding pattern in diploid cells, and affects segregation of the nucleus. To find cell components that interact genetically with the products of the *MSB3* and *MSB4* genes, we screened a genomic library for multicopy suppressor genes restoring normal growth of the double mutant in the presence of DMSO and caffeine. Six genes were identified, and the extent to which each gene corrects specific growth defects of the *msb3 msb4* mutant is described. The encoded suppressors were classified on the basis of functional features into five groups: vesicular transport, cell division, molecular chaperon, proteasome and ribosomal RNA. These results allow us to identify the physiologic ways where the Msb3p and Msb4p proteins are implicated. The product of the *oncTre210* oncogene is involved in various human cancers, including Ewing's sarcoma. In order to identify proteins interacting with the two parts of this protein, we performed yeast two-hybrid screening of various libraries. A large number of proteins was identified to be partners of the oncogene product. Two components of the cytoskeleton were chosen to be studied, whose interaction with the GAP region was confirmed by GST-pulldown, co-immunoprecipitation, and colocalisation experiments. The proteins found to interact with the GAP region are the light regulatory chain of myosin II (Myl2) and LOC91256, a protein containing ankyrin repeats. From these observations a new role for the *oncTre210p* oncoprotein in cytokinesis was suggested. Our results and data from other international teams allow us to propose a model for the action of the *oncTre210* oncogene product.

---

**Copyright.** Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et des modifications ultérieures.



# REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail de doctorat réalisé au sein de l'Unité de Biologie animale et microbienne de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux et financé par une bourse FNRS-Télévie, je tiens tout d'abord à remercier mes promoteurs, le Professeur Daniel Portetelle et le Docteur Micheline Vandebol, pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe.

Pour ses conseils précieux et sa patience, je tiens à remercier le Professeur Daniel Portetelle. C'est une personne que j'estime énormément.

Que le Professeur Micheline Vandebol trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour tout ce qu'elle a pu faire pour moi durant ces longues années. Son enthousiasme, ses nombreux conseils, sa patience et sa disponibilité m'ont permis de m'enrichir que ce soit au point de vue professionnel qu'humain.

Pour leur accueil, je ne peux oublier le Docteur Marc Vidal et le Docteur Chistopher Armstrong, qui m'ont permis de vivre une grande expérience dans leur laboratoire aux Etats-Unis.

J'exprime ma gratitude envers les professeurs Richard Kettman et Jean Vandehaute pour avoir accepté le rôle de rapporteur de cette thèse ainsi que pour leurs remarques permettant d'enrichir le texte.

Je remercie également Séverine et Caroline pour leur investissement dans ce travail.

Je voudrais aussi remercier Jean-Claude et Franck pour leur expertise et leurs conseils dans les domaines de la culture des cellules de mammifères et la microscopie confocale.

Je songe également à Christelle, Anne-lise, "Martin", "Nuts", Aurore, Jean-Marc, Julien, "Maître" Michel et "Fred" qui ont réussi à me supporter durant ces longues années. Je garderai toujours un très bon souvenir de cette période importante de ma vie. J'espère que nous ne couperons pas les liens forts que nous avons tissés durant toutes ces années.

Je n'oublie pas ma famille, mes amis, ma femme et mes deux enfants pour le soutien et la joie qu'ils m'ont apportés tout au long de ce travail.

Enfin, je tiens à remercier le Professeur Arsène Burny pour son enthousiasme et pour m'avoir donné l'amour de la science dès ma première année à Gembloux.

Cette thèse n'aurait certainement pas vu le jour sans votre aide.  
Merci.

Christophe.

# Table des Matières

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>1</b>
<b>I. Introduction : de la levure à l'homme</b>	<b>3</b>
<b>II. Des GAPs aux tumeurs</b>	<b>5</b>
1. Les GAPs (GTPase Activating Proteins) et le cycle des GTPases	5
2. L'implication d'un dérèglement du cycle des GTPases dans la tumorigénicité	10
a) Le cancer	11
b) Le dérèglement du cycle des GTPases et la tumorigénèse	13
<b>III. Le sarcome d'Ewing</b>	<b>15</b>
1. Le sarcome d'Ewing	15
2. L'oncogène Tre2	16
3. L'oncoprotéine oncTre210p	18
4. Le domaine GAP	19
<b>IV. Le cytosquelette d'actine</b>	<b>24</b>
1. Introduction	24
2. L'actine	25
3. La myosine	32
4. La chaîne légère régulatrice de la myosine	35
a) Régulation de la chaîne légère de la myosine	35
b) Régulation de Myl dans la cytokinèse	37
5. Conclusions	38
<b>PRESENTATION DU SUJET</b>	<b>40</b>
<b>ETUDES DES INTERACTIONS GENETIQUES DE MSB3P ET MSB4P</b>	<b>44</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>46</b>
<b>II. Isolement des supresseurs homologues extragéniques multicopies</b>	<b>47</b>
1. Criblage de la banque génomique pour des supresseurs multicopies	47
<b>III. Observation des corrections des autres phénotypes associés à la double mutation</b>	<b>51</b>
1. Introduction	51

2.	Morphologie des cellules et organisation du noyau	51
3.	Organisation du cytosquelette d'actine	52
4.	Sensibilité au cadmium	54
<b>IV.</b>	<b>Présentation des supresseurs</b>	<b>56</b>
1.	Classe : Trafic vésiculaire (3 candidats)	56
2.	Classe : Cycle cellulaire (1 candidat)	58
3.	Classe : Chaperon moléculaire (1 candidat)	59
4.	Classe : Protéasome (1 candidat)	60
5.	Classe : ARN ribosomal (1 candidat)	61
<b>V.</b>	<b>Conclusions</b>	<b>63</b>
 <b>ETUDE DES PARTENAIRES PROTEIQUES DE ONCTRE210P</b>		 <b>65</b>
<b>I.</b>	<b>Introduction</b>	<b>67</b>
<b>II.</b>	<b>Recherche des partenaires potentiels des domaines Tre-GAP et Tre-REN-60 de oncTre210p avec les différentes banques d'ADNc selon la première approche</b>	<b>68</b>
1.	Principe de l'approche	68
2.	Efficacité de conjugaison et nombre total de cellules criblées	68
3.	Nombre de clones positifs après criblage	69
4.	Elimination des partenaires pouvant activer seuls la transcription des gènes rapporteurs	70
5.	Identification des partenaires protéiques potentiels	70
<b>III.</b>	<b>Recherche des partenaires potentiels des parties GAP et REN-60 de oncTre210p avec les différentes banques d'ADNc selon la seconde approche</b>	<b>72</b>
1.	Principe de l'approche	72
2.	Efficacité de la transformation de la levure avec la banque	72
3.	Nombre de clones positifs	73
4.	Identification des partenaires protéiques potentiels	75
5.	Evaluation des intensités d'interaction des partenaires protéiques potentiels	84
<b>IV.</b>	<b>Etude de deux partenaires interagissant avec Tre-GAP : Myl2 et Loc91256</b>	<b>89</b>
1.	Introduction	89
2.	Vérification des interactions par GST pulldown	89
3.	Vérification des interactions par co-immunoprécipitation	91
4.	Vérification des interactions par co-localisation	92
<b>V.</b>	<b>Conclusions</b>	<b>95</b>
 <b>CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES</b>		 <b>97</b>

<b>I.</b>	<b>Conclusions générales</b>	<b>98</b>
<b>II.</b>	<b>Fonctions biologiques de MSB3 et MSB4</b>	<b>99</b>
<b>III.</b>	<b>Tre-2 et le cytosquelette</b>	<b>104</b>
<b>IV.</b>	<b>Mot de la fin</b>	<b>110</b>
	<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>112</b>
<b>I.</b>	<b>Présentation des souches levuriennes et bactériennes utilisées</b>	<b>114</b>
<b>II.</b>	<b>Présentation des cellules de mammifères utilisées et milieu de culture</b>	<b>116</b>
<b>III.</b>	<b>Présentation des vecteurs utilisés</b>	<b>117</b>
<b>IV.</b>	<b>Composition des milieux de culture pour bactérie et levure</b>	<b>122</b>
1.	Milieux de culture pour bactérie	122
2.	Milieux de culture pour levure	122
a)	Milieu riche	122
b)	Milieu minimum	122
c)	Dropout (DO)	122
d)	L'ajout en acide aminé et autres éléments nutritifs	123
e)	L'ajout d'antibiotique	123
f)	L'ajout de 3-AT	123
g)	L'ajout de 5FOA	124
h)	L'ajout de 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside (X- $\alpha$ -gal)	124
<b>V.</b>	<b>Oligonucléotides</b>	<b>125</b>
<b>VI.</b>	<b>Méthodes relatives aux manipulations d'acides nucléiques</b>	<b>130</b>
1.	Extraction d'ADN plasmidique	130
2.	Extraction d'ADN total de levure	130
3.	Transformation des cellules de bactérie	131
4.	Transformation des cellules de levure	131
5.	Transfection des cellules HEK293	131
a)	Préparation des cellules	131
b)	Transfection des cellules	132
c)	Récolte et lyse des cellules (à froid)	132
6.	Transfection des cellules HeLa pour observation au microscope	132
7.	Restriction des fragments d'ADN	133
8.	Marqueur de poids moléculaire	133
9.	Purification de fragments d'ADN	133



10.	Traitement à la phosphatase alcaline	133
11.	Ligation	133
12.	Amplification de fragments d'ADN par PCR	134
13.	Séquençage de fragments d'ADN	134
14.	Technique Gateway pour la construction d'un plasmide cible pour le double-hybride en levure	134
a)	Principe du système Gateway	134
b)	Préparation des séquences Tre-GAP et Tre-REN-60	136
c)	Réaction BP	136
d)	Réaction LR	136
<b>VII.</b>	<b>Méthodes relatives aux manipulations des protéines</b>	<b>137</b>
1.	Séparation des protéines sur gel SDS-Page	137
2.	Détection des protéines par coloration au bleu de Coomassie	137
3.	Détection des protéines par Western blot	137
<b>VIII.</b>	<b>Technique du double-hybride en levure</b>	<b>138</b>
<b>IX.</b>	<b>Construction de la banque d'ADN génomique du double mutant haploïde YNL2b</b>	<b>139</b>
1.	Extraction de l'ADN génomique du double mutant haploïde	139
a)	Culture Cellulaire	139
b)	Formation des protoplastes	139
c)	Lyse des protoplastes	139
d)	Précipitation des protéines et débris cellulaires	140
e)	Précipitation et purification de l'ADN	140
2.	Traitement de l'ADN génomique du double mutant haploïde	140
a)	Restriction de l'ADNg par Sau3AI	140
3.	Ligation des fragments d'ADNg dans le vecteur YEp356 et transformation en bactéries	141
<b>X.</b>	<b>Recherche de supresseurs homologues</b>	<b>142</b>
1.	Transformation de la levure doublement mutée diploïde avec la banque génomique	142
a)	Préparation des cellules de levures compétentes	142
b)	Electroporation	142
c)	Sélection des levures FyBLT3-YN transformées par la banque	143
2.	Criblage des levures transformées	143
3.	Isolement des plasmides induisant un effet supresseur	143
4.	Analyse phénotypique de l'effet de suppression	144
5.	Identification des protéines supresseurs	144
<b>XI.</b>	<b>Marquage fluorescent et analyses microscopiques</b>	<b>145</b>
1.	Marquage de l'actine en levure avec du ALEXA Fluor 488 phalloïdine	145
2.	Marquage de l'ADN de levure au DAPI	145
3.	Microscopie à fluorescence	145

<b>XII. Méthodes d'identification de complexe formé par les protéines partenaires</b>	<b>146</b>
1. Description de la technique du GST pulldown	146
2. Description de la technique de co-immunoprécipitation	146
<b>XIII. Outils informatiques</b>	<b>148</b>
<b>TRAVAUX PUBLIÉS DANS LE CADRE DU DOCTORAT</b>	<b>150</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>155</b>

## Abréviations

3-AT	3-amino-triazol
5FOA	5-fluoro-orotique
A	Ampère
aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	adénosine triphosphate
b	base
BSA	Bovine serum albumin
CGP	Conclusions générales et perspectives
Da	Dalton
DAPI	4', 6-diamidino-2-phénylindole dihydrochloride
DAPK	death-associated protein kinase
DMF	Diméthylformamide
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (acide éthylène diamine tétra-acétique)
EGF	Epidermal growth factor (facteur de croissance épithélial)
EIG	Etudes des interactions génétiques
EPP	Etudes des partenaires protéiques
g	Gramme
GAP	GTPase Activating Protein (protéine activatrice de GTPase)
GDF	GDI dissociation factor (facteur dissociant le GDI de la GTPase)
GDI	Guanine dissociation inhibitor (inhibiteur de la dissociation des nucléotides guanylés)
GDP	guanosine 5'-diphosphate
GEF	Guanine exchange factor (facteur d'échange GDP/GTP)
GFP	Green Fluorescent Protein
GGTase	geranyl-geranyl-transferase
GST	Glutathione S-transferase
GTP	guanosine 5'-triphosphate
GTPase	guanosine triphosphatase
h	heure
HBS	Hepes buffer solution
HSP	Heat shock proteins
IB	Introduction bibliographique
ILK	Integrin-linked kinase
IPLS	Tamponde lyse cellulaire
IPTG	isopropyl- $\beta$ - D-galactopyranoside
L	Litre
LB	Luria Bertani medium (milieu riche pour bactéries)
M	molaire (moles/litre)
Mam	Milieu minimum ammonium
MAP	Mitogen-Activated Protein

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
min	Minute
MLCK	Myosin Light Chain Kinase
MT	Matériel et méthodes
Myl	Myosin light chaîne
MYP	Myosin phosphatase
MYPT1	Myosin phosphatase targeting subunit 1
MSB	Multicopy Suppressor of Bud emergence mutant
NPC	Nuclear pore complex
ORF	Open reading Frame (phase ouverte de lecture)
PAK	p21-activated kinase
pb	paire de bases
PBS	Phosphate buffer solution
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentiel hydrogène
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PRC17	Prostate cancer gene 17
RAC	Ribosome-associated complex
RBD	Receptor Binding Domain
REP	Rab escort protein
rpm	revolutions per minute (tours par minute)
RN-tre	Related to the N-terminal of tre
ROCK	Rho kinase
s	seconde
SAP	Sit4p-associated proteins
SCF	Skp1p - Cullin - F-box protein
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDSPAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TBC	domaine conservé qui est notamment présent dans les produits des gènes : Tre2 BUB2 CDC16
TBST	Tampon contenant du Tris-HCl, du NaCl et du tween 20
TE	Tampon tris EDTA
Tre	Transfection recombined DNA molecules
Tre-GAP	Partie "GAP" de oncTre210p
Tre-REN-60	Partie "REN-60" de oncTre210p
V	Volt
WT	Wild Type (type sauvage)
X- $\alpha$ -gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose medium (milieu riche pour levures)

### Codes 1 lettre et 3 lettres des acides aminés

A	Ala	alanine	M	Met	méthionine
C	Cys	cystéine	N	Asn	asparagine
D	Asp	acide aspartique	P	Pro	proline
E	Glu	acide glutamique	Q	Gln	glutamine
F	Phe	phénylalanine	R	Arg	arginine
G	Gly	glycine	S	Ser	sérine
H	His	histidine	T	Thr	thréonine
I	Ile	isoleucine	V	Val	valine
K	Lys	lysine	W	Trp	tryptophane
L	Leu	leucine	Y	Tyr	tyrosine



**INTRODUCTION**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**





## ***I. Introduction : de la levure à l'homme***

---

La levure, *Saccharomyces cerevisiae*, est depuis plusieurs millénaires exploitée par l'homme pour sa capacité de fermentation dans beaucoup d'applications aussi quotidiennes que la production du pain, de la bière et du fromage. Ce micro-organisme, utilisé dans l'industrie, est aussi l'objet d'un très grand intérêt dans le milieu scientifique. En effet, en 1996, son génome a pu être complètement séquencé, ce qui a été une grande avancée scientifique dans ce domaine car la levure fut alors le premier organisme eucaryote dont le matériel génétique était totalement séquencé. Un travail colossal qui a permis de décrypter plus de 12 millions de paires de bases représentant quelques 6000 gènes. Environ 40 % des protéines du protéome levurien présentent une séquence en acides aminés offrant une certaine homologie avec celle des protéines humaines. La levure constitue ainsi un modèle expérimental puissant permettant l'étude de gènes de fonctions inconnues, des cellules eucaryotes supérieures. De cette manière, la levure ouvre un grand nombre de perspectives intéressantes pour la compréhension de certaines maladies, tels que les cancers, impliquant des gènes particuliers pouvant avoir une homologie avec des gènes levuriens. C'est un organisme dans lequel la fonction d'un ensemble de gènes conservés dans tous les eucaryotes est en cours d'étude par utilisation des nouvelles technologies de la génomique et post-génomique.

En plus d'être un organisme modèle, la levure constitue un véritable tube à essai. En effet, en 1989, Fields et Song ont mis au point une technique, appelée le double hybride, qui étudie les interactions entre protéines et cela dans la cellule de levure. L'identification de partenaires protéiques d'une protéine de fonction inconnue permet de mieux comprendre son rôle, sa fonction et de connaître la voie physiologique où elle intervient.

L'utilisation de la levure comme modèle est fréquent. C'est en 1987, que l'équipe de Nurse a isolé pour la première fois un homologue humain par complémentation en fonction et en structure d'un mutant levurien (Lee, M.G. et Nurse, P., 1987). Il s'agit du mutant *cdc2* impliqué au point START de la division cellulaire. Par ailleurs, le laboratoire de Biochimie physiologique de l'Université catholique de Louvain-la-Neuve emploie la levure pour étudier des maladies humaines et certaines fonctions cellulaires dont les processus se localisent au niveau mitochondrial (Foury, F. et Kucej, M., 2002 ; Foury, F., 1997 ; Lecrenier, N. *et al.*, 1997). De même, au sein de l'Unité de Biologie animale et microbienne de la Faculté des

Sciences Agronomiques de Gembloux (FUSAGx), l'étude de l'oncogène humain (*oncTpe210*) passe par deux homologues chez la levure (*MSB3* et *MSB4*) (Bach, S. *et al.*, 2000 ; Bizimungu, C., 2001 ; Bizimungu, C., 2002 ; Bizimungu, C. et Vandebol M., 2005). Dans ces laboratoires, l'optique est d'étudier un ou des homologues de gènes humains dans la levure, un organisme simple et plus facile à manipuler que des cellules humaines.

## II. Des GAPs aux tumeurs

### 1. Les GAPs (GTPase Activating Proteins) et le cycle des GTPases

Les GTPases qui catalysent l'hydrolyse du GTP en GDP peuvent se retrouver sous deux formes : une forme active où elles sont liées au GTP et une forme inactive liant du GDP. C'est sous sa forme active que la GTPase engendre son effet biologique en agissant sur ses effecteurs. L'hydrolyse du GTP en GDP régénère la forme inactive. Le cycle des GTPases (voir figure IB-1) est régulé par différentes protéines : les GAPs (GTPase Activating Protein) et les GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factor). L'hydrolyse du GTP par la GTPase est très lente, mais peut-être accélérée d'un facteur  $10^6$  via une GAP. Le GDP est ensuite dissocié de la GTPase pour être remplacé par du GTP. Cette étape, comme la précédente, est très lente mais peut être accélérée grâce à l'action d'une protéine GEF.

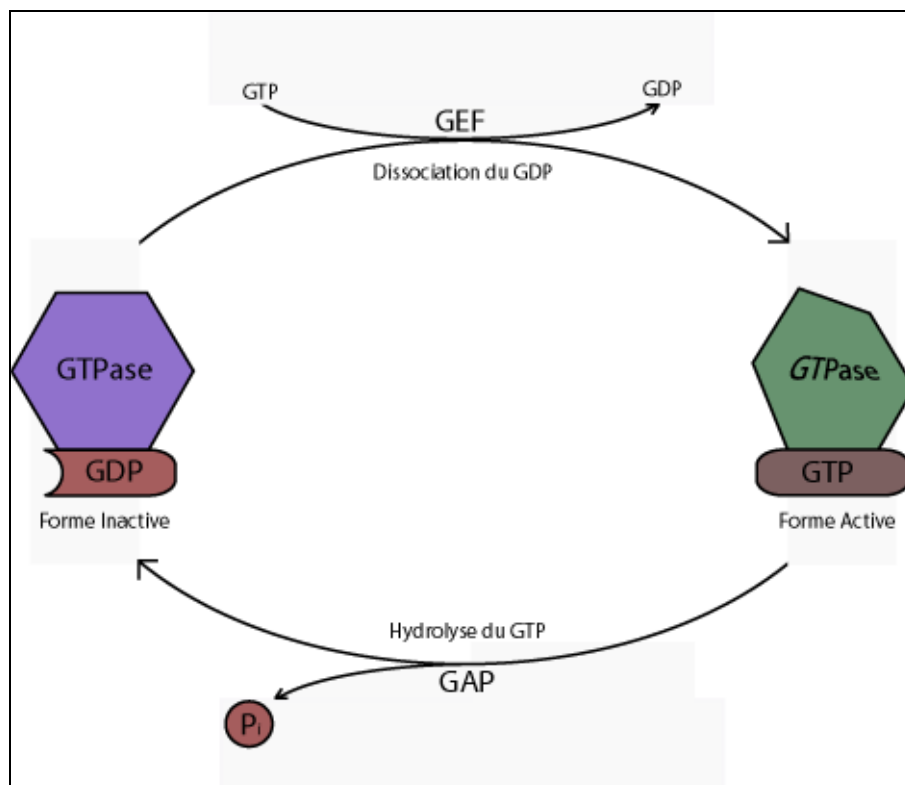


Figure IB-1 : Cycle des GTPases. Activation de la GTPase par dissociation du GDP par l'intermédiaire d'une GEF et hydrolyse du GTP en présence d'une GAP.

Les GAPs sont classées selon la GTPase sur laquelle elles agissent : les protéines G (forme hétérotrimérique) et les protéines similaires Ras (forme monomérique). Cette dernière

superfamille comprend 154 membres chez l'homme et peut être divisée en familles : les protéines Ras, Rho, Rab, Arf, Ran (Wennerberg, K. *et al.*, 2005).

La famille Ras (Bos, J.L., 2000) : Les protéines Ras contrôlent la transduction de signaux d'un récepteur sur la surface cellulaire vers une cible intracellulaire. Les RasGTPases ont pris de l'importance dans les années 1980 avec la découverte que 15% des tumeurs contenaient un point de mutation dans un des gènes *Ras*. Cette mutation maintient la GTPase sous sa forme active et devient incapable d'hydrolyser le GTP. Les Ras ont conservé fortement leur structure et leur fonction durant l'évolution.

La famille Rho (Ridley, A.J., 2000) : Les protéines Rho ont été identifiées pour la première fois en 1985, elles peuvent induire des changements de morphologie dans des cultures de tissus cellulaires de mammifères et interviennent dans la régulation du cytosquelette d'actine dans les cellules eucaryotes. De plus, nous remarquons qu'elles participent à l'activation du complexe enzymatique NADPH oxydase chez les cellules phagocytaires et à la cascade MAPK. Elles régulent aussi des facteurs de transcription, la sécrétion, l'endocytose, la polarité cellulaire et le cycle cellulaire. Enfin, elles jouent un rôle crucial dans le développement des organismes multicellulaires.

La famille Rab (Collins, R.N. et Brennwald, P., 2000) : Cette famille est un groupe de petites protéines monomériques liant le GTP, proche des Ras. Ces protéines interviennent dans le transport vésiculaire, du bourgeonnement à la fusion membranaire avec le compartiment de destination. Il apparaît que les composants de cette machinerie, tels que les RabGTPases, sont conservés dans toutes les cellules eucaryotes.

La famille Arf (Roth, M.G., 2000) : ADP-riboseylation factor. Chez la levure, elles interviennent dans les fonctions de sécrétion et dans la croissance végétative. Chez les mammifères, elles régulent une variété de processus liés au transport membranaire. Elles ont d'autres fonctions comme l'activation de l'enzyme phospholipase D, la régulation du cytosquelette d'actine et l'implication dans l'assemblage des vésicules liées au COPII (pour le transport membranaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi).

La famille Ran (Macara, I.G. *et al.*, 2000) : Les Ran, qui ne subissent pas de modifications post-traductionnelles, sont concentrées dans le nucléoplasme et y jouent un rôle dans le transport actif nucléocytoplasmique à travers les NPC (nuclear pore complex).

De plus, d'autres protéines régulent ce cycle : ce sont les GDI (Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor) et les GDF (GDI Dissociation Factor). La première inhibe la dissociation du GDP en se fixant sur le complexe protéique, tandis que la deuxième dégage le GDI de cette association.

Le GDI a une fonction importante dans certains phénomènes biologiques. C'est par exemple le cas pour les RabGTPases qui sont impliquées dans le transport vésiculaire entre compartiments cellulaires (voir figure IB-2). Ces RabGTPases sont régulées par des protéines déjà citées (GAP et GEF) mais aussi par des GDI et GDF. Le GDI permet le transport de la forme inactive de la RabGTPase, fixée à la membrane cible du compartiment accepteur où une vésicule a fusionné grâce à l'hydrolyse du GTP, vers la membrane du compartiment (figure IB-2/a) d'où la vésicule bourgeonnera. Le GDI est dissocié de la GTPase par l'intermédiaire d'une protéine membranaire : le GDF. La RabGTPase pourra alors retrouver sa forme active par l'intermédiaire d'une GEF (figure IB-2/b). La GTPase, sous sa conformation active, voyagera liée à la vésicule vers la membrane cible (figure IB-2/c). La fusion pourra ensuite se dérouler accompagnée d'une hydrolyse du GTP en GDP à l'aide d'une GAP (figure IB-2/d).

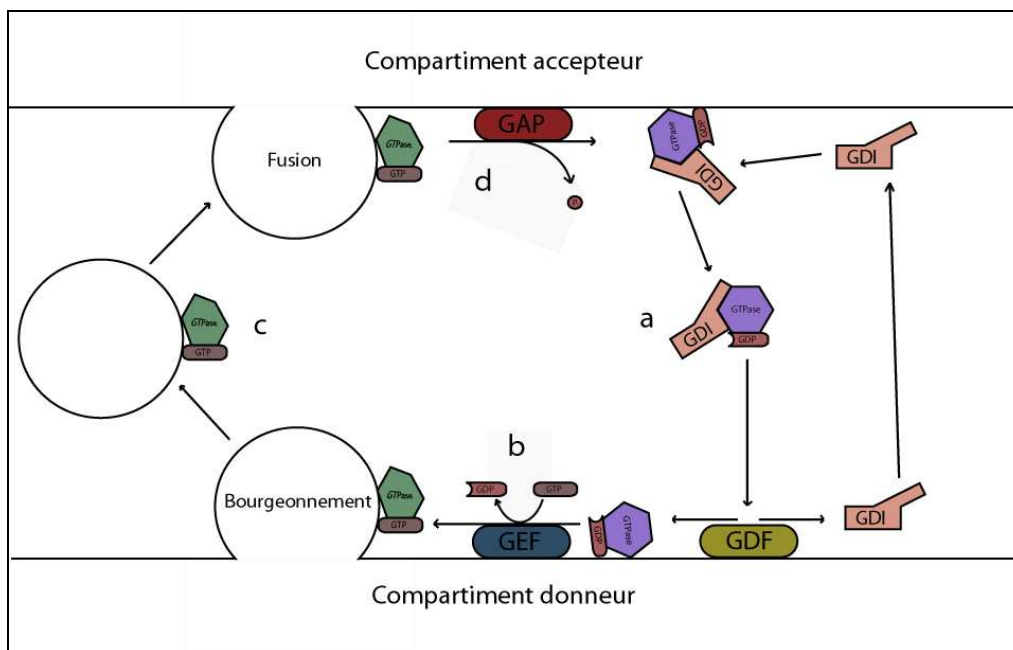


Figure IB-2 : Cycle des RabGTPases impliquées dans le transport vésiculaire.

Les RabGTPases se retrouvent à plusieurs moments du cycle accrochées à une membrane. Cette association est réalisée par une double géranylgeranylation sur des motifs cystéines C-terminal. Les protéines Rab contiennent habituellement plusieurs motifs cystéines : -CXC, -CC, -CCX, -CCXX et -CCXXX. Cette machinerie de prénylation nécessite également une séquence conservée en amont du motif C-terminal cystéine (Collins, R.N. et Brennwald, P., 1999). Deux protéines jouent un rôle capital dans la maturation de la GTPase : Rab GGTase II (Rab GéranylGéranyl Transférase) et REP-1 (Rab Escort Protein). Rab GGT II est l'enzyme, hétérodimère de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , qui isoprényle la protéine Rab (Seabra, M.C. *et al.*, 2002). REP-1 est un transporteur qui recrute la RabGTPase immature fraîchement synthétisée et qui la présente à l'enzyme géranylgéranyl transférase pour la prénylation (Seabra, M.C. *et al.*, 2002). Après le transfert lipidique, la GTPase est acheminée vers la membrane donneuse en libérant REP-1 capable de se lier à nouveau sur d'autres Rabs immatures (Seabra, M.C. *et al.*, 2002). En l'absence de REP et de RabGGT, les GTPases resteront dans le cytosol à l'état inactif (Seabra, M.C. *et al.*, 2002) (voir figure IB-3/a).

Le GDI décroche la GTPase de la membrane en rendant l'ajout lipidique de la prénylation indisponible, solubilisant la GTPase dans le cytosol et permettant son transport. Lorsque la GTPase est arrivée à destination, il y a dissociation du complexe GDI-GTPase (voir figure IB-3/b).

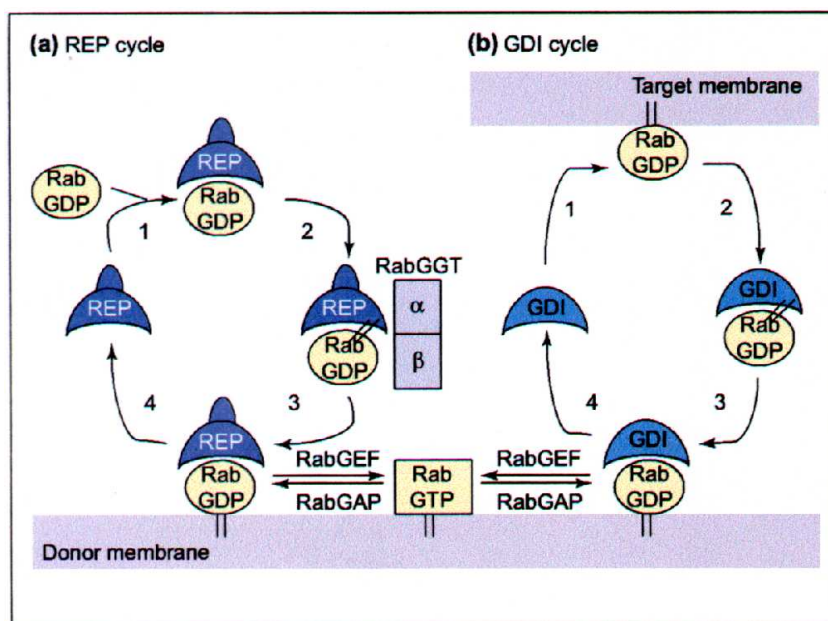


Figure IB-3 : Localisation membranaire des RabGTPases par l'intermédiaire des cycles REP et GDI (Seabra, *et al.*, 2002).

La déphosphorylation du GTP est une réaction d'hydrolyse très lente sur la GTPase. Cette réaction passe par une étape de transition (figure IB-4/A). Pour une hydrolyse efficace, il est nécessaire d'avoir une interaction avec une GAP. En effet l'interaction GAP-GTPase permet le recrutement de la molécule d'eau au niveau du site actif, de son orientation et de la stabilisation de l'étape de transition de la réaction d'hydrolyse (figure IB-4/B).

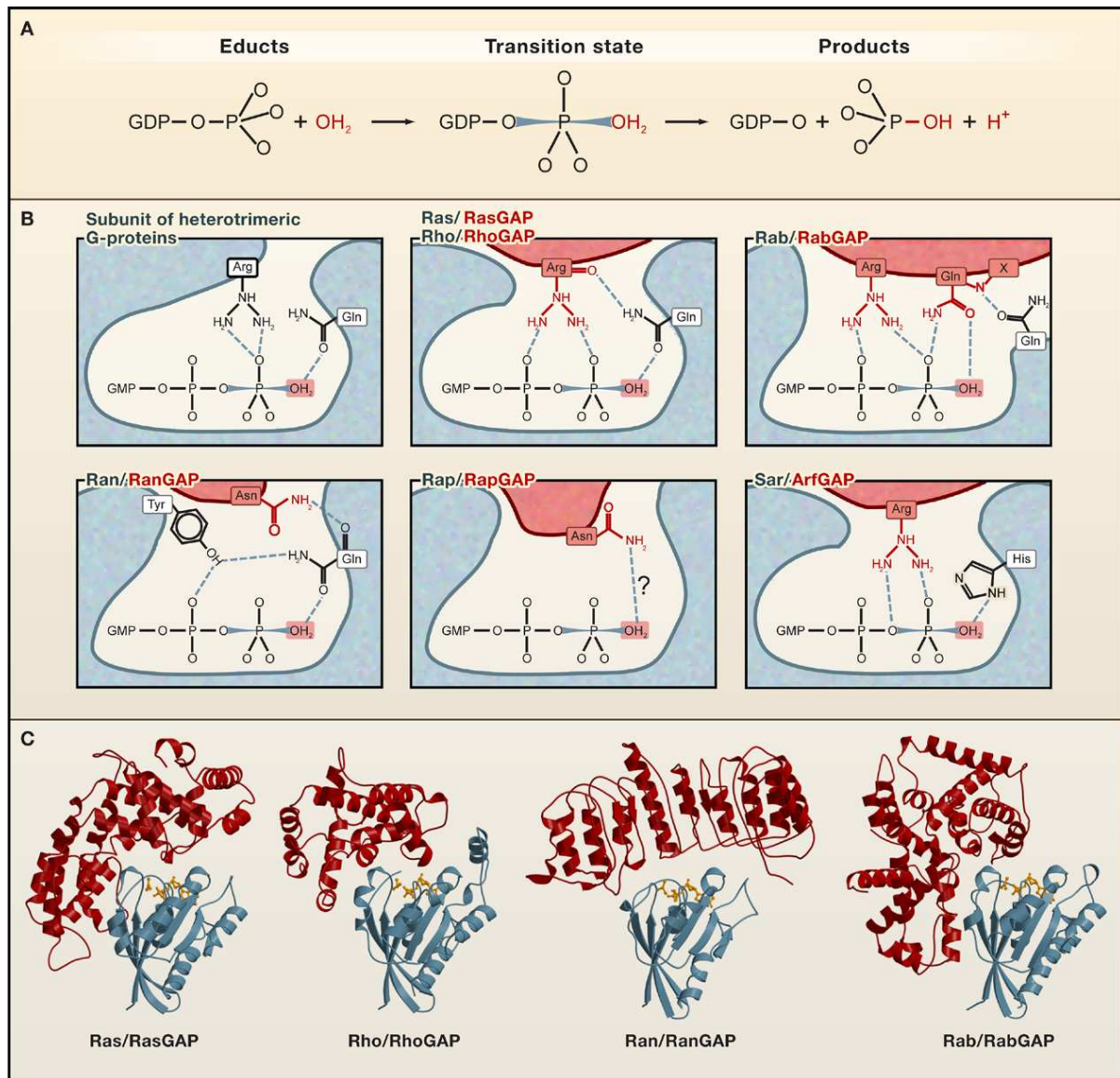


Figure IB-4 : Mécanisme de l'hydrolyse du GTP induite par les GAPs (Bos, J.L. et al., 2007). (A) Représentation schématique de l'hydrolyse du GTP. (B) Différentes approches qu'utilisent les GAPs pour contribuer à l'hydrolyse du GTP. Les résidus des GTPases et des GAPs qui contribuent directement à la catalyse sont représentés respectivement en bleu et rouge. (C) Diversité de la structure des GAPs.

Comme les GAPs des différentes familles ne sont pas conservées, elles utilisent diverses approches dans l'augmentation de l'activité des GTPases. Par exemple, dans le complexe RasGTPase/RasGAP (Scheffzek, K. *et al.*, 1997), la GAP stabilise la GTPase par sa glutamine 61 qui, à son tour, permet l'attaque de la molécule d'eau sur le GTP. De plus, une arginine de la GAP, appelée doigt d'arginine, est positionnée au niveau du site actif liant les phosphates et stabilise l'étape de transition de la réaction d'hydrolyse en neutralisant les charges négatives des phosphates. Par contre, pour le complexe RabGTPase/RabGAP (Pan, X. *et al.*, 2006), la glutamine qui oriente et recrute la molécule d'eau appartient à la GAP et la glutamine de la GTPase est quant à elle positionnée à l'extérieur du site actif et est impliquée dans la liaison avec la GAP. Enfin, nous ajoutons que les GAPs ont des structures très diverses comme le montre la figure précédente (Figure IB-4/C).

## **2. L'implication d'un dérèglement du cycle des GTPases dans la tumorigénicité**

Dans notre organisme, il existe 6000 milliards de cellules qui remplissent chacune la fonction qui lui a été assignée en maintenant en plus une communication quasi constante entre elles. Pour cela, elles reçoivent une multitude de signaux de leur environnement. Une fois interprétés, ces signaux vont permettre aux cellules de déterminer leur position et leur rôle dans l'organisme. Ils sont indispensables à la prolifération, à la différenciation, à la morphologie et à la mobilité des cellules. Au niveau des organes, ces signaux assurent le maintien harmonieux de la taille et de la fonction des tissus.

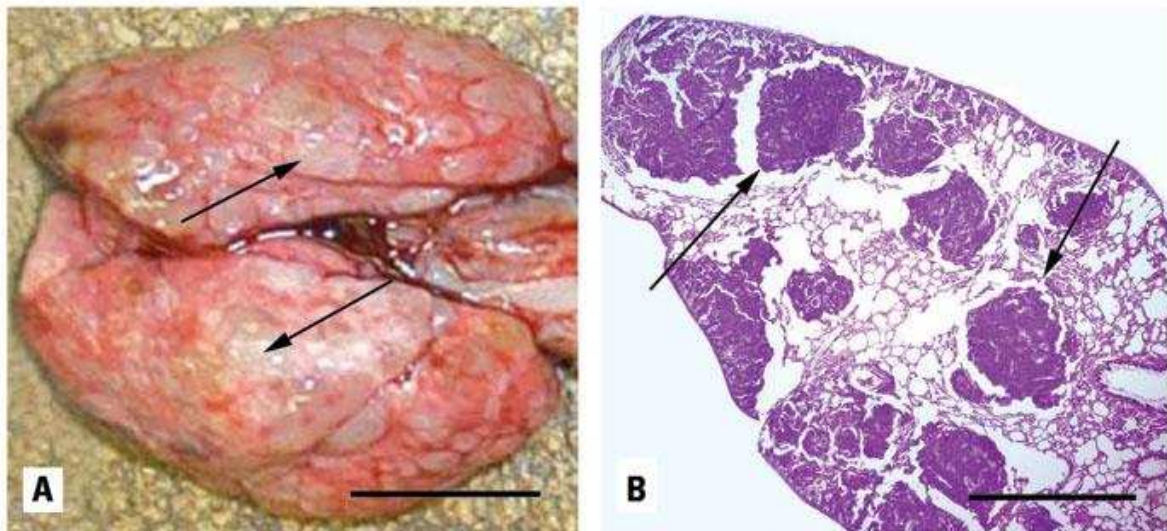
Un système extrêmement bien rôdé dont la moindre défaillance peut conduire à la catastrophe : si l'une des cellules échappe aux mécanismes de surveillance, elle peut alors devenir immortelle et proliférer de façon anarchique, ce qui peut conduire à l'apparition d'une tumeur.

Un dérèglement du bon fonctionnement du cycle des GTPases peut donc engendrer la formation de tissus tumoraux.



a) Le cancer

La prolifération cellulaire est un processus contrôlé qui répond à des besoins particuliers de l'organisme. Ce contrôle, qui est un ajustement délicat entre la multiplication cellulaire et la mort cellulaire, dépend de l'âge de l'individu et du tissu où se retrouve la cellule. Si une défaillance de ce contrôle se manifeste, dans ce cas, une cellule grossit et se divise, et il suffit que cette prolifération incontrôlée se transmette aux descendants de cette cellule pour qu'apparaisse un clone de cellules immortelles appelé tumeur. Tant que la tumeur reste circonscrite, elle ne menace pas l'organisme et est qualifiée de bénigne. A ce niveau les cellules peuvent fonctionner comme des cellules normales auxquelles elles ressemblent fortement. Les molécules superficielles de reconnaissance qui assurent la cohésion des tissus maintiennent la tumeur bénigne à ce niveau. Il arrive que ces cellules commencent à se disperser dans l'organisme en perdant leur faculté de cohésion, elles font désormais partie d'une tumeur maligne. Les cellules quittent leur site d'origine, par l'intermédiaire du système circulatoire, pour envahir un autre tissu et former une métastase (voir exemple figure IB-5), ces cellules pouvant retrouver leur faculté de cohésion par un phénomène encore inconnu.



*Figure IB-5 : Métastases dans un poumon de rat. IB-5/A: certaines métastases sont indiquées avec les flèches sur l'organe du rat. IB-5/B: coloration d'une section du poumon du rat malade observée par microscope (Kalinich, J.F. et al., 2005).*

Il existe donc plusieurs stades dans les cancers. Voici, par exemple, la description des différents stades d'un cancer du sein.

#### Stade I

La taille du cancer ne dépasse pas 2 centimètres et le cancer ne s'est pas propagé en dehors du sein.

#### Stade II

Ce stade est atteint dans l'une des conditions suivantes :

- Le cancer ne dépasse pas 2 centimètres mais il s'est propagé aux ganglions axillaires.
- Le cancer a une taille comprise entre 2 et 5 centimètres avec ou sans propagation vers les ganglions de l'aisselle.
- Sa taille dépasse 5 centimètres mais sans propagation vers les ganglions de l'aisselle.

#### Stade III

Le Stade III est divisé en stade IIIA et IIIB.

Le Stade IIIA est défini par une des conditions suivantes:

- Le cancer est plus petit que 5 centimètres et s'est propagé aux ganglions axillaires et les ganglions sont attachés entre eux ou à d'autres structures.
- Le cancer est plus gros que 5 centimètres et s'est propagé vers les ganglions axillaires.

Le Stade IIIB est défini par une des conditions suivantes:

- Le cancer s'est propagé vers les tissus voisins du sein (la peau ou la paroi thoracique, incluant les côtes et les muscles du thorax).
- Le cancer s'est propagé vers les ganglions lymphatiques situés à l'intérieur de la paroi thoracique.

#### Stade IV

Le cancer s'est propagé vers d'autres organes du corps, souvent les os, les poumons ou le cerveau. Ou encore, la tumeur s'est propagée localement vers la peau et les ganglions lymphatiques internes du cou.

Comme pour les cellules normales, le classement des cellules tumorales malignes se base d'après le tissu embryonnaire (endoderme, ectoderme et mésoderme) dont elles sont issues.

Les tumeurs appelées carcinomes dérivent de l'endoderme ou de l'ectoderme, les sarcomes du mésoderme et les leucémies sont un type de sarcome composé de cellules sanguines libres.

Les évènements déclenchant la transformation tumorale découlent généralement de l'expression d'un ou plusieurs gènes défectueux, appelés oncogènes. Un oncogène est un gène dont le produit est impliqué dans la tumorigenèse. La plupart des oncogènes sont à l'origine des gènes cellulaires normaux qui participent au contrôle de la prolifération cellulaire. Il existe cinq types de protéines impliquées dans cette régulation : les facteurs de croissance, les récepteurs de ceux-ci, les transducteurs intracellulaires de signaux, les facteurs de transcription nucléaires et les protéines réglant le cycle cellulaire.

b) *Le dérèglement du cycle des GTPases et la tumorigenèse*

Quand nous étudions les voies biologiques régulées par le cycle des GTPases, nous pouvons conclure que son dérèglement peut engendrer une perturbation au niveau cellulaire qui peut aller jusqu'à l'apparition d'une tumeur. Des modifications fonctionnelles ou structurales des protéines du cycle des GTPases peuvent engendrer l'apparition d'un effet "oncogène". Dans ce chapitre, plusieurs exemples d'oncoprotéines (produit de l'oncogène) vont être décrits.

Premièrement, les RasGTPases sont les premiers proto-oncogènes (gènes normaux d'où dérivent les oncogènes) identifiés. Les protéines Ras, activées via des récepteurs membranaires, ont un rôle dans le déclenchement de plusieurs cascades protéiques : la voie des MAPK qui régule la prolifération, la voie de la PI3K qui inhibe l'apoptose et la voie Ral qui intervient dans l'exocytose et l'endocytose.

Les oncogènes Ras, provenant d'une mutation qui rend leurs produits continuellement actifs, sont retrouvés en bonne proportion dans un grand nombre de cancers (tableau IB-1).

Type de tumeur	Fréquence approximative en %
Adénocarcinome du poumon	30
Adénocarcinome du pancréas	90
Adénocarcinome du colon	50
Leucémie Myéloïde	30

Tableau IB-1 : Fréquence des mutations des protéines Ras dans différents cancers commun de l'homme (Bos, J.L., 1989).

Ha-ras et Ki-ras sont deux oncogènes Ras présents dans les rétrovirus responsables respectivement des sarcomes murins de Harvey et de Kirsten. Le premier est aussi présent dans les cancers de la vessie, du sein et de la peau. Ki-ras se retrouve également dans les cancers du poumon et du colon (Donovan, S. *et al.*, 2002 ; Grunicke, H.H. et Maly, K., 1993).

Deuxièmement, une perte de fonction d'une GAP par une mutation dans son gène peut participer à l'apparition de tumeur. L'exemple le plus connu est la neurofibromine, une RasGAP codée par le proto-oncogène NF1 tumor suppressor gene (TSG) qui, mutée, est impliquée dans la neurofibromatose de type 1 qui prédispose à une variété de tumeurs bénignes et malignes (Donovan, S. *et al.*, 2002 ; Grunicke, H.H. et Maly, K., 1993).

