

JESSY TREMBLAY

**ÉTUDE DE LA RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE ET POST-  
TRADUCTIONNELLE DU GÈNE *YPS1* CODANT POUR L'ENDOPROTÉASE  
YAPSINE 1 DE *Saccharomyces cerevisiae***

Mémoire

Présenté

à la Faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M.Sc)

Département de biochimie  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE  
UNIVERSITÉ LAVAL

Janvier 2001



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-57841-0

Canada

## RÉSUMÉ

Le gène *YPS1* de *Saccharomyces cerevisiae* code pour une enzyme de la famille des aspartyl protéases nommée yapsine 1. Elle est localisée dans l'espace périplasmique et est ancrée à la membrane par un groupement GPI. Yps1 est la plus étudiée d'une famille de six aspartyl protéases retrouvées chez la levure. Son rôle ainsi que ses substrats biologiques sont toutefois encore indéterminés. Notre hypothèse est que Yps1 a un rôle à jouer dans la régulation des enzymes impliquées dans l'assemblage et le remodelage de la paroi. Pour tester notre hypothèse, nous avons étudié le profil d'expression du gène *YPS1* au cours du cycle cellulaire et dans différentes conditions de stress pour la paroi cellulaire. Nos résultats indiquent que l'expression de *YPS1* est régulée périodiquement dans le cycle cellulaire à la transition G<sub>1</sub>/S où s'initie la formation du bourgeon. Nous avons également montré que la transcription de *YPS1* est stimulée par des stress de paroi. Cette induction nécessite l'activation des voies de signalisation régulées par la protéine kinase Mpk1 et la calcineurine, deux sentiers de signalisation qui contrôlent l'assemblage et le remodelage de la paroi cellulaire. Un autre aspect de notre recherche était d'étudier la maturation post-traductionnelle de l'endoprotéase Yps1. Pour ce faire, nous avons construit une série de mutants de l'enzyme qui ont été caractérisés pour leur activité enzymatique et leur séquence N-terminale. L'ensemble de ces travaux nous a permis de confirmer que Yps1 est initialement synthétisée sous une forme zymogène et de déterminer les sites de maturation de l'endoprotéase. De plus, nous avons démontré que selon les conditions de croissance, Yps1 devient son propre substrat et permet le relargage de la forme membranaire dans le milieu de culture. Nous pouvons donc conclure que l'endoprotéase Yps1 joue un rôle dans l'assemblage et/ou le remodelage de la paroi cellulaire chez *S. cerevisiae*.

---

Jessy Tremblay

---

Yves Bourbonnais

## **AVANT-PROPOS**

Tout d'abord, je tiens à remercier particulièrement mon directeur de recherche le Dr Yves Bourbonnais pour m'avoir permis d'évoluer au sein de son laboratoire sous son encadrement, pour sa disponibilité ainsi que la patience dont il a fait preuve à mon égard tout au long de mon projet de recherche de maîtrise. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir initié à la recherche et fait partager une partie de sa grande expérience.

Ma gratitude va également au membre de mon comité aviseur, les Drs Dominick Pallotta et Guy Bellemare pour leurs collaborations et leurs judicieux conseils. J'aimerais remercier spécialement la Dre Louise Brisson pour son support, ses conseils et toutes les discussions stimulantes que nous avons eues. J'aimerais aussi remercier le Dr Luc Giasson pour son attention et ses bons commentaires quant à l'évaluation de ce mémoire.

J'exprime aussi toute ma reconnaissance à mes collègues de laboratoire Guylaine Tardif, Claude Lamarre et Chantal Larouche pour leur collaboration et l'atmosphère agréable qui a prévalu tout le long de ce projet de recherche.

Mes remerciements vont également à ma compagne de vie Sandra, sans qui, les obstacles auraient été beaucoup plus difficiles à surmonter. Mes remerciements vont également à tous les membres de ma famille et à mes amis(es) qui ont toujours cru en moi.

Enfin, je remercie toutes les personnes dont j'aurais omis de mentionner le nom et qui m'ont aidé de près ou de loin pendant toute la durée de ma maîtrise.

## TABLE DES MATIÈRES

	PAGE
<b>RÉSUMÉ</b> .....	2
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	3
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	4
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	8
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	9
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	12
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION</b> .....	14
<b>1.1. Paroi cellulaire chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	14
1.1.1. Structure moléculaire de la paroi.....	14
1.1.1.1. $\beta$ -glucans.....	14
1.1.1.2. Chitine.....	17
1.1.1.3. Mannoprotéines.....	17
1.1.2. Assemblage et remodelage de la paroi.....	19
1.1.2.1. Enzymes majeures impliquées.....	20
1.1.2.1.1. Chitinases et chitine synthétases.....	20
1.1.2.1.2. Glucanases.....	21
1.1.2.1.3. Endoprotéases.....	22
1.1.2.2. Régulation de la paroi.....	22
1.1.2.2.1. Dans le cycle cellulaire.....	23
1.1.2.2.2. Par les conditions du milieu.....	27
<b>1.2. L'endoprotéase Yps1</b> .....	31
1.2.1. Découverte du gène <i>YPS1</i> .....	31
1.2.2. L'endoprotéase Yps1 est membre de la famille des aspartyl protéases.....	31
1.2.2.1. Structure de l'endoprotéase Yps1.....	31
1.2.2.2. Similarité de séquence avec les aspartyl protéases.....	33

1.2.2.3. Mécanisme d'activation des aspartyl protéases .....	35
1.2.3. Spécificité de clivage de Yps1 .....	37
1.2.4. Homologues de Yps1 chez la levure .....	38
1.2.5. Localisation cellulaire de Yps1 .....	40
<b>1.3. Hypothèses et objectifs de la recherche .....</b>	<b>42</b>

## **CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES .....**

<b>2.1. Les micro-organismes .....</b>	<b>43</b>
2.1.1. Les souches .....	43
2.1.1.1. Bactéries .....	43
2.1.1.2. Levures .....	43
2.1.1.3. Bactériophage .....	43
2.1.2. La culture .....	43
2.1.2.1. Bactéries .....	45
2.1.2.2. Levures .....	45
2.1.3. Synchronisation d'une culture de levure par le facteur $\alpha$ .....	45
2.1.4. Protocole de stress de levure .....	46
2.1.5. Transformation .....	46
2.1.5.1. Bactéries .....	46
2.1.5.2. Levures .....	46
2.1.6. Essais biologiques .....	47
2.1.6.1. Tests de zone .....	47
2.1.6.2. Tests de conjugaison .....	48
<b>2.2. Les protéines .....</b>	<b>48</b>
2.2.1. Préparation d'extraits protéiques de levure .....	48
2.2.2. Quantification .....	49
2.2.3. Déglycosylation (en condition non réductrice) .....	49
2.2.4. Migration par SDS-PAGE .....	50
2.2.5. Migration par SDS-PAGE pour la séparation de protéines de 1 à 100 kDa .....	50
2.2.6. Transfert sur une membrane de nitrocellulose ou PVDF .....	51
2.2.7. Détection des protéines .....	51
2.2.7.1. Coloration .....	51
2.2.7.2. Immunofluorescence indirecte .....	52
2.2.8. Purification de protéines flanquées de six histidines .....	52
2.2.8.1. Concentration des protéines .....	52
2.2.8.2. Purification sur résine Ni-NTA-agarose .....	53

2.2.9. Analyse des séquences N-terminales.....	53
2.2.10. Essais enzymatiques avec Yps1-H et ses variants.....	53
<b>2.3. Les acides nucléiques.....</b>	<b>54</b>
2.3.1. Les plasmides.....	54
2.3.2. Mini préparation d'ADN plasmidique.....	54
2.3.3. Purification d'ADN plasmidique pour le séquençage.....	56
2.3.4. Préparation de sondes d'ADN par PCR.....	56
2.3.5. Purification d'ADN sur gel d'agarose.....	56
2.3.6. Mutagenèse dirigée.....	57
2.3.6.1. Préparation d'ADN simple brin.....	57
2.3.6.2. Oligonucléotides utilisés pour modifier le gène <i>YPS1</i> .....	58
2.3.6.3. Phosphorylation de l'oligonucléotide.....	58
2.3.6.4. Hybridation des oligonucléotides à l'ADN simple brin, synthèse <i>in vitro</i> du second brin et transformation bactérienne.....	58
2.3.7. Préparation d'ARN total de levure.....	59
2.3.8. Migration d'ARN sur gel d'agarose (buvardage northern).....	59
2.3.8.1. Transfert sur membrane de nylon.....	60
2.3.9. Détection d'ARNm sur membrane.....	61
2.3.9.1. Marquage radioactif de sondes d'ADN.....	61
2.3.9.1.1. Évaluation de l'incorporation de la radioactivité.....	61
2.3.9.2. Hybridation.....	62
2.3.9.3. Visualisation des signaux.....	62
2.3.9.4. Déshybridation.....	62
 <b>CHAPITRE III : RÉSULTATS.....</b>	 <b>63</b>
 <b>3.1. Régulation transcriptionnelle du gène <i>YPS1</i>.....</b>	 <b>63</b>
3.1.1. Régulation transcriptionnelle dans le cycle cellulaire.....	63
3.1.2. Régulation transcriptionnelle lors de stress.....	65
<b>3.2. Régulation post-traductionnelle du gène <i>YPS1</i>.....</b>	<b>71</b>
3.2.1. Étude du mécanisme d'activation de l'endoprotéase yapsine 1 par mutagenèse de sites potentiels de maturation et du site catalytique.....	71
3.2.1.1. Effets des mutations introduites dans <i>YPS1</i> sur l'activité endo- protéolytique spécifique à yapsine 1.....	73
3.2.1.1.1. Effets sur la maturation de la prosomatostatine- facteur $\alpha$ .....	73

3.2.1.1.2. Effets sur la correction d'un phénotype associé à l'endo-protéase Kex2.....	75
3.2.1.2. Analyse électrophorétique de l'effet des mutations introduites dans Yps1 sur son expression et sa maturation.....	75
3.2.1.2.1. Analyse des variants de <i>YPS1</i> exprimée avec le vecteur centromérique.....	77
3.2.1.2.2. Analyse des variants de <i>YPS1</i> exprimée avec le vecteur multicopie.....	77
3.2.1.2.2.1. Formes intracellulaires et périplasmiques.....	77
3.2.1.2.2.2. Formes sécrétées.....	81
3.2.1.2.3. Analyse des variants surexprimés de Yps1 tronquée à l'extrémité C-terminale.....	84
3.2.1.2.3.1. Analyse électrophorétique en condition réductrice de l'effet du pH sur la maturation de Yps1-H.....	86
3.2.1.2.3.2. Analyse électrophorétique en condition réductrice et non-réductrice de Yps1-H.....	87
3.2.1.2.3.3. Activité enzymatique <i>in vivo</i> des formes purifiées de Yps1 et ses variants.....	90
<b>CHAPITRE IV : DISCUSSION</b> .....	93
<b>4.1.</b> La régulation transcriptionnelle du gène <i>YPS1</i> .....	93
4.1.1. <i>YPS1</i> est régulé de façon cyclique dans le cycle cellulaire.....	93
4.1.2. <i>YPS1</i> est plus fortement exprimé lorsqu'on stimule la voie d'intégrité de la paroi (PKC) et celle de la calcineurine.....	94
<b>4.2.</b> La régulation post-traductionnelle de l'endoprotéase Yps1.....	98
4.2.1. Initiation de la synthèse du zymogène.....	99
4.2.2. Maturation de la prorégion du zymogène.....	101
4.2.3. Coupure $\alpha/\beta$ de la protéine.....	101
4.2.4. Maturation de la sous-unité $\beta$ .....	102
4.2.5. Le relargage de Yps1 dans le milieu.....	103
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	105
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	107



**LISTE DES TABLEAUX**

	PAGE
<b>Tableau I.</b> Facteurs de transcription important pour l'expression des régulateurs du cycle de division cellulaire.....	25
<b>Tableau II.</b> Survol des gènes codant pour des CWP dont les niveaux d'expression varient dans le cycle cellulaire.....	26
<b>Tableau III.</b> Survol des gènes codant pour des CWP dont les niveaux d'expression varient sous différentes conditions de croissance.....	30
<b>Tableau IV.</b> Souches de <i>S. cerevisiae</i> utilisées dans ce mémoire.....	44
<b>Tableau V.</b> Plasmides utilisés dans ce mémoire.....	55
<b>Tableau VI.</b> Identification des séquences N-terminales des variants de Yps1-H et ses variants.....	89

## LISTE DES FIGURES

		PAGE
<b>Figure 1.</b>	Structure moléculaire de la paroi de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	15
<b>Figure 2.</b>	Aperçu de la régulation des événements du cycle de division cellulaire de la levure.....	24
<b>Figure 3.</b>	Modèle de la voie d'intégrité de la paroi cellulaire.....	28
<b>Figure 4.</b>	Représentation schématique des composantes structurales de yapsine 1	32
<b>Figure 5.</b>	Alignement de la séquence du produit des gènes <i>PEP4</i> , <i>BAR1</i> et <i>YPS1</i> membres des aspartyl protéases de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> avec la séquence du pepsinogène A humain.....	34
<b>Figure 6.</b>	Représentation de la structure tertiaire du pepsinogène A de porc.....	36
<b>Figure 7.</b>	Alignement de la séquence du produit des gènes <i>YPS</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	39
<b>Figure 8.</b>	Identification de sites potentiels de maturation dibasiques chez des glycoprotéines ancrées par un GPI à la membrane plasmique.....	41
<b>Figure 9.</b>	Niveaux d'expression de messagers dans le cycle cellulaire.....	64
<b>Figure 10.</b>	Comparaison de niveaux de messagers chez des mutants des voies de PKC et de la calcineurine en condition de croissance à température extrême.....	66
<b>Figure 11.</b>	Comparaison de niveaux de messagers chez des mutants des voies de PKC et de la calcineurine affectés au niveau de la paroi par la présence de SDS 0,005 %.....	67

<b>Figure 12.</b>	Comparaison de niveaux de messagers chez des mutants des voies de PKC et de la calcineurine en présence de $Ca^{2+}$ .....	69
<b>Figure 13.</b>	Comparaison de niveaux de messagers chez des mutants des voies de PKC et de la calcineurine placés en milieu hypertonique.....	70
<b>Figure 14.</b>	Représentation schématique des mutations introduites dans yapsin 1 pour l'étude de son mécanisme d'activation.....	72
<b>Figure 15.</b>	Détection de facteur $\alpha$ mature chez des souches exprimant une copie De Yps1 ou ses variants.....	74
<b>Figure 16.</b>	Correction du défaut de croissance à 16°C d'un mutant de maturation endoprotéolytique par l'expression multicopie de Yps1 ou ses variants.....	76
<b>Figure 17.</b>	Analyse en buvardage western des variants de yapsine 1 exprimés avec le vecteur centromérique.....	78
<b>Figure 18.</b>	Comparaison de la taille déglycosylée (+Endo H <sub>f</sub> ) et glycosylée (-Endo H <sub>f</sub> ) des variants de yapsine 1 retrouvées dans les extraits cellulaires lorsque exprimés avec le vecteur multicopie.....	79
<b>Figure 19.</b>	Comparaison de la taille en condition réductrice (+DTT) et non réductrice (-DTT) des variants de yapsin 1 retrouvées dans les surnageants de culture lorsque exprimés avec le vecteur multicopie.....	82
<b>Figure 20.</b>	Analyse de yapsine 1 et ses variants retrouvés dans les surnageants de cultures en milieu non tamponnées et tamponnées.....	83
<b>Figure 21.</b>	Comparaison de la taille de Yps1-H retrouvée dans les surnageants de cultures tamponnées à différents pH.....	85
<b>Figure 22.</b>	Comparaison de la taille en condition réductrice et non réductrice des variants sécrétés de yapsin 1 (Ysp1-H) exprimées sous un promoteur fort sur un vecteur multicopie.....	88
<b>Figure 23.</b>	Représentation schématique de la pré-élafine avec ses ponts disulfures...	91

<b>Figure 24.</b>	Maturation <i>in vitro</i> de la pré-élafine recombinante par Yps1 et ses variants.....	92
<b>Figure 25.</b>	Analyse des éléments de régulation transcriptionnelle potentiels présents dans la région promotrice du gène <i>YPS1</i> .....	95
<b>Figure 26.</b>	Schéma hypothétique de la maturation de Yps1 chez la levure.....	100

## LISTE DES ABRÉVIATION

A : alanine  
 a.a. : acide aminé  
 ADN : acide désoxyribonucléique  
 ADNss : ADN simple brin  
 APC : anaphase-promoting complexe  
 ARN : acide ribonucléique  
 Asp : acide aspartique  
 ATCC : *American Type Culture Collection*  
 ATP : adénosine triphosphate  
 °C : degré Celsius  
 CDK : cyclin-dependent kinase  
 CLB : cycline B  
 CLN : cycline  
 cpm : compte par minute  
 CWP : cell wall proteins, protéines de la paroi cellulaire  
 D : acide aspartique  
 dCTP : désoxycytidine triphosphate  
 DEPC : diéthyle pyrocarbonate  
 D.O. : densité optique  
 dNTP : désoxynucléotide triphosphate  
 DTT : dithiothréitol  
 ECB : early cell cycle box  
 EDTA : éthylène diamine tétraacétate  
 Endo H<sub>f</sub> : endoglycosydase H<sub>f</sub>  
 GPI : glycosylphosphatidylinositol  
 GTP : guanosine triphosphate  
 h : heure  
 J : joule  
 K : lysine  
 kb : kilobase  
 kDa : kilodalton  
 M : molaire  
 MBF : MCB binding factor  
 MCB : *MluI* cell cycle box  
 MCE : Mcm1 cell cycle element  
 MES : acide 2-[n-morpholino] éthanesulfonique  
 min : minute

ml : millilitre  
 mM : millimolaire  
 N : normale  
 ng : nanogramme  
 NMWL : « nominal molecular weight limit » poids moléculaire nominal limite  
 pb : paire de base  
 PCE : POMC-converting enzyme  
 PCR : réaction en chaîne de la polymérase  
 PEG : polyéthylène glycol  
 pfu : unité formatrice de plaque  
 POMC : hormone pro-opiomélanocorticoïque  
 p/v : ratio poids sur volume  
 PVDF : polyvinylidène difluoride  
 R : arginine  
 RE : reticulum endoplasmique  
 rpm : rotation par minute  
 SBF : SCB binding factor  
 SC : milieu synthétique complet  
 SCB : Swi4-Swi6-dependent cell cycle box  
 SD : milieu synthétique dextrose  
 sec : seconde  
 Ser : sérine  
 SDS : sodium dodécylsulfate  
 SDS-PAGE : « SDS-Polyacrylamine Gel Electrophoresis » électrophorèse en gel de polyacrylamide  
 en présence de SDS  
 SPB : « spindle pole body » : corps du fuseau polaire  
 TCA : acide trichloroacétique  
 TEMED : N,N,N',N'-tetraméthyl éthylène diamine  
 Thr : thréonine  
 Tris : 2-amino-2(hydroxyméthyl)-1,3 propanediol  
 U : unité  
 UA : unité d'absorbance  
 µg : microgramme  
 µl : microlitre  
 -URA : sans uracile  
 V : volt  
 vol : volume  
 wt : « wild type », type sauvage

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1. Paroi cellulaire chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

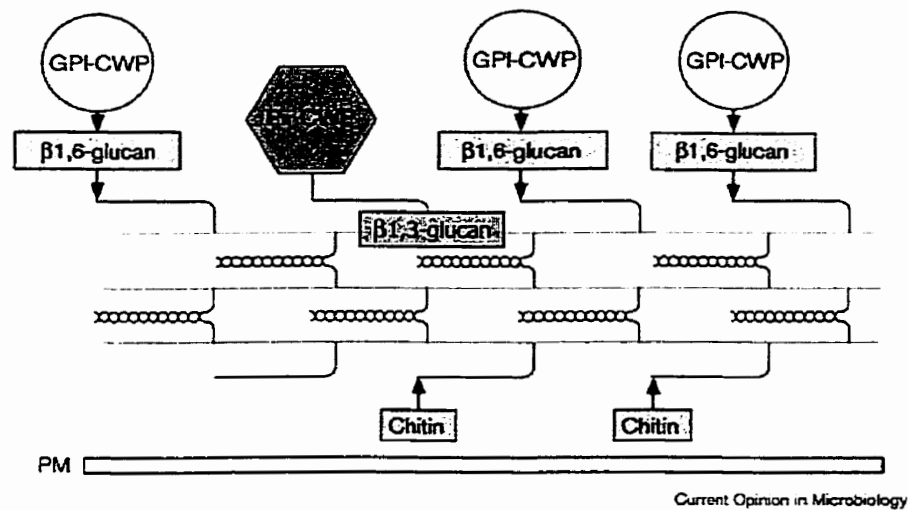
La paroi des microorganismes fait l'objet d'un bon nombre de recherches orientées sur la découverte de nouvelles molécules pouvant nous aider à combattre les infections. Les raisons qui poussent les chercheurs à cibler cette structure sont évidentes, la paroi des microorganismes est généralement un organe essentiel qui est directement en contact avec le milieu. Donc les molécules antibiotiques n'ont pas besoin de pénétrer à l'intérieur des cellules afin d'agir. Cette stratégie a également fait ses preuves avec la pénicilline. De plus, lorsqu'on a affaire à des pathogènes eucaryotes, les molécules qui ciblent cette structure ont moins de chance d'être toxiques pour l'humain. Bien que la paroi de *Saccharomyces cerevisiae* ne soit pas représentative de toutes les levures, elle offre un bon modèle pour l'étude des Ascomycotina, spécialement pour l'étude du pathogène opportuniste *Candida albicans*. La levure consacre une grande partie de son énergie à organiser sa paroi qui représente 20 à 30 % du poids sec d'une cellule. Pour la levure, la paroi ne joue pas seulement le rôle de squelette mais elle est un organe clef impliqué dans la morphogénèse et dans la reconnaissance cellule-cellule.

##### 1.1.1. Structure moléculaire de la paroi

Sur la base de travaux récents effectués par plusieurs groupes (revue par Lipke et Ovalle, 1998; Kapteyn *et al.*, 1999a), Smits et ses collègues (1999) présentent un modèle de la paroi de la levure *Saccharomyces cerevisiae* à un niveau moléculaire (Figure 1).

##### 1.1.1.1. $\beta$ -glucans

La paroi est d'abord constituée d'une structure squelettique interne formée par un réseau tridimensionnel de  $\beta$ -1,3-glucans, entrelacé de  $\beta$ -1,6-glucans, entourant entièrement la cellule. Cette structure est largement responsable de la rigidité mécanique de la paroi. Les  $\beta$ -



**Figure 1. Structure moléculaire de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*.** Voici le modèle proposé par Smits et ses collègues quant à la structure moléculaire de la paroi de *S. cerevisiae*. (Smits *et al.*, 1999). PM : membrane plasmique. CWP : cell wall proteins; Pir : Protein with internal repeats; GPI : glycosylphosphatidylinositol.



1,3-glucans constituent la composante majeure de la paroi, comptant pour plus de la moitié de son poids sec. Les  $\beta$ -1,3-glucans sont faits de longs polymères linéaires de  $\beta$ -1,3-glucose avec quelques embranchements de résidus  $\beta$ -1,6-glucose, tandis que les  $\beta$ -1,6-glucans sont formés de chaînes de  $\beta$ -1,6-glucose avec plusieurs embranchements de  $\beta$ -1,3-glucans et  $\beta$ -1,6-glucans (Cid *et al.*, 1995). Une fois à maturité, les embranchements avec de multiples extrémités non réduites servent de sites d'attachements pour d'autres composantes de la paroi.

Plusieurs gènes ont été identifiés affectant le contenu en  $\beta$ -1,3-glucan de la paroi et des fonctions leurs ont été attribuées, mais la biosynthèse *in vivo* des  $\beta$ -1,3-glucans est peu documentée. Les produits génétiques des gènes *FKS1* et *FKS2* constituent les sous-unités catalytiques de deux complexes enzymatiques appelés, respectivement,  $\beta$ -1,3-glucan synthétase I et II. Celles-ci ont une sous-unité régulatrice commune codée par le gène *RHO1*. Les protéines codées par les gènes *KNR4* et *HKR1* agiraient comme régulateurs de la synthèse des  $\beta$ -1,3-glucans *in vivo* mais leurs rôles exacts ne sont pas connus.

Les molécules de  $\beta$ -1,6-glucans matures sont principalement retrouvées sur la face externe du réseau squelettique et interconnectent une classe particulière de mannoprotéines de la paroi avec le réseau principal (Smits *et al.*, 1999). Une analyse des  $\beta$ -1,6-glucans de la paroi de la levure a révélé un polymère hautement ramifié comptant pour environ 10% du contenu total des glucans de la paroi. Ces polymères sont composés en moyenne de 350 résidus glucoses. Les premières études effectuées sur les  $\beta$ -1,6-glucans ont mis en évidence leurs propriétés de lier les mannoprotéines de façon covalente à la paroi. Récemment, une analyse biochimique a révélé que des protéines sont attachées à la paroi par un carbohydrate contenant du mannose (*N*-acetyl)glucosamine attaché pour la plupart à un résidu glucose. Ce carbohydrate est maintenant connu pour être dérivé du motif C-terminal du complexe glycosylphosphatidylinositol (GPI). Le GPI est une ancre membranaire servant à fixer les protéines aux membranes cellulaires (voir section 1.1.1.3.). Shahinian et Bussey (2000) ont proposé un modèle schématique des étapes putatives impliquées dans la biosynthèse des  $\beta$ -1,6-glucans attachés aux protéines GPI de la paroi cellulaire, mais bien peu de choses sont connues. Plusieurs gènes ont été identifiés affectant la synthèse des  $\beta$ -1,6-glucans (dont la majeure partie est de la famille des gènes *KRE*) mais l'activité biochimique de seulement deux produits de ces gènes (les glucosidases des chaînes-*N* du RE *Cwh41* et *Rot2*) est connue et ils ne semblent pas impliqués directement dans la synthèse du polymère de  $\beta$ -1,6-glucan. Il semble toutefois bien établi qu'une fois à la membrane plasmique, les mannoprotéines ancrées par un GPI et destinées à être incorporées à la paroi subiraient une ablation du groupement phospholipide inositol. La chaîne glucidique restante du GPI servirait alors de substrat pour l'addition d'une chaîne latérale de  $\beta$ -1,6-glucan permettant ainsi le pontage de la mannoprotéine au réseau de  $\beta$ -glucans.

### 1.1.1.2. Chitine

Le squelette de glucans est renforcé par des chaînes de chitine retrouvées principalement près de la membrane plasmique. La chitine est un long polymère de  $\beta$ -1,4-N-acétylglucosamine. Elle compte seulement pour un faible pourcentage (1 à 2%) du poids sec de la paroi des cellules végétatives (Cid *et al.*, 1995). Cependant, elle constitue une composante essentielle à la levure. Une faible quantité de chitine est incorporée au squelette de  $\beta$ -glucans. Sa liaison s'effectue par un lien  $\beta$ -1,4 entre son extrémité réduite et un glucose terminal non réduit d'un polymère de  $\beta$ -1,3-glucan. Quelques chaînes de chitine sont aussi retrouvées liées à de courtes chaînes de  $\beta$ -1,3-glucans. Elle est principalement retrouvée aux cicatrices de bourgeonnement, apparaissant comme une structure en forme de cratère facilement détectable à l'aide d'une coloration au Calcofluor White sur la surface de la cellule mère après la séparation cellulaire. Les cellules naissantes ne présentent pas de trace détectable de chitine. La chitine est également retrouvée sur les projections sexuelles (shmoo) formées par les cellules lors de la réponse aux phéromones sexuelles.

### 1.1.1.3. Mannoprotéines

Les mannoprotéines sont des protéines retrouvées au niveau de la paroi, liées de façon covalente, et possédant un grand contenu en mannose polymérisé. Ces protéines sont initialement synthétisées au RE où s'effectue l'ajout des premiers sucres *N*- et *O*-liés. Ensuite, elles empruntent la voie de sécrétion et subissent des modifications et élongations de leurs chaînes glucidiques. L'élongation de ces chaînes se poursuit possiblement dans l'espace périplasmique, de sorte que les mannoprotéines qui atteignent la membrane plasmique sont typiquement hyperglycosylées. Ces protéines constituent une des composantes majeures de la paroi, représentant 30 à 50 % de son poids sec. En accord avec leurs fonctions, les mannoprotéines peuvent être classées arbitrairement en deux groupes principaux : 1) les mannoprotéines de structure qui forment des composantes intégrales de la paroi cellulaire, et 2) les enzymes localisées dans la paroi ou dans l'espace périplasmique ayant soit un rôle trophique, soit un rôle morphologique ou simplement en attente de procédé de sécrétion. Aussi, certaines mannoprotéines connues sont des enzymes hydrolytiques localisées dans l'espace périplasmique.

Les mannoprotéines de structure sont de larges molécules, dont 95% de la masse est composée de carbohydrates, pouvant être extraites de la paroi de cellules intactes sans troubler leur forme. À première vue, ces mannoprotéines peuvent paraître comme étant du matériel de remplissage empêtré dans le réseau de  $\beta$ -glucans. Pourtant, ces protéines jouent un rôle

fondamental dans le processus de biosynthèse de la paroi, servant d'antenne, acceptant et guidant les différentes chaînes glucidiques le long de la voie de sécrétion. La glycosylation de ces protéines est bien établie et l'ajout des chaînes glucidiques à la structure protéique est médié par deux processus connus sous le nom de *N*-glycosylation et *O*-glycosylation. Il est difficile de séparer les mannoprotéines car la plupart d'entre elles migrent de façon diffuse sur gel d'électrophorèse dû à la présence de chaînes *N*-glycosylées hypermannosylées. L'utilisation d'outils comme la tunicamycine, un inhibiteur de la *N*-glycosylation, ou d'une endoglycosidase spécifique peut être très utile. Les mannoprotéines de la paroi (*cell wall proteins* : CWP) suivent la voie de sécrétion et sont, d'une façon ou d'une autre, piégées dans l'espace périplasmique ou incorporées à la matrice de  $\beta$ -glucans. Plusieurs CWP, mais pas toutes, subissent un autre processus de glycosylation, plus récemment découvert, via l'attachement d'une ancre glycosylphosphoinositol (GPI) en C-terminale de la protéine.

L'ancre GPI constitue un mécanisme par lequel plusieurs CWP sont attachées à la surface de la cellule. Elle joue un rôle clef dans l'incorporation d'un nombre important de mannoprotéines à la paroi. L' $\alpha$ -agglutinine et Gas1 sont deux exemples de mannoprotéines dont le rôle de l'ancre GPI fut étudié en détail (Cid *et al.*, 1995 ; Ram *et al.*, 1998a). La matrice de l'ancre GPI consiste en un résidu d'éthanolamine-phosphate-(mannose)<sub>3</sub>-glucosamine-inositol attaché à un phospholipide de la membrane. Le transfert du glycolipide s'effectue dans le RE. L'ancre est attachée à la protéine par l'extrémité non réduite de la chaîne glucidique et peut être coupée par une phospholipase C spécifique. Toutes les protéines ancrées par un GPI ont un signal hydrophobique en C-terminale qui est coupé par une transaminase C-terminale puis remplacé par l'ancre GPI.

Deux classes de mannoprotéines liées de façon covalente à la paroi sont connues, les GPI-CWP et celles avec des répétitions internes les Pir-CWP (*protein with internal repeats* : Pir). Les GPI-CWP sont des protéines généralement riches en Ser/Thr et contenant une région hydrophobique en C-terminale. Quant à elles, les Pir-CWP possèdent dans leurs séquences un ou plusieurs motifs répétés et un site potentiel de reconnaissance pour l'endoprotéase Kex2. Elles ne contiennent cependant pas de séquence C-terminale pour l'ajout du GPI. Les Pir-CWP semblent être liées directement aux molécules de  $\beta$ -1,3-glucan sans interconnexion avec les motifs des  $\beta$ -1,6-glucans, cette caractéristique permet de les extraire de la paroi par une douce alcalyse (Kapteyn *et al.*, 1999b). Contrairement au complexe structural GPI-CWP $\rightarrow\beta$ -1,6-glucan $\rightarrow\beta$ -1,3-glucan, lequel a été intensivement étudié, le complexe Pir-CWP $\rightarrow\beta$ -1,3-glucan vient tout juste d'être défini (Smits *et al.*, 1999). Cependant, comme soulevé par Vossen *et Coll* (1997), plusieurs mannoprotéines, incluant Gas1, possédant une ancre GPI, se trouvent dans la membrane. Ces protéines ont la particularité de posséder un motif dibasique près du résidu liant le GPI. L'abolition de ce motif conduit à l'incorporation de ces protéines à la paroi

suggérant que, par défaut, la destination des protéines GPI est la paroi cellulaire, et que celles destinées à la membrane plasmique nécessitent des informations supplémentaires pour leur ciblage, incluant un motif dibasique près de leur extrémité C-terminale (Kapteyn *et al.*, 1999a).

Suivant une approche génomique, l'existence d'approximativement 40 GPI-CWP différentes a été prédite chez la levure. Par la suite, ceci a été confirmé expérimentalement (Hamada *et al.*, 1998). Bien qu'il a été démontré que les CWP, collectivement, limitent la perméabilité de la paroi, la fonction individuelle de la plupart des CWP reste un mystère. Certaines sont clairement impliquées dans l'adhésion cellule-cellule comme Flo1, Flo5, Flo9 et Flo10 ainsi que les agglutinines sexuelles Aga1, Aga2 et Sag1. Flo11 représente un cas spécial. Originellement découverte comme étant une autre floculine, elle apparaît être nécessaire pour envahir les milieux solides (agar) et possiblement pour l'émergence des pseudohyphes lors de la réponse à une privation en azote. Cela indique que Flo11 peut jouer un rôle dans la morphologie de la cellule. Une autre GPI-CWP, Fig2, semble aussi affecter la morphologie. Lors de l'accouplement de cellules  $\alpha$  et  $\alpha$  délétées pour ce gène, il y a formation d'étroites projections d'accouplement (shmoo) avec des ponts de fusion interférant avec la fusion et la migration nucléaire. Finalement, Egt2, qui est aussi une GPI-CWP, semble être nécessaire pour la ségrégation cellulaire (Smith *et al.*, 1999).

### **1.1.2. Assemblage et remodelage de la paroi**

L'internalisation et l'assemblage des composantes de la paroi cellulaire, à l'intérieur de cette organelle supramoléculaire à morphologie spécifique, s'effectuent vraisemblablement selon une grande variété d'interactions d'ordre enzymatique, chimique et physique très complexes dont la nature n'est pas encore élucidée. Le mécanisme proposé le plus probable pour l'incorporation du nouveau matériel de la paroi aux structures préexistantes veut que l'expansion de la paroi implique un processus continu de synthèse et de dégradation. Ainsi, les nouveaux éléments sont incorporés à des sites de croissance où les liens de la paroi récemment formés sont sectionnés. Cette notion d'une croissance dynamique de la paroi, en équilibre entre l'activité de type lytique et ligase, reçoit de plus en plus d'appui. Toutefois, une autre hypothèse soutient que la nouvelle paroi prendrait initialement forme à l'intérieur de celle existante et serait incorporée à celle-ci une fois qu'une brèche serait formée, comme au moment de l'émergence du bourgeon, permettant de lier le nouveau matériel. Dans ce cas, il est impératif que l'ancienne paroi soit affaiblie par certains processus hydrolytiques afin de permettre l'émergence de la nouvelle paroi. Quel que soit le mécanisme, il apparaît clair, qu'à un moment ou à un autre, une rupture hautement localisée survient dans la paroi existante (Cid *et al.*, 1995). Conséquemment, un bon nombre d'enzymes hydrolytiques ont été rapportées être associées à l'enveloppe de la levure, incluant des chitinases, des glucanases et des endoprotéases.

### 1.1.2.1. Enzymes majeures impliquées

#### 1.1.2.1.1. Chitinases et chitine synthétases

Comme décrit plus tôt, la chitine constitue une composante mineure de la paroi. Bien que sa déposition est localisée spécifiquement dans la région du septum, elle est importante pour la stabilité mécanique de cette jonction temporaire entre la cellule mère et la cellule fille. La dégradation de ce septum continu semble impératif pour permettre à la cellule fille de devenir indépendante. Toutefois, contrairement à la présence de nombreuses glucanases (voir section 1.1.2.1.2), une seule endochitinase, qui hydrolyse aussi bien la chitine insoluble que des substrats analogues solubles, a jusqu'à présent été identifiée chez *S. cerevisiae* (Cid *et al.*, 1995). Elle correspond au produit du gène *CST1* dont l'analyse révèle une protéine de 562 aa séparés en quatre domaines distincts : un peptide signal, un domaine catalytique, une région riche en Ser/Thr et un domaine C-terminal avec une haute affinité pour la chitine.

Bien que la majorité de l'activité chitinase produite par la levure soit retrouvée principalement dans le milieu (90%), la plupart de l'activité chitinase associée à la cellule demeure séquestrée à l'intérieur de la paroi (60%) (Cid *et al.*, 1995). Les résultats suggèrent que la région de liaison à la chitine localise l'enzyme dans la paroi cellulaire principalement aux endroits où les fibres de chitine lient la cellule mère et la cellule fille.

L'étude de la synthèse des chitines chez la levure a permis l'identification de trois enzymes impliquées dans ce processus. Elles correspondent aux produits des gènes *CHS1*, *CHS2* et *CHS3*, et des rôles bien spécifiques sont attribués à chacune de ces trois chitines synthétases. *Chs3* est responsable de la chitine incorporée dans la paroi cellulaire et de la synthèse de l'anneau de chitine qui forme la base pour l'émergence du bourgeon. *Chs2* catalyse quant à elle la formation du disque de chitine qui constitue la portion centrale du septum primaire. Finalement, *Chs1* semble jouer un rôle de réparation contrecarrant l'action excessive d'une chitinase (Ford *et al.*, 1996). La reconnaissance que trois chitines synthétases possèdent différentes fonctions conduit inévitablement à la conclusion que la levure doit être capable de réguler leurs fonctions individuellement. Les chitines synthétases sont présentes dans la cellule sous une forme latente ou zymogène qui peut être convertie en une forme active par une protéolyse partielle. *Chs3* semblait être une exception à la règle générale mais il a été démontré, que sous des conditions appropriées, *Chs3* peut également être retrouvé sous une forme zymogène. Ces découvertes suggèrent un mécanisme de régulation post-traductionnelle. Ainsi, lorsque la fonction d'une chitine synthétase est requise, la conversion d'un zymogène donne place à une forme active. Cette conversion ne survient pas nécessairement par

protéolyse qui pourrait être une voie artificielle afin d'obtenir une forme active de l'enzyme. Dans les faits, les évidences pour Chs3 indiquent que le produit du gène *CHS4* agirait comme un activateur non protéolytique. Toutefois, nous n'avons aucune connaissance quant aux mécanismes moléculaires de son activation et on ignore quels sont les domaines structuraux de la protéine qui participent à la régulation ou à l'activité catalytique. Un autre gène, *CHS5*, a été identifié et la protéine correspondante serait impliquée dans la localisation intracellulaire de Chs3 (Cos *et al.*, 1998).

