THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS XI

U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY

Spécialité : Génétique Moléculaire et Biochimie

Présentée par

Chaouki MILED

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR EN SCIENCES

DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

Régulation du cycle cellulaire et de la morphologie cellulaire par les kinases de la nouvelle famille *Cak1* et par *Xbp1*, répresseur de l'expression des gènes *CLB*

Soutenue le 26 juin 2001 devant la Commission d'examen

Pr. Claude GAILLARDIN Pr. Micheline WESOLOWSKI-LOUVEL Pr. Michel AIGLE Dr. Gérard FAYE Dr. Carl MANN Président Rapporteur Rapporteur Directeur de Thèse Directeur de Thèse Les protéines kinases dépendantes des cyclines, les CDKs, sont des régulateurs cruciaux dans la coordination des événements du cycle cellulaire des eucaryotes. Le cycle cellulaire dépend des oscillations de l'activité des CDKs. Cette activité est induite par des mécanismes complexes comprenant la liaison de sous-unités régulatrices et des phosphorylations au niveau de sites régulateurs positifs et négatifs en réponse à des changements environnementaux.

De nombreux signaux environnementaux qui activent diverses voies de signalisation dans la cellule induisent des changements morphologiques de la cellule et des modifications du cycle cellulaire. Une carence en azote induit la différenciation pseudohyphale chez les cellules diploïdes de *S. cerevisiae*. La température de 37°C et d'autres signaux, souvent liés aux stress, induisent les développements hyphale et pseudohyphale chez *C. albicans*. Une carence en glucose induit la croissance invasive chez les cellules haploïdes de *S. cerevisiae*.

Les cellules carencées en azote s'allongent et une petite fraction forme des filaments qui pénètrent dans l'agar. Les bases moléculaires des changements de la morphologie cellulaire et du cycle cellulaire en réponse à une carence en azote sont très peu définies, en partie parce que les conditions de croissance hétérogènes des cellules carencées en milieu agar solide ne sont pas maniables pour les analyses biochimiques. Dans ce travail, nous avons utilisé des cultures en chémostats pour étudier le rôle des régulateurs du cycle cellulaire vis-àvis de la différenciation cellulaire en réponse à une carence en azote, en utilisant des conditions de culture homogènes contrôlées. Nous avons trouvé que les niveaux des cyclines Clb1, Clb2 et Clb5 sont réduits en milieu carencé en azote en chémostat comparés aux cultures en milieu riche. D'autre part le répresseur transcriptionnel Xbp1 est fortement induit dans ces conditions. En outre, la délétion de *XBP1* inhibe l'élongation cellulaire et la croissance pseudohyphale en milieu carencé en azote. La délétion de *CLB2* restaure l'élongation cellulaire et la filamentation du mutant Axbp1 en réponse à une carence en azote. L'activation transcriptionnelle de *XBP1* et conséquemment la répression de l'expression des gènes *CLB* sont une réponse clé des cellules de *S. cerevisae* à une carence en azote.

Chez *Candida albicans*, les bases moléculaires de la régulation de la différenciation filamenteuse en réponse à une température de 37° C sont inconnues. Nos résultats suggèrent que la température de 37° C réduit la phosphorylation activatrice de Cdc28 par Cak1, que nous avons identifiée et classée dans une nouvelle famille de kinases spécifiques aux champignons. La protéine Cak1 constitue une cible pour des antifongiques contre le pathogène humain *C. albicans*.

Nous avons également isolé les phosphatases responsables de la déphosphorylation de la thréonine activatrice de Cdc28, il s'agit de PTC2 et PTC3. Lors de cette recherche, nous avons également mis en évidence une régulation de la croissance filamenteuse par les protéines phosphatases Cdc14, Pph21, Pph22, Pph3, Ppz1, Ppz2 et Sit4.

Nous avons montré que des mutations dans *GPI1* et les facteurs de transcription *PAF1* et *CTR9* sont colétales avec des mutations dans le gène *CAK1*. Ainsi une fonction importante de Cak1 serait de moduler l'expression du transcriptome en réponse aux stress.

Remerciements

Je voudrais exprimer toute ma gratitude aux Docteurs Carl Mann et Gérard Faye de m'avoir accueilli dans leur laboratoire et de m'avoir accordé leur confiance dans le choix des orientations à donner à mes travaux avec une grande liberté.

J'exprime mes plus sincères remerciements au Professeur Claude Gaillardin qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse, aux Professeurs Micheline Wesolowski-Louvel et Michel Aigle qui ont accepté d'en être les rapporteurs.

Je tiens à remercier l'Association pour la Recherche sur le Cancer, la Fondation pour la Recherche Médicale et Aventis pour leurs soutiens financiers.

Merci aux Professeurs André Sentenac et Maurice Wegnez de m'avoir donné l'opportunité de vivre ma passion.

Je remercie également le Professeur David Morgan de m'avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi que les Docteurs Sue Jasperson, Julia Charles et Hernan Espinoza de m'avoir apporté leur soutien pendant mon séjour à San Francisco. Merci aussi au Professeur Andrew Murray de m'avoir facilité l'accès à son laboratoire pendant les week-ends.

Un grand Merci à Monsieur Stanley Mann de m'avoir hébergé à San Francisco.

Merci à Michel Simon pour son soutien moral et son amitié.

Merci à Céline pour son aide technique, ainsi que Sarah, Odile, Carine, Maryline, Anne, Bernadette, Karine, Sophie, Thérèse, Eliane et Corinne pour leurs gentillesses.

Merci aux Docteurs Martine Heude et Roland Chanet pour nos discussions scientifiques enrichissantes.

Merci aux Docteurs Corinne et Frank Chauvat, ainsi que Kalil pour les bons moments passés ensemble au SBGM et Martin pour son aide technique dans les expériences de FPLC.

Merci à Claude Venderbure, Tassadite Selmane pour leur soutien pendant la rédaction de ce manuscrit et pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci à Carl pour son soutien moral, et l'amitié qu'il m'a témoignée au cours de ces années.

J'ai eu beaucoup de chance d'avoir bénéficié de l'encadrement des Docteurs Carl Mann et Gérard Faye et d'avoir partagé leur passion pour la recherche.

Je remercie chaleureusement mon frère, Dr. Mekki, pour ses conseils et son soutien moral. Merci à mon frère Sabri pour ses conseils dans la rédaction de ce manuscrit et de m'avoir appris les notions de programmation. Merci à ma sœur Dr. Leila pour son encouragement et bonne chance pour le résidanat. Merci à mon frère Dr. Youssef pour son soutien moral. Merci à mes frères Hechmi, Hatem, Pr. Mohamed, Pr. Ahmed et mes sœurs Raoudha et Wided pour tout ce que vous avez toujours fait pour moi.

Merci du fond du cœur à mes parents de m'avoir très bien soutenu pendant les moments difficiles.

Merci infiniment à SAMIA, t'es magnifique...

Enfin que toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail soient assurées de ma reconnaissance.

à mon oncle Heidi

Sommaire

Partie I : Cycle cellulaire et le rôle clé des CDKs

Chapitre 1 : Régulation des CDKs par la CAK

Chapitre 2 : Régulation des CDKs par les cyclines

Chapitre 3 : Régulation des CDKs par les phosphatases

Chapitre 4 : Régulation de l'élongation cellulaire et de la différenciation filamenteuse

Chapitre 5 : Candida albicans est un pathogène majeur chez l'homme

Partie II : Résultats

- I La répression des cyclines B par Xbp1 contribue aux modifications de la morphologie cellulaire en réponse à une carence en azote
- II La température de l'hôte induit la déphosphorylation de la thréonine activatrice des CDKs chez *Candida albicans*
- III Régulation et localisation de Cak1
- IV Régulation de la différenciation filamenteuse par les phosphatases CDC14, GLC7, PPH21, PPH22, PPH3, PPZ1, PPZ2, PTC2, PTC3 et SIT4 et isolement des phosphatases de Cdc28

Conclusion et Perspectives

Partie I : Cycle cellulaire et le rôle clé des CDKs

C	Chapitre 1 : Régulation des CDKs par la CAK	7				
1	Généralités					
2	2 La CAK (CDK Activating Kinase)	11				
	2.1 La famille CAK-Cdk7	11				
	2.1.1 La sous-unité catalytique de la CAK-Cdk7	11				
	2.1.2 La cycline associée à la CAK-Cdk7					
	2.1.3 La CAK-Cdk7 contient un facteur d'assemblage : MAT1					
	2.1.4 Les homologues apparents de la CAK-Cdk7	15				
	2.1.5 Structure-fonction de la CAK-Cdk7	16				
	2.1.6 Existe-t-il plusieurs CAK?	16				
3	Rôles de Cak1 chez <i>S. cerevisiae</i>	17				
	3.1 Rôle essentiel de Cak1 dans le cycle cellulaire					
	3.2 Rôle de Cak1 dans la sporulation	19				
	3.3 Cak1 est stabilisée par Cdc37	19				
	3.4 Kin28 est un substrat de Cak1	20				
4	Les homologues de <i>CAK1</i>	21				
C	Chapitre 2 : Régulation des CDKs par les cyclines	23				
1	Les cyclines G1					
2	2 Les cyclines B					
3	B L'oscillation des cyclines	27				
4	Les inhibiteurs des CDKs ou CKI					
5	5 Les interactions entre Cdc28 et la machinerie de protéolyse					
6	5 Inhibition des CDKs par phosphorylation					
7	7 Bases structurales de la régulation des CDKs					
	7.1 Site de fixation de l'ATP	35				
	7.2 Rôle de la cycline-A					
	7.3 Site de phosphorylation activatrice de Cdk2 par la CAK					
	7.4 Les Sites de phosphorylation inhibitrice					
C	Chapitre 3 : Régulation des CDKs par les phosphatases	42				
1	La phosphatase humaine KAP de Cdk2					
2	Etude des phosphatases chez S. cerevisiae					
	2.1 Les phosphatases à sérine et thréonine	45				
	2.2 Les phosphatases à double spécificité					
	2.3 Les phosphatases à tyrosines	47				
C	Chapitre 4 : Régulation de l'élongation cellulaire et de la différenciation					

filamenteuse.....48

1	La croissance polarisée chez	es eucaryotes	49
---	------------------------------	---------------	----

2	Morphogenèse du bourgeon	51
3	Sélection des sites de bourgeonnement	52
4	Géométrie des cellules pseudohyphales	53
5	Régulation de la morphogenèse filamenteuse par la voie MAPK	53
6	Complexité des voies de régulation de la morphogenèse filamenteuse	63
7	Régulation du cycle cellulaire au cours de la morphogenèse filamenteuse	66
	7.1 Régulation de la morphogenèse filamenteuse par les CDKs	67
	7.2 La croissance pseudohyphale est synchrone	69
	7.2.1 Le facteur de transcription Xbp1	71
	7.2.2 Les protéines FKH (Forkhead)	72
C	hapitre 5 : Candida albicans est un pathogène majeur chez l'homme	74
1	<i>C. albicans</i> est un pathogène majeur chez l'homme	75
2	Candida albicans et la réponse aux variations des conditions environnementales	77
	2.1 Effets de la température de l'organisme humain	77
	2.2 Environnement et sexualité	80
	2.3 Autres facteurs environnementaux	80

Partie II : Résultats

Ι	L c	a répression des cyclines B par Xbp1 contribue aux modifications de la morpholog ellulaire en réponse à une carence en azote	;ie .84
1	Intr	oduction	. 85
2	Rés	ultats	. 86
	2.1	Les mutants de Cak1 présentent une dérépression de la croissance pseudohyphale	:86
	2.2	Les cultures en Chémostat permettent d'avoir une culture homogène de cellules	. 87
	2.3	Effet du pH sur l'élongation cellulaire en milieu carencé en azote	. 88
	2.4	Réduction de l'expression des cyclines mitotiques au cours de la croissance milieu carencé en azote.	en . 89
	2.5	Modification de l'expression génique au cours de la croissance en milieu carencé azote en chémostat	en 90
	2.6	L'expression de Cks1, Cdc37 et Kin28 n'est pas modifiée en réponse à une caren en azote, mais Kin28 est déphosphorylée au cours de la croissance en milieu	ce
		carencé en glucose en chémostat	. 92
	2.7	XBP1 est nécessaire à la croissance pseudohyphale	. 94
3	Dis	cussion	. 94
	3.1	La répression de l'expression de CLB2 par Xbp1 est nécessaire à l'élongation	
		cellulaire en réponse à une carence en azote	. 94
	3.2	La réduction de la phosphorylation activatrice de Cdc28 est une régulation possib	ole
		en réponse à une carence en azote	. 96
	3.3	Xbp1 réprime l'expression de CLB2 en réponse à une carence en azote	.97
	3.4	Kin28 pourrait jouer un rôle mineur au cours de la différenciation filamenteuse, mais elle serait impliquée dans la réponse à une carence en glucose	 . 98
4	Cor	nclusion	. 99
Π	L C	a température de l'hôte induit la déphosphorylation de la thréonine activatrice des DKs chez <i>Candida albicans</i> 1	13

1	Introduction	114				
2	Une famille de protéines kinases Cak1 est spécifique aux champignons	114				
3	Les cellules mutantes Cacak1 sont déreprimées pour la croissance hyphale et					
	pseudohyphale	123				
4	La température de 37 [°] C induit une forte réduction de la phosphorylation activatric	e de				
_	CaCdc28	123				
5	Discussion	126				
6	Conclusion	129				
/ 7	Partie experimentale	129				
7	1 Isolement de CaCAK1 KICAK1 CSK1 et D $mTCP1$	129 131				
/	$12 \qquad Isolement de CaCAK1, KICAK1, CSK1 et Dint Cl 1$	131				
III	Régulation et localisation de Cak1	132				
1	Localisation de Cak1	133				
2	L'intégrité du domaine C-terminale de Cak1 est nécessaire à son activité	133				
3	Les thréonines en position 192 et 202 de Cak1 ne sont pas essentielles <i>in vivo</i> et <i>ir</i>	ı vitro				
		136				
4	La lysine en position 31 de Cak1 n'est pas essentielle in vivo	137				
5	L'aspartate 179 et le glutamate 213 sont essentiels	139				
6	La Myelin Basic Protein (MBP) est un substrat de Cak1 in vitro	139				
7	Rôles de Cak1 à 37°C	140				
8	Le niveau protéique de Cak1 diminue en phase stationnaire	140				
9	Mutants cak1 thermosensibles et leur phénotype	142				
10	Révertants extragéniques	143				
11	Recherche de mutations co-létales avec les mutations cak1-2 et cak1-4	143				
12	Discussion	144				
13	Conclusion	144				
14	Partie expérimentale	147				
1	4.1 Purification de Cak1 à partir d' <i>E. coli</i>	147				
IV	Régulation de la différenciation filamenteuse par les phosphatases CDC14. GLC	C7.				
	PPH21, PPH22, PPH3, PPZ1, PPZ2, PTC2, PTC3 et SIT4 et isolement des	,				
	phosphatases de Cdc28	148				
1		1.40				
1	Introduction	149				
2	Effet de la sur-expression des phosphatases sur la croissance cellulaire	149				
3 1	Analyse des interactions génétiques entre CDC28 et CDC14 CLC7 DDU21 DDU	131 122				
4	PPH3 PPZ1 PPZ2 PTC2 PTC3 et SIT4	122, 151				
5	Analyse des interactions génétiques entre les phosphatases <i>CDC14</i> . <i>GLC7</i> . <i>PPH2</i> .	1.				
-	PPH22. PPH3. PPZ1. PPZ2. PTC2. PTC3. SIT4 et les voies · MAPK ASH1 GPA2					
	PHD1 et XBP1	154				
6	Recherche de suppresseurs multicopies du phénotype hyper-filamenteux du mutar	nt				
	cak1-4	154				
7	Discussion	162				
8	Conclusion	163				
9	Partie expérimentale	164				