De plus, une RabGAP a été identifiée dans un cancer de la prostate comme une oncoprotéine codée par l'oncogène *PRC17* (Pei, L. *et al.*, 2002). Ce gène du chromosome 17 est surexprimé dans les tumeurs de la prostate, d'où son nom *prostate cancer gene 17 (PRC17)* (Pei, L. *et al.*, 2002). Il code pour une protéine de 549 acides aminés dont 84% sont identiques à *Tre-2* (Pei, L. *et al.*, 2002). Ce dernier, qui est étudié dans le cadre de cette thèse, contient une ORF, *oncTre210*, considérée comme étant un oncogène codant une RabGAP et impliquée dans le sarcome d'Ewing.

### ***III. Le sarcome d'Ewing***

---

#### ***1. Le sarcome d'Ewing***

Le sarcome d'Ewing, membre de la famille des tumeurs d'Ewing avec la tumeur primitive neuroectodermale, est la deuxième tumeur osseuse maligne (après l'ostéosarcome) la plus commune chez l'enfant et l'adolescent. La famille des tumeurs d'Ewing appartient au groupe des néoplasmes habituellement appelés *small round cell tumors*.

Plus de la moitié des patients atteints du sarcome d'Ewing ont entre 10 et 20 ans et 70% ont moins de 20 ans (Grier, H.E., 1997). L'incidence annuelle de la maladie aux Etats-Unis est de 2,7 par million d'enfants en dessous de 15 ans (West, D.C., 2000). Cette tumeur atteint principalement les personnes de race blanche et est rare chez les sujets d'origine noire et asiatique (Joyce, M.J. *et al.*, 1984 ; Grier, H.E., 1997). De plus, la maladie est légèrement plus commune chez les hommes que chez les femmes (rapport d'environ 1,5 : 1) (Zamora, P. *et al.*, 1986 ; Burchill, S.A., 2003). Le sarcome d'Ewing ne paraît pas être impliqué dans un syndrome cancéreux familial (Hutter, R.V.P. *et al.*, 1964 ; Joyce, M.J. *et al.*, 1984 ; Zamora, P. *et al.*, 1986).

Les tissus malades ont été initialement décrits en 1921 par James Ewing comme une tumeur d'origine endothéliale composée de petites cellules bleues arrondies (Ewing, J., 1921). Plus tard, il a été remarqué que ces cellules bleutées dérivent de cellules primitives neuroectodermales.

Le sarcome d'Ewing peut affecter tous les os, mais certains sont plus couramment atteints que d'autres. La distribution des sites primaires osseux a été observée dans une étude qui portait sur 303 patients atteints de la maladie : 20% au niveau des os du bassin, 45,6% pour diaphyse, 12,9 pour épiphyse, 12,9 pour les os de la colonne vertébrale et les côtes et 2,3% pour les os du visage (Grier, H.E., 1997). Les différents symptômes de la maladie sont des douleurs locales (84%), des tuméfactions (63%), de la fièvre (28%) et de la paraplégie (3%) (Grier, H.E., 1997).

Les différents traitements du cancer sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Cette dernière est la plus efficace d'après les travaux de l'équipe de Kotz (Sluga, M. *et al.*, 2001). Il faut préciser qu'actuellement, la maladie est soignée par une combinaison des trois traitements et que les résultats restent pauvres : 50% de survie à 5 ans (25% si présence de métastases au diagnostic) et moins de 30% à 10 ans (Riggi, N. et Stamenkovic, I., 2007). Enfin, il a été montré très récemment qu'après traitement il y avait un risque élevé de rechute (Navid, F. *et al.*, 2008)

Dans la plupart des tumeurs du sarcome d'Ewing, du point de vue de la génétique moléculaire, une translocation résultant d'un réarrangement entre le gène *EWS* (chromosome 22) et un gène de la famille des *ETS* a été observé (Aurias, A. *et al.*, 1984 ; May, W.A. *et al.*, 1993). Les membres de la famille des *ETS* sont des facteurs de transcription connus pour leur régulation dans l'expression de *TGFBR2* codant le récepteur à TGF- $\beta$  de type II (un suppresseur de tumeur). Le cas le plus fréquent est la translocation t(11 ; 22) (q24 ; q12) avec comme gène *ETS* impliqué, le gène *FLI-1* (chromosome 11) dans 85% des sarcomes d'Ewing (Burchill, S.A., 2003). Le mécanisme de EWS-FLI-1 est très bien décrit dans une revue de Riggi et Stamenkovic publiée récemment dans *Cancer Letters* (Riggi, N. et Stamenkovic, I., 2007). D'autres réarrangements des gènes *EWS-ETS* ont été identifiés dans 15% des tumeurs : fusion du gène *EWS* avec le gène *ERG* (dans 10% des cas), le gène *ETV1*, *E1AF* et *FEV* (Burchill, S.A., 2003). Ces translocations spécifiques, résultant de la fusion *EWS* et *ETS*, présentent un intérêt particulier dans le diagnostic de la maladie.

## 2. L'oncogène *Tre2*

Lors d'essais de transfection-tumorigénicité, Nakamura et son équipe ont isolé un locus d'origine humaine, le *Tre* (Transfection recombined DNA), capable de provoquer l'apparition de tumeurs (Nakamura, T. *et al.*, 1988). Ce locus est composé de trois éléments génétiques recombinés : TRE5, provenant du chromosome 5, le TRE18 ayant son origine sur le chromosome 18 et le TRE17 (ou *Tre2*) provenant du chromosome 17. Suite à un épissage alternatif, *Tre2* est transcrit en deux ARN : le *Tre210* et le *Tre213*, chacun composé de deux ORFs (voir figure 1) (Nakamura, T. *et al.*, 1992).

Il est apparu lors d'expériences de transfection, réalisées par Nakamura et son groupe, que l'ORF1 de *Tre210* contient un pouvoir tumoral tandis que l'ORF2 de *Tre213* détient un rôle

de suppresseur de tumeur (figure IB-6). L'ORF1 de *Tre210* a été appelé *oncTre210* étant donné qu'il contient le pouvoir tumoral.

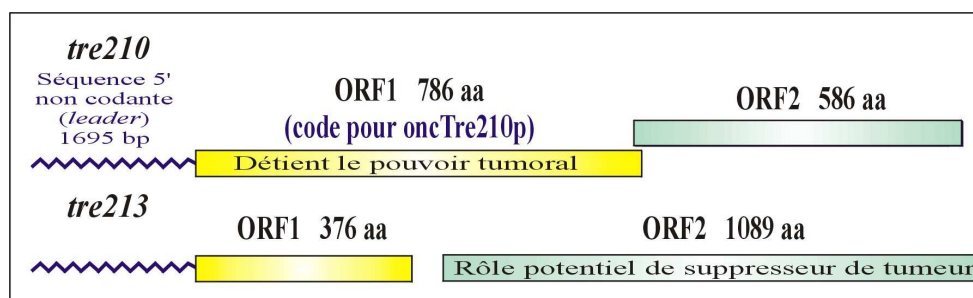


Figure IB-6 : Les deux messagers bicistroniques de l'oncogène *Tre2* (d'après Bach, S., 2000).

L'oncogène *oncTre210* est exprimé dans les cellules du sarcome d'Ewing, mais aussi dans d'autres types de cellules cancéreuses indiquées dans le tableau suivant.

Nature du cancer (lignée cellulaire)	Référence
Lignée cellulaire monoblastique THP-1 (leucémie aiguë)	Institut fur Humangenetik, Ruprecht-Karls-Universitat, Heidelberg, Germany.1999 (Janssen, J.W., <i>et al.</i> , 1999)
Leiomyosarcoma (LMS)	Institut fur Pathologie, Universitat Heidelberg, Germany.1998 (Otano-Joos, M., <i>et al.</i> , 1998)
Sarcome d'Ewing (lignée cellulaire IARC-EW1) Rhabdomyosarcome (A204) Carcinome de la vessie (T24) Ostéosarcome (Tes) Carcinome cervical (HeLa)	Laboratoire dissous : Laboratory of Cellular and Molecular Biology, CNRS, Villejuif, France.1992 (Nakamura, T., <i>et al.</i> , 1992)
Sarcome d'Ewing, ostéoblastome, myofibrome, adénocarcinome du sein et de l'endomètre, mélanome	Oliveira, A.M., <i>et al.</i> , 2005
Carcinome cervical (HeLa), cancer du sein (MSF7), leucémie érythrocytaire (HEL)	Shen, C., <i>et al.</i> , 2005

Tableau IB-2 : Expression de *oncTre210* dans différents cancers.

Par la suite, la transcription excessive de *oncTre210* a aussi été observée dans des kystes osseux anévrysmaux résultant d'une translocation chromosomique (Oliveira, A.M. *et al.*, 2004a/b ; Oliveira, A.M. *et al.*, 2005). Dans ces réarrangements, il a été montré une juxtaposition de la phase codante de l'oncogène avec des promoteurs hautement actifs (promoteurs de CDH11 (cadhérine 11), COL1A1 (collagène 1A1), OMD (ostéomoduline), ZNF9 (zinc finger 9) et TRAP150 (thyroid receptor-associated protein 150)) qui induirait une dérégulation de la transcription de l'oncogène (Oliveira, A.M. *et al.*, 2005; Panagopoulos, I. *et al.*, 2008)).

De plus, le gène levurien DOA4, codant une désubiquitinase, présente une homologie de séquence avec l'ORF2 de *tre213* dont il a été démontré expérimentalement qu'elle fait partie de cette même classe d'enzymes (Papa, F.R. et Hochstrasser, M., 1993). Deux modules de désubiquitination sont nécessaires pour que l'enzyme soit fonctionnelle, comme c'est le cas pour DOA4 et l'ORF2 de *tre213*. Mais *oncTre210p* ne contient qu'un seul module, suggérant que *oncTre210p* serait une forme tronquée du produit normal de *Tre2* (Papa, F.R. et Hochstrasser, M., 1993).

### 3. L'oncoprotéine *oncTre210p*

Sur base des comparaisons de séquence de la structure primaire de *oncTre210p* avec celles des banques de données, il a été remarqué que l'oncoprotéine (786 aa) a une structure bipartite (figure IB-7).

En effet, la partie N-terminale (499 aa) contient le domaine TBC des Ypt/RabGAP, protéine activatrice de RabGTPase, et la partie C-terminale (287 aa) est identique (92% d'identité) à la partie centrale de l'oncoprotéine NY-REN-60 (1/5 de la totalité de la protéine), une protéine désubiquitinase, impliquée dans un carcinome du rein (Scanlan, M.J. *et al.*, 1999 ; Paulding, C.A. *et al.*, 2003). En raison des homologies de séquences, ces régions seront appelées respectivement GAP (499 aa) et REN-60 (287 aa).



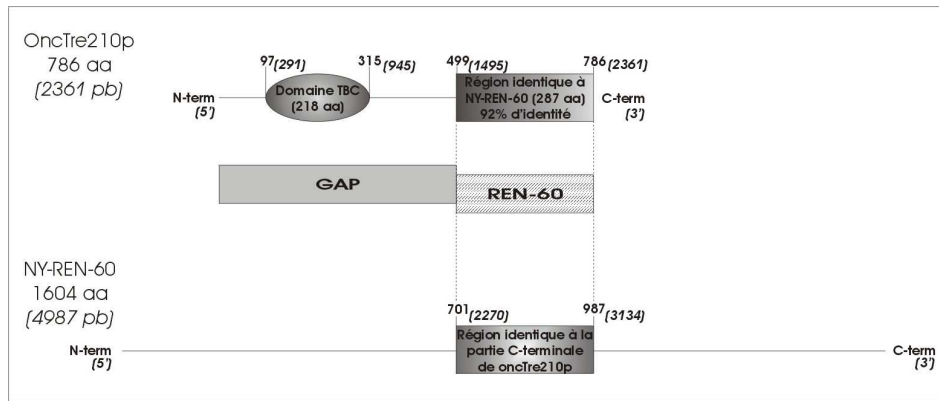


Figure IB-7 : Structure bipartite de *oncTre210p*.

D'après des recherches effectuées par l'équipe du Dr. Chou, l'oncoprotéine est décrite comme un effecteur de la RhoGTPase Cdc42 et Rac1 dans l'organisation du cytosquelette (Masuda-Robens, J.M. *et al.*, 2003) et comme un activateur de l'Arf6 dans le système de recyclage des membranes plasmiques (Martinu, L. *et al.*, 2004).

#### 4. Le domaine GAP

Vu que l'oncoprotéine *oncTre210p* contient l'entièreté de la séquence du domaine catalytique des Ypt/RabGAPs (le domaine TBC), nous pouvons émettre l'hypothèse que la protéine serait une protéine GAP.

Le domaine TBC a été mis en évidence en 1995 par Richardson qui a isolé un fragment d'ADNc, *Tbc1*. La protéine correspondant au gène contient un domaine de 180 aa conservé chez *oncTre210p* et deux protéines levuriennes : *Bub2p* et *Cdc16p*, d'où son appellation TBC (Richardson, P.M. et Zon, L.I., 1995). Une homologie de séquence est observée avec deux autres protéines levuriennes (*Gyp6p* et *Gyp7p*), ainsi qu'avec la protéine humaine RN-Tre qui est fortement similaire à *oncTre210p* (Matoskova, B., 1996). Enfin, l'activité catalytique du domaine TBC a été démontrée comme étant celle de protéines GAPs par des études menées en 1999 (Albert, S. *et al.*, 1999b).

De plus, l'Unité de Biologie animale et microbienne de la FUSAGx a mis en évidence, lors de sa participation au programme de séquençage du génome de *Saccharomyces cerevisiae*, une protéine de 492 acides aminés, *Msb4p* (492 aa), qui présente une forte homologie de séquence (23% d'identité et 47% de similarité sur 453 aa) avec l'oncoprotéine humaine *oncTre210p*

(Vandenbol, M. *et al.*, 1995) et avec une seconde protéine levurienne, Msb3p (633 aa). A partir de ce moment, le laboratoire a alors entrepris la caractérisation de la fonction biologique du domaine GAP de l'oncoprotéine humaine par analyse comparative avec les deux protéines de levure Msb3p et Msb4p.

Enfin, des études biochimiques ont permis de confirmer biochimiquement que Msb3p (Albert, S. *et al.*, 1999a) et Msb4p (Albert, S. *et al.*, 2000) sont deux protéines GAPs spécifiques des GTPases appartenant à la famille Ypt/Rab. Ces protéines apparaissent impliquées dans l'exocytose et la polarisation du cytosquelette d'actine (Bi, E. *et al.*, 2000 ; Gao, X.D. *et al.*, 2003). La co-délétion de *MSB3* et *MSB4* induit différents phénotypes à la levure comme l'inhibition de croissance sur milieu contenant de la caféine ou du DMSO, un profil de bourgeonnement aléatoire des cellules diploïdes, une désorganisation du cytosquelette d'actine (Bach, S. *et al.*, 2000) et un défaut dans la ségrégation des noyaux lors de la mitose (Bi, E. *et al.*, 2000)

Plusieurs observations ont été faites dans l'Unité : il a été remarqué par des expériences de complémentation du double mutant levurien *msb3 msb4* que le domaine TBC de oncTre210p est non fonctionnel. Par contre, l'homologue humain actif, RN-Tre, peut remplacer fonctionnellement les deux protéines levuriennes (Bizimungu, C. *et al.*, 2003). Ceci fait supposer que oncTre210p a perdu intrinsèquement son activité catalytique GAP. Ceci est la base d'un premier modèle d'action pour l'oncoprotéine oncTre210p proposé par le Dr. Bach en 2000 : celle-ci se fixerait de manière compétitive sur les GTPases sans les activer. La cancérisation des cellules pourrait être expliquée par l'action de oncTre210p sur une ou plusieurs GTPases (Bach, S., 2000) (figure IB-8).

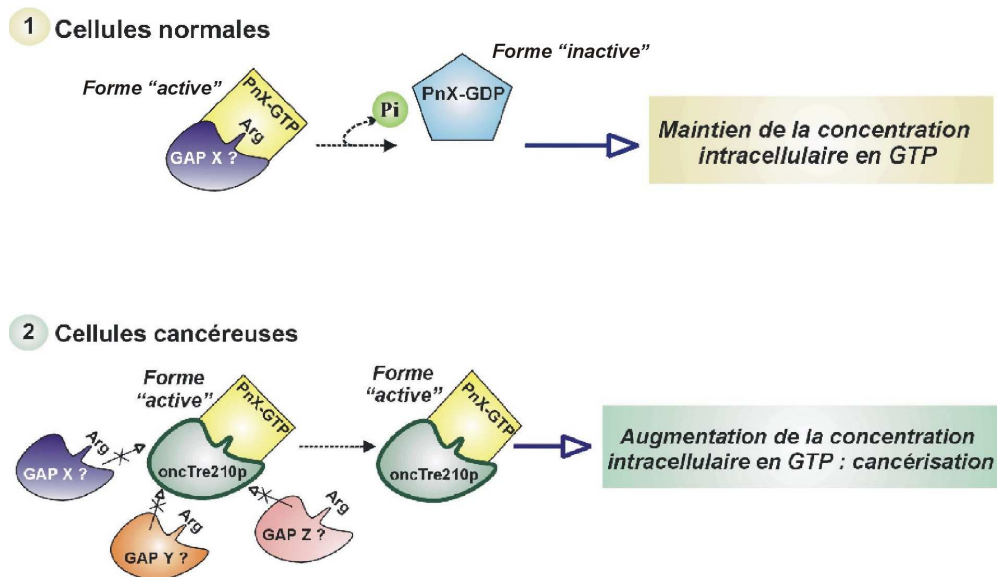


Figure IB-8 : Modèle d'action de l'oncoprotéine *oncTre210p*. PnX est une GTPase et X,Y,Z sont trois GAPs pouvant amplifier son activité GTPasique (d'après Bach, S., 2000).

Le Dr. Bizimungu a ensuite montré que deux régions semblent importantes pour l'activité catalytique GAP de l'oncoprotéine *oncTre210p* (Bizimungu, C. et Vandebol, M., 2005; Bizimungu, C. *et al.*, 2007). Tout d'abord, le domaine TBC (résidus 97-315) où la mutation de deux résidus hautement conservés au sein de ce domaine pourrait expliquer sa non-fonctionnalité. En effet, l'arginine catalytique est remplacée par un résidu thréonine, et un résidu glutamine, important pour la stabilité du site actif, est changé en arginine. L'importance du mécanisme en doigt arginine a été décrite précédemment dans le paragraphe II.1 décrivant les GAPs. Cependant, ces mutations ne sont pas la seule cause de l'absence d'activité GAP, puisque la restauration des résidus conservés ne permet pas de rétablir son activité catalytique en levure. La seconde région, qui semble influencer l'activité catalytique de l'oncoprotéine, est formée de 93 acides aminés situés directement en aval du domaine TBC (résidus 316-408). La structure secondaire est prédite comme totalement désordonnée. Une telle désorganisation traduit une certaine flexibilité de la structure tridimensionnelle. Il a été aussi montré que la partie REN-60 n'influence pas l'activité GAP et qu'elle pourrait être impliquée dans d'autres fonctions d'*oncTre210p* (Bizimungu, C. *et al.*, 2007).

Le modèle proposé par le Dr. Bizimungu est basé sur l'idée que *oncTre210p* se lierait sur les mêmes GTPases que RN-Tre, Rab5 et Rab41 et qu'une compétition existerait entre les deux GAPs pour la fixation. Dans les cellules malades (IB-9/B), une dérégulation de la transcription entraînerait une surexpression de l'oncogène. *OncTre210p* se fixerait alors de

manière compétitive sur les deux GTPases mais sans activer l'hydrolyse du GTP, ce qui perturberait les fonctions où RN-Tre est impliquée.

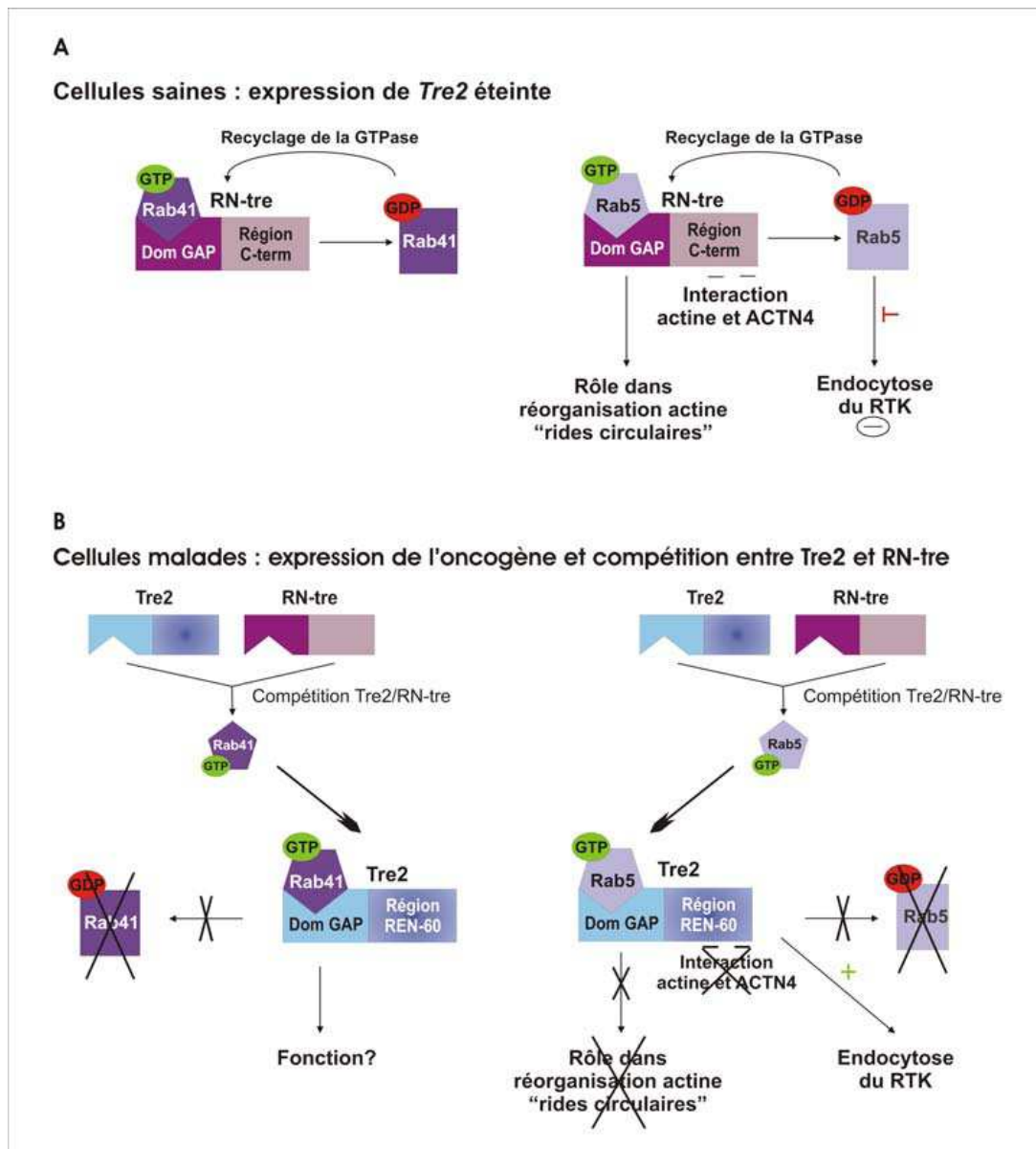


Figure IB-9 : Modèle de compétition entre *oncTre210p* et RN-Tre pour la fixation sur les GTPases Rab5 et Rab41. IB-9/A: cellules saines où l'oncogène n'est pas exprimé. IB-9/B: Cellules malades synthétisant l'oncoprotéine. ACTN4: actinine, RTK: récepteur à tyrosine kinase (d'après Bizimungu, C., 2006).

Dans les cellules saines (IB-9/A), il n'y aurait présence que de RN-Tre qui régulerait l'activité de Rab41 et Rab5. La fonction de Rab41 qui est encore inconnue se localiserait dans une voie impliquée dans le contrôle du trafic vésiculaire au niveau du Golgi (Haas, A.K. *et al.*, 2005).

Il est intéressant de préciser que l'équipe de Haas a montré en 2007 que RN-Tre est une GAP pour Rab43 et contrôle le transport rétrograde dans le Golgi (Haas, A.K. *et al.*, 2007; Fuchs, E. *et al.*, 2007). L'interaction de RN-Tre avec Rab5 permettrait de contrôler l'internalisation du récepteur à l'EGF et à la formation des rides circulaires d'actine par l'interaction directe de RN-Tre avec l'actine et l'actinine (Di Fiore, P.P. et Scita, G., 2002; Lanzetti, L. *et al.*, 2000; Lanzetti, L. *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que RN-Tre est une cible physiologique de la phosphatase humaine Cdc14A impliquée dans la machinerie du cycle cellulaire (Lanzetti, L. *et al.*, 2007).

## ***IV. Le cytosquelette d'actine***

---

### ***1. Introduction***

Les premières cellules eucaryotes étaient probablement immobiles et se déplaçaient selon les courants et les mouvements du milieu. La diffusion suffisait à disperser les éléments de la cellule au sein de celle-ci. Mais les cellules sont devenues plus volumineuses et ont développé des systèmes de transport intra-cellulaire et ont intégré un appareil locomoteur pour coloniser des sites plus favorables.

Les cellules subissent des changements de forme comme la contraction cellulaire, la naissance de protusions superficielles (ex. microvillosités) et l'étranglement au niveau du sillon de clivage lors de la cytokinèse. De plus, certaines cellules ont le pouvoir de se déplacer comme l'illustre par exemple l'ébauche d'organe qui se forme par migration de cellules venues de divers endroits de l'embryon.

Le constituant responsable de ces phénomènes est le cytosquelette, un système de fibrilles tendues à travers le cytoplasme. Il sert de soutien à la membrane plasmique ou de guide aux organites ou aux autres éléments qui se meuvent dans le cytosol. Le cytosquelette est une structure dynamique soumise à de continuel réarrangements.

Le cytosquelette est un réseau formé de trois types de fibres cytosoliques : les microfilaments, les filaments intermédiaires et les microtubules. Les microfilaments et les microtubules, les seuls à intervenir dans la motilité, s'allongent par polymérisation respective de protomères d'actine et tubuline, les filaments intermédiaires sont des polymères plus complexes, formés d'un protomère  $\alpha$ -hélicoïdal commun.

Nous décrivons dans ce chapitre le cytosquelette d'actine car d'une part, c'est le mieux connu et d'autre part, il intervient dans tous les types de motilité, de la migration cellulaire au transport à travers le cytosol. De plus, nous avons choisi de commencer par une description en forme de rappel des deux grands composants du cytosquelette qui sont l'actine et la myosine. Enfin, nous décrirons une voie complexe d'activation de la myosine.

## 2. L'actine

L'actine est une protéine prépondérante dans les cellules eucaryotes et fortement conservée à travers les espèces (Sheterline, P., Sparrow, J.C., 1994). Par exemple, l'actine dans les cellules musculaires compte pour 10-20 %, et dans d'autres cellules de 5 à 10 %, de la quantité totale de protéine cellulaire. L'actine est une protéine globulaire de 42 kDa de 375 acides aminés identifiée la première fois comme faisant partie du complexe actomyosine (Straub, F.B., 1942).

Chez l'homme, nous connaissons actuellement sept actines: quatre sont des actines  $\alpha$ , chacune propre à un type de muscle, deux actines  $\gamma$ , la première se trouve dans les muscles lisses de la paroi intestinale et l'autre est non musculaire, et l'actine  $\beta$  non musculaire (point isoélectrique variant de 5.4 pour  $\alpha$  à 5.9 pour  $\gamma$ ) (Zechel, K. et Weber, K., 1978).

L'actine se présente sous forme d'un monomère globulaire appelé actine G et sous forme d'un polymère hélicoïdal d'une demi-période de 37 nm possédant une polarité structurale et fonctionnelle appelée actine F, formé d'une chaîne de monomères d'actine G.

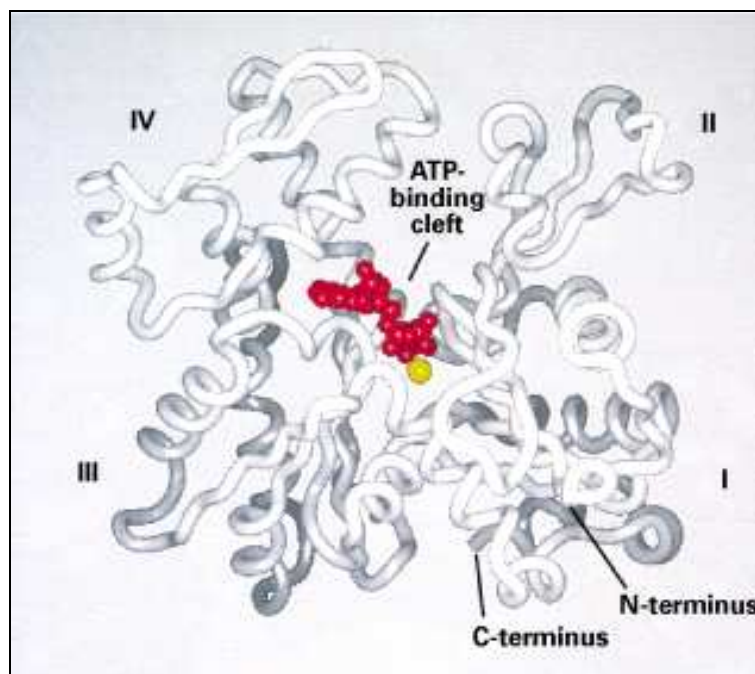


Figure IB-10 : Représentation graphique de l'actine G-ATP avec ses quatre sous-domaines (I-IV), l'ATP en rouge et l'ion métallique en jaune dans l'interstice.

Le monomère d'actine est composé de deux lobes (I - II et II-IV) eux-mêmes divisés en deux sous-domaines de I à IV (figure IB-10). Au niveau de l'interstice entre les quatre sous domaines, réside un complexe métal-nucléotide constitué de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$  séquestré par l'ATP ou l'ADP. La présence d'ATP dans le site influence la conformation de l'actine en arrimant les deux lobes de la protéine. Ainsi, la nature du nucléotide influence significativement les propriétés biochimiques du filament d'actine et plus particulièrement les mécanismes de polymérisation.

A force ionique physiologique, les actines G s'assemblent spontanément en actine F en quatre étapes (Kasai, M. *et al.*, 1962) (figure IB-11):

- L'activation : les monomères se lient au cation métallique, en induisant un changement de conformation.
- La nucléation : formation de noyau de 3 monomères.
- L'allongement : croissance rapide du filament.
- L'état stationnaire : phase d'équilibre du filament.

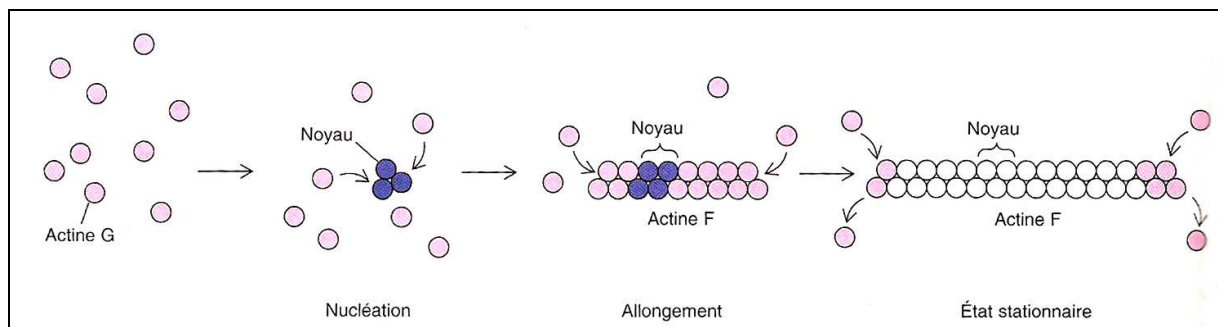


Figure IB-11 : Représentation de la polymérisation de l'actine divisée en quatre étapes : l'activation, la nucléation, l'allongement et l'état stationnaire.

L'actine F est une protéine asymétrique. Nous pouvons distinguer les deux extrémités en partant du bout - (ou bout pointu) où l'actine polymérise plus lentement et du bout + (ou bout barbé) où la croissance du filament est rapide (figure IB-12).



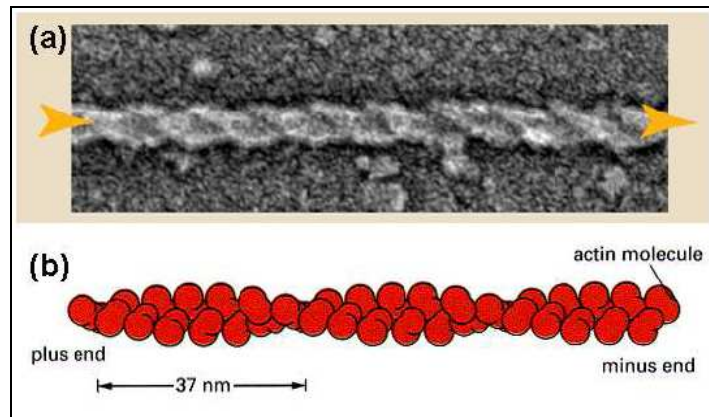


Figure IB-12 : (a) filament d'actine vu au microscope électronique (b) structure en hélice de l'actine avec le bout +(plus end) et le bout – (minus end)

Le filament d'actine constitue une chaîne dynamique constamment en équilibre avec la forme monomérique présente en solution. *In vitro*, la vitesse d'association des actines G à une extrémité donnée est proportionnelle à la concentration en actine G du milieu. Au fur et à mesure de la consommation en actine monomérique, nous arrivons à un point critique de concentration où un équilibre entre polymérisation et dépolymérisation apparaît et le filament arrête de croître. En présence d'ATP (figure IB-13), ce sont les actines G-ATP qui vont préférentiellement polymériser. Dans le filament, il va tout d'abord avoir un clivage de l'ATP en ADP-Pi puis un relargage du phosphate. Ce processus est lent, ainsi au bout + où la croissance est rapide, il peut se former une coiffe d'actine-ATP (Carlier, M.F. *et al.*, 1984). Nous pouvons retrouver ainsi de l'actine-ADP au bout - et de l'actine ADP-Pi au centre du filament (Carlier, M.F., 1991).

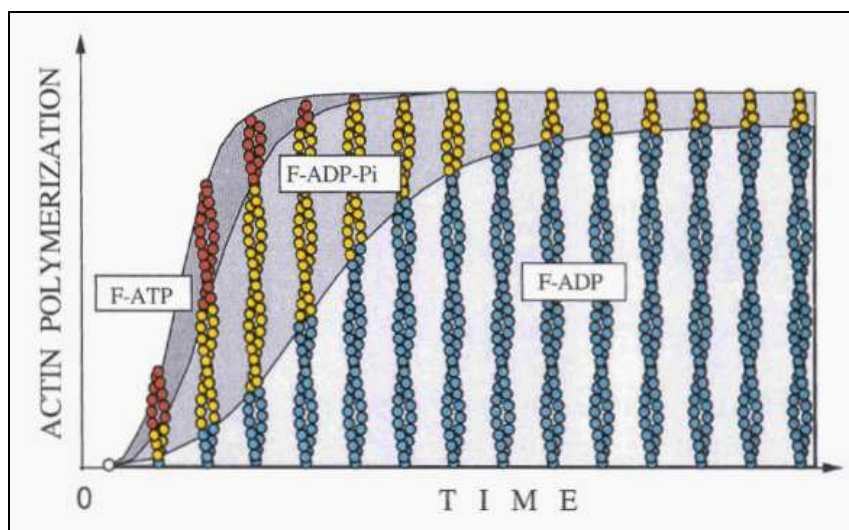


Figure IB-13 : Composition d'un filament d'actine lors de la polymérisation

Signalons que l'actine-ADP a moins d'affinité pour ses voisins que l'actine-ATP. Ainsi, au bout - du filament d'actine nous aurons une dépolymérisation plus importante qu'au bout +. En effet, au moment de l'équilibre, la cinétique du bout + est dominée par l'ajout de monomères alors qu'à l'autre bout les monomères se détachent. Nous avons donc un mécanisme de tapis roulant (Alberts, B. *et al.*, 2002).

*In vivo*, les cinétiques de l'actine sont très différentes et peuvent être supérieures à celles observées *in vitro*. Ceci est dû à l'action de protéines régulatrices de la cellule.

La polymérisation de l'actine au sein de la cellule est influencée par la présence de diverses protéines comme la thymosine  $\beta_4$  et la profiline qui se lient aux actines G. La profiline se lie préférentiellement aux monomères actine-ADP et favorise l'échange ADP/ATP (Theriot, J.A. *et al.*, 1994). Elle permet d'augmenter la vitesse de polymérisation du bout + en élevant le taux d'actine G accessible à cette extrémité. De plus, elle agit comme une protéine séquestrante lorsque le bout + est occupé par une protéine dite coiffante.

La thymosine  $\beta_4$  a une forte affinité pour les actines G-ATP et a pour effet de séquestrer les monomères et de tamponner la quantité d'actine G polymérisable (Marchand, J.B. *et al.*, 1995).

La polymérisation de l'actine peut aussi être influencée par des protéines agissant directement sur le filament.

La gelsoline coiffe le filament d'actine en son bout + et favorise ainsi sa dépolymérisation au bout - (Pantaloni, D. *et al.*, 2001). De plus, la concentration en actine G augmente et favorise la polymérisation des filaments non-coiffés (Pantaloni, D. *et al.*, 2001).

L'ADF (actin depolymerizing factor)/cofiline se lie à l'actine-ADP et lorsqu'elle se lie au filament, elle diminue le pas de l'hélice d'environ 25% et fragilise les liaisons entre monomères (McGough, A. *et al.*, 1998) (figure IB-14). Nous avons ainsi une augmentation des dissociations des monomères au bout - (Carlier, M.F. *et al.*, 1997).

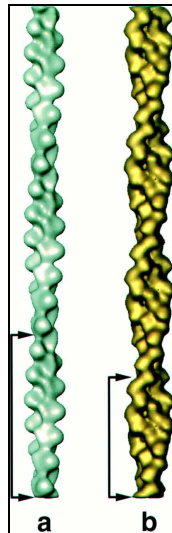


Figure IB-14 : Influence de la cofiline sur le pas de l'hélice d'un filament d'actine : (a) filament d'actine seul et (b) filament d'actine lié à la cofiline (McGough, A. et al., 1997)

Des toxines fongiques peuvent déstabiliser l'équilibre monomère-polymère. La cytochalasine B et D, des alcaloïdes de champignon, en s'attachant à un bout du filament d'actine, engendre une dépolymérisation de l'actine F. La phalloïdine, de l'amanite phalloïde, a l'effet opposé car elle empêche les filaments d'actine de se dépolymériser et gèle l'assemblage des monomères. La phalloïdine rendue fluorescente sert à colorer les filaments pour la microscopie optique à fluorescence car elle ne se fixe qu'à l'actine.

Le cytosquelette d'actine se compose de faisceaux et de réseaux de filaments. Les filaments assemblés en faisceaux, notamment là où la membrane fait saillir ses replis, se prolongent vers l'intérieur de la cellule, où ils s'écartent les uns des autres pour se fondre dans le réseau de filaments. Dans les faisceaux, les filaments sont accolés parallèlement de façon compacte, tandis que dans les réseaux les filaments se croisent, souvent à angle droit. Il existe deux sortes de réseaux d'actine dans la cellule, un réseau bidimensionnel, plan, réticulé, associé à la membrane plasmique et, au sein de la cellule, un réseau tridimensionnel de filaments d'actine qui donne un aspect gélatineux au cytosol. Dans tous les cas les filaments d'actine sont maintenus par des protéines de pontage de l'actine qui doivent comporter deux sites de liaisons à l'actine. Selon la longueur et la flexibilité de cette protéine de réticulation, il se formera un faisceau ou un réseau. Par exemple, l'actinine  $\alpha$ , la fimbrine et la fascine forcent les filaments à s'arranger en faisceau et la spectrine, dystrophine et filamine se rencontrent dans les réseaux.

L'actinine  $\alpha$  force les filaments d'actine à se placer parallèlement mais pas orientés dans la même direction et la structure formée est suffisamment lâche pour permettre aux myosines d'interagir avec l'actine (Alberts, B. *et al.*, 2002) (figure IB-15/a).

La fimbrine arrange parallèlement les filaments d'actine de façon très serrée et tous orientés dans le même sens (Alberts, B. *et al.*, 2002) (figure IB-15/b).

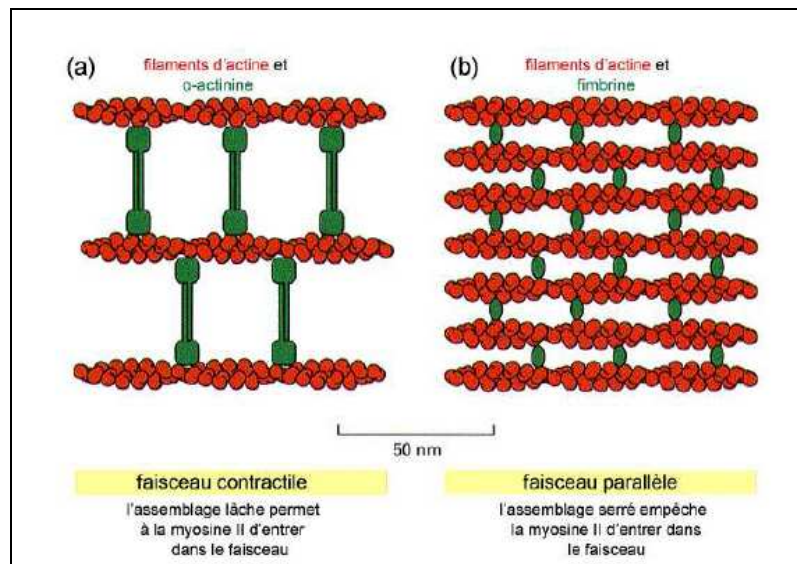


Figure IB-15 : Représentation graphique de l'agencement en faisceaux par l'intermédiaire de l'actinine  $\alpha$  (a) et la fimbrine (b)

La filamine est une protéine qui favorise la formation de gel réticulé lâche où les filaments d'actine ont une grande liberté de mouvement (Alberts, B. *et al.*, 2002) (figure IB-16).

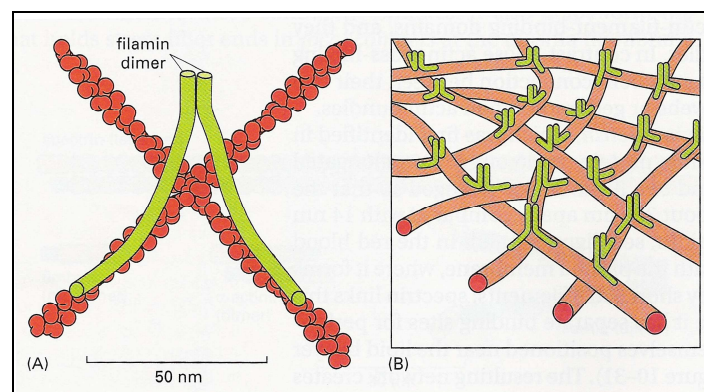


Figure IB-16 : Liaisons tridimensionnelles de la filamine avec les filaments d'actine (Alberts *et al.*, 2002). (A) Liaison d'un dimère de filamine avec deux filaments d'actine. (B) Vue d'ensemble du réseau d'actine formé par la présence de filamine.

Les faisceaux et réseaux d'actine sont arrimés à la membrane par des protéines de pontage de la membrane aux microfilaments qui servent de soudure entre le feuillet membranaire et le cytosquelette. Quand la membrane se lie à un faisceau de filaments, elle prend la forme d'un doigt, quand elle s'arrime à un réseau plan de filaments, elle reste plane. L'arrimage membranaire de l'actine est très variable : les connexions les plus simples sont assurées par des protéines membranaires qui s'attachent directement aux filaments, mais en général, nous rencontrons des liaisons plus complexes unissant les filaments d'actine aux protéines membranaires intrinsèques par l'intermédiaire de protéines membranaires.

Ainsi, la cellule a élaboré divers processus pour assembler le cytosquelette cortical d'actine. Par exemple, la membrane des érythrocytes doit sa résistance et sa souplesse au réseau plan de filaments d'actine qui borde la face interne de la membrane. Le cytosquelette est composé principalement de spectrine, une longue protéine fibreuse, qui se retrouve sous forme de tétramères. Ces tétramères forment un réseau en étant liés par un pontage au niveau d'un complexe de jonction contenant un petit filament d'actine consolidé par la tropomyosine et la tropomoduline, l'adducine et la protéine de la bande 4.1 (figure IB-17). La spectrine se retrouve liée à la membrane plasmique par l'intermédiaire du couple formé par la protéine adventice ankyrine et le dimère de bande 3, transporteur d'anions. Le complexe de jonction est lié à la protéine membranaire intrinsèque glycophorine qui se lie directement à la protéine de la bande 4.1. C'est ainsi que le cytosquelette de l'érythrocyte forme une coque fibrillaire dense sur laquelle la membrane plasmique s'appuie en entier.