### 1.1.2.1.2. Glucanases

Deux grandes classes d'activité  $\beta$ -1,3-glucanase sont retrouvées chez la levure, soit les activités exoglucanases et les activités endoglucanases. L'activité  $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase compte pour la majeure partie de l'activité glucanase chez la levure. Elle catalyse l'hydrolyse des liens  $\beta$ -O-glycosyliques à l'extrémité non-réduite des chaînes de polymères, libérant ainsi du glucose. Ces enzymes ne sont pas particulièrement spécifiques, elles agissent également sur les liens des  $\beta$ -1,6-glucans mais avec une efficacité moindre. L'activité  $\text{endo-}\beta$ -1,3-glucanase attaque quant à elle les liens au point intermédiaire des chaînes de polymère, relâchant un mélange d'oligosaccharides avec du glucose en faible quantité. On a longtemps crû que l'essentiel de l'activité glucanase ( $\text{exo-}$  et  $\text{endo-}$ ) de la levure durant sa croissance végétative se limitait à trois glycoprotéines synthétisées de façon constitutive, initialement sécrétées dans l'espace périplasmique, ces enzymes sont éventuellement relâchées dans le milieu de culture où elles s'accumulent (Cid *et al.*, 1995). L'enzyme majeure retrouvée dans le milieu est l' $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase Exg Ib qui hydrolyse aussi bien les liens  $\beta$ -1,3 que les liens  $\beta$ -1,6 (ces derniers à un degré moindre. Cette enzyme possède également une activité  $\beta$ -glucosidase. Une autre enzyme est l' $\text{exo-}\beta$ -glucanase Exg Ia, également non-spécifique, qui possède un domaine structural identique à Exo Ib. Finalement, une  $\text{endo-}\beta$ -1,3-glucanase de haut poids moléculaire est aussi présente mais en quantité plus faible. Le cycle méiotique conduit, quant à lui, à l'induction d'un autre type d' $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase qui n'est pas présent durant la croissance végétative des cellules. L'analyse de la séquence des  $\text{exo-}$ glucanases révèle une structure en C-terminal caractéristique des polypeptides attachés à la membrane par un GPI. De plus, Exg Ia et Exg Ib sont initialement produites sous une forme contenant une extension de 40 aa en N-terminal délimitée par une paire d'aa basiques. Ceci laisse croire qu'elles pourraient être synthétisées sous des formes inactives nécessitant un événement de maturation protéolytique pour les activer.

Les connaissances actuelles suggèrent que le système de glucanases chez la levure est plus complexe et appuient l'existence de formes mineures, présentes en très faible quantité. Ces dernières demeureraient associées à la paroi cellulaire plutôt que d'être relâchées dans le

milieu (Cid *et al.*, 1995). Fait intéressant, ces enzymes associées à la paroi sont largement répandues et conservées chez les levures, particulièrement chez *Candida albicans*.

En contre-partie, il y a vraisemblablement aussi des enzymes responsables de faire les liens entre les glucans de la paroi. Le meilleur candidat identifié jusqu'ici pour le soudage des glucans est Gas1, une protéine retrouvée dans le périplasme et ancrée à la membrane par un groupement GPI. Sa fonction est nécessaire pour l'expansion et l'assemblage des polymères de la paroi durant la croissance de *S. cerevisiae*. Quatre homologues de Gas1 (Gas2, 3, 4 et 5) ont été identifiés par similarité de séquence chez la levure. Des homologues de Gas1 ont également été retrouvés chez d'autres levures, principalement celles à caractère mycéliale comme *Candida albicans* (Popolo et Vai, 1999).

### **1.1.2.1.3. Endoprotéases**

La preuve étant faite que plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse ou le remodelage de la paroi sont produites sous formes inactives, ou nécessitent une régulation négative une fois leur travail effectué, il est simple d'imaginer que cette régulation ponctuelle puisse s'effectuer via l'activité d'enzymes protéolytiques. Des endoprotéases pourraient intervenir à des moments précis et mûrir des enzymes hydrolytiques afin de réguler leur activité et/ou leur relâche dans le milieu ceci afin d'inhiber leur activité à la paroi. À cet égard, il est intéressant de noter qu'une famille d'endoprotéases appartenant à la classe des aspartyl protéases a récemment été identifiée chez la levure. Ces enzymes, collectivement appelées « yapsine » sont localisées dans l'espace périplasmique où elles sont maintenues par un groupement GPI. Yapsine 1, produit du gène *YPS1* de levure, est la plus étudiée d'entre elles et constitue l'archétype de cette famille. Les enzymes Yps2/Mkc7 et Yps3 ont fait l'objet de quelques études alors que Yps4, 5 et 6 ne sont, pour l'instant, que des cadres de lecture ouverts révélés par le séquençage du génome. Yps1, 2 et 3 possèdent une spécificité pour la maturation de précurseur protéique à des résidus basiques. L'implication et la caractérisation de ces endoprotéases sont discutées plus en détail à la section consacrée à l'endoprotéase Yps1.

### **1.1.2.2. Régulation de la paroi**

La division végétative des cellules de levure se produit de façon caractéristique par bourgeonnement, où la cellule fille apparaît comme une excroissance à la surface de la cellule mère. Il s'ensuit une division nucléaire, formation de paroi et, finalement, il y a séparation des cellules. La taille des cellules haploïdes et diploïdes varie en fonction de la phase du cycle cellulaire. La composition ainsi que la structure de la paroi sont étroitement régulées en fonction de son stade de développement et en réponse à une multitude de conditions

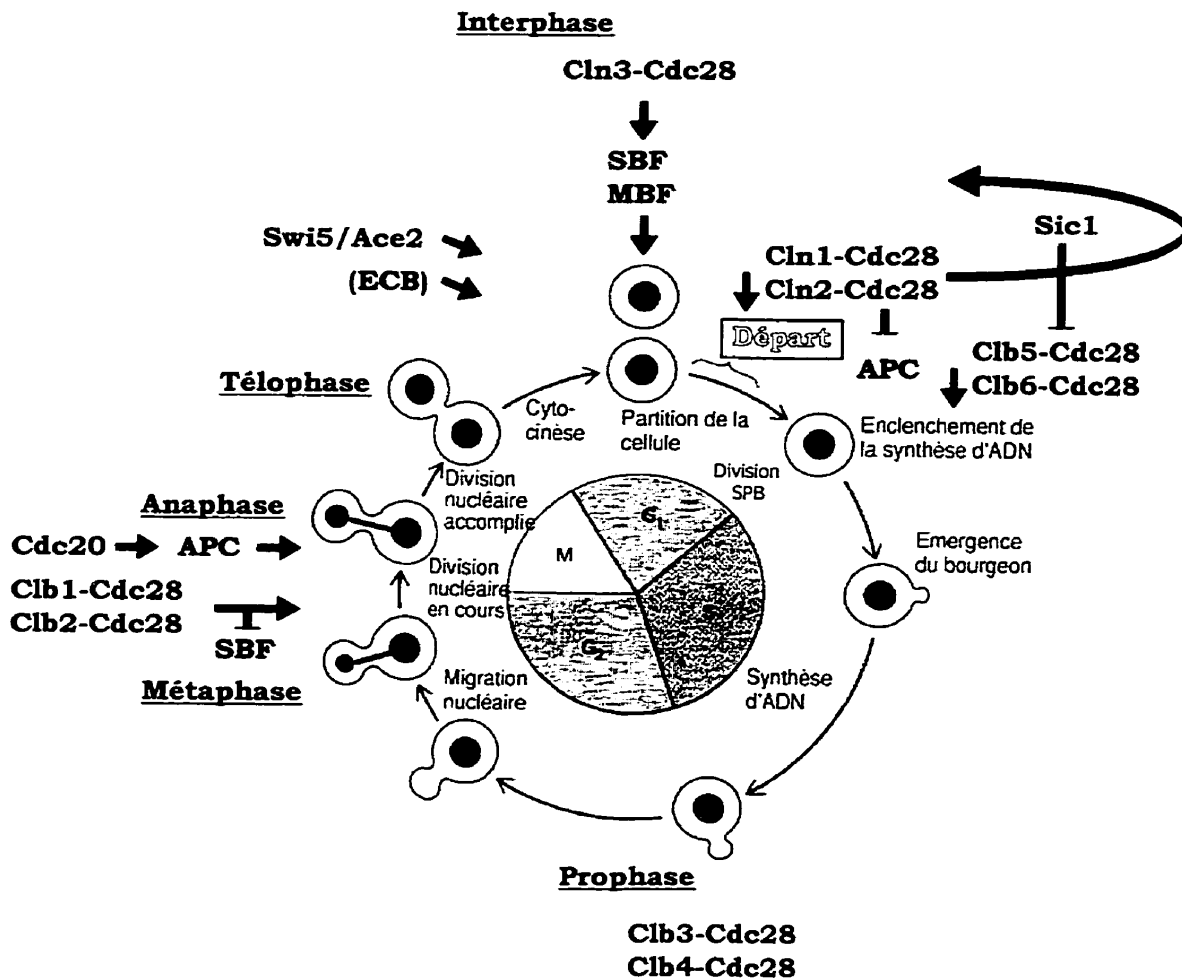
environnementales. Il apparaît de plus en plus évident que des voies de signalisation d'urgence pour la survie de la cellule sont structurées avec celles impliquées dans l'organisation de la paroi, permettant à la cellule de compenser pour différentes formes de dommages.

### 1.1.2.2.1. Dans le cycle cellulaire

La régulation de la division cellulaire est un processus très complexe qui s'opère essentiellement sur deux niveaux : la transcription et la protéolyse. On mettra ici l'emphase principalement sur la régulation transcriptionnelle. L'une des protéines jouant un rôle majeur dans le cycle cellulaire est la protéine kinase codée par le gène *CDC28*. L'activité de cette kinase, qui est conservée chez tous les eucaryotes, est modulée par de nombreux régulateurs, incluant une famille de petites protéines appelées cyclines. La protéine Cdc28 sert à intégrer et réguler la transcription de gènes spécifiques à la progression dans le cycle cellulaire. Les régulateurs qui activent et inhibent Cdc28 sont eux-mêmes produits par des vagues transcriptionnelles successives pour être ensuite rapidement dégradés par protéolyse. On reconnaît quatre vagues de transcription spécifique dans le cycle de division cellulaire affectant l'activité de Cdc28 (Mendenhall et Hodge, 1998). De loin la plus étudiée est celle de l'activation transcriptionnelle au point de départ (« START »). Elle conduit à la synthèse des cyclines Cln1, Cln2, Clb5 et Clb6, puis à la transition  $G_1/S$ . Aussi, la vague survenant à la transition  $M/G_1$ , conduisant à la synthèse de Cln3, Cdc6, Sic1 et Far1, reçoit de plus en plus d'attention. Les vagues survenant en S et en  $G_2$  du cycle de division cellulaire sont moins bien étudiées. La Figure 2 donne un aperçu des gènes exprimés de façon cyclique et ayant un rôle à jouer dans le contrôle du cycle cellulaire. Les produits synthétisés à chaque vague transcriptionnelle sont généralement responsables, plus ou moins directement, de la vague transcriptionnelle suivante. Le Tableau I donne un aperçu des facteurs de transcription important pour la synthèse des régulateurs influençant le déroulement du cycle cellulaire. Ces mêmes facteurs de transcription sont également impliqués dans la régulation de la transcription de plusieurs de gènes de paroi.

L'expression d'approximativement 13% des gènes de *Saccharomyces cerevisiae* est régulée en fonction du cycle cellulaire (Spellman *et al.*, 1998). Ceci inclut plus de la moitié des gènes codant pour des CWP (22 sur 43), dont *PIR1*, le gène le plus strictement régulé dans le cycle cellulaire chez la levure. Bien que des gènes codant spécifiquement pour des CWP sont exprimés de façon cyclique à toutes les phase du cycle cellulaire, la plupart sont induits à la fin de la phase M ou au début de  $G_1$  (transition  $M/G_1$ , Tableau II), soit respectivement au moment où la cellule fille se sépare de la cellule mère, et que le bourgeon débute sa croissance isotropique (Smits *et al.*, 1999). Finalement, conséquemment à leur expression étroitement





**Figure 2. Aperçu de la régulation des événements du cycle de division cellulaire de la levure.** L'image ci-haut nous montre la levure à différents stades de son cycle de division cellulaire. La division cellulaire de la levure s'effectue par bourgeonnement. Un cycle complet est parcouru environ en 90 min en milieu riche et environ en 140 min en milieu synthétique. Les gènes majeurs impliqués dans le contrôle du cycle de division cellulaire, en influençant la transcription des gènes de façon cyclique, de même que leur site d'action sont illustrés dans le schéma ci-contre. Notons le lien étroit qui unit la morphologie de la cellule au cycle cellulaire. G<sub>1</sub> : période de préparation, S : duplication des chromosomes, G<sub>2</sub> : période de préparation pour la mitose (division cellulaire), M : division et migration nucléaire, division cellulaire. (Darnell *et al.*, 1993 ; Mendenhall et Hodge, 1998). Activation : ➔ ; inhibition : ⊥ ; APC : *anaphase promoting complexe*; SBF : *SCB binding factor*; SCB : *Swi4-Swi6-dependent cell cycle box*; MBF : *MCB binding factor*; MCB : *MluI cell cycle box*; ECB : *early cell cycle box*; SPB : *spindle pole body*, corps du fuseau polaire.

**Tableau I.** Facteurs de transcription importants pour l'expression des régulateurs du cycle de division cellulaire.

<b>Facteur de transcription</b>	<b>Élément d'ADN reconnu</b>	<b>Motif de reconnaissance*</b>
<b>SBF</b>	<b>SCB</b>	<b>mrCGAAA</b>
<b>MBF</b>	<b>MCB</b>	<b>ACGCGT</b>
<b>Xbp1 Mcm1</b>	<b>MCE</b>	<b>GcCTGArGmgr dCCywwwnnrG</b>
<b>Mcm1 SFF</b>	<b>ECB SFRE</b>	<b>TTwCCcnwnAGGAAA AnGTmAACAA</b>
<b>Swi5, Ace2</b>		<b>tGCTGGT</b>
<b>Ste12</b>	<b>PRE</b>	<b>ATGAAACA</b>

\* : m représente C ou A, n n'importe quel base, r représente A ou G, y représente T ou C, les lettres en minuscules indiquent que le nucléotide n'est pas un élément clef dans la reconnaissance du motif. (Mendenhall et Hodge, 1998).

**Tableau II.** Survol des gènes codant pour des CWP dont les niveaux d'expression varient dans le cycle cellulaire.

<b>Cycle Cellulaire</b>	<b>Gènes régulés</b>
G1	<i>PRY3, YGR189c, YNL300w</i>
G2	<i>CIS3, CWPI, CWP2, TIR1</i>
M	<i>SED1, YIP1, YOR383c</i>
M/G1	<i>AGA1, AGA2, EGT2, HSP150, PIR1, PIR3, SAG1, TIP1, TIR5, UTR2, YER150c, YHR126c, YLR194c</i>

(Smits *et al.*, 1999)

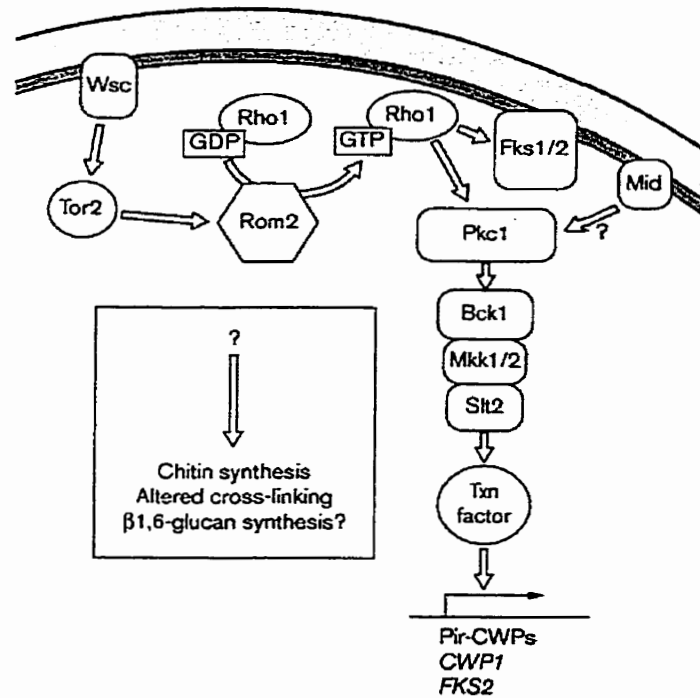
régulée dans le cycle cellulaire, certaines CWP sont connues pour être exportées dans des régions bien spécifiques de la paroi cellulaire.

#### **1.1.2.2.2. Par les conditions du milieu**

Il y a une accumulation d'évidences qui laisse croire que l'affaiblissement de la paroi cellulaire mène à l'activation d'une voie de survie chez la levure, conduisant à des changements compensatoire de la paroi. Smits et ses collègues (1999) proposent de l'appeler la voie d'intégrité de la paroi cellulaire (« cell wall integrity pathway »). L'existence d'une telle voie pourrait expliquer pourquoi tant de mutants de paroi cellulaire montrent une hypersensibilité à la caféine. La caféine active la protéine kinase A, laquelle réprime plusieurs réponses à différents stress. Par conséquent, les cellules mutantes pourraient être hypersensibles à la caféine par ce qu'elles dépendent de la voie d'intégrité de la paroi cellulaire pour leur survie.

La détection de l'affaiblissement de la paroi, passant probablement par la tension de la membrane plasmique, semble impliquer les protéines membranaires de la famille Wsc et Mid (Smits *et al.*, 1999; Ketela *et al.*, 1999). La croyance veut que le signal passe ensuite par Rho1, une petite protéine liant le GTP, via Tor2, une phosphatidylinositol-4 kinase, et le facteur d'échange Rom2 (Bickle *et al.*, 1998). Rho1 module l'activité de la voie de PKC de même que l'activité de la  $\beta$ -1,3-glucan synthétase (Fks1/2) conduisant à une augmentation de la synthèse de glucan et de chitine (Kapteyn *et al.*, 1997; Ram *et al.*, 1998b; Dallies *et al.*, 1998). Une branche de la voie de PKC conduit à l'activation d'une cascade de kinase composée de Bck1, Mkk1/2 et Mpk1(Slt2) (Figure 3). La délétion de l'une ou l'autre de ces kinases conduit à une lyse cellulaire lorsque les cellules sont cultivées en condition douce de stress thermique (37 à 39°C). L'augmentation de la température induit notamment une forte activation de Mpk1 (Kamada *et al.*; 1995). Les liens entre les glucans et les protéines sont altérés puis, il y a augmentation de l'expression de certaines CWP et de Pir-CWP (*CWP1*, *HSP150/PIR2*, *TIP1* et *TIR2*) (Kapteyn *et al.*; 1999b, 1997; Ram *et al.*, 1998b).

Fks1 et Fks2 sont deux sous-unités alternatives du complexe de la glucan synthétase responsable de la synthèse des  $\beta$ -1,3-glucans (Mazure *et al.*, 1995). La présence de l'une ou l'autre de ces deux sous-unités est suffisante pour maintenir l'activité glucan synthétase essentielle à la viabilité cellulaire. La GTPase Rho1, quant à elle, est la sous-unité régulatrice du complexe, servant à stimuler la synthèse de  $\beta$ -1,3-glucan d'une façon GTP dépendante (Qadota *et al.*, 1996). Les gènes *FKS1* et *FKS2* diffèrent d'abord par la manière dont est contrôlée leur expression. Dans des conditions optimales de croissance, *FKS1* est le gène principalement exprimé, et ses niveaux d'ARN messager fluctuent périodiquement dans le cycle cellulaire



Current Opinion in Microbiology

**Figure 3. Modèle de la voie d'intégrité de la paroi cellulaire.** Voici le modèle proposé par Smits et ses collègues (1999) quant à la voie de signalisation pour l'intégrité de la paroi cellulaire chez *S. cerevisiae*.

(Mazure *et al.*, 1995). L'expression de *FKS2* est faible en condition optimale de croissance, mais son expression est induite en réponse aux traitements par les phéromones d'accouplement, le  $\text{CaCl}_2$ , ou lors de croissance en présence de faibles sources de carbone ou encore en absence de *Fks1* fonctionnel. La voie qui induit l'expression de *FKS2* par les phéromones, le  $\text{CaCl}_2$  ou chez un mutant *fks1* requière la protéine calcineurine phosphatase  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline-dépendante (PP2B) (Cyert et Thorner, 1992). Un double mutant de sous-unité B régulatrice de la calcineurine (*cnb1*) et de *fks1* est non viable dû à une déficience dans l'expression de *FKS2* (Garrett-Engle *et al.*, 1995). La calcineurine et la voie d'intégrité de la paroi fonctionnent en parallèle dans l'activation de *FKS2* au moyen d'éléments dissociables dans le promoteur (Zhao *et al.*, 1998). Ceci implique le facteur de transcription *Crz1* lors de la réponse au  $\text{CaCl}_2$  via l'élément CDRE (*calcineurine-dependent response element*) du promoteur de *FKS2* (Stathopoulos et Cyert, 1997).

Lorsque les levures haploïdes perçoivent la phéromone du type sexuel opposé, elles arrêtent leur croissance en  $G_1$  du cycle cellulaire et forment des « shmoos ». La densité d'agglutinine sexuelle dans la paroi des « shmoos » augmente dramatiquement. De plus, l'expression de *FIG2*, une GPI-CWP putative, est régulée à la hausse. Aussi, plus de chitine est déposée dans la paroi des « shmoos ». Ces observations indiquent clairement que la paroi des « shmoos » diffère de la paroi normale. Le Tableau III présente différents gènes qui sont régulés selon les conditions de croissance.

Les cellules cultivées en "batch" consomment rapidement le glucose par fermentation, de ce fait il y a production d'éthanol. Subséquemment, elles empruntent la chaîne respiratoire et utilisent l'éthanol avant d'entrer en phase stationnaire. Le niveau de transcription de certains gènes de CWP change lorsque les cellules optent pour la respiration ou entrent en phase stationnaire. Par exemple, *Sed1*, une GPI-CWP, devient une CWP majeure chez les cellules en phase stationnaire. La croissance utilisant la fermentation peut aussi conduire à l'hypoxie ce qui entraîne l'induction de d'autres gènes CWP (Smits *et al.*, 1999).

Lorsque les cellules diploïdes sont privées d'azote, elles modifient leur croissance pour former des pseudohyphes. Ce phénomène est accompagné d'une augmentation de l'expression de *FLO11* (Lo *et al.*, 1998; Rupp *et al.*, 1999) et, possiblement, de *HSP150/PIR2* (Russo *et al.*; 1993). Il n'est toutefois pas clair si plus de CWP sont préférentiellement utilisées par la cellule durant la croissance des pseudohyphes. Sans source de carbone acceptable et de source d'azote, les cellules activent le programme de sporulation. Il s'ensuit une augmentation ou une diminution de l'expression d'une variété de gènes de CWP (Chu *et al.*, 1998)(Tableau III).

**Tableau III.** Survol des gènes codant pour des CWP dont les niveaux d'expression varient sous différentes conditions de croissance.

<b>Signal</b>	<b>Gènes régulés</b>
<b>Phéromone</b>	<i>AGA1, CWP1, FIG2, SAG1</i>
<b>Source de carbone</b>	<i>CIS3, CWP1, EGT2, FLO1, FLO5, FLO9, SED1, SUN4, TIP1, TIR1, TIR6, UTR2, YER150w, YOR383c</i>
<b>Azote</b>	<i>FLO11, HSP150</i>
<b>Sporulation</b>	<i>AGA2, BARI, CIS3, CWP1, CWP2, EGT2, FIG2, FLO11, HSP150, PIR1, PIR3, SED1, TIP1, TIR2, TIR5, UTR2, YDR134c, YER150w, YGR189c, YIB1, YLR110c, YLR194c, YOL155c, YOR214c, YOR382w, YOR383c</i>
<b>Stress</b>	
Paroi endommagée	<i>CIS3, CWP1, HSP150, PIR3, SED1, SSR1</i>
Température	<i>HSP150, TIP1, TIR1, TIR2</i>
Hypoxia	<i>DAN1, TIP1, TIR1</i>
Aluminium	<i>SED1, HSP150</i>

(Smits *et al.*, 1999)

## 1.2. L'endoprotéase Yps1

### 1.2.1. Découverte du gène *YPS1*

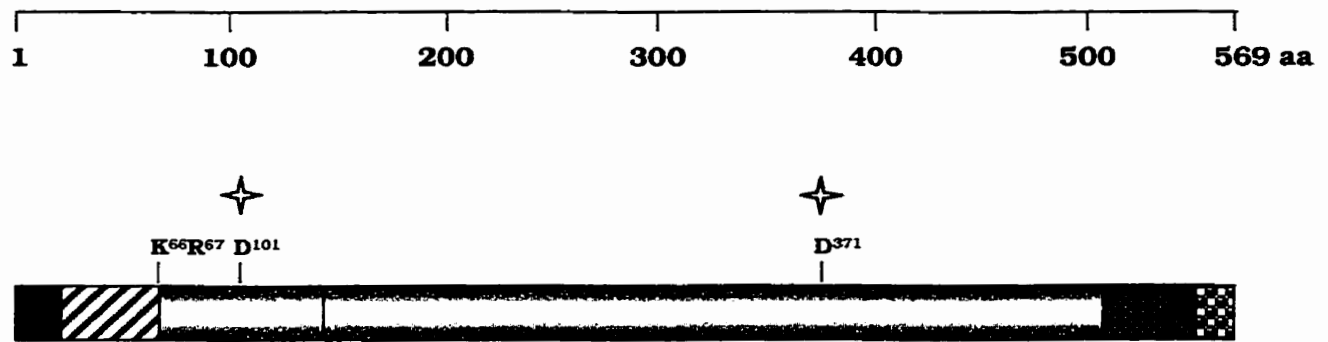
Le gène *YPS1* fut initialement cloné pour son habileté à permettre, en absence de l'endoprotéase *kex2*, la sécrétion chez *Saccharomyces cerevisiae* de facteur sexuel  $\alpha$  biologiquement actif (Egel-Mitani *et al.*, 1990). La phéromone d'accouplement  $\alpha$  de levure est synthétisée sous la forme d'une préproprotéine à partir de laquelle la phéromone active est relâchée par une suite d'événements de maturation dont la première étape, catalysée par *Kex2*, est une endoprotéolyse spécifique à des sites dibasiques (KR). Chez une souche déficiente pour le gène *kex2*, la surexpression du gène *YPS1* permet l'activation du facteur sexuel  $\alpha$  (Egel-Mitani *et al.*, 1990). Un autre groupe de chercheurs clona *YPS1* pour son habileté à corriger un mutant de levure déficient dans l'expression de la somatostatine-28 (mutant *sex*) (Bourbonnais *et al.*, 1993). La somatostatine-28 est également synthétisée sous la forme d'un précurseur plus grand et requiert une maturation protéolytique à un site de clivage monobasique (R). Une délétion du gène *yps1* affectant plus sévèrement le clivage de la prosomatostatine au site monobasique (>90%) que l'absence de *kex2* (~10%), ces études ont permis de mettre en évidence que les deux endoprotéases, bien que reconnaissant des sites de clivage similaires, possèdent une spécificité qui leur est propre.

### 1.2.2. L'endoprotéase Yps1 est membre de la famille des aspartyl protéases

#### 1.2.2.1. Structure de l'endoprotéase Yps1

L'analyse structurale du gène *YPS1* nous révèle une protéine de 569 aa pouvant être séparée en cinq domaines (Figure 4) (Ash *et al.*, 1995). En plus du domaine catalytique où l'on retrouve les résidus aspartates typiques des enzymes de la famille des aspartyl protéases, nous retrouvons un peptide signal de 21 aa en N-terminale de la protéine qui la cible à la voie de sécrétion. Ce domaine est suivi d'un segment de 46 aa borné en C-terminale d'une paire d'aa basique (K<sup>66</sup>R<sup>67</sup>) qui suggère que l'enzyme pourrait être synthétisée sous la forme d'un zymogène. Le domaine catalytique pour sa part est suivi d'une région de 43 résidus riches en Ser/Thr, constituant possiblement un site pour l'addition de chaînes glucidiques O-liées. Finalement, la séquence de l'endoprotéase se termine avec un domaine hydrophobique de 19 aa impliqué dans l'ajout d'un groupement GPI servant à ancrer la protéine aux membranes (voir





**Figure 4. Représentation schématique des composantes structurales de yapsine 1.**

Le gène *YPS1* de levure code pour une protéine de 569 aa qui peut être séparée en 5 domaines. Il y a le domaine catalytique (□) qui porte les deux résidus acide aspartique catalytiques (★ : D<sup>101</sup> et D<sup>371</sup>), il y a un segment hydrophobique de 21 aa en N-terminale (■) qui sert de peptide signal. Ce domaine est suivi d'une région de 46 aa (▨) servant de pro-peptide, cette région est bornée à l'extrémité COOH par une paire d'aa basiques (K<sup>66</sup>R<sup>67</sup>). Le domaine catalytique est suivi pour sa part d'une région de 43 a.a. riche en Ser/Thr (▩). Finalement, l'endoprotéase se termine avec une région hydrophobique de 19 aa (▧) servant de signal pour l'ajout d'une ancre GPI qui fixe et cible la protéine à la membrane plasmique (Ash *et al.*, 1995).

section 1.2.5). L'analyse de la séquence révèle dix sites potentiels de *N*-glycosylation dont huit se trouvent dans le domaine catalytique.

### 1.2.2.2. Similarité de séquence avec les aspartyl protéases

L'endoprotéase Yps1 présente une similarité de séquence avec de nombreuses aspartyl protéases de la sous-classe des pepsines (voir ci-contre) et plus particulièrement avec le produit des gènes de levure *PEP4* et *BAR1*. Pour cette raison, *YPS1* avait d'abord été nommée *YAP3* (*yeast aspartyl protéase 3*) puisqu'elle constituait alors le troisième membre de la famille des aspartyl protéases identifiées chez la levure (Egel-Mitani *et al.*, 1990). La plus forte similarité de séquence est observée entre Yps1 et Bar1, et se retrouve dans les domaines catalytiques, l'extrémité C-terminale étant moins conservée (Figure 5). Ce domaine C-terminal s'est avéré ne pas influencer l'activité catalytique de la protéase Bar1. Les cystéines sont également toutes conservées. On observe aussi chez Yps1 une grande région située entre les deux résidus catalytiques et ne comportant aucune homologie avec les autres aspartyl protéases. Cette région semble représenter une boucle qui fut insérée dans le gène au cours de son évolution.

Les endopeptidases dépendant directement des résidus acides aspartiques pour leur activité catalytique représentent, de loin, la classe de peptidases avec la plus simple sous classification. Seules trois familles sont connues. Les données cristallographiques disponibles montrent qu'au moins deux d'entre elles sont distinctement reliées. Les deux familles connues pour être apparentées sont celles de la pepsine (A1) et de la rétropepsine (A2). Les enzymes de pararétrovirus, comme celles du virus de la mosaïque du chou-fleur, forment la famille A3. Elles présentent des similitudes avec les rétropepsines, et sont provisoirement classées dans le clan des aspartyl protéases. Tous les membres connus des aspartyl protéases sont des endopeptidases (Rawling et Barrett, 1995).

Dans le clan des aspartyl protéases, le résidu catalytique Asp est rencontré avec le motif Asp-Xaa-Gly, dans lequel Xaa peut être une Ser ou une Thr. La présence de ce motif dans une protéine a souvent été pris comme une évidence que cette protéine était une aspartyl peptidase, mais cette déduction est plutôt hâtive. Le résidu Asp dans la triade catalytique des sérines peptidases de la famille des subtilisines se présente selon le même motif, et il est également retrouvé chez plusieurs protéines qui ne sont pas des peptidases.

Les membres de la famille pepsine n'ont été retrouvés que chez des eucaryotes. La famille inclut des enzymes du système digestif animal, comme la pepsine et la chymosine, des enzymes lysosomales comme la cathepsine D, et des enzymes impliquées dans la maturation post-traductionnelle comme la rénine et les yapsines. Plusieurs enzymes de cette famille

```

Pepsinogène 1 ---MKWLLLLSLVVLSEVVKPLVRKKSRLRQNLKPKGLKDFLKTHKLN-----
Pep4 1 MFSLKALLPLALLLVSANQVAAKVHKPKYKHELSDEMKEVTFQHALLGQKYLTOFEK
Yps1 1 ----MKLKTFRSAVLSSFASQVLGKPAANKRDDSNSEFVKPFKLYG---DSLE
Bar1 1 -----S---NHLKLLASFNNTITATGTGLLEFQ-----

Pepsinogène 48 -----PASKYFPEAAALIGDEPLENYLDTEFGIGADFI SNLPSV
Pep4 61 ANPEVVFREHPFFTEGGHDVPLTNYLNAQYDITL PNEKIL SNLPSN
Yps1 53 NVGSDKKPEVRLKLRADGYEEIITNQQSF SVD E V P N V V S L I G
Bar1 41 -----EEMY-----S-----F-----

-S-
Pepsinogène 103 ---SS-----
Pep4 121 ---EGS-----
Yps1 113 D Y SS MG RRRVIDKRDDSSSGSLINDINPFGWLTGTGSAIGPTATGLGGSGT
Bar1 75 S L P N T YSN-----

-S-
Pepsinogène 107 -----L A SDHNQF PDD FEAT-SQELS GT -SMT ILL YD QVG
Pep4 125 -----L A FLH K DHEA S KAN-GTEA Q GT -SLE VISQD L GDL
Yps1 173 QSVPAEAM QQYG PSTSG PRSN-TY S S G S F D V D L S D L
Bar1 91 YNGEEVKP RSM EHR YLE GR Y N

Pepsinogène 154 SDT QI LSETEPG-SFLYY PFDGILGLAYP--SIS S ATPVD ---WDQGLWS
Pep4 172 T KOD AE TSEPG-LTFAP KFDGILGLGYD--TISVDKVVPPFY ---AIQDLL
Yps1 232 NVTGLS A NETNS-TM L EL VTYSGSTASHSKAYK D I V NSGAK
Bar1 151 Q KYAT P F RR SVKG---YE -PNEY P Q S K

Pepsinogène 207 QDLF VY S N---DSGSVILG S Y Y T S N W V W S-----VEYWQI LD
Pep4 225 EKRFAY GDTSKDTENG EAT G K ITWL VR-----RK YWEVKE
Yps1 291 SNT Y DS---AMH T L V H Y T T Y I I TLSASGFSS LQFDV N
Bar1 207 VVA P---GT F I -EYP IVD TLA

Pepsinogène 255 SITMDG----ETIACSGGCAIV T T T T S A I A I N I Q S D I E A S E N S D E M V I S
Pep4 276 I LG---D YAELESHGAAI T ITL -SGLAE INA E I G A K K G W T Q T
Yps1 348 I ISD SG-SSNK L I A T T Y L Q T V V S M I T E U G Q S R I Y V
Bar1 263 AQ KSSCEH F Y V N K V A D K F N E E I

Pepsinogène 310 SSIDSLPDI V TINGW YPSP AY Q---DDDS TSSEFGMDVPTSSGELWI I
Pep4 329 NTRDNLPLDI N NGYNEFTIGPYDYT E---VSGS IS IT MDFPEPVGLAIV A
Yps1 407 SDD-SM IV GEH NA F ---T TT LLG I L S DTG---TI S
Bar1 323 VSVGD YN D L PET Y GF SMV-----

Pepsinogène 367 RQY T R A N V G PVA-----
Pep4 386 RKY SIY G N A V G K I I-----
Yps1 459 TN Y E L E M R V T T S E N I E I T S S V P S A V K--A P S Y T N T S A S I V T G G
Bar1 377 S Y Y N A E V S K K N I Q T D G S G A K I T A E P N E P F T V T S

Yps1 517 N F T V N S S Q T A S S G N L T T A S T S T S S K V G D H I V P S L P L L T L L F A F I-----
Bar1 437 STGCKRPLQSSA L I E N V Q S C S T P G R S T K P T Q N S A M H Q S T G

Bar1 497 AVTQTSNETKLELSSTMANSGSVSLPTSNSIDKEFEHKSQTTSDPSVAEHSTFNQTFVH

Bar1 557 ETKYRPTHKTVITETVTKYSTVLINVCKPTY

```

**Figure 5. Alignement de la séquence du produit des gènes PEP4, BARI et YPS1 de *Saccharomyces cerevisiae* avec la séquence du pepsinogène A humain.** Les résidus hautement conservés sont placés sur fond noir et ceux partiellement conservés sont ombragés. Les résidus aspartates catalytiques sont identifiés par une étoile et les cystéines par un S. On observe la présence d'une insertion (Boucle) dans Yps1. L'alignement fut effectué avec ClustralW sur le serveur du « Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine ».

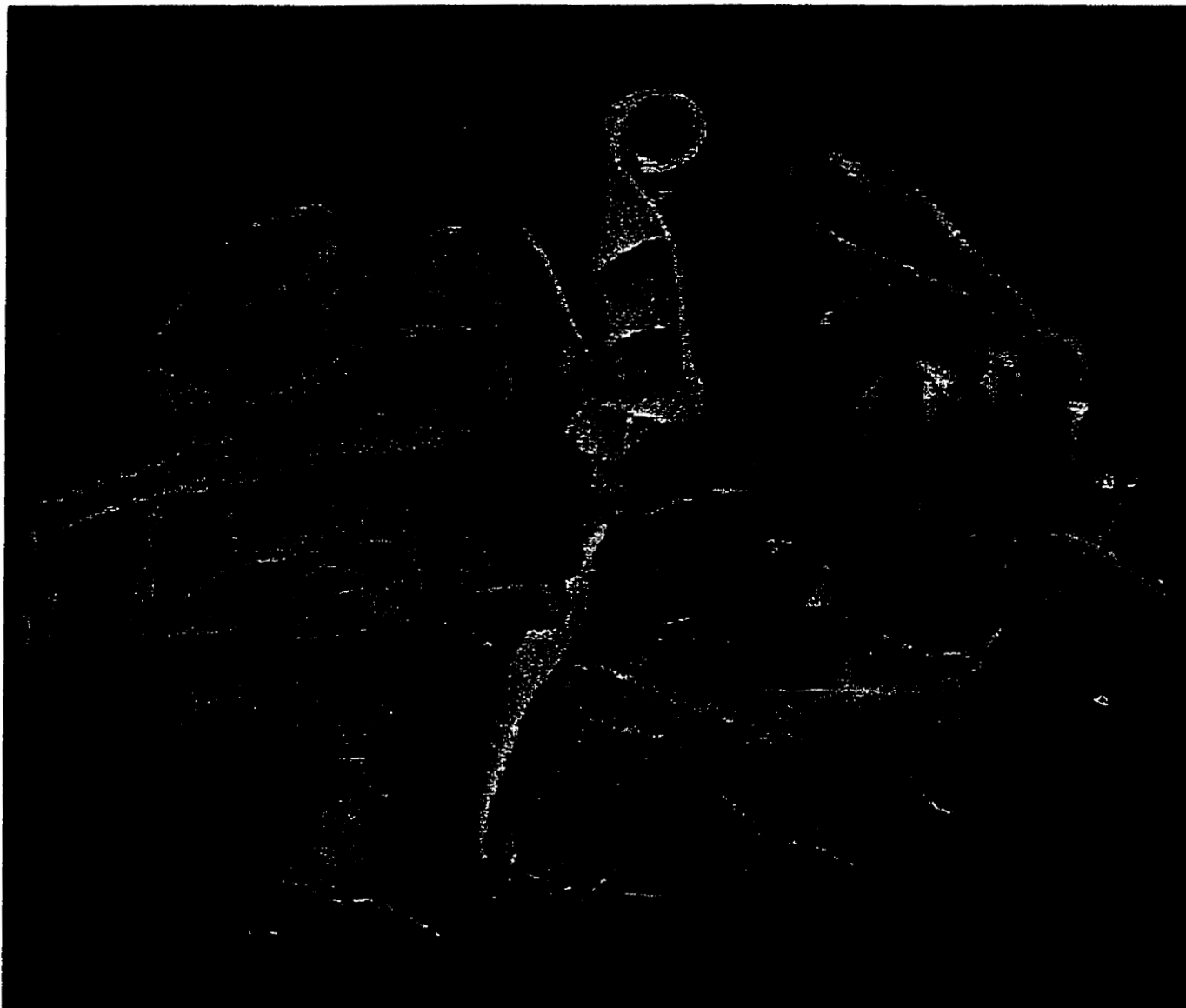
empruntent la voie de sécrétion, ces dernières étant synthétisées avec un peptide signal et un propeptide. De façon non usuelle, la barrieropepsine (Bar1) de levure possède une longue extension C-terminale. Il y a aussi des exemples chez les protozoaires (e.g. *Eimeria*, *Plasmodium*), chez les champignons/moisissures et chez une plante.