Conclusion et Perspectives

Liste des figures

Partie I : Cycle cellulaire et le rôle clé des CDKs

Figure 1.1. Rôle clé de Cdc28 dans le cycle cellulaire	5
Chapitre 1 : Régulation des CDKs par la CAK	7
Figure 1.2 Points de contrôle du cycle cellulaire	9
Figure 1.3 Rôle physiologique au complexe Cdk7-cycline H-MAT1	14
Figure 1.4 Les différentes CAKs chez la levure et les métazoaires	22
Chapitre 2 : Régulation des CDKs par les cyclines	23
Figure 2.1 Régulation de l'expression des cyclines chez S. cerevisiae	26
Figure 2.2 Logique de la succession de l'accumulation cyclines G1 puis cyclines B	29
Figure 2.3 Schéma du complexe Cdk2-cycline A	34
Figure 2.4 Rôle de la cycline A	34
Figure 2.5 Structure de Cdk2 avant et après la fixation de la cycline A	37
Figure 2.6 Interface de la région d'interaction entre l'hélice PSTAIRE et la cycline A	37
Figure 2.7 Cdk2 monomérique est inactive parce que l'ATP n'est pas accessible	39
Figure 2.8 Les principes de la régulation des CDKs	41
Chapitre 3 : Régulation des CDKs par les phosphatases	42
Chapitre 4 : Régulation de l'élongation cellulaire et de la différenciation filamenteuse	48
Figure 4.1 Les voies de développement de <i>S. cerevisiae</i>	50
Figure 4.2 Les voies de régulation de la différenciation filamenteuse chez S. cerevisiae	
Figure 4.3 Régulation de la filamentation par Kss1 et Fus3	58
Figure 4.4 Modèle : fonction de Kss1	60
Figure 4.5 Modèle : Kss1 phosphoryle Dig1/2 et Ste12	62
Chapitre 5 : Candida albicans est un pathogène majeur chez l'homme	74
Figure 5.1 Effet de la température de l'homme sur l'élongation de <i>C. albicans</i> .	79
Figure 5.2 Les voies de régulation de la différenciation hyphale chez C. albicans	82

Partie II : Résultats

I La répression des cyclines B par Xbp1 contribue aux modifications de la morphologie	
cellulaire en réponse à une carence en azote	84
Figure I.1 Sur-expression de <i>CDC28</i> ou <i>CAK1</i> dans une souche sauvage Σ	86
Figure I.2 Effet du pH sur l'élongation cellulaire	88
Figure I.3 Le niveau protéique de Cln1 diminue faiblement en carence en azote	91
Figure I.4 Kin28 est peu phosphorylée en carence en glucose	92
Figure I.5 Profil d'expression protéique de cellules Σ en carence en azote	93
Figure I.6 Le niveau protéique de Cks1 ne change pas en carence en azote	93
Figure I.7 Le profil de migration de Cdc28T169E n'est pas modifié en carence en azote	96

Figure I.8 Modèle : Boucle de retro-contrôle négatif et Xbp1/Fkh2	97
Figure 1.9 Sur-expression de <i>CDK7</i> et différenciation blastoporale	99
Figure I.10 Les cellules pseudohyphales présentent un Point de contrôle qui retarde G2 Figure I.11 Rôle de Xbp1 dans les modifications de la morphologie et du cycle cellulaire.	100 101
Figures de l'article	102
Fig. 1. Partial inactivation of Cak1 stimulates pseudohyphal growth Fig. 2 The derepressed pseudohyphal growth of <i>civ1-4</i> mutants requires the function of the	104 e
STE MAP kinase pathway	105
Fig. 3 Chemostat	106
Fig. 4. Clb2 protein levels are significantly reduced in wild-type diploid cells	107
Fig. 5 Quantitative RT-PCR of <i>CLB</i> , <i>CLN</i> and <i>XBPT</i> mRNA levels in wild-type cells Fig. 6 Homozygous diploid <i>xbp1</i> mutant cells are inhibited for cellular elongation	108
II La température de l'hôte induit la déphosphorylation de la thréonine activatrice des CDKs chez <i>Candida albicans</i>	113
Tablaau II 1 las hamalaguas fanationnals de $SaCAVI$	116
Figure II.1 les nomologues loncuonnels de ScCAA1	110
Figure II.1 Alignement multiple de ScCak1, CaCak1, KICak1, CsK1	11/
Tigure II.2 Alighement multiple de ScCaki, ZiCaki, KiCaki, CaCaki, YiCaki et Cski	119
Figure II 2h Alignement multiple des TCD	120
Tigure II.20 Alignement de mutante Cacablta/ag	122
Figure II 2 Les mutants <i>Cacal</i> l sont dérensimés neur le projection humbele	124
Figure II.5 Les inutants Cacaki sont dereprintee pour la croissance hypitale	123
Figure II.4 CaCuc28 est deprosphorylee a 57°C	120
Figure II.5 Phylogenie des CDKs	128
Figure 11.6 CaCdc28 est deprosphorylee a 37°C chez C. <i>albicans</i>	130
III Régulation et localisation de Cak1	132
Figure III.1 Localisation de GFP-Cak1	134
Figure III.2 Alignement multiple des Cdks et Cak1	135
Figure III.3 Le mutant cak1K31A n'est pas essentiel in vivo	136
Figure III.4 Purification de Cak1 chez S. cerevisiae et E. coli	138
Figure III.5 Tests d'activité des protéines mutantes Cak1	137
Figure III.6 La protéine MBP est un nouveau substrat de Cak1	140
Figure III.7 Le niveau protéique de Cak1 est réduit en phase stationnaire	141
Figure III.8 Kin28 est peu phosphorylée en phase stationnaire	.141
Figure III.9 Détermination de la constante de dissociation de Cak1	146
IV Régulation de la différenciation filamenteuse par les phosphatases CDC14, GLC7, PPH21, PPH22, PPH3, PPZ1, PPZ2, PTC2, PTC3 et SIT4 et isolement des phosphatases de Cdc28.	148
Figure IV.1 Effet de la sur-expression des phosphatases sur la croissance cellulaire	.151
Figure IV.2 Sur-expression des phosphatases	152
Figure IV.3 Co-expression des phosphatases et de CDC28-43244	153
Figure IV.4-1 Sur-expression des phosphatases dans une souche Agpa2	.155
Figure IV.4-2 Sur-expression des phosphatases dans une souche $\Delta phd1$.156
Figure IV.4-3 Sur-expression des phosphatases dans une souche Axhn1	.157
Figure IV 4-4 Sur-expression des phosphatases dans une souche Aash1	158
Figure IV 4-5 Sur-expression des phosphalases dans une souche $Asto 20$	159
Figure IV 4-6 Sur-expression des phosphalases dans une souche Atoc 1	160
T 1501 V 1 T T O DUI VAPIODIOI NO PHOPHUMOO NUID UNO DOUONO 2001	

Figure IV.4-7 Sur-expression des phosphatases dans une souche Aras2	161
Figure IV.5 Alignement de séquences de Cdc14 de S. cerevisiae et de KAP humaine	163

Conclusion et Perspectives

Figure	V.	Régulation	de la	filamentation	par Cak1.	Cdc28.	Clb2 et Xb	p1	168
					p	,		P	

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique ADNc : ADN complémentaire ARN : acide ribonucléque ATP : adénosine triphosphate CAK : « CDK-activating-kinase » cdc : »cell division cycle » CDK : « cyclin-dependent-kinase » CLB : cycline B CLN : cycline G1 DAPI: 4'-6' diamino-2-phénylindol JNK : « jun activating kinase » Kb : kilo base kDa : kilo Dalton MAPK : « mitogen-activated protein kinase» MAPKK : « mitogen-activated protein kinase kinase» MAPKKK : « mitogen-activated protein kinase kinase kinase» MPF : « maturation promoting factor » pb : paire de bases PCR : « polymerase chain reaction » RB: « Retinoblastoma protein » SPB : « spindle pole body » ts : thermosensible RT-PCR : « reverse trancription-PCR » UV :ultra violet

At : Arabidopsis thaliana Ca : C. albicans : Candida albicans Ce : Caenorhabditis elegans Dm : Drosophila melanogaster Ec : E. coli : Escherichia coli Hs : Homo sapiens Kl : K. lactis : Kluyveromyces lactis Tv : Thermoplasma volcanium Sc : S. cerevisiae : Saccharomyces cerevisiae Sp : S. pombe : Schizosaccharomyces pombe Xl : Xenopus lavis Yl : Y. lipolitica : Yarrowia lipolitica

Zr: Zygosaccharomyces rouxii

Introduction

Les protéines kinases dépendantes des cyclines, les CDKs, sont des régulateurs cruciaux dans la coordination des événements du cycle cellulaire des eucaryotes (Morgan, 1996; Morgan et De Bondt, 1994; Nurse, 1990). Elles constituent l'horloge du cycle cellulaire (Morgan, 1997). L'action transitoire de ces kinases à des stades spécifiques du cycle cellulaire déclenche les principales transitions du cycle cellulaire. Chez les levures, ces transitions sont sous le contrôle d'une seule CDK (Cdc28 chez *S. cerevisiae*) (Broek et al., 1991). Dans les cellules humaines, le cycle cellulaire est gouverné par plusieurs CDKs (notamment *CDC2* et *CDK2*) (Dorée et Galas, 1994; Nigg, 1995). Elles sont étroitement apparentées à Cdc28/Cdc2 avec environ 65% d'identité de séquence.

Le cycle cellulaire dépend des oscillations de l'activité des CDKs. Cette activité est induite par des mécanismes complexes comprenant la liaison de sous-unités régulatrices et des phosphorylations au niveau de sites régulateurs positifs et négatifs.

Cdc28 est une petite molécule d'environ 34 kD, elle contient le cœur catalytique conservé chez toutes les protéines kinases des eucaryotes. Cdc28 est inactive sous forme monomérique, l'activation nécessite la fixation d'une cycline (Jeffrey et al., 1995).

Les cellules tumorales sont typiquement endommagées au niveau de gènes qui régulent directement le cycle cellulaire. Les cyclines D, partenaires de Cdk4 et Cdk6, agissent en réponse aux facteurs de croissances. L'activité kinase dépendante de la cycline B gouverne la phosphorylation de la protéine RB et la sortie de la phase G1 du cycle cellulaire. Des altérations génétiques affectant la cycline D1 sont très fréquentes dans les cancers humains où l'inactivation de cette voie est nécessaire pour le développement de la tumeur (Diehl et al., 1997; Zindy et al., 1997).

L'activité kinase du complexe CDK-cycline est également régulée par des phosphorylations/déphosphorylations. La seule fixation des cyclines n'active pas totalement la sous-unité catalytique CDK, la phosphorylation au niveau de résidu(s) localisés dans un segment particulier dans le centre du domaine kinasique appelé "segment d'activation", aboutit à l'activation maximale du complexe CDK-cycline.

La CAK phosphorylant Cdc2 et Cdk2 a été isolée chez le Xénope, l'étoile de mer et les mammifères (Fesquet et al., 1993 ; Solomon et al., 1993 ; Poon et al., 1993; Darbon et al., 1994; Wu et al., 1994). La sous-unité catalytique de cette kinase a été identifiée comme étant MO15 et rebaptisée Cdk7 du fait qu'elle est associée à une cycline activatrice appelée Cycline H (Labbe et al., 1994; Makela et al., 1994), et un facteur d'assemblage appelé MAT1 (Devault et al., 1995; Tassan et al., 1995; Yee et al., 1995).

Cak1, la kinase responsable de la phosphorylation activatrice sur la thréonine située au niveau de la boucle T des CDKs chez *S. cerevisiae*, a été identifiée récemment (Thuret et al., 1996; Espinoza et al., 1996; Kaldis et al., 1998). Des mutants *cak1* sont très allongés et

déréprimés pour la différenciation filamenteuse. Les bases moléculaires des modifications du cycle cellulaire au cours de la morphogenèse filamenteuse sont inconnues.

Les souches sauvages de levures s'adaptent aux variations des conditions de l'environnement pour survivre. La physiologie cellulaire de ces microorganismes est facilement influencée par l'environnement. De nombreux signaux environnementaux qui activent diverses voies de signalisation dans la cellule induisent des changements morphologiques de la cellule et des modifications profondes du cycle cellulaire (Ahn et al., 1999; Gancedo, 2001; Kron et Gow, 1995; Kron et al., 1994). Une carence en azote induit la différenciation pseudohyphale chez les cellules diploïdes de *S. cerevisiae* (Gimeno et al., 1992). La température de 37° C et d'autres signaux, souvent liés aux stress, induisent les développements hyphale et pseudohyphale chez *C. albicans* (Ernst, 2000). Une carence en glucose induit la croissance invasive chez les cellules haploïdes de *S. cerevisiae* (Cullen et Sprague, 2000).

La différenciation filamenteuse consiste en une croissance cellulaire polarisée. La division cellulaire unidirectionnelle est présente chez tous les organismes : elle a eu lieu par exemple durant l'embryogenèse chez *C. elegans*, la neurogenèse chez la drosophile, le développement des spores chez *B. subtilis* et de la tige chez les plantes (Madden et Snyder, 1998; Chant, 1999; Kron et Gow, 1995; Kron, 1997; Durbin et al., 1996).

La croissance polarisée du bourgeon commence au point Start du cycle cellulaire lorsque Cdc28 est activée par Cln1 et Cln2. Cette croissance est inhibée par l'activité kinase Cdc28-Clb1,2 (Nasmyth, 1993). Nos études génétiques suggèrent que la réduction de l'activité kinase mitotique serait à l'origine de la croissance hyperpolarisée.

Nous avons utilisé un chémostat pour effectuer des analyses biochimiques de la différenciation filamenteuse qui n'existaient pas auparavant. Nous avons découvert que le facteur de transcription *XBP1* est essentiel pour le développement filamenteux. L'inhibition de la transcription des cyclines *CLB1* et *CLB2* par Xbp1 réduit l'activité kinase du complexe Cdc28-Clb1/2 induisant ainsi un retard en G2 et une élongation cellulaire caractéristiques de la croissance filamenteuse. Ainsi la répression de l'expression des cyclines B par Xbp1 contribue aux modifications de la morphologie et du cycle cellulaire en réponse à une carence en azote. Il est probable que Xbp1 régule l'expression d'autres gènes impliqués dans la différenciation pseudohyphale (*Miled, C., Mann, C., et Faye, G. (2001). Xbp1-mediated repression of clb gene expression contributes to the modifications of yeast cell morphology and cell cycle seen during nitrogen-limited growth. Mol Cell Biol 21, 3714-24).*

En carence en glucose, la croissance invasive est déclenchée (Cullen et Sprague, 2000), l'expression des cyclines *CLB1* et *CLB2* n'est pas modifiée. Nous avons montré que la phosphorylation activatrice de Cdc28 est réduite. Ainsi la réduction de l'activité kinase associée à Cdc28 est nécessaire pour coordonner la croissance cellulaire et le niveau de nutriment disponible dans l'habitat des cellules. Nous avons montré aussi que le niveau de Cak1 est fortement réduit en phase stationnaire. L'ensemble de nos résultats montre que l'activité kinase associée à Cdc28 joue un rôle clé au cours des modifications du cycle cellulaire et de la morphologie cellulaire en réponse à des changements environnementaux. La réduction du niveau de phosphorylation de Cdc28T169 en réponse à une carence en glucose est due soit à une inhibition de la CAK, soit à une activation des phosphatases déphosphorylant la thréonine 169 de Cdc28. Nous avons isolé les phosphatases responsables de la déphosphorylation de la thréonine activatrice de Cdc28, il s'agit de PTC2 et PTC3. Lors de cette recherche, nous avons également mis en évidence une régulation de la croissance filamenteuse par les protéines phosphatases Cdc14, Pph21, Pph22, Pph3, Ppz1, Ppz2 et Sit4.