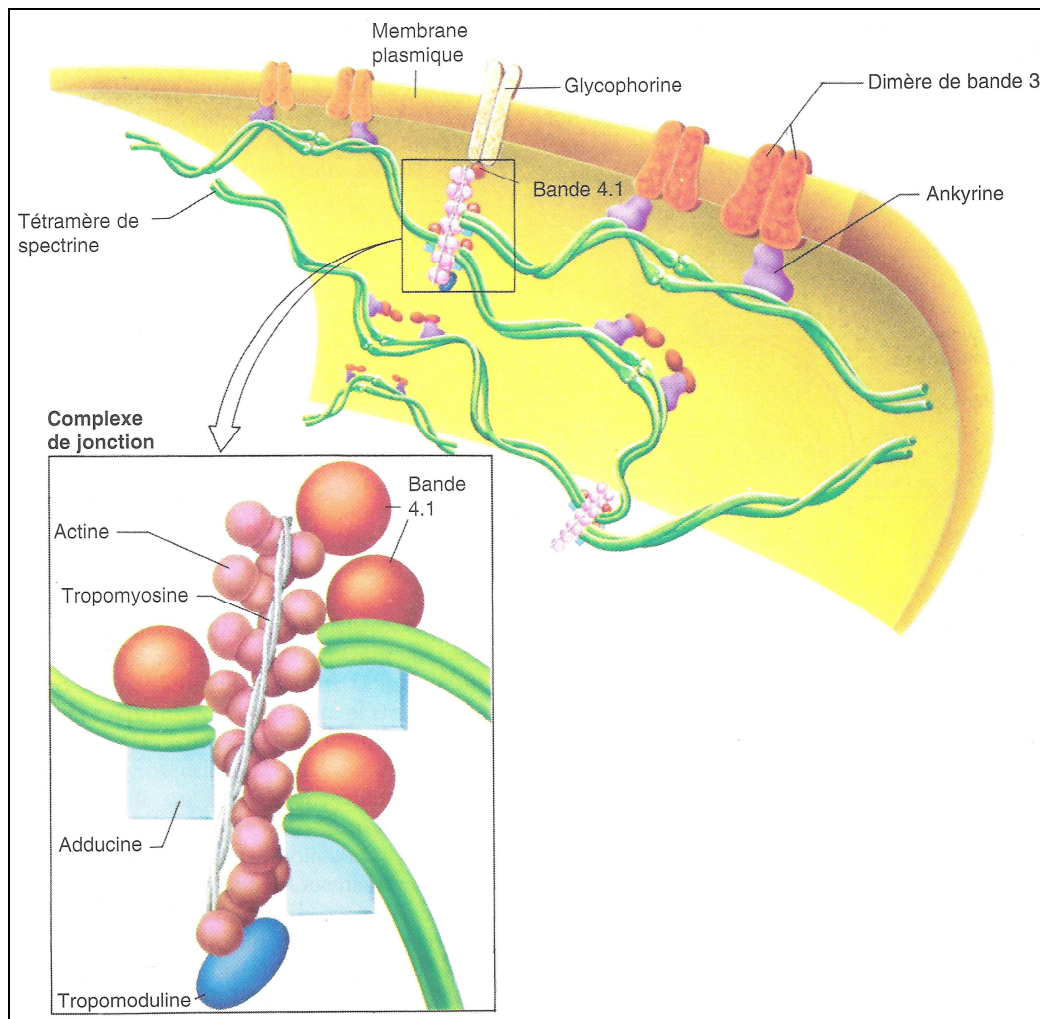


Figure IB-17 : Organisation du cytosquelette cortical érythrocytaire (Lodish, H. et al., 1997 d'après Lux, 1979 et Luna et Hitt, 1992).

### 3. La myosine

Les filaments d'actine offrent un réseau qui soutient la membrane plasmique et structure le cytosol et par sa polymérisation ils produisent une certaine motilité aux cellules. Cependant, dans beaucoup de cellules, l'actine n'intervient pas seule dans les mouvements, il y a une interaction entre les filaments d'actine et la myosine, un moteur protéique fonctionnant comme ATPase.

La myosine est une enzyme mécano-chimique qui couple l'utilisation d'ATP avec des changements de conformation ce qui permettra un glissement sur le filament d'actine. La myosine est une ATPase qui est activée par l'actine. L'activité ATPase de la myosine est multipliée par 300 dans le complexe myosine-actine par rapport à la myosine seule.

La myosine est composée de plusieurs protéines. C'est un complexe comprenant une ou plusieurs chaînes lourdes et plusieurs chaînes légères.

Il existe trois domaines structuraux et fonctionnels dans la myosine.

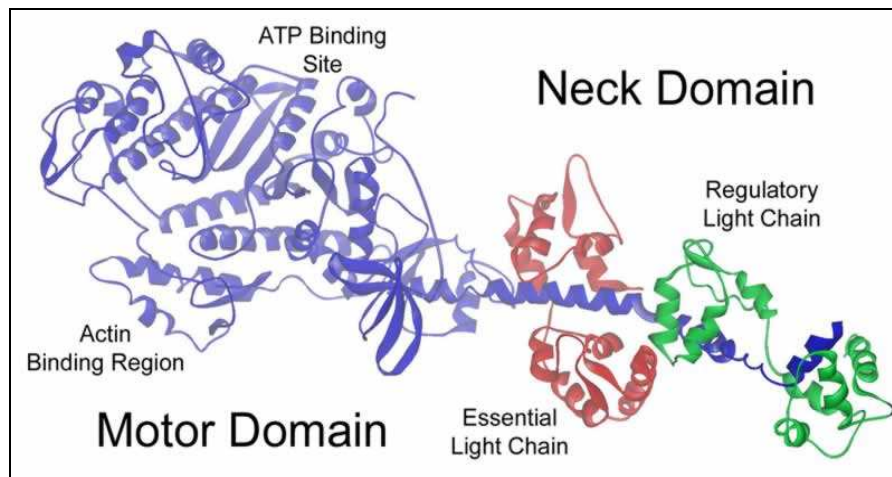


Figure IB-18 : représentation de la tête et du cou de la myosine II. En bleu, la chaîne lourde de la tête et du cou ; en rouge, la chaîne légère essentielle et en vert, la chaîne légère régulatrice. ATP binding site = site de liaison à l'ATP et Actin binding region = région de liaison à l'actine.

Le premier domaine est la tête de la myosine qui est le moteur moléculaire. Il a été montré en 1987, *in vitro*, que des têtes de myosines isolées sont capables de faire déplacer le filament d'actine (Toyoshima, Y.Y. *et al.*, 1987). Lors de l'identification de la structure 3D de la tête de la myosine (Rayment, I. *et al.*, 1993), des domaines morphologiquement différents (figure IB-18) ont été identifiés : le domaine moteur (la tête à proprement dite) et le domaine régulateur (aussi appelé le cou). Le domaine moteur représente la partie globulaire de la tête qui contient l'activité ATPase et le site de liaison à l'actine. Après le 780<sup>ème</sup> résidu, le domaine moteur devient le domaine régulateur qui est une longue hélice  $\alpha$  rigide stabilisée par l'association non-covalente à deux chaînes légères, une essentielle et une régulatrice, ou à la calmoduline. L'action motrice de la tête de la myosine est un cycle comprenant des changements de conformation, d'hydrolyse d'ATP et de liaison à l'actine. La tête agit comme un levier sur l'actine. Spudich explique en 1994 que le domaine de régulation, le cou, agirait comme un bras de levier en induisant une rotation d'environ  $60^\circ$  par rapport au domaine moteur. Le domaine régulateur détermine la distance de déplacement du filament d'actine par sa longueur (Anson, M. *et al.*, 1996). En effet, l'insertion et la délétion de site de liaison aux

chaînes légères par mutagenèse résultent respectivement en une augmentation ou une diminution de la vitesse du déplacement de l'actine (Uyeda, T.Q. *et al.*, 1996).

Le dernier domaine est la queue, partie C-terminale de la myosine. Contrairement à la tête de la myosine qui est fortement conservée dans les différentes myosines, les queues de myosine sont très diverses selon leur taille et leur séquence (Sellers, J.R. *et al.*, 1996 ; Cheney, R.E. et Mooseker, M.S., 1992). La spécificité des fonctions des différentes myosines est influencée par les variabilités de cette queue. La partie C-terminale de la myosine peut contenir des sites de liaison s'attachant à la membrane ou à d'autres queues pour former des filaments de myosine.

Il existe 18 classes de myosines différentes (Berg, J.S. *et al.*, 2001). Les plus connues sont les myosines I, II et V. Les myosines I et V, possédant des chaînes légères de calmoduline, participent aux interactions cytosquelette-membrane, notamment dans le transport des vésicules issues des membranes. La myosine I, à l'inverse de la myosine V, ne forme pas un dimère mais un monomère. La myosine II est le moteur protéique qui assure la contraction musculaire et la cytokinèse. Cette dernière forme un filament dont chaque monomère possède une chaîne légère essentielle et une chaîne légère régulatrice. L'activité ATPase de la myosine est régulée par les chaînes légères régulatrices grâce à la présence d'ions calcium ou à la phosphorylation par la kinase de chaînes myosiniques légères.

L'actine et la myosine II sont essentielles dans la scission des cellules, la cytokinèse, par la formation d'un anneau contractile au niveau de la plaque équatoriale de la cellule en fin de mitose. Cet anneau est un faisceau contractile de filaments d'actine et de myosine dont le diamètre diminue lors de la cytokinèse et la cellule est étranglée par un sillon de clivage (figure IB-19). En désactivant la myosine II chez l'amibe *Dictyostelium*, nous obtenons des cellules multinucléées puisque seule la cytokinèse est bloquée (de Lozanne, A. et Spudich, J.A., 1987 ; Wessels, D. et Soll, D.R., 1990).



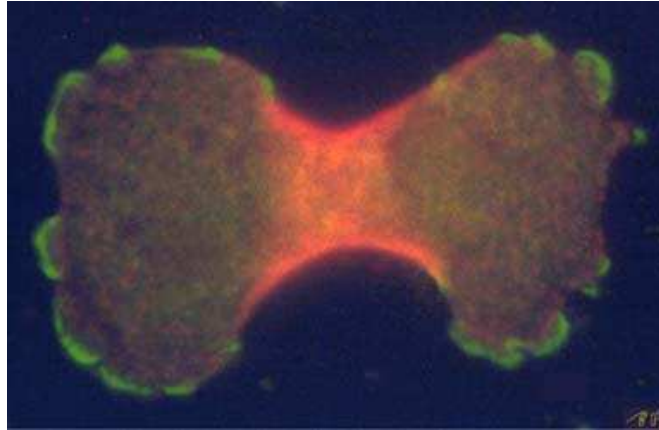


Figure IB-19 : Photographie d'une cellule lors de la cytokinèse. En rouge, la myosine II concentrée au niveau de l'anneau contractile.

#### 4. La chaîne légère régulatrice de la myosine

##### a) Régulation de la chaîne légère de la myosine

La phosphorylation au niveau Ser19/Thr18 de la chaîne légère régulatrice de la myosine II (Myl ou MLC) a pour but d'activer la myosine II (Moussavi, R.S. *et al.*, 1993). Le site de phosphorylation le plus important est Ser19 qui permet à la myosine II d'interagir avec l'actine, de former le complexe d'actinomyosine et d'initier la contraction. La phosphorylation Ser19/Thr18 permet l'assemblage du filament de myosine (Ikebe, M. *et al.*, 1988). Donc, la phosphorylation de Myl contrôle aussi bien l'assemblage de l'appareil contractile de l'actinomyosine que sa contraction. Des expériences génétiques ont également montré que cette phosphorylation est cruciale pour la division cellulaire (Komatsu, S. *et al.*, 2000).

Deux groupes d'enzymes contrôlent la phosphorylation de la chaîne légère : le premier est composé de kinases qui par phosphorylation activent Myl et le deuxième de phosphatases qui déphosphorylent Myl en inhibant son activité.

Il a été montré que plusieurs kinases peuvent phosphoryler Myl au niveau Ser19/Thr18 : MLCK "myosin light chain kinase", ROCK "Rho-kinase", PAK "p21-activated kinase", cintron-K, ILK "integrin-linked kinase", MRCK "myotonic dystrophy protein kinase" et DAPK "death-associated protein kinase comprenant ZIPK" (Somlyo, A.P. et Somlyo, A.V.,

2003 ; Matsumura, F. *et al.*, 2001 ; Shohat, G. *et al.*, 2002 ; Leung, T. *et al.*, 1998 ; Komatsu, S. et Ikebe, M., 2004). Ces kinases sont régulées par une variété d'autres molécules.

La principale phosphatase MYP (myosin phosphatase) qui déphosphoryle Myl est composée de trois sous-unités : une grande sous-unité d'environ 130kDa MYPT1 (Mynosin Phosphatase Targeting subunit 1), une sous-unité catalytique de 38kDa PP1c et une petite sous-unité de 20kDa M20 (Hartshorne, D.J. *et al.*, 2004). La fonction de M20 est encore inconnue mais MYPT1 relie la myosine et la sous-unité catalytique PP1c (Alessi, D. *et al.*, 1992). MYPT1 contient des motifs ankyrines qui seraient impliqués dans la liaison des protéines cibles (Sedgwick, S.G. et Smerdon, S.J., 1999 ; Hartshorne, D.J. *et al.*, 2004).

Il est important de noter que certains régulateurs positifs de la phosphorylation de Myl permettent aussi cette phosphorylation par inhibition de la myosine phosphatase. En effet, l'activité de MYP est inhibée par la phosphorylation de MYPT au niveau Thr695 par des kinases telles que ROCK, ZIP kinase, ILK, PAK et MRCK (Kimura, K. *et al.*, 1996 ; Endo, A. *et al.*, 2004 ; Kiss, E. *et al.*, 2002 ; Takizawa, N. *et al.*, 2002 ; Muranyi, A. *et al.*, 2001). De plus, ROCK phosphoryle MYPT1 au niveau Thr850 qui permet la dissociation de la myosine de MYP (Velasco, G. *et al.*, 2002).

Les multiples kinases contrôlant la chaîne légère de la myosine et la phosphatase sont régulées par une variété de molécules, ce qui montre la complexité du système comme le illustré figure IB-20.

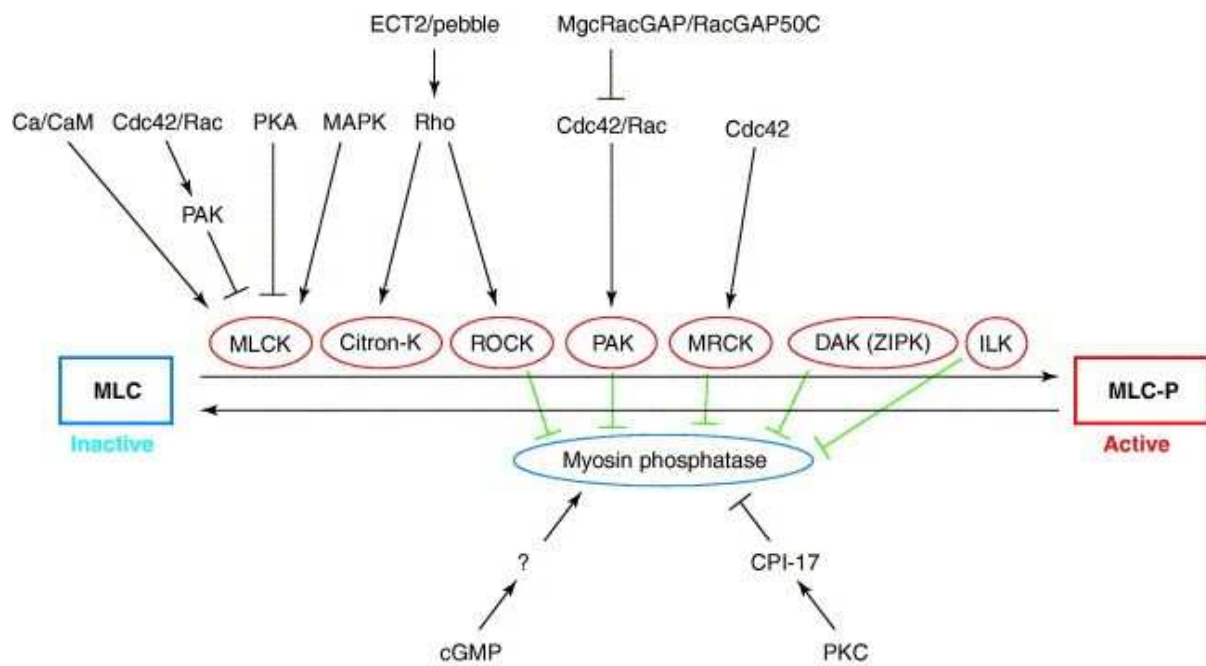


Figure IB-20 : Complexité de la régulation de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine. ↓ : activateur; ⊥ : inhibiteur. (Matsumura, F., 2005).

b) Régulation de Myl dans la cytokinèse

Il existe un grand nombre de molécules pouvant réguler la phosphorylation de Myl mais actuellement seulement quelques candidats peuvent prétendre à la régulation de Myl lors de la division cellulaire.

Quatre enzymes ont été identifiées comme localisées au niveau de l'anneau contractile : MLCK, ROCK, citron-K et MYP (Chew, T.L. *et al.*, 2002 ; Poperechnaya, A. *et al.*, 2000 ; Eda, M. *et al.*, 2001 ; Kosako, H. *et al.*, 1999 ; Madaule, P. *et al.*, 1998).

- **MLCK** a deux isoformes, une longue et une courte, contenant le domaine catalytique et le domaine régulateur Ca<sup>2+</sup>/calmoduline dans leur partie C-terminale, et dans la partie N-terminale des modules IgG et des motifs de liaison à l'actine (Kamm, K.E. et Stull, J.T., 2001). Il a été remarqué que MLCK se retrouve localisé au niveau du faisceau de clivage (Poperechnaya, A. *et al.*, 2000). De plus des analyses ont montré qu'avant la constitution du faisceau contractile, il y avait un enrichissement de MLCK suivi d'une activation de celle-ci qui reste durant la cytokinèse (Chew, T.L. *et al.*, 2002). Ces observations suggèrent que MLCK est impliquée dans l'assemblage de l'anneau contractile et dans sa contraction.

Cependant il faut préciser que des recherches, à l'aide de souris mutées pour les isoformes de MLCK, ont montré que MLCK n'est pas l'unique kinase qui active la myosine lors de la division cellulaire (Somlyo, A.V. *et al.*, 2004).

- **ROCK**, une "Rho-effector kinase", peut activer la myosine II par inhibition de MYPT1 et directement en phosphorylant Myl. ROCK et son activateur RhoA, celui-ci connu comme essentiel dans la cytokinèse (Drechsel, D.N. *et al.*, 1997), sont localisés au niveau du faisceau contractile (Kosako, H. *et al.*, 1999 ; Yonemura, S. *et al.*, 2004). De plus, la voie RhoA-ROCK est activée par une RhoGEF (ECT2) (Somers, W.G. et Saint, R., 2003 ; Tatsumoto, T. *et al.*, 1999). Dans diverses espèces animales, l'inhibition de la RhoGEF induit un blocage de l'initiation de la cytokinèse (Prokopenko, S.N. *et al.*, 1999 ; Sonnichsen, B. *et al.*, 2005). Par contre, dans les cellules de mammifère, l'initiation n'est pas bloquée mais c'est plutôt l'accomplissement de la cytokinèse qui est bloqué (Tatsumoto, T. *et al.*, 1999), ce qui suggère que la cellule de mammifère utilise d'autres activateurs que RhoA (Matsumura, F., 2005).

- **Cintron-K**, une "Rho-effector kinase", a une activité redondante à ROCK et phosphoryle Myl aux niveaux Ser19 et Thr18 (Yamashiro, S. *et al.*, 2003).

- **MYP** est une phosphatase qui agit sur Myl. Son unité MYPT1 peut être phosphorylée par deux kinases, ROCK et Aurora-B qui induiront de cette manière une inhibition de la myosine phosphatase et une activation de Myl (Kawano, Y. *et al.*, 1999 ; Yokoyama, T. *et al.*, 2005).

## 5. Conclusions

Comme discuté brièvement dans ce chapitre, nous pouvons remarquer que le cytosquelette est complexe. Il apparaît qu'un grand nombre de molécules font partie de ce cytosquelette et qu'elles sont régulées par encore un plus grand nombre de voie de régulation. Ce qui nous amène à la conclusion que dans ce domaine, il y a encore beaucoup de voies de régulation et d'intervenants protéiques à découvrir.



# **PRESENTATION DU SUJET**



Le sujet de cette thèse est axé sur la caractérisation de la fonction cellulaire de l'oncoprotéine, oncTre210p, impliquée dans différents cancers dont le sarcome d'Ewing, pour laquelle peu d'information était accessible. Cette oncoprotéine, possédant le domaine catalytique *TBC* des RabGAPs, est fortement similaire à deux protéines levuriennes Msb3p et Msb4p. En utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme organisme modèle, plus facile à utiliser expérimentalement, le laboratoire a entrepris le projet visant à caractériser la fonction cellulaire de oncTre210p par analyse comparative des produits protéiques homologues Msb3p et Msb4p.

C'est dans cette optique que la première partie du travail a été de rechercher les interactions génétiques des produits des gènes *MSB3* et *MSB4*. Afin d'isoler les protéines impliquées dans les mêmes processus cellulaires que Msb3p et Msb4p, l'approche de l'isolement de suppresseurs extragéniques, largement utilisée dans la génétique levurienne, a été appliquée. L'isolement de suppresseurs est fondé sur la correction de phénotypes du mutant levurien *msb3 msb4* par transformation génétique avec une banque d'ADN génomique de levure. Les suppresseurs isolés ont été testés pour les différents phénotypes de la levure délétée simultanément pour les deux gènes *MSB3* et *MSB4*. Nous avons ainsi pu isoler des suppresseurs homologues extragéniques multicopies qui nous indiquent dans quelles voies physiologiques les deux protéines levuriennes sont impliquées. Ça qui nous laisse supposer que l'oncoprotéine oncTre210p pourrait aussi être impliquée dans l'une ou l'autre de ces voies.

Dans la deuxième partie, la levure n'est plus utilisée comme modèle mais comme outil d'étude. En effet, nous avons recherché les interactions directes de oncTre210p et plus particulièrement de ses deux domaines (« Tre-GAP » et « Tre-REN-60 ») à l'aide de la technique double-hybride en levure. Ces expériences ont permis de cibler les voies physiologiques dans lesquelles la protéine oncTre210p est impliquée (l'apoptose cellulaire, la transmission de signaux, l'organisation du cytosquelette, l'adhérence cellulaire et le trafic vésiculaire). De plus, nous avons choisi deux partenaires et vérifié la réalité des interactions identifiées.

L'entièreté des résultats nous a permis de mieux cibler les fonctions biologiques de oncTre210p ainsi que de Msb3p et Msb4p.

De plus, chacune de ces parties a fait l'objet d'une publication.





**ETUDES DES INTERACTIONS  
GENETIQUES DE Msb3p ET Msb4p**



## *I. Introduction*

---

Les protéines Msb3p et Msb4p de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont des membres de la famille des protéines « Ypt/Rab-GTPase activating protein » (Ypt/RabGAP). Ces protéines sont essentielles dans le trafic vésiculaire et sont impliquées dans la régulation de l'exocytose et dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Mais, leurs rôles biologiques exacts n'ont jamais été déterminés. La délétion simultanée des 2 gènes *MSB3* et *MSB4* dans la levure *S. cerevisiae* induit une inhibition de croissance de la levure sur un milieu de culture contenant du DMSO et/ou de la caféine, perturbe l'organisation du cytosquelette d'actine, produit une anomalie de bourgeonnement dans la levure diploïde et affecte la ségrégation des noyaux (Bach, S. *et al.*, 2000 ; Bizimungu, C. *et al.*, 2003). Pour trouver des composants qui interagissent génétiquement avec les produits des gènes *MSB3* et *MSB4*, nous avons criblé une banque génomique pour des supresseurs homologues extragéniques multicopies restaurant la croissance normale du double mutant levurien *msb3 msb4* en présence de DMSO et de caféine. Sept gènes ont ainsi été identifiés après une série de vérifications. De plus ces supresseurs ont été testés pour les corrections des autres phénotypes du double mutant levurien *msb3 msb4*.

## ***II. Isolement des supprimeurs homologues extragénomiques multicopies***

---

### ***1. Criblage de la banque génomique pour des supprimeurs multicopies***

Le double mutant *msb3 msb4* diploïde (souche FyBLT3-YN), montre une inhibition de croissance en présence de DMSO et caféine (Bach *et al.*, 2000, Bizimungu *et al.*, 2003). La sensibilité à la caféine est souvent associée à un défaut au niveau de la voie des MAP kinases (Hampsey, 1997). L'effet biologique du DMSO dans la levure n'est pas encore clair, mais serait impliqué dans le clivage de la cellule mère en deux cellules filles chez *Schizosaccharomyces pombe* (Poloni et Simanis, 2002), faciliterait la biosynthèse des phospholipides et la prolifération de la membrane cellulaire chez *S. cerevisiae* (Murata *et al.*, 2003). Afin d'identifier les protéines qui interagissent génétiquement avec Msb3p et Msb4p, la souche FyBLT3-YN a d'abord été transformée à l'aide d'une banque génomique multicopie de *S. cerevisiae* YNL2b où *MSB3* et *MSB4* sont délétés. Une première sélection des souches transformées a été réalisée sur un milieu de culture minimum complété avec les éléments requis pour un développement spécifique des cellules URA3<sup>+</sup> ayant donc incorporé un plasmide.

Le criblage a été ensuite entrepris par l'étalement d'un minimum d'environ 100 000 clones URA3<sup>+</sup> sur un milieu riche YPD contenant simultanément du DMSO (4%) et de la caféine (10mM) de manière à augmenter le pouvoir de sélection afin de diminuer l'apparition de résistance naturelle due à des mutations spontanées. Les clones positifs résistants ont été repiqués sur milieu de sélection afin d'identifier la présence du plasmide. Les plasmides ont alors été récupérés et transformés de nouveau dans le double mutant pour retester les phénotypes de résistance en présence de caféine ou de DMSO. Seuls 25 clones ont présenté une forte correction des deux phénotypes de croissance.

Etant donné que dans deux clones (S8 et S18), deux gènes sont présents simultanément sur le même fragment d'ADN, des expériences de sous-clonage ont été réalisées pour identifier les gènes responsables de la suppression d'inhibition de croissance sur milieu contenant de la caféine et du DMSO (tableau EIG-1).

Clone	Gène	Taille ORF	Sous-clonage	Amorces
S8 (2900 pb)	VPS35	3066 pb	1-2301	VPS35-3' / YEP356-5'
	FBP26	1359 pb	1760-2900	FBP26-5' / YEP356-3'
S18 (2310 pb)	COX6	447 pb	1-1233	COX6-3' / YEP356-5'
	CIC1	1131 pb	968-2310	CIC1-3' / YEP356- 3'

Tableau EIG-1 : Les sous-clonages réalisés sur les clones S8 et S18. La colonne «sous-clonage» correspond à la position des sous-clones par rapport à l'insert de départ.

Le sous-clonage des deux clones S8 et S18 (figure EIG-1) indique que seul VPS35 est responsable de la suppression d'inhibition de croissance pour le clone S8 et CIC1 (YHR052w) pour le clone S18.

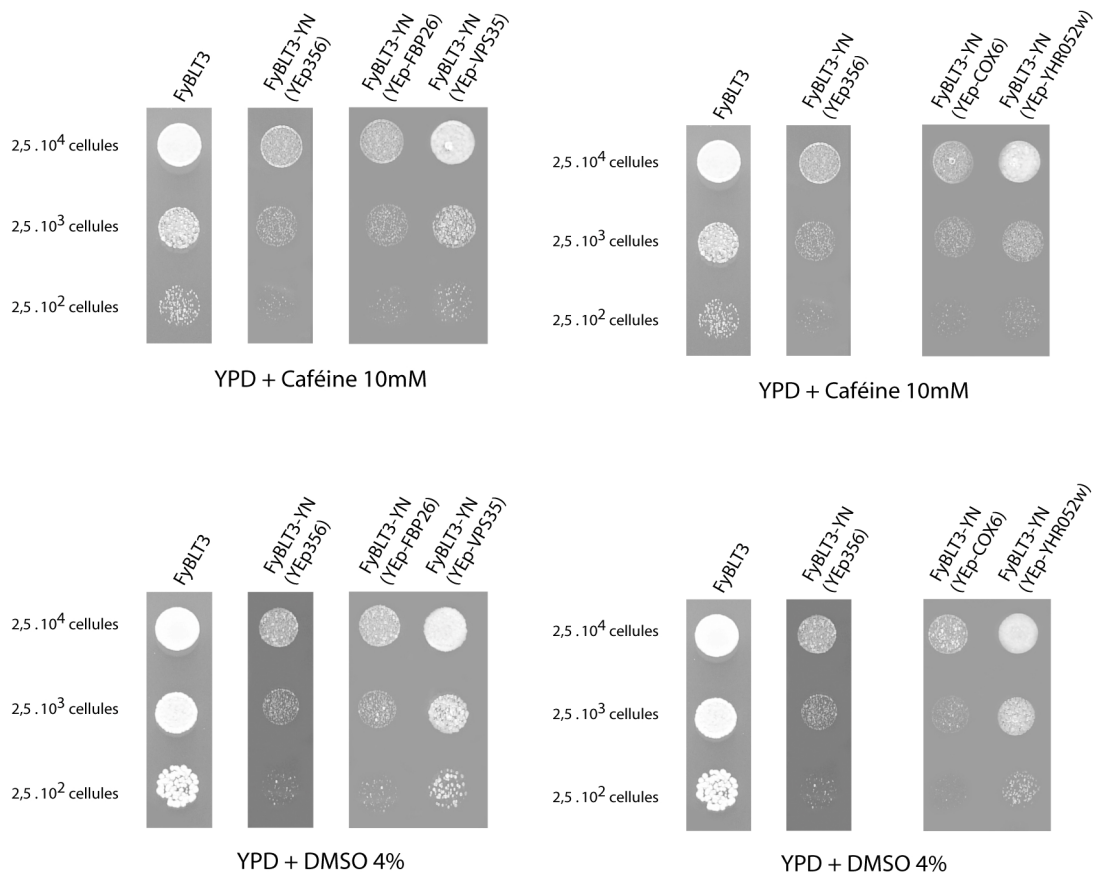


Figure EIG-1 : Tests de croissance des sous-clonages pour les candidats S8(à gauche) et S18 (à droite) en présence de DMSO et caféine.

Sept inserts indépendants ont été identifiés après sous-clonage et séquençage. Les ORFs identifiées sont reprises dans le tableau suivant.

<b>Classe</b>	<b>Nom du clone</b>	<b>Nom du gène</b>	<b>Catégorie fonctionnelle</b>
1	S6	<i>SEC7</i>	Transport vésiculaire
	S8	<i>VPS35</i>	
	S22	<i>USO1</i>	
2	S3	<i>SAP155</i>	Cycle cellulaire
3	S24	<i>SSZ1</i>	HSP70 chaperon moléculaire
4	S18	<i>CIC1</i>	Protéasome
5	S9	25S ARNr	ARN ribosomal

*Tableau EIG-2 : Gènes en copies multiples supprimant l'inhibition de croissance sur DMSO et caféine du double mutant *msb3 msb4*.*

La figure de la page suivante illustre les tests phénotypiques de croissance en présence de DMSO et caféine pour les souches transformées par les 7 supprimeurs. Comme contrôles, nous avons utilisé la souche diploïde sauvage (FyBLT3) et la souche doublement mutée (FyBLT3-YN). Nous avons aussi utilisé comme contrôle négatif le double mutant transformé par le vecteur multicopie YEp356 et par le plasmide synthétisant oncTre210p (pYX-oncTre210); et comme contrôle positif le mutant exprimant Msb4p (pYX-MSB4).

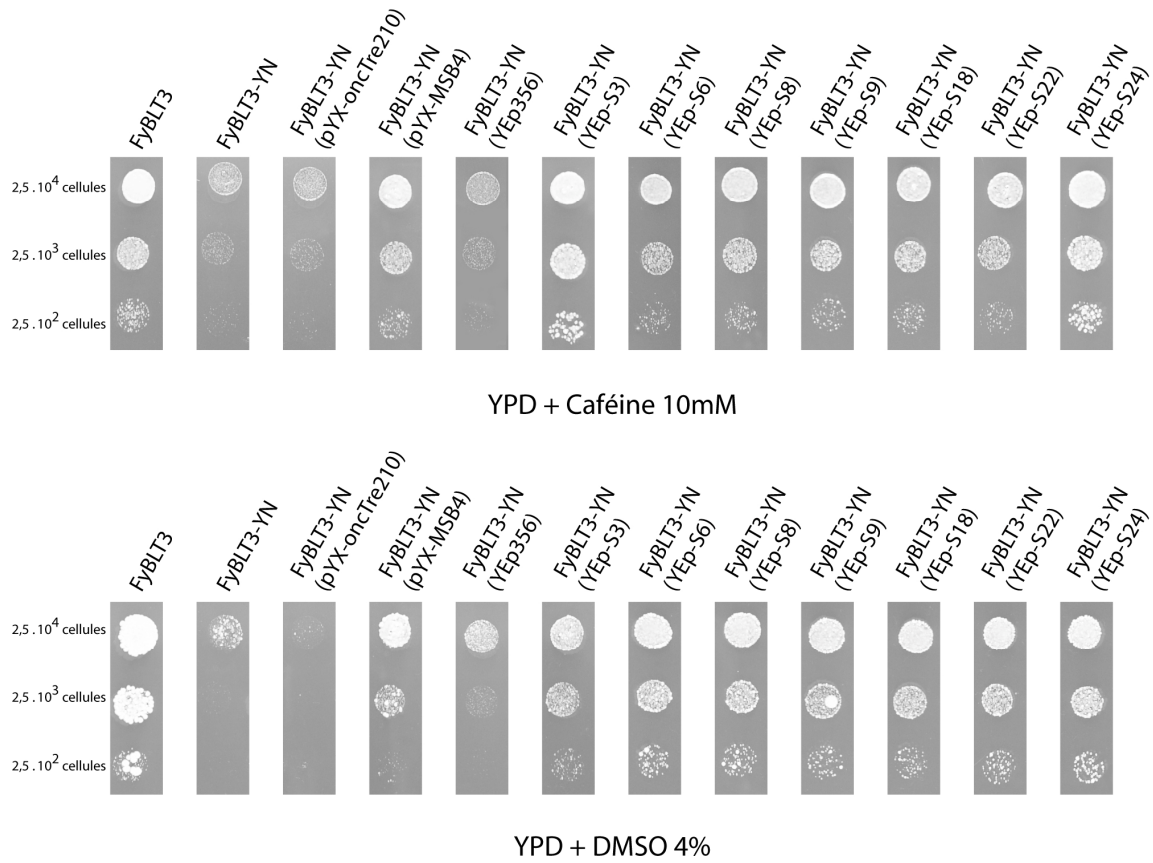


Figure EIG-2 : Tests de croissance des 7 candidats suppresseurs levuriens en présence de DMSO et caféine.



### *III. Observation des corrections des autres phénotypes associés à la double mutation*

---

#### *1. Introduction*

Comme précédemment cité, d'autres phénotypes sont liés à la double mutation. En effet, la souche diploïde FyBLT3-YN observée sous microscope ne présente plus des cellules de forme ellipsoïdale (caractéristique des cellules de levure développant un axe de polarisation de la croissance) avec maximum un bourgeon. De plus, cette souche montre un défaut de ségrégation du noyau lors de la mitose et une désorganisation de cytosquelette d'actine.

La correction de ces différents phénotypes liés à la délétion simultanée de *MSB3* et *MSB4* a été vérifiée pour chaque suppresseur isolé.

Enfin, un phénotype lié à l'inactivation seule de *MSB3*, à savoir la sensibilité au cadmium présent dans le milieu de culture, a été testé pour les différents suppresseurs multicopies.

#### *2. Morphologie des cellules et organisation du noyau*

La morphologie des cellules diploïdes FyBLT3 au cours de la phase de croissance exponentielle montre des cellules ellipsoïdales présentant en majorité un seul bourgeon. Par contre, les cellules diploïdes mutées en *MSB3* et *MSB4* (FyBLT3-YN) ainsi que ces cellules contenant le vecteur YEp356, arborent plusieurs bourgeons et ont une forme plus ronde et moins régulière que les cellules sauvages. Nous pouvons voir que Msb4p complète bien la double mutation en rétablissant la morphologie sauvage. Lors de l'observation de la souche FyBLT3-YN exprimant les différents suppresseurs isolés, une correction parfaite de la morphologie de la levure a été remarquée (figure EIG-3).

La visualisation des cellules sauvages, par marquage au DAPI, nous montre une bonne ségrégation des noyaux lors de la mitose : un seul noyau par cellule, une bonne migration vers le site de bourgeonnement et à la fin de la mitose une bonne séparation afin de donner un noyau aux deux cellules filles après cytokinèse. Cela n'est pas le cas pour le double mutant où nous observons un phénomène d'endomitose. Comme pour la morphologie, une correction

parfaite du défaut est observée suite à l'expression du gène *MSB4* et des gènes suppresseurs (figure EIG-3).

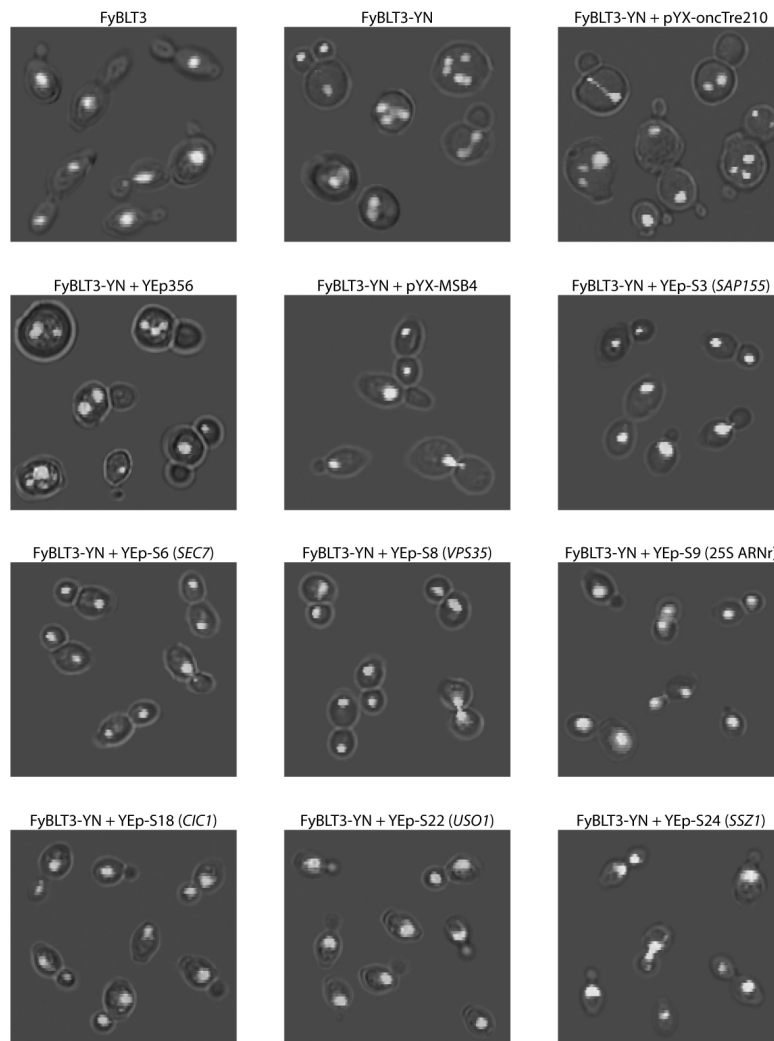


Figure EIG-3 : Observation de la morphologie des cellules et de l'organisation du noyau (marquage DAPI)

### 3. Organisation du cytosquelette d'actine

Afin d'observer l'organisation du cytosquelette d'actine, l'actine des levures a été marquée et observée au microscope à fluorescence. La figure de la page suivante montre les résultats obtenus.

Pour la souche sauvage FyBLT3, l'actine se concentre au niveau de l'émergence du bourgeon, au sein des bourgeons de petite et moyenne taille et des filaments d'actine orientés vers le

bourgeon. A l'inverse, la souche diploïde FyBLT3-YN (mutant *msb3 msb4*) et celle transformée par le vecteur YEp356 présentent une délocalisation de l'actine, le déséquilibre entre cellule mère et bourgeon n'est plus observé.

Les levures doublement mutées qui expriment les suppresseurs présentent une organisation du cytosquelette d'actine comparable à celle de la souche sauvage.

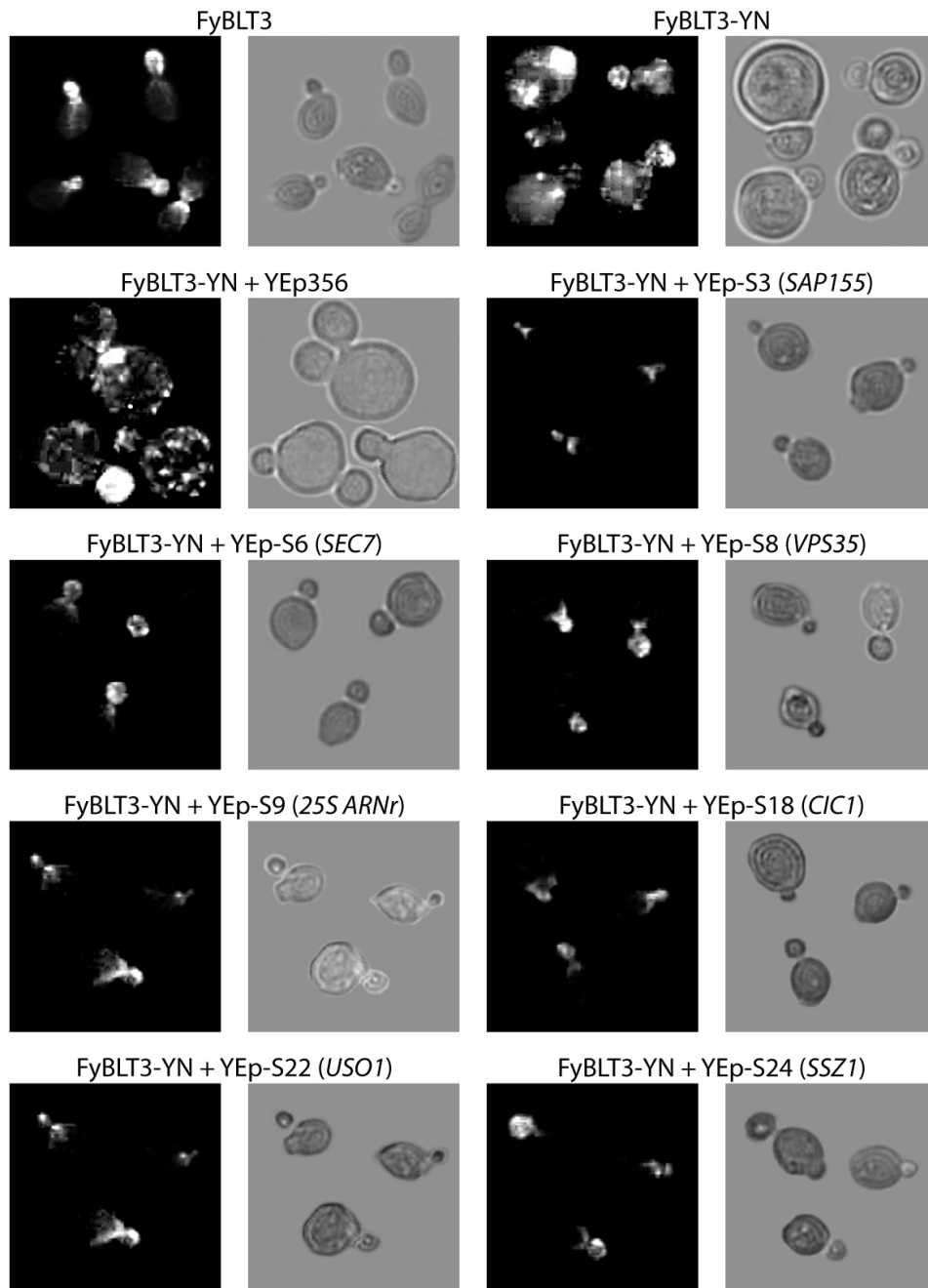


Figure EIG-4 : Observation de l'organisation du cytosquelette d'actine (marquage phalloïdine)

#### 4. Sensibilité au cadmium

Les phénotypes mentionnés précédemment sont observables seulement quand *MSB3* et *MSB4* sont délétés simultanément. Jusqu'à maintenant, nous n'avons pas été capable de dissocier les rôles de ces deux gènes levuriens, que ce soit au niveau des phénotypes associés au cytosquelette d'actine, du cycle cellulaire et de l'exocytose.

Lors d'expérience à grande échelle de recherche de phénotypes associés à des délétants levuriens, il a été montré que la croissance d'une levure haploïde mutée en *MSB3* est inhibée en présence de cadmium (Bianchi *et al.*, 2001).

Dans une première étape, les différentes souches diploïdes disponibles au laboratoire ont été testées sur milieu contenant du cadmium : il s'agit de FyBLT3 (la souche sauvage diploïde), FyBLT3-Y (mutant *msb4*), FyBLT3-N (mutant *msb3*) et FyBLT3-YN (double mutant *msb3 msb4*). Dans la figure EIG-5/A, les résultats ont montré que les observations faites par Bianchi *et al.* étaient aussi valables pour nos souches diploïdes. Nous voyons donc que l'inhibition de croissance sur cadmium requiert la seule mutation du gène *MSB3*. Le produit du gène *MSB4* ne peut complémenter la délétion de *MSB3* en présence de cadmium. Ceci fait penser que *MSB3* aurait un rôle supplémentaire.

La seconde étape a été de vérifier si les suppresseurs isolés corrigent le phénotype lié à *MSB3*. Comme le montre la figure EIG-5/B, aucune correction de l'inhibition de croissance n'est observée. Ce qui renforce l'idée que *MSB3* pourrait aussi agir au sein d'une autre voie cellulaire.