Les endopeptidases reliées à la pepsine ont une activité maximale à pH acide mais cette caractéristique n'est pas, à elle seule, une indication de lien avec la pepsine car plusieurs endopeptidases, sans relation avec celle-ci, ont aussi une activité maximale à pH acide. Les membres du clan des aspartyl protéases sont tous plus ou moins inhibés par la pepstatine selon un mécanisme qui est connu pour être similaire au moins chez les familles A1 et A2 (Rawling et Barrett, 1995). Des inhibiteurs agissant de façon covalente avec la pepsine comme le diazoacétylnorleucine méthyl ester (DANLME), le 1,2-époxy-3-(*p*-nitrophénoxy)propane (EPNP), et le *p*-brophénacyl bromide, sont aussi utilisés comme réactifs pour diagnostiquer les aspartyl endopeptidases.

### **1.2.2.3. Mécanisme d'activation des aspartyl protéases**

Les études cristallographiques ont montré que les enzymes de la famille des pepsines présentent une structure bilobée avec une fente constituant le site actif. Seul un court hexapeptide les connecte et chaque lobe contribue à situer un des deux acides aspartiques responsables de l'activité catalytique. Les lobes sont homologues l'un à l'autre, semblant provenir d'une duplication génétique, en dépit d'une très faible similarité de séquence (Figure 6). Par ailleurs, la rétropepsine présente seulement un lobe portant un seul résidu aspartique. Ainsi, son activité nécessite la formation non covalente d'un homodimère. Il semble clair que l'enzyme ancestrale a évolué par duplication du gène suivi d'une fusion.

Chez presque tous les membres de la famille pepsine, les résidus Asp catalytiques sont contenus dans un motif Asp-Thr-Gly-Xaa pour chacun des lobes de l'enzyme (Rawling et Barrett, 1995). Avec quelques exceptions, Xaa est une serine ou une thréonine dont la chaîne latérale peut former un pont hydrogène avec le résidu Asp catalytique. On remarque également une certaine conservation de résidus cystéines. Chez la pepsine, il y a trois boucles fermées par des ponts disulfures, une suivant le premier Asp catalytique (Asp-32, nomenclature basée sur la pepsine A mature de porc), une précédant le second (Asp-215), et une près du C-terminale de la protéine. La première boucle est présente chez tous les membres de la famille exceptée quelques enzymes de moisissure. Elle est généralement petite, contenant seulement cinq résidus pour la plupart, sauf chez la candidapepsine (*C. albicans*) et la barrieropepsine (*S. cerevisiae*). La seconde boucle est constituée communément de cinq à six résidus et est



**Figure 6. Représentation de la structure tertiaire du pepsinogène A de porc.** Sa structure est similaire à celle du pepsinogène A humain. Les deux lobes, représentés en vert et en bleu, sont disposés de chaque côté du site actif, dont les aspartates catalytiques (Asp<sup>32</sup> et Asp<sup>215</sup>) sont colorés en rouge, tandis que le prosegment, en jaune, traverse verticalement la fente bloquant le site actif (Richter *et al.*, 1998).

retrouvée seulement chez les enzymes d'espèces animales. La troisième boucle, et la plus grande formée par un pont disulfure, est conservée chez tous les membres de la famille pepsine exceptée la polyporopepsine. Le mécanisme par lequel le propeptide de 44 aa du pepsinogène inactive la proenzyme a pu être élucidé à partir de la structure cristallographique du pepsinogène (Figure 6). Dans le précurseur, les 11 premiers résidus de la pepsine mature sont déplacés par les résidus du propeptide, dans un feuillet  $\beta$  à six brins. Le propeptide contient deux hélices qui bloquent l'accès au site actif, et le résidu conservé Asp-11 forme un pont hydrogène avec une Arg conservée du propeptide. Ceci stabilise la conformation du propeptide et c'est probablement pourquoi la conversion du pepsinogène en pepsine s'effectue en condition acide. Finalement, deux résidus tyrosine bloquent les sites de liaison S1 et S1' (Rawling et Barrett, 1995). Le mécanisme d'activation des autres membres de la famille pepsine n'est pas élucidé pour tous. Mentionnons cependant que la plupart des enzymes de cette famille sont initialement synthétisées sous une forme zymogène.

### 1.2.3. Spécificité de clivage de Yps1

La pepsine montre une spécificité pour la coupure de liens peptidiques à des résidus hydrophobes de peptides avec au moins six résidus. La structure cristallographique a fourni quelques détails sur les bases de la spécificité de l'activité catalytique. Les sites de liaison prennent place dans une fente située à la jonction des deux lobes, où une boucle de sept résidus projetés au travers de la fente forme un lasso qui entraîne substrats et inhibiteurs au site actif de l'enzyme. Les sites responsables de la spécificité sont formés par des résidus hydrophobes entourant les résidus Asp catalytiques ainsi que trois résidus de la boucle, Tyr-75, Gly-76 et Asp-77. Certaines aspartyl endoprotéases de moisissures ont la capacité d'activer le trypsinogène en coupant un lien Lys+Ile, montrant une affinité pour le côté anionique de la lysine en S1. Chez une enzyme, la penicillopepsine, Asp-77 a été identifié comme le site de liaison anionique. Ce résidu est conservé chez tous les membres capables d'activer le trypsinogène. Il est remplacé par une thréonine ou une serine chez les autres (pepsine A, mucorpepsine, chymosine, renine). Chez la levure, Yps1 requiert pour sa part des aa basiques en S1 et S1' et définit donc une nouvelle sous classe de la famille. Yps1 a conservé Asp-77, et la spécificité pour un résidu basique en S1' doit être médiée par un résidu Asp qui correspond à des résidus non chargés chez la penicillopepsine et la pepsine, donc devrait être le résidu responsable de la spécificité pour des aa basiques en S1' (Asp-448 de la préproyapsine 1).

Plusieurs études de la spécificité de Yps1 ont été réalisées avec différents précurseurs hormonaux des cellules animales, dont la pro-opiomelanocortine (Azaryan *et al.*, 1993) et la pro-somatostatine (Bourbonnais *et al.*, 1994) de même qu'avec plusieurs peptides de synthèse (Ledgerwood *et al.*, 1996). Il en ressort que Yps1 peut aussi bien couper à des sites dibasiques

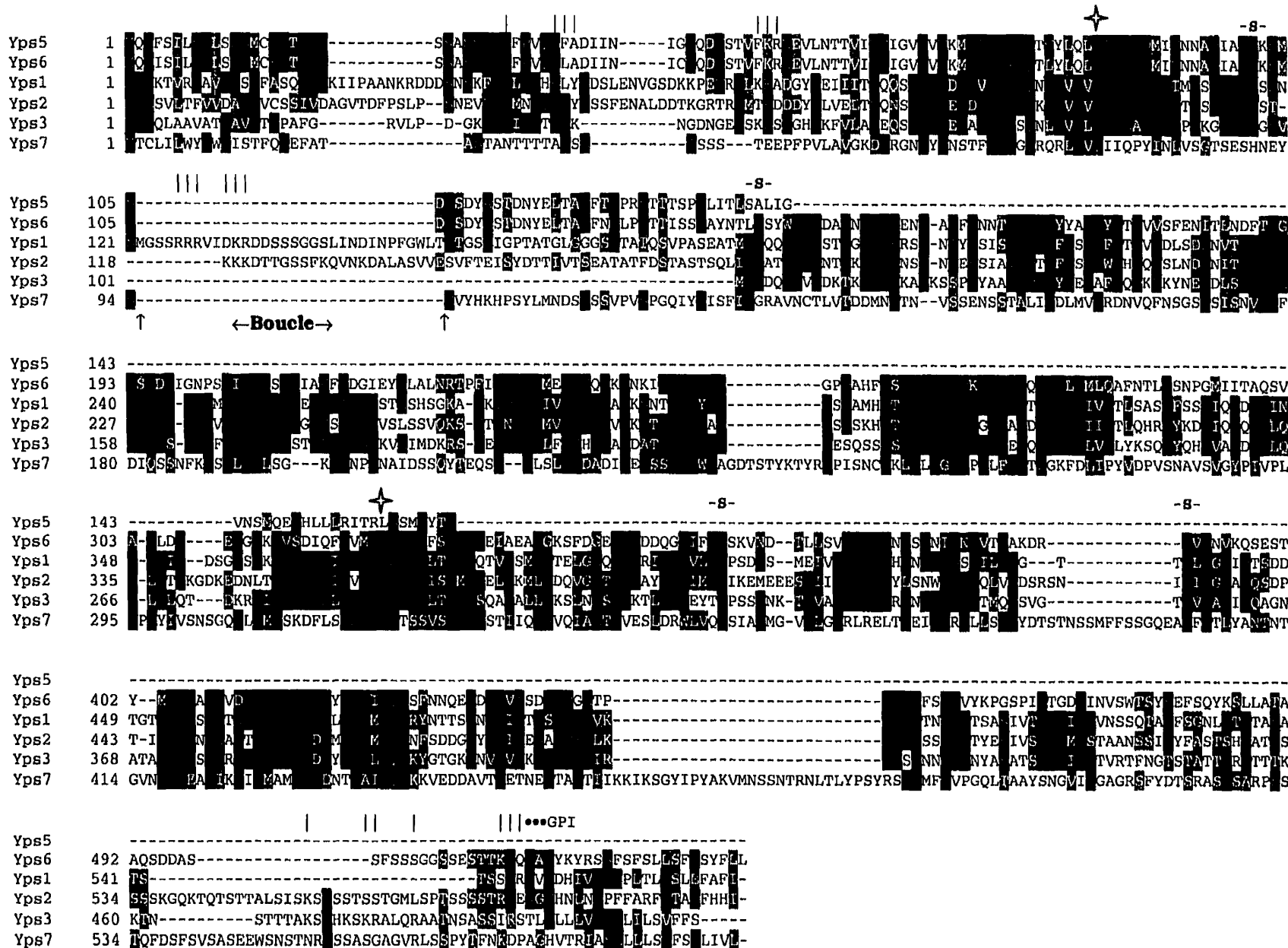
(KR, RK, RR) que monobasiques (R ou K). Toutefois, Yps1 montre une nette préférence pour les substrats ayant des résidus basiques additionnels (un ou plusieurs) près des sites de maturation, notamment aux positions -6 et +2 des sites de clivage dibasiques. L'enzyme purifiée serait extrêmement stable, pouvant être entreposée dans un tampon neutre à -20°C pour au moins 10 mois ou sous une forme lyophilisée pour une plus longue période (Loh et Cawley, 1995).

#### 1.2.4. Homologues de Yps1 chez la levure

Une fois de plus, le mutant *kex2*Δ fut impliqué dans l'identification d'une nouvelle aspartyl protéase, homologue à Yps1, Yps2/Mkc7 (Komano et Fuller, 1995). Yps2/Mkc7, pour « *multicopy suppressor of *kex2*Δ cold sensitivity* », s'avère plus efficace que son prédécesseur pour la correction de la sensibilité du mutant *kex2*Δ à croître à des températures extrêmes pour la levure. Cependant, Yps1 parvient également à corriger le phénotype. Alors que la délétion de l'une ou l'autre des aspartyl protéases ne montre aucun effet sur la croissance des cellules, la délétion des deux entraîne une diminution de la vitesse de croissance à 37°C et empêche la formation de colonie à 39°C. La combinaison d'une délétion de *kex2* avec celle des deux aspartyl protéases résulte en de profonds défauts de croissance à 37°C. Aussi, l'effet des mutations fonctionne de façon synergique sur la croissance à 16°C. Une délétion de *kex2* jumelée à celle de l'une ou l'autre des protéases confère un défaut de croissance seulement en milieu riche, alors que le triple mutant montre, quant à lui, un défaut de croissance sur milieu riche et synthétique. Les phénotypes synthétiques résultant de la combinaison des trois mutations suggèrent que ces enzymes jouent un rôle important dans la croissance normale de la levure. L'ensemble de ces résultats illustre par ailleurs le fait que certains substrats sont communs aux trois enzymes alors que d'autres sont préférentiellement activés par l'une ou l'autre.

Finalement, une autre aspartyl protéase de levure fut récemment caractérisée, elle fut nommée yapsine 3 à cause de sa forte homologie avec Yps1 et Yps2/Mkc7 (Olsen *et al.*, 1999). Les essais de maturation de différentes hormones avec Yps3 purifiée révèlent une spécificité distincte de celle d'Yps1. Lorsqu'on aligne la séquence de *YPS1* avec celle du génome de la levure on peut identifier trois autres homologues potentiels nommés *YPS5*, *YPS6* et *YPS7* .

En alignant la séquence protéique des yapsines de levure on peut observer la présence de régions conservées et d'autres distinctes. On peut distinguer que le site putatif de maturation KR<sup>66-67</sup> d'Yps1 semble conservé chez les autres membres de la famille excepté Yps7 (Figure 7). Chez Yps1 et Yps2, on retrouve une boucle située entre les deux résidus aspartate qui composent le domaine catalytique. Le rôle de cette boucle est inconnu mais on remarque la



**Figure 7. Alignement de la séquence du produit des gènes YPS de *Saccharomyces cerevisiae*.** Les résidus hautement conservés sont placés sur fond noir et ceux partiellement conservés sont ombragés. Les résidus basiques représentant des sites potentiels de maturation sont identifiés par un trait (|). Les deux aspartates catalytiques sont identifiés par une étoile, les résidus cystéines sont identifiés par un S et les résidus putatifs liant le GPI (N ou G) sont identifiés par un point (•). On peut observer une insertion (boucle) présente seulement chez Yps1 et Yps2. L'alignement fut effectué avec ClustalW sur le serveur « Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine ».



présence de sites potentiels pour la maturation. Yps7, pour sa part, expose trois régions n'ayant aucune homologie de séquence avec les autres Yps, ressemblant à des insertions. Lorsqu'on examine l'extrémité C-terminale de ces endoprotéases, elles semblent toutes posséder une région hydrophobique, servant de signal pour l'ajout du GPI, précédée de résidus basiques (KR<sup>546,547</sup> pour Yps1) pouvant être impliqués dans le ciblage, et peut-être dans le clivage, de ces enzymes dans l'espace périplasmique (voir section suivante).

### **1.2.5. Localisation cellulaire de Yps1**

Yps1 est une mannoprotéine ancrée par un groupement GPI qui la fixe aux membranes et la dirige à l'espace périplasmique, tel que supporté par les études de fractionnement cellulaire par Ash et ses collaborateurs (1995). Deux observations additionnelles supportent cette localisation cellulaire. D'abord, Yps1 est une protéine hyperglycosylée et, comme nous l'avons vu précédemment, cette modification est typique des protéines ayant atteint l'espace périplasmique quelque soit leur destination finale (*i.e.* périplasme, paroi ou milieu de culture). Par ailleurs, Komano *et Coll.* (1998) ont montré que la maturation du précurseur peptidique  $\beta$ -amyloïque (APP) par Yps1 et Yps2 s'effectue principalement à la surface de la cellule. Tout comme Gas1 et Exg2, Yps1 et certains de ses homologues sont caractérisées par des résidus basiques près du site d'ajout du GPI (Figure 8) ce qui préviendrait leur incorporation dans la paroi (voir section 1.1.1.3.). Étrangement, on observe qu'Yps1 s'accumule avec le temps dans le milieu de culture. En principe, il y aurait deux façons de libérer Yps1 dans le milieu : soit par l'abolition de l'ancre GPI soit par un clivage endoprotéolytique en amont du GPI. Les résidus basiques identifiés en C-terminale pourraient constituer des sites potentiels de maturation endoprotéolytique pour Yps1 ou d'autres endoprotéases impliquées dans le relargage d'enzymes de l'espace périplasmique.

Yps1 : TTSTASATSTSS**KRN**  
Yps2 : GMLSPTSSSSP**RKEN**  
Yps6 : SSSGGSSSESTT**KKQN**  
Gas1 : SSSSSASSSSSS**KKN**  
Exg2 : SSVLSSTTT**SKSKN**  
Krel : VGVIKSAI**KKTVSHN**  
Plb1 : SASASASGSSTH**KKN**  
Sps2 : KNGAKSQGSS**KKMEN**

**Figure 8. Identification de sites potentiels de maturation dibasiques chez des glycoprotéines ancrées par un GPI à la membrane plasmique.** Le dernier résidu constitue le site putatif d'ajout de l'ancre GPI. Le motif dibasique, ici identifié en gras, serait un motif potentiellement impliqué dans le ciblage et, peut-être, dans le clivage de certaines glycoprotéines localisées dans l'espace périplasmique (Vossen *et al.*, 1997).

### 1.3. Hypothèses et objectifs de la recherche

Yps1 est la plus étudiée d'une nouvelle famille de six aspartyl protéases retrouvées chez la levure. Son rôle, ainsi que ses substrats biologiques, n'ont toujours pas été déterminés mais plusieurs indices nous laissent croire que Yps1 jouerait un rôle dans la régulation des propriétés de la paroi. D'abord, elle est localisée dans l'espace périplasmique (Ash *et al.*, 1995) où la majorité de son activité a été détectée (Komano *et al.*, 1998). Par ailleurs, des mutants perturbés dans le contrôle de l'assemblage de la paroi, présentant une paroi plus poreuse, montrent également une maturation Yps1 dépendante réduite (Bourbonnais *et al.*, 1993). De plus, un double mutant *yps1Δ* et *yps2Δ* montre de profonds défauts de croissance à haute température pour la levure et la surexpression de l'une ou l'autre atténue la sensibilité au froid de mutant *kex2Δ*, laissant croire que les yapsines pourraient jouer un rôle en condition de stress (Komano et Fuller, 1995). Notre hypothèse est que Yps1 pourrait être impliquée dans l'activation ou l'inactivation d'enzymes responsables de modifier les propriétés de la paroi.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons fait l'analyse de la régulation transcriptionnelle du gène *YPS1*. La paroi de la levure est un organe dont la synthèse est étroitement régulée dans le cycle cellulaire afin de permettre au bourgeon, qui formera la nouvelle cellule, de se développer au rythme des composantes intracellulaires. De plus, puisqu'elle constitue l'enveloppe protectrice de la cellule, c'est un organe qui est appelé à s'adapter rapidement en réponse aux stress environnementaux. Donc si *YPS1* a un rôle à jouer dans la régulation des propriétés de la paroi, son expression devrait refléter celle de gènes connus pour être impliqués dans la synthèse des composantes de la paroi.

Une autre facette de notre étude concerne l'activation de l'endoprotéase Yps1. Comme la plupart des endoprotéases, Yps1 pourrait être synthétisée sous la forme d'un zymogène nécessitant un ou plusieurs événements de maturation protéolytique pour être activé. L'activation du zymogène constitue une forme de régulation. Quand et comment est activé le zymogène peut nous permettre de mieux saisir où l'activité de la protéase est nécessaire. L'identification du ou des enzymes impliquées dans l'activation du zymogène est également essentielle pour élucider les mécanismes qui régulent son activité. Nous avons donc entrepris d'étudier la biosynthèse de Yps1 et de mesurer l'activité enzymatique de la protéine sauvage, de même que celle d'une série de mutants susceptibles de modifier sa maturation et/ou son activité catalytique.

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1. Les micro-organismes

##### 2.1.1. Les souches

###### 2.1.1.1. Bactéries

Les souches bactériennes utilisées au cours de mes recherches sont MC1061 (*hsdR mcrB araD 139Δ(ara ABC -Leu) 7669Δ lacX 74 galK rspl thi*; Sambrook *et al.*, 1989) et CJ236 (*dut ungl thi-1 rel1 A1/ pCJ05(camrF)*; Sambrook *et al.*, 1989).

###### 2.1.1.2. Levures

Les souches de levure utilisées au cours de mes recherches sont décrites dans le Tableau IV.

###### 2.1.1.3. Bactériophage

*Phage helper* M13K07 (ATCC 37468) : utilisé pour la production de plasmide sous forme simple brin, le "*helper phage*" M13K07 est une version du phage M13 dont la copie du gène 2 est mutée et qui possède une origine de répliation dérivée du plasmide p15a ainsi qu'un gène de résistance à la kanamycine dérivé du transposon Tn 903.

##### 2.1.2. La culture

Tous les milieux utilisés pour la culture des micro-organismes doivent être stériles, la stérilité des milieux est assurée par 15 min d'incubation à l'autoclave à 121°C et 15 lb de pression. Les contenants avec plus de 1 litre de milieu peuvent nécessiter une incubation de plus longue durée.

**Tableau IV.** Souches de *S. cerevisiae* utilisées dans le cadre de ce travail

<b>Souche</b>	<b>Génotype</b>	<b>Source ou référence</b>
W303-1B	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2 leu2 his3 trp1 ura3</i>	ATCC 208353
DS7	<i>MAT<math>\alpha</math> mfa1/<math>\alpha</math>2::LEU2 ade2 leu2 his3 trp1 ura3</i>	Bourbonnais <i>et al.</i> (1993)
YBAD1	<i>MAT<math>\alpha</math> yps1::HIS3 mfa1/<math>\alpha</math>2::LEU2 ade2 leu2 his3 trp1 ura3</i>	Bourbonnais <i>et al.</i> (1993)
YBAD8	<i>MAT<math>\alpha</math> kex2::LEU2 yps1::HIS3 ade2 leu2 his3 trp1 ura3</i>	Bourbonnais, Y.
K2944-1B	<i>MAT<math>\alpha</math> sst1::LEU2 cdc15-2 ade2 leu2 his3 trp1 ura3</i>	Oehlen <i>et Cross.</i> (1994)
AWM4	<i>MAT<math>\alpha</math> sst1</i>	Whiteway <i>et al.</i> (1988)
M200-6C	<i>MAT<math>\alpha</math> sst1 sst2 ade2 ilv1 ura3</i>	Whiteway <i>et al.</i> (1988)
his1 a	<i>MAT<math>\alpha</math> his1</i>	Whiteway <i>et al.</i> (1988)
1783	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 trp1 his4 can1</i>	Lee <i>et al.</i> (1993)
DL456-3B	<i>MAT<math>\alpha</math> mpk1::TRP1 ura3 leu2 trp1 his4 can1</i>	Lee <i>et al.</i> (1993)
YPH499	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 lys2 ade2 leu2 trp1 his3</i>	Sikorski <i>et Hieter.</i> (1989)
MCY3-1D	<i>MAT<math>\alpha</math> crb1::LEU2 ura3 lys2 ade2 leu2 trp1 his3</i>	Stathopoulos <i>et Cyert.</i> (1997)
ASY472	<i>MAT<math>\alpha</math> crz1::KAN ura3 lys2 ade2 leu2 trp1 his3</i>	Stathopoulos <i>et Cyert.</i> (1997)

### 2.1.2.1. Bactéries

Le milieu utilisé pour la culture des bactéries est le 2YT (1,6% Bacto-tryptone (Difco), 1% Bacto-yeast extract (Difco), 0,05% NaCl (BDH), 0,02% D-glucose (BDH)). Les milieux solides ont en supplément 1,5% Bacto-agar (Difco).

### 2.1.2.2. Levures

Le milieu YPD (1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone (Difco), 2% D-glucose est le milieu riche utilisé pour la croissance non sélective des levures. Les milieux solides sont préparés avec l'ajout de 2% Bacto-agar.

Le milieu SC (0,67% Bacto yeast nitrogen base without amino acid (Difco), 2% D-glucose, "drop-out") est le milieu sélectif utilisé pour la croissance des levures portant un ou plusieurs plasmides avec des gènes de correction auxotrophique. Lorsqu'il n'y a pas de "drop-out" d'ajouté on le nomme SD. Le "drop-out" est constitué d'un fin mélange de plusieurs acides aminés mais où il manque l'acide aminé associé au gène de sélection. La quantité à ajouter au milieu varie selon sa composition en a.a. tel que décrit dans *Methods in yeast genetics* (Kaiser et al., 1989).

Le milieu SC-URA\_PO<sub>4</sub> est le milieu sélectif utilisé pour la production de l'endoprotéase Yps1 recombinante flanquée de six histidines. C'est un milieu SC élaboré avec un tampon phosphate 0,1 M pH 6.0 (87,7% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M , 12,3% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M) pour prévenir l'acidification du milieu durant la croissance et ainsi conserver l'activité de l'endoprotéase.

Le milieu SC-URA\_16°C est un milieu élaboré pour mettre en évidence les défauts de croissance à basse température des mutants *kex2* en milieu synthétique (Komano et Fuller, 1995). Sa composition est semblable au milieu SC mais (i) 1% de proline remplace le (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> comme source d'azote, (ii) le KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> est à 1,0 mM, (iii) le MgSO<sub>4</sub> est à 0,5 mM et (iv) le pH est ajusté à 6,5 avec 50 mM de tampon MES.

### 2.1.3. Synchronisation d'une culture de levure par le facteur $\alpha$

Le protocole de synchronisation des levures est dérivé de la méthode décrite par Price et ses collègues (1991). Incuber à 25°C avec agitation vigoureuse une culture de 300 ml de milieu YPD dont la D.O. à 600 nm est ajustée à 0,5 à l'aide d'une préculture de la souche d'intérêt (K2944-1B). Pour permettre une bonne aération, utiliser une flasque où la culture occupe

environ 1/5 du volume. Lorsque la culture atteint une D.O. à 600 nm de 1,0, ajouter 100 ng/ml de phéromone  $\alpha$  (Sigma) puis poursuivre l'incubation pour une période de 2 h 30. Une fois l'arrêt de croissance induite par la phéromone, filtrer la culture à l'aide d'un appareil de filtration sous vide (Millipore) et d'un filtre 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius) tous deux stérilisés. Une fois la culture filtrée, rincer avec un volume égal de milieu YPD à 25°C et poursuivre la filtration. Les cellules ainsi que le filtre sont ensuite déposés dans un volume égal au volume de départ de milieu YPD à 25°C dont 1/10 du milieu est remplacé par le surnageant d'une culture de 16 h de la souche parentale (W303-1B). À partir de ce moment, les cellules reprennent leur croissance de façon synchronisée dans le cycle cellulaire pour une durée d'environ deux cycles.

#### **2.1.4. Protocole de stress de levure**

Incuber 3h à 25°C avec agitation vigoureuse une culture en milieu YPD dont la D.O. à 600 nm est ajustée à 0,75 avec une préculture de la souche d'intérêt. Pour permettre une bonne aération, utiliser une flasque où la culture occupe environ 1/5 du volume. On procède alors à l'un des stress suivant : a) 2 h à 37°C; b) 2h à 25°C en présence de 0,005% SDS; c) 20 min à 25°C en présence de 30 mM  $\text{CaCl}_2$ ; d) reprendre les cellules dans un milieu YPD 1M NaCl et incuber 4 h à 25°C ou; e) reprendre les cellules dans milieu YPD 0.05% glucose (plutôt que 2%) et incuber 2 h à 25°C.

#### **2.1.5. Transformation**

##### **2.1.5.1. Bactéries**

Mélanger délicatement dans un microtube stérile : 130  $\mu\text{l}$  de cellules compétentes, 70  $\mu\text{l}$  de TCM (Tris HCl 100 mM pH 7,4,  $\text{CaCl}_2$  100 mM,  $\text{MgCl}_2$  100 mM) et la quantité désirée du plasmide qu'on veut introduire dans la bactérie. Incuber le tout 30 min sur glace. Ensuite, effectuer un choc thermique à 42°C d'une durée de 2 min et remettre le tube sur la glace 1 min. Ajouter 1 ml de 2YT et incuber 30 min à 37°C. Finalement, centrifuger 15 sec dans une microcentrifugeuse à vitesse maximale. Après décantation du milieu, remettre les cellules en suspension dans le volume restant (~200  $\mu\text{l}$ ) et étaler le culot de cellules sur un milieu sélectif. Incuber 16-18h à 37°C.

##### **2.1.5.2. Levures**

Pour chaque transformation, centrifuger, dans un microtube stérile, 1 ml d'une culture dense de la souche à transformer. On peut facilement obtenir une culture dense en incubant à

30°C 3 ml de milieu YPD inoculé avec une colonie de la souche d'intérêt pour une durée de 16 h sous bonne agitation (~200 rpm). Décanter le surnageant en conservant le culot et 50-100 µl de liquide. Ajouter 2 µl d'ADN de sperme de saumon dénaturé à 10 mg/ml et ~1 µg du ou des plasmides à introduire puis mélanger au vortex. Ajouter 0,5 ml de "PLATE mixture" (40% PEG 4000, Acétate de Lithium 100 mM, Tris HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM) et mélanger au vortex. Finalement ajouter 20 µl de DTT 1 M (je recommande d'utiliser 100 µl de DTT 1 M lorsqu'on désire introduire deux plasmides différents dans une même souche) mélanger et incubé à la température de la pièce 6-8 h. Effectuer un choc thermique de 10 min à 42°C. Centrifuger 5-10 sec et prélever 100 µl au fond du tube tout en dispersant légèrement le culot avec l'embout de la pipette pour bien l'aspirer. Déposer l'aliquote sur une gélose sélective et l'étendre à l'aide d'un râteau de verre stérile. Attendre que les pétris soient secs puis les sceller à l'aide de Parafilm (American National Can.) et les placer à 30°C pour 72 h.

## **2.1.6. Essais biologiques**

### **2.1.6.1. Tests de zone**

Les tests de zone nécessitent la préparation de pétris contenant un tapis de cellules MATa hypersensible à la phéromone  $\alpha$  comme AWM4 et M200-6C. Ces pétris sont préparés 30 min avant le dépôt des cellules à tester. Inoculer 5 à 6 ml de milieu SC-TRP-URA 1,7% agar préalablement refondu et garder 5 min à 42°C, avec 12 µl d'une culture de 16 h en milieu riche de AWM4 (ou 35 µl de M200-6C). Agiter au vortex en commençant à basse vitesse, puis en l'augmentant graduellement afin d'éviter la formation de bulles, et vider d'un trait le contenu sur une gélose mince de milieu riche. S'assurer que le milieu versé recouvre bien toute la surface du pétri. Laisser sécher 20 à 30 min le pétri entrouvert sous une hotte stérile.

À l'aide d'une préculture de 16 h de la souche YBAD1 transformée avec pS3C et pCY1, ajuster 1 ml de milieu à 1 UA à 600 nm par ml et l'incuber à 30°C pour une durée de 4 h. Une fois la culture en phase exponentielle de croissance, prélever l'équivalent de  $5 \times 10^6$  cellules (soit 0,5 UA à 600 nm puisque chaque UA correspond à  $1 \times 10^7$  cellules). Centrifuger les aliquotes 15 sec dans une microcentrifugeuse puis enlever délicatement la quantité de surnageant nécessaire pour qu'il reste 25 µl dans le tube. Bien resuspendre et déposer 5 µl sur les pétris de cellules hypersensibles en laissant 1 cm de distance entre les dépôts. Laisser alors les pétris entrouverts sous une hotte stérile jusqu'à ce que les dépôts soient secs. Sceller les pétris à l'aide de Parafilm et laisser incubé à la température de la pièce 24 à 48h.



### 2.1.6.2. Tests de conjugaison

Les levures auxotrophes n'ont pas la capacité de croître en milieu minimal (SD). Cependant, lorsqu'on croise deux souches de type sexuel opposé (a et  $\alpha$ ) possédant des auxotrophies différentes, les diploïdes engendrés, grâce à la complémentation génétique, retrouvent la capacité de croître en milieu minimal.

La présence des phéromones a et  $\alpha$  est requise pour enclencher le processus de conjugaison chez la levure. Les cellules MAT $\alpha$  que nous utilisons (YBAD1) sont mutées *mfa1/α2* en plus d'être délétées pour *yps1*, donc elles n'ont plus la capacité de se conjuguer à moins de leur fournir une source de facteur  $\alpha$  exogène. Nous leur fournissons donc une source de facteur  $\alpha$  dont l'activité biologique est dépendante de sa maturation par Yps1. La phéromone est produite sous la forme d'un précurseur inactif, la prosomatostatine-facteur  $\alpha$  (Figure 8), par les cellules transformées avec pS3C. En transformant également les cellules avec pCY1, exprimant une copie d'*YPS1*, celles-ci retrouvent leurs capacités de conjugaison. Donc lorsqu'il y a présence du précurseur et de la protéase active, la conjugaison devient possible et il y a croissance de diploïdes sur milieu minimal.

Préparer des tapis de cellule de type MATa en étalant, à l'aide d'un râteau de verre, 400  $\mu$ l d'une culture de 16 h en milieu riche de his1a. Les cellules de type MAT $\alpha$  (YBAD1) à tester sont préparées en déposant en secteur des aliquotes de 25  $\mu$ l de culture dense sur un milieu sélectif. Aussitôt déposées, les aliquotes sont étalées à l'aide d'un fil à boucle de façon à former des carrés de 1 cm. Une fois sec, les pétris contenant les cellules de type a et  $\alpha$  sont scellés et placés à 30°C pour une croissance à saturation, soit environ 48 h. Un pétri de cellules MATa et un de cellules MAT $\alpha$  sont alors répliqués sur une même gélose sélective à l'aide d'un velours. Ce pétri est placé à 30°C pour une durée de 24 h puis répliqué à l'aide d'un velours sur une gélose SD qui est aussi placée à 30°C jusqu'à l'apparition de colonies.

## 2.2. Les protéines

### 2.2.1. Préparation d'extraits protéiques de levure

À partir d'une préculture de levures dont on veut préparer les extraits, prélever la quantité équivalant à  $1,75 \times 10^7$  cellules et placer l'aliquote dans un microtube stérile. Centrifuger l'aliquote 15 sec puis disposer délicatement du surnageant. Resuspendre le culot dans 1 ml de milieu et transférer le tout dans un tube de 15 ml contenant 2,5 ml de milieu. Placer la culture à 30°C sous bonne agitation (~200 rpm) pour une durée de 72 h. La culture

terminée, récolter l'équivalent de  $3 \times 10^7$  cellules, placer l'aliquote dans un microtube et centrifuger 15 sec. Transférer délicatement le surnageant dans un autre tube et le placer à  $-20^{\circ}\text{C}$ , ceci représente un échantillon de protéines sécrétées. Resuspendre le culot dans  $100 \mu\text{l}$  d'eau glacée contenant  $1 \mu\text{g/ml}$  de pepstatine A (Boehringer) et  $3 \mu\text{g/ml}$  de leupeptine (Boehringer), puis ajouter un volume équivalent à  $50 \mu\text{l}$  de billes de verre (Sigma). Procéder maintenant au bris des cellules en agitant la tube vigoureusement à l'aide d'un vortex réglé à vitesse maximale pendant 30 sec puis le replacer immédiatement sur la glace pour un autre 30 sec. Répéter ces étapes cinq fois. Un volume de  $10 \mu\text{l}$  de SDS 10% est alors ajouté et le tout est incubé à  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 2 min. Finalement, centrifuger l'échantillon 1 min à vitesse maximale et transférer le surnageant dans un nouveau tube. Utiliser  $5 \mu\text{l}$  pour quantifier les protéines totales et conserver le reste de l'extrait protéique à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.2. Quantification**

La trousse "Bio-Rad DC Protein Assay" de la compagnie Bio-Rad est utilisée pour le dosage des protéines. Il est possible d'effectuer un microessai qui s'avère très utile car il nécessite peu de matériel et peu de réactifs. Le micro essai peut servir à quantifier des concentrations variant de 5 à  $250 \mu\text{g/ml}$ . Mélanger dans une cuvette à spectrophotomètre de 2 ml :  $200 \mu\text{l}$  d'échantillon (dilué au besoin),  $100 \mu\text{l}$  de réactif A (supplémenté ou non de  $20 \mu\text{l/ml}$  de tampon de compatibilité aux détergents "DC buffer" fourni avec la trousse) et  $800 \mu\text{l}$  de réactif B. Bien mélanger et laisser reposer 15 min. Lire la D.O. à  $750 \text{ nm}$ .