Les voies de régulation de la différenciation filamenteuse sur lesquelles ces phosphatases doivent agir restent à identifier (Un article sera soumis).

Nous avons également isolé les gènes *GAL11*, *GSH2*, *SSP1*, *SPA2* et *SCO2*, ou *MRF1*' comme inducteurs et suppresseurs du phénotype hyper-filamenteux de la souche *cak1-4*, respectivement.

La communauté scientifique considère que la phosphorylation activatrice des CDKs par Cak1 est constitutive (Harper et Elledge, 1998). Nous avons identifié une nouvelle famille de protéines kinases responsables de la phosphorylation activatrice des CDKs : la famille CAK1. La protéine kinase Cdk7 associée à la cycline H possède une activité CAK chez l'homme (Harper et Elledge, 1998). Nous avons montré que la coexpression de CDK7 et cycline H complémente un mutant cak1-4 à température restrictive alors que la seule expression de CDK7 ne suffit pas pour remplacer la fonction de CAK1 chez *S. cerevisiae*. Ainsi Cdk7-cycline H possède une activité CAK *in vivo* chez *S. cerevisiae*. Les résultats suggèrent très fortement que la kinase CAK1 est spécifique aux champignons et ne présente pas d'homologues évidents chez les eucaryotes supérieurs et il semblerait que Cdk7-cycline H soit une véritable CAK *in vivo* chez les eucaryotes supérieurs, mais ceci n'exclut pas la présence d'autres kinases ayant une activité CAK et ne possédant pas de séquences similaires aux membres de la famille CAK1.

Cette famille semble être spécifique aux champignons et ne présente pas d'homologue chez l'homme. Candida albicans est un champignon pathogène très répandu chez l'homme. Malgré les thérapies disponibles, la mortalité due aux infections systémiques par C. albicans est proche de 30 % (Gale et al., 1998). Les gènes spécifiques aux champignons et qui contribuent à la virulence et la pathogénicité sont très recherchés. La protéine CaCak1 constitue une cible pour des antifongiques. La température de l'organisme humain est nécessaire pour induire la filamentation chez C. albicans (Braun et Johnson, 1997; Riggle et al., 1999; Sonneborn et al., 1999; Ernst, 2000). Les voies de signalisation cellulaires activées par la température de 37°C sont inconnues. Nos résultats suggèrent que la température de l'hôte induise une réduction de la phosphorylation activatrice de CaCdc28. Nous avons montré que des mutants thermosensibles de CaCAK1 (que nous avons isolés) sont fortement déréprimés pour la croissance pseudohyphale à température permissive chez C. albicans. L'ensemble de nos résultats suggère fortement que la réduction de l'activité kinase de Cak1/Cdc28, en réponse à la température de l'hôte, serait responsable de l'élongation cellulaire et des modifications du cycle cellulaire au cours de la différenciation pseudohyphale et hyphale chez C. albicans (Un article sera soumis).

Nous avons montré que GFP-Cak1 est localisée dans le noyau et dans le cytoplasme *in vivo*. Nous avons également montré que la lysine et la thréonine hautement conservées et essentielles au processus catalytique dans la grande famille des protéines kinases, ne sont pas essentielles à l'activité de ScCak1 *in vivo*.

Nous avons mis en évidence des interactions génétiques entre le gène *CAK1* et les gènes *GPI1*, *PAF1* et *CTR9*. Nos résultats suggèrent fortement que Cak1 joue un rôle dans la régulation de la machinerie de la transcription. Des expériences biochimiques sont en cours pour savoir si la protéine Cak1 interagit physiquement avec les facteurs Paf1, Ctr9 et Gpi1. Il est donc possible que Cak1 coordonne l'avancement dans le cycle cellulaire et l'expression génique (Un article sera soumis).

Finalement nous avons trouvé que la kinase *JNK3* humaine supprime le défaut de croissance du mutant *cak1-4*. Jnk3 est une MAPK de la famille JNK ou SAPK (stress-sctivated MAPK) (Davis, 2000), *JNK3* pourrait être l'activité CAK très recherchée chez les eucaryotes supérieurs.

Les figures I.11 (page 101) et V (page 168) résument la contribution de ces travaux dans la compréhension des bases moléculaires de la régulation de la morphologie cellulaire et des modifications du cycle cellulaire en réponse à des variations des signaux environnementaux chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*.





Cycle cellulaire et le rôle clé des CDKs

CHAPITRE 1

Régulation des CDKs par la CAK

1 Généralités

Tous les organismes vivants sont composés d'une ou plusieurs cellules. La naissance de nouvelles cellules se produit uniquement par la division d'une cellule préexistante. Pour se reproduire la cellule réplique ses chromosomes (support de l'information génétique) durant la phase S (Synthèse d'ADN) et les répartit dans deux cellules filles durant la phase M (Mitose). Ces deux phases sont séparées par deux intervalles, G2 et G1 (Gap).

La production de deux cellules filles viables et génétiquement identiques pose de nombreux problèmes. Les cellules doivent répliquer leurs chromosomes puis les répartir dans les deux cellules filles. Ces deux activités doivent être coordonnées dans le temps. Par exemple une condensation prématurée des chromosomes empêcherait la réplication totale du matériel génétique : les cellules ne doivent donc pas entrer en mitose avant de terminer la réplication de l'ADN. C'est un exemple du problème d'achèvement (completion) : certains processus du cycle cellulaire doivent s'achever avant que d'autres ne commencent. Un autre problème que la cellule doit résoudre est le problème de l'alternance : par exemple des mécanismes assurent que chaque événement de réplication de l'ADN est suivi d'un événement de ségrégation des chromosomes plutôt que d'un autre événement de réplication de l'ADN (Figure 1.2).

Des séries d'expériences fondamentales ont permis de révéler la logique du cycle cellulaire. La fusion de cellules en phase G1 de mammifères avec des cellules en phase S induit l'entrée en phase de synthèse d'ADN des noyaux des cellules en G1. Ceci suggère la présence dans le cytoplasme des cellules en phase S d'un certain nombre de facteurs qui induisent la réplication de l'ADN des noyaux des cellules en phase G1. Par contre la fusion de cellules en phase G2 avec des cellules en phase S n'induit pas la réplication de l'ADN des noyaux en phase G2, ce qui démontre l'existence de mécanismes empêchant une réplication supplémentaire (Johnson et Rothstein, 1970; Rao et Johnson, 1970).

La levure *S. cerevisiae* se divise par bourgeonnement, cette propriété rend plus facile le suivi de la progression dans le cycle cellulaire de cellules vivantes : en fin de phase G1 (début d'un nouveau cycle) un petit bourgeon se forme, il grandit continuellement et la dernière étape est la séparation d'avec la cellule mère.



Figure 1.2 Points de contrôle du cycle cellulaire

La formation du bourgeon a lieu juste après Start, ce qui constitue un marqueur commode de cet événement. Le rapport de taille entre cellule mère et bourgeon donne une estimation de la position de la cellule mère dans le cycle cellulaire.

Chez *S. cerevisiae*, la mitose est du type « fermé » : la membrane nucléaire reste intacte au cours de la division. Le contenu en ADN révèle la position dans le cycle cellulaire, il est mesuré par la technique de cytometrie de flux (FACS). Les cellules en G2 contiennent deux fois plus d'ADN que les cellules en G1 (les cellules en phase S contiennent une quantité intermédiaire). Cette technique permet de savoir à quelle phase du cycle un mutant *cdc* est arrêté.

Un mutant *cdc28ts* bloque à température restrictive tous les événements en aval de Start dans le cycle cellulaire. Les cellules continuent à croître toutefois elles sont incapables de bourgeonner, de dupliquer leur SPB ou de répliquer leur ADN. La capacité d'une seule mutation de bloquer tous ces processus suggère que la protéine Cdc28 est une composante clé de la machinerie du cycle cellulaire. Des mutants *cdc28ts* permettent de donner une définition précise de Start : c'est le point dans le cycle cellulaire où bourgeonnement, réplication de l'ADN et duplication du SPB deviennent insensibles à la perte de la fonction *CDC28*. Dès que les cellules ont passé ce point, elles sont obligatoirement engagées dans un nouveau cycle (Hartwell, 1974).

La protéine Cdc28 appartient à la famille des CDKs conservée de la levure jusqu'à l'homme. La protéine kinase Cdc28 n'est pas active sous forme monomérique, mais seulement quand elle est associée à une cycline. Le complexe Cdc28-cycline B est appelé MPF (Maturation Promoting Factor). Le MPF avait été isolé biochimiquement comme facteur déclenchant la mitose chez le Xénope : le traitement des œufs par un inhibiteur de la synthèse protéique arrête les cellules en interphase, par contre l'injection de MPF dans les œufs arrêtés induit leur entrée en mitose, ce qui suggère que le rôle de la synthèse protéique dans le cycle cellulaire est limité à l'induction de l'activation du MPF (Newport et Kirschner, 1984).

Hunt et al., ont découvert les cyclines et ont montré que la quantité de ces protéines augmente durant l'interphase et décline brutalement à la fin de chaque mitose (Evans et al., 1983). A partir de ces résultats on a construit un modèle simple : la protéine Cdc28/Cdc2 est exprimée constitutivement et c'est la destruction périodique des cyclines qui détermine l'oscillation de l'activité du facteur MPF (Murray et Kirschner, 1989; Murray et al., 1989).

Cependant la protéine kinase Cdc28 associée à une cycline n'est pas active, mais elle doit être phosphorylée sur une thréonine en position 169. Cette phosphorylation est réalisée par une enzyme appelée CAK (Figure 1.1).

2 La CAK (CDK Activating Kinase)

2.1 La famille CAK-Cdk7

2.1.1 La sous-unité catalytique de la CAK-Cdk7

La protéine Cdk2 humaine est une kinase très proche de Cdc28 et joue un rôle important lors de la transition G1/S chez les eucaryotes supérieurs. Elle présente un site majeur phosphorylable au niveau de la Thr160. La substitution de cette thréonine par une alanine abolit l'activité de la kinase. La thréonine 160 est conservée chez toutes les autres CDKs. Le remplacement du résidu équivalent chez Cdc2 par un autre résidu non phosphorylable donne aussi une kinase inactive à l'exception du remplacement par un glutamate qui donne un mutant présentant une accumulation de complexes Cdc2-T161E-Clb2 en mitose. Ce résultat suggère que le glutamate mime une phosphorylation constitutive de Thr161 et que ce résidu doit être déphosphorylé pour sortir de la mitose (Fesquet et al., 1993). La majorité des CDKs connues ne sont actives que sous forme phosphorylation activatrice des CDKs est donc une composante centrale du réseau régulateur du cycle cellulaire (Poon et al., 1993).

Cdk2 et plusieurs autres CDKs ne sont pas capables de s'autophosphoryler, il existe donc une kinase responsable de leur phosphorylation activatrice. On donne à cette activité kinase le nom de CAK pour <u>CDK</u> <u>A</u>ctivating <u>K</u>inase. Plusieurs équipes utilisant des approches différentes et des organismes différents ont caractérisé cette kinase.

En se basant sur la capacité de la CAK d'activer Cdc2-cycline, Fesquet et al ont purifié la CAK à partir de l'étoile de mer en partant d'un extrait cellulaire. La fraction hautement purifiée phosphoryle Cdc2 uniquement sur la thréonine 160. La CAK peut utiliser Cdc2 ou Cdk2 associées aux cyclines A ou B. La CAK de l'étoile de mer présente une forte homologie de séquence avec une protéine du Xénope appelée MO15 (Fesquet et al., 1993). A l'origine MO15 a été isolée dans une recherche d'homologues de Cdc2. Hunt et al ont montré que MO15 ne phosphoryle pas l'histone H1, un substrat de Cdc2. (Poon et al., 1993).

2.1.2 La cycline associée à la CAK-Cdk7

L'équipe de Morgan a montré que l'homologue de MO15 chez les mammifères, Cdk7, possède un autre partenaire qui est une cycline appelée cycline H. La CAK est donc un nouveau complexe CDK-cycline capable de phosphoryler un ensemble de complexes CDKs. On montre que dans le cas de la kinase Cdc2, l'activation se passe en deux étapes, la fixation de la cycline est suivie par la phosphorylation de la Thr161 par la CAK. On peut aussi observer *in vitro* une interaction stable entre cycline B et Cdc2 en l'absence de phosphorylation (Desai et al., 1992), ainsi que la phosphorylation de Cdk2 monomérique (Fisher et al., 1994), mais on ne connaît pas la signification physiologique de ces réactions. L'activité de la CAK semble être constitutive au cours du cycle cellulaire : les variations du niveau d'activité des CDKs semblent plutôt refléter le niveau de cycline disponible (Fisher et al., 1995).

D'autres études ont montré que la CAK du Xénope, MO15, nécessite une translocation dans le noyau après sa traduction pour acquérir une activité kinase. MO15 présente une séquence signale de localisation nucléaire. Des mutations au niveau de cette séquence abolissent la translocation de la CAK dans le noyau et suppriment son activité.

On a vu précédemment que MO15 a été découverte suite à une recherche d'homologie avec les CDKs. Comme pour Cdc2, la phosphorylation de la Thr176 (équivalente à la thréonine 160) est nécessaire à l'activité du complexe Cdk7-cycline H. Il ne s'agit pas d'une autophosphorylation intramoléculaire car un mutant *cdk7* incapable de fixer l'ATP est toujours phosphorylable sur la thréonine 176 (Devault et al., 1995).

2.1.3 La CAK-Cdk7 contient un facteur d'assemblage : MAT1

Un troisième partenaire de la CAK a été isolé. Il s'agit de la protéine MAT1 (Ménage A Trois). Cette protéine est un nouveau membre de la famille des protéines à "RING finger" caractérisées par le motif C3HC4 dans la moitié N-terminale. On a pu montrer qu'on peut obtenir des complexes hétérotrimériques de CAK à partir de l'expression des ARNm de CDK7, cycline H et MAT1 dans des lysats de réticulocytes. Par contre on n'obtient pas de complexes hétérodimériques Cdk7-cycline H à partir de lysat de réticulocyte programmés uniquement avec des ARNm de Cdk7 et cycline H. Ces résultats suggèrent que la protéine MAT1 stabilise le complexe Cdk7-cycline H et qu'elle reste probablement fixée à ce

complexe. La stabilisation des complexes CAK ne fait pas intervenir la phosphorylation de la Thr176 car le mutant Cdk7Thr176Ala est engagé efficacement et comparablement à la protéine Cdk7 sauvage dans un complexe ternaire. Les protéines MAT1 de l'étoile de mer et MAT1 du Xénope présentent des domaines "RING finger" identiques, mais on ne peut pas stabiliser le complexe Cdk7-cycline H du Xénope par MAT1 de l'étoile de mer, ce qui suggère que MAT1 n'interagit pas avec Cdk7-cycline H par le domaine "RING finger" (ou pas seulement) (Martinez et al., 1997).