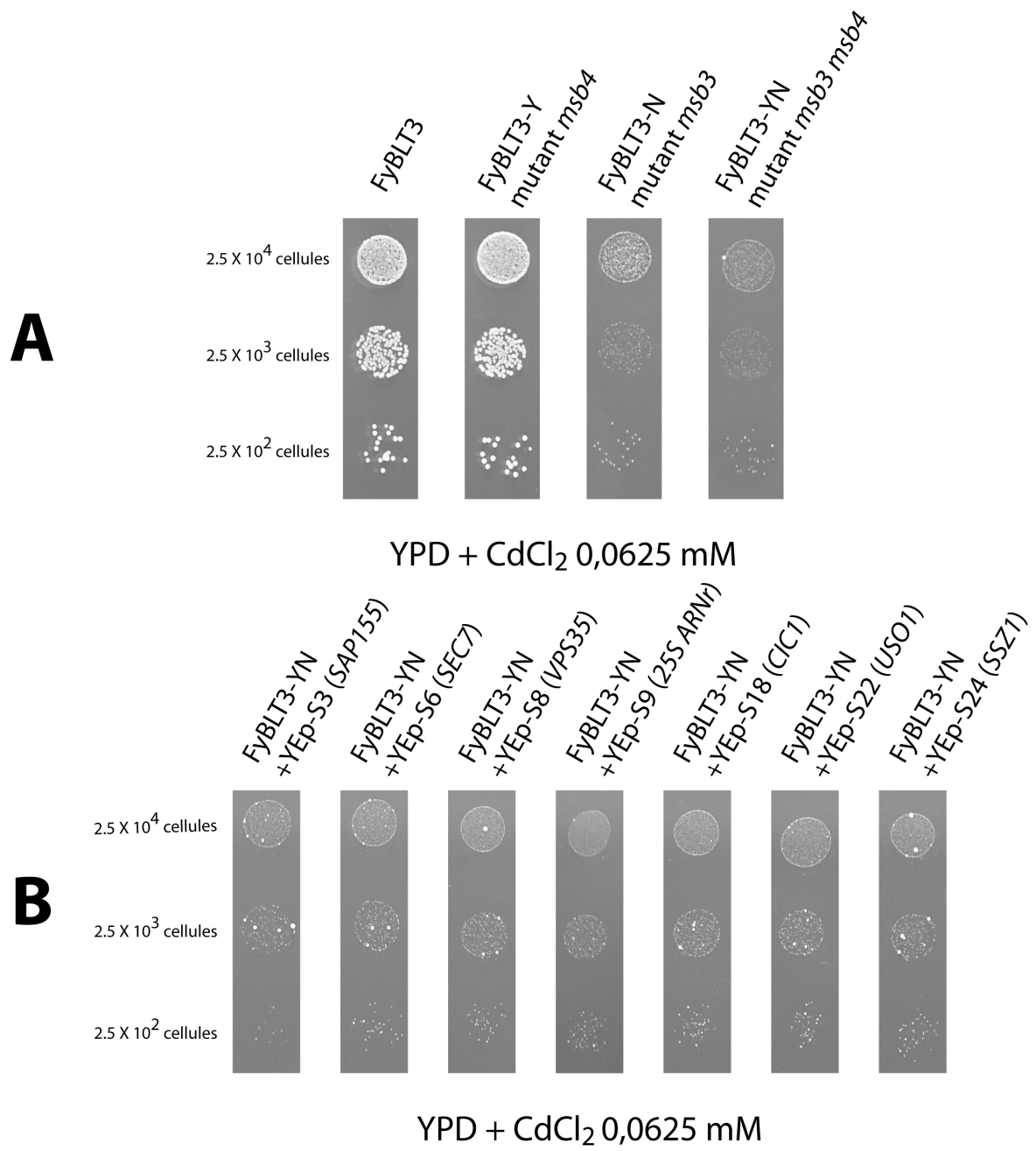


Figure EIG-5 : Test de résistance/sensibilité au cadmium.

## IV. Présentation des supresseurs

### 1. Classe : Trafic vésiculaire (3 candidats)

Dans cette classe, trois supresseurs indépendants provenant des clones S6, S8 et S22 ont été isolés. Sur la figure suivante, les cartes structurales des séquences des trois candidats levuriens supresseurs sont illustrées. Nous pouvons voir que les gènes impliqués dans la suppression sont *SEC7*, *VPS35*, et *USO1*.

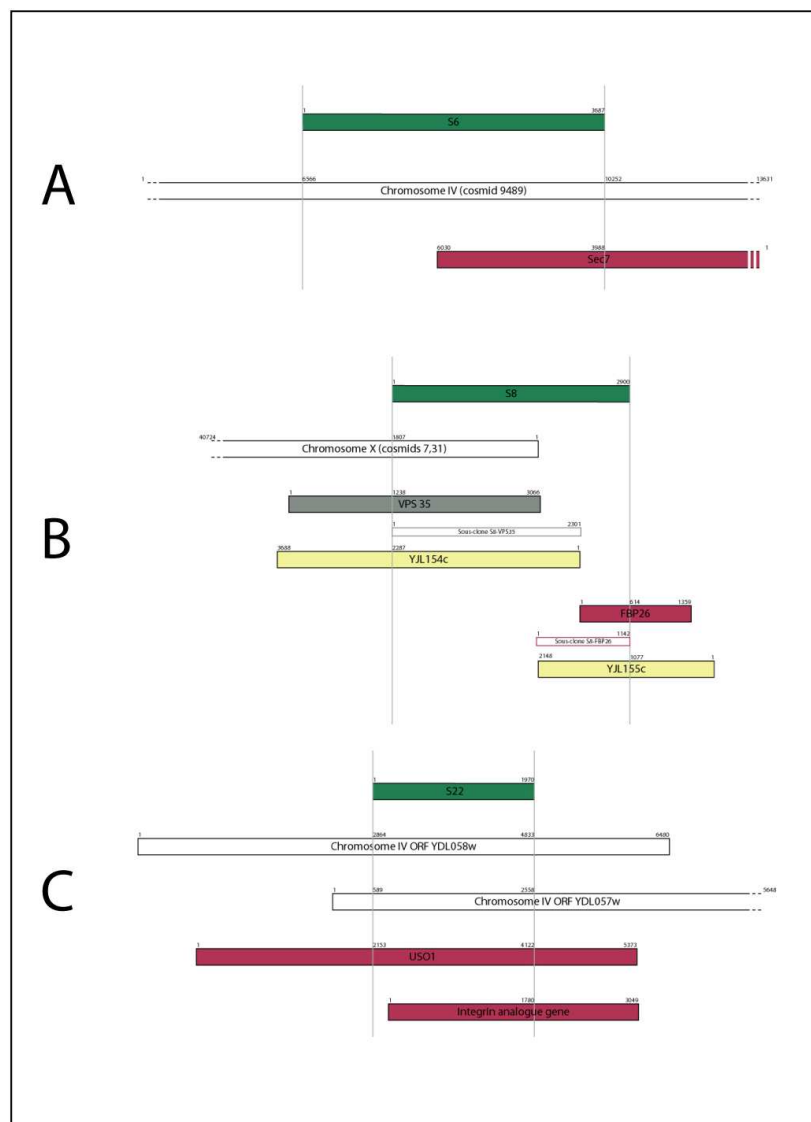


Figure EIG-6 : Cartes structurales des séquences des trois supresseurs de la classe trafic vésiculaire. A : clone S6 (*Sec7*); B : clone S8 (*VPS35*) et C : clone S22 (*USO1*). Illustré en vert : l'insert; en rouge, jaune ou gris : les ORFs; en blanc : la séquence située par rapport au chromosome et en encadré couleur, les inserts sous-clonés.

Le produit du gène *SEC7*, une ArfGEF (Arf Guanine nucleotide Exchange Factor), joue un rôle dans le trafic vésiculaire en interagissant avec Ypt1p, une YptGTPase, entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi ainsi que dans le transport intra-Golgi (Bacon *et al.*, 1989). De plus, dans un mutant *SEC7*, le transport protéique au sein de l'appareil de Golgi est bloqué (Franzusoff et Schekman, 1989). Sec7p joue un rôle central dans la régulation des transitions nécessaires à la biogenèse et à la maturation du Golgi levurien (Deitz *et al.*, 2000).

Vps35p est une protéine membranaire impliquée dans le recrutement et la sortie de protéines cargos spécifiques du compartiment prévacuolaire. Elle intervient dans le contrôle de la localisation et du recrutement intracellulaire de plusieurs protéines comme Vps10p qui est un récepteur de sortie pour des hydrolases vacuolaires solubles (Seaman *et al.*, 1997 ; Seaman *et al.*, 1998). En effet, il a été démontré que cinq protéines membranaires (Vps35p, Vps29p, Vps26p, Vps5p et Vps17p) s'assemblent au niveau de la membrane de l'endosome pour former un complexe multimérique, dit rétromère (figure EIG-7). Ce complexe membranaire récupère directement et sélectivement les molécules cargos vésiculaires de l'endosome vers le Golgi. Ce rétromère se subdivise en deux sous-complexes : un sous-complexe avec les protéines Vps35p, Vps29p, Vps26p qui sont impliquées dans le recrutement et la sortie de protéines cargos spécifiques au niveau du compartiment prévacuolaire et un sous-complexe avec les protéines Vps5p et Vps17p qui jouent un rôle structural dans la formation et le bourgeonnement des vésicules (Seaman *et al.*, 1998).

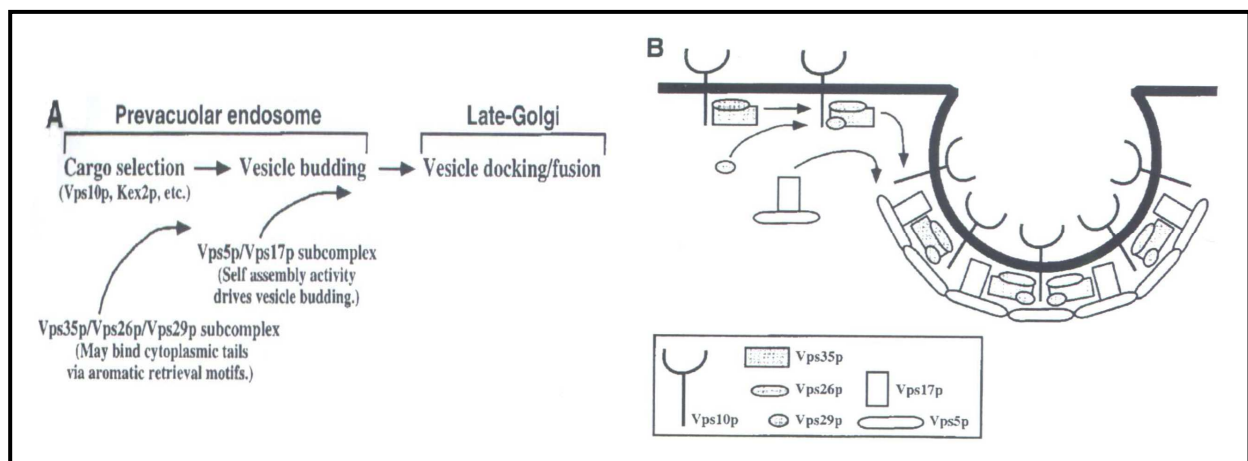


Figure EIG-7 : (A) Modèle schématique du mécanisme de la formation des vésicules (B) Schéma des deux sous-complexes du rétromère s'assemblant au niveau de la membrane de l'endosome (emprunté à Seaman *et al.*, 1998).

Uso1p est nécessaire dans le ciblage et la fusion des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique avec la membrane de l'appareil de Golgi, dans lequel Ypt1p joue un rôle (Sapperstein *et al.*, 1996). Uso1p active le v-SNARE permettant ainsi de former le complexe v-SNARE/t-SNARE (Sapperstein *et al.*, 1996).

## 2. Classe : Cycle cellulaire (1 candidat)

Le clone S3 a été identifié comme étant le gène *SAP155* qui code une protéine impliquée dans le cycle cellulaire (figure EIG-8).

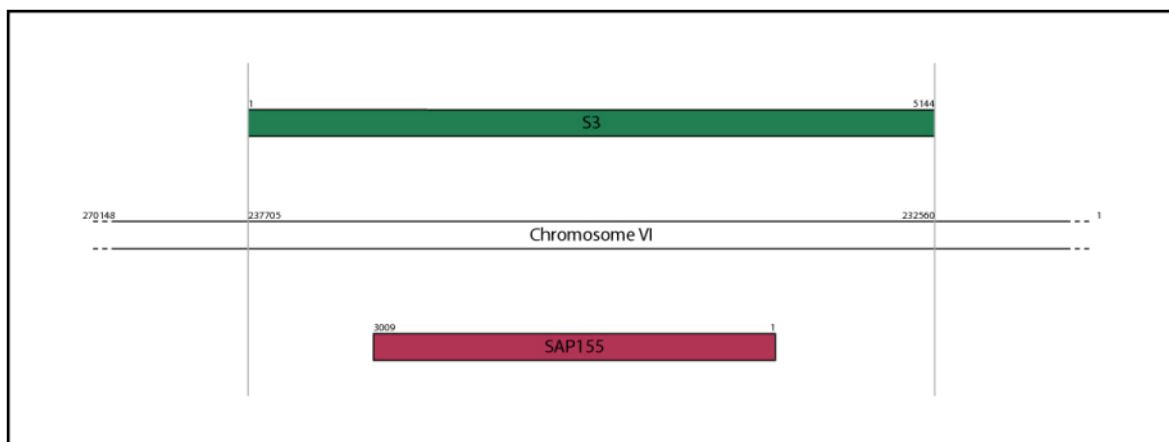


Figure EIG-8 : Carte structurale de la séquence issue du candidat levurien suppresseur *SAP155*. Illustré en vert : l'insert; en rouge : l'ORF et en blanc : la séquence située par rapport au chromosome

Sap155p est une phosphoprotéine de la famille des SAPs (Sit4p-Associated Proteins), des protéines de haut poids moléculaire qui s'associent physiquement avec Sit4p au cours du cycle cellulaire. La protéine Sit4p, sous-unité catalytique d'une protéine phosphatase de *S. cerevisiae*, va intervenir dans l'exécution du point START (en fin de phase G1) et la progression au cours de la phase S du cycle cellulaire (Sutton *et al.*, 1991). Sit4p est nécessaire pour les fonctions biologiques de Pkc1p (de la Torre-Ruiz *et al.*, 2002), une protéine kinase C impliquée dans le bourgeonnement, la progression du cycle cellulaire, la régulation du métabolisme des parois cellulaires et l'organisation du cytosquelette.

Différentes observations montrent que les protéines SAPs fonctionnent positivement et de façon interdépendante avec Sit4p. En effet, chacune des protéines SAPs surexprimées



supprime le phénotype thermosensible du mutant *sit4* et l'inactivation des gènes *SAPs* ou *SIT4* dans les cellules engendre un phénotype léthal ou un taux de croissance lent avec un retard en phase G1. Ces différentes données suggèrent donc que les protéines *SAPs* sont non fonctionnelles en l'absence de Sit4p et inversement : les protéines *SAPs* sont donc soit des activateurs positifs de la phosphatase Sit4p, soit des effecteurs de Sit4p (Luke *et al.*, 1996).

De plus, le gène *SAP155* a été identifié comme étant le seul gène *SAP* à pouvoir conférer une résistance à la zymocine, un inhibiteur qui bloque les cellules en phase G1 du cycle cellulaire antérieurement au bourgeonnement et à la réplication de l'ADN (Jablonowski *et al.*, 2001).

### 3. Classe : Chaperon moléculaire (1 candidat)

Dans cette classe, Le clone S24 a été identifié comme étant le gène *SSZI* (ou *HSP70/YHR064c*) qui code pour un chaperon moléculaire (figure EIG-9).

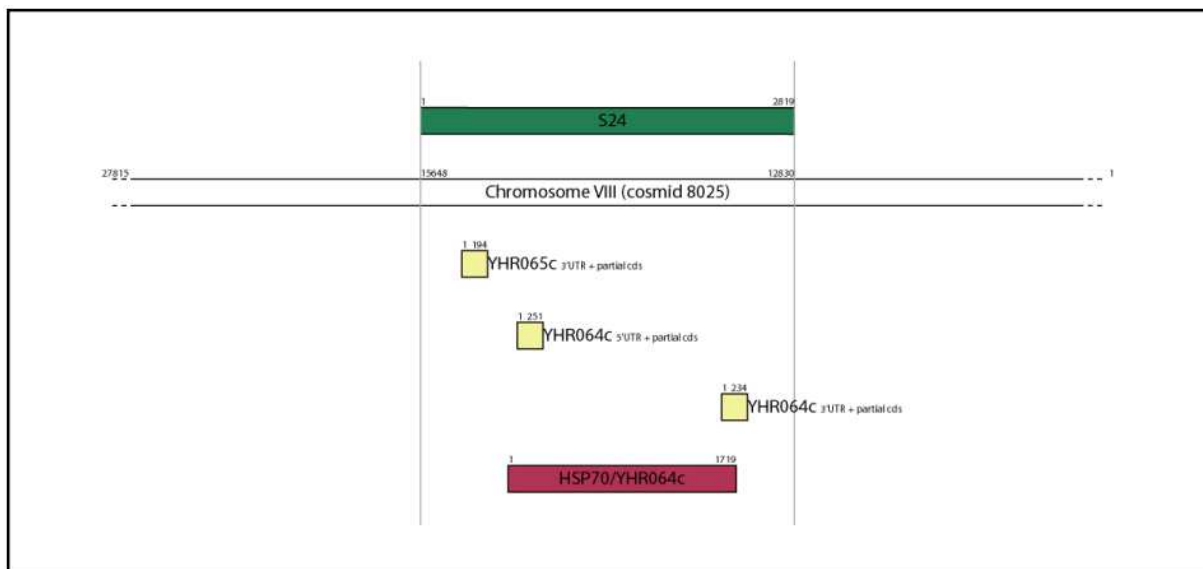


Figure EIG-9 : Carte structurale de la séquence du candidat levurien suppresseur S24. Illustré en vert : l'insert; en rouge : l'ORF; en jaune : les UTRs et en blanc : la séquence située par rapport au chromosome

Ssz1p, chaperon moléculaire, est un membre de la famille HSP70 des Heat Shock Proteins montrant une activité ATPase (Hundley *et al.*, 2002). Les chaperons moléculaires sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires importants de repliement de la chaîne

polypeptidique en cours de synthèse, de translocation des protéines au travers des membranes, d'assemblage et désassemblage de complexes et de dégradation des protéines (Hartl, 1996).

Ssz1p a été identifié comme étant un régulateur positif de Pdr1p, facteur transcriptionnel qui contrôle et régule l'expression des gènes *PDR5* et *YORI*, appartenant à la superfamille des ABC (ATP-Binding Cassette) codant des facteurs de résistance à différentes drogues (Hallstrom *et al.*, 1998).

Ssz1p forme un complexe stable avec Zuo1p, protéine de la famille des HSP40. Ce complexe est associé aux ribosomes via la sous-unité zuotine de la protéine Zuo1p. Ce complexe RAC (Ribosome-Associated Complex) stimule la translocation dans les mitochondries d'une protéine précurseur mitochondriale liée au ribosome. Les deux protéines Ssz1p et Zuo1p constituent ainsi une nouvelle paire fonctionnelle de chaperons partenaires Hsp70:Hsp40 (Michimoto *et al.*, 2000 ; Gautschi *et al.*, 2001). Hsp40 fixe les protéines déployées et stimule l'activité ATPase de Hsp70 (Hundley *et al.*, 2002).

#### 4. Classe : Protéasome (1 candidat)

Dans cette classe, le clone S18 a été identifié comme étant le gène *CIC1* (ou *YHR052w*) qui code pour une protéine impliquée dans le protéasome (figure EIG-10).

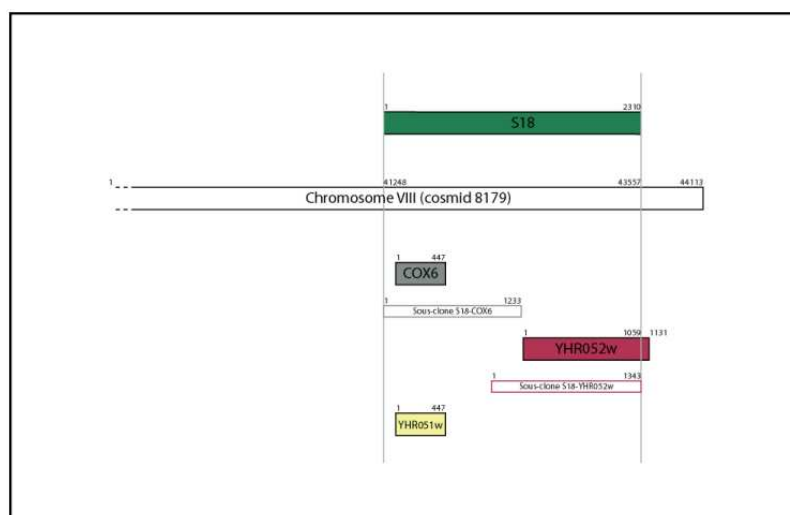


Figure EIG-10 : Carte structurale de la séquence du candidat levurien suppresseur S18. Illustré en vert : l'insert; en rouge et jaune : les ORFs; en blanc : la séquence située par rapport au chromosome et en encadré couleur, les inserts sous-clonés.

Cic1p (Core-Interacting Component) est une protéine localisée dans le noyau et associée avec le protéasome 26S (Jager *et al.*, 2001). Ce protéasome 26S (complexe protéique de 2,4 MDa), qui a la capacité de dégrader les protéines polyubiquitinylées, est essentiel pour assurer les fonctions vitales de la cellule, notamment la réparation de l'ADN, l'apoptose, l'endocytose et la régulation du cycle cellulaire (Hershko A. et Ciechanover A., 1998 ; Schwartz A.L. et Ciechanover A., 1999).

Cic1p est impliquée dans la dégradation de deux protéines F-box, Cdc4p et Grr1p, qui permettent l'interaction entre les protéines qui doivent être dégradées et la machinerie d'ubiquitination. Ces protéines Cdc4p et Grr1p sont des composants instables du complexe SCF (Skp1p – Cullin – F-box protein) qui sont rapidement dégradés *in vivo* via le système protéasome ubiquitine-dépendante durant le cycle cellulaire (Li et Johnston, 1997 ; Kishi *et al.*, 1998 ; Zhou P. et Howley P., 1998 ; Galan J.-M. et Peter M., 1999 ; Mathias *et al.*, 1999).

D'après ces différentes observations, il a été établi que Cic1p jouerait un rôle d'adaptateur entre le complexe SCF et le protéasome 26S (Jager *et al.* 2001). La fonction d'un adaptateur peut résider dans la garantie d'une dégradation sûre et rapide d'un certain nombre de protéines régulatrices en dehors de la multitude de substrats ubiquitinylés, lesquels, plus particulièrement sous des conditions de stress, inondent la machinerie protéolytique

##### 5. Classe : ARN ribosomal (1 candidat)

Dans cette classe, le clone S9 a été identifié comme étant les ARNs ribosomiaux 25S rRNA et 26S rRNA (figure EIG-11).

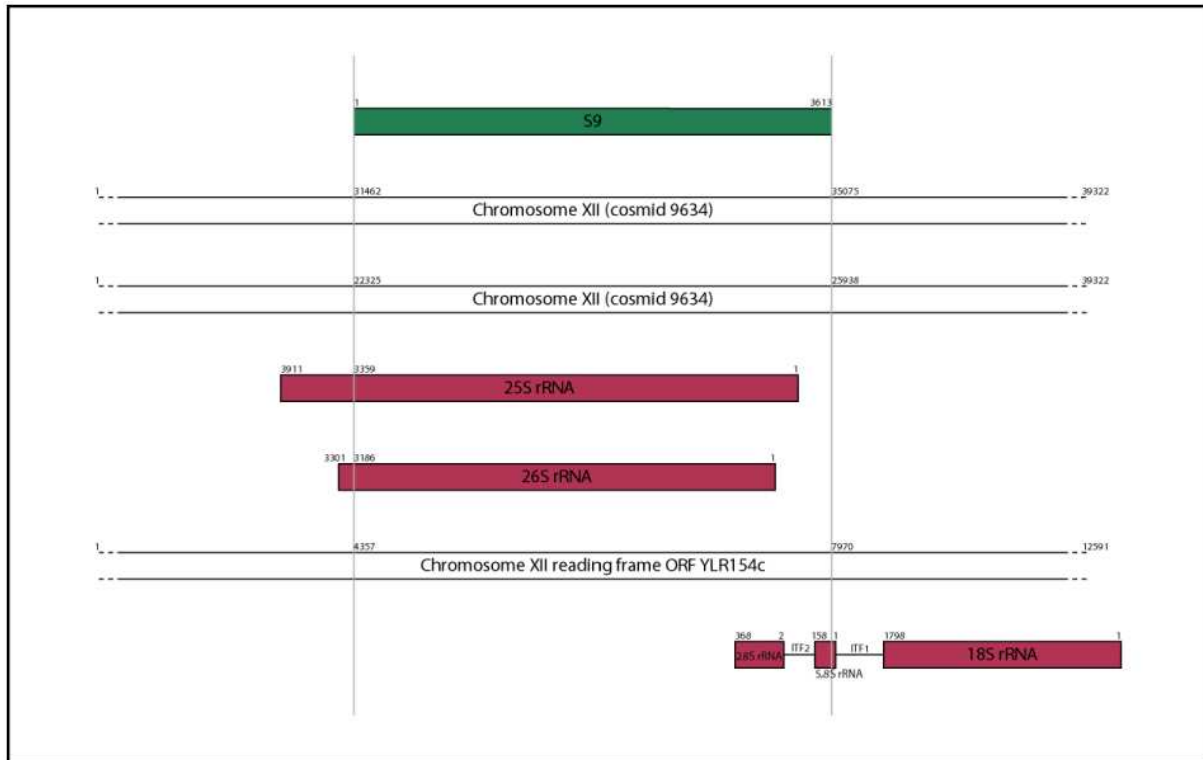


Figure EIG-11 : Carte structurale de la séquence du candidat levurien suppresseur S9. Illustré en vert : l'insert; en rouge : les ARNs et en blanc : la séquence située par rapport au chromosome

Le ribosome est un complexe composé de molécules d'ARN et de plus de 50 protéines, toutes réparties en un gros (60S) et un petit élément (40S). Dans notre cas, l'ARNr 25S fait partie du gros élément avec les ARNr 5,8S et 5S. Tandis, que l'ARNr 18S est présent dans le petit élément 40S. Les ARNr 25S, 5,8S et 18S sont produits au sein du nucléole à partir d'un même transcrit appelé transcrit primaire pré-ARNr 35S (6,6 kb) grâce à l'ARN polymérase I. L'ARNr 5S est formé par l'ARN polymérase III dans le nucléoplasme entourant le nucléole. Cet ARNr migrera ensuite dans le nucléole pour former le gros élément ribosomial avec les ARNr 25S et 5,8S.

De plus, il a été découvert que le brin anti-sens de l'ADN ribosomal 25S de la levure *Saccharomyces cerevisiae* code une petite protéine mitochondriale de 124 aa (Tar1p, Transcript Antisense to Ribosomal RNA) dont la surexpression corrige les défauts de respiration d'une souche portant une mutation dans le gène codant l'ARN polymérase mitochondriale (Coelho et al., 2002).

## V. *Conclusions*

---

Afin d'identifier des composants qui interagissent génétiquement avec les produits des gènes *MSB3* et *MSB4* dont les rôles biologiques exacts n'ont jamais été déterminés, nous avons criblé une banque génomique pour des suppresseurs homologues extragéniques multicopies restaurant la croissance normale du double mutant levurien *msb3 msb4* en présence de DMSO et de caféine. Sept gènes suppresseurs, corrigeant aussi les autres phénotypes du double mutant levurien *msb3 msb4*, ont ainsi été identifiés. Ces 7 suppresseurs peuvent être classés pour la fonction biologique de leurs produits en 5 classes : transport vésiculaire, cycle cellulaire, chaperon moléculaire, protéasome et ARN ribosomal.

Notre étude a aussi montré que les 7 suppresseurs isolés compenseraient la délétion de *MSB4*, en présence de DMSO et caféine. En effet, il a été montré que les suppresseurs n'avaient aucun effet sur un défaut de croissance sur cadmium caractéristique des mutants *msb3*. De plus, le produit du gène *MSB3* aurait un rôle supplémentaire de celui de *MSB4* étant donné que ce dernier ne peut compléter le mutant *msb3* lors de l'inhibition de croissance sur milieu contenant du cadmium. Ceci pourrait constituer une nouvelle approche afin d'étudier les actions cellulaires de chacune de ces deux protéines.



**ETUDE DES PARTENAIRES  
PROTEIQUES DE oncTre210p**





## *I. Introduction*

---

Pour l'étude des partenaires interagissant avec l'une ou l'autre des deux parties de la protéine de fusion oncTre210p, nous avons utilisé le système double-hybride en levure. Le système double-hybride, élaboré initialement par Fields et Song en 1989, est une méthode de clonage par interaction *in vivo* chez la levure *S. cerevisiae*. En bref, ce système offre la possibilité de déterminer l'interaction entre deux protéines (appât et proie) et, en parallèle, de cloner le gène codant la protéine partenaire. Depuis, de nombreuses variantes du système double-hybride ont vu le jour mais dans notre étude, seul le système nucléaire classique utilisant le facteur de transcription levurien Gal4p fut utilisé et cela dans le cadre de deux approches différentes.

La première que nous avons utilisée, est basée sur le protocole mis au point au sein du laboratoire de J.C. Jauniaux (Heidelberg, DKFZ, Allemagne) inspiré des recommandations de la firme BD Clontech et amélioré à l'Unité de Biologie animale et microbienne (FUSAGx). Dans cette première phase de recherche, les partenaires des parties Tre-GAP et Tre-REN-60 de l'oncoprotéine ont été étudiées à partir de banques d'ADNc issues de cellules HeLa et du muscle squelettique d'origine humaine.

Ensuite, la deuxième approche, pratiquée au sein du laboratoire de M. Vidal (Dana-Farber Cancer Institute de Boston-USA) dans le cadre d'une cartographie des interactions protéiques chez *C. elegans*, a été mise au point par Christopher M. Armstrong, Siming Li et Marc Vidal. Cette technique a été mise en œuvre lors de mon séjour au sein de l'équipe de Marc Vidal à Boston. Pendant ces quelques semaines, les banques suivantes ont été testées avec les deux parties d'oncTre210p comme appât : banques d'ADNc et d'ORF de *C. elegans*; banques d'ADNc d'embryons de souris, de cellules HeLa et de foie humain.

Cette partie présente les différentes étapes de la mise en œuvre de la technique du double-hybride, depuis le criblage de banques avec les deux parties du gène *oncTre210* jusqu'à l'identification et vérification des interactions des partenaires de oncTre210p.

## ***II. Recherche des partenaires potentiels des domaines Tre-GAP et Tre-REN-60 de oncTre210p avec les différentes banques d'ADNc selon la première approche***

---

### ***1. Principe de l'approche***

La recherche des partenaires protéiques provenant d'un tissu humain sain et malade susceptibles d'interagir avec oncTre210p ou une de ses parties, a été effectuée par conjugaison de la souche Y187, contenant soit pGBT-GAP ou pGBT-REN60, avec la souche AH109 intégrant d'une part la banque d'ADNc de muscle squelettique humain et d'autre part celle d'ADNc de cellules HeLa.

Les cellules diploïdes obtenues contiennent les gènes rapporteurs *MEL1*, *ADE2* et *HIS3*, ainsi que les vecteurs appât et proie contenant respectivement les marqueurs de sélection *TRP1* et *LEU2*.

### ***2. Efficacité de conjugaison et nombre total de cellules criblées***

Le calcul de l'efficacité de la conjugaison et du nombre de cellules testées lors des différents criblages donne de très bonnes valeurs (tableau EPP-1). Une efficacité de conjugaison de 2% et un nombre de cellules criblées de  $5 \cdot 10^6$  sont considérés comme acceptables selon les recommandations de la firme BD Clontech.

<b>Appât</b>	<b>Proie (Banque d'ADNc)</b>	<b>Nombre total de cellules testées</b>	<b>Efficacité de conjugaison</b>
GAP	Lignée Cellulaire HeLa	$12,9 \cdot 10^6$	6,13%
GAP	Muscle squelettique	$18 \cdot 10^6$	10%
REN-60	Lignée Cellulaire HeLa	$24 \cdot 10^6$	25%

*Tableau EPP-1 : Résultats du test d'efficacité de conjugaison et calcul du nombre de cellules criblées*

### 3. Nombre de clones positifs après criblage

Après les sélections successives pour les trois gènes rapporteurs de l'interaction (*HIS3*, *ADE2* et *MEL1*), 32 clones ont été obtenus pour le criblage de la banque d'ADNc du muscle squelettique avec la partie Tre-REN-60 de oncTre210p, 9 clones pour le criblage de cette même banque mais avec la partie Tre-GAP de l'oncoprotéine et 1 clone présentant une possible interaction entre la partie Tre-GAP et une protéine provenant d'une banque de la lignée cellulaire HeLa (figure EPP-1).

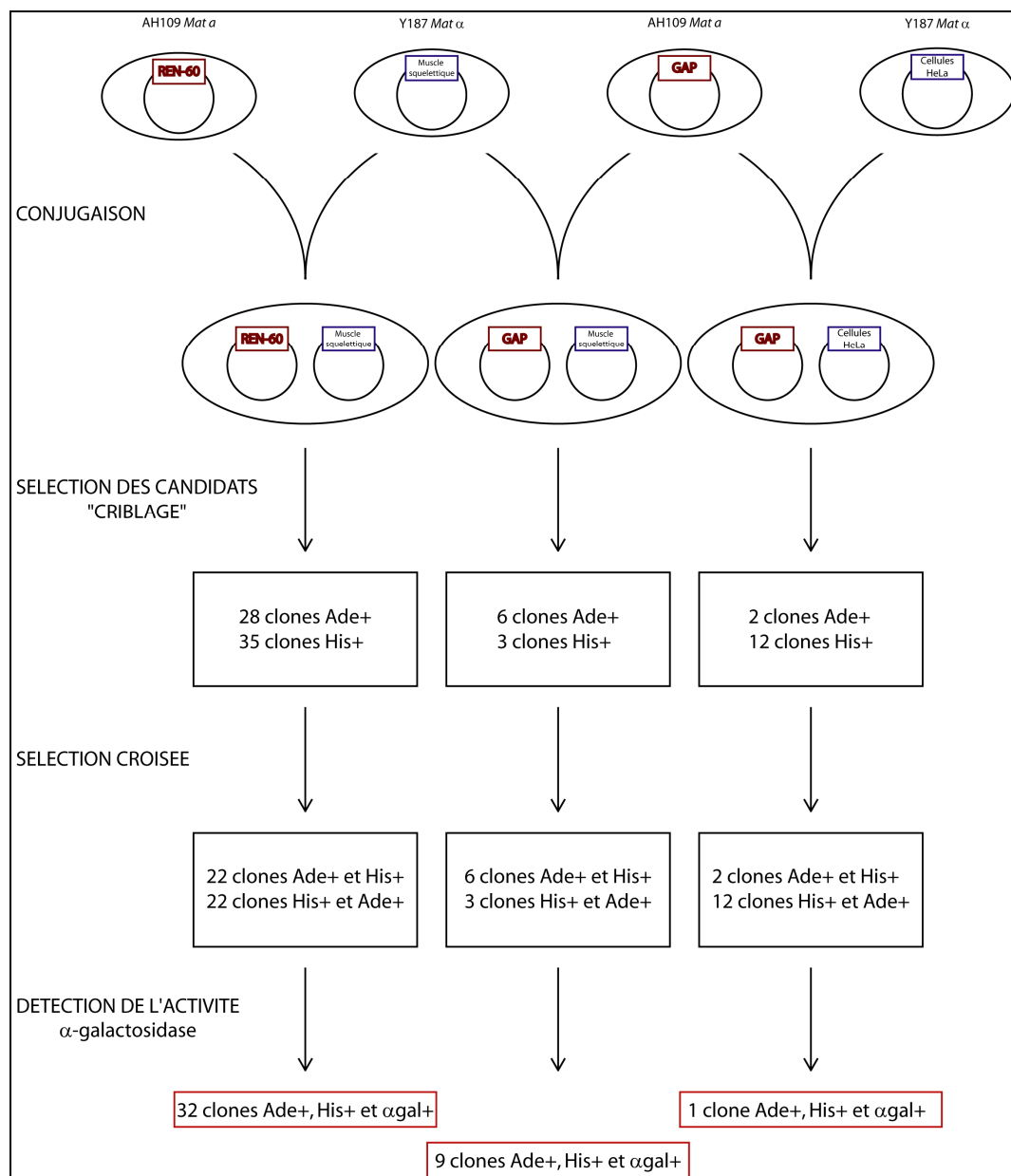


Figure EPP-1 : Evolution des sélections successives lors des criblages selon la première approche double-hybride en levure

#### 4. Elimination des partenaires pouvant activer seuls la transcription des gènes rapporteurs

Cette étape permet de supprimer des facteurs capables à eux seuls d'induire la transcription des gènes rapporteurs sans qu'il y ait eu interaction entre l'appât et la proie, donnant ainsi des faux positifs.

La première étape a été d'isoler le plasmide proie de chacun des clones positifs, issu des différents criblages, par transformation bactérienne avec l'ADN total et par sélection des bactéries ayant incorporé le plasmide en amplifiant l'insert par PCR avec les amorces pGAD GH5' et pGAD GH3' pour la banque issue de cellules HeLa et les oligonucléotides OliACT2 et 3AD pour la banque issue du muscle squelettique.

La deuxième a été d'incorporer le plasmide dans la levure Y187 et enfin de faire croître ces levures sur un milieu contenant du X- $\alpha$ -gal pour observer si la protéine exprimée est capable, à elle seule, d'activer le gène rapporteur correspondant.

Nous avons remarqué que seuls 2 clones prennent la couleur bleue caractéristique d'activation du gène rapporteur. Ces 2 clones ont été éliminés pour la suite du travail.

#### 5. Identification des partenaires protéiques potentiels

Premièrement, les inserts ont été amplifiés par PCR sur l'ADN total extrait des clones positifs en utilisant les oligonucléotides pGAD GH5' et pGAD GH3' pour la banque de cellules HeLa et les amorces OliACT2 et 3AD pour la banque de muscle squelettique. Ensuite, les inserts ont été purifiés par extraction sur gel d'agarose et ont été séquencés avec les deux oligonucléotides utilisés lors de l'amplification de l'insert.

L'analyse des séquences a montré que la partie GAP présente 1 et 3 partenaires potentiels indépendants provenant respectivement des banques de cellules HeLa et du muscle squelettique. La partie REN-60 interagirait avec 11 partenaires potentiels indépendants dont 2 sont des séquences inconnues en date du 1<sup>er</sup> juillet 2005 et une séquence du chromosome 3 est non annotées. Ces différents partenaires sont présentés dans le tableau EPP-2. Sur base de

banques de données, comme celle du site internet [www.incyte.com](http://www.incyte.com) où il est possible de préciser les fonctions potentielles des protéines identifiées lors de ce travail.

<b>Proie</b>	<b>Origine</b>	<b>Appât</b>	<b>Fonction</b>
Ubiquitously-expressed transcript (UXT)	Hela	GAP	Protéine liée au cytosquelette d'actine
Chaîne légère de la myosine II (MyI2)	Muscle squelettique	GAP	Protéine impliquée dans l'organisation du cytosquelette.
Activating transcription factor 5 (ATF5)	Muscle squelettique	GAP	Protéine qui régule le cycle cellulaire
CD74 antigen	Muscle squelettique	GAP	Protéine intervenant dans le transport de protéine dans la cellule, jouant alors un rôle dans la croissance et la maintenance cellulaire
Créatine kinase (CKM)	Muscle squelettique	REN-60	Enzyme qui catalyse de la conversion de la créatine en phosphocréatine, impliquant la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate
FLJ44603 fis	Muscle squelettique	REN-60	Protéine fortement similaire au Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase, dans la mitochondrie
Sodium channel beta-2 subunit precursor (SCN2B)	Muscle squelettique	REN-60	Protéine importante dans l'assemblage, l'expression et la modulation fonctionnelle du complexe du canal à sodium
Cytochrome c oxydase assembly protein (COX10)	Muscle squelettique	REN-60	Protéine pour la biosynthèse du noyau hème A (farnésyltransférase)
Récepteur nucléaire de la sous-famille 1, groupe D, membre1 (NR1D1)	Muscle squelettique	REN-60	Co-répresseur transcriptionnel qui régule le métabolisme des lipoprotéines
AMP-activated protein kinase gamma subunit (PRKAG3)	Muscle squelettique	REN-60	Protéine importante dans l'homéostasie de l'énergie via le stockage du glucose et du glycogène
Troponine C slow (TNNC1)	Muscle squelettique	REN-60	Protéine impliquée dans la régulation de la contraction du muscle squelettique
Mortality factor 4 like 1 (MORF4L1)	Muscle squelettique	REN-60	Facteur de transcription impliqué dans le vieillissement cellulaire et la sénescence

*Tableau EPP-2 : tableau récapitulatif des résultats obtenus avec la première approche du double-hybride. Séquences décrites au 01/07/2005.*

### ***III. Recherche des partenaires potentiels des parties GAP et REN-60 de oncTre210p avec les différentes banques d'ADNc selon la seconde approche***

---

#### ***1. Principe de l'approche***

La recherche des partenaires protéiques des deux parties de l'oncoprotéine oncTre210p provenant de différents tissus humains (foie, cellules HeLa), de tissu d'embryon de souris et de l'organisme modèle *C. elegans* (banque d'ORF et d'ADNc), a été effectuée par co-transformation de la levure MaV203 par les plasmides exprimant les protéines appât et proie. Les cellules MaV203 ainsi obtenues contiennent les gènes rapporteurs *HIS3*, *URA3* et *LacZ*, ainsi que les vecteurs appât et proie contenant respectivement les marqueurs de sélection *LEU2* et *TRP1*.

#### ***2. Efficacité de la transformation de la levure avec la banque***

Les cellules transformées avec la banque sont resuspendues par ajout d'eau stérile dans un volume total de 7,2 ml pour les criblages avec des banques d'ADNc et dans un volume de 0,9 ml pour la banque d'ORF de *C. elegans*. Les solutions sont étalées par volume de 300 µl sur boîtes de Petri contenant le milieu 3-AT. Les efficacités de transformation sont décrites dans le tableau EPP-3.

<b>Appât</b>	<b>Proie (Banque d'ADN)</b>	<b>Total de cellules criblées</b>
GAP	<i>C. elegans</i> (ADNc)	$5,59 \cdot 10^6$
REN-60	<i>C. elegans</i> (ADNc)	$4,71 \cdot 10^6$
GAP	<i>C. elegans</i> (ORF)	$2,64 \cdot 10^5$
REN-60	<i>C. elegans</i> (ORF)	$1,8 \cdot 10^4$ et $1,14 \cdot 10^5$
GAP	Foie	$9,12 \cdot 10^5$
REN-60	Foie	$7,8 \cdot 10^5$
GAP	Lignée Cellulaire HeLa	$2,64 \cdot 10^5$ et $9,6 \cdot 10^5$
REN-60	Lignée Cellulaire HeLa	$1,7 \cdot 10^5$ et $8,9 \cdot 10^5$
GAP	Embryon de souris	$6,24 \cdot 10^5$
REN-60	Embryon de souris	$1,5 \cdot 10^5$

*Tableau EPP-3 : efficacité des transformations levuriennes avec 25µg d'ADN pour les banques d'ADNc et 4 µg pour les banques d'ORF.*

Dans certains cas, comme le montre le tableau EPP-3, vu que la première transformation n'a pas donné un bon rendement, une deuxième transformation a été entreprise.

### 3. Nombre de clones positifs

Après les sélections successives pour les trois gènes rapporteurs de l'interaction (*HIS3*, *URA3* et *LacZ*), 10 et 0 clones ont été obtenus respectivement pour le criblage des banques d'ADNc et d'ORF de *C.elegans* avec la partie Tre-GAP de oncTre210p, 7 et 4 clones pour le criblage de ces mêmes banques mais avec la partie Tre-REN-60 de l'oncoprotéine (figure EPP-2).

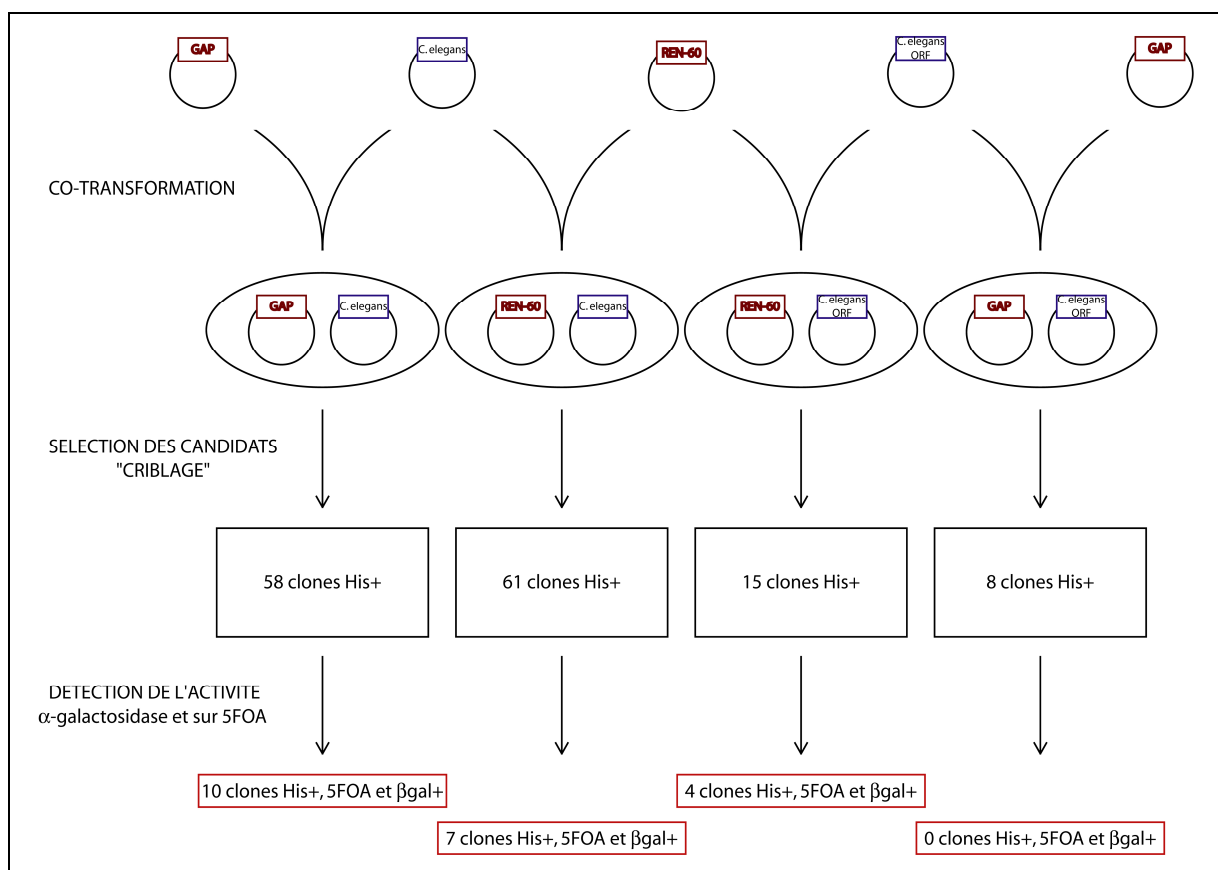


Figure EPP-2 : Evolution des sélections successives lors des criblages des banques de *C. elegans*. Remarque : les détections de l'activité  $\alpha$ -galactosidase et sur 5FOA se sont déroulées en parallèle.