### **2.2.3. Déglycosylation (en condition non-réductrice)**

L'endoglycosidase  $H_f$  commercialisée par la compagnie New-England Biolabs est utilisée pour déglycosyler les échantillons protéiques dont on veut faire une analyse sur SDS-PAGE. Tout d'abord, l'échantillon est dénaturé 10 min à  $100^{\circ}\text{C}$  en présence de SDS à une concentration finale de 0,5%. Le tampon de dénaturation fourni avec l'enzyme contient également du  $\beta$ -mercaptoéthanol qui sert à réduire les ponts disulfures rendant la déglycosylation plus efficace. Comme je désire conserver les ponts disulfures, j'utilise seulement le SDS et non le tampon fourni avec l'enzyme. Après la dénaturation, le pH de la réaction est ajusté à l'aide de tampon citrate pH 5,5 de façon à obtenir 50 mM finale puis l'enzyme est ajoutée à raison de  $1 \mu\text{l} / 100 \mu\text{l}$  de réaction ( $10\,000 \text{ U/ml}$ ). Enfin la réaction est incubée à  $37^{\circ}\text{C}$  pour 75 min puis arrêtée par l'ajout de tampon de chargement (Tris HCl 50 mM pH 6,8, 2% SDS, 10% glycérol, 0,1% bleu de bromophénol) et une incubation de 5 min à  $100^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.4. Migration sur SDS-PAGE**

Le protocole de SDS-PAGE est tiré de Sambrook *et Coll.*, (1989). Les échantillons à faire migrer sont dénaturés 3 min à 100°C en présence de tampon de chargement (Tris HCl 50mM pH 6,8, 2% SDS, 10% glycérol, 0,1% bleu de bromophénol, avec ou sans DTT 100 mM) puis chargés sur un gel de polyacrylamide. Le gel est constitué de deux sections : le gel de résolution ou de séparation (partie inférieure) et le gel d'empilement ou de concentration (partie supérieure). Dans un premier temps, couler le gel de résolution composé de 10% d'un mélange d'acrylamide/bisacrylamide (ratio 29/1), Tris HCl 375 mM pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfate d'ammonium et 0,04% TEMED. Le gel de résolution doit généralement occuper les trois quarts de l'espace disponible. Comblez le vide laissé avec du butanol saturé d'eau et laissez polymériser 30 min. Disposer alors du butanol et rincer deux fois à l'eau déminéralisée. Sécher à l'aide d'un papier buvard puis couler le gel d'empilement constitué de 5% d'un mélange d'acrylamide/bisacrylamide (ratio 29/1), Tris HCl 125 mM pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfate d'ammonium et de 0,1% de TEMED. Installer le peigne et laisser polymériser 30 min. Finalement, retirer le peigne, terminer le montage de l'appareil et remplir les chambres supérieure et inférieure de tampon d'électrophorèse (Tris base 25mM, glycine 250 mM, 0,1% SDS.) Pour l'appareil Mini Slab (IdeA) avec les plaques de 15 cm, l'électrophorèse est effectuée à 100 V pour une durée de 8 h.

### **2.2.5. Migration sur SDS-PAGE pour la séparation de protéines de 1 à 100 kDa**

Le protocole de SDS-PAGE pour la séparation de protéines de 1 à 100 kDa est tiré de Schagger et Jagow (1987). Les échantillons à faire migrer sont placés dans le tampon de chargement (Tris HCl 50 mM pH 6,8, 2% SDS, 10% glycérol, 0,1% bleu de bromophénol, avec ou sans DTT 100 mM), dénaturés 30 min à 40°C puis déposés dans les puits du gel de polyacrylamide. Le gel est constitué de trois sections : le gel de résolution ou de séparation (partie inférieure), le gel d'espacement (partie centrale) et le gel d'empilement ou de concentration (partie supérieure). Dans un premier temps, couler le gel de résolution (21% d'acrylamide, 1,4% bisacrylamide, 49% (p/v) urée, Tris HCl 1,36 M pH 8,45, 0,136% SDS, 0,045% persulfate d'ammonium et 0,045% TEMED). Le gel de résolution doit généralement occuper les deux tiers de l'espace disponible. Sans attendre, couler le gel d'espacement (9,76% acrylamide, 0,3% bisacrylamide, Tris HCl 1 M pH 8,45, 0,1% SDS, 0,033% persulfate d'ammonium, 0,033% TEMED) en utilisant la moitié de l'espace restante puis recouvrir délicatement d'eau déminéralisée. Laisser polymériser 30 min. Une fois gélifiés, enlever l'eau, sécher à l'aide d'un papier buvard puis couler le gel d'empilement (3,8% acrylamide, 0,12%

bisacrylamide, Tris HCl 0,74 M pH 8,45, 0,074% SDS, 0,08% persulfate d'ammonium, 0,08% TEMED). Installer le peigne et laisser polymériser 20 min. Finalement, retirer le peigne, terminer le montage de l'appareil et remplir la chambre du haut de tampon pour la cathode (Tris HCl 0,1 M pH 8,25, Tricine 0,1 M, 0,1% SDS) et la chambre du bas avec du tampon pour l'anode (Tris HCl 0,2 M pH 8,9). Pour l'appareil Mini Slab (ideA) avec les plaques de 15 cm, l'électrophorèse est effectuée à 35 V pour 1 h puis à 74 V pour une durée de 16 à 17 h.

### **2.2.6. Transfert sur une membrane de nitrocellulose ou PVDF**

Le transfert des protéines d'un gel de polyacrylamide sur une membrane de nitrocellulose est réalisé selon les directives fournies avec l'appareil de transfert semi-humide LKB Nova Blot (Pharmacia). Découper deux pièces de papier à transfert d'environ 2 mm d'épaisseur ainsi qu'une pièce de nitrocellulose de la même dimension que le gel à transférer. Après avoir rincé la membrane de nitrocellulose à l'eau déminéralisée, imbiber les trois pièces dans le tampon de transfert (2,93 g/L glycine, 5,81 g/L Tris base, 0,375 g/L SDS, 20% méthanol). Après avoir rincé les plaques de l'appareil à transfert, placer une des pièces de papier à transfert sur la plaque inférieure puis la membrane de nitrocellulose par dessus. Lors du transfert sur membrane de PVDF, activer la membrane 5 min dans du méthanol, l'imbiber de tampon de transfert et la placer par dessus la membrane de nitrocellulose. Déposer délicatement le gel de polyacrylamide sur la membrane et recouvrir de l'autre pièce de papier à transfert. Rouler lentement une pipette de haut en bas sur le montage pour enlever toutes traces de bulles d'air. Ajouter quelques gouttes de tampon de transfert pour que le montage soit bien humide et déposer délicatement la seconde plaque de l'appareil. Procéder au transfert à 0,8 mA/cm<sup>2</sup> pour une durée de 60 min.

### **2.2.7. Détection des protéines**

#### **2.2.7.1. Coloration**

Rincer deux fois la membrane avec le tampon de transfert et deux fois avec de l'eau déminéralisée, colorer 5 min avec 0,1% de Bleu de Coomassie ou de Rouge Ponceau dans 50% méthanol. Décolorer environ 5 min dans 50% méthanol et 10% d'acide acétique glaciale. Finalement, laver deux fois 5 min à l'eau déminéralisée. Sécher à l'air.

### **2.2.7.2. Immunofluorescence indirecte**

Bloquer la membrane 1 h dans une solution à 9% de poudre de lait écrémé (Carnation). Procéder au couplage du premier anticorps en incubant la membrane 30 min dans une solution à 2% de poudre de lait écrémé et contenant une dilution 1:1000 d'anticorps polyclonaux de lapin anti-Yps1 (lot 294-3). La membrane est ensuite lavée quatre fois avec du TBST (Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 0,05% Tween-20) à raison de 5 min par lavage. Procéder au couplage du second anticorps en incubant la membrane 30 min dans du TBST contenant une dilution 1:2500 d'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase (Sigma A-4914). La membrane est à nouveau lavée quatre fois avec du TBST à raison de 5 min par lavage. La révélation est effectuée selon les instructions fournies avec la trousse de détection "ECL Western Blotting Reagents" (Amersham).

### **2.2.8. Purification de protéines flanquées de six histidines**

Inoculer 1 litre de milieu SC-URA PO<sub>4</sub> avec une préculture de 3 ml de YBAD1 transformé avec pSY1H. Incuber 4 j à 25°C avec une bonne agitation. Séparer par centrifugation les cellules du surnageant. Conserver le surnageant sur la glace et procéder à la concentration des protéines.

#### **2.2.8.1. Concentration des protéines**

Les protéines du surnageant de culture sont concentrées à l'aide de deux Centricon Plus-80 à membrane Biomax PB de 30 000 NMWL (Millipore, UFC5 BTK 02). Les bouteilles de concentration doivent toujours être équilibrées l'une avec l'autre pour éviter de fâcheuses situations lors de la centrifugation. La centrifugeuse utilisée est une Sorvall RT-6000D (Dupond) avec un rotor de type "swinging bucket". Ajouter 80 ml de surnageant de culture à concentrer dans la partie supérieure de chacune des bouteilles de concentration, placer les couvercles et centrifuger 20 à 30 min à 3300 rpm en maintenant la température de la centrifugeuse à 21°C. La force appliquée lors de la centrifugation entraînera le surnageant à travers les filtres où les protéines de masse moléculaire plus élevée que le domaine d'exclusion de la membrane seront concentrées tandis que le liquide ainsi que les molécules plus petites aboutiront dans la partie inférieure de la bouteille. Disposer du liquide se trouvant dans la partie inférieure et répéter les opérations jusqu'à ce que tout le surnageant ait été filtré. Afin de conditionner notre échantillon protéique pour la purification sur résine Ni-NTA-agarose, ajouter 80 ml de tampon de sonication (tampon phosphate 50 mM pH 7,8, NaCl 300 mM) et centrifuger à nouveau 20 à 30 min. Finalement, placer les réceptacles conçus pour recueillir les protéines

retenues dans les filtres à la place des couvercles, séparer la partie supérieure de sa base et placer les bouteilles dans la centrifugeuse de façon que le réceptacle soit en dessous et les filtres sur le dessus. Récupérer les protéines concentrées en centrifugeant 1 min à 1000 rpm.

### **2.2.8.2. Purification sur résine Ni-NTA-agarose**

Déposer, dans un microtube de 1,5 ml, 400 µl d'une suspension de résine Ni-NTA-agarose (QIAGEN). Centrifuger 5 sec et disposer du surnageant. Rincer la résine une fois avec de l'eau déminéralisée et deux fois avec du tampon de sonication (tampon phosphate 50 mM pH 7,8, NaCl 300 mM). Ajouter l'échantillon protéique concentré et compléter le volume à 1,5 ml avec du tampon de sonication. Sceller le tube avec du Parafilm et incubé environ 16 h à la température de la pièce sur un agitateur rotatif "Labquake shaker" (Barnstead | Thermolyne). Durant l'incubation, les protéines avec une queue de polyhistidine vont s'accrocher sur la résine. Séparer la résine du surnageant par une brève centrifugation, placer le surnageant dans un nouveau tube et le conserver à -20°C. Laver la résine 3 fois avec du tampon de lavage (tampon phosphate 50 mM pH 7,8, NaCl 300 mM, 10% glycérol). Après avoir débarrassé la résine de tout le surnageant, procéder à la récupération des protéines accrochées en rinçant deux fois la résine avec 200 µl de tampon acétate 100 mM pH 4,0 en prenant soin de récupérer tout le surnageant à chaque rinçage. Utiliser 100 µl pour quantifier les protéines et conserver le reste à -20°C.

### **2.2.9. Analyse des séquences N-terminales**

Des aliquotes de Yps1-H avec ou sans mutation ont été séparés par SDS-PAGE en condition réductrice et non-réductrice puis les protéines ont été transférées sur membrane PVDF. Les protéines ont été révélées par coloration au rouge ponceau et la membrane fut envoyée au Dr Claude Lazure (Institut de Recherche Clinique de Montréal) qui a effectué le séquençage N-terminal des bandes majeures. Après analyse des résultats, le Dr Lazure nous a communiqué les conclusions du séquençage.

### **2.2.10. Essais enzymatiques avec Yps1-H et ses variants**

Mélanger 2 µl d'Yps1-H purifiée (ou un de ses variants), dosée et ajustée à 20 µg/ml, avec 2 µl de pré-élafine purifiée, dosée et ajustée à 200 µg/ml, dans 56 µl de tampon acétate 50 mM à pH 4,4 puis incubé le tout à 37°C. Après 1 h, prélever 30 µl de la réaction et poursuivre l'incubation 3 h à la même température. Ajouter à l'aliquote prélevée du tampon de chargement (Tris 50 mM pH 6,8, 2% SDS, 10% glycérol, 0,1% bleu de bromophénol) et incubé

3 min à 100°C. Faire de même avec le reste du mélange réactionnel lorsque le temps d'incubation est écoulé. Faire migrer les échantillons par SDS-PAGE pour la séparation des protéines de 1 à 100 kDa. Transférer sur membrane et révéler par chimioluminescence (voir section 2.2.6.2) en utilisant l'antisérum de lapin anti-élafine à une dilution de 1:1000 dans du TBST comme premier anticorps.

## **2.3. Les acides nucléiques**

### **2.3.1. Les plasmides**

Les plasmides utilisés dans ce travail sont énumérés dans le Tableau IV.

### **2.3.2. Mini préparation d'ADN plasmidique**

Le protocole de mini préparation d'ADN plasmidique par la méthode de lyse alcaline est une version modifiée de celui retrouvé de Sambrook *et Coll.*, (1989). Incuber à 37°C pendant 16 h une colonie bactérienne possédant le plasmide à purifier dans 3 ml de 2YT contenant l'antibiotique approprié. Transférer 1,5 ml de cette culture dans un microtube, centrifuger 30 sec dans une microcentrifugeuse à vitesse maximale et disposer du surnageant. Resuspendre le culot dans 100 µl de GTE froid (glucose 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM) en agitant vigoureusement au vortex. Ajouter 200 µl de solution alcaline fraîchement préparée (NaOH 0,2 N, 1% SDS), inverser le tube pour en recouvrir toute sa surface intérieure et déposer sur glace. Récupérer l'ADN plasmidique en ajoutant 150 µl d'une solution froide composée d'acétate de potassium 3 M et d'acide acétique 2 M, bien fermer le tube et le secouer énergiquement six fois. Il y aura formation d'un précipité composé principalement de débris cellulaires et d'ADN génomique alors que les plasmides demeurent dans le surnageant. Incuber 5 min sur glace, centrifuger à vitesse maximale 5 min et transférer le surnageant dans un nouveau tube contenant 400 µl de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1). Agiter vigoureusement au vortex et centrifuger à nouveau 5 min. Prélever délicatement la phase aqueuse et la déposer dans un tube avec 2 vol d'éthanol 95% gardé à -20°C. Mélanger et laisser précipiter 10 min sur glace. Centrifuger 10 min à vitesse maximale, disposer du surnageant puis rincer le culot avec 1 ml d'éthanol 70% gardé à -20°C. Centrifuger à nouveau 3 min, enlever tout le surnageant, laisser sécher 10 min sur la paille et resuspendre le culot dans 30 µl de TE (Tris HCl 10mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Conserver à -20°C.

**Tableau V.** Plasmides utilisés dans ce travail

Nom	Description	Source ou référence
pRS316	<i>E. coli</i> / <i>S. cerevisiae</i> phagemide vecteur (CEN6 ARSH4, ampR, URA3, f1 ORI).	Sikorski et Hieter (1989) ATCC 77145
pCY1	pRS316 contenant le fragment <i>Sal I</i> - <i>Xba I</i> de 2,7 kb du gène <i>YPS1</i> .	Mayaki. (1998)
pRS426	<i>E. coli</i> / <i>S. cerevisiae</i> phagemide vecteur (2 $\mu$ , ampR, URA3, f1 ORI).	Christianson <i>et al.</i> (1992) ATCC 77107
pMY1	pRS426 contenant le fragment <i>Sac I</i> - <i>Xho I</i> de 2,7 kb du gène <i>YPS1</i> .	ce mémoire
pVT101-U	<i>E. coli</i> / <i>S. cerevisiae</i> phagemide vecteur (2 $\mu$ , ampR, URA3, f1 ORI) pour l'expression de protéines sous le contrôle du promoteur constitutif <i>ADHI</i> de levure.	Vernet <i>et al.</i> (1987)
pSY1H	pVT101-U contenant le fragment <i>Nde I</i> - <i>BamH I</i> de 1,9 kb du gène <i>YPS1</i> dont les codons 502 à 569 ont été remplacés par six codons histidines.	Mayaki. (1998)
pS3C	Plasmide exprimant le gène hybride pro-somatostatine / fateur $\alpha$ de levure sous le contrôle du promoteur <i>MFA1</i> (2 $\mu$ , ampR, <i>TRP1</i> ).	Bourbonnais <i>et al.</i> (1993)



### **2.3.3. Purification d'ADN plasmidique pour le séquençage**

Procéder comme indiqué à la section précédente (2.3.2.) en incluant un traitement à la RNase (30 min à 37°C en présence de 50 µg/ml de RNase A) juste avant l'extraction des protéines avec 400 µl de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1). Après avoir laissé sécher le culot sur la paillasse 10 min, le resuspendre dans 16,8 µl d'eau déminéralisée. Ajouter 3,2 µl de NaCl 5 M et 20 µl d'une solution de PEG 8000 13% puis mélanger et déposer sur glace. Laisser précipiter 1 h à 4°C et centrifuger 10 min à vitesse maximale. Disposer du surnageant pour finalement resuspendre le culot dans 20 µl d'eau déminéralisée. Doser au spectrophotomètre GeneQuant (Pharmacia) à l'aide de capillaires de quartz et ajuster la concentration à 100 µg/ml. Conserver à -20°C.

### **2.3.4. Préparation de sondes d'ADN par PCR**

Dans un volume final de 50 µl, mélanger 20 ng d'ADN génomique de levure (W303-1B), 50 pmoles de chaque oligonucléotides (Research Genetics) servant à amplifier le gène visé, 5 µl de tampon 10X pour la Taq DNA polymérase (Pharmacia), 10 nmoles de chaque dNTP et 2,5 U de Taq DNA polymérase (Pharmacia). Recouvrir de 50 µl d'huile minérale et placer au thermocycleur (Perkin-Elmer) pour 32 cycles selon les paramètres suivants : étape de dénaturation : 5 min à 94°C pour le premier cycle et 1 min pour les autres, étape d'hybridation : 1 min à 50°C, étape d'élongation : 3 min à 72°C, terminer le dernier cycle avec un élongation de 10 min puis conserver à 4°C. Purifier le fragment amplifié sur gel d'agarose.

### **2.3.5. Purification d'ADN sur gel d'agarose**

Procéder à l'électrophorèse de l'échantillon d'ADN à purifier en utilisant un gel d'agarose 0,7% dans du TAE (Tris/acide acétique 40 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Colorer les fragments d'ADN en laissant tremper le gel d'électrophorèse 15 min dans une solution de bromure d'éthidium à 5 µg/ml. Visualiser les fragments d'ADN sous une lampe à rayons ultraviolets réglée à 368 nm (plutôt que 302 nm) et découper la bande d'intérêt à l'aide d'une lame. Placer le fragment d'agarose dans un microtube et procéder à l'extraction de l'ADN du gel d'agarose. L'extraction de l'ADN est effectuée selon les directives fournies avec la trousse QIAEX Gel extraction kit (QIAGEN).

### **2.3.6. Mutagénèse dirigée**

Cette méthode de mutagénèse est une version modifiée du protocole décrit par Kunkel (1985). La mutagénèse dirigée permet de modifier de façon précise et durable l'information d'un gène. Selon la nature des modifications apportées, les variants produits nous permettent de décortiquer le rôle des séquences modifiées dans la fonction ou l'intégrité du produit génétique.

#### **2.3.6.1. Préparation d'ADN simple brin**

À l'aide de 2 ml d'une culture de 16 h à 37°C de la souche CJ236 transformée avec un plasmide possédant une origine de répllication pour le phage M13 et contenant le gène à modifier, inoculer 8 ml de milieu 2YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 30 µg/ml de chloramphénicol. Incuber la culture à 37°C jusqu'à ce qu'elle atteigne une D.O. à 600 nm comprise entre 0,4 et 0,8. À ce stade, 5 ml de culture sont transférés dans une fiole conique que l'on infecte avec 5 µl de "phage helper" M13K07 ( $5 \times 10^{12}$  pfu/ml). Incuber la culture infectée à 37°C sous une forte agitation (300 rpm) pour une période de 1 h. Ensuite, ajouter 20 ml de milieu 2YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline, 30 µg/ml de chloramphénicol, 70 µg/ml de kanamycine et 25 µg/ml d'uridine puis poursuivre l'incubation pendant 16 h. La culture est ensuite transférée dans un tube de polypropylène de 30 ml (Nalgene) et est centrifugée 10 min à 10 000 rpm dans une Sorvall RC 5B plus (Dupond). Les phages contenus dans 20 ml de surnageant sont précipités 15 à 60 min à la température de la pièce par l'ajout de 5 ml d'une solution de PEG 8000 20% ; NaCl 2,5 M. Les phages sont ensuite centrifugés 10 min à 10 000 rpm. Le culot est repris dans 400 µl de tampon Tris HCl 10 mM pH 7,5, transféré dans un microtube et incubé 30 min à 37°C en présence de MgCl<sub>2</sub> 5 mM, 50 µg/ml DNase I et 10 µg/ml RNase A. Arrêter la réaction en ajoutant 80 µl d'une solution composée d'acétate de sodium 1,5 M pH 7 et EDTA 50 mM. Ajouter un volume égal de phénol:chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1) et mélanger vigoureusement. Centrifuger 5 min à vitesse maximale puis transférer la phase aqueuse dans un autre tube. Précipiter l'ADNss en ajoutant 2,5 vol d'éthanol 95% à -20°C. Laisser sur glace 10 à 15 min et centrifuger 10 min à vitesse maximale. Reprendre le culot dans 50-100 µl de TE. Prendre une lecture de la D.O. à 260 nm et calculer la concentration de l'ADNss purifié. La concentration d'ADNss en pmole/µl correspond à 120 fois la D.O. à 260 nm sur le nombre de nucléotides retrouvés dans l'ADNss. Multiplier le résultat par 20 lorsque la D.O. est prise au spectrophotomètre GeneQuant (Pharmacia) à l'aide de capillaires de quartz.

### 2.3.6.2. Oligonucléotides utilisés pour modifier le gène YPS1

Les oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse ont été synthétisés par le service de synthèse du pavillon Charles-Eugène-Marchand de l'Université Laval à l'aide d'un appareil de type 394 DNA/RNA Synthetizer (Applied Biosystems). Puisque l'ADNss utilisé pour la mutagenèse correspond au brin codant du gène *YPS1*, la séquence des oligonucléotides utilisés est complémentaire aux régions du brin codant où on introduit la mutation. Leurs séquences sont présentées ci-dessous:

**YB 106 :** 5'TCGAGTCGTCGTCCGGCCGCGTITGCTGCTGGT3' (K<sup>29</sup>, R<sup>30</sup>, Eag I)

**YB 101 :** 5'CATAACCGTCAGCGGCCGCCAATAGGCGTACT3' (K<sup>66</sup>, R<sup>67</sup>, Not I)

**YB 116 :** 5'GGAGCCTGTTGGCCACCAGGACCG3' (D<sup>101</sup>, Msc I)

**YB 120 :** 5'TGACGAATCATCGGCCGGTCAATAACACG3' (K<sup>132</sup>, R<sup>133</sup>, Eag I)

Les caractères en gras représentent les nucléotides qui ne sont pas complémentaires au gène *YPS1* et servant à introduire les mutations. À la droite des séquences figure le symbole et la position dans la protéine des a.a. modifiés pour des alanines, ainsi que le nom de l'enzyme reconnaissant le site de restriction introduit (caractères soulignés) par la mutation.

### 2.3.6.3. Phosphorylation de l'oligonucléotide

Dans un volume final de 10 µl, incuber 30 min à 37°C 10 pmoles d'oligonucléotide en présence de Tris HCl 70 mM pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM, ATP 1 mM et 10 U de T4 polynucléotide kinase. Inactiver ensuite l'enzyme en incubant le mélange 10 min à 65°C.

### 2.3.6.4. Hybridation des oligonucléotides à l'ADN simple brin, synthèse *in vitro* du second brin et transformation bactérienne

Dans un volume final de 10 µl, mélanger 1 pmole d'oligonucléotides phosphorylés avec 0,05 à 0,1 pmole d'ADNss en présence de Tris HCl 20 mM pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 50 mM. Incuber à 80°C 5 min dans un bloc chauffant (Baxter) puis retirer le bloc du module électrique et laissez hybrider les amorces jusqu'à ce que la température du bloc atteigne 30°C. L'hybridation complétée, ajouter 1 µl de tampon de synthèse (0,5 mM de chaque dNTP, Tris HCl

10 mM pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 2 mM), 2,5 U de T4 DNA ligase (New England Biolab) et 1 U de T7 DNA polymérase (New England Biolab). Incuber 5 min sur glace, ensuite 5 min à température pièce et finalement, 90 min à 37°C. Utiliser la moitié du mélange pour transformer une souche de *E. coli Dut<sup>+</sup> Ung<sup>r</sup>* comme MC1061 afin que l'ADNss soit remplacé par de l'ADN complémentaire au brin synthétisé *in vitro* introduisant ainsi la mutation. Conserver le reste du mélange à -20°C pour transformer à nouveau si nécessaire. Digérer l'ADN plasmidique de dix clones avec les enzymes de restriction appropriées et analyser sur gel d'électrophorèse pour sélectionner ceux qui portent les mutations. De façon typique, 10 à 80 % des clones sont positifs.

### **2.3.7. Préparation d'ARN total de levure**

La méthode utilisée pour l'extraction de l'ARN total de levure est une adaptation de celle décrite par Köhrer et Domdey, (1991). Centrifuger 5 min à 3000 rpm dans une centrifugeuse de table, 10 ml de culture dont on veut isoler l'ARN total. Resuspendre le culot dans 0,8 ml de tampon acétate 50 mM pH 5. Ajouter 80 µl de SDS 10% et 1 ml de phénol acide préchauffé à 65°C. Incuber 5 min à 65°C en vortexant à toutes les 30 sec. Transférer le tube dans un bain d'eau et de glace afin de ramener à température pièce le plus rapidement possible puis, centrifuger 10 min à 3000 rpm. Prélever la phase organique en prenant soin de laisser le culot, l'interphase ainsi que la phase aqueuse. Ajouter à la phase aqueuse 1,2 ml de phénol préchauffé à 65°C. Incuber à nouveau 5 min à 65°C en vortexant à toutes les 30 sec. Transférer le tube rapidement dans un bain d'eau et de glace afin de ramener à température pièce puis centrifuger 10 min à 3000 rpm. Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube et ajouter 1 ml de chloroforme:alcool isoamylique (24:1). Vortexer vigoureusement puis centrifuger 15 min à 3000 rpm. Transférer à nouveau la phase aqueuse dans un tube propre et ajouter 1/10 vol d'acétate de sodium 3 M et 3 vol d'éthanol 95% gardé à -20°C. Mélanger et laisser précipiter l'ARN toute une nuit à -20°C. Placer la centrifugeuse à 4°C et centrifuger 20 min à 3000 rpm, rincer le culot avec 1ml d'éthanol 70% à -20°C et centrifuger à nouveau 3 min à 3000 rpm. Enlever l'éthanol et resuspendre le culot dans 100 µl d'eau traité au DEPC (diéthyle pyrocarbonate). Conserver pour de courtes durées comme tel à -80°C. Pour une plus longue période conserver à -80°C dans 1/10 vol d'acétate de sodium 3 M et 3 vol d'éthanol 95%.

### **2.3.8. Migration d'ARN sur gel d'agarose (buvardage northern)**

Prélever environ de 10 µg d'échantillon d'ARN et le précipiter en ajoutant à l'aliquote 1/10 vol d'acétate de sodium 3 M et 3 vol d'éthanol 95% à -20°C. Centrifuger 20 min à vitesse maximale, enlever la majorité du surnageant sans toucher au culot et ajouter 200 µl d'éthanol

80% à -20°C. Centrifuger à nouveau 5 min, enlever le surnageant et laisser sécher le culot 5 min à la température de la pièce. Resuspendre le culot dans 7,3 µl de solution HEFF (tampon Hepes (*free acid*) 50 mM pH 7,8, EDTA 1 mM, 6,2% formaldéhyde déionisée, 50% formamide déionisée) et conserver sur glace. Juste avant de charger l'échantillon, dénaturer 10 min à 70°C, mettre 5 min sur glace, centrifuger 1 min à 10 000 rpm et ajouter 2,6 µl de tampon de chargement (tampon Hepes 50 mM pH 7,8, EDTA 1 mM, 6,2% formaldéhyde déionisée, 50% formamide déionisée, 2,7 mg/ml bromure d'éthidium, 8% sucrose). Mélanger délicatement et garder sur glace jusqu'au moment du dépôt sur le gel.

Préparer le gel (1,2% d'agarose, tampon Hepes 50 mM pH 7,8, EDTA 1 mM, 6,1% formaldéhyde) en chauffant l'eau et l'agarose au four micro-ondes. Laisser refroidir jusqu'à 70°C puis ajouter le tampon Hepes et la formaldéhyde. Mélanger rapidement sans faire de bulles, puis couler la solution dans le moule conçu à cet effet. Placer le peigne et laisser solidifier 45 min. Une fois le temps écoulé, recouvrir le gel de tampon d'électrophorèse (tampon Hepes 50mM pH 7,8, EDTA 1 mM, 6,1% formaldéhyde) et laisser solidifier encore 75 min. Retirer délicatement le peigne, placer le gel dans l'appareil à électrophorèse et remplir de tampon d'électrophorèse jusqu'à ce qu'il recouvre légèrement le gel.

Procéder à une pré-électrophorèse de 5 min à 4 V/cm (distance entre les électrodes). Charger les échantillons et procéder à l'électrophorèse à 5 V/cm pour une durée d'environ 4 h. Après 1 h de migration, puis à intervalles de 30 min, mélanger le tampon d'électrophorèse des deux chambres. Surveiller en même temps, à l'aide d'une lampe UV, la migration des ARN ribosomaux qui donne un aperçu de la qualité des échantillons déposés. Des échantillons de bonne qualité présenteront deux bandes d'intensité égale de 1,7 (18S) et 3,8 kb (28S). Une fois l'électrophorèse terminée, prendre une photo du gel sous les UV.

### **2.3.8.1. Transfert sur membrane de nylon**

Avant le transfert, rincer le gel 30 min avec agitation dans un tampon 20X SSPE (175,3 g/l NaCl, 27,6 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, 7,4 g/l EDTA, ajuster pH à 7,4 avec NaOH) en changeant la solution après 15 min. Découper une pièce de membrane en nylon Hybond-N (Amersham) de façon qu'elle dépasse d'environ 5 mm de chaque côté du gel à transférer. Tremper la membrane 5 min dans de l'eau déminéralisée, puis 5 min dans la solution 20X SSPE. Placer la membrane au centre de la plaque poreuse d'un appareil à transfert sous vide (TransBlot). Fabriquer un pochoir avec une feuille de vinyle dont la forme évidée sera un rectangle de dimension légèrement inférieure à celle du gel à transférer. Placer le pochoir bien centré sur la plaque poreuse du TransBlot de façon à ce que le rectangle de celui-ci soit centré sur la membrane en nylon. Déposer le gel sur la membrane en s'assurant que les bords du gel soient

sur le vinyle. Faire une marque au niveau des puits avec un crayon à mine. Assembler le cadre supérieur du TransBlot en prenant soin de bien coincer le pochoir entre le cadre et le joint d'étanchéité puis sceller les puits et les côtés du gel avec de l'agar 1,2%. Une fois l'agar figé, recouvrir le gel de quelques millimètres de 20X SSPE (il n'est pas nécessaire de recouvrir le pochoir) et appliquer le vide 1 h à 70 mm•Hg. Ajouter du 20X SSPE sur le gel à mesure que celui-ci baisse, lorsque le système est bien étanche cela en nécessite peu. Après le transfert, prendre une photo du gel sous les UV et comparer la photo à celle prise avant le transfert pour vérifier l'efficacité. Après le transfert, ponter les ARNs à la membrane en plaçant celle-ci face vers le haut dans un StrataLinker (STRATAGENE) en mode "auto-crosslink" à 1800 J. Envelopper la membrane dans deux épaisseurs de SaranWrap (Dow) et la conserver à -20°C.

### **2.3.9. Détection d'ARNm sur membrane**

#### **2.3.9.1. Marquage radioactif de sondes d'ADN**

Le protocole de marquage radioactif de sondes d'ADN est une adaptation de celui fourni avec la trousse *rediprime* (Amersham). Diluer 25 ng d'ADN à marquer dans 45 µl de TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Dénaturer 5 min à 100°C et refroidir 1 min sur glace. Centrifuger brièvement et ajouter l'ADN dénaturé au "labelling mix" de la trousse *rediprime*. Centrifuger brièvement, ajouter 4 µl de dCTP  $\alpha$ <sup>32</sup>P (ICN 33004X) et mélanger en pipettages successifs (~12 fois). Incuber 30 min à 37°C puis arrêter la réaction en ajoutant 5 µl d'EDTA 0,2M. Dénaturer 5 min à 100°C puis garder sur glace jusqu'à l'hybridation. Centrifuger brièvement et évaluer l'efficacité de l'incorporation de la radioactivité.

##### **2.3.9.1.1. Évaluation de l'incorporation de la radioactivité**

Transférer 1 µl de la sonde radioactive d'ADN dans 9 µl de TE. Mélanger et déposer 5 µl d'échantillon sur deux petits papiers filtres. Placer un des filtres dans un vial à scintillation et y ajouter 5 ml de scintillant liquide (Universol ; ICN). Faire tremper le second filtre 10 min dans du TCA 5% froid (~30 ml). Renouveler la solution et laisser encore 5 min. Remplacer le TCA par de l'éthanol 95% à -20°C et laisser 3 min. Enlever l'éthanol, laisser sécher le filtre et le placer dans un vial avec 5 ml de scintillant liquide. Mesurer la radioactivité des deux filtres avec un compteur  $\beta$  (LKB) sur une durée de 60 sec toutes les fenêtres du spectre ouvertes. Faire le rapport du nombre de cpm pour le filtre lavé au TCA sur celui du filtre non lavé. Sauf exception, utiliser les sondes où plus de 30% du précurseur radioactif a été incorporé.

### **2.3.9.2. Hybridation**

Préhybrider la membrane au moins 4 h au four à hybridation (Hybaid) à 55°C avec 10 ml de solution de préhybridation fraîchement préparée ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$  250 mM pH 7,2, NaCl 250 mM, EDTA 1 mM, 7% SDS) pour les cylindres de 3,5 X 10 cm ou 15 ml pour ceux de 3,5 X 15 cm. Renouveler la solution de préhybridation avec une solution fraîche à 55°C et ajouter la ou les sondes. Hybrider à 55°C au four à hybridation pour une période de 16 à 18 h. Enlever la solution d'hybridation et rincer brièvement une fois en agitant vigoureusement le cylindre rempli à moitié de solution 2X SSPE, 0,1% SDS. Changer la solution et incuber 10 min au four à hybridation. Finalement, remplacer la solution par la même quantité de 0,2X SSPE 0,1% SDS préchauffé à 55°C et incuber 30 min au four à hybridation à 55°C. Sortir la membrane du cylindre, la plonger quelques secondes dans du 0,2X SSPE 0,1% SDS (~100 ml) puis l'égoutter. Envelopper la membrane dans deux épaisseurs de SaranWrap. Procéder à la visualisation des signaux ou conserver à -20°C.

### **2.3.9.3. Visualisation des signaux**

Pour une visualisation traditionnelle, placer la membrane face vers le haut dans une cassette d'exposition munie d'un écran intensificateur. Fixer la membrane à l'aide de deux petits morceaux de ruban adhésif. Dans une chambre noire, découper un film Kodack Biomax MR-1 (InterScience 8701302) de façon qu'il soit un peu plus grand que la membrane et le placer face vers le bas sur la membrane (une des deux faces bénéficie d'une émulsion spéciale, suivre les indications du fabricant). Refermer la cassette et la placer à -80°C pour  $\approx$  16 h. Sortir la cassette du congélateur au moins 15 min avant de développer le film au développeur automatique X-OMAT (Kodak). Si nécessaire, exposer la membrane avec un nouveau film, en ajustant le temps d'exposition. Une exposition à température pièce procède 4 fois plus lentement qu'à -80°C mais résulte en un bruit de fond plus faible.

Pour une visualisation permettant des mesures quantitatives utiliser le système d'imagerie Fujix BAS1000 avec l'écran Fujix BASIII et le logiciel MacBas (Fuji).

### **2.3.9.4. Déshybridation**

Faire bouillir la membrane à déshybrider 30 min dans une solution 0,1X SSPE et 0,1% SDS. Ensuite, à la température de la pièce, rincer la membrane avec ~100 ml du même tampon. Emballer la membrane de deux feuilles de SaranWrap et conserver à -20°C.

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

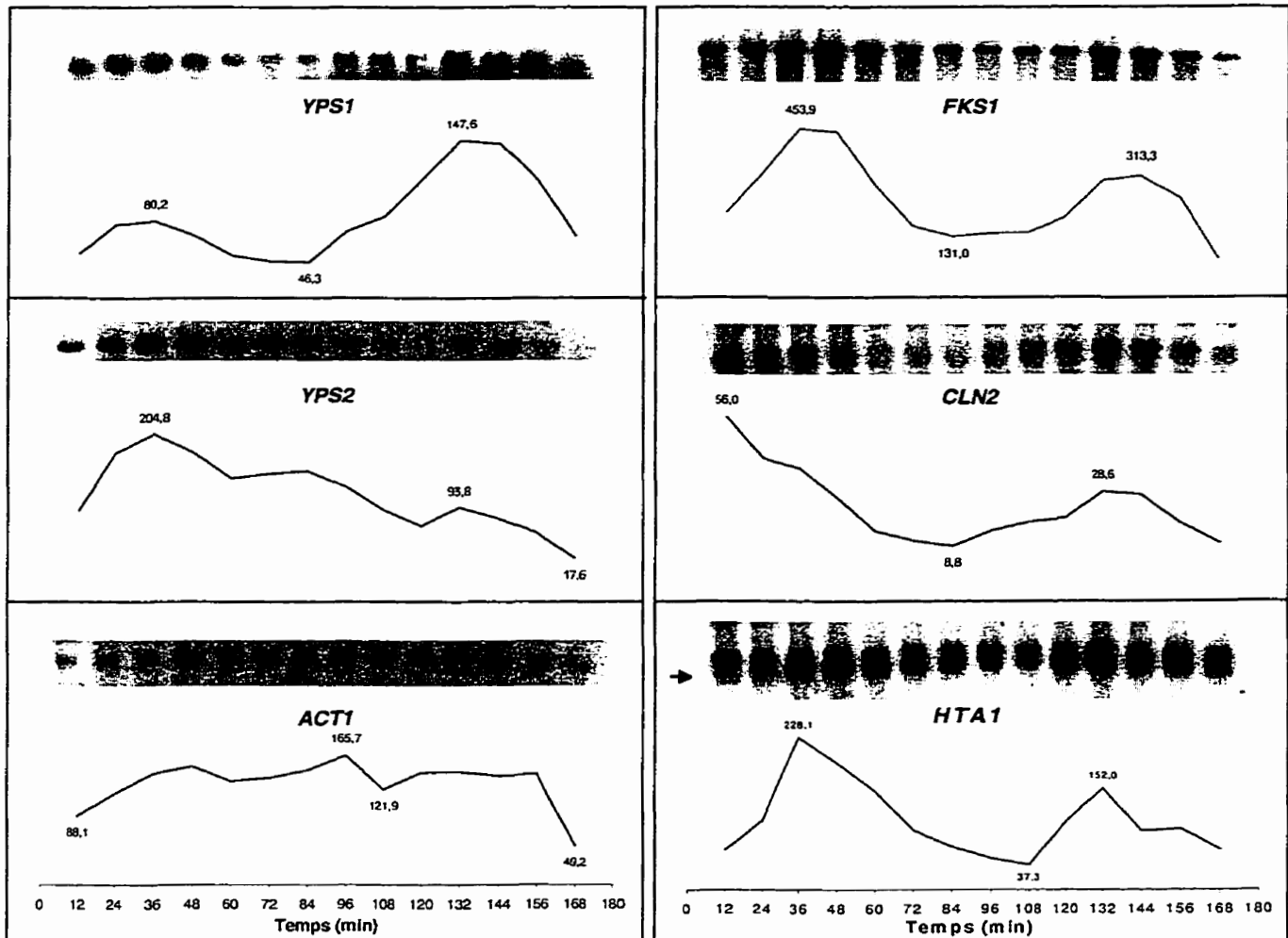
#### 3.1. Régulation transcriptionnelle du gène *YPS1*

Étudier comment est régulée la transcription d'un gène permet d'approfondir nos connaissances quant à son rôle dans l'organisme. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité de la paroi sont souvent régulés dans le cycle cellulaire ou bien exprimés quand celle-ci subit certains stress. Nous avons dirigé notre démarche dans ce sens en examinant les niveaux d'expression de *YPS1* chez des populations de levures en phase dans le cycle cellulaire ou sous différentes conditions de stress.