L'homologue de MAT1 chez la souris est la protéine p36. On sait que p36 est un facteur qui favorise l'assemblage de la Cdk7 et la cycline H et reste associée au complexe après avoir induit un changement conformationnel du complexe CAK. Mais comment expliquer qu'on ait pu reconstituer une CAK active avec seulement Cdk7 et cycline H? En attendant la solution de ce paradoxe, on a découvert un autre mécanisme de l'assemblage et de l'activation de la CAK. Un complexe binaire Cdk7-cycline H ne peut être formé que si la Thr170 de la Cdk7 est phosphorylée. Ce mode de stabilisation de CDK-cycline a un précédent : la phosphorylation activatrice de la thréonine de Cdc2 par la CAK est nécessaire pour l'assemblage de Cdc2 et de la cycline A. Existe-t-il des conditions physiologiques dans lesquelles la Thr170 ne peut pas être phosphorylée in vivo et où l'assemblage de la CAK devient strictement dépendant de la p36? Une réponse définitive à cette question doit attendre l'identification de la CAKAK ou CDK Activating Kinase Activating Kinase (l'enzyme qui phosphoryle la CAK sur la thréonine 170) in vivo et l'évaluation de son activité tout le long du cycle cellulaire. Il semble que les complexes Cdc2 et Cdk2 aient -in vitro- une activité CAKAK. Accomplissent-elles la même fonction in vivo? Dans ce cas, l'activation des CDK serait gouvernée par une boucle de rétrocontrôle positif dans laquelle les cibles de la CAK, les CDKs, sont aussi ses activateurs. Cependant, pour initier la boucle, la CAK active doit être formée en absence de CDK actives préexistantes. La présence de p36, en contournant l'étape nécessaire de la phosphorylation, peut conférer une autonomie au complexe trimérique de la CAK (Fisher et al., 1995).

La figure 1.3 présente trois voies possibles permettant d'attribuer un rôle physiologique au complexe Cdk7-cycline H-MAT.



Figure 1.3 Il existe trois voies possibles imaginables pour attribuer un rôle physiologique au complexe Cdk7-Cycline H-MAT1 (A) le complexe pourrait avoir une double fonction, elle phosphoryle le CTD et Cdl2. (B) le complexe phosphoryle Cdl2 et agit indirectement sur le TFIIH, mais ne possède pas d'activité CTD kinase. (C) le complexe phosphoryle le CTD directement, mais ne phosphoryle pas Cdk2. Modifié à partir (Nigg, 1996)

2.1.4 Les homologues apparents de la CAK-Cdk7

Il existe un homologue de la CAK Cdk7/MO15 chez *S. pombe* : Crk1/Mop1. Le gène *CRK1* est essentiel. La protéine Crk1 est associée à une cycline appelée Mcs2, elle est homologue à la cycline H. Le complexe Crk1-Mcs2 possède une activité CAK *in vitro* du fait qu'il phosphoryle Cdk2 sur la Thr160. D'autre part ce complexe phosphoryle un peptide correspondant au domaine CTD de l'ARN polymérase (Buck et al., 1995). De plus, MO15 complémente un mutant $\Delta Crk1$ (Damagnez et al., 1995).

Il existe un homologue de Cdk7-MO15 chez *S. cerevisiae*, Kin28. Comme MO15/Cdk7, qui a été identifié aussi comme composante du facteur de transcription TFIIH, Kin28 appartient à TFIIH et est associée à une cycline, Ccl1, homologue à la cycline H (Valay et al., 1993; Valay et al., 1995; Valay et al., 1996). Kin28 est une protéine kinase de la famille Cdc28/Cdc2. Quel est son rôle au niveau du facteur de transcription TFIIH? La plus grosse sous-unité de l'ARN polymérase II contient un domaine carboxy-terminal essentiel, le CTD, impliqué dans la réponse aux facteurs de régulation lors de l'initiation de la transcription. Le domaine CTD est phosphorylé *in vivo* et il est la cible de phosphorylation par le facteur TFIIH *in vitro* (Serizawa et al., 1994). Le groupe de Kornberg a montré que, chez la levure, cette fonction est assurée par la kinase Kin28-Ccl1 (Feaver et al., 1994).

Puisque Kin28 et la CAK des eucaryotes supérieurs accomplissent la même fonction CTD kinase et qu'elles présentent une bonne homologie de séquence, il était possible sinon probable que Kin28 soit la CAK de levure. Cependant, dans un mutant *kin28ts*, le taux de phosphorylation activatrice de Cdc28 au niveau de la thréonine 169 est inchangé à température restrictive. De plus, l'immunoprécipitation de Kin28 dans un extrait brut de la levure possédant une forte activité CAK ne précipite pas l'activité CAK, alors qu'elle précipite l'activité CTD-kinase. Finalement, *in vitro* Kin28 ne phosphoryle pas Cdc28, donc Kin28 apparaît ne pas être la CAK de la levure (Cismowski et al., 1995). Ainsi chez la levure, la CTD-kinase et la CAK ne sont pas identiques, contrairement à Cdk7/MO15 qui intègre les deux fonctions. Comment expliquer cette divergence entre la levure et les eucaryotes supérieurs ? Il est possible que chez les vertébrés la même enzyme possède deux fonctions différentes, tandis que *S. cerevisiae* a besoin de deux enzymes différentes pour accomplir deux fonctions différentes (Cismowski et al., 1995; Nigg, 1996).

2.1.5 Structure-fonction de la CAK-Cdk7

En absence de MAT1, la phosphorylation de la boucle T est nécessaire pour la fixation de la cycline H sur Cdk7. La phosphorylation des résidus S170 et T176 est nécessaire pour la fixation de la cycline H sur Cdk7. En effet, dans un lysat de réticulocyte les complexes GST-Cdk2-CycA et GST-Cdc2-CycB s'expriment et sont responsables des phosphorylations des résidus S170 et T176 de Cdk7 en absence de la cycline H. Cette double phosphorylation confère à Cdk7 le tiers de son activité CAK *in vitro*. Des résultats similaires ont été obtenus en remplaçant S170 et T176 par des D.

Le mutant Cdk7T176A n'interagit pas avec la cycline H dans un test double hybride (Makela et al., 1994). En absence de MAT1, la phosphorylation activatrice de la boucle T est nécessaire pour la formation du complexe Cdk7-cycline H. La phosphorylation des résidus S170 et T176 ne nécessite pas la fixation de la cycline H *in vitro*. La phosphorylation de la S170 est suffisante pour que Cdk7 fixe la cycline H avec une faible affinité. Ainsi, la fixation de la cycline H avec une faible affinité. Ainsi, la fixation de la cycline H avec une forte affinité et l'activation complète de la CAK nécessite la phosphorylation des résidus S170 et T176 (Martinez et al., 1997).

La phosphorylation activatrice de Cdc2 et Cdk2 n'est pas régulée au cours du cycle cellulaire. Cependant la phosphorylation activatrice de Cdk4 et 6 est inhibée par fixation des inhibiteurs p21 et p27 respectivement sur Cdk4 et 6 *in vitro*. Ceci a pour conséquence d'empêcher l'accès de la CAK à la thréonine activatrice (Aprelikova et al., 1995). La communauté scientifique considère que l'activité CAK est constitutive (Harper et Elledge, 1998).

2.1.6 Existe-t-il plusieurs CAKs?

Chez la drosophile, l'activité CAK est constituée d'un complexe très similaire à Cdk7cycline H-MAT1. La CAK de la drosophile, *DmCDK7* est la seule CAK chez les métazoaires possédant une activité CAK *in vivo*. Un mutant *cdk7* thermosensible présente une chute de l'activité CAK à température restrictive. Dans ce cas Cdc2 n'est pas phosphorylée sur la T161, mais elle est capable de s'associer à la cycline B et non pas à la cycline A .Cependant l'activité liée à Cdk2 n'est pas affectée. Ceci suggère que Cdk2 nécessite un très faible niveau d'activité CAK ou bien qu'il existe d'autre(s) activité(es) CAK minoritaires responsables de la phosphorylation activatrice de Cdk2T160 (Larochelle et al., 1998). Des cellules humaines d'un hépatocarcinome traité par TGF- β induit un arrêt en G1. Elles présentent une hypophosphorylation de Cdk2T160, alors que l'activité CAK liée à Cdk7-cycline H-MAT1 est constante. Ceci suggère que Cdk2 possède une CAK spécifique différente de la CAK associée à Cdk7, ou bien TGF- β induit une phosphatase spécifique à Cdk2T160 (Nagahara et al., 1999).

En fixant Cdk2 sur une colonne puis en faisant passer à travers cette colonne un extrait protéique de cellules humaines, Kaldis et Solomon ont détecté la présence d'une activité CAK différente de CAK-Cdk7. Cette activité (46kDa) phosphoryle et active Cdk2. Curieusement il n'a pas été possible de déterminer la séquence de cette hypothétique CAK (Kaldis et Solomon, 2000).

3 Rôles de Cak1 chez S. cerevisiae

En se basant sur la capacité de la CAK de S. cerevisiae à activer Cdk2-cycline A, notre équipe et celles de Morgan et de Solomon ont purifié la CAK de S. cerevisiae, appelée Cak1 (Deux autres noms ont été aussi donnés : Civ1 et Mca28). C'est une protéine de 44 kDa, elle a été isolée comme suppresseur multicopie d'un mutant kin28 thermosensible par le groupe de Faye. CAK1 est un gène essentiel. Il code pour une protéine kinase active sous forme monomérique. Nous avons montré que la protéine Cak1 purifiée à partir de E. coli est capable de phosphoryler Cdc28 sur la thréonine 169. Dans un mutant cak1-4, Cdc28 est majoritairement déphosphorylée sur la thréonine 169 à température permissive. Un mutant cak1K31R possède moins de 10 % d'activité CAK in vitro (voir résultats et (Kaldis et al., 1998)). Cak1 possède plus de 97 % de l'activité CAK chez la levure. Le niveau d'activité et la quantité de Cak1 sont constants au cours du cycle cellulaire (Espinoza et al., 1996; Kaldis et al., 1998). Dans un mutant *cak1-4*, il y a 50 % de cellules en G1 à 25°C. Ce contenu passe à 70 % après un passage de 5 heures à 37°C. D'autres mutants de cakl présentent une accumulation majoritaire de cellules en G2 à température restrictive (Sutton et Freiman, 1997). Ainsi CAK1 est nécessaire pour les passages G1/S et G2/M. Une spore délétée pour CAK1 germe et se divise plusieurs fois avant l'arrêt de la division (Valay, 1994). Les cellules présentent une très forte croissance polarisée comparable à la croissance pseudohyphale.

3.1 Rôle essentiel de Cak1 dans le cycle cellulaire

Cross et Levine ont construit un mutant de CDC28 dont l'activité est indépendante de CAK1. Chez plusieurs CDKs, la substitution de la phosphothréonine activatrice par un résidu glutamate est suffisante pour rendre la protéine active. Un mutant cdc28T169E n'est pas actif. En utilisant plusieurs cycles de PCR mutagène sur ce mutant Cross et Levine ont isolé un mutant CDC28-43244 actif. Les mutations sont situées préférentiellement au niveau du feuillet β4, en se basant sur l'alignement de Cdc28 avec Cdk2 (Levine et al., 1998). Le mutant CDC28-43244 nécessite la fixation des cyclines pour son activité. L'activité kinase associée à Clb2 est proche de la normale, cependant l'activité kinase associée à Cln2 représente 50 % de l'activité kinase du complexe sauvage. Une souche délétée pour CDC28 et CAK1 et contenant le mutant CDC28-43244 est viable à 25°C sur un milieu complet. Ceci montre que les cycles déphosphorylation/phosphorylation ne sont pas nécessaires pour la régulation du cycle cellulaire et que le seul rôle essentiel de CAK1 (en croissance végétative et à 25°C) est la phosphorylation de Cdc28 sur la thréonine 169. Les études de Surana ont montré que la déphosphorylation de Cdc28T169 n'est pas essentielle pour la sortie de la mitose (Lim et al., 1996). CAK1 pourrait avoir d'autres fonctions essentielles pour l'accomplissement d'autres processus cellulaires dans des conditions bien définies. Démontrer l'existence d'une régulation de la phosphorylation activatrice par la CAK serait très novateur et inattendu.

Les travaux de Cross et Levine ont permis d'expliquer les relations entre la boucle d'activation et la liaison des cyclines dans l'activation de Cdc28. On a vu que Cdc28-43244 fixe Cln2 avec une faible affinité. Cependant une réversion du mutant *CDC28-43244* a été obtenue (*CDC28-43244T169E* en T169T) qui phosphorylée sur la thréonine169 rend la kinase active en absence de Cln2. C'est-à-dire que la phosphorylation de la T169 du révertant remplace la fixation de Cln2. Ceci suggère que la phosphorylation de la T169 ou la fixation de Cln2 sont importants pour donner des changements structuraux aboutissant à une kinase Cdc28 active (Cross et Levine, 2000).

Un mutant Cdc28T169A, qui n'est pas phosphorylable par Cak1, présente une faible liaison avec Clb2 *in vivo*. La forme non phosphorylée de Cdc28 sauvage fixe très faiblement les cyclines Clb2 et Cln2 *in vitro*. Ainsi il semblerait que la phosphorylation de Cdc28 par Cak1 précède la fixation des cyclines (Ross et al., 2000).

3.2 Rôle de Cak1 dans la sporulation

La protéine kinase Smk1 est une MAPK impliquée dans la régulation de la morphogenèse de la paroi des spores au cours de la méiose. Un mutant *smk1-2* thermosensible a été isolé par Wagner et al. Un crible exploitant la propriété naturelle de la paroi des spores à fluorescer après excitation par des UV a été mis au point. Ainsi les spores *smk1-2* fluorescent à 26°C et pas à 34°C. La sur-expression de *CAK1* permet de supprimer le défaut de fluorescence du mutant *smk1-2*. Nos résultats et ceux de Wagner montrent que plusieurs mutants de *cak1* présentent un défaut de sporulation. Le profil d'expression des ARNm de *CAK1* montre une baisse d'expression après 2 heures de sporulation et une forte augmentation de *CAK1* montre é et 8 heures de sporulation et de nouveau une très faible baisse de *CAK1* à 10 heures de sporulation (Wagner et al., 1997). Kaldis et al., ont montré que la régulation de l'expression des ARNm de *CAK1* n'est pas nécessaire pour la formation des spores. L'expression contrôlée à partir d'un promoteur inductible à des stades où *CAK1* n'est pas exprimée chez la souche sauvage ne perturbe pas le déroulement de la sporulation. L'ensemble de ces résultats permet de dire que *CAK1* exerce une fonction positive et essentielle à la formation des spores (Kaldis et al., 1998).

3.3 Cak1 est stabilisée par Cdc37

Cdc37 est une co-chaperonne agissant de concert avec Hsp90. Le niveau d'expression protéique de Cak1 diminue fortement dans un mutant cdc37-1 thermosensible à température restrictive. Parallèlement à cette diminution de Cak1, l'activité Cak1 kinase diminue fortement et elle n'est pas restaurée par l'addition de la protéine Cdc37 exogène aux extraits. La sur-expression de *CAK1* dans un mutant cdc37-1 n'augmente pas le niveau d'activité de Cak1. Des expériences de « pulse-chase » ont permis de montrer que la demi-vie de Cak1 dans une souche sauvage est de 60 minutes à 23°C et 37°C. Cependant la demi-vie de Cak1 dans une souche cdc37-1 est de 45 minutes à 23°C et de 20 minutes à 37°C. Ces résultats montrent que la fonction de Cdc37 est nécessaire à la stabilité de Cak1 (Farrell et Morgan, 2000). Soret et al ont mis en évidence des interactions génétiques entre des mutations cak1-ts et les mutants cdc37-1 ou cdc37-184 (Faye, communication personnelle).