De même, 17 et 31 clones ont été obtenus respectivement pour le criblage des banques humaines d'ADNc de foie et de la lignée cellulaire HeLa avec la partie Tre-GAP de oncTre210p, 15 et 28 clones par le criblage de ces mêmes banques mais avec la partie Tre-REN-60 de l'oncoprotéine (figure EPP-3).

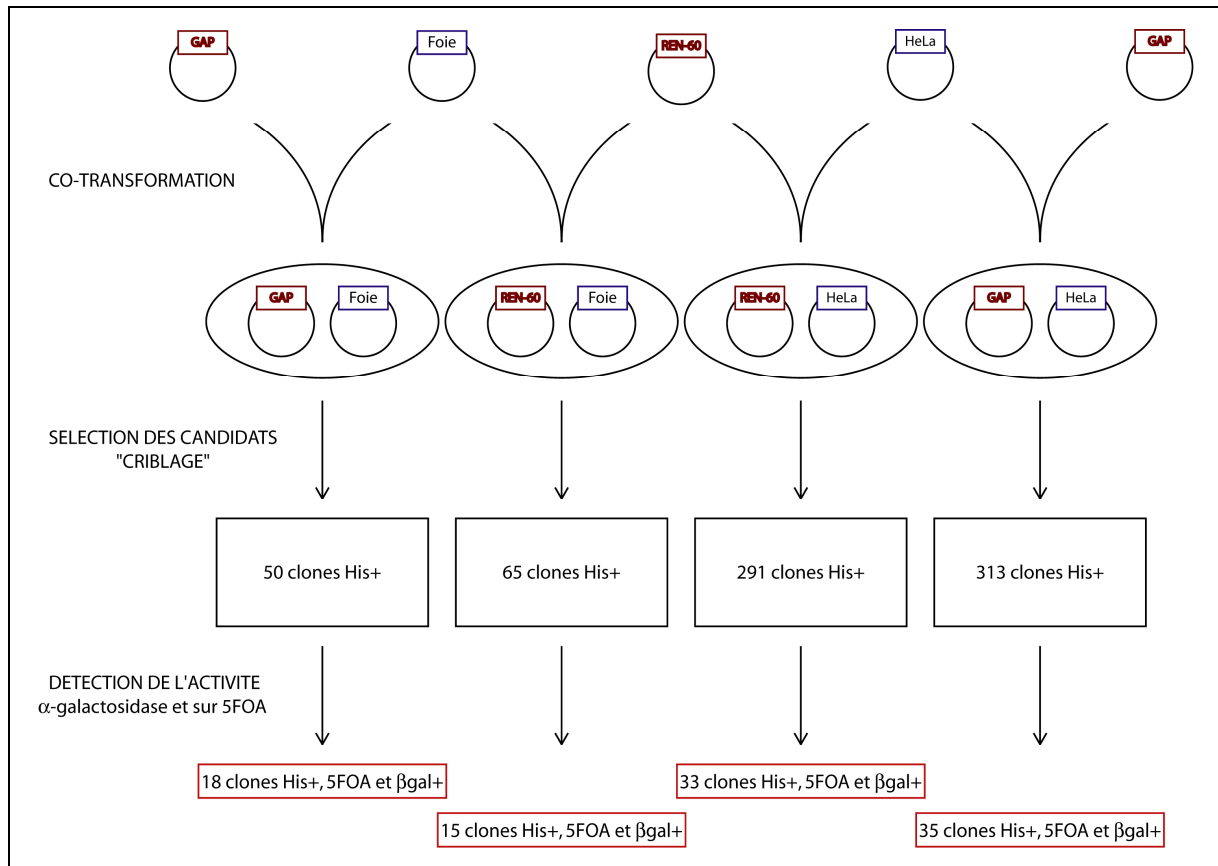


Figure EPP-3 : Evolution des sélections successives lors des criblages des banques humaines. Remarque : les détections de l'activité  $\alpha$ -galactosidase et sur 5FOA se sont déroulées en parallèle.

Enfin, 4 clones ont été obtenus pour le criblage de la banque d'ADNc de souris avec la partie Tre-GAP de oncTre210p, 21 clones par le criblage de cette même banque mais avec la partie Tre-REN-60 de l'oncoprotéine (figure EPP-4).



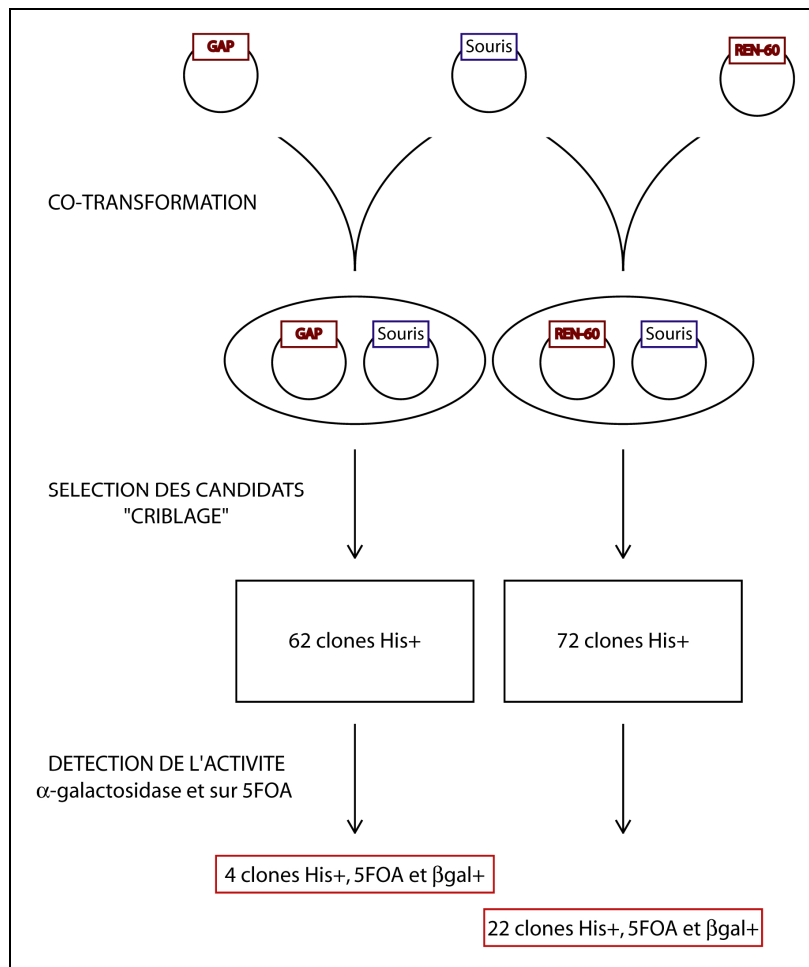


Figure EPP-4 : Evolution des sélections successives lors des criblages de la banque d'ADNc de souris

#### 4. Identification des partenaires protéiques potentiels

Premièrement, les inserts ont été amplifiés par PCR sur l'ADN total des clones.

L'analyse des séquences a montré que la partie Tre-GAP présente 9, 12, 28 et 4 partenaires potentiels indépendants provenant respectivement des banques de *C. elegans*, d'ADNc du foie, des cellules HeLa et de l'embryon de souris, tandis que la partie Tre-REN-60 interagirait avec 8, 12, 21 et 11 partenaires potentiels indépendants. Ces différents partenaires sont présentés dans le tableau EPP-4. A partir de banques de données, comme celle du site internet [www.incyte.com](http://www.incyte.com), il est possible de préciser les fonctions potentielles des protéines identifiées.

<b>Proie</b>	<b>Origine</b>	<b>Appât</b>	<b>Fonction</b>
S-adenosyl methionine decarboxylase 1 (SMD1)	C. elegans	GAP	Protéine qui intervient dans la biosynthèse des polyamines
i-90 protein precursor family member	C. elegans	GAP	Protéine de fonction inconnue
tRNA-Arg/glu/phe/leu, Cytochrome b (CYTB), cytochrome oxydase subunit III (COIII)	C. elegans	GAP	Protéine qui intervient dans l'assemblage de complexe protéique, l'organogenèse, la respiration et le transport d'électron
Essential ribosomal protein large subunit (RPL-9)	C. elegans	GAP	Constituant structural des ribosomes, qui interviennent dans la biosynthèse des protéines.
Ribosomal protein large subunit (RPL-11.2)	C. elegans	GAP	Constituant structural des ribosomes, qui interviennent dans la biosynthèse des protéines.
NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	C. elegans	GAP	Protéine qui contrôle la lipogenèse au niveau cytosolique en catalysant la réaction dihydroxyacétone phosphate vers le G3P
RabGDP dissociation inhibitor family GDI-1 (GDI-1)	C. elegans	GAP	Protéine qui intervient dans le transfert vésiculaire, inhibe la dissociation des GDP à partir des protéines Rab et joue un rôle dans la gamétogenèse
Cuticle collagen precursor family member	C. elegans	GAP	Protéine qui intervient dans la biosynthèse de la cuticule
Regulator of calcineurin 1, calcipressine/human down syndrome candidate region 1 like (DSCR1L)	C. elegans	GAP	Protéine qui intervient dans la formation de la cuticule, la croissance et la maturation. Identité de 39% sur les 207 aa avec DSCR1L1 chez l'Homme dont son rôle principal est la transduction de signaux
Elongation factor 2 (eft2)	C. elegans	REN-60	Protéine qui à la même activité qu'une GTPase en liant le GTP. Similaire à la protéine humaine EEF2, GTPase hydrolase
60S Ribosomal protein L44/L41	C. elegans	REN-60	Constituant structural des ribosomes, qui interviennent dans la biosynthèse des protéines.
Essential pre-mRNA factor	C. elegans	REN-60	Protéine qui joue un rôle dans l'expression protéique
Essential ribosomal protein, la petite unité	C. elegans	REN-60	Constituant structural des ribosomes, qui interviennent dans la biosynthèse des

					protéines.
Prion-like protein (PQN-64)	Q/N-rich domain	C. elegans		REN-60	Protéine de fonction encore inconnue
Elongation factor 2 (eft2)		C. elegans	ORF	REN-60	Déjà cité ci-dessus
Homeobox (ceh-23)		C. elegans	ORF	REN-60	Facteur de transcription. Intervient dans la neurogenèse
Protein kinase Pick1-like	C-binding	C. elegans	ORF	REN-60	Protéine qui intervient dans la communication cellulaire
CDW92 antigen		Foie		GAP	Transporteur choline
Methionine adenosyltransferase I alpha (MAT1A)		Foie		GAP	Protéine qui permet la réaction entre la méthionine et l'ATP qui donne le S-adenosylmethionine, a une activité de liaison avec l'ATP.
Protein tyrosine phosphatase, non receptor Tp1 (PTPN1)		Foie		GAP	Protéine impliquée dans la régulation négative de la signalisation des récepteurs à insuline, peut-être associé au diabète de type II et à l'obésité
Heat shock 70 kDa protein 8 (HSPA8)		Foie		GAP	Chaperon moléculaire de la famille des HSP70 marqueur pour la cardiomyopathie hypertrophique, la maladie d'Alzheimer et de l'arthrite rhumatoïde. Délétion corrélée avec le carcinome du sein sporadique
Vitronectin (VTN)		Foie		GAP	Ligand intégrine qui est impliqué dans l'adhésion cellule-substrat, contribue au remodelage et à l'inflammation des tissus. La surexpression est associée à la maladie d'Alzheimer, l'artériosclérose et au cancer colorectal.
ATP synthetase, aminotransferase 2	aspartate	Foie		GAP	ATP synthetase
Actin related protein complex subunit 4 (ARPC4)		Foie		GAP	Protéine qui peut contribuer au niveau du cytosquelette d'actine comme intermédiaire dans la formation du complexe Arp2/3.
Ras-related toxin substrate 1, RhoGTPase (RAC1) et Super dismutase 2 (SOD2)	C3 botulium	Foie		GAP	RhoGTPase qui régule la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'organisation du cytosquelette d'actine et contribue aussi dans la prolifération des cellules tumorales. Elle répond à un stress oxydatif

Interferon consensus seq binding protein 1 (ICSBP1)	Foie	GAP	Facteur de transcription pour IFN. Exprimé faiblement lors d'une leucémie chronique myéloïde
Suppression of tumorigenicity 13 (ST13)	Foie	GAP	Suppresseur de tumeur et elle interagit avec HSP70
Poly(rC)-binding protein 1 (PCBP1)	Foie	GAP	Protéine qui joue un rôle dans la stabilité de l'ARNm
Inhibitor of apoptosis protein 1 (MIHC, HIAP1)	Foie	GAP	Inhibiteur d'apoptose, activité ligase pour les ubiquitin-protein
Small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 14 (CXCL 14)	Foie	REN-60	Protéine qui régule l'infiltration des leucocytes dans les tissus inflammés et peut jouer un rôle dans la sénescence et l'immortalisation des cellules
Serum amyloid A1 (SAA1)	Foie	REN-60	Apolipoprotéine de la phase aiguë qui intervient comme chimioattractant pour les leucocytes et induit la formation de la matrice métalloprotéases
Phytanoyl-CoA hydroxylase (PHYH)	Foie	REN-60	Enzyme qui intervient dans le métabolisme des lipides
V-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homologue	Foie	REN-60	Protéine qui agit dans de multiples voies de transmission des signaux, est notamment impliquée dans la régulation du cycle cellulaire
NADH dehydrogenase subunit 6 (ND6)	Foie	REN-60	Protéine qui a une fonction dans la phosphorylation oxydative
Heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A)	Foie	REN-60	Membre des chaperons HSP70 qui module la réponse au stress
Composé 7 du complement (C7)	Foie	REN-60	Protéine faisant partie de la voie classique et du complément qui est impliquée dans la liaison des complexes à la membrane cellulaire et inhibe l'apoptose
Sirtuine 2 (silent mating type information regulation 2)transcript variant 2 (SIRT2)	Foie	REN-60	Protéine qui fonctionne comme histone désacétylase dépendante de NAD <sup>+</sup> , et génère l'O-acétyl ADP-ribose
Human cytochrome P-450 S-mephenytoin 4-hydroxylase (P450_MP-4)	Foie	REN-60	Protéine jouant un rôle dans le métabolisme des stéroïdes, des acides gras et des xénobiotiques
Hexose-6-phosphate déshydrogénase (H6PD)	Foie	REN-60	Protéine intervenant dans le métabolisme des carbohydrates et du glucose. Transporteur

				d'électrons
Vitronectine (VTN)		Foie	REN-60	Ligand de l'intégrine qui intervient dans l'adhésion des cellules et dans leur migration. Contribue à l'inflammation
Orosomucoïde 1 (ORM1)		Foie	REN-60	Glycoprotéine plasmique qui joue un rôle dans la phase aiguë et dans les réponses inflammatoires
Ribosomal protein S3 (RPS3)		HeLa	GAP	Composant de la petite sous-unité ribosomomale 40S. Intervient dans la prolifération cellulaire
Ribosomal protein S4 X-linked (RPS4X)		HeLa	GAP	Idem RPS3 avec une action de régulation du cycle cellulaire
Ribosomal protein S25 (RPS25)		HeLa	GAP	Composant de la petite sous-unité ribosomomale 40S. Intervient dans la biosynthèse protéique
Ribosomal protein L30 (RPL30)		HeLa	GAP	Composant de la grande sous-unité ribosomomale 60S. Intervient dans la biosynthèse protéique
Ribosomal protein L24 (RPL24)		HeLa	GAP	Idem RPL30
Ribosomal protein L13a (RPL13A)		HeLa	GAP	Idem RPL30 avec une action de régulation négative de la croissance et prolifération cellulaire. Induit l'apoptose
COP9 photomorphogenic sb6 (COPS6)	constitutive homolog	HeLa	GAP	Protéine qui peut médier la dégradation p53 et est impliquée dans la transition G2-M du cycle cellulaire
Tubulin alpha 6 (TUBA6)		HeLa	GAP	Protéine qui contient un domaine GTPase
Homeobox C10 (HOXC10)		HeLa	GAP	Facteur de transcription régulant positivement la prolifération cellulaire
FLJ22729		HeLa	GAP	Protéine de fonction inconnue
Pre-mRNA processing factor 38 domain containing B (PRPF38B)		HeLa	GAP	Membre de la famille des PRP38, impliquée dans l'épissage
Transgelin 2 (TAGLN2)		HeLa	GAP	Protéine de liaison à l'actine
Glutamate ionotropic, N-MethylD-Aspartate-like1A (GRIN1)	receptor,	HeLa	GAP	Protéine qui est impliquée dans la neurotransmission excitatoire

Mesothelin (MSLN)	HeLa	GAP	Antigène de surface de fonction inconnue qui pourrait jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire et est présent dans les mésothéliomes et dans le cancer de l'ovaire.
Enolase 1 alpha (ENO1)	HeLa	GAP	Enzyme de la glycolyse
Actin related protein 2/3 complex subunit 1A (ARPC1A)	HeLa	GAP	Protéine qui est impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine
Claudin-1 (CLDN1)	HeLa	GAP	Protéine qui est responsable du maintien de la polarisation cellulaire et contribue dans l'adhésion entre cellules
Williams beuren syndrome chromosome region 1 (WBSCR1)	HeLa	GAP	Protéine qui augmente l'activité ATPase et interagit avec le virion de l'herpès
Prion protein (PRNP)	HeLa	GAP	Protéine qui induit l'apoptose et agit sur l'adhésion cellulaire
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD)	HeLa	GAP	Protéine qui intervient dans l'apoptose et contrôle la glycolyse et la glycogénolyse
Primase, polypeptide 1 (PRIM1)	HeLa	GAP	Protéine qui intervient dans la réplication du DNA pour la synthèse du fragment d'Okazaki.
Secretory carrier membrane protein 3 (SCAMP3)	HeLa	GAP	Protéine qui intervient dans le trafic et recyclage vésiculaire
Hight mobility group AT-hook 1 (HMGA1)	HeLa	GAP	Protéine qui intervient dans l'établissement et le maintien de la chromatine, inhibiteur d'apoptose, croissance et maintenance cellulaire
Diazepam binding inhibitor (DBI)	HeLa	GAP	Protéine qui intervient dans le métabolisme des acides gras
Protein tyrosine kinase 2 beta (PTK2B)	HeLa	GAP	FAK (Focal Adhesion Kinase) qui active la voie des kinases MAP. Intervient dans la mobilité et l'apoptose cellulaire. Elle a aussi une activité d'une protéine de liaison du cytosquelette
T-Lak cell-originated protein kinase (TOPK)	HeLa	GAP	Protéine qui active les MAPK et régule le cycle cellulaire

FLJ13855	HeLa	GAP	Protéine qui contient un « ubiquitin-conjugating enzyme domain » et est similaire à BIRC6, inhibiteur d'apoptose dans des lignées cellulaires cancéreuses
KIAA1522	HeLa	GAP	Protéine qui a une faible similarité avec la mucine qui est impliquée dans l'adhésion cellulaire
FLJ21919	HeLa	GAP	Protéine de fonction encore inconnue
Effecteur de Rab9, p40 (RAB9P40)	HeLa	REN-60	Protéine associée à Rab9, qui joue un rôle dans le transport des récepteurs mannose-6-phosphate de l'endosome jusqu'au Trans Golgi et peut jouer un rôle dans le docking des vésicules
Homeobox C10 (HOXC10)	HeLa	REN-60	Facteur de transcription qui influence la régulation de la progression mitotique et peut lier la régulation du développement au contrôle du cycle cellulaire
RNA binding motif protein X-linked-like 1 (RBMX)	HeLa	REN-60	Protéine avec le motif protéinique se liant à l'ARN du chromosome X. C'est un facteur de transcription alternatif qui peut jouer un rôle dans les fonctions des testicules
DnaJ (Hsp40) subfamily A, member 1 (DNAJA1)	HeLa	REN-60	Molécule co-chaperon pour Hsc70, facilite le transport des protéines dans les mitochondries. Reconnaît et renature les protéines mal repliées.
Récepteur laminine (LAMR)	HeLa	REN-60	Protéine qui joue un rôle dans la transduction des signaux, adhésion cellulaire et la migration, l'apoptose et la prolifération cellulaire
Cyclin-dependent kinase 2-interacting protein (CINP)	HeLa	REN-60	Protéine qui pourrait interagir avec des kinases cyclines dépendantes pour réguler l'activité de la kinase et la progression du cycle cellulaire. Pourrait aussi réguler la réplication de l'ADN
KIAA0101	HeLa	REN-60	Protéine qui interagit avec PCNA. Surexprimer dans un certain nombre de tumeurs

DKFZp761D0211		HeLa	REN-60	Protéine qui est similaire à KIAA1467 qui contient deux domaines intégrine alpha, qui intervient dans l'adhésion cellulaire
Thioredoxin-like p19 protein (TLP19)		HeLa	REN-60	Protéine impliquée dans la régulation du potentiel rédox, transporte les électrons au niveau du réticulum endoplasmique
MGC25181		HeLa	REN-60	Similaire à Dld2p de <i>S. cerevisiae</i> , qui est une D-lactate déshydrogénase mitochondriale
Splicing factor arginine/serine-rich 3 (SFRS3)		HeLa	REN-60	Protéine qui régule le choix du site de l'épissage
Homeobox C11 (HOXC11)		HeLa	REN-60	Facteur de transcription qui peut activer la protéine HNF1alpha (TCF1) et peut jouer un rôle dans le développement précoce et la différenciation de l'intestin
Pyruvate kinase (PKM2)		HeLa	REN-60	Enzyme glycolytique qui convertit le phosphoénolpyruvate en pyruvate. Peut intervenir dans la différenciation cellulaire
Ubiquitine-conjugate enzyme E2 variant 2 (UBE2V2)		HeLa	REN-60	Protéine qui intervient dans le contrôle de la différenciation et peut exercer ses effets dans l'altération de la distribution du cycle cellulaire
Facteur eucaryotique de translation-élongation gamma (EEF1G)	1	HeLa	REN-60	Sous-unité du complexe de translation-élongation qui se lie à la cystéinyl-ARNt synthétase cytoplasmique et au GTP
Guanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 2-like 1 (GBN1L2)		HeLa	REN-60	Protéine kinase C (PKC), sous-unité d'ancrage qui intervient dans la transmission des signaux par les intégrines
Protéine ribosomale (RPS2)	S2	HeLa	REN-60	Composé putatif de la sous-unité ribosomale 40S, peut participer à la liaison ARNt-aminoacyl au niveau des ribosomes
Cell division cycle associated 4, transcript variant 2 (CDCA4)		HeLa	REN-60	Protéine similaire au produit du gène murin AB041541, régulateur transcriptionnel
Protéine 265 en doigt de zinc (ZNF265)		HeLa	REN-60	Protéine impliquée dans l'épissage alternatif
Ribosomal protein, large, P0, transcript variant 1 (RPLP0)		HeLa	REN-60	Phosphoprotéine acide, qui joue un rôle dans la traduction



Phosphoglycérate kinase 1 (PGK1)	HeLa	REN-60	Enzyme qui génère de l'ATP quand il convertit le 1,3-diphosphoglycérate en 3-phosphoglycérate dans la glycolyse
Annexin I (ANXA1)	Souris	GAP	Protéine qui active les MAPK, action anti-inflammatoire par l'inhibition de l'accumulation des neutrophiles
Decidual trophoblast prolactin-related protein (DTPRP)	Souris	GAP	Protéine qui interagit avec l'héparine, intervient dans la gestation
Homeobox D10 (HOXD10)	Souris	GAP	Protéine qui a un rôle dans le développement des membres et du squelette lors de l'embryogenèse
Crumbs homolog 2	Souris	GAP	Protéine qui joue un rôle dans la maintenance structurelle et le développement neuronal dans la rétine
Décorine (DCN)	Souris	REN-60	Protéine qui régule négativement la croissance cellulaire et qui peut avoir un rôle dans l'ontogenèse, la régulation de l'apoptose, le cycle cellulaire et l'organogenèse
Thioredoxin domain containing 4 (TXNDC4)	Souris	REN-60	Isomérase putative du réticulum endoplasmique qui peut réguler l'activité des oxidoréductines de réticulum endoplasmique pendant le repliement des protéines
Proliferin (Plf)	Souris	REN-60	Membre de la famille de la prolactine/hormone de croissance (GH) qui influence positivement l'angiogenèse et a un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire...
ATPase subunit 6	Souris	REN-60	ATPase
Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha (CTLA2A)	Souris	REN-60	Protéine associée aux lymphocytes T avec des régions de cystéines protéases. La transcription du gène peut être inhibée par le biais de l'oncogène v-src, contribuant à l'établissement d'une tumeur
Homeobox A9 (HOXA9)	Souris	REN-60	Facteur de transcription qui peut réguler la morphogenèse et la différenciation
Homeobox D9 (HOXD9)	Souris	REN-60	Facteur de transcription

Hemoglobin Z, beta-like embryonic chain	Souris	REN-60	Protéine qui transporte l'oxygène et le dioxyde de carbone entre les poumons et les tissus
Elongation factor-like protein	Souris	REN-60	Protéine qui interviendrait dans la synthèse des protéines
Phosphofruktokinase type B (PFKL)	Souris	REN-60	Protéine qui catalyse la phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-biphosphate dans la glycolyse
ATP synthetase subunit D	Souris	REN-60	ATP synthétase transporteuse d'ions H <sup>+</sup>

*Tableau EPP-4 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus avec la seconde approche du double-hybride. Séquences décrites au 01/07/2005.*

### 5. Evaluation des intensités d'interaction des partenaires protéiques potentiels

Pour évaluer les intensités d'interaction protéique, nous avons testé les partenaires potentiels, répartis sur deux boîtes de culture 96 puits, pour l'expression des trois gènes rapporteurs (*HIS3*, *URA3* et *LacZ*). Les résultats sont illustrés dans le tableau EPP-5. Pour les deux gènes rapporteurs *HIS3* et *URA3*, une note de 0 à 10 a été donnée. La valeur 10 correspond au maximum attendu pour une interaction forte à savoir une forte croissance sur milieu 3-AT ou inhibition totale de croissance sur 5-FOA. Dans le test du gène bactérien *LacZ*, tous les clones sélectionnés montrent une coloration bleue moyenne, seuls deux clones présentent une forte coloration bleue, illustrés par un fond bleu dans le tableau EPP-5.

Les partenaires correspondant aux annotations du tableau EPP-5 sont décrits dans le tableau EPP-6.

Nous pouvons observer qu'il n'y a aucun cas pour lequel l'interaction serait annotée avec deux 10 et un fond bleu. La règle au laboratoire de Marc Vidal, quand la souche de levure MaV203 est utilisée, est de conclure à une interaction lorsque 2 des 3 gènes rapporteurs exprimés.

Nous voyons, dans le tableau suivant, parmi les différents candidats positifs un ensemble de clones présentant une intensité d'interaction en levure plus forte. Ces différents partenaires semblent intéressants pour la poursuite du travail malgré qu'une intensité faible dans le test double-hybride en levure ne permet pas de conclure à une faible interaction. Nous pouvons

aussi voir plusieurs cas de figure quand nous analysons les tableaux : une même protéine qui ressort plusieurs fois lors d'un même criblage (HOXC10 criblage de la banque d'ADNc de cellules HeLa avec la partie Tre-REN-60), une protéine d'une même banque qui interagit avec les deux parties de l'oncoprotéine (Vitonectine de la banque d'ADNc de foie humain) et une protéine que nous retrouvons lors de deux criblages différents mais de banque provenant d'un même organisme (eft-2 interagit avec Tre-REN-60 lors du criblage de la banque d'ORF et d'ADNc de *C. elegans*).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0 10	0 10	0 10	5 10	0 10	0 10	5 10	0 10	0 10	0 10	6 10	0 10	Boite 1
B	6 10	0 10	2 10	1 10	2 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	1 10	6 10	
C	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	1 10	0 10	4 10	1 10	0 10	0 10	1 10	
D	9 10	0 10	0 10	5 10	5 10	1 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	1 10	
E	6 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	1 10	0 10	0 10	1 10	0 10	
F	5 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	1 10	
G	0 10	0 10	9 10	1 10	4 10	9 10	0 10	0 10				0 10	
H		0 10											
A	0 10	0 10	0 10	0 10	10 10	0 10	0 10	0 10	0 10	1 10	0 10	0 10	Boite 2
B	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	6 10	
C	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10		
D	0 10	0 10	7 9	0 10	1 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	
E	10 10	0 10	0 10	0 10	0 10	5 10	0 10	0 10	0 10	1 10	0 10	0 10	
F	9 10	5 10											
G													
H													

Tableau EPP-5 : Intensité des interactions obtenues par l'utilisation de la seconde approche double-hybride. En noir se trouve les notes pour la croissance sur 3-AT (gène rapporteur HIS3) ; en rouge, les notes pour l'inhibition de croissance sur 5-FOA (gène rapporteur URA3) et en fond bleu sont repris les cas où la coloration bleue (gène rapporteur LacZ) est plus forte que la moyenne.

<b>Boite 1</b>			
		C11	?
		C12	Putative tumor suppressor ST13
A1	Elongation factor eft-2	D1	Poly(rC) bindin protein1 PCBP1
A2	Homeobox ceh-23	D2	Inhibitor of Apoptosis protein 1 MIHC
A3	Protein Kinase C-Binding PICK1 like	D3	Small inducible cytokine subfamily b (souris)
A4	?	D4	Serum amyloid A1
A5	s-adenosyl Methionine Decarboxylase smd-1	D5	Phytanoyl-CoA hydroxylase (refsum disease)
A6	i-90 protein family member	D6	v-crk Sarcoma Virus CT10 oncogene homolog
A7	Cytochrome b, tRNA-arg, gln, phe, leu, COIII	D7	Actin related protein 2/3 complex subunit 4
A8	Ribosomal protein rpl-9	D8	Isolate mitochondrion
A9	Down Syndrome Cand. Reg. 1-like dscr11	D9	NADH dehydrogenase subunit 6
A10	Ribosomal protein rpl-11.2	D10	Complement component 7 C7
A11	NAD-dependent glycerol-3-P dehydrogenase	D11	Heat Shock 70 kDa protein 1A HSPA1A
A12	RabGDI	D12	Sirtuin 2 SIRT2
B1	?	E1	?
B2	Collagen structural gene col-156	E2	Cytochrome P450
B3	Elongation factor eft-2	E3	Hexose-6-phosphate deshydrogenase
B4	60S ribosomal protein L44	E4	Decidual PRL-related protein dPRP
B5	Essential pre-mRNA factor	E5	Annexin A1, Lipocortin 1
B6	Essential ribosomal protein	E6	Homeo Box D10 hoxd10
B7	Prion-like Q/N-rich domain protein PQN-64	E7	Crumbs homolog 2
B8	?	E8	?
B9	?	E9	Decorin Dcn
B10	Protein Tyrosine Phosphatase, non receptor Tp1	E10	?
B11	Heat Shock 70 kDa protein 8 HSPA8	E11	Thioredoxin domain containing 4 Txndc4
B12	Vitronectin	E12	?
C1	BAC clone RP11-692E14 from 4	F1	Proliferin Plf
C2	Choline transporter-like protein, CDW92 antigen	F2	ATPase subunit 6
C3	Isolate Mitochondrion	F3	Cytotoxic T Lymphocyte-associated prt 2 alpha
C4	?	F4	Homeo Box A9
C5	ATP synthetase, aspartate aminotransferase 2	F5	?
C6	Chromosome 21 clone BAC 28F9	F6	Homeo Box D9
C7	Methionine adenosyltransferase I, alpha	F7	?
C8	SOD-2 + rac1	F8	Hemoglobin Z
C9	Chromosome 16 clone RP11-542M13	F9	?
C10	Isolate Mitochondrion	F10	?

F11	?
F12	?
G1	Elongation factor-like protein
G2	?
G3	Phosphofructokinase PFK
G4	Orosomucoid 1
G5	?
G6	Vitronectin
G7	?
G8	ATP synthase subunit D
G9	Ribosomal protein S3 RPS3
G10	?
G11	?
G12	Rab9 effector p40
H1	Homeo Box C10 HOXC10
H2	?

**Boite 2**

A1	RNA binding motif protein X-linked-like1
A2	DnaJ (HSP40) homolog
A3	Homeo Box C10 HOXC10
A4	Laminin receptor 1
A5	Cyclin-dependent kinase 2-interacting protein
A6	KIAA0101
A7	DKFZp761D0211
A8	Thioredoxin-like protein p19 TLP19
A9	MGC25181, FLJ23449 fis
A10	Splicing Factor, arginine/serine-rich 3 SFRS3
A11	Homeo Box C10 HOXC10
A12	Homeo Box C10 HOXC10
B1	?
B2	Homeo Box C11
B3	Pyruvate Kinase
B4	Ubiquitin-conjugating Enzyme E2,EDAF1,MMS2

B5	?
B6	Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma
B7	Homeo Box C10
B8	Homeo Box C10
B9	Homeo Box C10
B10	Guanine Nucleotide protein (G protein)
B11	?
B12	Ribosomal protein S2
C1	FLJ26793 fis, FLJ13855, FLJ34325 fis
C2	COP9 constitutive photomorphogenic homolog sb 6
C3	Tubulin alpha 6
C4	?
C5	CDC associated 4 CDCA4
C6	ZNF265
C7	Ribosomal protein, large, P0
C8	Phosphoglycerate Kinase 1 PGK1
C9	Ribosomal Protein S25
C10	Ribosomal Protein L13a
C11	?
C12	Actin related protein 2/3 complex subunit 1A Williams-Beuren Syndrome Chromosome region
D1	1
D2	KIAA1522
D3	?
D4	?
D5	Secretory carrier membrane protein 3 SCAMP3
D6	?
D7	Protein Tyrosine Kinase 2 beta
D8	Ribosomal Protein S4 isoform RPS4X
D9	?
D10	FLJ22729
D11	?
D12	Homeo Box C10
E1	Prion Protein p27-30
E2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
E3	Primase, polypeptide1 PRIM1

E4	Ribosomal Protein L24, L30
E5	?
E6	pre-mRNA processing factor 38 domain containing B + Transgelin 2
E7	High Mobility group AT-Hook 1 HMGA1
E8	Diazepam Binding Inhibitor
E9	FLJ21919
E10	MAPKK like protein kinase TOPK
E11	Glutamate Receptor, ionotropic, N-Methyl-D-Aspartate-like 1A
E12	Claudin 1
F1	Mesothelin
F2	Enolase 1 alpha

ORF C. elegans
cDNA C. elegans
cDNA Foie
cDNA Embryon de souris
cDNA Cellule HeLa
Appât : REN-60
Appât : GAP

Tableau EPP-6 : partenaires correspondant aux annotations du tableau EPP-5.

## ***IV. Etude de deux partenaires interagissant avec Tre-GAP : Myl2 et Loc91256***

---

### ***1. Introduction***

Au vu du nombre de partenaires potentiels isolés lors des différents criblages double hybride, il est clair qu'il était impossible de vérifier toutes ces interactions. Nous avons donc choisi deux partenaires particulièrement intéressants au point de vue de l'intensité de l'interaction et de leur implication dans l'organisation du cytosquelette d'actine.

Le premier partenaire est Myl2 qui a été isolé lors du criblage d'une banque humaine d'ADNc de muscle squelettique avec la partie Tre-GAP de l'oncoprotéine oncTre210p. La protéine de 166 aa Myl2, chaîne légère régulatrice de la Myosine II, stabilise l'hélice alpha de la tête de la myosine et régule son activité ATPase.

Le deuxième partenaire est LOC91256 qui a été obtenu par Stéphane Bach (Bach, S., 2000) lors du criblage d'une banque d'ADNc du placenta humain avec la partie Tre-GAP de l'oncoprotéine. LOC91256 est une protéine de 919 aa contenant 26 motifs ankyrines qui joueraient une action de liaison protéique. Cette protéine est similaire à une région de la protéine ank1 (31% sur 1881 aa) qui est impliquée dans l'accrochage du cytosquelette à la membrane cellulaire.

Afin de certifier l'interaction directe entre Myl2 et la partie Tre-GAP de l'oncoprotéine et LOC91256 et cette même partie Tre-GAP, nous avons utilisé plusieurs techniques classiquement utilisées par la communauté scientifique pour conforter l'interaction entre deux protéines : le GST-pulldown, la co-immunoprécipitation en cellules de mammifères et la co-localisation cellulaire.

### ***2. Vérification des interactions par GST pulldown***

Le principe de cette méthode est de mettre en présence les deux protéines à étudier dont une est exprimée comme protéine de fusion avec la GST (glutathione-S-transférase) et liée ensuite à une résine, et l'autre présente dans des lysats cellulaires après transcription de la séquences

dans des réticulocytes de lapin (*in vitro*). Après incubation et lavages de la résine, celle-ci est séparée sur gel dénaturant puis révélée par Western blot lorsqu'un anticorps spécifique existe, sinon par autoradiographie si la dernière protéine a été marquée par un isotope.

Nous avons tout d'abord testé l'expression correcte des différentes protéines (Tre-GAP, Myl2 et LOC91256) en fusion avec la GST, dans la bactérie BL21Star. Les bactéries transformées et induites à l'IPTG ont été lysées. Les lysats ont alors été analysés par Western blot avec un anticorps anti-GST (figure EPP-5/A). Vu que la partie Tre-GAP en fusion avec GST ne s'exprime pas en bactérie BL21Star, nous avons donc utilisé, pour la technique de GST pull-down, Myl2 et LOC91256 fusionnés avec la GST. De plus, la séquence de la partie Tre-GAP fusionnée à un FLAG est bien exprimée par la transcription et la traduction en lysats de réticulocytes de lapin comme le montre la figure EPP-5/B après Western blot avec un anticorps anti-FLAG.

Après purification des deux protéines de fusion à la GST avec la résine, incubation avec Tre-GAP, réalisation de multiples lavages et analyse par Western blot avec un anticorps anti-FLAG, nous avons pu remarquer que les deux protéines interagissaient bien avec la partie Tre-GAP de oncTre210p (figure EPP-5/C).

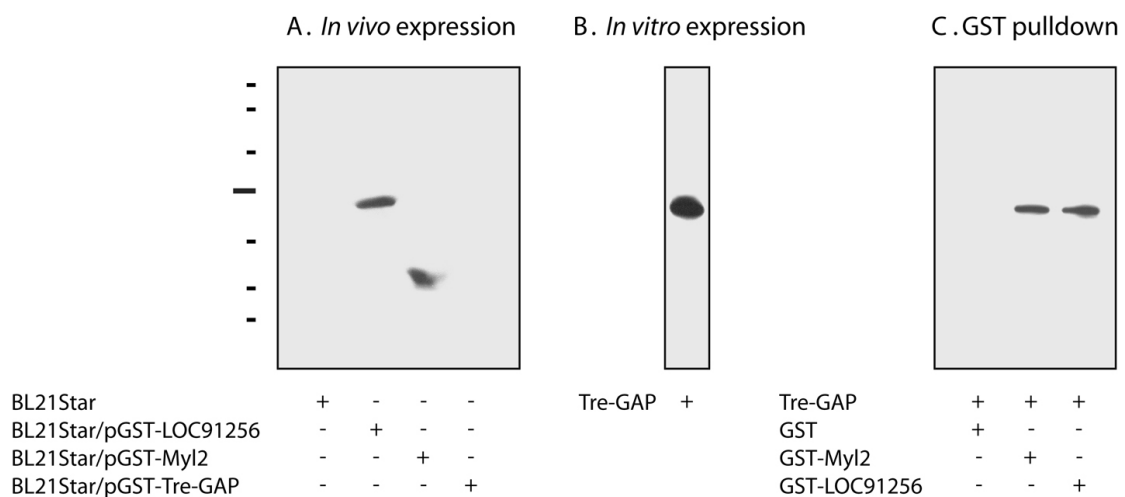


Figure EPP-5 : Vérification par GST pull-down et tests préliminaires. (A) Myl2, LOC91256 et Tre-GAP sont exprimés dans la bactérie *E. coli* BL21 Star comme protéine fusionnée au GST. (B) expression *in vitro* de Tre-GAP par la transcription et traduction en lysats de réticulocytes de lapin. (C) GST pull-down avec la détection de Tre-GAP. Première colonne :



*pulldown avec la protéine GST seule; deuxième colonne : pulldown avec GST-Myl2; troisième colonne : pulldown avec GST-LOC91256.*

### 3. Vérification des interactions par co-immunoprécipitation

Afin de vérifier que Myl2 et LOC91256 forment avec la partie Tre-GAP de oncTre210p un complexe au sein des cellules de mammifères, une technique de co-immunoprécipitation a été utilisée. La méthode consiste à immunoprécipiter le complexe avec un anticorps spécifique à une des protéines et à le révéler avec un anticorps dirigé contre l'autre protéine.

Des cellules HEK293 furent ainsi transfectées par les plasmides exprimant Myl2 en fusion à c-Myc et Tre-GAP couplée à FLAG, ainsi que LOC91256 fusionné à c-Myc et Tre-GAP couplé à un FLAG. La combinaison inverse fut aussi testée en fusionnant Tre-GAP à c-Myc et Myl2 et LOC91256 à FLAG. Comme témoins négatifs, toutes les combinaisons ont été testées : pFLAG-Tre-GAP + pMyc, pMyc-Tre-GAP + pFLAG, pFLAG-Myl2 + pMyc, pMyc-Myl2 + pFLAG, pFLAG-LOC91256 + pMyc, pMyc-LOC91256 + pFLAG et pMyc + pFLAG. Les lysats cellulaires ont été divisés en deux et ont été immunoprécipités par soit un anticorps anti-FLAG, soit un anticorps anti-c-Myc. Après plusieurs lavages, les protéines ont été séparées sur 2 gels dénaturants et ensuite transférées sur membranes. Une des deux membranes a été mise en présence d'un anticorps anti-FLAG et l'autre avec un anticorps anti-c-Myc. Nous avons pu observer dans tous les cas la présence du complexe attendu sauf pour les témoins négatifs. La figure EPP-6 représente les cas où Myl2 et BHO6 furent immunoprécipités.

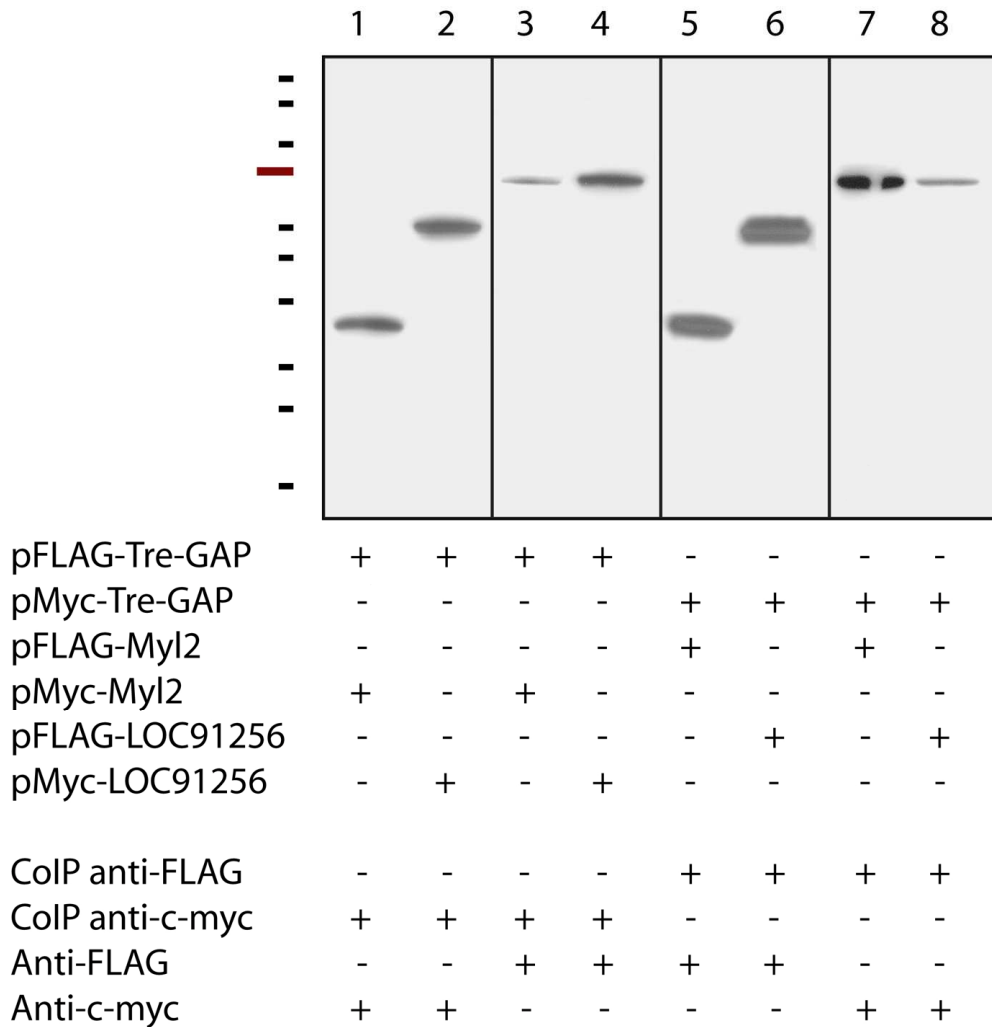


Figure EPP-6 : Vérification par co-immunoprécipitation. Le signe + (présence) et signe - (absence) à côté d'un plasmide correspond à sa présence dans la cellule. CoIP AntiFLAG et CoIP AntiMyc signifie que la co-immunoprécipitation a été réalisée respectivement à l'aide d'un anticorps anti-FLAG ou anti-c-myc. AntiFLAG et AntiMyc indique l'anticorps utilisé pour la révélation par Western blot.