##### 3.1.1. Régulation transcriptionnelle dans le cycle cellulaire

Les niveaux d'expression de *YPS1*, observés dans le temps chez une culture de levure *bar1Δ* synchronisée dans le cycle cellulaire à la suite d'un arrêt de croissance en  $G_1$  induit par la phéromone sexuelle  $\alpha$ , sont présentés à la Figure 9. Comme l'expression du gène *ACT1* est constitutive, donc ne varie pas dans le cycle cellulaire, ses niveaux ont été quantifiés afin de vérifier que la quantité d'ARN utilisée pour chaque échantillon est demeurée constante. Les résultats indiquent que les niveaux d'*ACT1* furent raisonnablement constants durant la période de temps observée. Les données recueillies montrent clairement que l'expression d'*YPS1* n'est pas constante dans le cycle cellulaire. Le gène montre des pics d'expression à 36 et 132 min. Appuyés par l'expression aux mêmes moments de *HTA1* (histone H2A), *CLN2* (une cycline nécessaire pour la transition  $G_1/S$ ) et *FKS1* (sous-unité de la  $\beta$ -1,3-glucan synthétase), ces pics représentent le moment où la culture est en début de phase S du cycle cellulaire (Hereford *et al.*, 1981; Wittenberg *et al.*, 1990; Ram *et al.*, 1995). Fait à remarquer, l'expression de *YPS1*, contrairement à *CLN2*, *FKS1* et *YPS2*, est plus importante lors du deuxième cycle cellulaire donnant l'impression que le bloc en  $G_1$  imposé par le facteur  $\alpha$  lors de la synchronisation de la culture aurait eu un effet de répression. Pour sa part, *YPS2* montre un pic d'expression à 36 min qui diminue constamment tout au long de l'expérience.





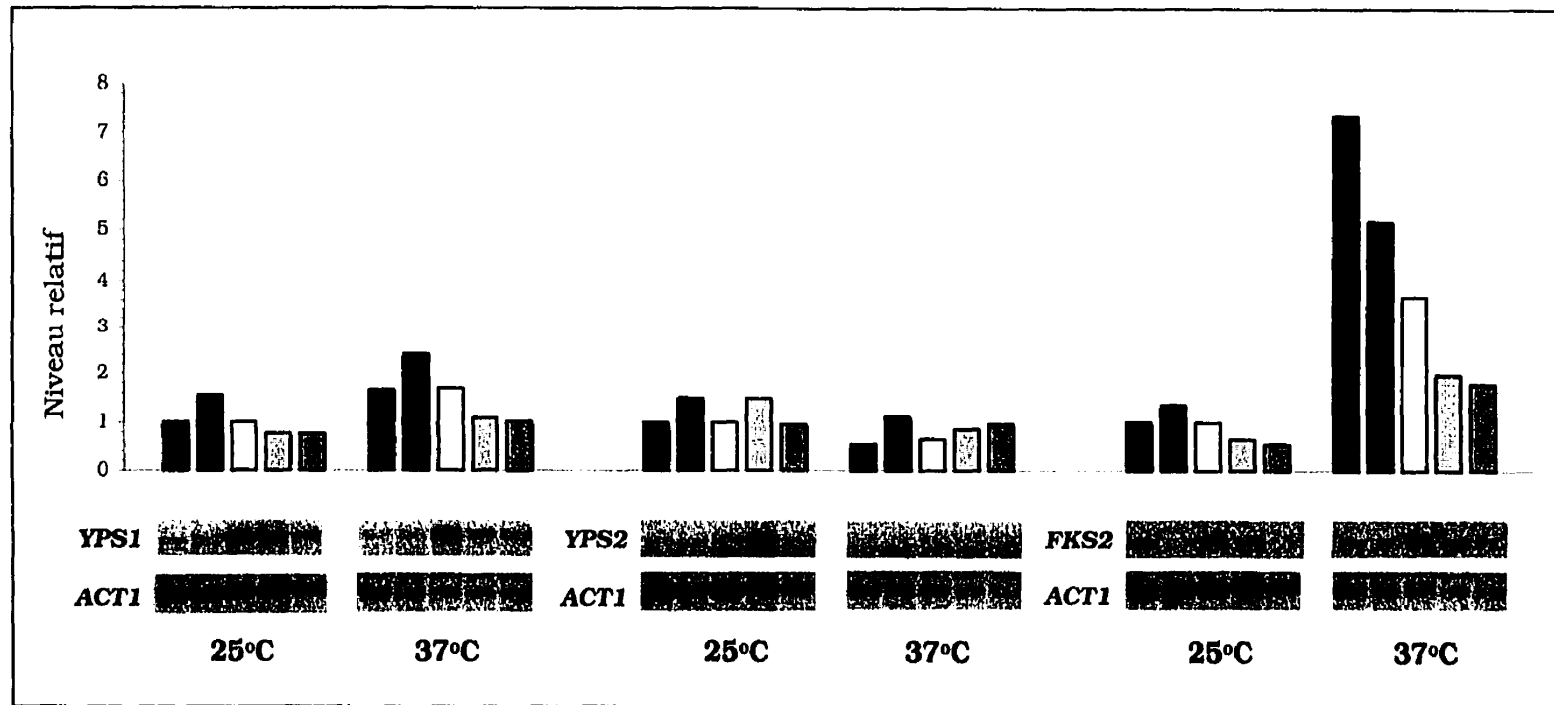
**Figure 9. Niveaux d'expression de messagers dans le cycle cellulaire.** Les niveaux de messagers furent détectés par hybridation de sondes radioactives, homologues aux gènes indiqués, avec le buvardage northern des ARN totaux prélevés à toutes les 12 min sur une durée de 180 min chez une culture synchronisée au facteur  $\alpha$  de la souche K2944-1B. Les données correspondent aux ARN prélevés aux temps 12 à 168 min. Les signaux furent visualisés et quantifiés à l'aide du système BioImaging de Fuji.

### 3.1.2. Régulation transcriptionnelle lors de stress

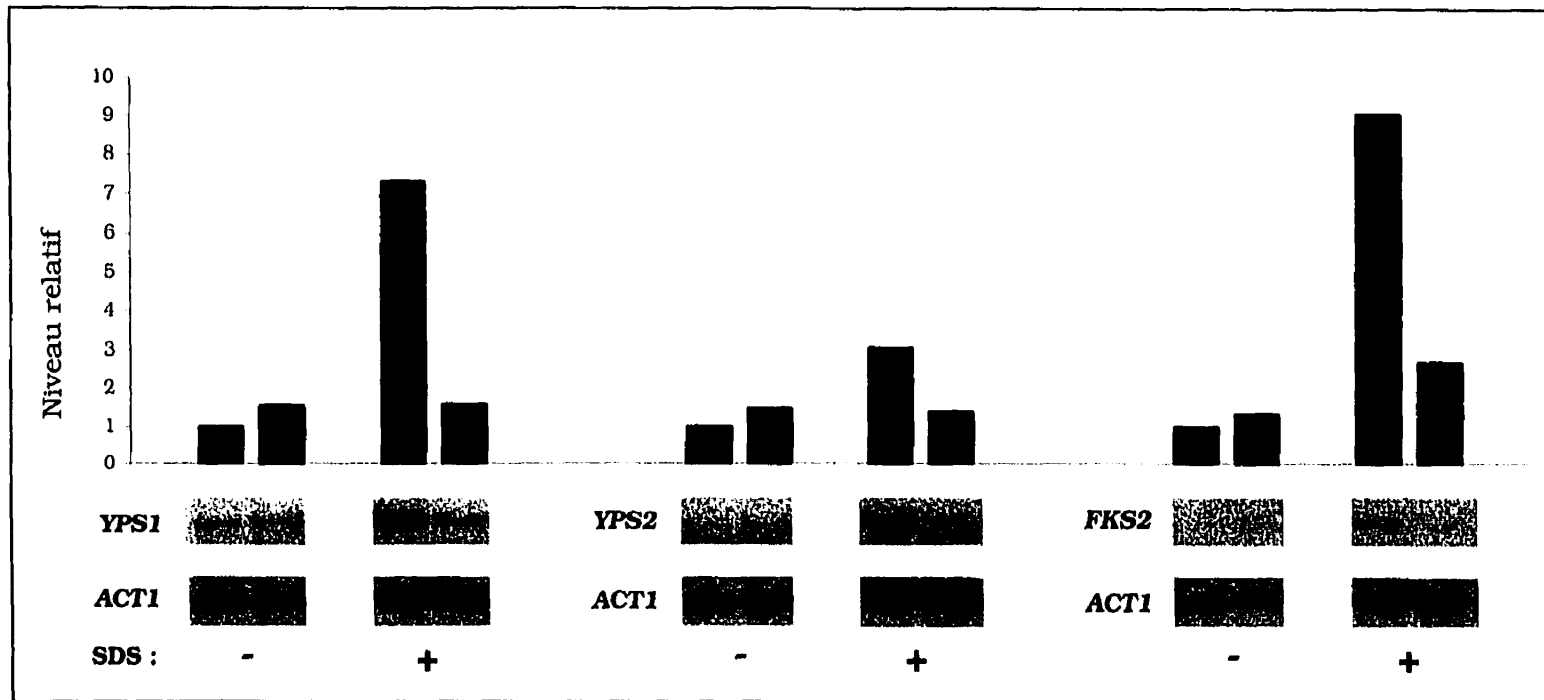
Plusieurs stress sont connus pour stimuler la cellule à épaissir ou modifier sa paroi. Nous avons utilisé ce principe afin de déterminer si l'expression de *YPS1* ou de son homologue *YPS2* est stimulée lors de certains de ces stress. De plus, tirant avantage des connaissances déjà acquises quant à l'implication des voies de PKC et de la calcineurine dans l'activation de *FKS2*, codant pour la sous-unité de la  $\beta$ -1,3-glucan synthétase exprimée en condition de stress, j'ai utilisé des mutants de ces voies (*mpk1* $\Delta$ , *cnb1* $\Delta$  et *crz1* $\Delta$ ) pour vérifier si l'expression de *YPS1* nécessite des voies de PKC ou de la calcineurine fonctionnelles. *Mpk1* est une kinase impliquée dans la voie de PKC, *Cnb1* est la sous-unité B régulatrice de la calcineurine et *Crz1* est un facteur de transcription activé par la calcineurine (voir section 1.1.3.2).

La Figure 10 montre les résultats obtenus lorsque la levure se trouve en condition de croissance à une température extrême, soit 37°C. Dans cette condition, les levures réagissent en augmentant l'épaisseur de leur paroi. Ceci se reflète dans l'activation de *FKS2*. Nous avons en effet observé que *FKS2* est fortement stimulé (7 et 4 fois les valeurs des cellules sauvages incubées à 25°C) dans cette condition. L'expression de *FKS2* chez les mutants est légèrement inférieure à celle retrouvée chez les souches sauvages. Pour sa part, *YPS1* montre une légère augmentation de son expression soit 1,6 fois son expression normale. On remarque une légère augmentation de l'expression de *YPS1* pour le mutant *mpk1* $\Delta$  par rapport au type sauvage et une petite diminution pour les mutants *cnb1* $\Delta$  et *crz1* $\Delta$  comparativement aux types sauvages. Pour son homologue *YPS2* par contre, l'expression ne semble pas affectée par une augmentation de la température.

Le SDS est un agent aussi utilisé pour stimuler les cellules à produire de la paroi (Bickel *et al.*, 1998). Le SDS a une forte affinité pour les protéines (1,4 g/g de protéine), en s'y fixant il les déstabilise et les dénature. Les protéines de la paroi et de l'espace périplasmique sont celles les plus exposées au milieu, donc les plus susceptibles d'être affectées par le SDS. Pour contrer ces effets, la cellule augmente, entre autres, l'épaisseur de sa paroi en activant la voie de PKC. La Figure 11 montre les niveaux d'expression de *YPS1*, de son homologue *YPS2* ainsi que celle de *FKS2* lorsque les cellules sont mises en présence d'une faible concentration de SDS (0,005%). Les niveaux d'expression des trois gènes observés ont augmenté de façon significative en réponse à la présence de SDS. Le niveau d'expression de *YPS1* a augmenté de sept fois, celui de *YPS2* trois fois et celui de *FKS2* neuf fois par rapport aux cellules sauvages qui n'ont pas été en contact avec le SDS. De plus, il semble clair que la présence d'une voie de PKC fonctionnelle est un prérequis à l'activation des trois gènes puisque leurs niveaux d'expression chutent dramatiquement chez le mutant *mpk1* $\Delta$ .



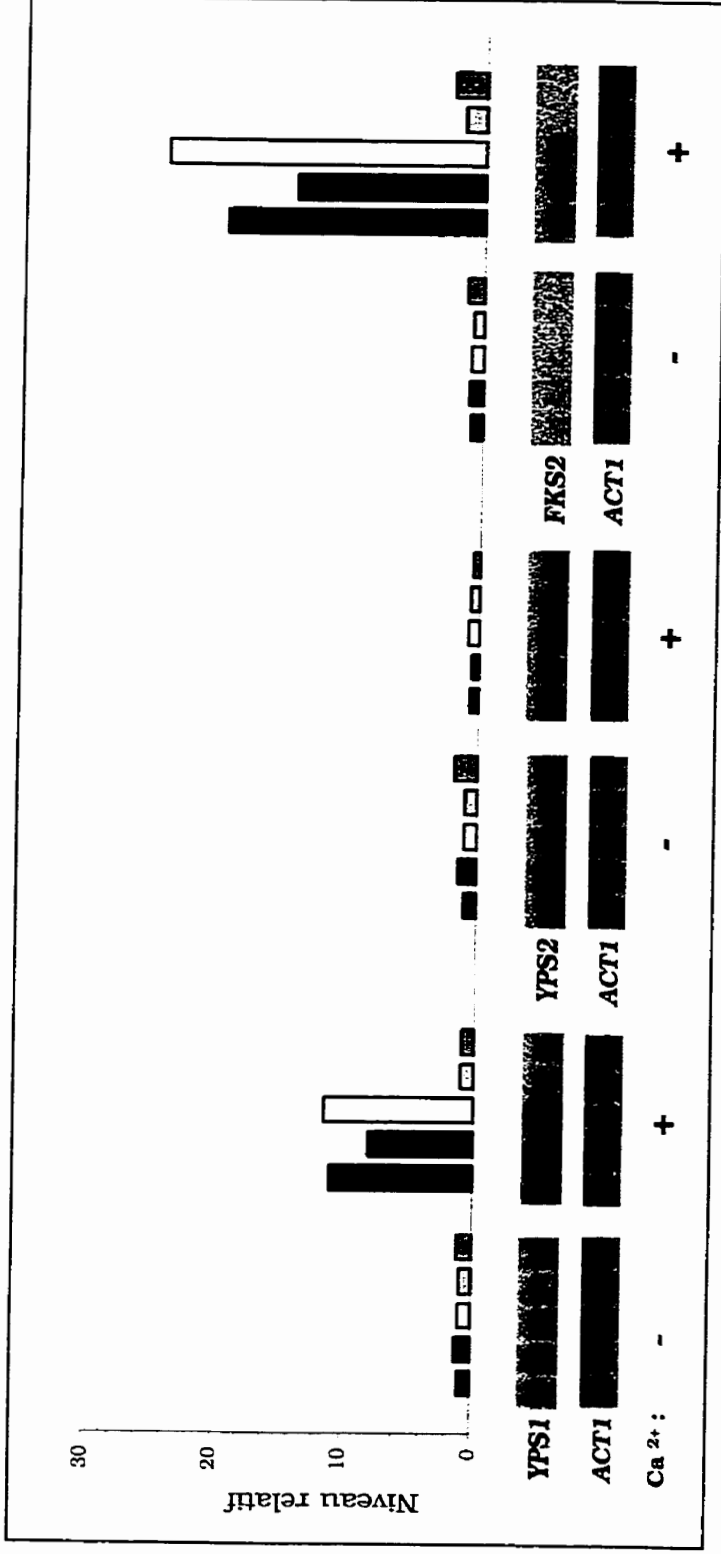
**Figure 10. Comparaison de niveaux de messagers chez des mutants des voies de PKC et de calcineurine en condition de croissance à température extrême.** Les niveaux de messagers furent détectés par hybridation de sondes radioactives, homologues aux gènes indiqués, avec le buvardage northern des ARN totaux prélevés chez des cultures en phase exponentielle de croissance des souches 1783 (wt), DL456-3B (*mpk1Δ*), YPH499 (wt), MCY3-1D (*cnb1Δ*) et ASY472 (*crz1Δ*) incubées 2 h à 25°C et 37°C. Les signaux obtenus furent visualisés et quantifiés à l'aide du système BioImaging de Fuji. Les niveaux de YPS1, YPS2 et FKS2 furent normalisés en fonction de ceux d'ACT1 servant de référence quant à la quantité d'ARN présente sur la membrane. Les niveaux normalisés de YPS1, YPS2 et FKS2 pour les souches sauvages (wt) incubées à 25°C furent désignés arbitrairement comme ayant une valeur de 1.



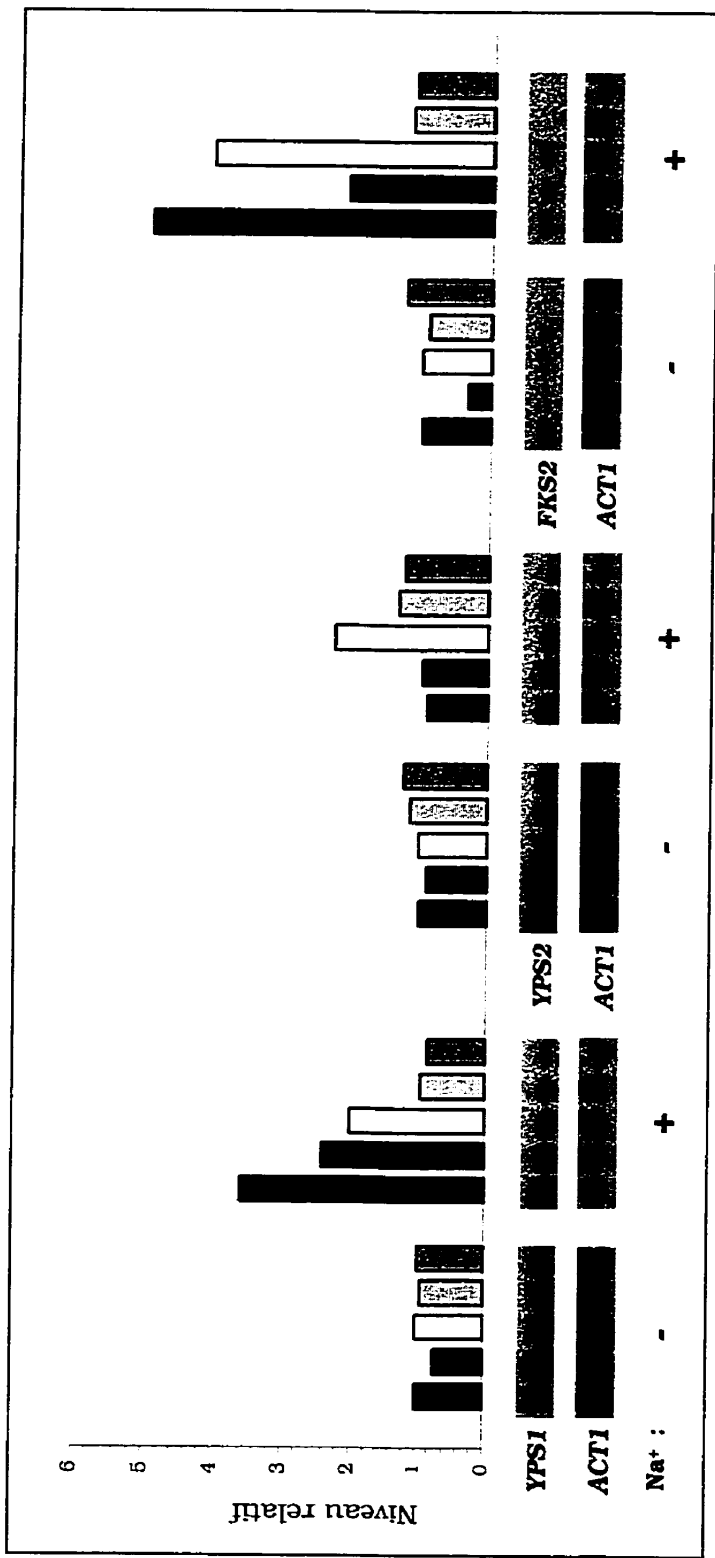
**Figure 11. Comparaison de niveaux de messagers chez des mutants des voies de PKC et de calcineurine affectés au niveau de la paroi par la présence de SDS 0,005 %.** Les niveaux de messagers furent détectés par hybridation de sondes radioactives, homologues aux gènes indiqués, avec le buvardage northern des ARN totaux prélevés chez des cultures en phase exponentielle de croissance des souches 1783 ■ (wt) et DL456-3B ▨ (*mpk1Δ*) incubées 2 h à 25°C en présence et en absence de SDS 0,005%. Les signaux obtenus furent visualisés et quantifiés à l'aide du système BioImaging de Fuji. Les niveaux de *YPS1*, *YPS2* et *FKS2* furent normalisés en fonction de ceux d'*ACT1* servant de référence quant à la quantité d'ARN présente sur la membrane. Les niveaux normalisés de *YPS1*, *YPS2* et *FKS2* pour la souche sauvage (wt) incubée en absence de SDS furent désignés arbitrairement comme ayant une valeur de 1.

Le calcium sous sa forme ionisée ( $\text{Ca}^{2+}$ ) est utilisé de façon générale par les cellules eucaryotes comme un second messenger intracellulaire. Normalement séquestré dans certaines organelles comme le réticulum endoplasmique ou les vésicules de sécrétion, celui-ci est libéré au moment opportun afin d'activer certaines protéines, comme PKC (Protéine Kinase Calcium dépendante), activant à leurs tours des voies métaboliques ou de signalisation (Darnel *et al.* 1993). Le niveau cytosolique se maintient normalement en dessous de  $0,2 \mu\text{M}$  et lorsque celui-ci dépasse  $1 \mu\text{M}$  une panoplie de réponses cellulaires s'amorcent. Par l'ajout de  $\text{CaCl}_2$  dans le milieu, il est possible d'augmenter le taux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et d'observer son effet sur le niveau d'expression de différents gènes. Comme le montre la Figure 12, il y a une forte expression de *FKS2* et d'*YPS1* en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . Le gène *FKS2* voit son niveau augmenter de 20-25 fois, comparativement à environ 11 fois pour le gène *YPS1*. Dans les deux cas, la stimulation de l'expression de *YPS1* et de *FKS2* par le  $\text{Ca}^{2+}$  chute légèrement chez le mutant de la voie de PKC (*mpk1Δ*) et plus dramatiquement chez les mutants de la voie de calcineurine (*cnb1Δ* et *crz1Δ*). Quant à *YPS2*, son expression n'est pas influencée par l'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Les chocs osmotiques impliquent également une réorganisation de la paroi chez la levure. Dans son environnement naturel, la levure est exposée à des variations de l'osmolarité de son milieu. Lors d'un choc hyperosmotique, celle-ci accumule du glycérol pour restaurer le gradient osmotique et induit des modifications au niveau de sa paroi (Davenport *et al.*, 1995). La Figure 13 montre les niveaux d'expression de *FKS2* et des deux gènes *YPS* à l'étude lorsque les cellules sont placées en milieu hypertonique. L'expression de *FKS2* se voit augmenter de 4 à 5 fois dans ces conditions. Le gène *YPS1*, quant à lui, voit son expression augmenter de 2 à 3,6 fois. L'expression de ces deux gènes semble modulée par la voie de calcineurine puisque dans les deux cas leurs niveaux chutent à la normale chez les mutants *cnb1Δ* et *crz1Δ*. Les résultats obtenus avec le gène *YPS2* pour les types sauvages sont contradictoires, il n'est donc pas possible de conclure si l'expression de *YPS2* est activée par le choc osmotique.



**Figure 12. Comparaison de niveaux de messagers chez des mutants des voies de PKC et de calcineurine en présence de Ca<sup>2+</sup>.** Les niveaux de messagers furent détectés par hybridation de sondes radioactives, homologues aux gènes indiqués, avec le buvardage northern des ARN totaux prélevés chez des cultures en phase exponentielle de croissance des souches 1783 (wt), DL456-3B (mpk1Δ), YPH499 (wt), MCV3-1D (crz1Δ) et ASY472 (crz1Δ) incubées 20 min à 25°C en présence et en absence de CaCl<sub>2</sub> 30 mM. Les signaux obtenus furent visualisés et quantifiés à l'aide du système BioImaging de Fuji. Les niveaux de YPS1, YPS2 et FKS2 furent normalisés en fonction de ceux d'ACT1 servant de référence quant à la quantité d'ARN présente sur la membrane. Les niveaux normalisés de YPS1, YPS2 et FKS2 pour les souches sauvages (wt) incubées en absence de sel furent désignés arbitrairement comme ayant une valeur de 1.



**Figure 13. Comparaison de niveaux de messagers chez des mutants des voies de PKC et de calcineurine placés en milieu hypertonique.** Les niveaux de messagers furent détectés par hybridation de sondes radioactives, homologues aux gènes indiqués, avec le buvardage northern des ARN totaux prélevés chez des cultures en phase exponentielle de croissance des souches 1783 (wt), DL456-3B (*mpk1Δ*), YPH499 (wt), MCY3-1D (*cnb1Δ*) et ASY472 (*crz1Δ*) incubées 4 h à 25°C en milieu frais contenant et ne contenant pas de NaCl à 1 M. Les signaux obtenus furent visualisés et quantifiés à l'aide du système BioImaging de Fuji. Les niveaux de YPS1, YPS2 et FKS2 furent normalisés en fonction de ceux d'ACT1 servant de référence quant à la quantité d'ARN présente sur la membrane. Les niveaux normalisés de YPS1, YPS2 et FKS2 pour les souches sauvages (wt) incubées en absence de sel furent désignés arbitrairement comme ayant une valeur de 1.

### 3.2. Régulation post-traductionnelle du gène *YPS1*

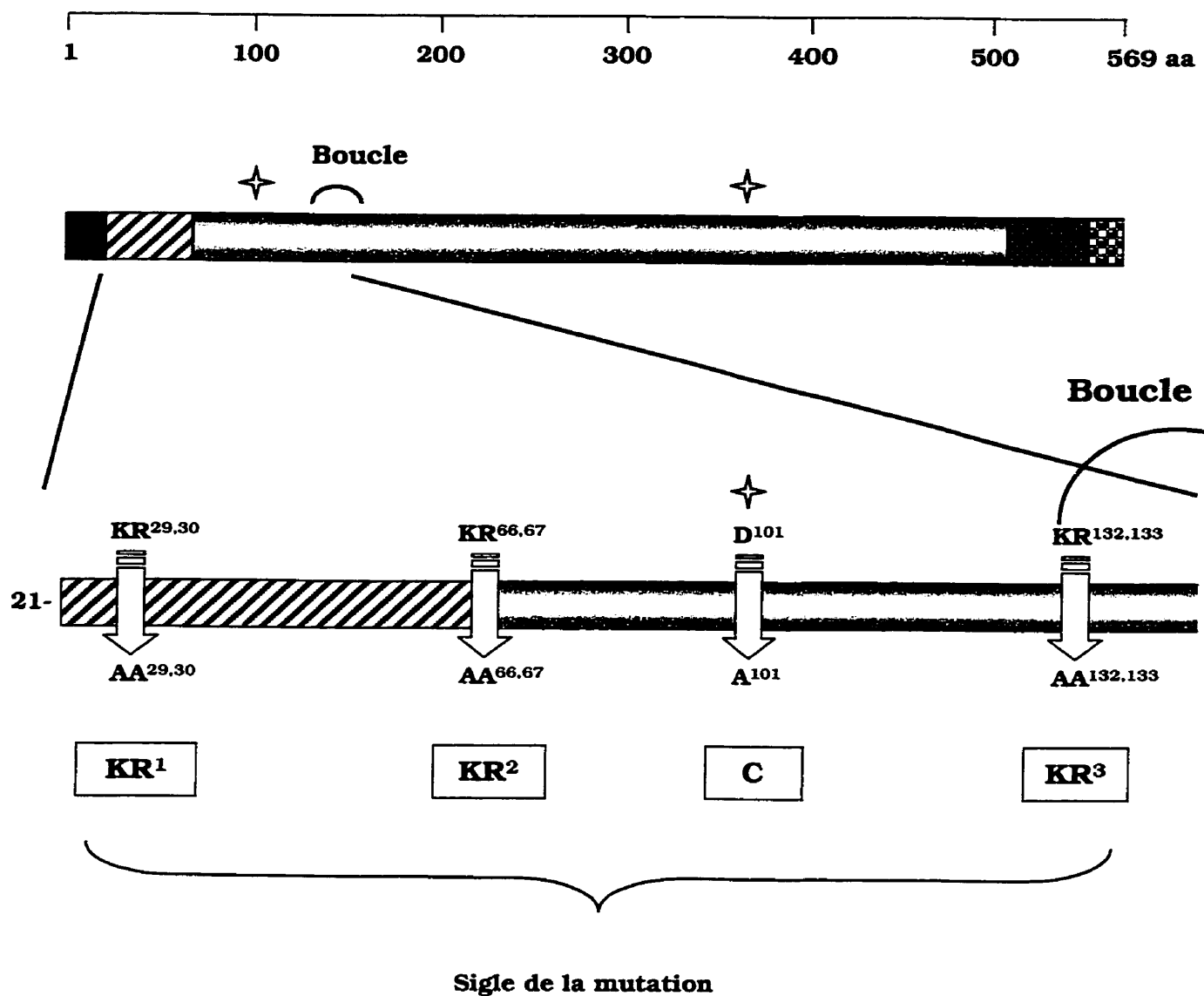
Comme c'est le cas de la plupart des protéases empruntant la voie de sécrétion, il est probable que Yps1 soit initialement synthétisée sous une forme zymogène. Cette hypothèse est d'ailleurs soutenue par la présence d'une séquence en N-terminale de Yps1 (prorégion) montrant très peu de similarité avec les autres membres de la famille des aspartyl protéases. De plus, cette région est bordée par une paire d'aa basiques qui pourrait constituer un site de clivage pour l'activation endoprotéolytique de la forme zymogène. Nous avons donc entrepris de tester cette hypothèse et, le cas échéant, d'étudier son mécanisme d'activation à l'aide des techniques du génie génétique comme la mutagenèse dirigée.

#### 3.2.1. Étude du mécanisme d'activation de l'endoprotéase Yapsine 1 par mutagenèse de sites potentiels de maturation et du site catalytique

Pour comprendre le processus d'activation de l'endoprotéase yapsine 1, nous avons introduit des mutations bien précises dans le gène *YPS1*. Les mutations choisies visent à modifier des sites potentiels de maturation du zymogène, suggérés par l'alignement de séquence avec les autres membres de la famille Yps, ainsi qu'un des deux résidus aspartate du site actif de l'enzyme. L'expression de ces variants de Yps1 dans des souches *yps1Δ* permet d'étudier l'effet des mutations sur son activité *in vivo* et sur sa taille apparente en buvardage western. Nous avons également produit une version sécrétée de yapsine 1 (Yps1-H) et de ses variants afin de les purifier pour étudier leur activité *in vitro*, évaluer leurs tailles en buvardage western et déterminer leurs séquences N-terminales.

Les modifications apportées à Yps1 par mutagenèse et la nomenclature choisie pour les identifier dans ce mémoire sont présentées à la Figure 14. Deux types de vecteur d'expression ont été utilisés pour étudier l'effet des mutations sur l'activité et la maturation de Yps1 : pRS316 et pRS426. Le plasmide pRS316 possède une origine de répllication centromérique qui le soumet aux règles qui régissent la répllication des chromosomes. Donc, dans les cellules haploïdes on retrouve une seule copie du plasmide avec le gène d'intérêt. Ceci est souhaitable lorsqu'on veut être le plus près possible des conditions normales d'expression du gène. Le plasmide pRS426 quant à lui possède l'origine de répllication  $2\mu$  qui favorise la multiplication du plasmide, on retrouve généralement 20 à 30 copies par cellules des plasmides qui possèdent cette origine de répllication. Les plasmides multicopies sont utiles pour identifier des supresseurs de d'autres mutations ou pour étudier l'effet de la surexpression d'un gène en particulier. Dans chacune des constructions, nous avons pris soin d'inclure les régions 5' et 3'





**Figure 14. Représentation schématique des mutations introduites dans yapsin 1 pour l'étude de son mécanisme d'activation.** Les mutations introduites sont situées dans la prorégion et la sous-unité  $\alpha$  agrandies sur le schéma. Les mutations ont été identifiées par un sigle et les plasmides possédant une copie mutée du gène *YPS1* portent, à la suite du tiret, le ou les sigles correspondants aux mutations (ex.: pCY1-KR<sup>1,2</sup>C serait le plasmide pCY1 dont la copie du gène *YPS1* exprime la protéase mutée aux KR<sup>29,30</sup> et KR<sup>66,67</sup> ainsi qu'au site catalytique D<sup>101</sup>). Peptide signal (■); pro-peptide (▨); domaine catalytique (□); Asp catalytique (✦); région riche en Ser/Thr (■); région hydrophobique (▣).

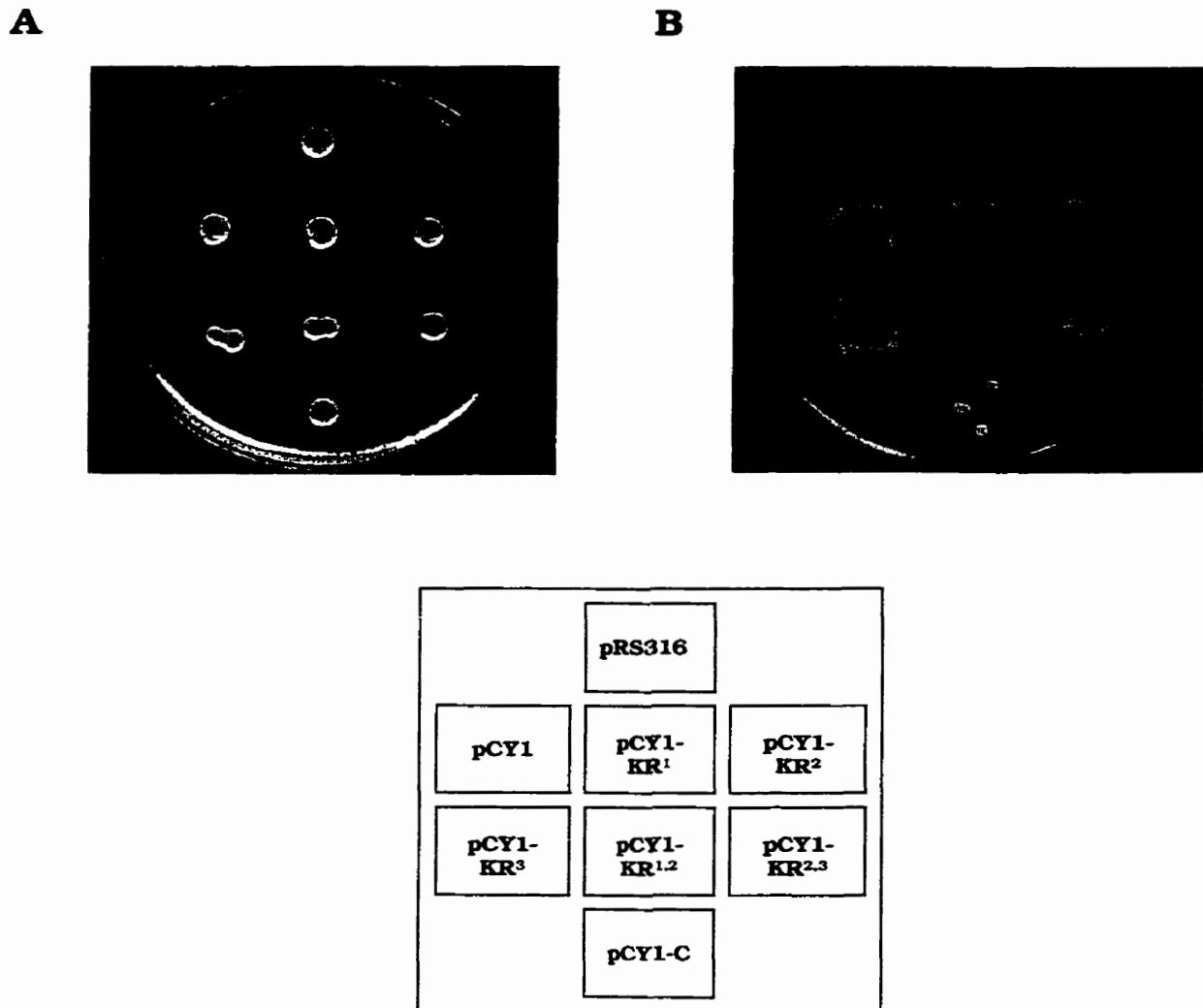
du gène *YPS1* (650 pb en amont du codon initiateur et 275 pb en aval du codon stop, correspondant au fragment de restriction *Sall-XbaI*) afin que son expression plasmidique soit régulée comme la copie chromosomique.

L'analyse des extrémités N-terminales de Yps1 et de ses variants ainsi que l'analyse de leur activité *in vitro* ne pouvaient être possibles qu'en travaillant avec des formes purifiées. L'avenue la plus simple pour purifier Yps1 et ses mutants était d'empêcher l'ancrage de la protéase à la membrane et d'y ajouter un épitope qui faciliterait sa purification. La construction choisie consiste en une délétion des codons 503 à 569, représentant les aa situés dans la région riche en sérine/thréonine et celle impliquée dans l'ancrage à la membrane, et d'y ajouter six codons histidine (His-Tag) (Mayaki, D., 1998). Le His-Tag permet de purifier la protéine à l'aide d'une chromatographie d'affinité au nickel qui possède une forte affinité pour les histidines chargées. La production massive de Yps1-H et de ses variants pour la purification a été assurée par son expression sous le promoteur de l'ADH (promoteur à forte expression constitutive de l'alcool déshydrogénase) dans le vecteur multicopie pVT101u.