3.4 Kin28 est un substrat de Cak1

Kin28 est une protéine kinase identifiée par Simon et al., (Simon et al., 1986). Elle est inactive sous forme monomérique. L'activation de Kin28 nécessite la fixation de la cycline Ccl1 (Valay et al., 1996). Le facteur *RIG2* interagit avec *KIN28* et *CCL1* et semble être l'homologue de MAT1 chez les eucaryotes supérieurs (Faye et al., 1997). Cet hétérodimère appartient au complexe de transcription TFIIH, responsable de la phosphorylation de la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase sur un heptamère répété appelé CTD (Valay et al., 1995; Valay et al., 1996). Plusieurs mutants thermosensibles de *cak1* présentent une colétalité avec des mutants thermosensibles *kin28*. *CAK1* est un suppresseur multicopie de plusieurs allèles thermosensibles de *kin28* (Valay et al., 1996).

Cak1 phosphoryle Kin28 sur la thréonine162 située au niveau de la boucle d'activation. Dans un mutant *cak1-23*, Kin28 n'est pas phosphorylée sur la thréonine 162. L'activité CTD kinase *in vitro* de Kin28 est très fortement abolie dans un mutant *cak1-23* (Espinoza et al., 1998). Une souche délétée pour *CAK1* et portant l'allèle *CDC28-43244* présente une absence de phosphorylation de Kin28 sur la thréonine 162. Ceci suggère que la phosphorylation de Kin28T162 est assurée par Cak1 et non pas par Cdc28. Cette souche est viable à 28°C. La purification de Kin28 à partir de cellules d'insectes donne une protéine déphosphorylée sur la thréonine 162 et inactive. La présence de Cak1 dans les cellules d'insectes permet d'avoir une protéine phosphorylée sur la thréonine 162 et active. Il apparaît que la phosphorylation de Kin28 sur la thréonine 162 et active. Il apparaît que la phosphorylation de Kin28 sur la thréonine 162 n'est pas essentielle à 28°C (Espinoza et al., 1998), mais elle semble jouer un rôle à 37°C (Faye, communication personnelle et Morgan communication personnelle).

MO15 est l'homologue de Kin28, l'activité CTD kinase de MO15 diminue pendant la mitose. La phosphorylation de la thréonine 162 de Kin28 n'est pas régulée au cours du cycle cellulaire. En absence de phosphorylation de MO15 sur la T170 (T162 chez Kin28) le complexe MO15-cycline H-*M*AT1 est actif *in vitro*. Cette situation semble s'appliquer sur Kin28, c'est-à-dire le complexe Kin28-Ccl1-Rig2 est actif en absence de phosphorylation de la thréonine 162 *in vivo*. Ccl1 et Rig2 sont les homologues respectifs de cycline H et *MAT1* (Valay et al., 1995; Valay et al., 1996; Faye et al., 1997).

4 Les homologues de CAK1

Chez les eucaryotes supérieurs la fonction CAK est assurée par MO15/Cdk7. Chez *S. pombe* MO15 complémente un mutant *mop1/mcs6/crk1* (Molz et Beach, 1993). Mop1est associée à une cycline appelée Mcs2. Mop1-Mcs2 présente une activité CAK et CTD-kinase *in vitro*. *MOP1* est un gène essentiel (Buck et al., 1995). La sur-expression de la kinase *CSK1* supprime un mutant thermosensible *mcs2-13*. Le gène *CSK1* n'est pas essentiel. Le double mutant $\Delta csk1$ mcs6-13 (mop1) est létal à température permissive pour *mcs6-13*. Dans une souche $\Delta csk1$, l'activité CAK et CTD kinase diminue d'un facteur 3 *in vivo*. Csk1 phosphoryle Mop1 sur une sérine 165 située au niveau de la boucle d'activation. Elle joue le rôle de CDK Activating Kinase Activating Kinase, ou CAKAK, pour Mop1-Mcs2. La phosphorylation de Mop1 sur la S165 par Csk1 augmente l'activité du complexe Mop1-Mcs2 d'un facteur de 3 (Damagnez et al., 1995). Nos résultats montrent que Csk1 possède une activité CAK chez *S. cerevisiae in vivo*.

Umeda et al ont identifié la CAK chez *A. thaliana* par complémentation fonctionnelle d'une souche *cak1-4*. Il s'agit de la kinase *AtCAKt*. Elle possède une activité CAK *in vitro* et *in vivo*. Cependant elle ne possède pas d'activité CTD-kinase. La protéine AtCakt purifiée à partir de *E. coli ne* possède pas d'activité CAK *in vitro*. Ceci suggère que AtCakt nécessite des modifications post-traductionnelles ou bien l'association de sous-unités régulatrices positives. AtCakt migre dans un SDS-PAGE à 62kDa, or elle fait 54kd, il est donc possible que AtCakt soit phosphorylée (Umeda et al., 1998).

Conclusion

L'ensemble de ces données sont en faveur de l'existence de deux familles distinctes de CAK chez les eucaryotes. La famille de la CAK-*CDK7* formée par l'association d'une kinase, une cycline, et un facteur d'assemblage. Cette famille semble être spécifique aux eucaryotes supérieurs. La famille de *CAK1*, Cak1 est active sous forme monomérique. D'après nos résultats, cette famille est probablement spécifique aux champignons (Figure 1.4).



CHAPITRE 2

Régulation des CDKs par les cyclines

Les cyclines associées à Cdc28

1 Les cyclines G1

L'identification des cyclines G1 chez *S. cerevisiae* est le résultat de la recherche de mutants résistants aux facteurs de conjugaison. On sait que la présence de phéromones provoque l'arrêt des cellules à Start et induit l'expression des gènes de conjugaison. Pour sélectionner des mutants résistants aux facteurs de conjugaison, on traite les cellules avec des phéromones et on sélectionne les cellules capables de pousser. On vérifie bien qu'il ne s'agit pas de mutations dans la voie de transduction du signal, c'est-à-dire que les gènes de conjugaison sont bien exprimés. Richardson et al ont isolé une mutation dominante de résistance aux phéromones, il s'agit de *CLN3-D*. Son gène code pour une cycline G1 tronquée, plus stable que la protéine sauvage. Par des approches similaires deux autres gènes *CLN1* et *CLN2* ont été isolés. Ces trois gènes codent pour les trois cyclines G1 de *S. cerevisiae*. L'inactivation des trois gènes bloque la transition G1/S, donc les cyclines G1 sont nécessaires pour le passage de G1 à S. D'autre part la délétion d'un ou deux gènes codant pour des cyclines G1 est viable, il y a donc redondance dans la fonction de ces trois protéines, du moins en croissance végétative (Richardson et al., 1989; Richardson et al., 1989).

Pour démontrer que les cyclines G1 induisent Start, Richardson et al., ont construit une souche délétée pour les gènes *CLN1*, 2 et 3 et les ont remplacés par une copie du gène *CLN2* dont la transcription est sous le contrôle d'un promoteur inductible au galactose. *CLN2* est transcrit en galactose et pas en glucose. En glucose, cette souche s'arrête à Start. Cette expérience démontre aussi que les cyclines G1 sont des protéines instables et qu'elles doivent être synthétisées à chaque cycle cellulaire (Richardson et al., 1989; Richardson et al., 1992).

Wittenberg et al., ont montré que les gènes *CLN1* et *CLN2* sont transcrits seulement en phase G1 et que leurs protéines correspondantes ne sont présentes qu'en G1 : elles sont instables. Par contre la transcription du gène *CLN3* est constitutive et son produit est toujours présent. Les protéines Cln1, 2, et 3 s'associent séparément avec Cdc28 (Wittenberg et al., 1990).

Ces travaux n'expliquent pas les mécanismes qui aboutissent à l'accumulation des cyclines G1 en phase G1. Pour répondre à cette question un modèle de rétrocontrôle positif
pour l'activation des cyclines G1 a été proposé, selon lequel la transcription de *CLN1* et *CLN2* est stimulée par un activateur de transcription composé des protéines Swi4 et Swi6, mais ce facteur n'est complètement actif que lorsqu'il est phosphorylé et cette phosphorylation est induite par les complexes Cdc28-Cln. Ainsi l'expression de faibles quantités de cyclines peut conduire à une augmentation rapide dans l'expression des cyclines G1 (Figure 2.1).

La transcription de *CLN1* et *CLN2* tardivement en G1 est due aux facteurs de transcription SBF (Swi4/Swi6) et MBF (Mbp1/Swi6). SBF pour SCB Binding Factor (SCB pour Swi4/6 Cell cycle Box, SCB consensus : CACGAAA) et MBF pour MCB Binding Factor (MCB pour Mlu Cell cycle Box, MCB consensus : ACGCTNA avec N=A,T,G ou C) (Amon et al., 1993; Dirick et Nasmyth, 1991). Les facteurs SBF et MBF sont des régulateurs d'une large famille de gènes transcrits spécifiquement en fin de phase G1. Les gènes *CLN1*, *CLN2*, *HCS26* (qui code pour une protéine apparentée aux cyclines) et de l'endonucléase HO sont des cibles de SBF, tandis que MBF active la transcription d'autres gènes dont la majorité est impliqué dans le métabolisme de l'ADN et code pour des protéines stables comme l'ADN polymérase α (*POL1*) et la thymidilate kinase (*TMP1*) (Dirick et al., 1995). Cependant, parmi les gènes dont l'activité est contrôlée par le facteur MBF, deux codent pour des protéines instables du type cyclineB, Clb5 et Clb6. Les cyclines Clb5 et Clb6 s'associent à Cdc28 pour donner les complexes actifs qui contrôlent la phase S. SBF et MBF sont essentiels à la viabilité cellulaire.

D'autres résultats semblent montrer que Cln1/2 et Cln3 jouent des rôles différents : Cdc28-Cln3 activerait SBF/MBF quand la cellule atteint une taille suffisante tandis que Cdc28-Cln1/2 réguleraient les événements postérieurs à Start (Dirick et al., 1995). En effet, le complexe kinasique Cdc28-Cln1/2 est essentiel pour la dégradation des cyclines. Les travaux de Mann et de Wittenberg ont montré que les cyclines G1 sont des phosphoprotéines. Les phosphorylations des cyclines sont assurées par les complexes Cdc28-Cln1/2. Les mutations au niveau des résidus phosphorylables stabilisent les cyclines G1. Ainsi les phosphorylations sur des résidus spécifiques des cyclines G1 et leur ubiquitination par le complexe SCF-Grr1 sont indispensables pour leur dégradation (Willems et al., 1996).



2 Les cyclines B

Chez *S. cerevisiae,* les cyclines B sont au nombre de six et divisées en trois classes : *CLB1* et *CLB2, CLB3* et *CLB4, CLB5* et *CLB6.* La régulation de *CLB5* et *CLB6* est similaire à celle de *CLN1* et *CLN2. CLB5* et *CLB6* sont nécessaires pour l'entrée en phase S, les autres cyclines sont nécessaires pour l'assemblage du fuseau et l'entrée en mitos (Amon et al., 1993).

La délétion de *CLB1*, *CLB3* et *CLB4* ne donne aucun phénotype notable. Par contre la délétion de *CLB2* retarde fortement la mitose. L'activité kinase du complexe Cdc28-Clb2 est absente en phase G1, apparaît en phases S et G2 et disparaît en fin de mitose. Le profil des transcrits de *CLB1* et *CLB2* est similaire à celui de l'activité kinase Cdc28-Clb2, ce qui suggère la présence d'un contrôle transcriptionnel analogue à celui de *CLN1/2* agissant sous forme de rétrocontrôle positif. Pour tester cette hypothèse un mutant *clb-ts* a été utilisé pour voir si la transcription de *CLB1* et *CLB2* dépend de l'activité kinase de *Cdc28-Clb2*. Le mutant *clb2ts* ne présente pas d'accumulation de transcrits de CLB comme dans le cas sauvage. Les mêmes résultats ont été obtenus avec un mutant *cdc28ts* : on peut donc conclure que la kinase *Cdc28-Clb2* active la transcription de *CLB1* et *CLB2* (Amon et al., 1993) (Figure 2.1).

3 L'oscillation des cyclines

Quand la boucle de rétrocontrôle positif des CLBs s'installe on observe un déclin au niveau de l'activité Cdc28-Cln, ce qui suggère que la fonction CLB réprime la transcription des CLNs. Le facteur de transcription qui régule les gènes *CLN1* et *CLN2* étant SBF, on a cherché une relation entre SBF et Cdc28-Clb : Cdc28-Clb2 phosphoryle la protéine Swi4. Ainsi, l'association des cyclines B avec Cdc28 et/ou la phosphorylation de SBF constituent un mécanisme potentiel de répression de la trancription des cyclines G (Amon et al., 1994) (Figure .2.1).

Le modèle présenté sur la figure 2.1 n'explique pas comment l'ordre de l'oscillation des cyclines B et cyclines G1 est contrôlé tout le long du cycle cellulaire, c'est-à-dire comment la cellule s'assure que les cyclines nécessaires pour déclencher la phase S (*CLN1/2*) apparaissent avant celles qui sont nécessaires pour la mitose (*CLB1* à 4). Pour répondre à ce problème clé la série d'expériences suivantes a été réalisée : des cellules où les trois cyclines

G1 sont délétées sont maintenues en vie par une construction MET3-CLN2 répressible par la méthionine. La souche comporte aussi une construction GAL1-CLB2 inductible par le galactose. En présence de méthionine et galactose les cellules s'arrêtent en G1 et sont dépourvues de Cln1/2. Malgré l'induction de l'expression de CLB2 on n'obtient pas d'accumulation de protéines Clb2. L'incapacité d'accumuler les protéines Clb2 dans les cellules arrêtées en phase G1 peut être due à une incapacité de synthétiser Clb2 ou bien à une instabilité de la protéine. D'autres études ont montré que les cyclines B possèdent une séquence de neuf résidus au niveau N-terminal appelée "cyclin destruction box". Cette séquence est reconnue par une machinerie de protéolyse qui détruit les cyclines B à la fin de chaque mitose (Glotzer et al., 1991). Pour distinguer entre les deux hypothèses précédentes, l'expérience a été refaite avec une autre version de Clb2 dont la "destruction box" est délétée. Cette fois-ci on obtient une accumulation de protéines Clb2. Ainsi c'est la "destruction box" qui empêche l'accumulation des protéines Clb2. En utilisant la première construction et en activant la synthèse des CLNs on obtient une accumulation de Clb2. On démontre ainsi que les kinases Cdc28-Cln1/2 sont les facteurs qui inactivent le système de protéolyse des cyclines B. Ceci explique bien la logique de la succession de l'accumulation cyclines G1 puis cyclines B (Amon et al., 1994) (Figure 2.2).