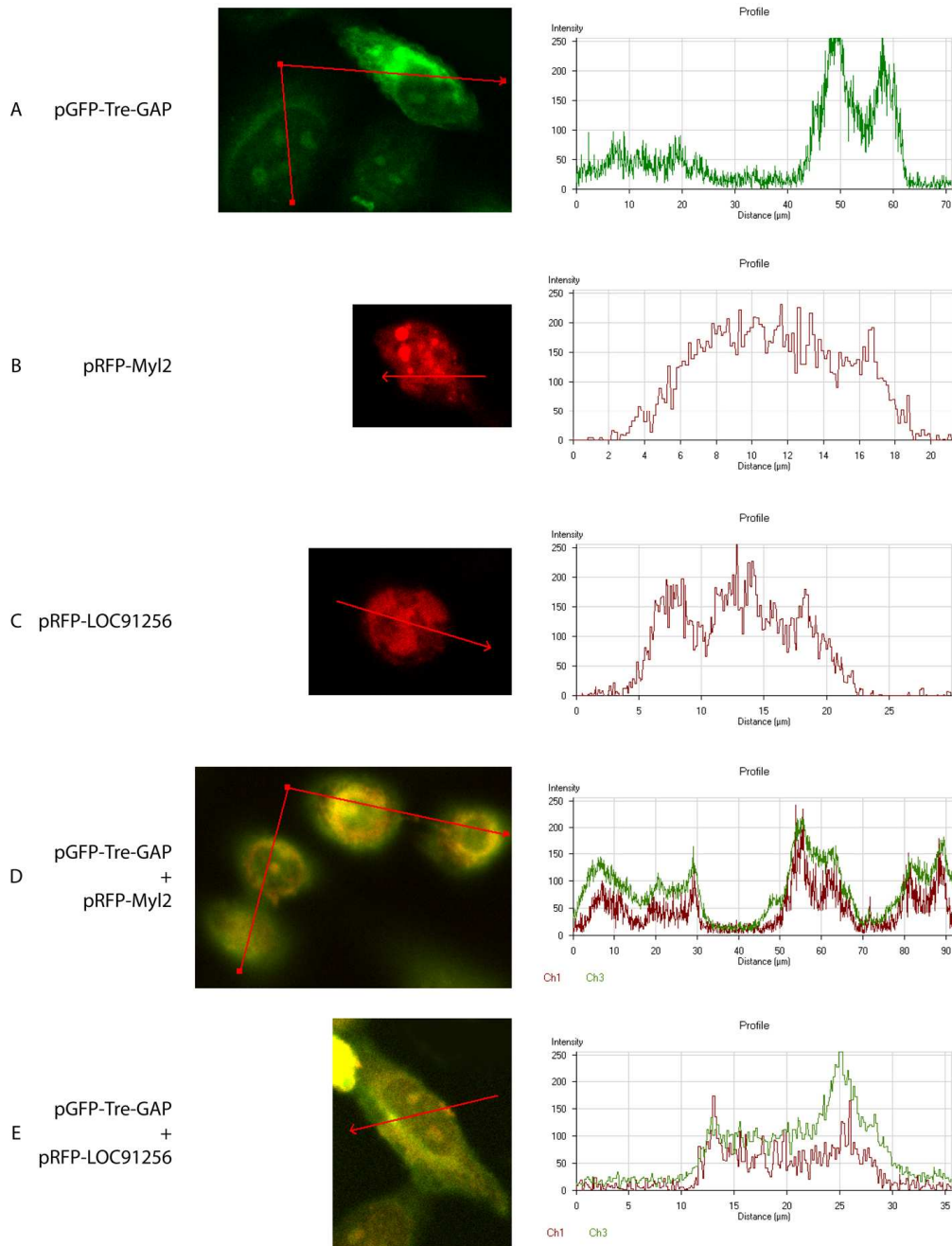
Nous pouvons donc conclure que Myl2 et LOC91256 sont physiquement associés au sein des lysats de cellules de mammifère.

#### 4. Vérification des interactions par co-localisation

Nous avons pu valider que Myl2 et LOC91256 peuvent s'associer avec la partie Tre-GAP de l'oncogène par des méthodes biochimiques. Mais, pour que ces interactions puissent avoir un sens biologique, il faut prouver que ces protéines se retrouvent dans un même compartiment

cellulaire à un moment donné. C'est ainsi, que des expériences de co-localisation cellulaire ont été entreprises (figure EPP-7).

Pour ce faire, des cellules HeLa ont été transfectées avec les plasmides d'expression pGFP-Tre-GAP et pRFP-Myl2, pGFP-Tre-GAP et pRFP-LOC91256, pGFP-Tre-GAP, pRFP-Myl2, et pRFP-LOC91256. Ces cellules ont été observées au microscope confocal à fluorescence. Ceci nous a permis d'observer que les protéines co-localisent au niveau de la membrane où la protéine Tre-GAP se localise essentiellement. Les protéines Myl2 et LOC91256 se retrouvent distribuées uniformément dans toute la cellule mais se retrouvent plus concentrées à la membrane quand elles sont exprimées en même temps que la protéine Tre-GAP. Tre-GAP induirait une translocation partielle de Myl2 et LOC91256 suite à leur association.



*Figure EPP-7 : Co-localisation cellulaire dans des cellules de la lignée HeLa.. Tre-GAP (A) marquée avec la “green fluorescent protein” (pGFP-Tre-GAP) et Myl2 (B) et LOC91526 (C) marquée avec la “red fluorescent protein » (pRFP-Myl2 et pRFP-LOC91526) sont exprimées en cellules HeLa. Dans les photographies microscopiques D et E, il y a respectivement la co-expression de Tre-GAP - Myl2 et Tre-GAP - LOC91256. Les zones jaunes dans l'image juxtaposée indiquent une co-localisation. Les graphes représentent les intensités de fluorescence mesurées le long des flèches rouges sur les photographies de gauche. Les lignes vertes et rouges dans le profil correspondent aux intensités relatives de la GFP et RFP.*

## V. *Conclusions*

---

Afin de cibler les fonctions cellulaires de l'oncoprotéine oncTre210p, le système double-hybride en levure a été utilisé dans l'identification de partenaires protéiques potentiels. Le criblage de différentes banques d'ADNc et d'ORF de différents organismes provenant de différents tissus malades ou sains, a permis d'identifier diverses voies physiologiques où oncTre210p serait impliquée : l'apoptose cellulaire, la transmission de signaux, l'organisation du cytosquelette, l'adhérence cellulaire et le trafic vésiculaire.

En sachant que oncTre210p est impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine par le fait, entre autre, qu'elle serait un effecteur de RAC1 et CDC42 (Masuda-Robens *et al.* 2003), nous avons certifié l'interaction de oncTre210p avec deux partenaires impliqués dans l'organisation du cytosquelette d'actine : Myl2 et LOC91256. Myl2, chaîne légère régulatrice de la Myosine II isolée lors du criblage d'une banque humaine d'ADNc de muscle squelettique avec la partie Tre-GAP, régule l'activité de la myosine (cfr. Introduction Bibliographique). LOC91256, protéine de 919 aa contenant 26 motifs ankyrines obtenu par Stéphane Bach lors du criblage d'une banque d'ADNc du placenta humain avec la partie Tre-GAP, est similaire à une région de la protéine ank1 qui est impliquée dans l'accrochage du cytosquelette à la membrane cellulaire.

En conclusion, l'étude des partenaires protéiques de oncTre210p, oncoprotéine impliqué dans le sarcome d'Ewing, a permis de cibler différentes voies physiologiques où elle serait impliquée. De plus, l'étude des deux partenaires Myl2 et LOC91256 de oncTre210p permet de confirmer l'implication de l'oncoprotéine dans le cytosquelette d'actine. Les rôles physiologiques de ces interactions, étant toujours inconnus, requièrent d'autres études notamment dans des lignées cellulaires cancéreuses où l'oncogène est exprimé.



# **CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES**

## ***I. Conclusions générales***

---

Notre objectif, lors de nos recherches, a été d'étudier *oncTre210*, un oncogène impliqué dans le sarcome d'Ewing. Pour ce faire, nous avons décidé de travailler sur deux voies : une première a été d'utiliser un modèle levurien où deux gènes (*MSB3* et *MSB4*) homologues à *oncTre210* ont été mutés. Nous avons entrepris la recherche de suppresseurs génétiques du double mutant *msb3<sup>-</sup> msb4<sup>-</sup>*, nous permettant de déterminer les interactions génétiques des deux protéines levuriennes. La seconde voie a été d'identifier les partenaires protéiques directs du produit de l'oncogène *oncTre210*.

**Dans la première étape** de notre travail, nous avons isolé sept suppresseurs pouvant corriger des phénotypes du double mutant amenant aux observations suivantes :

- Croissance sur milieu contenant du DMSO et/ou de la caféine.
- Bonne ségrégation des noyaux avec absence de cellules multinuclées.
- Bonne organisation du cytosquelette d'actine.
- Morphologie correcte des cellules (cellules ovoïdes, un seul bourgeon maximum par cellule ...)

Les différents gènes suppresseurs isolés sont *SEC7*, *VPS35*, *USO1*, *SAP155*, *SSZ1*, *CIC1* et 25S ARNr. Ces interactions génétiques nous font penser que Msb3p et Msb4p joueraient des rôles dans des voies physiologiques comme le transport vésiculaire et le cycle cellulaire, ce qui est en concordance avec les données bibliographiques connues à ce jour au sujet de ce couple de protéines (cfr. Introduction Bibliographique)

**Dans la seconde partie**, nous avons identifié un très grand nombre de partenaires protéiques, que ce soit pour la partie GAP ou soit pour la partie REN-60 de *oncTre210p*, par la technique du double hybride en levure. Pour vérifier ces interactions, il était nécessaire de les confirmer en cellules d'origine humaine par des techniques de co-immunoprécipitation et de co-localisation cellulaire. Il était tout à fait inconcevable de tester tous ces partenaires. La décision a été de choisir deux partenaires particulièrement intéressants. Nous avons donc démontré que la partie GAP de *oncTre210p* interagissait directement avec Myl2 (la chaîne légère de la myosine II) et LOC91526, une protéine contenant des motifs ankyrine.



## II. Fonctions biologiques de MSB3 et MSB4

---

Nous avons entrepris des recherches pour déterminer quels étaient les composants qui peuvent interagir génétiquement avec les produits des gènes *MSB3* et *MSB4*. Nous avons ainsi pu isoler des supprimeurs homologues extragéniques multicopies qui nous indiquent dans quelles voies physiologiques les deux protéines levuriennes sont impliquées.

Sept supprimeurs peuvent restaurer des comportements "sauvages" du double mutant levurien *msb3 msb4* tels que la croissance normale sur milieu de culture contenant du DMSO ou de la caféine, une morphologie ellipsoïdale, une bonne ségrégation des noyaux et une organisation de cytosquelette d'actine normale. Ces supprimeurs sont classables dans plusieurs catégories fonctionnelles :

Transport vésiculaire : *SEC7*, *VPS35* et *USO1*

Cycle cellulaire : *SAP155*

HSP70 chaperon moléculaire : *SSZ1*

Protéasome : *CIC1*

ARN ribosomal : 25S ARNr

Le trafic vésiculaire avec trois supprimeurs est une voie physiologique connue impliquant les produits des gènes *MSB3* et *MSB4*. En effet, Msb3p et Msb4p sont deux protéines GAPs spécifiques des GTPases appartenant à la famille Ypt/Rab (Albert, S. *et al.*, 1999a; Albert, S. *et al.*, 2000), qui est impliquée dans le transport vésiculaire entre compartiments cellulaires. Plus précisément, ces deux protéines levuriennes régulent, grâce à leur activité GAP sur la GTPase Sec4p, le processus d'exocytose (Gao, X.D. *et al.*, 2003). Il a été montré dans ces travaux, qu'une accumulation de grosses vésicules apparaissait dans les cellules qui ne pouvaient exprimer correctement *MSB3* et *MSB4*. L'équipe de Tcheperegine S.E. (2005) précise que Msb3p et Msb4p régulent la croissance polarisée par des mécanismes multiples, régulant directement d'une part l'exocytose par leur activité GAP sur Sec4p et d'autre part les fonctions de Cdc42p, Rho1p, et Bni1p dans le polarisome. Le modèle présenté par cette équipe nous montre un recrutement par Spa2p des protéines Msb3p, Msb4p et Bni1p à l'extrémité du bourgeon. A ce niveau, Msb3p et Msb4p forment un complexe avec la GTPase Cdc42p sous sa forme inactive liée au GDP qui peut alors être convertie en Cdc42p-GTP par sa GEF Cdc24p. Cdc42p-GTP active ensuite Bni1p qui régule la formation de filaments

d'actine qui dirigeront les vésicules sécrétoires vers l'extrémité du bourgeon où Msb3p et Msb4p réguleront l'exocytose via la GTPase Sec4p.

Malheureusement, ce modèle d'action proposé pour les deux protéines levuriennes sur le trafic vésiculaire est loin des implications et du rôle des trois suppresseurs isolés lors de nos travaux. En effet, les produits des gènes *SEC7*, *VPS35* et *USO1* se retrouvent impliqués dans des voies physiologiques situées au niveau de l'appareil de Golgi.

En effet, *Uso1p* et *Sec7p* sont impliquées, plus particulièrement, dans le transport des vésicules dérivées du reticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, avec une implication supplémentaire de la protéine *Sec7p* dans le transport intra-Golgi. *Vps35p* intervient dans le recyclage de protéines vers le *trans*-Golgi en agissant sur l'endosome prévacuolaire.

Quel lien existe-t-il entre ces trois partenaires génétiques et Msb3p et Msb4p ? Comment des protéines "fonctionnant" au niveau de l'appareil de Golgi, en amont du couple protéique, pourraient corriger des phénotypes du double mutant *msb3 msb4* ? Les produits de ces trois gènes suppresseurs auraient-ils d'autres fonctions biologiques ou agiraient-ils dans une autre voie physiologique parallèle à celle utilisée par Msb3p et Msb4p permettant de les court-circuiter ?

Autant de questions sans réponses qui mériteraient d'en trouver pour une meilleure compréhension des fonctions biologiques de Msb3p et Msb4p.

Une piste à ces questions viendrait peut-être de RN-Tre. En effet, cette protéine humaine complémentaire à Msb3 et Msb4p régulerait l'activité de Rab41 et Rab43. La fonction de Rab41 reste encore inconnue mais se localiserait dans une voie impliquée dans le contrôle du trafic vésiculaire au niveau de l'appareil de Golgi (Hass, A.K. *et al.*, 2005). Tandis que Rab43 contrôle le transport rétrograde dans l'appareil de Golgi (Hass, A.K. *et al.*, 2007; Fuchs, E. *et al.*, 2007).

Pour les autres suppresseurs, ces questions restent d'application. En effet, nous montrons que Sap155p peut corriger les phénotypes du double mutant. Sap155p est une protéine impliquée dans le cycle cellulaire et plus particulièrement par son association avec Sit4p (Sap155p serait un activateur positif ou un effecteur de la phosphatase Sit4p). Sit4p intervient dans l'exécution du point START et la progression de la phase S, phase de réplication de l'ADN. Il est clair

que Msb3p et Msb4p sont également impliqués dans le cycle cellulaire comme le montrent différents phénotypes lors de la co-délétion des deux gènes (cellules polynucléées, perte du mode de bourgeonnement bipolaire, plusieurs bourgeons par cellule ...) et aussi par le fait que leur homologue fonctionnel humain RN-Tre est une cible physiologique de la phosphatase humaine Cdc14A impliquée dans la machinerie du cycle cellulaire (Lanzetti, L. *et al.*, 2007) mais le lien entre Sap155p et Msb3p/Msb4p n'est pas encore clair.

Cependant, nos recherches nous permettent de conforter des voies physiologiques où Msb3p et Msb4p seraient impliqués : le transport vésiculaire et le cycle cellulaire.

Concernant, les deux supresseurs Ssz1p (un chaperon moléculaire impliqué dans plusieurs processus cellulaires importants comme le repliement et le dépliement des protéines au cours du transport vésiculaire) et Cic1p (protéine impliquée dans le protéasome qui est capable de dégrader les protéines ubiquitinylées), nous pouvons imaginer que dans le processus de trafic vésiculaire, lors du passage d'une vésicule à une autre, des protéines aient à subir des modifications de leur repliement/dépliement ou des dégradations à des instants précis de leur cycle.

Enfin, nos connaissances ne nous permettent pas, à ce jour, d'apporter des informations supplémentaires quant à l'implication du 25S rRNA (ARN ribosomal du ribosome).

Un autre aspect a été étudié lors de ce travail. Nous avons confirmé les résultats de Bianchi M.M. *et al.* (2001) dans lesquels le mutant *msb3* présentait une inhibition de croissance en présence de cadmium dans le milieu de culture. En effet, nous avons montré que l'inhibition de croissance sur YPD+cadmium requiert la seule mutation du gène *MSB3* et que le gène *MSB4* ne peut compléter la délétion de *MSB3* par ce phénotype. Ceci fait entendre que Msb3p aurait un rôle supplémentaire. Quel rôle supplémentaire ? Msb3p ne jouerait-elle pas un autre rôle que Msb4p dans la cellule ? Msb3p ne jouerait-elle pas le rôle de Msb4p seulement lorsque celle-ci n'est pas exprimée ?

Enfin, nous avons montré que les différents supresseurs isolés ne pouvaient restaurer le phénotype de sensibilité au cadmium lié à *MSB3*, montrant qu'ils compenseraient uniquement la délétion de *MSB4*.

Ces résultats suggèrent des interrogations quant à la redondance de Msb3p et Msb4p dans leur action cellulaire. En effet, nous n'avons jamais pu séparer leur rôle dans la cellule. Y aurait-il un rôle supplémentaire pour l'une d'elle et différent dans la cellule ?

De multiples questions qui ouvrent de nouvelles voies dans l'étude de Msb3p et Msb4p.

### Perspectives expérimentales

Afin d'étudier le rôle et les interactions de Msb3p/Msb4p et des suppresseurs, il peut être envisagé d'étudier :

- Le transcriptome dans la souche sauvage, le double mutant et les souches suppresseurs afin d'identifier les gènes individuels ou groupe de gènes dont la transcription est modulée. Pour ce faire, la technologie des puces à ADN peut-être utilisée.
- Le protéome dans les 3 mêmes backgrounds levuriens (souche sauvage, délétée et suppresseur). En effet, une grande partie des protéines de levure peuvent être séparées et quantifiées par électrophorèse 2D. Les "spots protéiques" intéressants pourront être identifiés par spectrométrie de masse.

Finalement, la technique du double-hybride pourrait être utilisée afin d'identifier les partenaires directs des candidats suppresseurs et créer ainsi un réseau d'interaction autour de Msb3p et Msb4p.

Ces technologies pourraient aussi être utilisées dans l'étude du rôle supplémentaire de Msb3p. Nous pourrions comparer les niveaux d'expression génique du mutant *msb3*, du mutant *msb4*, du double mutant et de la souche sauvage en présence de cadmium.

Pour étudier Msb3p, nous pourrions aussi envisager une recherche des interactions génétiques de *MSB3*. Pour ce faire, des travaux d'identification des suppresseurs homologues extragéniques multicopies du mutant *msb3* pourront être réalisés comme lors de ce travail de thèse ou par l'analyse des synthétiques léthaux.

Enfin, comme le double mutant levurien *msb3 msb4* est pour nous un modèle d'étude de *oncTre210p*, il serait alors intéressant de vérifier par la technologie des microarrays si les suppresseurs humains homologues auraient un effet sur des cellules exprimant de manière naturelle ou non *oncTre210*.

En effet, par cette technique, nous pourrions obtenir une carte détaillée des niveaux d'expression des gènes dans ces cellules exprimant *oncTre210* mais aussi les suppresseurs. Par comparaison de ces cartes, nous pourrions obtenir une masse importante d'informations sur l'influence de l'expression de ces suppresseurs dans des cellules cancéreuses.

De plus, cela permettrait de déterminer si ces séquences ont également un effet suppresseur dans les cellules humaines exprimant l'oncogène.

Plusieurs homologues humains ont été identifiés dans les bases de données, il s'agit, entre autre, de *BIG* (Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange) pour *SEC7*, *VPS35* pour *VPS35*, *P155* et *MYH* (chaîne lourde de la myosine) pour *USO1*, *SAPS* (SIT4 phosphatase-associated protein) pour *SAP155*, *HSP70* pour *SSZI* et *RSL1D1* (ribosomal L1 domain containing 1) pour *CIC1*.

### ***III. Tre-2 et le cytosquelette***

---

Nous avons démontré, par différentes approches, que la partie RabGAP de l'oncoprotéine oncTre210p, impliquée dans le sarcome d'Ewing, interagit directement avec deux composants du cytosquelette d'actine : Myl2, la chaîne légère régulatrice de la myosine et LOC91526, une protéine contenant des motifs ankyrine.

Le cytosquelette d'actine, composé de microfilaments, joue un rôle essentiel dans la cellule en participant dans l'endocytose, l'exocytose, la cytokinèse, la polarisation cellulaire et dans la migration des cellules.

Le composant principal des microfilaments est l'actine, existant sous forme de monomères (G-actine) et de polymères (F-actine).

Un autre composant est la myosine. Les myosines forment une superfamille de protéines divisées en 17 classes (Hodge, T. et Cope, M.J., 2000). Ce sont les moteurs qui se déplacent le long des filaments d'actine. Leur cycle d'interaction avec ces filaments, accompagné par l'hydrolyse d'ATP, est la base moléculaire d'un grand nombre de mécanismes biologiques de la motilité, du transport vésiculaire aux contractions musculaires.

Une molécule de myosine consiste en une ou deux chaînes lourdes, chacune associée à une ou deux chaînes légères. La chaîne lourde est généralement composée d'une tête, d'un cou et d'une queue. La tête, hautement conservée dans les différentes classes, contient les sites ATPase et de liaison à l'actine. C'est le moteur de l'interaction actine-myosine, régulé par les chaînes légères ou la calmoduline. Ces deux derniers se lient à la chaîne lourde au niveau du cou. La queue est quant à elle très diverse dans ses fonctions.

Myl2 est un composant de la myosine II. Cette myosine contient deux chaînes lourdes et chacune avec une paire de chaînes légères au niveau du cou : une essentielle et une régulatrice. Des mutations au niveau de ces chaînes légères sont associées à des myopathies du coeur et du muscle (Poetter, K. *et al.*, 1996). Myl2 est une chaîne légère régulatrice de la myosine II. Elle régule l'activité ATPase de la chaîne lourde. Cette activité est diminuée dans des cellules dérivées d'un ostéosarcome (HOS) qui ont subi soit une transformation par

infection d'un virus, le Kirsten murine sarcoma virus (K-HOS) ou soit par exposition à une substance chimique carcinogène (MNNG-HOS) (Kumar, C.C. et Chang, C., 1992).

Quelle est la signification physiologique de l'association de oncTre210p avec Myl2 ? Pour cela il est intéressant de rappeler que l'oncoprotéine a été décrite comme un effecteur des RhoGTPases Rac1 et Cdc42 (Masuda-Robens, J.M. *et al.*, 2003). Les RhoGTPases sont de petites protéines impliquées dans diverses voies physiologiques associées avec les filaments d'actinomyosine (cytokinèse, motilité cellulaire, contraction musculaire), incluant des voies aberrantes (comme des cancers). Rac1 et Cdc42 sont des médiateurs de la régulation de la myosine II (Wilkinson, S. *et al.*, 2005). Donc, il est possible que l'interaction Myl2 et oncTre210p participe à la signalisation des RhoGTPases. C'est sur base de cette hypothèse et de ces observations que notre modèle va être élaboré.

Loc91526 est une protéine montrant des similarités avec la protéine d'ancrage au cytosquelette, l'ankyrine 1 (31% sur 1881 aa). Elle contient 26 motifs ankyrine qui peuvent participer aux liaisons protéiques. Ce motif est un des motifs les plus fréquemment observés dans les bases de données. Ce module d'interaction protéine-protéine est impliqué dans diverses fonctions cellulaires (Mosavi, L.K. *et al.*, 2004). L'ankyrine-1 est une protéine de liaison à la spectrine qui s'associe via ses motifs ankyrine avec une variété de canaux à ions, avec des molécules d'adhérence. De plus, via la spectrine elle est le lien entre des protéines membranaires et le cytosquelette (Rubtsov, A.M. et Lopina, O.D., 2000). L'association membrane-cytosquelette se fait donc sous un réseau bi-dimensionnel localisé à la surface cytoplasmique de la membrane plasmique. Ce réseau est attaché à la membrane plasmique par des interactions impliquant l'ankyrine.

Il serait donc imaginable que oncTre210p, par son interaction avec Loc91526, interfère au niveau du réseau du cytosquelette cellulaire. Cela serait en accord avec le modèle levurien où une désorganisation du cytosquelette dans le double mutant *msb3 msb4* a été observée.

## Hypothèses de travail proposées

Notre modèle proposé pour l'action de oncTre210p sur le cytosquelette est basé sur son interaction directe avec la chaîne légère de la myosine Myl2. Nous situons notre modèle à l'étape de cytokinèse de la division cellulaire, étape où la synthèse de myosine est abondante.

La cytokinèse commence par la formation d'un anneau contractile, composé d'actine et myosine, qui va former un sillon de clivage au milieu de la cellule induisant la formation de deux cellules filles. Enfin, les deux cellules vont se séparer physiquement.

Plusieurs observations sont à tenir en compte dans notre modèle :

- Il a été montré au sein de notre laboratoire que oncTre210p, comme les deux protéines levuriennes Msb3p et Msb4p, intervenait au moment de la cytokinèse durant le cycle de division cellulaire. En effet, une surexpression de l'oncoprotéine dans des cellules HeLa induit une séparation difficile des cellules filles à la mitose (données non publiées de la thèse de Bizimungu C. 2006).
- En 2003, l'équipe de Masuda-Robens montrait que oncTre210p faisait très vraisemblablement partie d'un complexe d'effecteurs de la Rho GTPases Cdc42 et Rac1 dans le remodelage de l'actine. Par ailleurs, la liaison directe entre la calmoduline/Ca<sup>++</sup> et oncTre210p a été démontrée (Shen, C. *et al.*, 2005.)

Comme le montre la figure CGP-1/A, la calmoduline/Ca<sup>++</sup> et Cdc42/Rac1 agissent durant la cytokinèse sur la chaîne légère de la myosine par l'intermédiaire d'une kinase, la MLCK (Myosin Light Chain Kinase).

## Partie GAP de oncTre210p

La partie GAP de oncTre210p interagit directement avec Myl2 et la calmoduline (figure CGP-1/B). Ces deux protéines sont impliquées dans la formation et la contraction de l'anneau contractile. La calmoduline se fixe sur la kinase MLCK et l'active suite à une augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup>. Ensuite MLCK phosphoryle Myl2 ce qui a pour effet de permettre à la myosine d'interagir avec l'actine et de promouvoir la formation de filaments de myosine.



Les interactions de la partie GAP avec Myl2 et la calmoduline perturberaient la contraction de l'anneau contractile engendrant des anomalies de la cytokinèse.

### Partie REN-60 de oncTre210p

La partie REN-60, grâce à ses peptides obliques et ses sites RBD mis en évidence par Bizimungu C. *et al.* (2007), aurait-elle ici un rôle? Elle pourrait intervenir dans de nouvelles interactions protéiques ou dans la localisation intracellulaire ou modification de la conformation spatiale de l'oncoprotéine.

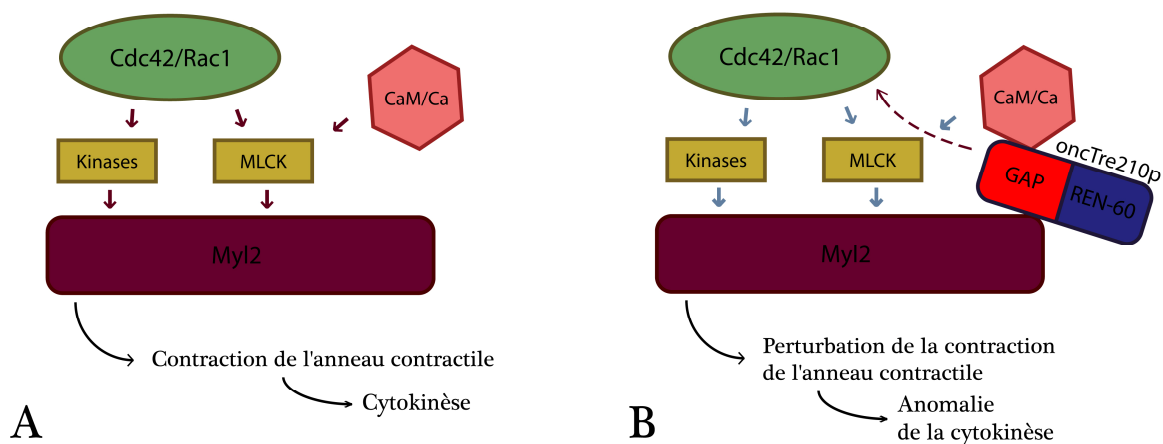


Figure CGP-1: (A) Représentation de la voie d'activation de Myl2 par la calmoduline et le complex Cdc42/Rac. (B) Représentation de l'impact de oncTre210p sur la cytokinèse.

Diverses observations sur la MLCK (cfr. introduction bibliographique) suggèrent qu'elle est impliquée dans l'assemblage de l'anneau contractile et dans sa contraction. Cependant il a été montré que MLCK n'est pas l'unique kinase qui active la myosine lors de la division cellulaire (Somlyo, A.V. *et al.*, 2004). Cela nous fait penser que d'autres protéines partenaires sont nécessaires pour expliquer les désorganisations causées par oncTre210p au niveau de la cytokinèse. Afin d'être complet dans nos interprétations, il faut aussi se rappeler que Cdc42/Rac1 ne joue pas seulement un rôle sur la régulation de la myosine via MLCK mais aussi via d'autres kinases de Myl2 (par exemple : PAK) et que oncTre210p pourrait aussi jouer un rôle complémentaire sur d'autres protéines régulant la cytokinèse.

Il n'est pas si étonnant de retrouver oncTre210p dans cette voie Cdc42/kinase/Myl2. Tout d'abord les homologues levuriens Msb3p et Msb4p s'y retrouvent impliqués comme le montre

divers modèles présentés dans une récente revue (Park, H.O. et Bi, E., 2007). Ensuite, l'implication dans cette voie d'une protéine impliquée dans un cancer a été aussi montrée pour DLC1 (deleted in Liver Cancer 1), un suppresseur de tumeur impliqué directement dans la voie Rho/kinase/Myl2 qui influence la tumorigénicité et le développement métastatique du carcinome hépato-cellulaire (Wang, C.C. *et al.*, 2008).

Enfin, il faut ajouter que l'oncoprotéine n'agirait certainement pas seulement sur l'anneau contractile durant la cytokinèse, mais jouerait un rôle dans la dynamique membranaire (apport et remodelage des membranes) au niveau du sillon de clivage par l'intermédiaire de son interaction avec Arf6, une GTPase. En effet, Arf6 sous sa forme liée au GDP est recrutée par oncTre210p, et mise à proximité de ses GEFs qui induisent son activation (Martinu, L. *et al.*, 2004).

#### Perspectives expérimentales aux modèles proposés

Dans le but de préciser l'action de l'oncoprotéine sur la cytokinèse, il serait intéressant d'observer plus en détail l'organisation de l'actinomyosine selon le niveau d'expression de *oncTre210*. Il faudrait observer un ensemble de lignées cancéreuses où *oncTre210* est exprimée pour obtenir une corrélation entre les défauts et le taux d'expression de l'oncoprotéine. Pour ce faire, et par des techniques d'immunofluorescence, nous pourrions observer l'organisation de l'actine à différentes étapes de la division cellulaire et de la cytokinèse plus en particulier. Le taux d'expression de *oncTre210* pourrait quant à lui être quantifié par la méthode de RT-PCR afin de corréler les effets observés au taux d'expression de *oncTre210*.

Les interactions illustrées dans les modèles ont été décrites une ou plusieurs fois dans la littérature. Cependant, notre modèle ajoute une notion de co-localisation complexe. Il est donc primordial de vérifier celle-ci par des techniques de co-localisation comme celles utilisées dans ce travail. Nous pourrions ainsi confirmer ou infirmer les interactions directes et indirectes présentées dans nos modèles.

Nous pouvons aussi évaluer un possible recrutement de Myl2 et de la calmoduline par oncTre210p. Pour ce faire, des expérimentations d'immunofluorescence pourraient nous le montrer, mais il faudrait aussi prouver le lien physique de recrutement. Est-ce que

oncTre210p peut se lier simultanément avec Myl2 et la Calmoduline/Ca<sup>++</sup> ? Rentrent-t-il en compétition ? Des questions qui pourront trouver réponses lors d'étude de co-immunoprécipitation. De plus nous pourrions analyser les sites d'interactions entre CaM/Ca<sup>++</sup> - Myl2; CaM/Ca<sup>++</sup> - oncTre210p; Myl2 - oncTre210p. Ces analyses donneraient des indications sur d'éventuelles compétitions d'interactions.

#### ***IV. Mot de la fin***

---

Pour terminer, il faut signaler qu'il a été montré au laboratoire et ailleurs, que l'oncoprotéine oncTre210p est également impliquée dans le trafic vésiculaire, qui est un autre mécanisme cellulaire pouvant être associé à l'apparition de cellules cancéreuses. Un modèle a été d'ailleurs proposé lors du travail de thèse de Bizimungu C. sur le dérèglement biologique engendré. Dans ce modèle, oncTre210p inactive rentrerait en compétition avec la GAP active de RN-Tre pour l'activation des GTPases Rab5 et Rab41 dans le processus de contrôle d'endocytose du récepteur à l'EGF et la formation de rides circulaires d'actine.

Selon l'étape de développement des cellules ou le stade d'évolution de la maladie, l'oncogène pourrait être détecté dans l'un ou l'autre de ces mécanismes (trafic vésiculaire ou cytokinèse) impliquant probablement des régulations et localisations spatiales très différentes de la protéine. Ceci montrant que l'oncoprotéine serait associée à la dynamique cellulaire. Ce qui expliquerait la quantité importante de partenaires protéiques identifiées par la méthode du double-hybride en levure au cours de notre travail. En effet, cette étude donne une vision statique des interactions avec oncTre210p, mais toutes n'ont pas forcément lieu simultanément.

Par ailleurs, la structure bipartite de l'oncoprotéine fusionnant deux séquences totalement indépendantes, "GAP" et "REN-60", ajoute à la complexité et diversité du rôle de cette protéine dans la cancérisation des cellules (du Sarcome d'Ewing ou d'autres lignées dans lesquelles elle est exprimée).



# MATERIEL ET METHODES



## ***I. Présentation des souches levuriennes et bactériennes utilisées***

Les souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* et de bactérie *Escherichia coli* utilisées sont reprises et décrites dans le tableau suivant.

Les bactéries citées dans le tableau sont utilisées comme souches réceptrices lors de la construction et l'amplification des vecteurs recombinants.

Les souches levuriennes (à l'exception de Y187, AH109 et MaV203) sont isogènes à FyBLT3 qui est dérivée de S288c, une souche standard de laboratoire pour le séquençage systématique des chromosomes.

<b>Souches levuriennes</b>	<b>Génotype</b>	<b>Origine</b>
Y187	<i>MAT α, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ, gal80 Δ, mef, URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ MEL1</i>	BD Clontech
AH109	<i>MATα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ, gal80 Δ, LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3 GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ MEL1</i>	BD Clontech
MaV203	<i>MAT α, leu2-3, 112, trp-901, his3 Δ200, ade2-1, gal4 Δ, gal80 Δ, SAPL10::URA3, GAL1::lacZ, HIS3<sub>uasgal1</sub>::HIS3-@LYS2, can1<sup>R</sup>, cyh2<sup>R</sup></i>	Invitrogen
FyBLT3	<i>MATα/MATα, ura3 Δ851/ura3 Δ851, trp1 Δ63/trp1 Δ63, leu2 Δ1/leu2 Δ1, his3 Δ200/his3 Δ200, lys2 Δ202/+</i>	Fairhead et al., 1996
FyBLT3-YN	<i>MATα/MATα, ura3 Δ851/ura3 Δ851, trp1 Δ63/trp1 Δ63, leu2 Δ1/leu2 Δ1, his3 Δ200/his3 Δ200, lys2 Δ202/lys2 Δ202, msb3- Δ1::TRP1/msb3- Δ1::TRP1, msb4- Δ1::kan<sup>R</sup>/msb4- Δ1::kan<sup>R</sup></i>	Bach, 2000
FyBLT3-Y	<i>MATα/MATα, ura3 Δ851/ura3 Δ851, trp1 Δ63/trp1 Δ63, leu2 Δ1/leu2 Δ1, his3 Δ200/his3 Δ200, lys2 Δ202/+, msb4- Δ1::kan<sup>R</sup>/msb4- Δ1::kan<sup>R</sup></i>	Bach, 2000
FyBLT3-N	<i>MATα/MATα, ura3 Δ851/ura3 Δ851, trp1 Δ63/trp1 Δ63, leu2 Δ1/leu2 Δ1, his3 Δ200/his3 Δ200, lys2 Δ202/lys2 Δ202, msb3- Δ1::TRP1/msb3- Δ1::TRP1</i>	Bach, 2000
NL3d	<i>MATα, ura3 Δ851, trp1 Δ63, leu2 Δ1, his3 Δ200, lys2 Δ202</i>	
FyB7d	<i>MATα, ura3 Δ851, trp1 Δ63, leu2 Δ1, his3 Δ200, msb4- Δ1::kan<sup>R</sup></i>	Bach, 2000



NL1d	<i>MATa, ura3Δ851, trp1Δ63, leu2Δ1, his3Δ200, lys2Δ202, msb3-Δ1::TRP1</i>	Bach, 2000
YNL1d	<i>MATa, ura3Δ851, trp1Δ63, leu2Δ1, his3Δ200, lys2Δ202, msb3-Δ1::TRP1, msb4-Δ1::kan<sup>R</sup></i>	Bach, 2000
YNL2b	<i>MATa, ura3Δ851, trp1Δ63, leu2Δ1, his3Δ200, lys2Δ202, msb3-Δ1::TRP1, msb4-Δ1::kan<sup>R</sup></i>	Bach, 2000
<b>Souches</b>		
<b>bactériennes</b>	<b>Génotype</b>	<b>Origine</b>
DH5α	<i>F<sup>-</sup> Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) gal<sup>-</sup> phoA supE44 λ<sup>-</sup> thi<sup>-1</sup> gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
DH10B	<i>F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ<sup>-</sup> rpsL (Str<sup>r</sup>) nupG λ<sup>-</sup> tonA</i>	Invitrogen
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F<sup>'</sup> proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Stratagene
BL21 Star (DE3)pLysS	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm rneI31 (DE3) pLysS (Cam<sup>R</sup>)</i>	Invitrogen
EP-Max 10B	<i>F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK rpsL nupG λ<sup>-</sup></i>	Biorad

*Tableau MT-1 : Présentation des souches levuriennes et bactériennes utilisées.*

## *II. Présentation des cellules de mammifères utilisées et milieu de culture*

---

Deux types cellulaires ont été utilisés au cours de ce travail.

La lignée HEK293 (ATCC : CRL-1573) est composée de cellules du rein d'un embryon humain (Human Embryonic Kidney) transfectées par l'ADN d'un adénovirus humain de type 5 (Ad5). La lignée Hela (ATCC : CCL-2) est une lignée de cellules tumorales issues d'un carcinome du col utérin.

Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium de Sigma-Aldrich) complété par 10% de sérum de veau fœtal inactivé (Sigma Aldrich), 100U/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine et 292µg/ml de L-glutamine et maintenues dans un incubateur en atmosphère humide à 37°C, enrichie en 5% de CO<sub>2</sub>.

### ***III. Présentation des vecteurs utilisés***

---

- **pGBT-CYH** : plasmide navette *S. cerevisiae/E. coli*. Il dérive du vecteur pGBT9.C (Bartel *et al.*, 1996) dans lequel a été inséré, au niveau du site *AatII*, le gène *CYH2*. Ce gène confère, à une souche de levure, la sensibilité à la cycloheximide (antibiotique inhibant la synthèse protéique). Ce plasmide contient la séquence codant pour le domaine de liaison à l'ADN (BD, Binding Domain) de l'activateur transcriptionnel Gal4p dont l'expression est placée sous contrôle du promoteur (*pADH*) et du terminateur (*tADH*) du gène *ADH1* (code pour l'alcool déshydrogénase). Ce vecteur a été utilisé lors de la technique du double-hybride afin de produire la protéine de fusion entre la protéine appât et le BD de Gal4p. Le gène *TRP1* fut utilisé comme marqueur de sélection phénotypique dans la transformation de la souche Y187 (*Mata*) comme le gène de résistance à l'ampicilline pour la transformation dans la souche DH5 $\alpha$ . Les séquences ARS et CEN4 ont permis au vecteur de se répliquer de façon autonome et d'être transmis de façon stable à la descendance de ces cellules.
- **pGBT-GAP** et **pGBT-REN-60** : plasmides recombinants appâts obtenus par insertion respective de la partie Tre-GAP et de la partie Tre-REN-60 de la phase codante de *oncTre210* au niveau de la cassette de clonage de pGBT-CYH (site *SmaI/SalI* pour Tre-GAP et *SmaI* pour Tre-REN-60). L'insertion est réalisée en phase avec le BD de *GAL4*.
- **pACT2** : plasmide navette de la firme BD Clontech *S. cerevisiae/E. coli* utilisé lors de la technique double-hybride. La présence de l'origine de réplication du plasmide naturel 2 $\mu$  permet à ce plasmide d'être présent de 25 à 200 copies par cellule de levure transformée. C'est au niveau de la cassette de clonage de ce plasmide (site *EcoRI*) qu'ont été insérés, en fusion avec le domaine d'activation de la transcription de Gal4p (AD, Activation Domain), les fragments d'ADN (codant pour les protéines proies) provenant des banques testées lors de la première partie de la recherche de protéine partenaire. Les hybrides de fusion résultants sont ainsi placés sous contrôle des régions *pADH* et *tADH*. Les gènes *amp*<sup>R</sup> et *LEU2* présents sur ce plasmide sont utilisés comme marqueurs de sélection dans la transformation respective d'*E. coli* et de *S. cerevisiae*.

- **pYX122** : plasmide centromérique navette *S. cerevisiae/E. coli* (possède une origine de réplication bactérienne ainsi que les séquences *ARS* et *CEN*). Il existe à raison de une à cinq copies par cellules haploïde et possède le gène *HIS3*, utilisé comme marqueur de sélection lors de la transformation de souches de levure. C'est un vecteur d'expression levurien. En effet, la présence du promoteur du gène codant pour la triose-phosphate isomérase (TPI) en amont de la cassette de clonage permet l'expression constitutive d'une séquence codante dans la cellule de levure.
  
- **pYX-*oncTre210*** : plasmide recombinant obtenu par Bach en 2000 par insertion de l'intégralité de la phase codante du gène *oncTre210* (2361 pb) au niveau de la cassette de clonage de pYX122 (site *BamHI*).
  
- **pET-20b** : plasmide de surexpression bactérien portant une séquence signal *pelB* en N-terminale pour une potentielle localisation periplasmique (Novagen).
  
- **pET-20b-*oncTre210*** : plasmide recombinant obtenu par insertion dans le plasmide pET-20b de la phase codante du gène *oncTre210* (2361 pb).
  
- **YEp356** : plasmide répliatif de type épisomal, à un nombre de copies élevé (environ 50 par génome). YEp356 fut construit en 1986 par Myers *et al.* Il contient un gène de résistance à l'antibiotique ampicilline pour la sélection bactérienne et un marqueur de sélection *URA3* pour la transformation en levure. Lors de la construction de la banque génomique de levure, les ADNs ont été insérés au niveau du site *BamHI* de la cassette de clonage.
  
- **pRS313** : plasmide centromérique navette *S. cerevisiae/E. coli*. Il existe à raison de une à cinq copies par cellule haploïde et possède le gène *HIS3*, utilisé comme marqueur de sélection lors de la transformation de souches de levure.
  
- **pDONR221** : plasmide donneur Invitrogen compatible à la technologie Gateway pour l'obtention du clone d'entrée.