### **3.2.1.1. Effets des mutations introduites dans *YPS1* sur l'activité endoprotéolytique spécifique à yapsine 1**

#### **3.2.1.1.1. Effets sur la maturation de la prosomatostatine-facteur $\alpha$**

La maturation au site monobasique de la protéine de fusion prosomatostatine-facteur  $\alpha$  est dépendante de Yps1 chez la levure (Bourbonnais *et al.*, 1993). Lorsque cette protéine de fusion est surexprimée chez une souche MAT $\alpha$  *yps1* $\Delta$  *mf $\alpha$ 1*/ $\alpha$ 2 $\Delta$  (YBAD1), la sécrétion de facteur  $\alpha$  mature est à peine détectable. Une copie du gène *YPS1* réintroduit dans le délétant à l'aide d'un vecteur centromérique rétablit la maturation efficace du précurseur. J'ai exploité cette caractéristique pour évaluer l'activité *in vivo* des variants de yapsine 1. La Figure 15 montre les niveaux de facteur  $\alpha$  produits par les souches transformées avec le vecteur d'expression de la prosomatostatine-facteur  $\alpha$  et un vecteur centromérique exprimant *YPS1* ou un de ses variants. Les souches exprimant une copie fonctionnelle de l'endoprotéase provoquent une zone d'inhibition de croissance des cellules hypersensibles MAT $\alpha$  *sst1*/*sst2* $\Delta$  (M200-6C) induit par la présence de facteur  $\alpha$  mature (Figure 16 A). Ces mêmes souches ont été placées en présence de cellules de type sexuel opposé (*his1a*) afin d'évaluer si elles produisaient suffisamment de facteur  $\alpha$  pour induire la conjugaison. Par complémentation génétique, seules les cellules diploïdes ont la capacité de croître sur le milieu minimal (SD) où elles ont été répliquées (Figure 16 B). Les deux essais mènent aux mêmes résultats, les cellules



**Figure 15. Détection de facteur  $\alpha$  mature chez des souches exprimant une copie d'*Yps1* ou ses variants.** La souche YBAD1 (*yps1 $\Delta$* ) fut conjointement transformée avec pS3C et pCY1 ou un de ses variants. Les cellules furent ensuite testées (A) pour la formation de zones d'inhibition de croissance sur un tapis de cellules M200-6C hypersensibles au facteur  $\alpha$  ainsi que (B) pour la conjugaison sexuelle avec des cellules *his1a*.

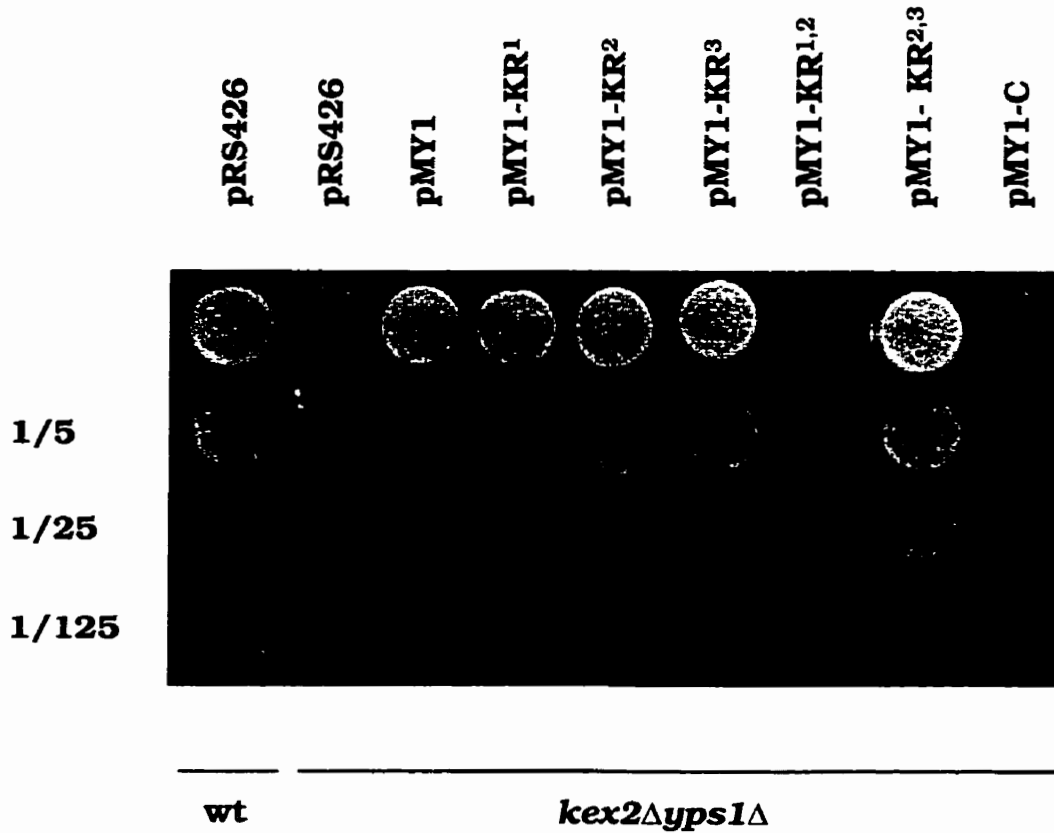
transformées avec pCY1-KR<sup>1,2</sup> et pCY1-C montrent des zones et une capacité de conjugaison semblable à celle des cellules transformées avec le vecteur sans insert. Donc, seuls les variants de Yps1 étant mutés aux deux sites potentiels de maturation KR<sup>29,30</sup> et KR<sup>66,67</sup> (i.e. KR<sup>1,2</sup>) ou au site catalytique (i.e. C) semblent affecter l'activité *in vivo* de l'endoprotéase.

### **3.2.1.1.2. Effets sur la correction d'un phénotype associé à l'endoprotéase Kex2**

Un mutant *kex2Δ* montre des difficultés à croître à des températures extrêmes pour la levure. Plus particulièrement, son défaut de croissance à 16°C a permis d'identifier le premier homologue de *YPS1* soit *MKC7* (*YPS2*) comme étant un suppresseur multicopie du défaut de croissance à basse température du délétant *kex2Δ* (*multicopy suppressor of kex2 cold sensitivity*; Komano et Fuller, 1995). Bien que *YPS1* soit légèrement moins efficace que *YPS2* pour la correction de ce phénotype, sa correction est assez évidente pour utiliser ce test comme un autre essai *in vivo* de l'activité des variants de *YPS1*. De plus, cet essai est d'autant plus intéressant qu'il n'implique aucun substrat exogène à la levure. La Figure 16 expose les résultats obtenus du double mutant *kex2Δyps1Δ* (YBAD8) exprimant, à l'aide d'un vecteur multicopie, *YPS1* ou un de ses variants. J'ai utilisé un double délétant afin de ne pas introduire de copie sauvage de *YPS1* chez les variants. Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus pour la maturation *in vivo* de la prosomatostatine-facteur  $\alpha$ . La croissance des cellules transformées avec pMY1-KR<sup>1,2</sup> et pMY1-C s'est effectuée au même rythme que celles transformées avec le vecteur sans insert. Par contre, la croissance des autres transformants s'est déroulée à la même vitesse que celle de la souche sauvage (wt). Donc lorsque des mutations aux sites potentiels de maturation KR<sup>29-30</sup> et KR<sup>66-67</sup> sont combinées (KR<sup>1,2</sup>) ou en absence d'un site catalytique fonctionnel (mutation C), la protéase Yps1 ne peut corriger le phénotype à 16°C du mutant *kex2Δ*.

### **3.2.1.2. Analyse électrophorétique de l'effet des mutations introduites dans Yps1 sur son expression et sa maturation**

Afin de s'assurer que tous les variants étaient bien exprimés par tous les vecteurs utilisés, nous en avons fait l'analyse en buvardage western. L'analyse des variants de Yps1 en buvardage western n'aurait pu être possible sans les anticorps polyclonaux anti-Yps1. Les anticorps anti-Yps1 ont été générés avec un peptide dont la séquence correspond aux codons 35 à 246 de Yps1 (Ash *et al.*, 1995). L'anti-Yps1 utilisé fut testé contre des extraits protéiques provenant du mutant *yps1Δ* transformé avec pRS316, pRS426 et pVT101u et dans les



**Figure 16. Correction du défaut de croissance à 16°C d'un mutant de maturation endoprotéolytique par l'expression multicopie d'Yps1 ou ses variants.** Des cultures de la souche YBAD8 (*kex2Δyps1Δ*) transformée avec pMY1 ou un de ses variants furent amenées en phase exponentielle de croissance, ajustées à 1 UA par ml et diluées trois fois 1/5 en série puis déposées en secteurs sur un pétri de SC-URA\_16°C à raison de 5 µl par dépôt et incubées 6 jours à 16°C. À gauche apparaît la souche W303-1B (wt), dans laquelle la double délétion a été effectuée, transformé avec le vecteur sans insert.

conditions de détection utilisées, aucun signal n'est observable. Comme on le sait, Yps1 est une protéine largement glycosylée. Les sucres de la protéine interfèrent avec sa migration sur SDS-PAGE rendant difficile son analyse. Les sucres ajoutés sur les protéines sont de deux natures, soit ils sont liés à des sérines ou des thréonines (*O*-glycosylation), ou à une arginine (*N*-glycosylation). Une endoglycosidase recombinante disponible commercialement (Endo H<sub>f</sub>) nous permet d'éliminer les sucres *N*-liés de nos échantillons protéiques. Ceci améliore grandement la migration des protéines hyperglycosylées sur SDS-PAGE. Cependant, nous ne disposons pas de traitement pour éliminer la *O*-glycosylation. La plupart des échantillons analysés furent traités à l'Endo H<sub>f</sub> pour leur analyse sur gel. Les agents réducteurs comme le DTT et le  $\beta$ -mercaptoéthanol, servant à rompre les liens disulfures, sont également utilisés d'emblée lors du traitement des échantillons protéiques pour améliorer leur migration en SDS-PAGE.

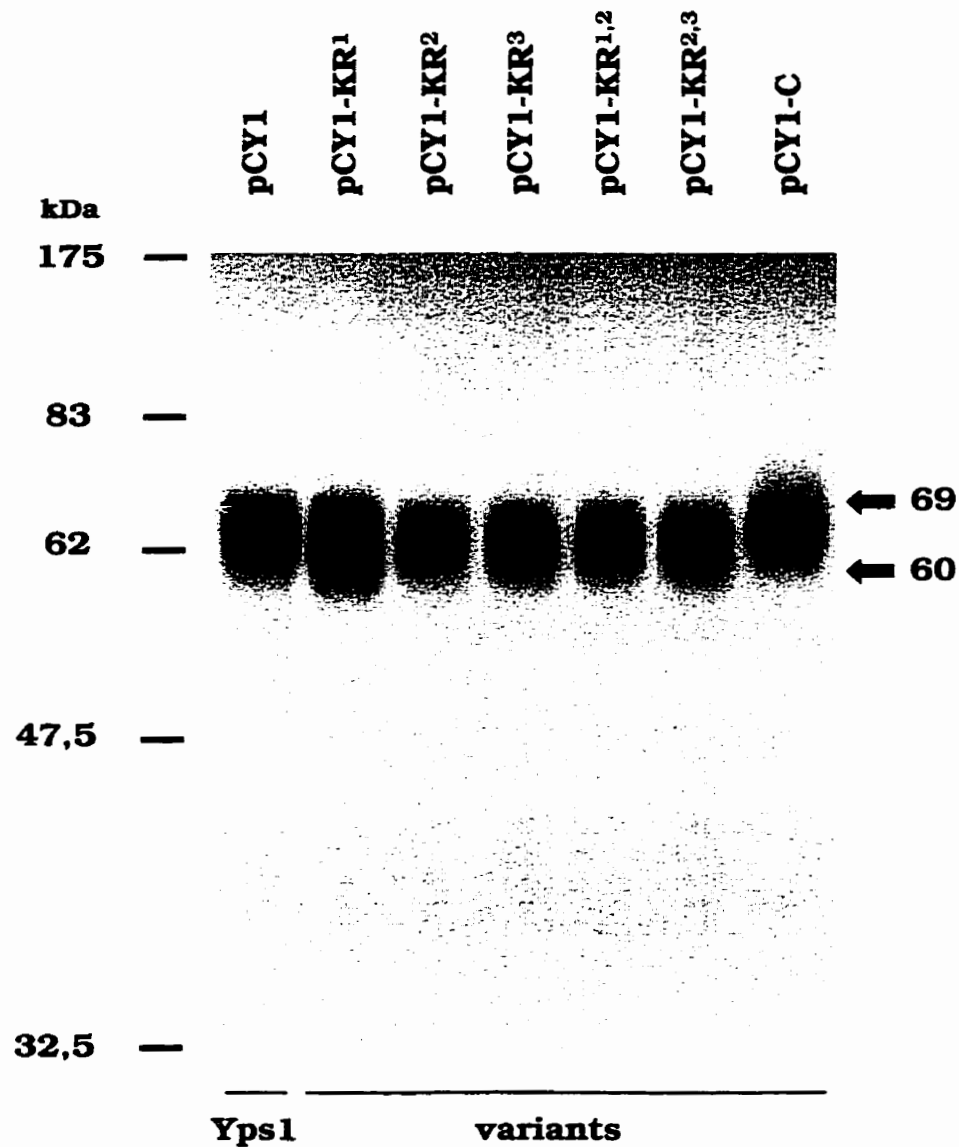
### **3.2.1.2.1. Analyse des variants d'Yps1 exprimées avec le vecteur centromérique**

Nous avons analysé en buvardage western les extraits protéiques déglycosylés et séparés par SDS-PAGE en présence de DTT des différents variants de Yps1 exprimés par le vecteur centromérique chez un mutant *yps1Δ* (Figure 17). On observe dans chacun des puits une tache étendue comprise entre 60 et 69 kDa de masse moléculaire ce qui témoigne de l'hétérogénéité de Yps1. Plusieurs facteurs peuvent être responsables de cette hétérogénéité dont la *O*-glycosylation et des protéolyses partielles (voir section 3.2.1.2.3.). Ces résultats nous indiquent cependant que tous les variants semblent efficacement exprimés par les cellules transformées et donc, que les différences d'activité suggérées par les essais biologiques ne sont pas causées par l'instabilité de certains variants.

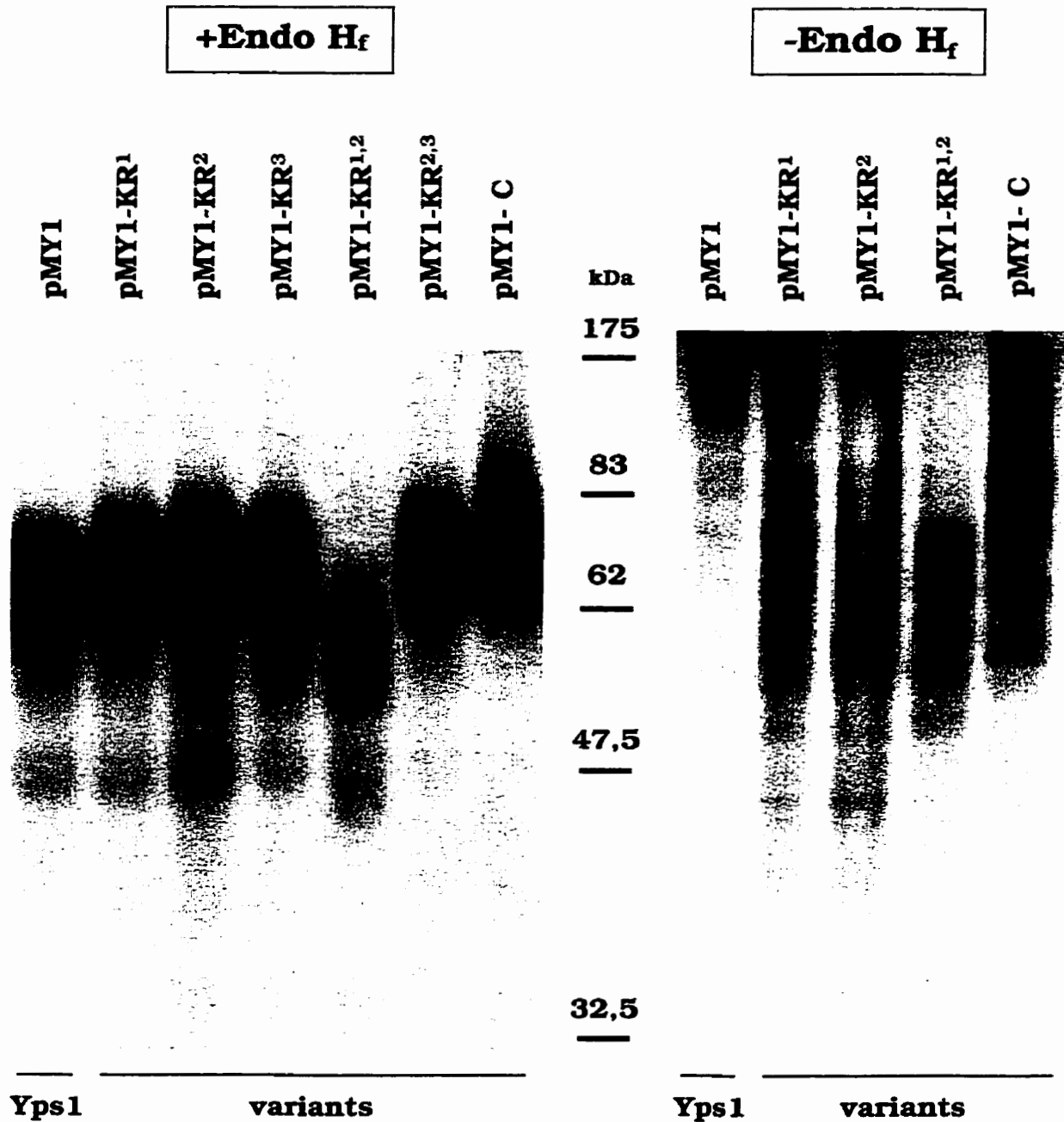
### **3.2.1.2.2. Analyse des variants de Yps1 exprimées avec le vecteur multicopie**

#### **3.2.1.2.2.1. Formes intracellulaires et périplasmiques**

L'analyse western des variants de Yps1 exprimées par un vecteur multicopie (Figure 18) montre pour sa part des taches plus intenses et de masse moléculaire légèrement plus étendues que celles retrouvées lors de l'analyse des variants exprimés par un vecteur centromérique (Figure 17). La protéine sauvage présente une tache majeure comprise entre 60 et 74 kDa. Les variants déglycosylés portant les mutations KR<sup>1</sup>, KR<sup>2</sup>, KR<sup>3</sup> ou KR<sup>23</sup> présentent des taches similaires à la protéine sauvage sauf qu'elles s'étendent jusqu'à environ 80 kDa. De



**Figure 17. Analyse en buvardage western des variants de yapsine 1 exprimés avec le vecteur centromérique.** Une détection par immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre yapsin 1 fut réalisée sur le buvardage western des extraits protéiques préparés à partir de YBAD1 (*yps1Δ*) transformée avec pCY1 ou un de ses variants. Avant leur électrophorèse sur SDS PAGE 10%, les échantillons protéiques ajustés à 33  $\mu$ g furent traités à l'endo H<sub>f</sub> en présence de DTT.



**Figure 18. Comparaison de la taille déglycosylée (+Endo H<sub>f</sub>) et glycosylée (-Endo H<sub>f</sub>) des variants de yapsine 1 retrouvés dans les extraits cellulaires lorsque exprimés avec le vecteur multicopie.** Une détection par immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre yapsin 1 fut réalisée sur le buvardage western des extraits protéiques préparés à partir de YBAD1 (*yps1Δ*) transformée avec pMY1 ou ses variants. Avant leur séparation en SDS PAGE 10%, les échantillons protéiques ajustés à 33 μg furent dénaturés en présence de DTT puis traités ou non à l'endo H<sub>f</sub>.



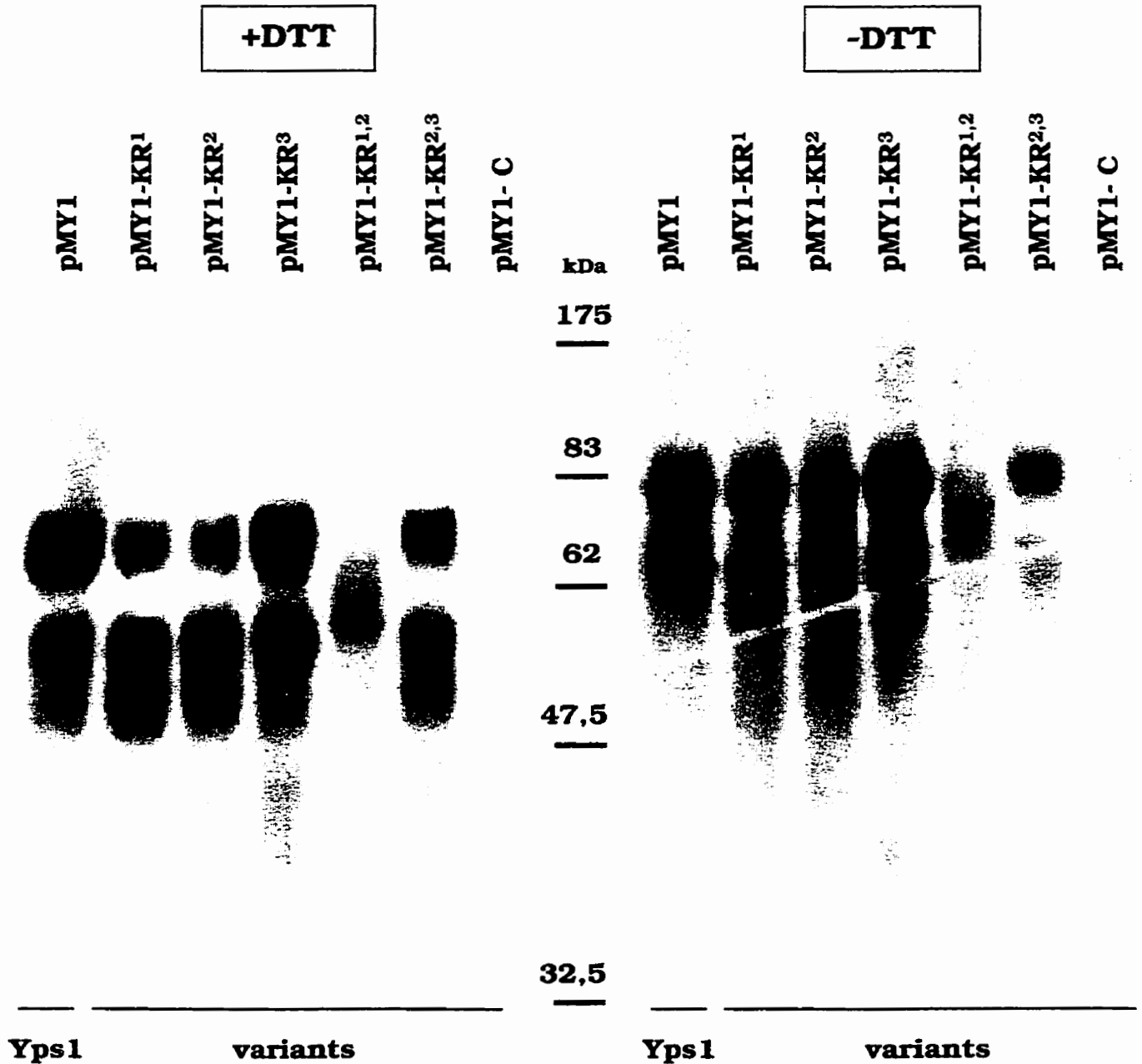
même, la mutation du site catalytique a généré des protéines de tailles encore plus élevées comprises entre 63 et 91 kDa. L'observation la plus étonnante cependant est que la protéine mutée aux deux sites potentiels de maturation (KR<sup>1,2</sup>) montre une masse moléculaire moyenne très différente lorsque le gène est exprimé en plusieurs copies (Figure 18) comparativement à une seule copie (Figure 17). La taille de la forme majeure de ce variant (~57 kDa) est plus petite et correspond à une forme mineure de Yps1 observée chez tous les variants de Yps1. Il y a deux causes possibles pouvant expliquer la différence de taille observée entre ce mutant et les autres variants. Soit la différence représente une modification au niveau de la protéine elle-même ou au niveau des sucres qui lui sont ajoutés.

Il est connu que la protéine Yps1 mature est largement hyperglycosylée, formant sur gel une tache diffuse migrant à environ 160 kDa (Ash *et al.*, 1995). La maturation des oligosaccharides *N*-liés s'effectue au Golgi et consiste essentiellement à l'addition de résidus mannoses. Certains oligosaccharides *N*-liés sont préférentiellement allongés pour former des glycoprotéines hypermannosylées (mannoprotéines) avec des chaînes latérales pouvant contenir plus de 200 résidus mannoses (Dean, 1999). Autant chez la levure que chez les mammifères, les protéines qui empruntent la voie de sécrétion adoptent leur structure tertiaire finale dans le RE. Les conditions qui induisent l'accumulation de protéines et de glycoprotéines repliées de façon incorrecte au RE active une réponse conduisant à l'augmentation de la synthèse de chaperonnes et de d'autres protéines accessoires. Les protéines qui n'arrivent toujours pas à être repliées correctement ne sont pas transportées au Golgi et sont d'abord retenues au RE pour éventuellement être acheminées au cytosol où elles sont dégradées au protéosome (Parodi, 1999). L'analyse des extraits non traités à l'endo H<sub>f</sub> nous révèle que les mutations KR<sup>1</sup> et KR<sup>2</sup> affectent de façon synergique l'accumulation des formes hyperglycosylées de Yps1, seules, la mutation KR<sup>1</sup> ou KR<sup>2</sup> affectent partiellement l'accumulation des formes hyperglycosylées et présentent des formes de plus faibles poids moléculaires étendues entre 59 et 90 kDa. Chez le double mutant KR<sup>1,2</sup>, on remarque qu'il n'y a pas de protéine hyperglycosylée, seulement des bandes situées entre 59 et 90 kDa de masse moléculaire sont présentes. Le mutant du site catalytique (Yps1-C) montre également un problème d'accumulation des formes de haut poids moléculaire mais sa taille est moins hétérogène que celles des mutants KR et tourne plutôt autour de 83 kDa. Cependant, il semble que lorsqu'on exprime ces variants avec le vecteur centromérique, on n'observe pas de retard dans l'accumulation des formes hyperglycosylées (Mayaki, 1998 ; Figure 17). Alors, comme nos résultats indiquent que ces variants exprimés avec le vecteur multicopie présentent, à différents degrés, des difficultés à atteindre le Golgi pour être hyperglycosylés, on peut déduire que possiblement les mutations induisent un délai dans le repliement correct de la protéine et que ce délai est plus facilement perceptible lorsqu'on exprime les variants avec le vecteur multicopie.

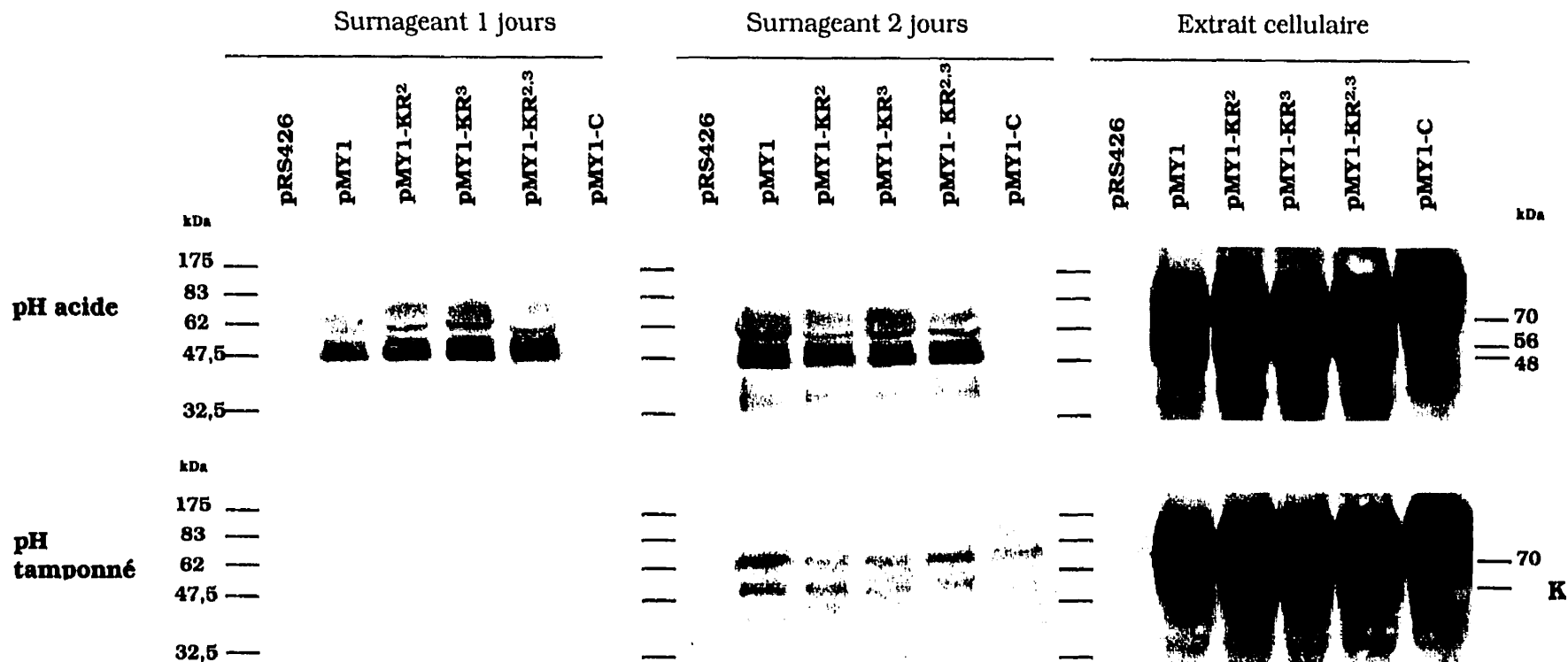
### 3.2.1.2.2.2. Formes secrétées

Au cours de mes travaux, Cawley et ses collaborateurs (1998) démontrèrent que l'endoprotéase Yps1 est sécrétée dans le milieu sous la forme de deux sous-unités ( $\alpha$  et  $\beta$ ) maintenus ensembles par un pont disulfure et portant chacune un résidu aspartate du site catalytique. Nous avons donc analysé la taille des formes secrétées de nos variants en présence ou non de DTT, agent réducteur servant à briser les ponts disulfures, afin de vérifier cette information. Nous avons constaté que la taille des formes majeures retrouvées dans les surnageants de culture (70 et 56 kDa) augmentait d'environ 10 kDa en absence de traitement au DTT (70  $\rightarrow$  80 kDa et 56  $\rightarrow$  66 kDa) indiquant qu'ils sont tous maturés en deux sous-unités liées par un pont disulfure (Figure 19). Cependant, les cellules transformées avec le plasmide pMY1-KR<sup>1,2</sup> montrent une forme de Yps1 de masse moléculaire moyenne très différente des autres et présente en quantité moins abondante. Celles transformées avec pMY1-C, quant à elles, ne sécrètent pas la protéase dans le milieu. Il se trouve que ces deux variants, Yps1-C et Yps1-KR<sup>1,2</sup>, ont également démontré être inactifs *in vivo* (Figure 15 et 16), et leur transport à l'appareil de Golgi semble être retardé (Figure 18). Nous avons donc deux possibilités qui expliquent l'absence de ces variants dans le milieu : soit les protéines n'atteignent pas l'espace périplasmique, soit la protéase demeure ancrée à la membrane plasmique. Nous savions par contre que ces mêmes variants sont efficacement retrouvés dans le milieu lorsqu'on abolit la région hydrophobe servant de signal pour l'ajout du GPI (section suivante), suggérant qu'elles atteignent efficacement l'espace périplasmique et la raison de la plus faible présence de ces variants est plutôt associée à leur relâche. Nous avons donc testé l'hypothèse que Yps1 puisse être relarguée selon un processus de maturation autocatalytique et avons étudié l'effet de conditions de pH non optimal pour les aspartyl protéases sur la sécrétion de Yps1.

La Figure 20 expose les résultats du buvardage western des surnageants de cultures surexprimant Yps1 et ses variants, après un et deux jours de croissance en milieu SC-URA non tamponné (condition généralement utilisée en laboratoire pour la croissance de transformants de levure portant des vecteurs avec comme marqueur de sélection le gène *URA3*) versus en milieu SC-URA\_PO<sub>4</sub> tamponné à pH 6,0. Mentionnons que la levure produit une bonne quantité de proton lors de sa croissance (H<sup>+</sup>) et comme le milieu synthétique n'offre pas un bon pouvoir tampon il s'acidifie rapidement (voir section suivante). Les résultats démontrent que la présence de yapsine 1 dans le surnageant se fait plus tardivement lorsque le milieu est tamponné, une bonne quantité de protéines peut être détectée après seulement un jour de culture en milieu non tamponné alors qu'en conditions tamponnées, la détection se fait après deux jours et les quantités observées sont moins importantes. La taille des protéines retrouvées dans les surnageants diffère aussi légèrement en fonction du pH. Les bandes obtenues à partir des surnageants tamponnés sont approximativement de 70 et 56 kDa, alors



**Figure 19.** Comparaison de la taille en condition réductrice (+DTT) et non-réductrice (-DTT) des variants de yapsin 1 retrouvés dans les surnageants de culture lorsqu'exprimés avec le vecteur multicopie. Une détection par immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre yapsin 1 fut réalisée sur le buvardage western des surnageants de culture de YBAD1 ( $\Delta yps1$ ) transformée avec pMY1 ou ses variants. Avant leur séparation en SDS PAGE 10%, les protéines contenues dans l'échantillons de 65  $\mu$ l de surnageant furent traitées à l'endo H<sub>f</sub> puis dénaturées en absence ou en présence de DTT.

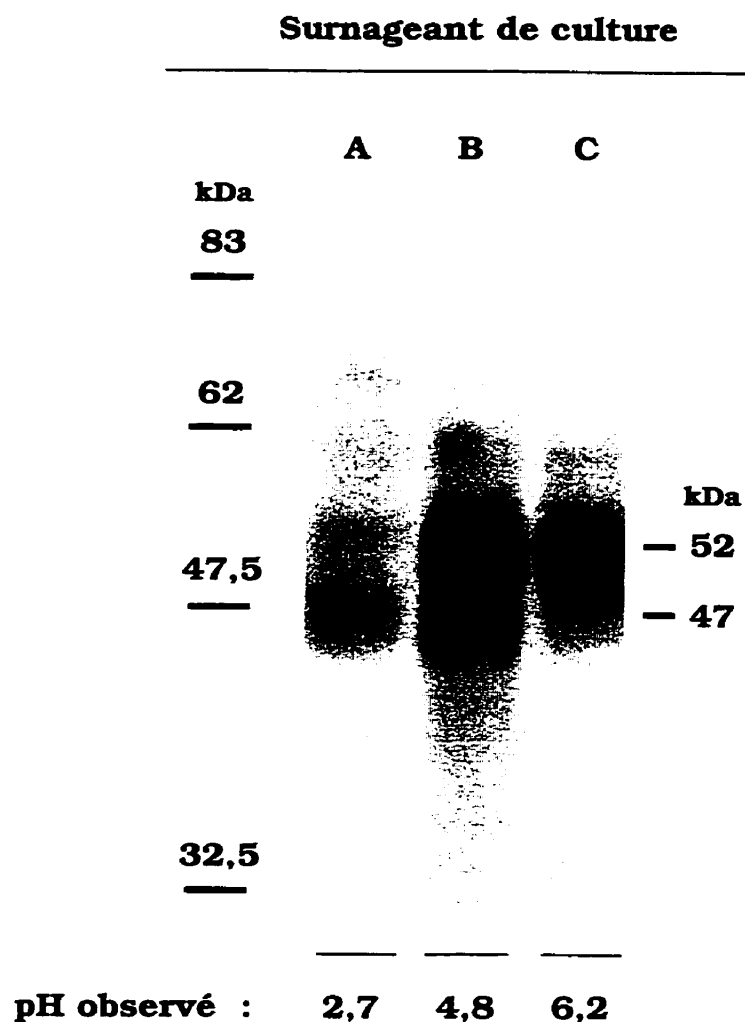


**Figure 20. Analyse de yapsine 1 et ses variants retrouvés dans les surnageants de cultures en milieu non tamponné et tamponné.** Une détection par immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre yapsine 1 fut réalisée sur le buvardage western des surnageants de culture après un jour et deux jours de culture ainsi que des extraits cellulaires après deux jours de culture de YBAD1 (*yps1Δ*) transformée avec pMY1 ou un de ses variants et cultivée en milieu SC-Ura (pH acide) ou en milieu SC-URA PO<sup>4</sup> à pH 6,0 (pH tamponné). Avant leur électrophorèse sur SDS PAGE 10%, les protéines contenues dans les échantillons de 1 ml de surnageant furent concentrées et traitées à l'endo H<sub>f</sub> puis dénaturées en présence de DTT. Pour les extraits cellulaires, 33 μg d'extrait de protéines totales furent traitées selon les mêmes conditions que pour les surnageants.

que celles obtenues avec les surnageants non tamponnés tournent principalement autour de 48 kDa de masse moléculaire bien qu'on détecte aussi la présence de protéines de 70 et 56 kDa. Notons également que Yps1-C est généralement absent dans les surnageants de culture mais ici, après deux jours de culture tamponnée, on peut observer la présence d'une faible quantité de Yps1-C dans le milieu. Ceci constitue la seule observation de Yps1-C dans le surnageant de culture lorsque qu'elle est exprimée avec son signal d'ancrage. Les extraits cellulaires montrent pour leur part que Yps1 et ses variants sont tous bien exprimés chez les cultures tamponnées et non tamponnées.