L'inactivation de la protéolyse de Clb2 n'est pas spécifique aux kinases dépendantes des CLN, les kinases dépendantes des CLB sont capables d'inactiver la protéolyse des CLB. Une expression ectopique de *CLB2* durant la phase G1 induit une accumulation de la protéine de fusion Clb2-LacZ. Ainsi la protéolyse de Clb2 est une conséquence de l'inactivation des kinases dépendantes des CLN et des CLB. Un modèle de la régulation de la protéolyse de CLB a été établi. En progressant dans la phase G1 l'activité kinase dépendante des CLN augmente, cette activité atteint un niveau suffisant pour inhiber la protéolyse des CLB au cours de la transition G1/S. Durant la phase S et G2 l'activité kinase dépendante des CLN chute et l'inhibition de la protéolyse des CLB est assurée par l'activité kinase dépendante des CLB. Une question importante reste sans réponse : comment la protéolyse des CLB est activée pendant l'anaphase (Amon, 1997).



Figure	2,2	Logiq	ue d	e la
successio	n de	l'acci	mul	ation
evelines	C1.	nuie e	wellin	or R
cycinies	GT	puis c	усши	Ca D

Les cyclines Clb5 et Clb6 interviennent dans le processus de réplication de l'ADN. Les protéines Clb5/6 s'associent avec Cdc28 mais le complexe reste inactif jusqu'au déclenchement du début de la réplication de l'ADN. Cette inactivité s'explique par le fait que ces complexes sont inhibés par une autre protéine appelée Sic1 (Peter, 1997). Dans un double mutant *cln1/cln2* il se produit un retard considérable de la réplication de l'ADN. Ce résultat suggère que la destruction de l'inhibiteur Sic1 pourrait être l'une des fonctions de Cdc28-Cln1/2 (Dirick et al., 1995).

4 Les inhibiteurs des CDKs ou CKIs

Les CKIs (CDK Inhibitory protein) sont des protéines qui se fixent sur les complexes CDK-cyclines et inhibent leur activité. La protéine Sic1 est un substrat de Cdc28-Cln2 *in vitro*, et la phosphorylation pourrait diriger Sic1 vers le système de dégradation. Cette protéolyse qui ne peut se produire que si la synthèse des CLNs est déjà activée. Ainsi Sic1 joue un rôle important en assurant que le complexe Cdc28-Clb5/6 ne devient pas actif avant Cdc28-Cln. Une cellule délétée pour *SIC1* présente de nombreuses cassures et perte au niveau des chromosomes, ce qui suggère que *SIC1* a un rôle dans le maintien de l'intégrité du génome (Schwob et al., 1994). *SIC1* assure donc une fonction essentielle propre au cycle cellulaire. Un autre inhibiteur des kinases Cdc28-Cln, Far1, n'est pas un facteur propre au cycle cellulaire, mais agit en réponse aux facteurs de conjugaison.

La protéine Far1 assure la connexion entre la voie de transmission du signal et la machinerie du cycle cellulaire. Depuis longtemps on sait que le traitement des cellules avec des phéromones les arrête en phase G1. Ce phénotype est observé aussi dans des triples mutants *cln1 cln2 cln3*, donc il semble que l'arrêt dans le cycle cellulaire à la suite d'un traitement par des phéromones, soit dû à une inhibition de la synthèse des cyclines *CLN1*, 2 et 3. On a montré qu'en réponse aux phéromones, la protéine Far1 est phosphorylée (par Fus3), et devient capable de s'associer à la kinase Cdc28-Cln2. Cette association réduit le taux de transcription des cyclines G1 qui est la conséquence de la réduction de l'activité de la kinase Cdc28-Cln2. Cette réduction de la transcription est probablement due à l'inactivation de la boucle de rétrocontrôle positif. Les mutants *far1* incapables d'arrêter le cycle cellulaire en réponse aux phéromones sont aussi déficients au niveau de l'association entre la protéine Far1 et les kinases Cdc28-Cln2 (Peter et al., 1993).

Les protéines CKIs se fixent sur les CDK et inhibent leur activité, mais les mécanismes d'inhibition sont mal connus. Celui de p27, une protéine humaine, a été particulièrement étudié. Il inhibe les complexes Cdk2-cycline en réponse à un signal extracellulaire, en empêchant la phosphorylation activatrice de ce complexe (Peter et Herskowitz, 1994).

5 Les interactions entre Cdc28 et la machinerie de protéolyse

Pour lever l'inhibition due à Sic1, la cellule active une machinerie de protéolyse. En effet, des mutations qui touchent *CDC34*, l'un des gènes codant pour une composante de la machinerie de protéolyse aboutit à l'accumulation des protéines Sic1 (on montre aussi que l'accumulation de Sic1 n'est pas due à une augmentation du taux de transcription de *SIC1*).

CDC34 code pour une enzyme qui conjugue l'ubiquitine aux protéines destinées à la dégradation. L'ubiquitine est une protéine, hautement conservée, qui se lie covalement par des ponts isopeptidiques à des lysines des protéines cibles. Le complexe responsable de la dégradation des protéines ubiquitinées est le protéasome-26S. Le protéasome est formé par un complexe multiprotéique de 2000 kDa. Ghislain et Mann ont montré que le protéasome est impliqué directement dans la progression du cycle cellulaire. Ils ont isolé deux mutants *cim3* et *cim5* qui provoquent un arrêt dans le cycle cellulaire en G2/Métaphase. *CIM3* et *CIM5* codent pour des ATPases faisant partie du protéasome-26S. Les cyclines mitotiques Clb2 et Clb3 s'accumulent dans les mutants *cim* et ce résultat peut expliquer l'arrêt dans le cycle cellulaire en phase G2. Ils observent aussi une anomalie au niveau de la ségrégation des chromosomes. Ainsi l'activité protéolytique liée au protéasome est nécessaire pour la dégradation des Clbs et pour la séparation des chromosomes (Ghislain et al., 1993).

L'accumulation des protéines ubiquitinées est observée dans un autre mutant au niveau du protéasome, il s'agit de *nin1ts*. Ce mutant est incapable d'accomplir les transitions G1/S et G2/M. Dans ce mutant la kinase Cdc28-cycline est inactive, ainsi la protéine Nin1 semble être essentielle pour l'activation du complexe Cdc28-cycline (Kominami, 1994; Kominami et al., 1995).

6 Inhibition des Cdks par phosphorylation

Il existe plusieurs voies pour inactiver les complexes CDK-cyclines, les plus évidentes étant de déplacer la cycline ou de déphosphoryler la Thr160 de Cdk2 (Thr169 pour Cdc28).

32

Mais les complexes CDK-cycline peuvent aussi être inhibés par des phosphorylations au niveau de deux sites proches de l'extrémité N-terminale. Il s'agit de la Thr14 et Tyr15 chez la Cdc2 et Cdk2 humaines. Les phosphorylations de la Thr14 et Tyr15 sont particulièrement importantes dans le contrôle de l'activation de Cdc2 en mitose.

Les thréonines 14 et 161 (Cdc2) et la tyrosine 15 sont phosphorylées parallèlement à l'augmentation du taux des cyclines B quand les cellules s'approchent de la mitose. Ainsi les complexes Cdc2-Clb sont maintenus dans un état inactif jusqu'à la déphosphorylation des Thr14 et Tyr15, en fin de phase G2, ce qui conduit à l'activation du complexe Cdc2-Clb et à l'entrée en mitose. Les déphosphorylations brutales des thréonines 14 et 15 sont provoquées par des changements coordonnés dans l'activité des kinases et des phosphatases agissant au niveau de ces sites. La protéine kinase Weel phosphoryle la Tyr15 (Parker et Piwnica-Worms, 1992). Weel a été identifié à l'origine chez S. pombe. In vitro, Weel peut phosphoryler deux peptides substrats sur les deux résidus thréonine et tyrosine, laissant supposer que Weel pourrait être une kinase à double spécificité capable de phosphoryler les résidus Thr14 et Tyr15. L'activité Wee1 décline lors de la mitose, contribuant à la levée de la phosphorylation inhibitrice à ce stade du cycle cellulaire. La diminution de l'activité de Weel lors de la mitose est due à la phosphorylation de Wee1. Les kinases responsables de cette phosphorylation ne sont pas clairement identifiées. Chez S. pombe, la protéine kinase Nim1 inhibe Wee1 en phosphorylant le domaine catalytique situé à l'extrémité C-terminale (Wu et Russell, 1993).

Les résidus thréonine 14 et tyrosine 15 sont déphosphorylées toutes les deux par une même phosphatase à double spécificité, Cdc25 (Nilsson et Hoffmann, 2000). L'activité de Cdc25 augmente durant la mitose suite à une phosphorylation dans la moitié N-terminale. Durant la mitose la kinase responsable de la phosphorylation est activée et la phosphatase correspondante est inhibée. La kinase stimulant Cdc25 pourrait être Cdc2, formant la base d'un modèle de rétrocontrôle positif capable en théorie d'induire la déphosphorylation brusque de Cdc2 au cours de la mitose. La boucle de rétrocontrôle positif peut être mise en place d'une autre manière : Cdc2 peut stimuler la kinase qui inactive Wee1 et inhiber la/les phosphatase(s) qui inactive(nt) Cdc25 et active(nt) Wee1 (Nilsson et Hoffmann, 2000).

Ce mode de régulation par phosphorylation/déphosphorylation des résidus Thr14 et Tyr15 n'est pas universel. Chez *S. cerevisiae*, l'homologue de la kinase Wee1 est Swe1. La sur-expression de *SWE1* n'altère pas le cycle cellulaire. Une souche où l'on a substitué la

tyrosine19 (l'homologue de la Tyr15) par une phénylalanine (homologue non phosphorylable) dans Cdc28 ne présente aucun phénotype notable (Amon, 1992). Swe1 est capable de phosphoryler la tyrosine19 et d'inactiver partiellement le complexe Cdc28-Clb2 et non Cdc28-Cln, ce qui explique l'incapacité de Swe1 sur-exprimée d'inhiber la transition G1/S. Ces résultats suggèrent que les différentes cyclines sont à l'origine du ciblage de Cdc28 vers des contrôles régulateurs distincts. Ce ciblage peut être important pour assurer la fonction de *CDC28* durant le cycle cellulaire (Booher et al., 1993).

7 Bases structurales de la régulation des CDK

La phosphorylation d'une protéine, comme mécanisme de régulation de l'activité a été mis en évidence pour la première fois avec la glycogène phosphorylase. Actuellement, il est clair que ce mécanisme de modification post-traductionnelle réversible des protéines est très répandu et affecte de très près tous les aspects de la croissance, de la division cellulaire et de l'homéostasie dans les cellules eucaryotes. Les enzymes qui catalysent le transfert du phosphate y de l'ATP à une protéine substrat, les protéines kinases, constituent une famille large et diversifiée d'enzymes. Bien que ces enzymes soient différentes en taille, spécificité de substrat, mécanisme d'activation, composition en sous-unités et localisation intra-cellulaire, elles présentent néanmoins toutes un cœur catalytique très conservé. PKA, la protéine kinase dépendante de l'AMPc, est considérée comme un modèle pour l'étude des autres kinases. Elle est certainement la kinase dont on comprend le mieux le fonctionnement. Son mécanisme d'activation est simple, il met en jeu la dissociation de la kinase, active sous forme monomérique, de sa sous-unité régulatrice inhibitrice, tandis que les CDKs nécessitent l'association avec une sous-unité régulatrice activatrice. Les CDKs contrôlent le cycle cellulaire et utilisent des mécanismes régulateurs d'une complexité étonnante. Pour comprendre plus en détail les aspects moléculaires de la régulation des CDKs et dans le but de définir les bases moléculaires des interactions CDKs/substrats/régulateurs, le paragraphe suivant est consacré à l'étude des relations structure/fonction, en se basant sur les structures cristallographiques de PKA, Cdk2 et Cdk2-cycline A.

La structure de Cdk2 consiste en deux lobes : un petit lobe N-terminal, formé de 5 feuillets β antiparallèles et un lobe plus large C-terminal très riche en hélices α . Le site de fixation de l'ATP est situé dans le sillon entre les deux lobes. La structure tridimensionnelle de Cdk2 est très similaire à celle de PKA (Figure 2.3).





Figure 2.3 Schéma du complexe Cdk2-cycline A. L'ATP est représenté par des boules rouges. En rouge : la région PSTAIRE. En jaune : la boucle T. En violet : la cycline A. En bleu : Cdk2. (a) et (b) deux vues différentes du complexe Cdk2-Cycline A. (D'après Jeffrey et al., 1995)



Figure 2.4 La cycline positionne Glu51 et lui permet d'interagir avec Lys33 et Asp145. (D'après Pines, 1995)

7.1 Site de fixation de l'ATP

L'ATP interagit avec plusieurs résidus des deux côtés du sillon entre les deux lobes. La base adénine est positionnée dans une poche hydrophobe. Les phosphates de l'ATP établissent des liaisons hydrogènes et des ponts ioniques avec divers résidus et avec la boucle riche en glycines.

La majorité des interactions au niveau du site de fixation de l'ATP dans Cdk2 sont similaires à celles qui sont observées pour Cdk2-cycline A et PKA. Néanmoins, il existe deux différences capitales : Les positions des phosphates α et γ sont similaires chez les trois kinases, par contre, le phosphate β est rejeté à 4,5 Å chez Cdk2 comme le montre la figure 2.4.

Un alignement correct des trois phosphates de l'ATP est indispensable pour la catalyse. Le mécanisme par lequel la protéine PKA agit impose qu'un résidu conservé de la boucle catalytique (probablement Asp127 dans Cdk2) déprotone partiellement le groupe hydroxyle de la sérine de la protéine substrat, ce qui permet l'attaque nucléophile du phosphate γ de l'ATP par l'oxygène de l'hydroxyle. Ce résultat explique en partie l'inactivité de Cdk2 monomérique où la liaison β - γ phosphate est mal orientée.

Sur la figure 2.4 on voit que la région de liaison de l'ATP dans Cdk2 est adjacente à une hélice α très courte (α L12) au lieu d'un feuillet β dans la même région de la Cdk2-cycline A ou de PKA. A cause aussi de la présence de l'hélice α L12, l'hélice α adjacente se trouve très éloignée de l'ATP. Par contre le complexe Cdk2-cycline A et PKA présentent un resserrement plus élevé dû à la translocation latérale et la rotation de l'hélice PSTAIRE et à la fusion de l'hélice α L12 en début de la boucle-T qui empêche le mouvement de l'hélice PSTAIRE dans Cdk2. Ce mouvement positionne correctement la chaîne latérale du glutamate 51 qui appartient à une "triade catalytique". Cette triade (Lys33, Glu51 et Asp145) conservée chez toutes les kinases, est impliqué dans l'orientation du phosphate γ de l'ATP et la coordination de l'atome Mg2+, et on pense qu'elle est nécessaire pour la catalyse. Dans Cdk2-cycline A et PKA Glu51 fait une liaison ionique avec Lys33, l'un des résidus établissant des liaisons étroites avec les phosphates α et β de l'ATP. D'autre part l'aspartate 145 se lie à Mg2+. Cependant, dans Cdk2, Glu51 est à l'extérieur de la poche catalytique et exposé au solvant. Son groupement carboxyl est déplacé de 8Å à partir de sa position dans Cdk2-cycline A, et donc elle est incapable de former une liaison ionique avec Lys33. Ce mauvais alignement des résidus du site actif est en grande partie la cause de l'inactivité de Cdk2 monomérique (Figure 2.4).