- **pDONR GAP** et **pDONR REN-60** : plasmides recombinants appâts obtenus par insertion respective de la partie Tre-GAP et de la partie Tre-REN-60 de la phase codante de *oncTre210* au niveau de la cassette de clonage Gateway de pDONR211.
- **pPC97-dest** : plasmide centromérique (Invitrogen) navette *S. cerevisiae/E. coli*. C'est un vecteur d'expression levurien. C'est au niveau des cassettes de clonage du système Gateway de ce plasmide qu'ont été insérés, en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4p, les fragments d'ADN (codant pour les protéines appâts) testés lors de la deuxième partie de la recherche de protéines partenaires. Les hybrides de fusion résultants sont ainsi placés sous contrôle des régions *pADH* et *tADH*. Les gènes *amp<sup>R</sup>* et *LEU2* présents sur ce plasmide sont utilisés comme marqueurs de sélection dans la transformation respective d'*E. coli* et de *S. cerevisiae*
- **pPC97 GAP** et **pPC97 REN-60** : plasmides recombinants appâts obtenus par insertion respective de la partie Tre-GAP et de la partie Tre-REN-60 de la phase codante de *oncTre210* dans pPC97.
- **pPC86** : plasmide centromérique (Invitrogen) navette *S. cerevisiae/E. coli*. C'est un vecteur d'expression levurien. C'est au niveau des cassettes de clonage du système Gateway de ce plasmide qu'ont été insérés, en fusion avec le domaine d'activation de la transcription de Gal4p (AD, Activation Domain), les fragments d'ADN (codant pour les protéines proies) provenant des banques testées lors de la deuxième partie de la recherche de protéines partenaires. Les hybrides de fusion résultants sont ainsi placés sous contrôle des régions *pADH* et *tADH*. Les gènes *amp<sup>R</sup>* et *TRP1* présents sur ce plasmide sont utilisés comme marqueurs de sélection dans la transformation respective d'*E. coli* et de *S. cerevisiae*.
- **pEXP-AD502** : plasmide navette (Invitrogen) qui dérive du vecteur pPC86 utilisé dans la construction de la banque d'ADNc de foie humain.
- **pcDNA3.1(+)** : plasmide d'expression constitutif en cellules de mammifères contenant un promoteur CMV, promoteur du gène précoce du cytomégalo virus humain (Invitrogen).

- **pFD13** (ou pFLAG) : plasmide construit par Dequiedt F. dérivant de pcDNA3.1(+) pouvant exprimer en cellules de mammifères des protéines fusionnées à FLAG.
- **pFLAG-Tre-GAP et pFLAG-Myl2 et pFLAG-LOC91256** : plasmides obtenus par insertion dans le vecteur pFLAG de respectivement la partie Tre-GAP de la phase codante de *oncTre210*, l'ORF de Myl2 et LOC91256.
- **pFD60** (ou pMyc) : plasmide construit par Dequiedt F. dérivant de pcDNA3.1(+) pouvant exprimer en cellules de mammifères des protéines fusionnées à c-myc.
- **pMyc-Tre-GAP et pMyc-Myl2 et pMyc-LOC91256** : plasmides obtenus par insertion dans le vecteur pMyc de respectivement la partie Tre-GAP de la phase codante de *oncTre210*, l'ORF de Myl2 et LOC91256.
- **pGEX-2T** : plasmide d'expression en cellules procaryotes contenant *lacI<sup>q</sup>*, inducible en présence d'IPTG et gouverné par un promoteur de type *tac* (Amersham Biosciences)
- **pGST-Tre-GAP et pGST-Myl2 et pGST-LOC91256** : plasmides obtenus par insertion dans le vecteur pGST de respectivement la partie Tre-GAP de la phase codante de *oncTre210*, l'ORF de Myl2 et LOC91256.
- **pEGFP-C1** (ou pGFP) : plasmide commercialisé par BD Clontech qui exprime en cellules de mammifère, par l'intermédiaire d'un promoteur CMV, la protéine EGFP et autorise l'insertion de séquences en position carboxy-terminale de la protéine fluorescente. L'EGFP est une variante de la GFP (*Green Fluorescent Protein*), isolée à partir de la méduse *Aequorea victoria*, qui peut être excitée à une longueur d'onde de 489 nm pour ainsi émettre à une longueur de 508nm.
- **pGFP-Tre-GAP et pGFP-Myl2 et pGFP-LOC91256** : plasmides obtenus par insertion dans le vecteur pGFP de respectivement la partie Tre-GAP de la phase codante de *oncTre210*, l'ORF de Myl2 et LOC91256.

- **pHcRed1-C1** (ou pRFP) : plasmide commercialisé par BD Clontech qui exprime en cellules de mammifère, par l'intermédiaire d'un promoteur CMV, la protéine HcRed1 et autorise l'insertion de séquences en position carboxy-terminale de la protéine fluorescente. L'HcRed1 est dérivée d'une chromo-protéine non-fluorescente se trouvant chez le corail de récif *Heteractis crispa*. La fluorescence a été générée par combinaison de mutations aléatoires et dirigées. Cette protéine peut être excitée à une longueur d'onde de 588 nm pour ainsi émettre à une longueur de 618nm.
- **pRFP-Tre-GAP** et **pRFP-Myl2** et **pRFP-LOC91256** : plasmides obtenus par insertion dans le vecteur pRFP de respectivement la partie Tre-GAP de la phase codante de *oncTre210*, l'ORF de Myl2 et LOC91256.

## IV. Composition des milieux de culture pour bactérie et levure

---

*Remarques préliminaires :*

- *Les milieux sont stérilisés dans un autoclave à 120°C pendant 20 minutes et à une pression d'un bar;*
- *Les milieux se présentent sous une forme liquide ou solide ; dans ce dernier cas, l'ajout de 2% d'agar est nécessaire.*

### 1. Milieux de culture pour bactérie

Le milieu riche Luria Bertani (LB) se compose de 1% de Bactotryptone (DIFCO), 0,5% d'extrait de levure (GIBCO BRL) et de 1% de NaCl. Du milieu 2xYT Broth (LAB M™) est également utilisé. Les milieux sont ajustés à pH 7,5. L'addition d'antibiotique se déroule, après passage à l'autoclave, à raison de 0,005% pour l'ampicilline (Sigma-Aldrich) et de 0,005% pour la kanamycine (Sigma-Aldrich).

### 2. Milieux de culture pour levure

#### a) Milieu riche

Le milieu riche (YPD) est constitué des éléments suivants : 1% d'extrait de levure (GIBCO BRL), 2% de peptone (ICN) et 2% de glucose. Du milieu YPD Broth de chez LAB M™ est également utilisé. Pour les levures auxotrophes en adénine, l'ajout d'adénine, stérilisée par autoclave, à raison 0,002% est nécessaire (YPDA).

#### b) Milieu minimum

Le milieu minimum Mam est obtenu par addition de 0,17% Yeast Nitrogen Base without aa and ammonium sulfate (Difco), de 0,5% de sulfate d'ammonium (Merck) et de 2% de glucose. Ce milieu est amené à pH 5,8. Afin de compenser les éventuelles auxotrophies, ce milieu peut être complété, après stérilisation, par ajout d'aa ou de base azotée.

#### c) Dropout (DO)



Le dropout est une solution d'éléments nutritifs essentiels aux levures dans la technique double-hybride (DH) pour l'étude de partenaires protéiques. Pour la première technique DH utilisée, une solution concentrée dix fois est réalisée et décrite dans mon mémoire de DEA (Dechamps, 2003).

Pour la seconde technique de criblage double-hybride en levure, l'utilisation de Yeast Synthetic Drop-out Medium Amino Acid Supplement Without Histidine, Leucine, Tryptophan and Uracil (Sigma-Aldrich) est effectuée.

d) L'ajout en acide aminé et autres éléments nutritifs

Pour la première technique double-hybride utilisée, quatre nutriments peuvent être additionnés stérilement au milieu Mam : 4 ml/l d'adénine 0,5%, 5 ml/l d'histidine 0,4%, 4 ml/l de leucine 1% et 6 ml/l de tryptophane 0,5%.

Par contre dans la seconde technique, 8 ml par litre de milieu sont ajoutés pour chaque solution en acide aminé ou autre élément nutritif stérilisé dont les concentrations sont les suivantes : uracile 20 mM, histidine 100mM, tryptophane 40 mM.

Dans tous les autres cas de complémentation du milieu minimum Mam, l'ajout d'aa ou de base azotée s'effectue sous les conditions suivantes : 0,002% de L-Histidine, 0,004% de L-Leucine, 0,004% de L-Lysine, 0,002% de L-Méthionine, 0,003% de L-Tryptophane, 0,0025% d'Uracile et 0,008% d'Adénine.

e) L'ajout d'antibiotique

Les antibiotiques peuvent être additionnés au milieu de culture pour levure à raison de 10-15 mg/l pour la kanamycine et de  $25 \cdot 10^4$  unités/l de pénicilline G (Sigma-Aldrich).

f) L'ajout de 3-AT

Dans la première technique DH, du 3-amino-triazol (Sigma-Aldrich) est ajouté au milieu à raison de 2 ml d'une solution de 1 M stérilisée par filtration.

Dans la seconde technique DH, 1,18 g/l de 3-amino-triazol (Sigma-Aldrich) est additionné avant de couler les boîtes pour ainsi obtenir une concentration de 20mM en 3-AT.

g) L'ajout de 5FOA

L'addition de 2 g/l d'acide 5-Fluoro-orotique (BioVectra) est réalisée avant la préparation des boîtes.

h) L'ajout de 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside (X- $\alpha$ -gal)

Pour obtenir une concentration de 20 mg/ml, le X- $\alpha$ -gal (Clontech) est dissout dans du diméthylformamide (DMF) et conservé dans un tube en verre opaque à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Pour la préparation de boîtes X- $\alpha$ -gal, 2 ml de la solution de X- $\alpha$ -gal est ajouté à 1 litre de milieu Mam contenant les acides aminés nécessaires à la croissance, avant de couler les boîtes.

Pour la préparation de boîtes X- $\alpha$ -gal (boîtes de 145 mm de diamètre) contenant déjà le milieu minimum Mam, étaler 200  $\mu\text{l}$  d'une solution de X- $\alpha$ -gal diluée à 4 mg/ml dans du DMF. Ensuite laisser les boîtes sécher à température ambiante durant 15 minutes.

## V. Oligonucléotides

---

Les oligonucléotides utilisés dans le cadre de ce travail présentés dans le tableau ci-après ont été synthétisés chez Sigma-Aldrich. Les domaines spécifiques à la technique Gateway sont en rouge. La localisation correspond à la position par rapport au A du premier ATG de la phase codante ou à la première base du site de clonage pour les vecteurs.

<b>Nom de l'oligonucléotide</b>	<b>Localisation</b>	<b>Séquence</b>
<b>Oligonucléotides pour le séquençage de <i>oncTre210</i></b>		
A1Tre	210-228	5' GATGACACGAACGAGC 3'
A2Tre	524-541	5' CCTATTCGGAGTATAACC 3'
A3Tre I	825-8542	5' GATCTCTCTCGGGCTCAC 3'
A3Tre II	809-825	5' GAACCTGATTGACGGGA 3'
A4Tre	1120-1138	5' GCTTCACGTGGTGGGAAGA 3'
A5Tre	1415-1432	5' GATTTTGAACGGAGCTGC 3'
A6Tre	1736-1753	5' GGCATATGGCTAAATGCT 3'
A8Tre	2080-2099	5' TGTGGGCATATAAGTGTCCG 3'
A9Tre	1070-1052	5' GGCAGGTCCCCTTGCTTCC 3'
A10Tre	802-783	5' GGCAGCCTAACGAGGCACAC 3'
A11Tre	345-326	5' GTTCAGGAGGACTGACCACA 3'
A12Tre	1535-1516	5' GACATCTCCTCAGGCCAACT 3'
A13Tre	1590-1610	5' AGCCACAGGTCTAAGCAACCT 3'
A14Tre	1922-1937	5' GAGTCCATGAAAAGCC 3'
A15Tre	1886-1869	5' GCCAGAAGTTCTTGGGAG 3'
<b>Oligonucléotide de vérification de la présence d'insert sur pGBT-CYH</b>		
PGBT3'	Séquence en 3' de la cassette de clonage	5' AAATTCGCCCGGAATTAG 3'

<b>Oligonucléotides pour le clonage de la partie Tre-GAP de <i>oncTre210</i> dans le plasmide pGBT-CYH</b>		
GAPDH1	1-21	5' TTCCCGGGGATGGACATGGTAGAGAATGCA 3'
GAPDH2	1494-1474	5' AGGTTCGACGTCCGCAGTGTTCAGCCTGCCA 3'
<b>Oligonucléotides pour le clonage de la partie Tre-REN-60 de <i>oncTre210</i> dans le plasmide pGBT-CYH</b>		
RENDH1	1475-1515	5' TTCCCGGGGAGGTTTACAACAAAGATATG 3'
RENDH2	2361-2341	5' AGGTTCGACGTTAGGGTGAACATTCCATTTG 3'
RENDH1(3)	1475-1515	5' TCCCCCGGGGAGGAGGTTTACAACAAAGATATG 3'
RENDH2(3)	2361-2341	5' TCCCCCGGGGATTTTLAGGGTGAACATTCCATTTG 3'
<b>Oligonucléotides pour le séquençage et l'amplification d'insert à partir de pGAD GH</b>		
pGAD GH 5'	Séquence en 5' de la cassette de clonage	5' CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC 3'
pGAD GH 3'	Séquence en 3' de la cassette de clonage	5' GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT 3'
<b>Oligonucléotides pour le séquençage et l'amplification d'insert à partir de pACT2</b>		
OliACT2	Séquence en 5' de la cassette de clonage	5' AGCTTGGGTGGTCATATGGCCA 3'
3AD	Séquence en 3' de la cassette de clonage	5' GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGA 3'
<b>Oligonucléotides Gateway avec les séquences <i>AttB1</i> et <i>AttB2</i> pour la partie Tre-GAP de <i>oncTre210</i></b>		
GAP.F	3-23	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTG GACATGGTAGAGAATGCAGA 3'
GAP.R	1492-1475	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCG CAGTGTTCAGCCTGCC 3'
<b>Oligonucléotides Gateway avec les séquences <i>AttB1</i> et <i>AttB2</i> pour la partie Tre-REN-60 de <i>oncTre210</i></b>		
REN.F	1475-1517	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCT GAGGTTACAACAAAGATATGAG 3'
REN.R	2358-2338	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAG GGTGAACATTCCATTTGTAG 3'

<b>Oligonucléotides de vérification de la présence d'insert sur pPC86 ou dérivés</b>		
F-pPC86	Séquence en 5' du site d'insertion de la banque	5' TATAACGCGTTTGGAACTACT 3'
R-pPC86	Séquence en 3' du site d'insertion de la banque	5' GTAAATTTCTGGCAAGGTAGAC 3'
<b>Oligonucléotides de vérification de la présence d'insert sur YEp356</b>		
YEp356-5'	Séquence en 5' du site d'insertion <i>BamHI</i>	5' GAATTCGAGCTCGGTAC 3'
YEp356-3'	Séquence en 3' du site d'insertion <i>BamHI</i>	5' GGGATCGCAAGCTTGCA 3'
<b>Oligonucléotides pour les sous-clonages des clones S8 et S18</b>		
VPS35-3'	2301 - 2270	5' GCTCTAGAGCGTACTGTACTGTACCCCATGT 3'
FBP26-5'	1760 - 1783	5' TCCCCCGGGTTCGACGCACTTGTG 3'
COX6-3'	1206 - 1233	5' GCTCTAGAGCGGAACGTAGGTTTATCTG 3'
CIC1-5'	968 - 997	5' TCCCCCGGGTATTCTGTGCTTCACCGTT 3'
<b>Oligonucléotides pour le clonage de la partie Tre-GAP dans le plasmide pFD60</b>		
pcDNA GAP 5'		5' GTGGATCCGATGGACATGGTAGAGA 3'
pcDNA GAP 3'		5' AAAGCTTGGTCCGCAGTGTTTCAG 3'
<b>Oligonucléotides pour le clonage de la partie Tre-GAP dans le plasmide pFD13</b>		
pcDNA myl2 5'		5' TTAAGCTTGGATGGACATGGTAGAGA 3'
pcDNA myl2 3'		5' TGGATCCGAGCTCCGCAGTGTTTCAG 3'
<b>Oligonucléotides pour le clonage de Tre-GAP dans les plasmides pGEX-2T, pEGFP-C1 et pHcRed1-C1</b>		
pGEX GAP 5' (2)		5' GTGGATCCATGGACATGGTAGAGAATGCAGAT 3'
pGEX GAP 3' (2)		5' GTGGATCCTCCGCAGTGTTTCAGCCTGCCA 3'
<b>Oligonucléotides pour le clonage de Myl2 dans le plasmide pFD60 et pFD13</b>		
myl2-5' EcoRI		5' GCAGAATTCATGGCACCTAAGAAAGC 3'
myl2-3' EcoRI		5' TGGAATTCGTCTTCTCTTCTCC 3'

<b>Oligonucléotide pour le clonage de Myl2 dans le plasmide pGEX-2T</b>		
pGEX myl2 5'		5' GCAGAATTCATATGGCACCTAAGAAAGC 3'
<b>Oligonucléotides pour le clonage de Myl2 dans les plasmides pEGFP-C1 et pHcRed1-C1</b>		
pFP Myl2 5'		5' TCGAATTCTATGGCACCTAAGAAAGC 3'
pFP Myl2 3'		5' AGAATTCGAGTCCTTCTCTTCTCC 3'
<b>Oligonucléotides pour le clonage de LOC91256 dans les plasmides pFD60 et pFD13</b>		
BHO6-5' EcoRI		5' GCAGAATTCATGGCAGTGCTCAAACCTC 3'
BHO6-3' EcoRI		5' TGGAATTCCTGGCTGTGTCAGCTC 3'
<b>Oligonucléotide pour le clonage de LOC91256 dans le plasmide pGEX-2T</b>		
pGEX BHO6 5'		5' GCAGAATTCATATGGCAGTGCTCAAACCTC 3'
<b>Oligonucléotides pour le clonage de LOC91256 dans le plasmide pEGFP-C1 et pHcRed1-C1</b>		
pFP BHO6 5'		5' TCGAATTCTATGGCAGTGCTCAAACCTC 3'
pFP BHO6 3'		5' AGAATTCGACTTGGCTGTGTCAGCTC 3'
<b>Oligonucléotides de séquençage et de vérification de la présence d'insert sur pFD60 et pFD13</b>		
FD30		5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
FD31		5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'
<b>Oligonucléotides de séquençage et de vérification de la présence d'insert sur pGEX-2T</b>		
pGEX-2T 5'	Séquence en 5' de la cassette de clonage	5' GTGATCATGTAACCCATCCTGA 3'
pGEX-2T 3'	Séquence en 3' de la cassette de clonage	5' CTCCGCTATCGCTACGTGACTG 3'
<b>Oligonucléotides de séquençage et de vérification de la présence d'insert sur pEGFP-C1 et pHcRed1-C1</b>		
pEGFP-C1 5'	Séquence en 5' de la cassette de clonage de pEGFP-C1	5' GTGAACTTCAAGATCCGCC 3'
pHcRed1-C1 5'	Séquence en 5' de la cassette de clonage de	5' CGGAACGTGATGGCCCT 3'

---

	pHcRed1-C1
pFP 3'	Séquence en 3' de 5' TTAACAACAACAATTGCA 3'
	la cassette de
	clonage

---

*Tableau MT-2 : Liste des oligonucléotides utilisés.*

## VI. Méthodes relatives aux manipulations d'acides nucléiques

---

### 1. Extraction d'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique est effectuée grâce au QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) pour des petites quantités. Pour les plus grandes quantités, le HiSpeed Plasmid Midi Kit (QIAGEN) est utilisé.

### 2. Extraction d'ADN total de levure

La technique utilisée, en vue d'une transformation bactérienne par électroporation, est l'extraction au phénol-chloroforme.

Tout d'abord, deux grosses anses de cellules sont resuspendues dans 200 µl d'un tampon de lyse (2% v/v Triton X-100, 10% v/v SDS10%, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8 et 1 mM EDTA pH 8), ensuite 200 µl de solution phénol/chloroforme/alcool isoamylique et 0,3 g de billes de verre traitées sont ajoutés. Le tout est mélangé au vortex pendant 3 minutes et suivi par l'addition d'un même volume de tampon TE (Tris 10mM et EDTA 1mM, pH 8). La solution est centrifugée pendant 5 minutes à 13000 rpm à 4°C. La phase aqueuse est transférée dans un autre tube où une précipitation avec deux volumes d'éthanol 100% (1 ml) est réalisée à une température de -20°C. Le tube est centrifugé sous les mêmes conditions que l'étape précédente et le culot est resuspendu dans du tampon TE (400µl) à 4°C.

Pour éliminer les ARNs, 30 µl de RNase A (1 mg/ml) est ajouté et laissé à 37°C pendant 5 minutes. Ensuite l'addition de 10 µl d'acétate d'ammonium 4M et de 1 ml d'éthanol 100% permet la précipitation de l'ADN. Pour terminer, une centrifugation est effectuée, le culot est mis à sécher et est ensuite resuspendu dans 100 µl d'eau stérile. L'ADN récupéré est conservé à -20°C.

Une autre technique, utilisée lors de l'isolement de l'ADN génomique de double mutant haploïde YNL2b, a été entreprise dans le but d'obtenir de l'ADN en grande quantité et le plus « propre » possible. Cette méthode comporte 5 étapes : une première qui correspond à l'obtention d'une culture cellulaire, la deuxième à la formation de protoplastes suivi de la lyse de ceux-ci, une quatrième permettant d'éliminer les protéines et enfin la précipitation et purification de l'ADN.



### 3. Transformation des cellules de bactérie

Les transformations des souches bactériennes XL1-Blue et DH5 $\alpha$  par de l'ADN plasmidique sont réalisées suivant la méthode chimique au chlorure de calcium et choc thermique à 37°C pendant 45 secondes comme décrite par Okayama et Berg en 1982. Pour DH10B, EP-Max 10B et DH5 $\alpha$ , la technique de transformation par électroporation est préférée. Cette dernière technique est réalisée à partir du Gene Pulser Xcell Electroporation System (Biorad) dans des cupules d'électroporation de 0,1 cm.

### 4. Transformation des cellules de levure

Comme pour les bactéries, deux techniques sont utilisées. La première est la méthode à l'acétate de lithium et par choc thermique à 42°C pendant 15 minutes décrite par Ito *et al.* (1983) et améliorée par Gietz *et al.* (1992). La seconde est la technique électroporation selon les indications fournies avec le Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad).

### 5. Transfection des cellules HEK293

#### a) Préparation des cellules

Ce protocole est réalisé à partir d'une culture de HEK293 provenant d'une bouteille de type Nunc pour obtenir 4 boîtes de transfection.

Tout d'abord le milieu de culture de la bouteille est enlevé et les cellules sont lavées au PBS pour être ensuite décrochées avec 7 ml de trypsine-EDTA (Invitrogen).

La solution est récupérée avec 10 ml de milieu de culture préchauffé à 37°C et portée à un volume total de 5X le volume de trypsine.

Les cellules sont récupérées par centrifugation à faible vitesse et resuspendues dans 10 ml de milieu de culture. La resuspension est divisée dans les 4 boîtes de culture. Après ajout de 20 ml de milieu par boîtes, celles-ci sont mises à incuber 24h à 37°C dans une atmosphère contrôlée.

b) Transfection des cellules

Une heure avant transfection, le milieu de culture des boîtes est remplacé.

Lors de chaque transfection, 50µg d'ADN est engagé. Cet ADN se trouvant en solution dans une solution de HBS (KCl 10 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 1,5 mM, dextrose 12 mM, HEPES 50 mM) contenant du CaCl<sub>2</sub> 100 mM est déposé goutte à goutte sur le milieu de culture. Les boîtes de transfection sont ensuite mises en étuve pour incubation. Le milieu est changé après 24h.

c) Récolte et lyse des cellules (à froid)

Deux jours après la transfection, les boîtes sont placées sur glace et vidées de leur milieu de culture. Les cellules sont lavées trois fois au PBS froid et récupérées par décrochage avec 10 ml de PBS. Ces cellules sont lavées trois fois au PBS. Le culot de cellules est resuspendu dans 5 fois le volume du culot de tampon de lyse IPLS (NP-40 0,5%, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 0,5 mM, NaCl 120 mM) contenant des inhibiteurs de protéases.

La lyse se déroule sous agitation à 4°C pendant 30 minutes. Ensuite, les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation. Le lysat peut être stocké à -80°C après congélation dans l'azote liquide.

6. Transfection des cellules HeLa pour observation au microscope

Des cellules HeLa sont comptées à l'aide d'une cellule de Thomas et mises en culture dans les puits d'un « 24-wells », contenant des lamelles de verre, de manière à avoir 80000 cellules par puits. Ces cellules sont incubées pendant une nuit dans une étuve à 37°C, sous une atmosphère contrôlée de 5 % en CO<sub>2</sub>. Deux millilitres de liposome, lipofectamine2000, par microgramme d'ADN est utilisé. Pour chaque puits, 100 µl de milieu de culture opti MEM (Invitrogen) sont mélangés à un certain volume de Gene Jammer mesuré en fonction de la quantité d'ADN par puits. Après 5 minutes d'attente, ce mélange est ajouté à l'ADN (entre 1 et 2 µg dans 100 µl). De nouveau après 5 minutes d'incubation à température ambiante, le milieu des cellules est remplacé par 200 µl de milieu de culture sans sérum et le mélange ADN/liposome est délicatement déposé sur les cellules.

Après avoir laissé les cellules 24h en culture, trois lavages au PBS sont réalisés. Ensuite, 200ml de paraformaldéhyde 3,7%, permettant la fixation des cellules, sont ajoutés à chaque puits durant 20 minutes. Après trois nouveaux lavages au PBS, les lamelles sont récupérées et collées sur une lame à l'aide de l'antifade.

#### 7. Restriction des fragments d'ADN

L'ADN est digéré par les enzymes de restriction adéquates en suivant les recommandations du fournisseur (Amersham Biosciences ou Fermentas).

#### 8. Marqueur de poids moléculaire

Trois marqueurs de poids moléculaire sont utilisés, le premier est constitué du mélange de l'ADN du bactériophage  $\lambda$  digéré par *HindIII* (de 0,5 à 23 kb) (Life Technology) et de l'ADN du virus  $\Phi$ X-174-RF digéré par *HaeIII* (de 0,2 à 1,3 kb) (Invitrogen).

Le deuxième est le SmartLadder commercialisé par Eurogentec et le troisième est le 1 kb Plus DNA Ladder de chez GibcoBRL-Life-Technologies.

#### 9. Purification de fragments d'ADN

Après leur séparation électrophorétique, les fragments d'ADN sont extraits du gel d'agarose et purifiés en utilisant le kit QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit commercialisé par la firme QIAGEN.

#### 10. Traitement à la phosphatase alcaline

Après restriction enzymatique, le plasmide est traité à la phosphatase alcaline en suivant les recommandations du fournisseur (Amersham Biosciences).

#### 11. Ligation

Les ligations de molécules d'ADN sont réalisées en utilisant le kit Ready-to-go T4 DNA Ligase Kit, fourni par la société Amersham Biosciences.

## 12. Amplification de fragments d'ADN par PCR

Les amplifications par PCR sont réalisées à l'aide de l'appareil PTC-200™ Programmable Thermal Controller de la société MJ Research avec le programme de températures suivant :

Etape 1 :	92°C	5'
Etape 2 :	85°C	1'
Etape 3 :	92°C	15''
Etape 4 :	50°C	1'30''
Etape 5 :	72°C	1'30''
Etape 6 :	retour à l'étape 3 pour 29 cycles	
Etape 7 :	72°C	10'
Etape 8 :	4°C	∞

Les enzymes utilisées sont la Taq DNA polymérase et la Pwo DNA polymérase de Roche ainsi que la BD Titanium Taq DNA polymérase et BD Advantage2 ADN polymérase de la firme BD Clontech. De plus, la Platinum ADN polymérase de la firme Invitrogen a été employée lors du séjour à Boston.

## 13. Séquençage de fragments d'ADN

Le séquençage a été effectué par l'intermédiaire de la firme GATC Biotech AG (Konstanz) en Allemagne (<http://www.gatc.de>).

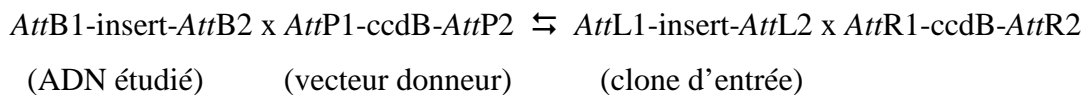
## 14. Technique Gateway pour la construction d'un plasmide cible pour le double-hybride en levure

### a) Principe du système Gateway

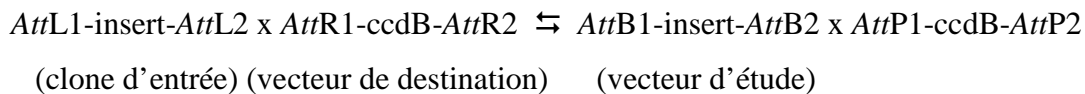
La technologie Gateway de chez Invitrogen est une technique de clonage basée sur les propriétés du bactériophage lambda de recombinaison site-spécifique qui permet son intégration dans le génome de *E. coli*. L'intégration se déroule par recombinaison du site attP, de l'ADN du phage, et le site attB, localisé dans le génome de la bactérie. Cela génère l'incorporation du génome du phage encadré des sites attL et attR. Cette étape nécessite deux

enzymes : le « phage protein integrase » (Int) et le « bacterial protein integration host factor » (IHF). Le mélange contenant l'ensemble est appelé BP clonase. Cette réaction BP est réversible par utilisation du mélange enzymatique LR clonase qui contient les enzymes Int, IHF et une enzyme additionnelle du phage : excisionase (Xis). Cette technologie basée sur ces propriétés permet de cloner rapidement et avec une très bonne efficacité des fragments d'ADN dans de multiples vecteurs en vue d'analyse fonctionnelle et d'expression protéique. La première étape du système Gateway est de recombiner le gène d'intérêt dans le vecteur donneur grâce à la réaction BP, ce qui résulte en un clone d'entrée. Ce dernier est utilisé pour recombiner le gène d'intérêt dans le vecteur de destination grâce à la réaction utilisant le mélange LR clonase.

### Réaction BP : (BP clonase)



### Réaction LR : (LR clonase)



Remarque : Le *ccdB* est un gène qui provoque l'inhibition de croissance des bactéries *E. coli*.

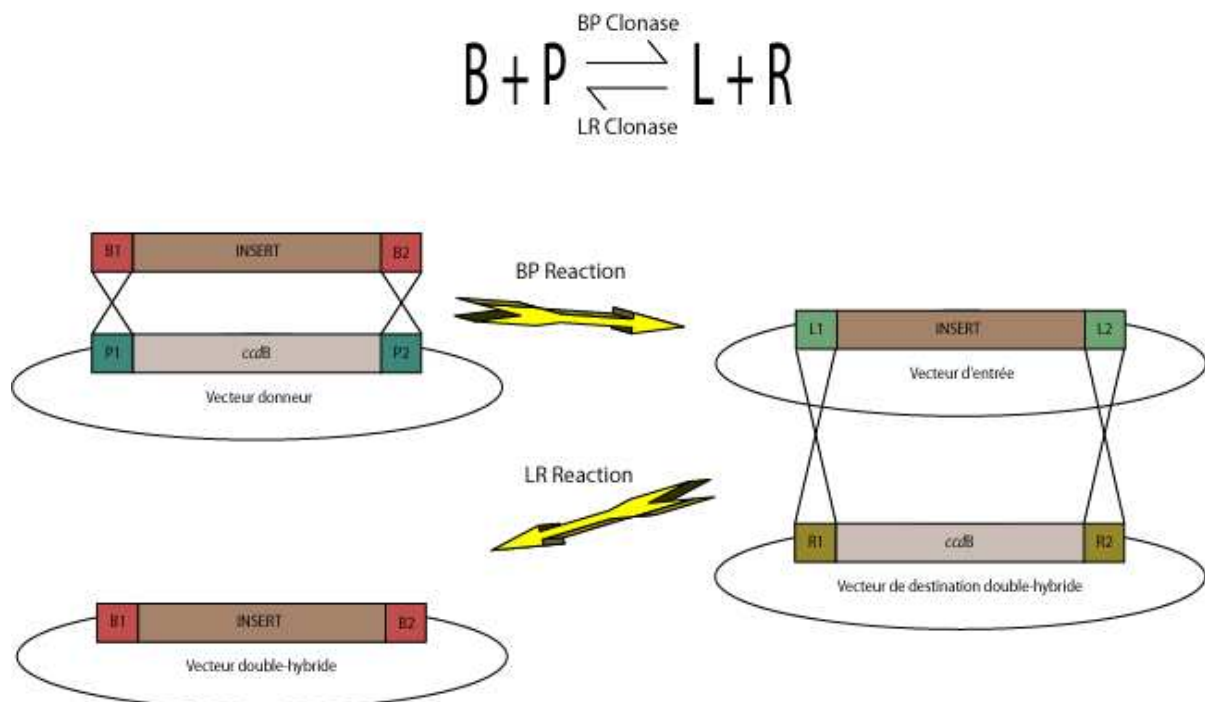


Figure MT-1 : Schématisation du clonage par la technique Gateway (Invitrogen)

b) Préparation des séquences Tre-GAP et Tre-REN-60

Le principe est d'amplifier le fragment d'ADN par PCR en ajoutant aux extrémités 5' et 3' respectivement *AttB1* et *AttB2*. Il faut donc obtenir les oligonucléotides *ad hoc* et bien mettre en phase l'insert à étudier, les codons start et stop doivent être omis dans l'amplification par PCR. La réalisation de la PCR se déroule avec une ADN polymérase haute fidélité (Platinum d'Invitrogen) sous les conditions indiquées par le fabricant.

Les oligonucléotides utilisés ont été décrits précédemment au point V.

c) Réaction BP

1. Dégeler le mélange d'enzyme BP Clonase sur glace.
2. Combiner dans un tube 2  $\mu$ l de vecteur donneur pDONR (125 ng), 2  $\mu$ l de tampon de réaction, 2  $\mu$ l de produit PCR, 2  $\mu$ l du mélange d'enzyme BP Clonase et porter à 10  $\mu$ l avec du TE.
3. Incuber à température ambiante durant la nuit.
4. Transformer 50  $\mu$ l de DH5 $\alpha$  compétentes avec 3  $\mu$ l de la réaction
5. Etaler sur milieu solide LB+Kan
6. Incuber durant la nuit à 37°C

Remarque : le plasmide donneur contient un gène de résistance à la kanamycine.

d) Réaction LR

1. Extraire le plasmide pDONR-produit PCR
2. Dégeler le mélange d'enzyme LR Clonase sur glace.
3. Combiner dans un tube 2  $\mu$ l de vecteur donneur pPC97dest (125 ng), 2  $\mu$ l de tampon de réaction, 2  $\mu$ l de produit PCR, 2  $\mu$ l du mélange d'enzyme LR Clonase et porter à 10  $\mu$ l avec du TE.
4. Incuber à température ambiante durant la nuit.
5. Transformer 50  $\mu$ l de DH5 $\alpha$  compétentes avec 3  $\mu$ l de la réaction
6. Etaler sur milieu solide LB+amp
7. Incuber durant la nuit à 37°C

Remarque : le plasmide de destination contient un gène de résistance à l'ampicilline

## VII. Méthodes relatives aux manipulations des protéines

---

### 1. Séparation des protéines sur gel SDS-Page

La séparation des protéines dans un tampon XT sample Buffer (BioRad) préalablement dénaturé 5 minutes à 100°C se déroule par migration des protéines par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE (gel Criterion Bis-Tris 4-12% ou Criterion Tris Acétate 7%, BioRad) sous un voltage de 220 volt et un courant d'une intensité de 120 mA.

### 2. Détection des protéines par coloration au bleu de Coomassie

La détection se déroule en 4 étapes.

La première est une étape de fixation où le gel est incubé sous agitation dans une solution d'isopropanol 25% et d'acide acétique 10% durant 15 minutes. Ensuite le gel est placé 2h dans une solution de coloration d'acide acétique 10% à base de bleu de Coomassie G250 0,02%. L'étape suivante est pratiquée pour la décoloration du gel en présence d'acide acétique 9% et de méthanol 45,5% pendant 2h. Enfin, le gel est incubé dans une solution de conservation d'acide acétique 7%.

### 3. Détection des protéines par Western blot

Après migration des protéines sur gel SDS-PAGE, celles-ci sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-ECL (Amersham Biosciences) sous un voltage constant de 100V pendant 1h30. La membrane est alors fixée dans une solution de blocage composée de lait écrémé 5% dans du TBST (Tris-HCl pH 7,5 50mM, NaCl 0,5% et Tween 20 0,1%) puis incubée une nuit en présence de l'anticorps primaire dans du TBST. Après un lavage au TBST, les protéines sont révélées en utilisant un anticorps secondaire couplé à la peroxydase et en incubant la membrane en présence d'un substrat chemiluminescent (ECL plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences). Les membranes imprégnées par le produit de révélation sont alors mises en autoradiographie pour des temps variant de quelques secondes à plusieurs minutes en fonction de la quantité de protéines transférées sur la membrane et de l'affinité de l'anticorps primaire.

## ***VIII. Technique du double-hybride en levure***

---

Nous avons utilisé deux techniques double-hybride en levure dans notre étude sur les interactions protéiques de oncTre210p.

La première technique a été mise au point par le Dr. Jean-Claude Jauniaux dans son laboratoire à Heidelberg et améliorée par l'unité de Biologie animale et microbienne (FUSAGx).

Cette méthode peut être décomposée en deux parties : la conjugaison de deux levures haploïdes *MATa* et *MATα* transformées respectivement par les vecteurs appât et proie et le criblage des transformants diploïdes présentant une interaction grâce à l'expression des gènes rapporteurs.

La deuxième approche de double-hybride en levure a été mise au point au sein du laboratoire du Dr. Marc Vidal au Dana Farber Cancer Institute à Boston. Cette méthode ne contient pas d'étape de conjugaison mais une co-transformation des plasmides appât et proie dans la levure hôte. La deuxième étape consiste en un criblage, permettant de mettre en évidence les levures pour lesquelles une interaction est présente entre les deux protéines appât et proie.

Ces deux méthodes ont été largement détaillées dans mon mémoire de DEA (Dechamps, 2003).



## ***IX. Construction de la banque d'ADN génomique du double mutant haploïde YNL2b***

---

### *1. Extraction de l'ADN génomique du double mutant haploïde*

#### *a) Culture Cellulaire*

Un ensemencement de 250ml de milieu sélectif (Mam +ura +leu +lys +his) avec la levure YNL2b est réalisé et incubé la nuit à 29°C sans dépasser une DO<sub>540</sub> (densité optique à une longueur d'onde de 540 nm) de 1.

Ensuite, la culture est centrifugée à 4000 rpm pendant 1 minute à une température de 4°C. Deux lavages sont entrepris avec 30 ml de Sorbitol 1,2M pour enfin resuspendre le culot cellulaire avec 10 ml de Sorbitol 1,2M ; EDTA 50 mM pH8,5 ; β-mercaptoéthanol (10µl/10ml).

Remarque : pour avoir des quantités suffisantes en ADNg, 4 cultures de 250 ml ont été réalisées par inoculation de la levure YNL2b dans du milieu selectif.

#### *b) Formation des protoplastes*

Afin d'obtenir des protoplastes, l'enzyme zymolyase est utilisée jusqu'à l'obtention d'une chute de la DO<sub>660</sub> initiale d'environ 70-80 %. Pour se faire, une première lecture de la DO est effectuée en diluant 30 µl des cellules resuspendues précédemment dans 3 ml d'eau stérile avant d'ajouter 1 ml de zymolyase (0,5 mg/ml). Durant l'incubation à 37°C, plusieurs mesures de la DO sont réalisées jusqu'à obtenir la chute de DO souhaitée. Enfin, la solution est centrifugée à une vitesse de 5000 rpm pendant 6 minutes à une température de 4°C.

#### *c) Lyse des protoplastes*

Dans cette étape, les protoplastes sont lysés par l'action d'un détergent puissant (le SDS). Le culot de protoplastes est resuspendu tout d'abord avec 1,8 ml d'EDTA à une concentration de 0,5M à pH 8,5. Ensuite 12,8 ml de tampon TE est ajouté avec 640 µl de Tris-base 2M et 276 µl de SDS 25%. La lyse dure 30 minutes à 70°C. Enfin, la solution est refroidie sur glace.

d) Précipitation des protéines et débris cellulaires

La solution est placée durant 30 minutes sur glace avec un ajout d'acétate de potassium 5M stocké à -20°C. Le tube est alors centrifugé 15 minutes à 13 000 rpm à 4°C pour récupérer le surnageant.

e) Précipitation et purification de l'ADN

Une première précipitation de l'ADNg est réalisée à l'aide d'isopropanol (0,6 volumes). Ensuite, une purification est entreprise par l'élimination des ARNs grâce à l'ajout de 100 µl RNase A (10 mg/ml) dans la resuspension du culot précédent avec 2 ml d'un tampon (Tris-HCl 10mM ; EDTA 10mM) pendant 1h, à une température de 37°C. Une deuxième purification de l'ADN est effectuée durant la nuit par l'ajout de 50µl de SDS 25% et de 50µl de protéinase K (2mg) à une température de 37°C pendant la première heure pour ensuite terminer à température ambiante la nuit.

Le lendemain, une centrifugation est réalisée durant 1h à 12000 rpm à 4°C pour récupérer le surnageant qui subira ensuite deux extractions successives au phénol/chloroforme/alcool isoamylique jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de précipité à l'interphase. Ensuite, l'ADN est précipité par l'éthanol pour être enfin resuspendu dans du TE (500 µl).

2. Traitement de l'ADN génomique du double mutant haploïde

Le but de cette étape est d'obtenir des fragments d'ADN génomique de taille comprise entre 2kb et 5kb, qui soient compatibles à une ligation avec un vecteur coupé par l'enzyme *BamHI*. Pour ce faire, l'ADN génomique subit une restriction partielle par *Sau3AI* dans des conditions idéales pour obtenir une représentation majoritaire de fragments de la taille désirée.

a) Restriction de l'ADNg par *Sau3AI*

Une étape préliminaire est effectuée pour permettre de connaître les conditions idéales de restriction. Plusieurs restrictions sont effectuées en faisant varier deux paramètres : le temps et la quantité d'enzyme.

Selon les conditions idéales de temps et de concentration d'enzyme obtenues lors de l'étape préliminaire (1,5 U d'enzyme pour 50 µg d'ADNg pendant 10 minutes), une restriction de 50

$\mu\text{g}$  d'ADNg de YNL2b est réalisée. La digestion est arrêtée par une extraction au phénol et le produit obtenu est déposé sur gel TAE. Une découpe du gel pour les fragments compris entre 2 et 5 kb est effectuée dans le but d'extraire l'ADN de tailles désirées à l'aide du kit QIAEX II de QIAGEN.

### 3. Ligation des fragments d'ADNg dans le vecteur YEp356 et transformation en bactéries

La ligation des fragments d'ADNg est réalisée avec la T4 DNA ligase sur 20  $\mu\text{l}$  de la banque traitée et 10 ng de plasmide YEp356, linéarisé par l'enzyme *Bam*HI et traité à la phosphatase alcaline vecteur

Pour la transformation, la technique d'électroporation est utilisée avec des cellules compétentes EP-Max 10B de chez Biorad.

Dans une cuvette de 0,1 cm, 1  $\mu\text{l}$  du produit de ligation sont incubés 5 minutes avec 20  $\mu\text{l}$  de bactéries compétentes. L'électroporation se déroule selon les conditions suivantes : 1,8 kV, 25  $\mu\text{F}$  et 200  $\Omega$ . Ensuite, les cellules sont récupérées avec 1 ml de milieu LB ou SOC puis incubées à 37°C sous agitation pendant 1h30'. Pour terminer, les cellules sont étalées sur milieu LB contenant de l'ampicilline.

Les cellules contenant la banque génomique de levures doublement mutées sont récupérées par raclage à l'aide de milieu LB contenant l'antibiotique de sélection.

La banque est ainsi conservée en bactérie.

## ***X. Recherche de suppresseurs homologues***

---

### *1. Transformation de la levure doublement mutée diploïde avec la banque génomique*

Pour cette étape, la levure diploïde FyBLT3-YN doublement mutée en *MSB3* et *MSB4* est utilisée pour ses propriétés phénotypiques de croissance (inhibition sur milieu contenant du DMSO et de la caféine).

#### *a) Préparation des cellules de levures compétentes*

Deux cultures de FyBLT3-YN sont incubées, durant la nuit à 29°C sans dépasser une DO de 1 (100 ml de milieu minimum contenant de l'uracile, de l'histidine, de la leucine et de la lysine). Les cultures sont centrifugées 10 minutes à 10000 rpm puis resuspendues dans un mélange d'AcLi 0,1 M, de DTT 0,01 M et de TE (tris 10mM et EDTA 1 mM). Les mélanges sont incubés durant 1h à température ambiante pour permettre la perméabilisation des cellules. Ensuite, deux lavages avec 25 ml d'eau stérile glacée et un lavage avec 10 ml de Sorbitol 1M glacé sont effectués, les trois intercalés de centrifugation à 5000 rpm durant 10 minutes. Les cellules compétentes sont resuspendues dans du sorbitol afin d'obtenir un volume final de 500 µl. Les cellules de levures compétentes ainsi obtenues doivent être utilisées rapidement pour un bon rendement de transformation.

#### *b) Electroporation*

Dans une cuvette de 0,2 cm, 500 ng de la banque génomique issue de YNL2b sont incubés 5 minutes sur glace avec 50 µl de cellules compétentes. Pour une bonne représentation de la banque, 15 cuvettes sont incubées. Une électroporation est alors effectuée selon les conditions suivantes : 1,5 kV ; 25µF ; 200 Ohms. Les cellules sont récupérées à l'aide de 1 ml de YPD et placées à 29°C durant 2h30 sans agitation.

c) Sélection des levures FyBLT3-YN transformées par la banque

Les levures sont étalées sur un milieu Mam contenant de la leucine, de la lysine et de l'histidine. Les boîtes sont placées 3 jours dans une étuve à 29°C. Ensuite, les colonies sélectionnées sont récupérées par raclage des boîtes à l'aide de 3 ml de milieu liquide Mam avec de la leucine, de la lysine et de l'histidine. Une mesure de la DO<sub>540</sub> est alors effectuée pour évaluer la concentration en cellules. Le stock est conservé au frigo.