### **3.2.1.2.3. Analyse des variants surexprimés de Yps1 tronqués à l'extrémité C-terminale**

Afin d'étudier plus en détail l'effet des mutations sur la maturation et l'activité de Yps1, nous avons produit une forme tronquée en C-terminale de Yps1 et portant un His-Tag (Yps1-H) nous permettant de la purifier plus facilement. Nous avons ensuite introduit certaines des mutations étudiées dans cette nouvelle construction. Yps1-H et ses variants furent par la suite exprimés 3 à 4 jours dans une souche *yps1Δ* (YBAD1), à l'aide du vecteur pSY1, cultivée en milieu tamponné (SC-URA PO<sub>4</sub>) afin de prévenir la dénaturation de Yps1 causée par l'acidification naturelle du milieu par la levure. Il a été démontré que la levure produit des protons (H<sup>+</sup>) lors de sa croissance, cette production est directement reliée à l'assimilation de l'azote en conditions d'aérobic, constituant un indice de la production de la biomasse chez la levure (Vicente, 1998). Après deux jours de culture en milieu synthétique, j'ai observé que le pH du milieu atteignait des valeurs inférieures à 3,0, ce dernier ne possédant pas un bon pouvoir tampon. Cawley et ses collaborateurs (1998) ont démontré que Yps1 était irréversiblement dénaturée à pH 3,0 alors j'ai tamponné mes milieux afin de prévenir la dénaturation de l'endoprotéase. Les surnageants de culture ainsi obtenus furent utilisés pour la purification de Yps1-H et ses variants. Nous avons déjà mentionné que Yps1 était scindée en deux sous-unités nommées  $\alpha$  et  $\beta$ , suite à cette coupure,  $\beta$  ne serait pas encore complètement maturée. Une analyse ultérieure nous a révélé que le pH agissait sur la taille de la sous-unité  $\beta$  (Figure 21). Comme la purification de Yps1-H et ses variants a été effectuée à partir de surnageants de cultures tamponnées, nous devons garder à l'esprit que les produits obtenus n'ont pas été soumis aux mêmes conditions de pH que les protéines de cultures non tamponnées. Nous avons alors investigué la maturation et l'activité de ces protéines purifiées en condition de pH tamponné en procédant à l'analyse de leurs tailles en buvardage western et de leurs séquences N-terminale, puis en les mettant en présence d'un substrat non naturel, la pré-élafine.



**Figure 21. Comparaison de la taille de Yps1-H retrouvé dans les surnageants de cultures tamponnées à différents pH.** Une détection par immuno-fluorescence indirecte à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre yapsin 1 fut réalisée sur le buvardage western des surnageants de culture de 3 jours de YBAD1 (*yps1Δ*) transformée avec pSY1 et cultivée en milieu SC-URA non tamponné (A), tamponné à pH 4,5 (B) et tamponné à pH 6,0 (C). Avant leur séparation en SDS PAGE 10%, les protéines contenues dans l'échantillons de 65  $\mu$ l de surnageant furent traitées à l'endo  $H_f$  puis dénaturées en présence de DTT.

### **3.2.1.2.3.1. Analyse électrophorétique en condition réductrice de l'effet du pH sur la maturation de Yps1-H**

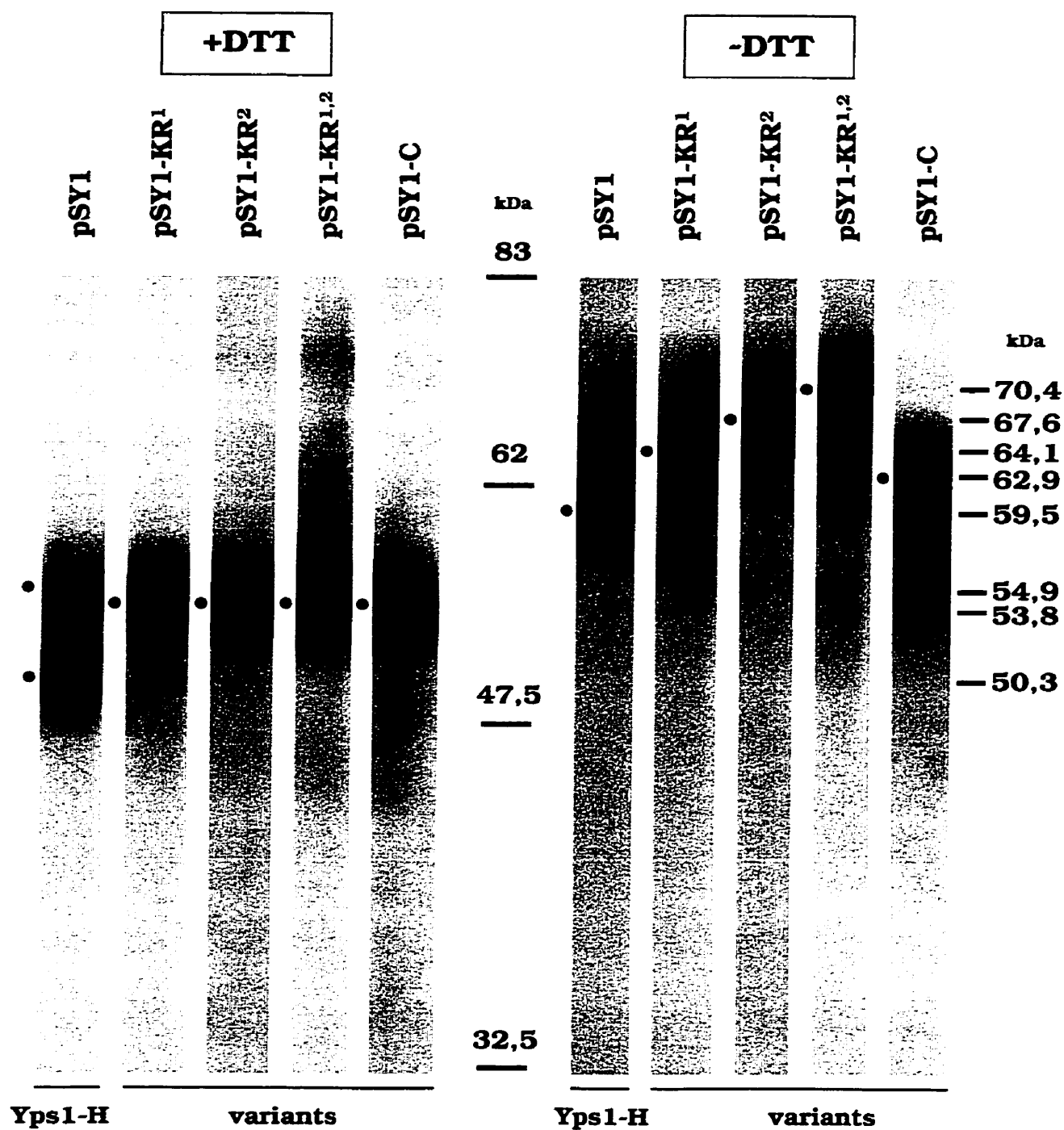
L'analyse en buvardage western de Yps1-H surexprimé chez des cultures tamponnées à différent pH montre que l'acidité du milieu influence directement la taille apparente sur gel de la protéine réduite (Figure 21). Lorsque le milieu SC-URA n'est pas tamponné, la culture atteint après trois jours de croissance un pH de 2,7. Dans ces conditions, peu de protéines sont détectées et la taille de la bande majeure correspond environ à 47 kDa. Lorsqu'il est tamponné à pH 4,5, le milieu contient une quantité considérable de protéines qui forment deux bandes majeures en buvardage western, une de 52 kDa et une de 47 kDa. Tamponné à pH 6,0, Yps1-H présente une seule forme de 52 kDa dans le surnageant. Notons que les tailles évaluées ici ne correspondent pas tout à fait à celles calculées pour les formes purifiées (Figure 23). Les formes purifiées ont migré lentement sur gel durant une longue période de temps alors que les échantillons de la Figure 21 ont migré plus rapidement sur un courte période de temps donc avec une moins bonne résolution biaisant le calcul de leur masse. Toutefois, il semble clair que la taille de la protéine réduite diminue lorsque le milieu s'acidifie. Les résultats montrent donc que la sous-unité  $\beta$  de Yps1 diminue de taille en condition de pH acide suggérant la présence d'un événement protéolytique effectué par une ou des protéases acides. Nous pouvons ajouter que les modifications se produisent nécessairement en N-terminale de la protéine puisque le domaine C-terminal est composé du His-Tag. Comme Yps1 est une endoprotéase fonctionnant à pH acide (pH optimal de 4,4), nous avons testé l'hypothèse qu'elle puisse être impliquée dans ce processus. Pour se faire, nous avons incubé 100 ng de Yps1-H purifié pendant 16 h dans des conditions optimales d'activité pour Yps1 (37°C, pH 4,4). Après le traitement, nous avons comparé en buvardage western le produit de la réaction avec une même quantité de Yps1-H purifiée non incubée. Les résultats n'ont montré aucune différence dans la stoechiométrie des deux formes observées entre l'échantillon de départ et celui incubé (résultat non présenté) suggérant que Yps1 n'est pas impliquée dans la différence de taille observée à pH acide de la sous-unité  $\beta$ . Nos résultats nous révèlent donc que la maturation de l'endoprotéase se poursuit à l'espace périplasmique et cet événement semble régulé par des protéases acides autres qu'e psl. Nous n'avons aucune idée du rôle de cet événement de maturation, mais nous savons que tous les variants purifiés montrent une sous-unité  $\beta$  immature et une activité réduite, suggérant que cet événement pourrait servir à réguler l'activité de Yps1 (section suivante).

### 3.2.1.2.3.2. Analyse électrophorétique en condition réductrice et non-réductrice de Yps1-H

L'analyse en buvardage western des formes purifiées de Yps 1 (Yps1-H) et ses variants traitées ou non au DTT, agent réducteur qui brise les ponts disulfures, révèle que la protéase varie de taille en fonction du traitement (Figure 22). Ceci confirme que nous sommes en présence de deux chaînes polypeptidiques maintenues ensemble par un pont disulfure. En présence de DTT, la protéase ne portant pas de mutation présente deux formes, une de plus haut poids moléculaire (54,9 kDa) et une de plus faible poids moléculaire (50,3 kDa) qui semble en quantité plus importante. Par contre, pour tous les mutants, la forme majeure est de haut poids moléculaire (53,8 kDa) bien qu'on distingue pour les mutants KR<sup>1</sup> et KR<sup>2</sup> une bande de faible intensité au niveau de 50,3 kDa. En absence de DTT, on remarque que la taille des mutants KR est plus élevée que celle de la protéine sauvage et du mutant du site catalytique (Yps1-C-H) suggérant que les mutations ont influencé la taille de la sous-unité  $\alpha$  donc possiblement sa maturation. Soulignons que contrairement aux résultats observés dans le surnageant des cellules exprimant Yps1 mutée au site catalytique sur un vecteur multicopie (Figure 19), la forme ici tronquée en C-terminale (His-Tag) du même mutant est retrouvée dans le surnageant puisqu'elle a été efficacement purifiée. Donc, on peut conclure que le mutant du site catalytique est efficacement transporté dans la voie de sécrétion.

Des aliquotes de 50 à 100  $\mu$ g de Yps1-H et ses variants purifiés furent traitées à l'endo H<sub>r</sub> en présence ou en absence de DTT puis séparées sur SDS-PAGE 10% et transférées sur membrane PVDF. Les protéines furent révélées au Ponceau S et les bandes obtenues furent découpées et analysées par dégradation d'Edman pour obtenir leurs séquences N-terminales. Les résultats du séquençage sont résumés dans le Tableau VI. Les acides aminés détectés pour chaque cycle y sont indiqués ainsi que les séquences déduites à partir de ces résultats. En bref, la sous-unité  $\beta$  de tous les variants séquencés débute au résidu Asp<sup>134</sup> contrairement à la protéine sauvage qui débute à Asp<sup>145</sup>. La sous-unité  $\alpha$  du mutant du site catalytique (Yps1-C-H) débute au résidu Ala<sup>68</sup> comme la protéine sauvage. Nous n'avons pas obtenu la séquence de  $\alpha$  pour la protéine sauvage mais celle-ci est déjà connue et débute à Ala<sup>68</sup> (Cawley *et al.*, 1998). Celle d'Yps1-KR<sup>2</sup>-H débute à Asp<sup>31</sup> (tout juste après le site KR<sup>1</sup>) tandis que celles de Yps1-KR<sup>1,2</sup>-H débute après le peptide signal à Lys<sup>22</sup>. Les séquences obtenues sont plutôt claires et ne laissent aucun doute quant à leur correspondance. Le fait qu'aucune séquence n'ait pu être obtenue pour la sous-unité  $\alpha$  de Yps1-KR<sup>1</sup>-H n'est pas claire mais pourrait découler d'une hétérogénéité dans l'extrémité N-terminale de  $\alpha$  des formes purifiées, tel que suggéré par l'analyse électrophorétique en conditions non-réductrices (Figure 22).





**Figure 22. Comparaison de la taille en condition réductrice et non-réductrice des formes purifiées de Yps1-H avec et sans mutation.** Une détection par immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre yapsin 1 fut réalisée sur le buvardage western des protéines purifiées à partir des surnageants de culture de 3 jours de YBAD1 ( $\Delta yps1$ ) transformé avec pSY1 ou ses variants. Avant leur séparation en SDS PAGE 10%, les échantillons protéiques totalisant 100 ng de protéines purifiées furent traités à l'endo Hr puis dénaturés en présence ou en absence de DTT. ● : niveau moyen de la bande.

**Tableau VI.** Identification des séquences N-terminales des variants de Yps1-H et ses variants.

<b>Échantillon séquencé</b>	<b>Résidus identifiés à chaque cycles *</b>	<b>Séquences déduites †</b>
<b>Yps1-H r</b>	(D,A,V,K) <sup>1</sup> I <sup>2</sup> N <sup>3</sup> P <sup>4</sup> F <sup>5</sup> (G,W) <sup>6</sup> (G) <sup>7</sup> L <sup>8</sup> (T) <sup>9</sup> X <sup>10</sup> (G) <sup>11</sup> G <sup>12</sup> X <sup>13</sup> A <sup>14</sup> I <sup>15</sup> G <sup>16</sup> P <sup>17</sup>	<b>D<sup>145</sup>INPFGWLTGTGSAIGP...</b> (β)
<b>Yps1-KR<sup>1</sup>-H nr</b>	D <sup>1</sup> D <sup>2</sup> X <sup>3</sup> X <sup>4</sup> X <sup>5</sup> X <sup>6</sup> G <sup>7</sup> (S) <sup>8</sup> L <sup>9</sup> I <sup>10</sup> N <sup>11</sup> D <sup>12</sup> I <sup>13</sup> N <sup>14</sup> P <sup>15</sup>	<b>D<sup>134</sup>DSSGGSLINDINP...</b> (β)
<b>Yps1-KR<sup>2</sup>-H nr</b>	D <sup>1</sup> D <sup>2</sup> (D,S) <sup>3</sup> (X,S) <sup>4</sup> (S,N) <sup>5</sup> (G,S) <sup>6</sup> (G,K) <sup>7</sup> (S,F) <sup>8</sup> (L,V) <sup>9</sup> I <sup>10</sup> (N,L) <sup>11</sup> (D,P) <sup>12</sup> (I,F) <sup>13</sup> N <sup>14</sup> P <sup>15</sup> F <sup>16</sup> G <sup>17</sup> X <sup>18</sup> L <sup>19</sup> X <sup>20</sup>	<b>D<sup>31</sup>DDSNSKFKLPP...</b> (α) <b>D<sup>134</sup>DSSGGSLINDINPFGWLT...</b> (β)
<b>Yps1-KR<sup>1,2</sup>-H nr</b>	D <sup>1</sup> D <sup>2</sup> X <sup>3</sup> (X,P) <sup>4</sup> (X,A) <sup>5</sup> (G,A) <sup>6</sup> (G,N) <sup>7</sup> (S,A) <sup>8</sup> (L,A) <sup>9</sup> (I,D) <sup>10</sup> (N,R) <sup>11</sup> D <sup>12</sup> I <sup>13</sup> N <sup>14</sup> P <sup>15</sup>	<b>K<sup>22</sup>IIPAANAADDDSN...</b> (α) <b>D<sup>134</sup>DSSGGSLINDINP...</b> (β)
<b>Yps1-C-H nr</b>	A <sup>1</sup> D <sup>2</sup> G <sup>3</sup> Y <sup>4</sup> E <sup>5</sup> E <sup>6</sup> I <sup>7</sup> I <sup>8</sup> I <sup>9</sup> T <sup>10</sup> N <sup>11</sup> Q <sup>12</sup> Q <sup>13</sup> S <sup>14</sup> F <sup>15</sup> Y <sup>16</sup> S <sup>17</sup> V <sup>18</sup> D <sup>19</sup> X <sup>20</sup>	<b>A<sup>60</sup>DGYEEIITNGGSFYSDL...</b> (α)
<b>Yps1-C-H r</b>	D <sup>1</sup> D <sup>2</sup> S <sup>3</sup> S <sup>4</sup> G <sup>5</sup> G <sup>6</sup> S <sup>7</sup> L <sup>8</sup> I <sup>9</sup> N <sup>10</sup> I <sup>11</sup> D <sup>12</sup> I <sup>13</sup> N <sup>14</sup> P <sup>15</sup> F <sup>16</sup> X <sup>17</sup> W <sup>18</sup> L <sup>19</sup> T <sup>20</sup>	<b>D<sup>134</sup>DSSGGSLINDINPFGWLT...</b> (β)

r.: réduit. nr.: non réduit.

\* no en exposant correspond au no du cycle, X : non identifié, ( ) : incertain.

† : les caractères en gras représentent les résidus identiques aux séquences obtenues, ( ) : sous-unité répondant à la séquence.

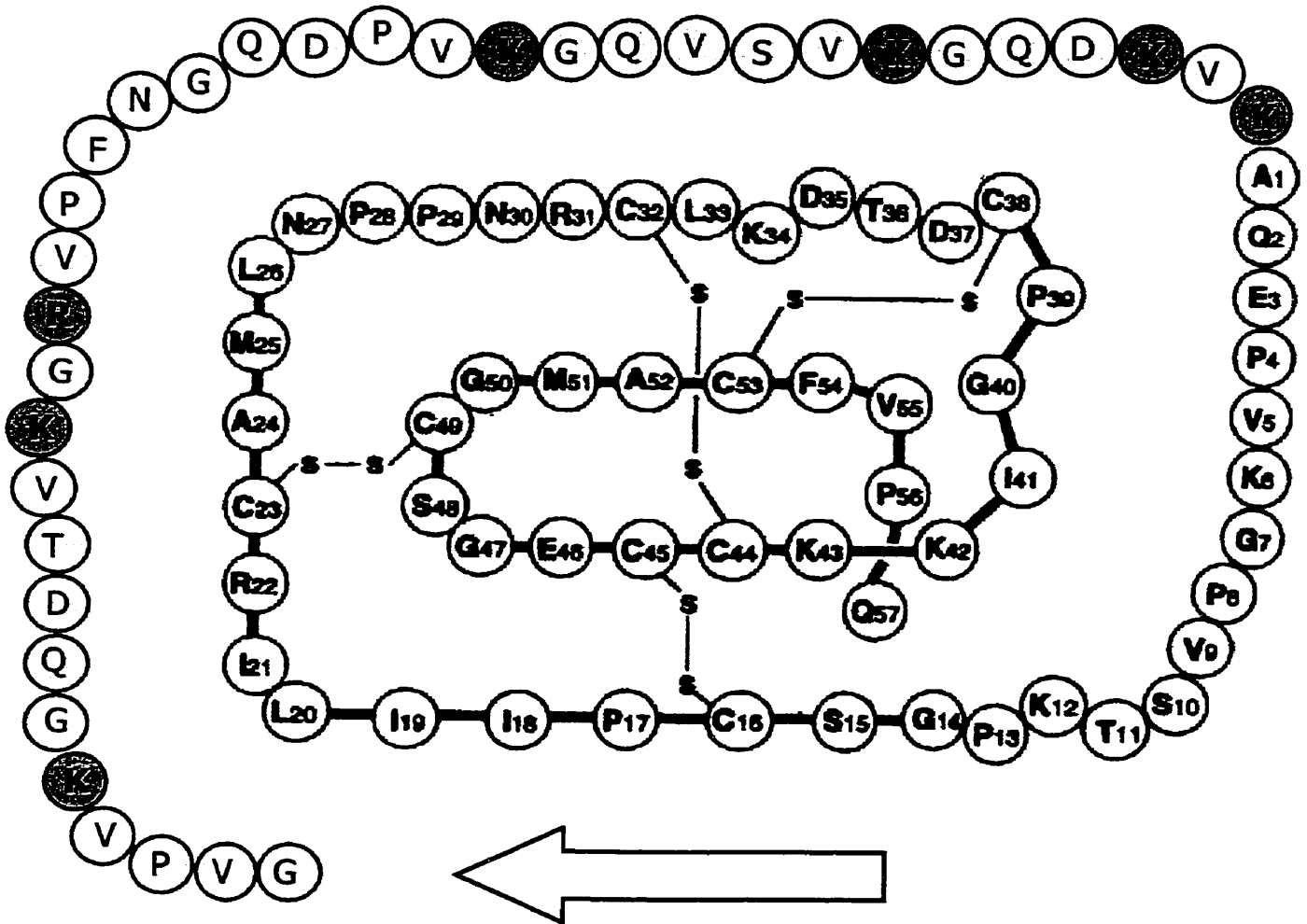
AA : correspond aux aa de la mutation KR<sup>1</sup>.

### 3.2.1.2.3.3. Activité enzymatique *in vitro* des formes purifiées de Yps1 et ses variants

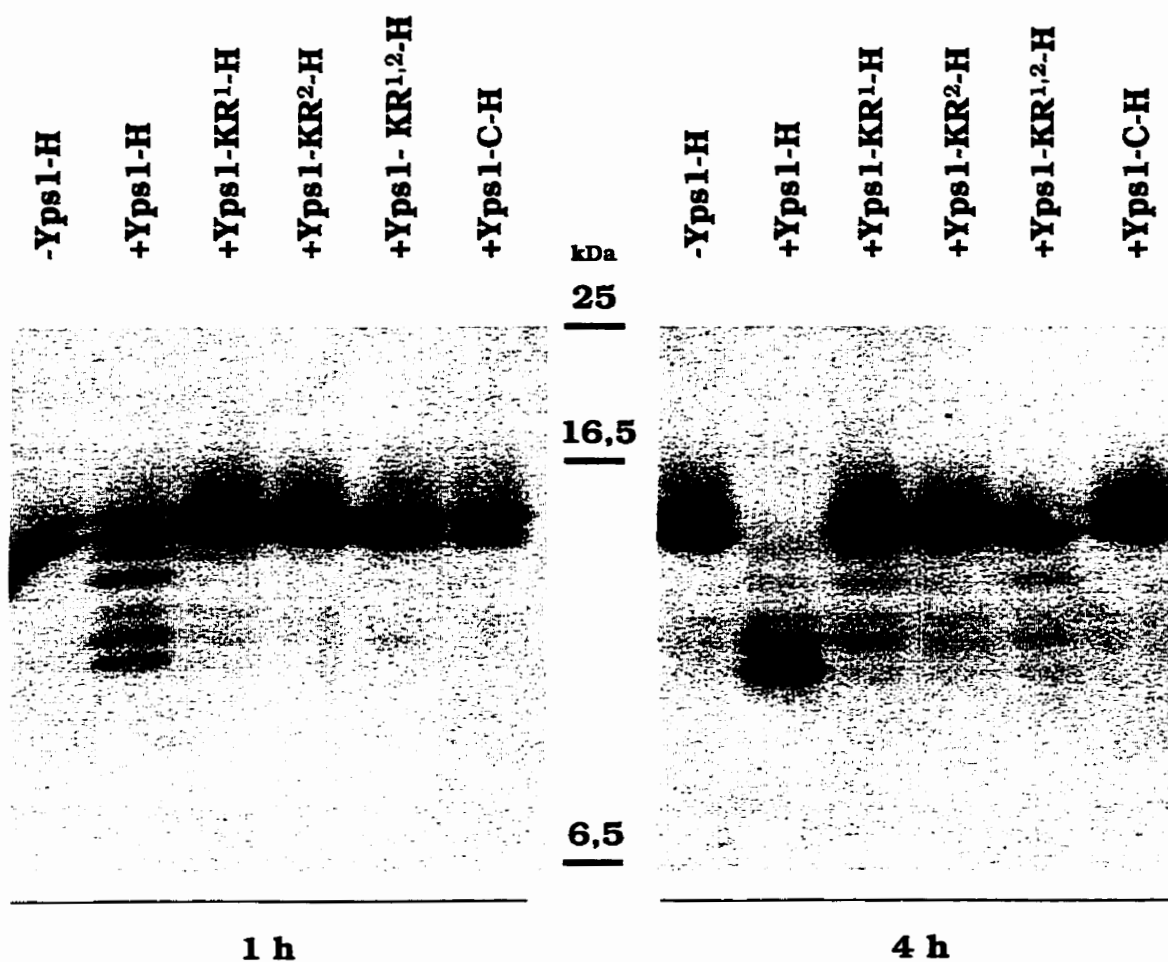
Les essais *in vivo* nous ont montré que le mutant KR<sup>1,2</sup> et le mutant C sont incapables d'induire la formation de facteur  $\alpha$  actif chez un mutant *yps1* et de corriger le défaut de croissance à 16°C du mutant *kex2*. Comme la perte de la correction peut être attribuable à plusieurs facteurs qui s'expriment finalement par une diminution de l'activité cellulaire d'Yps1, nous avons testé l'activité *in vitro* des formes purifiées face à un substrat afin d'évaluer plus spécifiquement leur activité.

L'élafine, aussi connue sous le nom de SKALP pour « Skin-derived antileukoproteinase », est un inhibiteur potentiel de l'élastase et de la protéinase 3 produites par les leucocytes, deux protéinases impliquées dans la destruction tissulaire et la migration des leucocytes (Kuijpers, 1998). L'élafine est initialement synthétisée sous forme d'un précurseur, la pré-élafine (Figure 23). L'expression de la pré-élafine chez la levure conduit à la production d'élafine mature. Cependant, dans certaines conditions, lorsqu'on exprime la pré-élafine dans un mutant *yps1*, on obtient le précurseur de l'élafine indiquant que Yps1 est impliquée dans la maturation de ce précurseur chez la levure. Après avoir fait réagir Yps1-H purifiée et de la pré-élafine purifiée, nous avons confirmé que l'endoprotéase pouvait convertir le précurseur de l'élafine en élafine mature.

Afin de tester l'activité des formes purifiées de Yps1, nous les avons incubées *in vitro* avec le précurseur pré-élafine dans des proportions moléculaires ~ 1 : 50. Après 1 h de réaction, on observe beaucoup de pré-élafine maturée par Yps1-H non muté mais la digestion n'est pas complète (Figure 24). Après 4 h, la maturation de la pré-élafine par Yps1-H est complète et on distingue une maturation partielle mais significative pour tous les variants sauf Yps1-C-H où aucune maturation n'est observée. Donc tous les mutants KR montrent une activité réduite *in vitro* et cette activité semble comparable chez tous ces mutants. Il doit donc avoir une autre cause qui justifie que le mutant KR<sup>1,2</sup> ne corrige pas les phénotypes *in vivo* alors que les mutant KR<sup>1</sup> et KR<sup>2</sup> les corrigent. Le phénomène pourrait être causé dans ce cas par le retard plus important dans la voie de sécrétion du mutant KR<sup>1,2</sup> (section 3.2.1.2.2.1). Nous devons cependant rester prudents quant à l'interprétation de ces résultats car nous devons aussi considérer que ces enzymes ont été exprimées en conditions de pH tamponné et que la sous unité  $\beta$  des variants purifiées n'est pas complètement mature. On ne connaît pas l'effet de cette extension de  $\beta$  sur l'activité de Yps1 mais sa maturation est influencée par le pH (section 3.2.1.2.3.1.) et pourrait servir à réguler l'activité de l'enzyme.



**Figure 23. Représentation schématique de la pré-élaïne avec ses ponts disulfures.** Les billes ombragées (○) représentent la prorégion contenant 7 sites potentielles de maturation pour Yps1 (●) et les billes blanches (○) correspondent à l'élaïne mature (Tsunemi *et al.*, 1996; Saheki *et al.*, 1992).



**Figure 24. Maturation *in vitro* de la pré-élafine recombinante par Yps1-H et ses variants.** Une détection par immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre l'élafine fut réalisée sur le buvardage western de la pré-élafine purifiée et incubée en présence de Yps1-H ou un de ses variants. La réaction, effectuée dans un volume final de 60  $\mu$ l à pH 4,4 et réunissant 400 ng de pré-élafine avec 40 ng de Yps1-H, fut incubée à 37°C pour une durée de 4 h dont la moitié de la réaction fut prélevée et arrêtée après 1 h d'incubation. Les produits de la réaction furent séparés en SDS PAGE pour les protéines de 1 à 100 kDa.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Le principal objectif de mon projet était de vérifier notre hypothèse voulant que *Yps1* joue un rôle dans la construction de la paroi. Pour se faire, nous avons entrepris d'étudier la régulation de son activité afin de déterminer si celle-ci s'effectue de façon parallèle à la régulation de la synthèse de la paroi. Comme l'analyse du gène suggère fortement que l'endoprotéase est synthétisée sous une forme zymogène, cela implique que son activité pourrait être régulée de deux façons indépendantes : soit au niveau transcriptionnel, soit par des événements post-traductionnels.

#### 4.1. La régulation transcriptionnelle du gène *YPS1*

Nous avons analysé l'expression du gène *YPS1* à deux niveaux : 1) dans le cycle cellulaire, car plusieurs gènes impliqués dans l'assemblage et la synthèse de la paroi sont exprimés périodiquement dans le cycle cellulaire et ; 2) en condition de stress impliquant une réorganisation par la cellule des propriétés de sa paroi. Les gènes *FKS* de levure, codant pour la composante catalytique essentielle à la synthèse des  $\beta$ -1,3-glucans de la paroi, sont de bons modèles de comparaison pour étudier la régulation du gène *YPS1* car ils sont chacun régulés de façon indépendante selon les deux systèmes étudiés. Le gène *FKS1* est exprimé périodiquement dans le cycle cellulaire alors que *FKS2* est activé en condition de stress de paroi (Mazure *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1998).

##### 4.1.1. *YPS1* est régulé de façon cyclique dans le cycle cellulaire

Nous avons observé que l'expression de *YPS1* n'est pas constante dans le cycle cellulaire. Tout comme l'expression des gènes *HTA1*, *CLN2* et *FKS1*, la transcription de *YPS1* est maximale en début de la phase S du cycle cellulaire (Hereford *et al.*, 1981; Wittenberg *et al.*, 1990; Ram *et al.*, 1995). *Gas1*, une glycoprotéine ancrée à la membrane plasmique par un GPI, est impliquée dans le remodelage des glucans de la paroi et son patron d'expression est également semblable à *YPS1* (Popolo et Vai, 1999). Le début de la phase S coïncide avec le

moment où la cellule se prépare à amorcer la formation du bourgeon ce qui implique un remodelage de la paroi. Le gène *YPS2* montre pour sa part de légères fluctuations de son expression dans le cycle cellulaire. Toutefois l'activation de *YPS2*, contrairement à celle de *YPS1*, est plus importante lors du premier cycle cellulaire. Les cellules ont été synchronisées dans le cycle cellulaire par l'addition du facteur  $\alpha$ . Cette phéromone induit un arrêt en  $G_1$ , avant le point « Start » (Oehlen et Cross, 1994). Par ailleurs, en réponse au facteur  $\alpha$  la cellule forme une élongation appelée « shmoo » qui nécessite le remodelage de la paroi cellulaire. Ainsi, l'addition de facteur  $\alpha$  est susceptible de modifier, positivement ou négativement, l'expression de certains gènes au début du premier cycle cellulaire. Il est donc possible que la faible stimulation de l'expression de *YPS1* au cours du premier cycle reflète une répression par la phéromone. En revanche, une activation par le facteur  $\alpha$  pourrait être responsable de la forte stimulation de *YPS2* au cours du premier cycle. L'expression de *GAS1* pour sa part est inhibée par un arrêt en  $G_1$  (Popolo et Vai, 1999).

L'analyse systématique des gènes de la levure régulés dans le cycle cellulaire n'a pas révélé *YPS1* comme un candidat potentiel. Mentionnons toutefois que la méthode de détection par fluorescence utilisée lors de l'analyse systématique est moins sensible que l'hybridation classique avec une sonde radioactive. Par ailleurs, lors de cette analyse, seuls les gènes dont les transcrits fluctuaient au-delà d'un certain seuil ont été retenus comme positifs. En outre, le seuil fixé excluait ~9% de gènes connus pour être régulés dans le cycle cellulaire (Spellman *et al.*, 1998). En support de l'expression cyclique de *YPS1* au cours de la division cellulaire, l'analyse de la région promotrice de *YPS1* révèle la présence des éléments de régulation ECB (3 éléments) et MCB (1 élément) (figure 25). Ces éléments sont impliqués dans l'activation de la transcription en début (ECB) et à la fin (MCB) de la phase  $G_1$  (voir figure 2).

#### **4.1.2. *YPS1* est plus fortement exprimé en condition de stress stimulant la voie d'intégrité de la paroi (PKC) et celle de la calcineurine**

La levure stimule fortement l'expression de *FKS2* (~40 fois) en condition de croissance à température élevée (Zhao *et al.*, 1998). Dans ces conditions, nous avons observé une stimulation par un facteur 7 de ce gène. La raison de cet écart s'explique probablement par le fait que notre stimulation fut induite d'une façon plus graduelle à 37°C plutôt que d'une façon plus drastique à 39°C comme décrit dans la littérature. Les mécanismes impliqués dans la stimulation de *FKS2* par la chaleur passent par les voies de PKC et de la calcineurine. La voie de la calcineurine induit une augmentation rapide mais transitoire de *FKS2*, alors que la voie de PKC ou d'intégrité de la paroi (Figure 3), passant par Mpk1(Slt2), induit une augmentation retardée mais soutenue. Nous avons confirmé ces résultats bien que dans les conditions que

**-600** **STRE**  
 CCGCTTCCAGTATACGCTCTACCTTGGGTTTACTGCTAGTCCCCTCCTTA

CTCATCCTTTCCGTTTTCTTTTCGTAAAAAAAACAATAGACACTATATA

**ECB** **ECB**  
 TAGACACTTTTTCCTTTTCCTTCTTTGCGCGATTTCAAGAGGAAAAGCATA

**HSTF** **MCB**  
 CTAAATAAGAATATTCCTAAAACACACGTTCTGACGCGTCAATTAGATC

**GCRI**  
 GTCAGACCTTGCATGCAGCCAAGACACCCTCACATAGCACTGCCTCCTTC

**CDRE ...**  
 CTCTCTTTTCTGTACCACCTCACCTCCCTCGTCCACTCAACTGAGTGG

**...** **TBC**  
CTTTCGCTCCTTTTATACTGCGCCATGAGTAGTTTTTCGTTTCACTGATG

**PRE**  
 TGTCCGAAAAAATTGAGGTTTCATAAAAAAATTTCGTGGACTTATTTATGG

AGAAACAGGGAAATCCGACTACTTAAGAAAAGGGTGTCAAAGAGGATTTA

**ECB**  
CTTTTTTCCTTCTTTTGCATTTGTTTCTATTTCCGCAATTGGACGGTTA

TTAAGAAGAACGCAATTGGCTTTTCTGTATATTAAAATACATAGCGTAAT

**-1**

AAAAAGATAAGGTGAACACCAAGCATATAGTATAATATTACCTACCACAT

**Figure 25. Analyse des éléments de régulation transcriptionnelle potentiels présents dans la région promotrice du gène *YPS1*.** L'analyse fut effectuée sur les 600 nucléotides précédant le premier codon du gène *YPS1*. Les motifs identifiés sont soulignés, leur correspondance est indiquée dans les boîtes placées au dessus et les boîtes ombragées représentent des motifs de régulation dans le cycle cellulaire (voir texte et figure 2 pour la signification des acronymes).



nous avons utilisées, l'induction par la calcineurine était nettement moindre. Ceci, en fait, confirme l'observation de Zhao *et al.* (1998) à l'effet que la calcineurine induit une forte expression transitoire de *FKS2*. *YPS1* montre une légère augmentation de son expression (~2 fois) dans ces conditions tandis que l'expression de son homologue *YPS2* n'est pas affectée. Contrairement à *FKS2*, les niveaux d'expression de *YPS1* en absence de *Mpk1* ne diminuent pas, mais augmentent légèrement, suggérant qu'un autre mode de régulation est utilisé *in vivo*. Lorsqu'on examine la région promotrice du gène *YPS1*, on retrouve notamment l'élément HSTF impliqué dans l'expression de gènes en condition de choc thermique (Figure 25) (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990). Il reste cependant à confirmer si cet élément est utilisé *in vivo*. En l'absence de *CNB1* et *CRZ1* par contre, les niveaux d'*YPS1* diminuent comme ceux d'*FKS2*, indiquant que la voie de la calcineurine est impliquée dans le mécanisme de stimulation des niveaux d'expression de *YPS1* à température élevée. Le seul élément connu jusqu'à présent impliquant la régulation des gènes sous le contrôle de la voie de calcineurine, impliquant le facteur de transcription *Crz1*, est une séquence de 24 nucléotides (CACCAGTCGGTGGCTGTGCGCTTG) identifiée CDRE (*calcineurine-dependent response element*). Nous avons aligné cette séquence avec celle du promoteur de *YPS1* et une région avec seulement 9 disparités a été identifiée. Cette région se situe entre les résidus -313 et -289 et contient la séquence suivante : **CTCAACTGAGTGGCTTTTCGCTCC**, où les résidus en gras sont ceux qui sont similaires à l'élément CDRE. On y distingue un segment 11 nucléotides très conservé (**GTGGCTTTTCGCT**) qui pourrait constituer une région consensus pour la liaison de *Crz1* (Figure 25).

Lorsqu'on perturbe la paroi avec du SDS, il y a une augmentation de l'échange GDP/GTP de la protéine *Rho1* stimulant son activité (Bickle *et al.*, 1998). *Rho1* contrôle l'activité de trois protéines différentes, importantes pour la synthèse de la paroi et l'organisation de l'actine. Notamment, elle active *Pkc1* et régule la synthèse des  $\beta$ -1,3-glucans en s'associant avec le produit des gènes *FKS*. Lorsque les cellules furent incubées en présence de SDS, nous avons observé une augmentation significative des niveaux d'expression d'*YPS1*, de son homologue *YPS2* et de *FKS2*. L'expression des trois gènes demeure au niveau basal en absence de *Mpk1*. Donc *YPS1* et *YPS2*, tout comme *FKS2*, sont effectivement bien régulés par la voie d'intégrité de la paroi (*Pkc*) en présence d'un stress de paroi.