7.2 Rôle de la cycline A

La cycline A présente une structure globulaire formée par 12 hélices α . La molécule présente une structure répétée deux fois. Bien que les deux parties de la molécule ne présentent que 12% de similitude de séquence, leurs structures tertiaires sont étonnamment semblables. La première répétition, conservée dans toutes les cyclines, coïncide avec la "cylin box", région impliquée dans l'interaction avec la CDK. Le cœur hydrophobe de la cycline A est formé par l'hélice α 3 dont la portion centrale est entourée par les quatre autres hélices α . Les points d'intersection entre les hélices correspondent à des résidus alanine dont la petite taille permet aux hélices de se lier étroitement. Dans le cas des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ la présence d'une paire d'alanine dans les points d'intersections est strictement indispensable. Cette paire de résidus est conservée dans toute la famille des cyclines. La fixation de la cycline A sur la kinase Cdk2 induit des changements conformationnels profonds. En effet, la protéine Cdk2 présente quatre éléments majeurs qui interagissent avec la cycline A ; l'hélice PSTAIRE, la boucle-T, le lobe N-terminal et le lobe C-terminal. Les changements conformationnels induits par la fixation de la cycline A touchent essentiellement ces deux régions. La région PSTAIRE établit des liaisons hydrogènes, hydrophobes et de Van der Waals avec les hélices de la cycline A. Le rôle clé de l'hélice PSTAIRE est cohérent avec les données biochimiques et génétiques. Des mutations dans cette séquence abolissent la liaison cycline-Cdk2. La fixation de la cycline A sur Cdk2 induit une translocation de l'hélice PSTAIRE dans la poche catalytique et une rotation d'environ 90° autour de son axe (Figures 2.5 et 2.6).

Ces changements conformationnels de la région PSTAIRE sont à l'origine des phénomènes déjà discutés dans le paragraphe consacré au site actif. Dans Cdk2, la boucle-T bloque l'accès à la poche catalytique. La fixation de la cycline A sur la Cdk2 induit un déplacement de la boucle-T, elle devient étroitement liée par des ponts hydrogènes et des interactions de Van der Waals avec la cycline A. Ainsi la liaison de la cycline A conduit à une levée de l'autoinhibition par la boucle-T et une exposition de l'hydroxyle de la Thr160, groupement phosphorylable par la CAK (Fig. 2.7).







Figure 2.5 Superposition de la structure de Cdk2 avant (en bleu) et après (en bleu) la fixation de la cycline A. (b,c) la fixation de la cycline A permet un alignement correct des résidus catalytiques avec les phosphates de l'ATP. K33, E51 et D145 forment la triade catalytique. (D'après Jeffrey et al., 1995)



Figure 2.6 Interface de la région d'interaction entre : (c) l'hélice PSTAIRE et la cycline A. En jaune : les résidus hydrophobes. (d)la boucle T et la cycline A (D'après Jeffrey et al., 1995)

7.3 Site de phosphorylation activatrice de Cdk2 par la CAK

La fixation de la cycline A induit des changements conformationnels de la boucle-T, qui devient très semblable à la région homologue de PKA (Figure 2.7). Cependant, dans le complexe Cdk2-cycline A, la chaîne latérale de la Thr160 n'est pas phosphorylée et pointe vers le solvant, tandis que l'équivalent de ce résidu chez PKA ne pointe pas vers le solvant mais établit des liaisons ioniques avec d'autres résidus.

Dans le complexe PKA-substrat, PKA phosphorylée sur la thréonine 197, cette région forme une partie de la poche de liaison incluant des résidus hydrophobes qui suivent immédiatement le phosphate accepteur. Sa conformation différente dans le complexe Cdk2cycline A non phosphorylé peut expliquer pourquoi cette dernière n'est pas active ou très peu active.

Dans la Cdk2 phosphorylée, la région Thr160 phosphorylée peut adopter une structure similaire à celle de la PKA parce que le complexe Cdk2-cycline A contient une poche cationique capable de lier le groupe phosphate de la Thr160-PO3 d'une manière analogue à celle de la PKA phosphorylée. Cette poche contient trois résidus arginine qui forment des liaisons avec le carboxylate du glutamate dans le complexe non phosphorylé.

Ce modèle a été confirmé par d'autres études sur la phosphatase KAP qui est responsable de la déphosphorylation de Thr160-PO3. Cette phosphatase peut se fixer sur le complexe Cdk2-cycline A phosphorylé, mais elle est incapable de le déphosphoryler, car le phosphate n'est probablement pas accessible. Quand la cycline A est dégradée, Thr160-PO3 devient accessible et la déphosphorylation devient possible.

7.4 Les Sites de phosphorylation inhibitrice

Les sites de phosphorylation inhibiteurs, Thr14 et Tyr15 sont au milieu de la boucle riche en glycine qui sert de poche d'ancrage des phosphates de l'ATP. Dans la structure publiée, les deux résidus Thr14 et Tyr15 ne sont pas phosphorylés, leurs chaînes latérales ne sont pas accessibles au solvant à cause de la présence de la boucle-T et de l'hélice α L12. L'hydroxyle de la Thr14 est étroitement lié au phosphate γ de l'ATP : la phosphorylation de ce site abolirait la conformation des liaisons β - γ .



Figure 2.7 (a) Cdk2 monomérique est inactive parce que l'ATP n'est pas accessible. (b) La fixation de la cycline A déplace la boucle T et expose l'ATP et la T160 (phosphorylée par la CAK) (c) PKA phosphorylée sur T197. (D'après Jeffrey et al., 1995)

D'autre part, dans Cdk2 l'hydroxyle de la Tyr15 est très éloigné de l'ATP et apparemment ne joue aucun rôle. Dans le complexe Cdk2-cycline A, le mouvement du lobe N-terminal amène la chaîne latérale de la Tyr15 au fond du sillon catalytique. Ainsi la phosphorylation de ce site peut affecter les positions des résidus du site catalytique et des phosphates de l'ATP par encombrement stérique et/ou répulsions électrostatiques (De Bondtet al., 1993; Fisher et al., 1991; Knighton et al., 1991; Desai et al., 1995; Jeffrey et al., 1995; Pines, 1995).

Résumé

La figure 2.8 résume les principes de régulation des CDKs.



CHAPITRE 3

Régulation des CDKs par les phosphatases

Introduction

La mobilisation des processus cellulaires en réponse à des stimuli externes est fondamentale au maintien de la vie. La phosphorylation réversible des protéines est un élément essentiel parmi les nombreux mécanismes assurant la propagation de ces stimuli à travers la surface cellulaire et aboutissant aux changements d'activités ou de fonctions de protéines intracellulaires. Les variations de l'état de phosphorylation d'une protéine sont régulées par deux activités enzymatiques : les activités des protéines kinases qui attachent un groupement phosphate à un résidu thréonine, sérine ou tyrosine et les activités inverses des protéines phosphatases. La fixation ou l'enlèvement d'un groupement phosphate d'une protéine peut affecter profondément les activités et les propriétés de la protéine. Par exemple la phosphorylation d'une protéine peut induire les changements conformationnels ou bien bloquer l'accès au site catalytique de l'enzyme. L'état de phosphorylation des protéines à chaque instant est un processus dynamique qui dépend de l'activité des protéines kinases et des phosphatases vis-à-vis de leurs substrats.

La phosphorylation réversible des protéines régule tous les aspects de la vie cellulaire. Par exemple, la régulation des gènes, le contrôle du cycle cellulaire, le processus de transport et de sécrétion, l'organisation du cytosquelette ou l'adhésion cellulaire. Ceci reflète la diversité des fonctions régulées par la phosphorylation. Une large proportion de protéines intracellulaires (30 %) est l'objet de phosphorylation réversible et il n'est pas surprenant que les eucaryotes supérieurs codent respectivement pour approximativement 2000 et 1000 protéines kinases et phosphatases, ce qui correspond à 3 % du génome total.

1 La phosphatase humaine KAP de Cdk2

La protéine KAP/Cdi1 est une phosphatase à double spécificité, c'est-à-dire qu'elle est capable de déphosphoryler des résidus phospho-thréonine, phospho-sérine et phospho-tyrosine. La protéine KAP interagit physiquement avec Cdk2 et Cdc2 par son côté C-terminal. Elle contient une séquence PEST (signal de dégradation reconnu par la machinerie de protéolyse) sur la partie N-terminal. L'expression de la KAP chez *S. cerevisiae* provoque une accumulation de cellules en phase G1. Cependant l'expression d'un mutant inactif de KAP ne retarde pas la transition G1/S. La protéine KAP interagit avec Cdc28 dans un test double hybride. Ces résultats indiquent que le retard dans la transition G1/S n'est pas dû à une séquestration de Cdc28 par la protéine KAP dans un complexe inactif. L'action de KAP est

produite par son activité phosphatase. L'immuno-déplétion de KAP réduit l'activité phosphatase de l'extrait cellulaire sur la thréonine 160 de Cdk2, mais ne l'épuise pas. Ceci suggère l'existence d'autres activités phosphatase agissant sur Cdk2T160 (Gyuris et al., 1993; Hannon et al., 1994).

La phosphatase KAP déphosphoryle la thréonine 160 de Cdk2 monomérique. La présence de la cycline A inhibe l'action de KAP. Cependant la protéine KAP s'associe fortement au complexe Cdk2-cycline A. Ainsi la thréonine 160 phosphorylée de Cdk2 associée à la cycline A n'est pas accessible pour la KAP. La présence de la phosphatase KAP n'interfère pas avec la phosphorylation de la thréonine 160 par la CAK. Un mutant inactif KAPC140S s'associe au complexe Cdk2-cycline A et n'inhibe pas son activité kinase. La présence de la cycline A stimule l'activité CAK. Ces résultats montrent que la cycline A induit la phosphorylation de Cdk2T160 par stimulation de l'activité CAK et par inhibition de l'activité phosphatase de KAP (Poon et Hunter, 1995).

2 Etude des phosphatases chez S. cerevisiae

Au début de ma thèse, on ne connaissait pas les phosphatases responsables de la déphosphorylation de la thréonine 169-PO3 de Cdc28. Nous avons utilisé une approche génomique qui nous a permis d'identifier les phosphatases de la protéine kinase Cdc28T169. Cette approche consiste à tester l'effet de la sur-expression de l'ensemble des protéines phosphatases appartenant à la famille des phosphatases responsables de la déphosphorylation d'une thréonine/sérine ou thréonine/sérine et tyrosine sur la croissance pseudohyphale dans une souche sauvage Σ . En effet, une hypo-phosphorylation de Cdc28T169 induit fortement la croissance pseudohyphale (Miled et al., 2001). Nous montrerons plus loin que nous avons obtenu des résultats intéressants sur l'activation de la croissance pseudohyphale par un ensemble de phosphatases. Il est donc utile de présenter l'ensemble des protéines phosphatases de *S. cerevisiae*.

Les protéines phosphatases sont des enzymes qui présentent des structures et des fonctions variées. Elles sont classées en trois familles. Les protéines phosphatases à thréonine/sérine qui déphosphorylent les résidus phosphosérine et phosphothréonine. La famille (PTP) qui est composée des phosphatases à tyrosine. Les phosphatases à double spécificité qui déphosphorylent les résidus phospho-sérine, phospho-thréonine et phospho-

tyrosine. Les domaines catalytiques sont hautement conservés dans chaque famille (Stark et al., 1994; Stark, 1996).

Dans chaque famille, la fixation de sous-unité régulatrice induit des changements structuraux considérables affectant le domaine catalytique et d'autres domaines des phosphatases. Les sous-unités régulatrices et les autres domaines jouent des rôles importants dans la localisation cellulaire et la spécificité des phosphatases.

Les protéines phosphatases à thréonine/sérine sont des métallo-enzymes; les réactions de déphosphorylation de leur substrat se fait en une seule étape. Les PTPs catalysent la déphosphorylation en passant par un intermédiaire enzyme-cystéinyl-phosphate.

2.1 Les phosphatases à sérine et thréonine

Les protéines phosphatases à thréonine/sérine sont classées en sept sous-familles :

2.1.1 La famille PP1

La protéine phosphatase PP1 contrôle plusieurs fonctions cellulaires. Chez *S. cerevisiae*, la sous-unité catalytique de PP1 est codée par un gène essentiel : *GLC7*. La protéine Glc7p est essentielle pour la mitose (attachement des chromosomes aux fuseaux mitotiques). Dans un mutant *glc7T170A*, l'activité kinase de Cdc28 est très élevée. *GLC7* a un rôle important dans l'intégrité cellulaire, la morphogenèse, la synthèse du glycogène, le contrôle général de la biosynthèse des acides aminés et la méiose. La sur-expression de *GLC7* est létale pour la cellule. Ces processus sont régulés par divers holoenzymes PP1 : la même sous-unité catalytique (PP1c) peut s'associer à divers sous-unités régulatrices (Hisamoto et al., 1994).

2.1.2 La famille PP2A

La phosphatase PP2A est formée d'une sous-unité catalytique PP2Ac et d'une sousunité A. Ces deux sous-unités forment le cœur de l'enzyme. L'activité de ce dernier est régulée par plusieurs sous-unités régulatrices. Les holoenzymes régulent des processus très variés : le métabolisme, le cycle cellulaire et la signalisation cellulaire. Chez *S. cerevisiae*, la sous famille PP2A comprend les deux gènes *PPH21* et *PPH22* (codant pour les sous-unités catalytiques). Un mutant *pph21-102* possède une très faible activité Clb2-Cdc28. La surexpression de *PPH21* provoque un retard de croissance. PP2A est inhibée spécifiquement par l'acide okadaïc, la microcystin et d'autres inhibiteurs spécifiques à cette sous-famille (Lin et Arndt, 1995).

2.1.3 La famille PP2B

L'activité de PP2B est dépendante du Ca2+. La sous-unité catalytique PP2Bc est associée à une sous-unité B et à la calmodulin, capable de fixer le Ca2+. Chez *S. cerevisiae*, les sous-unités catalytiques PP2Bc sont codées par *CNA1* et *CNA2*. Des données génétiques suggèrent que PP2B régule la structure de la paroi cellulaire et l'homéostasie de Ca2+. La surexpression de *CNA2* (promoteur GAL1) inhibe la croissance cellulaire et provoque une accumulation des cellules présentant un allongement de la phase G2 (Mizunuma et al., 2001). PP2B est inhibée spécifiquement par la cyclosporine.

2.1.4 La famille PPP1 :

Elle contient les phosphatases : *PPZ1*, *PPZ2*, *PPQ1*. La sur-expression de *PPZ1* provoque un retard de croissance très marqué dans un mutant où la cycline *CLN3* est délétée (Clotet et al., 1999).

2.1.5 La famille PPP2A

Elle contient les phosphatases : *SIT4*, *PPG1*, *PPH3* La phosphatase *SIT4* a un rôle essentiel dans la transcription de plusieurs gènes, elle est nécessaire pour l'accumulation de l'ARNm de *CLN1* et *CLN2* en fin de la phase G1 du cycle cellulaire et pour la formation du bourgeon (Fernandez-Sarabia et al., 1992; Di Como et al., 1995; Clotet et al., 1999).

2.1.6 La famille PPP5

Représentée par la phosphatase *PPT1*. La protéine Ppt1 présente 40 % de similitude avec la phosphatase Pp5 (Chen et al., 1994).

2.1.7 La famille PPM

Elle est formée par les phosphatases PP2C et les phosphatases *YBR125C* et *YOR090C*. (Sakumoto et al., 1999)

2.2 Les phosphatases à double spécificité

Les phosphatases de cette famille sont capables de déphosphoryler thréonine, sérine et tyrosine. Chez *S. cerevisiae*, il existe six phosphatases à double spécificité : *CDC14* : c'est un régulateur négatif de la kinase mitotique Cdk-Clb (Noton et Diffley, 2000), *YVH1, YIL113w*, *PTC1, PTC2* et *PTC3* : ces deux dernières phosphatases sont des régulateurs négatifs de Cdc28 (Cheng et al., 1999).