2. Criblage des levures transformées

Les levures transformées sont étalées ( $10^5$  -  $10^6$  cellules par boîte) sur des boîtes contenant du milieu YPD avec de la caféine 4% (2,3 ml/40 ml d'YPD) et du DMSO (2 ml /40 ml d'YPD) et placées en étuve durant 5 jours à 29 °C. Les colonies qui se sont développées sur le milieu de sélection sont repiquées sur un milieu Mam + leucine +lysine +histidine.

3. Isolement des plasmides induisant un effet supresseur

Pour ce faire, une première étape d'extraction de l'ADN total de levure est réalisée et suivie de la transformation en bactérie. Afin d'obtenir le plasmide, une extraction de celui-ci est effectué à l'aide d'un kit mini-prep de la firme Roche.

L'extraction de l'ADN total commence par la resuspension de deux grosses anses de cellules dans 200 µl d'un tampon de lyse (2% v/v Triton X-100, 10% v/v SDS10%, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8 et 1 mM EDTA pH 8), ensuite 200 µl de solution phénol/chloroforme/alcool isoamylique et 0,3 g de billes de verre traitées sont ajoutés, puis le tout est mélangé au vortex pendant 3 minutes et suivi de l'addition de tampon TE (200 µl) (Tris 10mM et EDTA 1mM). La solution est centrifugée pendant 5 minutes à 13000 rpm à 4°C. La phase aqueuse est transférée dans un autre tube dans lequel une précipitation avec deux volumes d'éthanol 100% (1 ml) est réalisée à -20°C. Le tube est centrifugé sous les mêmes conditions que l'étape précédente. Le culot est resuspendu dans du tampon TE (400 µl) à 4°C.

Pour éliminer les contaminants (ARN), 30 µl de RNase A (1 mg/ml) est ajouté et laissé à 37°C pendant 5 minutes. Ensuite, l'addition de 10 µl d'acétate d'ammonium 4M et de 1 ml

d'éthanol 100% permet la précipitation de l'ADN. Pour terminer, une centrifugation est effectuée, le culot est séché et est resuspendu dans 100 µl d'eau stérile. L'ADN récupéré est conservé à -20°C.

Ensuite, une transformation en bactéries EP-Max 10B de la firme Biorad est réalisée à l'aide de 2 µl d'ADN total isolé précédemment selon les conditions de Biorad. Enfin, les plasmides sont récupérés par extraction à l'aide d'un kit mini-prep.

#### 4. Analyse phénotypique de l'effet de suppression

Le plasmide purifié est introduit dans la levure doublement mutée FyBLT3-YN pour tester les cellules transformées sur milieux contenant de la caféine ou du DMSO.

Pour ce faire, trois dilutions de cellules ( $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ) sont déposés premièrement sur milieu riche YPD et milieu Mam contenant la leucine, l'histidine et de la lysine et deuxièmement sur deux milieux YPD contenant respectivement de la caféine 4% (2,3 ml/40 ml YPD) et du DMSO (2 ml/40 ml YPD).

Après incubation à une température de 29°C, les différences de croissance peuvent être observées.

#### 5. Identification des protéines supresseurs

L'identification des séquences supresseurs est réalisée par séquençage des inserts des plasmides purifiés par la firme GATC (<http://www.gatc.de>). La nature des protéines est révélée par comparaison de séquence nucléotidique ou protéique déduite des banques de données en utilisant les programmes BLASTn/p.

## *XI. Marquage fluorescent et analyses microscopiques*

---

### *1. Marquage de l'actine en levure avec du ALEXA Fluor 488 phalloïdine*

Les cellules de levure à observer sont fixées à partir d'1 ml de culture en phase exponentielle de levure avec 100µl de formaldéhyde 37% dans un tube durant 30 minutes à température ambiante. Les cellules fixées sont lavées deux fois avec du PBS (Phosphate Buffered Saline) pour ensuite être resuspendues dans 200µl de PBS contenant une unité d'ALEXA Fluor 488 phalloïdine (Molecular Probes) et du BSA 1% permettant de réduire le bruit fond non spécifique. La solution est incubée à température ambiante durant 20 minutes dans l'obscurité. Les cellules sont rincées 3 fois dans du PBS. Enfin, les cellules sont étalées sur lames traitées à la concanavalineA (Roche) et observées au microscope à fluorescence.

### *2. Marquage de l'ADN de levure au DAPI*

Les cellules de levure à observer sont fixées à partir d'1 ml de culture en phase exponentielle avec 100µl de formaldéhyde 37% dans un tube durant 30 minutes à température ambiante. Les cellules fixées sont ensuite lavées deux fois avec du PBS pour ensuite être resuspendues dans 200µl d'éthanol 70% et de 50µl de DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole dihydrochloride, Molecular Probes) à 1µg/ml. La solution est incubée à 4°C durant 15 minutes dans l'obscurité. Les cellules sont rincées 3 fois dans du PBS. Enfin, les cellules sont étalées sur lames traitées à la concanavalineA et observées au microscope à fluorescence.

### *3. Microscopie à fluorescence*

Le microscope utilisé lors des marquages de l'actine (excitation vers 495 nm et émission vers 518nm) et de l'ADN (excitation vers 304nm et émission vers 466nm) est le microscope à fluorescence Eclipse E800 (NIKON). L'acquisition d'images se fait grâce à une camera CCD JVC (modèle KY-F58) et au programme Image Archive Plus 4.21 (Laboratory Imaging).

Les cellules de mammifères sont observées par le microscope confocal à fluorescence Zeiss (Axiovert 200 avec LSM 510 ; Carl Zeiss Microscopy).

## ***XII. Méthodes d'identification de complexe formé par les protéines partenaires***

---

### ***1. Description de la technique du GST pulldown***

La première étape consiste en l'obtention de la protéine proie en fusion avec la glutathione-S-transférase (GST) induite en bactérie et purifiée tout en la maintenant fixée sur une résine (Glutathione Uniflow Resine de la firme BD Clontech). Pour ce faire, l'ADN codant de la protéine est cloné dans le vecteur pGEX-2T. Les bactéries BL21 Star (DE3)pLysS sont transformées avec ce vecteur. La bactérie transformée est cultivée dans 100 ml de milieu de sélection LB contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol. Lorsque la DO atteint 0,7 à 540nm, de l'IPTG est ajouté au milieu pour induire la production de la protéine fusionnée au GST. Après 2h30 d'incubation, les cellules sont récoltées et resuspendues dans 5 ml de Tris-HCl 20mM pH7,4 contenant des inhibiteurs de protéases. Les cellules sont ensuite lysées par sonication. Les débris sont éliminés par centrifugation et le surnageant est récupéré et agité durant la nuit à 4°C avec la résine. La résine est lavée trois fois avec du Tris-HCl 20mM pH7,4 puis resuspendue dans ce même tampon complété par l'ajout d'inhibiteurs de protéases. La résine est conservée à 4°C.

La deuxième étape consiste à engager 5µg de protéine appât transcrite *in vitro* à l'aide du kit TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) marquée au <sup>35</sup>S et la même quantité de protéine fusionnée au GST sous agitation à 4°C dans un tampon GST (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM KCl, 5 mM DTT, 2 mM EDTA, 10% glycérol, 0.5% lait écrémé en poudre et 0.1% NP-40) durant une nuit. Après quatre lavages, les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE et comparées à un marqueur de poids moléculaire (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas). Le gel est ensuite fixé dans une solution de méthanol (23%) et d'acide acétique (9%) puis mis en autoradiographie.

### ***2. Description de la technique de co-immunoprécipitation***

Une co-transfection en cellules HEK293 est réalisée avec les deux plasmides d'expression en cellules de mammifère pFD13 et pFD60 exprimant respectivement la protéine appât et la protéine proie. Le lysat des cellules transfectées est incubé durant la nuit à 4°C sous agitation en présence d'anticorps anti-c-Myc conjugués à de l'agarose (c-Myc (9E10) agarose



conjugate, Santa Cruz) ou d'anticorps anti-FLAG (Anti-FLAG M2 affinity Gel, Sigma-Aldrich). Les résines sont lavées plusieurs fois avec du tampon de lyse IPLS (NP-40 0,5%, Tris/HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 0,5 mM, NaCl 120 mM). Après dépôt et analyse sur un gel dénaturant, les immunoprécipités sont révélés par la technique du Western blot en utilisant comme anticorps primaire un anti-FLAG (Anti-FLAG polyclonal antibody rabbit, Sigma-Aldrich) pour les précipités avec l'anti-c-Myc ou un anti-c-Myc (c-Myc rabbit polyclonal IgG (A-14), Santa Cruz) pour les précipités avec l'anti-FLAG.

### ***XIII. Outils informatiques***

---

Le traitement d'images et la création d'illustrations sont effectués respectivement à l'aide des logiciels AdobePhotoshop et AdobeIllustrator. Pour l'analyse des séquences en ADN ou en acides aminés, les programmes *BLASTn* ou *BLASTp* sont utilisés. Ces derniers permettent la comparaison des séquences à des banques de données et cela par l'intermédiaire du site web de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).



**TRAVAUX PUBLIÉS DANS LE  
CADRE DU DOCTORAT**



## Publications dans une revue avec comité de lecture

**Dechamps C., Portetelle D. et Vandebol M.** 2005. Multicopy suppression screen in the *msb3 msb4 Saccharomyces cerevisiae* double mutant, affected in Ypt/RabGAP activity. *Biotechnol Lett.* **27**(19): 1439-1449.

**Dechamps C., Bach S., Portetelle D. et Vandebol M.** 2006. The Tre2 oncoprotein, implicated in Ewing's sarcoma, interacts with two components of the cytoskeleton. *Biotechnol Lett.* **28**(4): 223-231.

## Actes de colloque

### Télévie 2003 - Séminaire de la recherche

Liège, Belgique, 2003

**Dechamps C., Portetelle D. et Vandebol M.** Etude fonctionnelle et structurale du produit de l'oncogène *oncTre210*, homologue à deux protéines RabGAP levuriennes, impliqué dans différentes tumeurs humaines incluant le sarcome d'Ewing.

### Télévie 2004 - Séminaire de la recherche

Bruxelles, Belgique, 2004

**Dechamps C., Bizimungu C., Portetelle D. et Vandebol M.** Etude fonctionnelle et structurale du produit de l'oncogène *oncTre210*, homologue à deux protéines RabGAP levuriennes, impliqué dans différentes tumeurs humaines incluant le sarcome d'Ewing.

### Télévie 2005- Séminaire de la recherche

Gosselies, Belgique, 2005

**Dechamps C., Bizimungu C., Portetelle D. et Vandebol M.** Etude fonctionnelle et structurale du produit de l'oncogène *oncTre210*, homologue à deux protéines RabGAP levuriennes, impliqué dans différentes tumeurs humaines incluant le sarcome d'Ewing.

**Télévie 2006 - Séminaire de la recherche**

Liège, Belgique, 2006

**Bizimungu C., Dechamps C., Stroobants A., Tricot C., Portetelle D. et Vandebol M.**

Etude fonctionnelle de la structure et de la fonction du produit de l'oncogène Tre2, homologue à deux protéines Ypt/Rab GAPs levuriennes, impliqué dans différentes tumeurs humaines incluant le sarcome d'Ewing.





# REFERENCES



**Alberts B., Jonhson A., Lewis J., Raff., Roberts K. et Walter P.** 2002. Molecular Biology of the Cell. *Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.*

**Albert S., Gallwitz D.** 1999. Two new members of a family of Ypt/Rab GTPase activating proteins. Promiscuity of substrate recognition. *J.Biol.Chem.* **274**(47): 33186-33189.

**Albert S., Will E. et Gallwitz D.** 1999. Identification of the catalytic domains and their functionally critical arginine residues of two yeast GTPase-activating proteins specific for Ypt/Rab transport GTPases. *EMBO J.* **18**(19): 5216-5225.

**Albert S., Gallwitz D.** 2000. Msb4p, a protein involved in Cdc42p-dependent organization of the actin cytoskeleton, is a Ypt/Rab-specific GAP. *Biol.Chem.* **381**(5-6): 453-456.

**Alessi D., MacDougall L.K., Sola M.M., Ikebe M. et Cohen P.** 1992. The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur.J.Biochem.* **210**(3): 1023-1035.

**Anson M., Geeves M.A., Kurzawa S.E. et Manstein D.J.** 1996. Myosin motors with artificial lever arms. *EMBO J.* **15**(22): 6069-6074.

**Aurias A., Rimbaut C., Buffe D., Zucker J.M. et Mazabraud A.** 1984. Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma. A cytogenetic study of four fresh tumors. *Cancer Genet.Cytogenet.* **12**(1): 21-25.

**Bach S.** 2000. Etude de la fonction cellulaire codée par l'oncogène humain *Tre2* impliqué dans le sarcome d'Ewing par analyse comparative des gènes *MSB3* et *MSB4* de *Saccharomyces cerevisiae*. *Thèse de doctorat (Unité de Biologie Animale et Microbienne, FUSAGx).*

**Bach S., Bouchat O., Portetelle D. et Vandenbol M.** 2000. Co-deletion of the *MSB3* and *MSB4* coding regions affects bipolar budding and perturbs the organization of the actin cytoskeleton. *Yeast* **16**(11): 1015-1023.

**Bacon R.A., Salminen A., Ruohola H., Novick P. et Ferro-Novick S.** 1989. The GTP-binding protein Ypt1 is required for transport in vitro: the Golgi apparatus is defective in ypt1 mutants. *J.Cell Biol.* **109**(3): 1015-1022.

**Bartel P.L., Roecklein J.A., SenGupta D. et Fields S.** 1996. A protein linkage map of Escherichia coli bacteriophage T7. *Nat.Genet.* **12**(1): 72-77.

**Berg J.S., Powell B.C. et Cheney R.E.** 2001. A millennial myosin census. *Mol.Biol.Cell* **12**(4): 780-794.

**Bi E., Chiavetta J.B., Chen H., Chen G.C., Chan C.S. et Pringle J.R.** 2000. Identification of novel, evolutionarily conserved Cdc42p-interacting proteins and of redundant pathways linking Cdc24p and Cdc42p to actin polarization in yeast. *Mol.Biol.Cell* **11**(2): 773-793.

**Bianchi M.M., Ngo S., Vandenbol M., Sartori G., Morlupi A., Ricci C., Stefani S., Morlino G.B., Hilger F., Carignani G., Slonimski P.P. et Frontali L.** 2001. Large-scale phenotypic analysis reveals identical contributions to cell functions of known and unknown yeast genes. *Yeast* **18**(15): 1397-1412.

**Bizimungu C.** 2001. Etude de l'expression, dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, d'un oncogène humain codant pour une protéine GAP putative. *Travail de fin d'études (Unité de Biologie Animale et Microbienne, FUSAGx)*.

**Bizimungu C.** 2002. Etude moléculaire de la structure et de la fonction du produit d'un oncogène humain homologue à deux protéines GAPs, Msb3p et Msb4p, de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. *DEA (Unité de Biologie Animale et Microbienne, FUSAGx)*.

**Bizimungu C., De N.N., Burny A., Bach S., Bontemps F., Portetelle D. et Vandenbol M.** 2003. Expression in a RabGAP yeast mutant of two human homologues, one of which is an oncogene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **310**(2): 498-504.

**Bizimungu C., Vandenbol M.** 2005. At least two regions of the oncoprotein Tre2 are involved in its lack of GAP activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **335**(3): 883-890.

**Bizimungu C.** 2006. Etude de la structure et de la fonction du produit de l'oncogène humain *Tre2*, homologue à deux protéines GAP (GTPase Activating Proteins) de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. *Thèse de doctorat (Unité de Biologie Animale et Microbienne, FUSAGx)*.

**Bizimungu C., Thomas A., Brasseur R. et Vandenbol M.** 2007. Mutational analysis of the TRE2 oncogene encoding an inactive RabGAP. *Biotechnol.Lett.* **29**(12): 1927-1937.

**Bos J.L.** 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**(17): 4682-4689.

**Bos J.L.** 2000. Les Ras GTPases. Dans : GTPases. *Oxford University Press, Oxford.*

**Bos J.L., Rehmann H. et Wittinghofer A.** 2007. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**(5): 865-877.

**Burchill S.A.** 2003. Ewing's sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities. *J.Clin.Pathol.* **56**(2): 96-102.

**Carlier M.F., Pantaloni D. et Korn E.D.** 1984. Evidence for an ATP cap at the ends of actin filaments and its regulation of the F-actin steady state. *J.Biol.Chem.* **259**(16): 9983-9986.

**Carlier M.F.** 1991. Actin: protein structure and filament dynamics. *J.Biol.Chem.* **266**(1): 1-4.

**Carlier M.F., Laurent V., Santolini J., Melki R., Didry D., Xia G.X., Hong Y., Chua N.H. et Pantaloni D.** 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J.Cell Biol.* **136**(6): 1307-1322.

**Cheney R.E., Mooseker M.S.** 1992. Unconventional myosins. *Curr.Opin.Cell Biol.* **4**(1): 27-35.

**Chew T.L., Wolf W.A., Gallagher P.J., Matsumura F. et Chisholm R.L.** 2002. A fluorescent resonant energy transfer-based biosensor reveals transient and regional myosin light chain kinase activation in lamella and cleavage furrows. *J.Cell Biol.* **156**(3): 543-553.

**Coelho P.S., Bryan A.C., Kumar A., Shadel G.S. et Snyder M.** 2002. A novel mitochondrial protein, Tar1p, is encoded on the antisense strand of the nuclear 25S rDNA. *Genes Dev.* **16**(21): 2755-2760.

**Collins R.N., Brennwald P.** 1999. Rab proteins. *GTPases: Frontiers in Molecular Biology.Oxford University Press* **24**: 137-175.

**Collins R.N. et Brennwald P.** 2000. Les Rab GTPases. Dans : GTPases. *Oxford University Press, Oxford.*

**de la Torre-Ruiz A., Torres J., Arino J. et Herrero E.** 2002. Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **277**(36): 33468-33476.

**De L.A., Spudich J.A.** 1987. Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* **236**(4805): 1086-1091.

**Dechamps C., Bach S., Portetelle D. et Vandenbol M.** 2006. The Tre2 oncoprotein, implicated in Ewing's sarcoma, interacts with two components of the cytoskeleton. *Biotechnol.Lett.* **28**(4): 223-231.

**Deitz S.B., Rambourg A., Kepes F. et Franzusoff A.** 2000. Sec7p directs the transitions required for yeast Golgi biogenesis. *Traffic.* **1**(2): 172-183.

**De Lozanne A. et Spudich J.A.** 1987. Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science.* **236**(4805): 1086-1091.

**Di Fiore P.P., Scita G.** 2002. Eps8 in the midst of GTPases. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **34**(10): 1178-1183

**Donovan S., See W., Bonifas J., Stokoe D. et Shannon K.M.** 2002. Hyperactivation of protein kinase B and ERK have discrete effects on survival, proliferation, and cytokine expression in Nf1-deficient myeloid cells. *Cancer Cell* **2**(6): 507-514.

**Drechsel D.N., Hyman A.A., Hall A. et Glotzer M.** 1997. A requirement for Rho and Cdc42 during cytokinesis in *Xenopus* embryos. *Curr.Biol.* **7**(1): 12-23.

**Eda M., Yonemura S., Kato T., Watanabe N., Ishizaki T., Madaule P. et Narumiya S.** 2001. Rho-dependent transfer of Citron-kinase to the cleavage furrow of dividing cells. *J.Cell Sci.* **114**(Pt 18): 3273-3284.

**Endo A., Surks H.K., Mochizuki S., Mochizuki N. et Mendelsohn M.E.** 2004. Identification and characterization of zipper-interacting protein kinase as the unique vascular smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *J.Biol.Chem.* **279**(40): 42055-42061.

**Ewing J.** 1921. Diffuse endothelioma of bone. *Proc.N.Y.Pathol.Soc.* **21**(17).

- Fairhead C., Llorente B., Denis F., Soler M. et Dujon B.** 1996. New vectors for combinatorial deletions in yeast chromosomes and for gap-repair cloning using 'split-marker' recombination. *Yeast* **12**(14): 1439-1457.
- Fields S., Song O.** 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**(6230): 245-246.
- Foury F., Cazzalini O.** 1997. Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett.* **411**(2-3): 373-377.
- Foury F., Kucej M.** 2002. Yeast mitochondrial biogenesis: a model system for humans? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**(1): 106-111.
- Franzusoff A., Schekman R.** 1989. Functional compartments of the yeast Golgi apparatus are defined by the *sec7* mutation. *EMBO J.* **8**(9): 2695-2702.
- Fuchs E., Haas A.K., Spooner R.A., Yoshimura S., Lord J.M. et Barr F.A.** 2007. Specific Rab GTPase-activating proteins define the Shiga toxin and epidermal growth factor uptake pathways. *J. Cell Biol.* **177**(6): 1133-1143.
- Galan J.M., Peter M.** 1999. Ubiquitin-dependent degradation of multiple F-box proteins by an autocatalytic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**(16): 9124-9129.
- Gao X.D., Albert S., Tcheperegine S.E., Burd C.G., Gallwitz D. et Bi E.** 2003. The GAP activity of Msb3p and Msb4p for the Rab GTPase Sec4p is required for efficient exocytosis and actin organization. *J. Cell Biol.* **162**(4): 635-646.
- Gautschi M., Lilie H., Funfschilling U., Mun A., Ross S., Lithgow T., Rucknagel P. et Rospert S.** 2001. RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast formed by the DnaK-DnaJ homologs Ssz1p and zuotin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**(7): 3762-3767.
- Gietz D., St J.A., Woods R.A. et Schiestl R.H.** 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**(6): 1425.

- Grier H.E.** 1997. The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. *Pediatr.Clin.North Am.* **44**(4): 991-1004.
- Grunicke H.H., Maly K.** 1993. Role of GTPases and GTPase regulatory proteins in oncogenesis. *Crit Rev.Oncog.* **4**(4): 389-402.
- Haas A.K., Fuchs E., Kopajtich R. et Barr F.A.** 2005. A GTPase-activating protein controls Rab5 function in endocytic trafficking. *Nat. Cell Biol.* **7**(9): 887-893.
- Haas A.K., Yoshimura S., Stephens D.J., Preisinger C., Fuchs E. et Barr F.A.** 2007. Analysis of GTPase-activating proteins: Rab1 and Rab43 are key Rabs required to maintain a functional Golgi complex in human cells. *J.Cell Sci.* **120**(Pt 17): 2997-3010.
- Hallstrom T.C., Katzmann D.J., Torres R.J., Sharp W.J. et Moye-Rowley W.S.** 1998. Regulation of transcription factor Pdr1p function by an Hsp70 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **18**(3): 1147-1155.
- Hampsey M.** 1997. A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**(12): 1099-1133.
- Hartl F.U.** 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**(6583): 571-579.
- Hartshorne D.J., Ito M. et Erdodi F.** 2004. Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase. *J.Biol.Chem.* **279**(36): 37211-37214.
- Hershko A., Ciechanover A.** 1998. The ubiquitin system. *Annu.Rev.Biochem.* **67**: 425-479.
- Hodge T., Cope M.J.** 2000. A myosin family tree. *J.Cell Sci.* **113 Pt 19**: 3353-3354.
- Hundley H., Eisenman H., Walter W., Evans T., Hotokezaka Y., Wiedmann M. et Craig E.** 2002. The in vivo function of the ribosome-associated Hsp70, Ssz1, does not require its putative peptide-binding domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**(7): 4203-4208.
- Hutter R.V., Francis K.C. et Foote F.W.Jr.** 1964. Ewing's sarcoma in siblings: report of the second known occurrence. *Am.J.Surg.* **107**: 598-603.



**Ikebe M., Koretz J. et Hartshorne D.J.** 1988. Effects of phosphorylation of light chain residues threonine 18 and serine 19 on the properties and conformation of smooth muscle myosin. *J.Biol.Chem.* **263**(13): 6432-6437.

**Ito H., Fukuda Y., Murata K. et Kimura A.** 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J.Bacteriol.* **153**(1): 163-168.

**Jablonowski D., Butler A.R., Fichtner L., Gardiner D., Schaffrath R. et Stark M.J.** 2001. Sit4p protein phosphatase is required for sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to Kluveromyces lactis zymocin. *Genetics* **159**(4): 1479-1489.

**Jager S., Strayle J., Heinemeyer W. et Wolf D.H.** 2001. Cic1, an adaptor protein specifically linking the 26S proteasome to its substrate, the SCF component Cdc4. *EMBO J.* **20**(16): 4423-4431.

**Janssen J.W., Braunger J., Ballas K., Faust M., Siebers U., Steenvoorden A.C. et Bartram C.R.** 1999. Spectrum of transforming sequences detected by tumorigenicity assay in a large series of human neoplasms. *Int.J.Cancer* **80**(6): 857-862.

**Joyce M.J., Harmon D.C., Mankin H.J., Suit H.D., Schiller A.L. et Truman J.T.** 1984. Ewing's sarcoma in female siblings. A clinical report and review of the literature. *Cancer* **53**(9): 1959-1962.

**Kalinich J.F., Emond C.A., Dalton T.K., Mog S.R., Coleman G.D., Kordell J.E., Miller A.C. et McClain D.E.** 2005. Embedded weapons-grade tungsten alloy shrapnel rapidly induces metastatic high-grade rhabdomyosarcomas in F344 rats. *Environ.Health Perspect.* **113**(6): 729-734.

**Kamm K.E., Stull J.T.** 2001. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J.Biol.Chem.* **276**(7): 4527-4530.

**Kasai M., Sakura S. et Oosawa F.** 1962. The G-F equilibrium in actin solutions under various conditions. *Biochim.Biophys.Acta* **57**: 13-21.

**Kawano Y., Fukata Y., Oshiro N., Amano M., Nakamura T., Ito M., Matsumura F., Inagaki M. et Kaibuchi K.** 1999. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J.Cell Biol.* **147**(5): 1023-1038.

**Kimura K., Ito M., Amano M., Chihara K., Fukata Y., Nakafuku M., Yamamori B., Feng J., Nakano T., Okawa K., Iwamatsu A. et Kaibuchi K.** 1996. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**(5272): 245-248.

**Kishi T., Seno T. et Yamao F.** 1998. Grr1 functions in the ubiquitin pathway in *Saccharomyces cerevisiae* through association with Skp1. *Mol. Gen. Genet.* **257**(2): 143-148.

**Kiss E., Muranyi A., Csontos C., Gergely P., Ito M., Hartshorne D.J. et Erdodi F.** 2002. Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton. *Biochem.J.* **365**(Pt 1): 79-87.

**Komatsu S., Yano T., Shibata M., Tuft R.A. et Ikebe M.** 2000. Effects of the regulatory light chain phosphorylation of myosin II on mitosis and cytokinesis of mammalian cells. *J.Biol.Chem.* **275**(44): 34512-34520.

**Komatsu S., Ikebe M.** 2004. ZIP kinase is responsible for the phosphorylation of myosin II and necessary for cell motility in mammalian fibroblasts. *J.Cell Biol.* **165** (2): 243-254.

**Kosako H., Goto H., Yanagida M., Matsuzawa K., Fujita M., Tomono Y., Okigaki T., Odai H., Kaibuchi K. et Inagaki M.** 1999. Specific accumulation of Rho-associated kinase at the cleavage furrow during cytokinesis: cleavage furrow-specific phosphorylation of intermediate filaments. *Oncogene* **18**(17): 2783-2788.

**Kumar C.C., Chang C.** 1992. Human smooth muscle myosin light chain-2 gene expression is repressed in ras transformed fibroblast cells. *Cell Growth Differ.* **3**(1): 1-10.

**Lanzetti L., Rybin V., Malabarba M.G., Christoforidis S., Scita G., Zerial M. et Di Fiore P.P.** 2000. The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5. *Nature* **408**(6810): 374-377.

**Lanzetti L., Palamidessi A., Areces L., Scita G. et Di Fiore P.P.** 2004. Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases. *Nature* **429**(6989): 309-314.

**Lanzetti L., Margaria V., Melander F., Virgili L., Lee M.H., Bartek J. et Jensen S.** 2007. Regulation of the Rab5 GTPase-activating protein RN-tre by the dual specificity phosphatase Cdc14A in human cells. *J.Biol.Chem.* **282**(20): 15258-15270.

**Lecrenier N., Van Der B.P. et Foury F.** 1997. Mitochondrial DNA polymerases from yeast to man: a new family of polymerases. *Gene* **185**(1): 147-152.

**Lee M.G. et Nurse P.** 1987. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* **327**(6117): 31-35.

**Leung T., Chen X.Q., Tan I., Manser E. et Lim L.** 1998. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol. Cell Biol.* **18**(1): 130-140.

**Li F.N., Johnston M.** 1997. Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *EMBO J.* **16**(18): 5629-5638.

**Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P. et Darnell J.** 1997. Biologie moléculaire de la cellule. *DeBoek Université, Bruxelles.* 1344 p.

**Luke M.M., Della S.F., Di Como C.J., Sugimoto H., Kobayashi R. et Arndt K.T.** 1996. The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol. Cell Biol.* **16**(6): 2744-2755.

**Macara I.G.** 2000. Les Ran GTPases. Dans : GTPases. *Oxford University Press, Oxford.*

**Madaule P., Eda M., Watanabe N., Fujisawa K., Matsuoka T., Bito H., Ishizaki T. et Narumiya S.** 1998. Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature* **394**(6692): 491-494.

**Marchand J.B., Moreau P., Paoletti A., Cossart P., Carlier M.F. et Pantaloni D.** 1995. Actin-based movement of *Listeria monocytogenes*: actin assembly results from the local maintenance of uncapped filament barbed ends at the bacterium surface. *J. Cell Biol.* **130**(2): 331-343.

**Martinu L., Masuda-Robens J.M., Robertson S.E., Santy L.C., Casanova J.E. et Chou M.M.** 2004. The TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16) domain protein TRE17 regulates plasma membrane-endosomal trafficking through activation of Arf6. *Mol. Cell Biol.* **24**(22): 9752-9762.

- Masuda-Robens J.M., Kutney S.N., Qi H. et Chou M.M.** 2003. The TRE17 oncogene encodes a component of a novel effector pathway for Rho GTPases Cdc42 and Rac1 and stimulates actin remodeling. *Mol. Cell Biol.* **23**(6): 2151-2161.
- Mathias N., Johnson S., Byers B. et Goebel M.** 1999. The abundance of cell cycle regulatory protein Cdc4p is controlled by interactions between its F box and Skp1p. *Mol. Cell Biol.* **19**(3): 1759-1767.
- Matoskova B., Wong W.T., Seki N., Nagase T., Nomura N., Robbins K.C. et Di Fiore P.P.** 1996. RN-tre identifies a family of tre-related proteins displaying a novel potential protein binding domain. *Oncogene* **12**(12): 2563-2571.
- Matsumura F., Totsukawa G., Yamakita Y. et Yamashiro S.** 2001. Role of myosin light chain phosphorylation in the regulation of cytokinesis. *Cell Struct. Funct.* **26**(6): 639-644.
- Matsumura F.** 2005. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol.* **15**(7): 371-377.
- May W.A., Lessnick S.L., Braun B.S., Klemsz M., Lewis B.C., Lunsford L.B., Hromas R. et Denny C.T.** 1993. The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol. Cell Biol.* **13**(12): 7393-7398.
- McGough A., Pope B., Chiu W. et Weeds A.** 1997. Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* **138**(4): 771-781.
- McGough A., Chiu W. et Way M.** 1998. Determination of the gelsolin binding site on F-actin: implications for severing and capping. *Biophys. J.* **74**(2 Pt 1): 764-772.
- Michimoto T., Aoki T., Toh-e A et Kikuchi Y.** 2000. Yeast Pdr13p and Zuo1p molecular chaperones are new functional Hsp70 and Hsp40 partners. *Gene* **257**(1): 131-137.
- Mosavi L.K., Cammett T.J., Desrosiers D.C. et Peng Z.Y.** 2004. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* **13**(6): 1435-1448.
- Moussavi R.S., Kelley C.A. et Adelstein R.S.** 1993. Phosphorylation of vertebrate nonmuscle and smooth muscle myosin heavy chains and light chains. *Mol. Cell Biochem.* **127-128**: 219-227.

- Muranyi A., Zhang R., Liu F., Hirano K., Ito M., Epstein H.F. et Hartshorne D.J.** 2001. Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *FEBS Lett.* **493**(2-3): 80-84.
- Murata Y., Watanabe T., Sato M., Momose Y., Nakahara T., Oka S. et Iwahashi H.** 2003. Dimethyl sulfoxide exposure facilitates phospholipid biosynthesis and cellular membrane proliferation in yeast cells. *J.Biol.Chem.* **278**(35): 33185-33193.
- Myers A.M., Tzagoloff A., Kinney D.M. et Lusty C.J.** 1986. Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions. *Gene* **45**(3): 299-310.
- Nakamura T., Hillova J., Mariage-Samson R. et Hill M.** 1988. Molecular cloning of a novel oncogene generated by DNA recombination during transfection. *Oncogene Res.* **2**(4): 357-370.
- Nakamura T., Hillova J., Mariage-Samson R., Onno M., Huebner K., Cannizzaro L.A., Boghosian-Sell L., Croce C.M. et Hill M.** 1992. A novel transcriptional unit of the tre oncogene widely expressed in human cancer cells. *Oncogene* **7**(4): 733-741.
- Navid F., Billups C., Liu T., Krasin M.J. et Rodriguez-Galindo C.** 2008. Second cancers in patients with the Ewing sarcoma family of tumours. *Eur.J.Cancer* .
- Oliveira A.M., Perez-Atayde A.R., Inwards C.Y., Medeiros F., Derr V., Hsi B.L., Gebhardt M.C., Rosenberg A.E. et Fletcher J.A.** 2004a. USP6 and CDH11 oncogenes identify the neoplastic cell in primary aneurysmal bone cysts and are absent in so-called secondary aneurysmal bone cysts. *Am.J.Pathol.* **165**(5): 1773-1780.
- Oliveira A.M., Hsi B.L., Weremowicz S., Rosenberg A.E., Dal C.P., Joseph N., Bridge J.A., Perez-Atayde A.R., et Fletcher J.A.** 2004b. USP6 (Tre2) fusion oncogenes in aneurysmal bone cyst. *Cancer Res.* **6**: 1920-1923.
- Oliveira A.M., Perez-Atayde A.R., Dal C.P., Gebhardt M.C., Chen C.J., Neff J.R., Demetri G.D., Rosenberg A.E., Bridge J.A. et Fletcher J.A.** 2005. Aneurysmal bone cyst variant translocations upregulate USP6 transcription by promoter swapping with the ZNF9, COL1A1, TRAP150, and OMD genes. *Oncogene* **24**(21): 3419-3426.

- Otano-Joos M., Mechtersheimer G., Ohl S., Lehnert T., Willeke F., Moller P., Otto H.F., Lichter P. et Joos S.** 1998. [Analysis of chromosome copy number changes in leiomyosarcoma through molecular cytogenetic methods]. *Verh.Dtsch.Ges.Pathol.* **82**: 207-209.
- Pan X., Eathiraj S., Munson M. et Lambright D.G.** 2006. TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature* **442**(7100): 303-306.
- Panagopoulos I., Mertens F., Lofvenberg R. et Mandahl N.** 2008. Fusion of the COL1A1 and USP6 genes in a benign bone tumor. *Cancer Genet.Cytogenet.* **180**(1): 70-73.
- Pantaloni D., Le C.C. et Carlier M.F.** 2001. Mechanism of actin-based motility. *Science* **292**(5521): 1502-1506.
- Papa F.R., Hochstrasser M.** 1993. The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. *Nature* **366**(6453): 313-319.
- Park H.O., Bi E.** 2007. Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **71**(1): 48-96.
- Paulding C.A., Ruvolo M. et Haber D.A.** 2003. The Tre2 (USP6) oncogene is a hominoid-specific gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**(5): 2507-2511.
- Pei L., Peng Y., Yang Y., Ling X.B., Van Eyndhoven W.G., Nguyen K.C., Rubin M., Hoey T., Powers S. et Li J.** 2002. PRC17, a novel oncogene encoding a Rab GTPase-activating protein, is amplified in prostate cancer. *Cancer Res.* **62**(19): 5420-5424.
- Poetter K., Jiang H., Hassanzadeh S., Master S.R., Chang A., Dalakas M.C., Rayment I., Sellers J.R., Fananapazir L. et Epstein N.D.** 1996. Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat.Genet.* **13**(1): 63-69.
- Poloni D., Simanis V.** 2002. A DMSO-sensitive conditional mutant of the fission yeast orthologue of the *Saccharomyces cerevisiae* SEC13 gene is defective in septation. *FEBS Lett.* **511**(1-3): 85-89.

- Poperechnaya A., Varlamova O., Lin P.J., Stull J.T. et Bresnick A.R.** 2000. Localization and activity of myosin light chain kinase isoforms during the cell cycle. *J.Cell Biol.* **151**(3): 697-708.
- Prokopenko S.N., Brumby A., O'Keefe L., Prior L., He Y., Saint R. et Bellen H.J.** 1999. A putative exchange factor for Rho1 GTPase is required for initiation of cytokinesis in *Drosophila*. *Genes Dev.* **13**(17): 2301-2314.
- Rayment I., Rypniewski W.R., Schmidt-Base K., Smith R., Tomchick D.R., Benning M.M., Winkelmann D.A., Wesenberg G. et Holden H.M.** 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**(5117): 50-58.
- Richardson P.M., Zon L.I.** 1995. Molecular cloning of a cDNA with a novel domain present in the *tre-2* oncogene and the yeast cell cycle regulators BUB2 and *cdc16*. *Oncogene* **11**(6): 1139-1148.
- Ridley A.** 2000. Rho GTPases. Integrating integrin signaling. *J.Cell Biol.* **150**(4): F107-F109.
- Ridley A.J.** 2000. Les Rho GTPases. Dans : GTPases. *Oxford University Press, Oxford.*
- Riggi N., Stamenkovic I.** 2007. The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett.*
- Roth M.G.** 2000. Les Arf GTPases. Dans : GTPases. *Oxford University Press, Oxford.*
- Rubtsov A.M., Lopina O.D.** 2000. Ankyrins. *FEBS Lett.* **482**(1-2): 1-5.
- Sapperstein S.K., Lupashin V.V., Schmitt H.D. et Waters M.G.** 1996. Assembly of the ER to Golgi SNARE complex requires Usa1p. *J.Cell Biol.* **132**(5): 755-767.
- Scanlan M.J., Gordan J.D., Williamson B., Stockert E., Bander N.H., Jongeneel V., Gure A.O., Jager D., Jager E., Knuth A., Chen Y.T. et Old L.J.** 1999. Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma. *Int.J.Cancer* **83**(4): 456-464.
- Scheffzek K., Ahmadian M.R., Kabsch W., Wiesmuller L., Lautwein A., Schmitz F. et Wittinghofer A.** 1997. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**(5324): 333-338.

**Schwartz A.L., Ciechanover A.** 1999. The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu.Rev.Med.* **50**: 57-74.

**Seabra M.C., Mules E.H. et Hume A.N.** 2002. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol.Med.* **8**(1): 23-30.

**Seaman M.N., Marcusson E.G., Cereghino J.L. et Emr S.D.** 1997. Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products. *J.Cell Biol.* **137**(1): 79-92.

**Seaman M.N., McCaffery J.M. et Emr S.D.** 1998. A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J.Cell Biol.* **142**(3): 665-681.

**Sedgwick S.G., Smerdon S.J.** 1999. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem.Sci.* **24**(8): 311-316.

**Sellers J.R., Goodson H.V. et Wang F.** 1996. A myosin family reunion. *J.Muscle Res.Cell Motil.* **17**(1): 7-22.

**Shen C., Ye Y., Robertson S.E., Lau A.W., Mak D.O. et Chou M.M.** 2005. Calcium/calmodulin regulates ubiquitination of the ubiquitin-specific protease TRE17/USP6. *J.Biol.Chem.* **280**(43): 35967-35973.

**Sheterline P., Sparrow J.C.** 1994. Actin. *Protein Profile.* **1**(1): 1-121.

**Shohat G., Shani G., Eisenstein M. et Kimchi A.** 2002. The DAP-kinase family of proteins: study of a novel group of calcium-regulated death-promoting kinases. *Biochim.Biophys.Acta* **1600**(1-2): 45-50.

**Sluga M., Windhager R., Lang S., Heinzl H., Krepler P., Mittermayer F., Dominkus M., Zoubek A. et Kotz R.** 2001. A long-term review of the treatment of patients with Ewing's sarcoma in one institution. *Eur.J.Surg.Oncol.* **27**(6): 569-573.

**Somers W.G., Saint R.** 2003. A RhoGEF and Rho family GTPase-activating protein complex links the contractile ring to cortical microtubules at the onset of cytokinesis. *Dev.Cell* **4**(1): 29-39.



**Somlyo A.P., Somlyo A.V.** 2003. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* **83**(4): 1325-1358.

**Somlyo A.V., Wang H., Choudhury N., Khromov A.S., Majesky M., Owens G.K. et Somlyo A.P.** 2004. Myosin light chain kinase knockout. *J.Muscle Res.Cell Motil.* **25**(3): 241-242.

**Sonnichsen B., Koski L.B., Walsh A., Marschall P., Neumann B., Brehm M., Alleaume A.M., Artelt J., Bettencourt P., Cassin E., Hewitson M., Holz C., Khan M., Lazik S., Martin C., Nitzsche B., Ruer M., Stamford J., Winzi M., Heinkel R., Roder M., Finell J., Hantsch H., Jones S.J., Jones M., Piano F., Gunsalus K.C., Oegema K., Gonczy P., Coulson A., Hyman A.A. et Echeverri C.J.** 2005. Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **434**(7032): 462-469.

**Straub F.B.** 1942. Actin. *Stud Inst Med Chem Univ Szeged* **2**: 1-15.

**Sutton A., Immanuel D. et Arndt K.T.** 1991. The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Mol.Cell Biol.* **11**(4): 2133-2148.

**Takizawa N., Koga Y. et Ikebe M.** 2002. Phosphorylation of CPI17 and myosin binding subunit of type 1 protein phosphatase by p21-activated kinase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **297**(4): 773-778.

**Tatsumoto T., Xie X., Blumenthal R., Okamoto I. et Miki T.** 1999. Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J.Cell Biol.* **147**(5): 921-928.

**Tcheperegine S.E., Gao X.D. et Bi E.** 2005. Regulation of cell polarity by interactions of Msb3 and Msb4 with Cdc42 and polarisome components. *Mol.Cell Biol.* **25**(19): 8567-8580.

**Theriot J.A., Rosenblatt J., Portnoy D.A., Goldschmidt-Clermont P.J. et Mitchison T.J.** 1994. Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell* **76**(3): 505-517.

**Toyoshima Y.Y., Kron S.J., McNally E.M., Niebling K.R., Toyoshima C. et Spudich J.A.** 1987. Myosin subfragment-1 is sufficient to move actin filaments in vitro. *Nature* **328**(6130): 536-539.

**Uyeda T.Q., Abramson P.D. et Spudich J.A.** 1996. The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**(9): 4459-4464.

**Vandenbol M., Durand P., Portetelle D. et Hilger F.** 1995. Sequence analysis of a 44 kb DNA fragment of yeast chromosome XV including the Tyl-H3 retrotransposon, the *suf1(+)* frameshift suppressor gene for tRNA-Gly, the yeast transfer RNA-Thr-1a and a delta element. *Yeast* **11**(11): 1069-1075.

**Velasco G., Armstrong C., Morrice N., Frame S. et Cohen P.** 2002. Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin. *FEBS Lett.* **527**(1-3): 101-104.

**Wennerberg K., Rossman K.L. et Der C.J.** 2005. The Ras superfamily at a glance. *J.Cell Sci.* **118**(Pt 5): 843-846.

**Wessels D., Soll D.R.** 1990. Myosin II heavy chain null mutant of Dictyostelium exhibits defective intracellular particle movement. *J.Cell Biol.* **111**(3): 1137-1148.

**West D.C.** 2000. Ewing sarcoma family of tumors. *Curr.Opin.Oncol.* **12**(4): 323-329.

**Wilkinson S., Paterson H.F. et Marshall C.J.** 2005. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat.Cell Biol.* **7**(3): 255-261.

**Wong C.C., Wong C.M., Ko F.C., Chan L.K., Ching Y.P., Yam J.W. et Ng I.O.** 2008. Deleted in liver cancer 1 (DLC1) negatively regulates Rho/ROCK/MLC pathway in hepatocellular carcinoma. *PLoS.ONE.* **3**(7): e2779.

**Yamashiro S., Totsukawa G., Yamakita Y., Sasaki Y., Madaule P., Ishizaki T., Narumiya S. et Matsumura F.** 2003. Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II. *Mol.Biol.Cell* **14**(5): 1745-1756.

**Yokoyama T., Goto H., Izawa I., Mizutani H. et Inagaki M.** 2005. Aurora-B and Rho-kinase/ROCK, the two cleavage furrow kinases, independently regulate the progression of cytokinesis: possible existence of a novel cleavage furrow kinase phosphorylates ezrin/radixin/moesin (ERM). *Genes Cells* **10**(2): 127-137.

**Yonemura S., Hirao-Minakuchi K. et Nishimura Y.** 2004. Rho localization in cells and tissues. *Exp.Cell Res.* **295**(2): 300-314.

**Zamora P., Garcia de Paredes M.L., Gonzalez B.M., Diaz M.A., Escobar Y., Ordonez A., Lopez B.F. et Gonzalez J.M.** 1986. Ewing's tumor in brothers. An unusual observation. *Am.J.Clin.Oncol.* **9**(4): 358-360.

**Zechel K., Weber K.** 1978. Actins from mammals, bird, fish and slime mold characterized by isoelectric focusing in polyacrylamide gels. *Eur.J.Biochem.* **89**(1): 105-112.

**Zhou P., Howley P.M.** 1998. Ubiquitination and degradation of the substrate recognition subunits of SCF ubiquitin-protein ligases. *Mol.Cell* **2**(5): 571-580.