Comme un récepteur de  $Ca^{2+}$  intracellulaire, la calmoduline active un bon nombre d'enzymes cibles comme les protéines kinases et phosphatases calmoduline dépendante. Une de celles-ci est la protéine phosphatase Ser/Thr spécifique calcineurine qui agit comme un effecteur du signal transmis par le  $Ca^{2+}$ . L'expression de *FKS2* est stimulée par le  $Ca^{2+}$  et les phéromones sexuelles d'une façon complètement dépendante de la calcineurine (Stathopoulos et Cyert, 1997). Comme le montre nos résultats, l'expression de *YPS1* est également stimulée par le  $Ca^{2+}$  par un processus nécessitant la présence des gènes *CNB1* et *CRZ1*. Toutefois, une

légère diminution de l'expression de *YPS1* et de *FKS2* est également observée en l'absence de Mpk1. Quant à *YPS2* son expression n'est pas influencée par l'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Le sel, à haute concentration, est toxique pour la levure dû à une combinaison de deux effets différents : l'accumulation d'ions sodiums toxiques à l'intérieur de la cellule et la perte de la pression cellulaire interne due à une diminution du gradient osmotique traversant la membrane plasmique. Dans ces conditions, les cellules de levure accumulent du glycérol pour restaurer le gradient osmotique et induire des modifications au niveau de sa paroi. Ceci s'exprime par une augmentation de l'expression de *GPD1*, codant pour une glycérol phosphate déhydrogénase nécessaire à l'accumulation de glycérol pour rétablir le volume de la cellule après un stress par le NaCl (Marquez *et al.*, 1998). Aussi, *HAL1* et *ENA1/PMR2* sont activés formant une ATPase de type P impliquée dans la pompage des ions  $\text{Na}^+$ . L'activation transcriptionnelle de *GPD1* et d'*ENA1/PMR2* est contrôlée par la voie de transduction HOG (*high osmolarity glycerol signal transduction pathway*). En aval de cette voie de transduction, les gènes stimulés contiennent un élément de régulation positif dans le promoteur (STRE : *stress response element*) dont les séquences consensus sont CCCCT ou AGGGG. Cet élément n'active pas seulement la transcription en réponse à un stress osmotique mais en réponse à d'autres stress qui ne sont pas impliqués dans la voie HOG comme les chocs thermiques, les pH acides et les stress oxydatifs. Tous ces stress sont modulés négativement par de hauts niveaux d'activité de la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique, Pka. *ENA1*, pour sa part, est activé par la voie de la calcineurine en présence d'une concentration élevée de NaCl. Toutefois, l'induction dans ces conditions est due à la présence d'ions  $\text{Na}^+$  et non à cause de la pression osmotique. Donc, les mécanismes impliqués dans l'activation de gènes en présences de hautes concentrations de NaCl sont complexes et peuvent provenir de plusieurs voies. Il n'y a pas d'étude dans la littérature rapportant la régulation de *FKS2* en présence de NaCl, mais l'activation de la voie de calcineurine par le  $\text{Na}^+$  suggère fortement que l'expression du gène sera activée par cette condition, ce que nos résultats ont confirmés. L'expression de *YPS1* suit également le même profil que celui de *FKS2*. Cependant, les résultats obtenus avec le gène *YPS2* pour les types sauvages sont contradictoires, il ne m'est donc pas possible d'en faire une interprétation valable. Nous avons montré que l'induction des gènes *FKS2* et *YPS1* par le NaCl était entièrement dépendante de la présence de calcineurine et du facteur de transcription Crz1. Tel que suggéré par les travaux sur l'expression du gène *ENA1*, il est probable que cette régulation s'opère via la forte concentration d'ions  $\text{Na}^+$  plutôt que par la pression osmotique comme telle. Pour tester cette hypothèse, il faudrait répéter les hybridations northern avec des transcrits extraits de cellules incubées en présence d'une forte concentration d'un autre soluté, comme le KCl. La présence dans la région promotrice de *YPS1* d'un élément STRE (position -559 à -564) et d'une séquence de liaison pour le facteur de transcription Gcr1 (position -350 à -355) (Figure 25), deux éléments de régulation impliqués dans la réponse au stress

hyperosmotique (Norbeck et Blomberg, 1997), suggère en effet que *YPS1* puisse être régulé différemment selon la nature du choc osmotique.

D'autres études sont nécessaires afin d'identifier et/ou confirmer les éléments de régulation qui modulent l'expression du gène *YPS1* dans le cycle cellulaire et en réponse à différents stress. Néanmoins, cette étude préliminaire nous a permis de tester l'une de nos hypothèses de recherche. En effet, le fait que *YPS1* soit régulé de façon similaire aux gènes *FKS1* (cycle cellulaire) et *FKS2* (conditions de stress), deux gènes impliqués directement dans la synthèse de la paroi, supporte la notion que ce gène joue un rôle actif dans l'assemblage et/ou le remodelage de la paroi cellulaire chez *S. cerevisiae*.

#### **4.2. La régulation post-traductionnelle de l'endoprotéase Yps1**

Afin de déterminer le processus d'activation de l'endoprotéase Yps1, nous avons créé une série de mutants à des sites susceptibles d'affecter sa maturation et son activité. Nous avons donc éliminé, de façon individuelle ou en combinaison, des sites dibasiques potentiellement impliqués dans la maturation du zymogène, ainsi qu'un des acides aspartiques du site catalytique. Le mutant du site catalytique nous sert de contrôle quant aux effets de l'expression d'une forme inactive et permet de vérifier si un processus autocatalytique est impliqué dans la maturation de la proenzyme, alors que les mutations aux sites dibasiques permettent de vérifier si les sites choisis sont impliqués dans la maturation et l'activation de la protéase. Nous avons donc testé l'activité *in vivo* et *in vitro* de ces variants, puis les avons analysés en buvardage western et fait séquencer les extrémités N-terminales des formes tronquées purifiées.

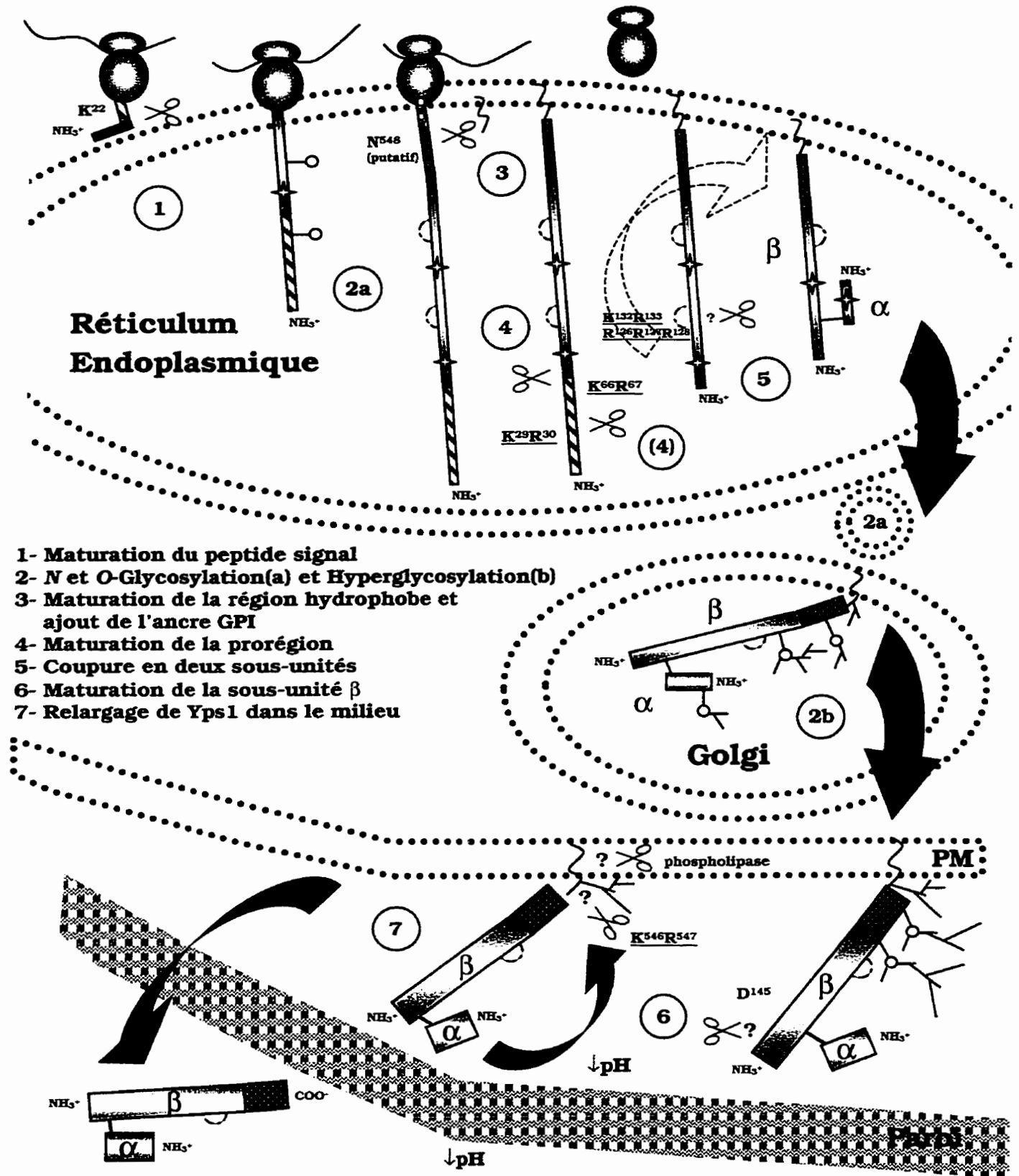
Nos résultats montrent que les sites KR<sup>29,30</sup> et KR<sup>66,67</sup> sont impliqués dans la maturation de Yps1 (Figure 22 et Tableau VI) et lorsqu'on mute de façon seule ou en combinaison l'un de ces sites, on observe une diminution nette de son activité *in vitro* (Figure 24). Nous ne pouvons toutefois pas exclure que cette diminution d'activité pourrait aussi être attribuable à la maturation non achevée de la sous-unité  $\beta$  (Figure 22 et Tableau VI), toutefois, les variants KR ont tous démontrés conserver une légère activité *in vitro* même si le double mutant KR se comporte comme une enzyme inactive *in vivo*. Ce mutant a aussi démontré être affecté plus sévèrement que les autres dans sa cinétique de transport à la voie de sécrétion montrant une taille aberrante sur gel (Figure 18), suggérant qu'une bonne proportion de ce variant soit dégradée avant d'atteindre l'espace périplasmique. De plus, cette hypothèse est en accord avec nos observations montrant que ce mutant est présent en plus faible quantité dans le milieu de culture comparativement aux autres mutants KR (Figure 19) bien qu'ils montrent tous la même activité *in vitro*.

Les formes secrétées nous ont également renseignés sur un autre aspect de la régulation post-traductionnelle de Yps1 soit son relargage dans le milieu. Nos résultats montrent que la présence de Yps1 dans le milieu de culture est influencée par des conditions de pH acide (condition optimale pour les aspartyl protéases), et lorsqu'on abolit le site actif de l'enzyme, son relargage est aussi inhibé (Figure 20) suggérant que ce processus s'effectue de manière autocatalytique. Toutefois, lorsqu'on tamponne le milieu, on peut observer une faible quantité de Yps1 muté au site catalytique dans le milieu de culture suggérant aussi qu'un autre processus permette la relâche de Yps1. L'intervention d'une phospholipase qui cliverait le GPI est l'hypothèse la plus probable. Les données obtenues avec le mutant du site catalytique nous indiquent également deux autres choses importantes, Yps1 n'a pas besoin d'un site actif fonctionnel pour que sa sous-unité  $\alpha$  soit correctement maturée et pour être scindée en deux sous-unités. Nous avons toutefois observé que la mutation du site actif induit aussi un retard de transport de la protéine à la voie de sécrétion mais moins marqué que celui observé pour le double mutant KR (Figure 18). De plus, le séquençage de la sous-unité  $\beta$  du variant muté au site catalytique a révélé un défaut de maturation aussi observé chez les mutants KR. Cependant on ne peut pas déterminer précisément si ce sont directement les mutations qui ont provoqué ce défaut ou si cela est le résultat des conditions de croissance à pH tamponné. Il est fort possible que les deux conditions (*i.e.* les mutations et le pH) influencent la maturation de la sous-unité  $\beta$ . C'est pourquoi il est impératif de déterminer quel est la séquence de la sous-unité  $\alpha$  du mutant KR<sup>29,30</sup> car si  $\alpha$  est mature, cela signifierait que l'activité de l'enzyme face à un substrat exogène est diminuée lorsque  $\beta$  n'est pas complètement mature. Dans le cas contraire, où la sous-unité  $\alpha$  serait immature, l'activité pourrait plutôt être modulée par la prorégion de Yps1. Des résultats préliminaires laissent croire que c'est probablement le pH qui serait en cause mais le processus de maturation semble s'effectuer toutefois moins efficacement chez les mutants comparativement à la protéine sauvage, nous pourrions purifier la protéine sauvage et les variants exprimés à différents pH tamponnés puis les analyser et tester leur activité *in vitro* afin de déterminer ce qui cause la perte d'activité.

Pour bien mettre en perspective nos résultats, nous en avons fait la synthèse et avons soumis un modèle hypothétique de la synthèse et de la maturation de Yps1 chez la levure *S. cerevisiae* (Figure 26), ce schéma est détaillé dans les sections qui suivent.

#### **4.2.1. Initiation de la synthèse du zymogène**

Comme c'est le cas pour la plupart des protéines empruntant la voie de sécrétion (Darnell *et al.*, 1993), la synthèse de Yps1 est initiée au cytosol où une protéine de reconnaissance du signal (SRP) se fixe au peptide signal et dirige le complexe traductionnel à la face externe du RE. Une signal peptidase clive le peptide signal puis la synthèse se poursuit



**Figure 26. Schéma hypothétique de la maturation de Yps1 chez la levure.** Peptide signal (■). Domaine catalytique (□) avec les deux acides aspartiques catalytique (✦). Prorégion (▨). Région riche en Ser/Thr (■) et région hydrophobe (▩). PM : membrane plasmique. Paroi cellulaire (▧). Glycosylation (φ) et hyperglycosylation (λ). Pont disulfure : (λ)

et la protéine traverse la membrane du RE (Figure 26, 1). La protéine nouvellement synthétisée est ensuite rapidement glycosylée (Figure 26, 2a), acceptant les premiers résidus qui seront utilisés par la suite lors des autres étapes de la glycosylation, effectuées au cours de son transport dans la voie de sécrétion (Figure 26, 2b). Vers la fin de la traduction, une transaminase C-terminale identifie la région hydrophobe, la coupe et ajoute l'ancre GPI afin de fixer Yps1 à la membrane (Figure 26, 3).

#### 4.2.2. Maturation de la prorégion du zymogène

Ensuite, la prorégion du zymogène de Yps1, qui servirait probablement au bon repliement de l'enzyme et à inhiber son activité sur la base de la fonction du propeptide des autres aspartyl protéases, est maturée permettant ensuite aux autres modifications post-traductionnelles de procéder normalement (Figure 26, 4). Cette maturation pourrait s'effectuer en deux étapes, d'abord au site KR<sup>29,30</sup> puis au site KR<sup>66,67</sup>, car nos résultats montrent d'abord que la protéine débute juste après le site KR<sup>29,30</sup> lorsqu'elle est mutée au site KR<sup>66,67</sup> et la mutation singulière ou en combinaison de l'un ou l'autre de ces sites affecte d'une façon similaire l'activité *in vitro* de l'enzyme et provoque des retards de transport dans la voie de sécrétion. Le retard de transport est nettement plus important lorsque les deux sites KR sont mutés suggérant aussi qu'ils soient tous deux impliqués dans la maturation et l'activation de Yps1. Afin de confirmer cette hypothèse, nous devons identifier clairement à quel résidu débute la sous-unité  $\alpha$  du mutant KR<sup>29,30</sup> et déterminer si la présence d'une sous-unité  $\beta$  immature affecte l'activité de l'endoprotéase. Un phénomène semblable de maturation a été observé chez l'endoprotéase Kex2 de levure, celle-ci possède une prorégion qui est clivée de manière autocatalytique à un site de maturation dibasique (KR<sup>107,108</sup>) (Germain *et al.*, 1992). L'abolition de ce site de maturation n'affecte pas l'activité de l'enzyme mais l'abolition supplémentaire d'un autre site dibasique présent en amont (KR<sup>79,80</sup>) réduit significativement son activité biologique (Germain *et al.*, 1993). Les résultats suggèrent que l'enzyme mutée aux deux sites soit active mais la présence de la prorégion la déstabiliserait et elle serait rapidement dégradée. En ce qui concerne Yps1, cette étape d'activation ne semble pas requérir l'activité de Yps1 car nos résultats montrent que le mutant du site catalytique possède une sous-unité  $\alpha$  mature.

#### 4.2.3. Coupure $\alpha/\beta$ de la protéine

Une fois activée par la maturation de la prorégion, Yps1 est scindée en deux sous-unités identifiées  $\alpha$  et  $\beta$  (Figure 26, 5). Cette maturation pourrait s'effectuer aux sites RRR<sup>126,127,128</sup> et/ou KR<sup>132,133</sup> présents dans la boucle située entre les deux résidus aspartates du site catalytique. La mutation du site dibasique KR<sup>132,133</sup> partiellement étudiée n'a pas démontré, à

priori, affecter la Coupure de la protéine, mais le séquençage des formes purifiées nous a démontré que ce site peut être utilisé comme site de maturation puisque tous les variants montrent une sous-unité  $\beta$  débutant au résidu 134 et suggèrent donc que les deux sites peuvent être utilisés dans la maturation de Yps1. Curieusement, Yps2, qui possède aussi une boucle située entre les deux résidus aspartate catalytiques, présente un site potentiel de maturation tribasique (KKK<sup>118,119,120</sup>) aligné avec le site dibasique KR<sup>132,133</sup> de Yps1 (voir figure 7). Mon hypothèse est que normalement la maturation de Yps1 en deux sous-unités s'effectue de façon autocatalytique à l'un ou l'autre de ces sites une fois sa prorégion maturée, mais lorsqu'on introduit des mutations qui affectent l'activité de Yps1 (comme les mutations KR ou C) sa coupure dépendrait de la maturation au site KR<sup>132,133</sup> par d'autres enzymes comme Kex2 ou les homologues de Yps1. Des résultats préliminaires de l'expression du variant muté KR<sup>132,133</sup> chez un mutant *kex2* nous indiquent qu'effectivement Kex2 pourrait être responsable de la maturation des variants à cette position. Afin de mieux comprendre comment s'effectue la coupure  $\alpha$  et  $\beta$  de Yps1 et déterminer si ce processus est essentiel à son activité nous pourrions muter les deux sites potentiel de maturation pour la coupure  $\alpha$  et  $\beta$  de la protéine (RRR<sup>126,127,128</sup> et KR<sup>132,133</sup>) et analyser l'expression d'un tel variant, mais puisque toutes les formes purifiées d'Yps1-H sont maturées en deux sous-unités, nous croyons que la protéine doit adopter cette structure avant de franchir le RE. Aussi, le mauvais rendement obtenu lors de la purification de certains variants laisse croire que certains d'entre eux pourraient avoir une cinétique de maturation plus lente probablement dû à leur moins grande activité. Nous pourrions vérifier cette hypothèse en mesurant, dans le surnageant de culture, la vitesse d'apparition des variants tronqués de Yps1 afin de vérifier si certains d'entre eux sont effectivement sécrétés plus tardivement.

#### 4.2.4. Maturation de la sous-unité $\beta$

La protéine poursuit ensuite son chemin dans la voie de sécrétion où elle y subit des modifications de ses chaînes latérales N- et O-liées, typiquement observées chez les mannoprotéines, ainsi que du GPI (Figure 26, 2b). Une fois à l'espace périplasmique, Yps1, en contact avec le milieu environnant, voit sa sous-unité  $\beta$  être maturée selon un processus stimulé par des conditions de pH acide (Figure 26, 6). Cette maturation pourrait servir à modifier la conformation de l'endoprotéase afin qu'elle puisse s'autorelarguer dans le milieu via un clivage au site KR<sup>546,547</sup> situé tout juste en amont du résidu putatif liant le GPI.

Mes résultats suggèrent également que Yps1 puisse aussi être relarguée dans le milieu en condition de pH neutre mais selon un autre processus conférant une taille supérieure à la protéine. Mon hypothèse est que dans cette situation le lien à la membrane serait rompu par une phospholipase qui scinderait le groupement phospholipide inositol de l'ancre GPI.

#### 4.2.5. Relargage de Yps1 dans le milieu

La destination finale de Yps1 est vraisemblablement le milieu de culture où la protéine s'accumule. Toutefois, nous croyons que son activité est requise à l'espace périplasmique et sa relâche constituerait un moyen de réguler négativement son activité locale. Nous soutenons que deux mécanismes seraient impliqués dans la relâche de Yps1, l'un procédant via une endoprotéolyse en C-terminale de la protéine et l'autre via la rupture du phospholipide inositol de l'ancre GPI.

Le premier mécanisme ferait appel à l'activité même de Yps1 qui procéderait à son automaturation. Nos résultats montrent que la relâche de Yps1 s'effectue autour de son pH optimal d'activité et la mutation du site actif inhibe sa relâche dans ces conditions de pH. Comme soulevé par Vossen *et al.* (1997), plusieurs protéines impliquées au niveau de la paroi et possédant une ancre GPI sont ciblées à la membrane sans être incorporées à la paroi. Ces protéines ont la particularité de posséder un motif dibasique (voir Figure 8) responsable de leur ciblage à la membrane périplasmique plutôt qu'à la paroi comme c'est le cas des autres protéines liées à un GPI. Ce motif, constitué des résidus KR<sup>546,547</sup> chez Yps1, pourrait représenter un site de maturation pour l'endoprotéase. Notre hypothèse est que l'un des rôles de Yps1 pourrait être de moduler sa relâche ainsi que celle de d'autres protéines GPI ciblées à l'espace périplasmique et qui sont impliquées dans l'assemblage et/ou le remodelage de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*.

L'hypothèse d'un second mécanisme de relargage pour Yps1 découle de nos observations effectuées à pH tamponné avec les différents variants. D'abord, le mutant du site catalytique fut retrouvé dans le milieu alors que généralement nous n'en détectons pas la présence. La taille des protéines obtenues est bien supérieures à celle normalement retrouvée, excluant que la différence de taille soit due au défaut de maturation de la sous-unité  $\beta$ . Nous croyons que Yps1 pourrait également être relarguée par un phospholipase qui couperait son ancre lipidique libérant ainsi une forme de Yps1 possédant toujours la portion glucidique du GPI et donc lui conférant une masse plus grande comparativement à celle résultant de la maturation endoprotéolytique en C-terminale.

Afin d'approfondir la régulation du relargage de Yps1, il serait intéressant de muter un des deux résidus impliqués dans son ciblage et peut-être dans sa maturation (K<sup>546</sup> ou R<sup>547</sup>). Nous ne pouvons pas étudier l'effet de la mutation des deux résidus basiques car cela ciblerait Yps1 à la paroi. Nous pourrions aussi incuber des extraits protéiques de YBAD1 surexprimant l'endoprotéase Yps1 non tronquée avec Yps1-H purifiée et des phospholipases commerciales



afin de vérifier si les bandes de haut poids moléculaire observées dans les extraits sont des formes de Yps1 possédant toujours l'ancre GPI. Si notre hypothèse s'avère exacte, les bandes devraient adopter une taille similaire à celles retrouvées dans le surnageant des cultures tamponnées et non tamponnées.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats de notre étude préliminaire de l'expression de *YPS1* nous ont permis de tester l'une de nos hypothèses de recherche voulant que ce gène joue un rôle actif dans l'assemblage et/ou le remodelage de la paroi cellulaire chez la levure. En effet, le fait que *YPS1* soit régulé de façon similaire aux gènes *FKS1* (cycle cellulaire) et *FKS2* (conditions de stress), deux gènes impliqués directement dans la synthèse de la paroi, supporte la notion que le rôle de Yps1 se situe au niveau de la paroi. D'autres études sont toutefois nécessaires pour confirmer les éléments de régulation qui modulent l'expression du gène *YPS1* dans le cycle cellulaire et en réponse à différents stress. Notamment, la dissection de sa région promotrice jointe à un gène rapporteur comme celui de la  $\beta$ -galactosidase permettrait de déterminer avec précision ce qui module son expression.

L'endoprotéase est aussi régulée par des événements post-traductionnels. La maturation de Yps1 paraît très complexe et semble être régulée à plusieurs niveaux. D'abord, nous croyons que la prorégion servirait au bon repliement de l'enzyme et préviendrait sa maturation de manière auto-catalytique en deux sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$ . Olsen et Loh ont démontré récemment (mars 2000) avec des techniques immunologiques que Yps1 est maturée dans la RE selon un processus autocatalytique. Nos résultats montrent par contre que tous les mutants de Yps1 étudiés, incluant celui du site catalytique, sont maturés en deux sous-unités. Nous croyons que la coupure de la protéine représenterait une étape essentielle à l'adoption de sa conformation finale et à sa poursuite dans la voie de sécrétion. La levure possède vraisemblablement d'autres enzymes permettant la coupure de la protéine avec sa prorégion mais selon un mécanisme moins efficace, donc retardant son transport à la voie de sécrétion. Nous croyons que Kex2 et les homologues de Yps1 chez la levure sont des candidats potentiels pour réaliser cette maturation. La poursuite de l'étude de la mutation KR<sup>132,133</sup> ainsi que la mutation de l'autre site potentiel de maturation RRR<sup>126,127,128</sup> pourraient nous permettre d'éclaircir les mécanismes impliqués dans la coupure de Yps1 en deux sous-unités et démontrer le rôle de cette modification post-traductionnelle dans l'activité de l'endoprotéase.

La maturation de Yps1 se poursuit également à l'espace périplasmique où on observe une diminution de la taille de la sous-unité  $\beta$  lorsque le milieu s'acidifie. Sa relâche dans le milieu est aussi stimulée par une diminution du pH environnant. Nous croyons que cette

maturation pourrait moduler l'activité de Yps1. Notre hypothèse est que l'un des rôles de Yps1 pourrait être de moduler sa relâche ainsi que celle de d'autres protéines GPI ciblées à l'espace périplasmique et impliquées dans l'assemblage et/ou le remodelage de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*. Le pH pourrait être un des éléments déclencheurs servant à activer Yps1 et ses homologues afin de relarguer différentes enzymes modulant la synthèse de la paroi. D'abord, une analyse d'Yps1 et de ses variants exprimés à différents pH tamponnés permettrait de déterminer l'effet précis du pH sur sa maturation et sa relâche. Ensuite, pour vérifier notre hypothèse, nous devons vérifier l'effet d'une mutation ponctuelle au site potentiel de maturation KR<sup>546-547</sup>. Aussi, l'analyse d'une souche délétée de façon multiple pour Yps1 et ses homologues pourrait, sans contredit, s'avérer utile quant à l'étude de leurs fonctions chez la levure car vraisemblablement, cette famille d'enzymes possède des rôles et des spécificités similaires compensant pour la seule perte de Yps1 chez la levure.

Nos recherches ont contribué significativement à éclaircir notre vision quant au rôle potentiel de Yps1 chez la levure et espérons, qu'à la suite des travaux proposés pour définir davantage son implication chez la levure, que nous pourrions démontrer clairement l'exactitude de nos hypothèses quant à sa fonction biologique.

## RÉFÉRENCES

- Ash, J., Dominguez, M., Bergeron, J.J.M., Thomas, D.Y. et Bourbonnais, Y. (1995) The yeast proprotein convertase encoded by YAP3 is a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein that localizes to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **270**, 20847-20854.
- Azaryan, V.A., Wong, M., Friedman, T.C., Cawley, N.X., Estivariz, F.E., Chen, H.-C. et Loh, Y.P. (1993) Purification and characterization of a paired basic residue-specific yeast aspartic protease encoded by the YAP3 gene. *J. Biol. Chem.* **268**, 11968-11975.
- Bickle, M., Delley, P.A., Schmidt, A. et Hall, M.N. (1998) Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *EMBO J.* **17**, 2235-2245.
- Bourbonnais, Y., Ash, J., Daigle, M. et Thomas, D.Y. (1993) Isolation and characterization of *S. cerevisiae* mutants defective in somatostatin expression: cloning and functional role of a yeast gene encoding an aspartyl protease in precursor processing at monobasic cleavage sites. *Embo J.* **12**, 285-294.
- Bourbonnais, Y., Germain, D., Ash, J. et Thomas, D.Y. (1994) Cleavage of prosomatostatins by Yap3 and Kex2 endoprotease. *Biochimie* **76**, 226-233.
- Cawley, N.X., Olsen, V., Zhang, C.-F., Chen, H.-C., Tan, M. et Loh, Y.P. (1998) Activation and processing of non-anchored yapsin 1 (Yap3p). *J. Biol. Chem.* **273**, 584-591.
- Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H. et Hieter, P. (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**, 119-122.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P.O. et Herskowitz, I. (1998) The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* **282**, 699-705.
- Cid, V.J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M.P., Nombela, C. et Sanchez, M. (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **59**, 345-386.
- Cos, T., Ford, R.A., Trilla, J.A., Duran, A., Cabib, E. et Roncero, C. (1998) Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *Eur. J. Biochem.* **256**, 419-426.

Cyert, M.S. et Thorner, J. (1992) Regulatory subunit (*CNB1* gene product) of yeast  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone. *Mol. Cell Biol.* **12**, 3460-3469.

Dallies, N., François, J. et Paquet, V. (1998) A method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1297-1306.

Darnell, J., Lodish, H., et Baltimore, D. (1993) *Biologie moléculaire et cellulaire de la cellule*. 2<sup>e</sup> ed. De Boeck Université. 1102 p.

Davenport, K.R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D.E. et Gustin, M. (1995) A osmosensing signal transduction pathway in yeast. *J. Biol. Chem.* **270**, 30157-30161.

Dean, N. (1999) Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 309-322.

Egel-Mitani, M., Flygering, H.P. et Hansen, M.T. (1990) A novel aspartyl protease allowing *KEX2*-independent *Mf $\alpha$*  prohormones processing in yeast. *Yeast* **6**, 127-137.

Ford, R.A., Shaw, J.A. et Cabib, E. (1996) Yeast chitin synthases 1 and 2 consist of a non-homologous and dispensable N-terminal region and of a homologous moiety essential for function. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 420-428.

Garrett-Engle, P., Moilanen, B. et Cyert, M.S. (1995) Calcineurine, the  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar  $\text{H}^{+}$ -ATPase. *Mol. Cell Biol.* **15**, 4103-4114.

Germain, D., Dumas, F., Vernet, T., Bourbonnais, Y., Thomas, D.Y. et Boileau, G. (1992) The pro-region of the *Kex2* endoprotéase of *Saccharomyces cerevisiae* is removed by self-processing. *FEBS Lett.* **299**, 283-286.

Germain, D., Thomas, D.Y. et Boileau, Guy. (1993) Processing of *Kex2* pro-region at two interchangeable cleavage sites. *FEBS Lett.* **323**, 129-131.

Hamada, K., Fukushi, S., Arisawa, M., Baba, M. et Kitada, K. (1998) Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 53-59.

Hereford, L.M., Osley, M.A., Ludwig, J.R. et McLaughlin, C.S. (1981) Cell cycle regulation of yeast histone mRNA. *Cell* **24**, 367-375.

Kaiser, C., Michaelis, S. et Mitchell, T.A. (1994) *Methods in yeast genetics*. Cold spring harbor laboratory press, Cold spring harbor, New York. Xp.

Kamada, Y., Jung, U.S., Piotrowski, J. et Levin, D.E. (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* **9**, 1559-1571.

Kapteyn, J.C., Van Den Ende, H. et Klis, F.M. (1999a) The contribution of cell wall proteins to the organisation of the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 373-383.

Kapteyn, J.C., Van Egmond, P., Sievi, E., Van Den Ende, H., Makarow, M. et Klis, F.M. (1999b) The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp-150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cell and  $\beta$ -1,6-glucan-deficient mutants. *Mol. Microbiol.* **31**, 1835-1844.

Kapteyn, J.C., Ram, A.F., Groos, E.M., Kollar, R., Montijn, R.C., Van Den Ende, H., Llobell, A., Calib, E. et Klis, F.M. (1997) Altered extent of cross-linking of  $\beta$ -1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall  $\beta$ -1,3-glucan content. *J. Bacteriol.* **179**, 6279-6284.

Ketela, T., Green, R. et Bussey, H. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J. Bacteriol.* **181**, 3330-3340.

Köhler, K. et Domdey, H. (1991) Preparation of high molecular weight RNA. *Methods Enzymol.* **194**, 398-405.

Komano, H. et Fuller, R. (1995) Shared functions in vivo of glyco-phosphatidylinositol-linked aspartyl protease, Mkc7, and the proprotein processing protease Kex2 in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10752-10756.

Komano, H., Seeger, M., Gandy, S., Wang, G.T., Krafft, G.A. et Fuller, R.S. (1998) Involvement of cell surface glycosyl-phosphatidylinositol-linked aspartyl proteases in  $\alpha$ -secretase-type cleavage and ectodomain solubilization of human Alzheimer  $\beta$ -amyloid precursor protein in yeast. *J. Biol. Chem.* **273**, 31648-31651.

Kuijpers, A.L., Pfundt, R., Zeeuwen, P.L., Molhuizen, H.O., Mariman, E.C., van de Kerkhof, P.C. et Schalkwijk, J. (1998) SKALP/elafin gene polymorphisms are not associated with pustular forms of psoriasis. *Clin. Genet.* **54**, 96-101.

Lee, K.S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, k. et Levin, D.E. (1993) A yeast mitogene-activated protein kinase homolog (Mpk1) mediates signaling by protein kinase C. *Mol. Cell Biol.* **13**, 3067-3075.

Lipke, P.N. et Ovale, R. (1998) Cell wall architecture in yeast : new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* **180**, 3735-3740.

Lo, W.S. et Dranginis, A.M. (1998) the cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **9**, 161-171.

Loh, Y.P. et Cawley, N.X. (1995) Processing enzymes of pepsin family : yeast aspartic protease 3 and pro-opiomelanocortin converting enzymes. *Methods Enzymol.* **248**, 137-155.

Marquez, J.A., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., et Serrano, R. (1998) The Ssn6-Tup1 repressor complex of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the osmotic induction of HOG-dependent and independent genes. *EMBO J.* **17**, 2543-2553.

Mayaki, D. (1998) Étude du mécanisme d'activation de l'endoprotéase codée par le gene YAP/ de levure. Press de l'Université Laval, 101p.

Mazure, P., Morin, N., Baginsky, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J.A., Nielsen, J.B. et Foor, F. (1995) Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-D-glucan synthase. *Mol. Cell Biol.* **15**, 5671-5681.

Mendenhall, M.D. et Hodge, A.E. (1998) Regulation of Cdc28 Cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**, 1191-1243.

Nieto-Sotelo, J., Wiederrecht, G., Okuda, A. et Parker, C.S. (1990) The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions. *Cell* **62**, 807-817.

- Norbeck, J. et Blomberg, A. (1997) Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 5544-5554.
- Oehlen, L.J. et Cross, F.R. (1994) G1 cyclins CLN1 and CLN2 repress the mating factor response pathway at Start in the yeast cell cycle. *Genes Dev.* **8**, 1058-1070.
- Olsen, V., Cawley, N.X., Brandt, J., Egel-Mitani, M. et Loh, Y.P. (1999) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* yapsin 3, a new member of the yapsin family of aspartic proteases encoded by the *YPS3* gene. *Biochem. J.* **339**, 407-411.
- Olsen, V. et Loh, Y.P. (2000) In vivo processing of nonanchored Yapsin 1 (Yap3p). *Arch. Biochem. Biophys.* **375**, 315-321.
- Parodi, A.J. (1999) Reglucosylation of glycoproteins and quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum of yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 287-295.
- Popolo, L. et Vai, M. (1999) The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 385-400.
- Price, C., Nasmyth, K. et Schuster, T. (1991) A general approach to the isolation of cell cycle-regulated genes in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **218**, 543-556.
- Qadota, H., Python, C.P., Inoue, S.B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D.E. et Ohya, Y. (1996) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* **272**, 279-281.
- Ram, A.F., Van Den Ende, H. et Klis F.M. (1998a) Green fluorescent protein-cell wall fusion proteins are covalently incorporated into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**, 249-255.
- Ram, A.F.J., Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Caro, L.H.P., Douwes, J.E., Baginsky, W., Mazur, P., Van Den Ende, H. et Klis, F.M. (1998b) Loss the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of  $\beta$ -1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J. Bacteriol.* **180**, 1418-1424.



Ram, A.F.J., Brekelmans, S.S.C., Oehlen, L.J.W. et Klis, F.M. (1995) Identification of 2 cell-cycle-regulated genes affecting the b-1,3-glucan content of cell-walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **358**, 165-170.

Rawlings, N.D. et Barrett, A.J. (1995) Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Methods in enzymology*, **248**, 105-120.

Richter, C., Tanaka, T. et Yada, R.Y. (1998) Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases : pepsinogène, progastricin and prochymosin. *Biochem. J.* **335**, 481-490.

Rupp, S., Summers, E., Lo, H.J., Madhani, H. et Fink, G. (1999) MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO* **18**, 1257-1269.

Russo, P., Simonen, M., Uimari, A., Teesalu, T. et Makarow, M. (1993) Dual regulation by heat and nutrient stress of the yeast *HSP150* gene encoding a secretory glycoprotein. *Mol. Gen. Genet.* **239**, 273-280.

Saheki, T., Ito, F., Hagiwara, H., Saito, Y., Kuroki, J., Tachibana, S. et Hirose, S. (1992) Primary structure of the human elafin precursor preproelafin deduced from the nucleotide sequence of its gene and the presence of unique repetitive sequences in the prosegment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 240-245.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. et Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edition, Cold spring harbor laboratory press, New York.

Schagger, H. et von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.

Sikorski, R.S. et Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.

Smits, G.J., Kapteyn, J.C., van den Ende, H. et Klis, F.M. (1999) Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol* **2**, 348-352.

Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D. et Futcher, B. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3273-3297.

Stathopoulos, A.M. et Cyert, M.S. (1997) Calcineurin acts through the *CRZ1/TCN1*-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes & Dev.* **11**, 3432-3444.

Tsunemi, M., Matsuura, Y., Sakakibara, S. et Katsube, Y. (1996) Crystal structure of an elastase-specific inhibitor elafin complexed with porcine pancreatic elastase determined at 1.9 Å resolution. *Biochemistry* **35**, 11570-11576.

Vernet, T., Dignard, D. et Thomas, D.Y. (1987) A family of yeast expression vectors containing the phage fl intergenic region. *Gene* **52**, 225-233.

Vicente, A., Castrillo, J.I., Teixeira, J.A. et Ugalde, U. (1998) On-line estimation of biomass through pH control analysis in aerobic yeast fermentation systems. *Biotechnol. Bioeng.* **58**, p.445-450.

Vossen, J.H., Muller, W.H., Lipke, P.N. et Klis, F.M. (1997) Restrictive glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in *cwh6/gpi3* yeast cells causes aberrant biogenesis of cell wall proteins. *J. Bacteriol.* **179**, 2202-2209.

Wittenberg, C., Sugimoto, K. et Reed, S.I. (1990) G<sub>1</sub>-specific cyclins of *S. cerevisiae* : Cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34<sup>CDC28</sup> protein kinase. *Cell* **62**, 225-237.

Whiteway, M., Hougan, L. et Thomas, D.Y. (1988) Expression of MF alpha 1 in MATa cells supersensitive to alpha-factor leads to self-arrest. *Mol. Gen. Genet.* **214**, 85-88.

Zhao, C., Jung, U.S., Garrett-Engle, P., Roe, T., Cyert, M.S. et Levin, D.E. (1998) Temperature-induced expression of yeast *FKS2* is under dual control of protein kinase C and calcineurine. *Mol. Cell Biol.* **18**, 1013-1022.