2.3 Les phosphatases à tyrosines

Elles catalysent le transfert du phosphate lié à une tyrosine du substrat. Le mécanisme catalytique de déphosphorylation se fait en deux étapes :

- 1) la formation d'un intermédiaire cystenyl-phosphate.
- 2) l'hydrolyse de l'intermédiaire.

Chez S. cerevisiae, on dénombre 10 phosphatases à tyrosine : LTP1, MIH1, MSG5, PTP1, PTP2, PTP3, SIW14, TEP1 et YJR110W. (Les phosphatases Ptp2 et Ptp3 régulent l'activité de la MAPK, Fus3) (Zhan et al., 1997).

CHAPITRE 4

Régulation de l'élongation cellulaire et la différenciation filamenteuse

1 La croissance polarisée chez les eucaryotes

La croissance cellulaire polarisée et la division cellulaire selon une direction définie sont des processus fondamentaux et essentiels au développement des eucaryotes. La croissance cellulaire polarisée consiste en une croissance asymétrique à partir d'une région de la cellule et donne une cellule présentant une forme et des structures particulières. Voici quelques exemples : l'absorption des nutriments par les micro-villosités des cellules épithéliales, et l'interaction des cellules T avec les lymphocytes B.

La division cellulaire unidirectionnelle est un processus par lequel les cellules se divisent selon des plans de clivage bien définis. La division directionnelle est essentielle pour assurer des contacts cellule-cellule appropriés, une partition asymétrique des composants cytoplasmiques durant la division et la mise en place des structures cellulaires polarisées. La division cellulaire unidirectionnelle est présente chez tous les organismes : elle a eu lieu durant l'embryogenèse chez *C. elegans*, la neurogenèse chez la drosophile, le développement des spores chez *B. subtilis* et de la tige chez les plantes. Les mécanismes impliqués dans la sélection des sites aboutissant à la croissance polarisée et régulant la division cellulaire unidirectionnelle sont très peu connus.

Chez la levure *S. cerevisiae*, la croissance polarisée est présente durant trois phases du cycle de vie (Figure 4.1) : la croissance végétative en milieu riche, la réponse aux phéromones sexuelles, la croissance pseudohyphale des cellules diploïdes et la croissance invasive chez les cellules haploïdes (Madden et Snyder, 1998; Chant, 1999; Kron et Gow, 1995; Kron, 1997; Durbin et al., 1996).

L'origine de l'établissement de la polarité cellulaire est un processus très conservé chez les eucaryotes. Durbin et Nelson ont comparé les mécanismes généraux impliqués dans la mise en place de la polarité cellulaire entre la levure et la cellule épithéliale qui sont deux cellules appartenant à deux organismes très éloignés du point de vue phylogénique. Cette comparaison montre l'existence d'une hiérarchie très conservée au niveau des différentes étapes de la mise en place de la croissance polarisée. Dans les deux cellules, la polarité est initiée par l'établissement d'une asymétrie moléculaire et structurale à la surface de la cellule par l'intermédiaire de signaux (Durbin et Nelson, 1996).



Ces signaux nécessitent la présence de récepteurs membranaires spécifiques ou de structures cyto-squelettiques qui marquent le site du signal au niveau de la surface cellulaire. Il en résulte une restriction de la signalisation au voisinage immédiat du signal. Ces interactions définissent une asymétrie moléculaire et structurale au niveau de la membrane entre le site du signal et le reste de la surface cellulaire. Le signal spatial induit l'assemblage localisé d'un réseau de signalisation. Ce réseau est formé par des protéines G, kinases, phosphatases, des protéines de structure/du cytosquelette et des facteurs de transcription (Durbin et Nelson, 1996).

2 Morphogenèse du bourgeon

La formation du bourgeon de *S. cerevisiae* est un processus complexe et coordonné dans le temps et l'espace. Le bourgeonnement commence par l'établissement d'une polarité spatiale dans la cellule mère. Le bourgeon est un marqueur spatial à l'origine de la réorganisation du cytosquelette permettant le transport du matériel nécessaire à sa morphogenèse (Madden et Snyder, 1998). La morphogenèse du bourgeon est contrôlée à plusieurs niveaux : (1) sélection du site de bourgeonnement, (2) transduction des signaux entre le site sélectionné et le cytosquelette, (3) sécrétion polarisée et (4) construction du bourgeon dans une forme bien définie.

La morphogenèse du bourgeon et le cycle cellulaire sont étroitement liés. L'initiation du bourgeonnement est restreinte à la phase G1 et étroitement liée aux deux transitions majeures du cycle cellulaire : (1) achèvement de la phase mitotique précédente (transition M/G1) et (2) déclenchement d'un nouveau cycle cellulaire en Start. Les kinases du Start Cdc28-Cln sont essentielles à l'émergence du bourgeon. Les cellules déficientes dans l'activité kinase Cdc28-Cln s'arrêtent en G1 sans bourgeon (Reed, 1992; Nasmyth, 1993). Padmshree et Surana ont utilisé les marqueurs du bourgeonnement Spa2 et Bni1 pour étudier le rôle de la kinase Cdc28-Clb. L'inactivation de Cdc28-Clb induit la formation d'un nouveau bourgeon en phase G2 et M. l'induction de l'activité kinase Cdc28-Clb en phase G1 inhibe la formation du bourgeon. Ceci suggère que Cdc28-Clb joue un rôle important dans la restriction du bourgeonnement à la phase G1 du cycle (Padmashree et Surana, 2001).

3 Sélection des sites de bourgeonnement

Chez S. cerevisiae, les cellules haploïdes de sexes a ou α ou les cellules de sexes a/a ou α/α présentent un bourgeonnement de type axial. La cellule mère et la cellule fille bourgeonnent au niveau d'un site adjacent au précèdent site de cytokinèse (sites proximaux). Les cellules diploïdes a/ α présentent un mode de bourgeonnement bipolaire. La cellule mère bourgeonne au niveau des deux pôles (proximal et distal) alors que la cellule fille bourgeonne préférentiellement au niveau d'un site opposé au site de cytokinèse c'est-à-dire le site distal. Il semble que le mode de bourgeonnement haploïde axial facilite la production de cellule diploïde. Dans la nature, la cellule mère d'une "vraie" souche sauvage, change de signe sexuel en fin G1. Le bourgeonnement au niveau des sites proximaux positionne les cellules de sexes opposés très proches l'une de l'autre ce qui facilitera la formation des diploïdes. Les cellules diploïdes sont plus résistantes aux stress environnementaux, tels les agents provoquant des dommages dans l'ADN, que les cellules haploïdes. Ainsi la formation de cellules diploïdes préserve la survie de l'espèce (Gimeno et al., 1992). Le mode de bourgeonnement bipolaire diploïde semble être favorable à l'expansion dans les trois directions des microcolonies à la recherche de nutriments. Ceci est particulièrement vrai au cours de la croissance pseudohyphale. C'est un terme défini par Fink en 1992 pour désigner la transition dimorphique dans le cycle de vie de S. cerevisiae. Le dimorphisme est une propriété des champignons qui ont la capacité de croître végétativement sous une forme de levure ou sous une forme filamenteuse. Un pseudohyphe est défini comme étant une chaîne fragile de cellules avec des caractéristiques morphologiques intermédiaires entre une chaîne de levure et un hyphe (Gavrias et al., 1996). La transition dimorphique est induite dans différents milieux. La plus étudiée est l'induction de la croissance pseudohyphale en carence azotée. La croissance pseudohyphale est caractérisée par la formation de chaînes de pseudohyphes émanant de la colonie et se dirigeant vers les substrats non consommés. Fink propose que la croissance pseudohyphale permet à des cellules de la colonie de se trouver dans des positions de plus en plus éloignées du site de colonisation initial, là où des nutriments sont encore disponibles (Gimeno et al., 1992).

4 Géométrie des cellules pseudohyphales

Les cellules pseudohyphales (ψ) sont plus longues et plus fines que les cellules de forme levure (L). Le rapport longueur ψ /L est largement supérieur à 1. Ce rapport peut atteindre chez certains mutants 3 ou plus. Sous sa forme levure, la cellule possède une forme ellipsoïde. Le changement de la géométrie de la forme pseudohyphale a pour conséquence de restreindre le plan de division cellulaire à l'axe longitudinale de la forme pseudohyphale. Ainsi, les bourgeons sont très proches de la pointe de la cellule pseudohyphale. La division est donc polarisée et aboutit inévitablement à une croissance polarisée. Cette polarité permet à la colonie de s'étaler sur la surface et de forer dans le milieu sur des distances relativement importantes à la recherche de nutriments Les colonies s'agrandissent jusqu'à épuisement total du milieu. Une colonie peut s'étendre sur la totalité d'une boîte.

La majorité des souches de laboratoire ne sont pas dimorphiques. L'isolement de "bonnes souches de laboratoire" fut à l'origine d'une forte sélection contre les gènes nécessaires à la croissance pseudohyphale (Gimeno et Fink, 1992). L'analyse de la souche de laboratoire standard S288C montre que l'absence de dimorphisme chez cette souche est due à une mutation non-sens dans le gène *FLO8*. La mutation de ce gène inhibe la croissance pseudohyphale diploïde, la croissance invasive haploïde et la floculation. L'introduction du gène *FLO8* dans une souche S288C rétablit le dimorphisme. Ces résultats suggèrent que la mutation *flo8* a été sélectionnée au cours des cultures de laboratoire (Liu et al., 1996).

5 Régulation de la morphogenèse filamenteuse par la voie MAPK

La cascade MAPK est un ensemble de protéines kinases agissant d'une manière séquentielle. Cette cascade est hautement conservée, elle permet la transmission de signaux externes vers des cibles en aval via des récepteurs. Chez la levure, la réponse aux phéromones de conjugaison est la voie de transduction du signal la mieux caractérisée. Les cellules haploïdes de levure présentent deux signes sexuels opposés appelés a et α . La conjugaison permet à deux cellules de signes sexuels a et α de fusionner et donner une cellule diploïde. Ce processus se déroule en plusieurs étapes : les cellules de signes a et α libèrent respectivement les petits peptides a et α . Les phéromones a et α se fixent sur leurs récepteurs respectifs situés au niveau des membranes des cellules de type sexuels α et a, respectivement. La phéromone se lie et active un récepteur à sept domaines trans-membranaires. L'activation du récepteur induit la dissociation d'une protéine G hétéro-trimérique : Gpa1 (G α) et Ste4 (G β) et Ste18

(Gγ), ces deux dernières sous-unités restent associées sous forme de complexe. Ce complexe active les protéines en aval dans la cascade MAPK. Cette voie est également nécessaire pour la transmission du signal en réponse à de multiples stimuli. En absence de phéromones, les cellules haploïdes forment des filaments et envahissent un milieu solide carencé en glucose, c'est la croissance invasive haploïde (Cullen et Sprague, 2000). Les cellules diploïdes forment des filaments en réponse à une carence en azote et à d'autres stimuli. Les trois processus décrits ci-dessus utilisent la même voie MAPK. Un ensemble de facteurs agissant d'une manière séquentielle forme la cascade MAPK. Il s'agit des protéines kinases Ste11, Ste7 et des kinases Kss1 et Fus3, appartenant à la famille des MAPK (Figure 4.2). Chez la levure, il existe six MAPK. Elles présentent des motifs communs à la famille des MAPK des eucaryotes. Les six MAPK de la levure sont associées à des réponses biologiques à des stimuli spécifiques (Pour revue : Herskowitz 1995; Posas et al., 1998; Garrington et Johnson, 1999; Ammerer, 1994). Une souche délétée pour les six MAPK est viable. Cependant cette viabilité est restreinte aux milieux du laboratoire, en dehors de ces conditions confortables, une telle souche a très peu de chance de survivre (Madhani et Fink, 1998).

Les MAPK Fus3 et Kss1 activent le même facteur de transcription Ste12. Ce dernier est responsable de l'activation transcriptionelle de nombreux gènes spécifiques à la conjugaison ou bien spécifique à la croissance filamenteuse. Ainsi une même cascade de kinases est activée par différents signaux chez l'haploïde et le diploïde, et aboutit à des résultats différents, du point de vue du développement dans les deux types de cellules (Liu et al., 1993 ; Roberts et Fink, 1994).

Le facteur de transcription Ste12 est nécessaire pour l'induction de trois programmes distincts, c'est-à-dire la réponse aux phéromones, l'invasivité de l'haploïde et le développement pseudohyphal diploïde. La spécificité de la réponse est apportée par un facteur de transcription Tec1. Cette protéine interagit d'une façon coopérative avec Ste12 durant la croissance filamenteuse. Ste12 se lie aux éléments de réponse aux phéromones appelées PRE, dont la séquence consensus est TGAAACA (Errede et Ammerer, 1989).



Tec1 se fixe sur la séquence TCS (CATTCT). La séquence composite TCS plus PRE constitue l'<u>E</u>lément de <u>R</u>éponse à la <u>F</u>ilamentation ou FRE. Les gènes qui répondent aux phéromones ne possèdent qu'une séquence PRE. Sachant que Ste12 forme un dimère (ou un hétérodimère Ste12-Mcm1) (Johnson, 1995) en réponse aux phéromones et que Ste12 s'associe à Tec1 pour exécuter le programme du développement filamenteux, comment l'activation différentielle de Ste12-Ste12 versus Ste12-Tec1 est-elle accomplie chez l'haploïde?

Les deux voies assurant respectivement la croissance invasive sur milieu YP glucose et la réponse aux phéromones, utilisent deux MAPK différentes. Chez les cellules haploïdes, en présence de phéromone, Fus3 est recrutée par Ste5, et ce faisant, Kss1 est exclue de la voie MAP kinase sollicitée par le signal. De plus, Fus3 empêche l'activation de Kss1, donc la mise en place de la croissance invasive. Cependant, les processus conduisant à cette répression ne sont pas connus (Elion, 2000).

Le groupe de J. Thorner (Cook et al., 1997) a précisé les rôles de Fus3 et Kss1 dans la croissance invasive. Il a utilisé 8 souches haploïdes portant toutes les combinaisons possibles des allèles sauvages et des allèles délétés des gènes *STE7*, *KSS1* et *FUS3*. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

STE7	+	Δ	+	+	Δ	Δ	+	Δ
KSS1	+	+	Δ	+	Δ	+	Δ	Δ
FUS3	+	+	+	Δ	+	Δ	Δ	Δ
Conjugaison	+	-	+	+	-	-	-	-
Invasion	+	-	-	+	+	-	+	+

Kss1 apparaît avoir une action positive et Fus3 une action négative sur la croissance invasive. Le mutant $\Delta ste7 \Delta kss1 \Delta fus3$ indique que la voie MAPK n'est pas nécessaire pour cette croissance. Un mutant $\Delta ste11 \Delta ste7 \Delta kss1 \Delta fus3$ est encore invasif. Ceci indique qu'une voie indépendante de la voie MAPK, mais vraisemblablement dépendante de Ras2, doit avoir un rôle positif dans la croissance invasive. L'analyse de mutants ponctuels a permis de préciser les actions de ces MAP kinases. Les mutants kss1-KL42R (pas de fixation de l'ATP) et kss1-T183M, tous deux déficients dans l'activité kinase de Kss1, sont inhibés pour la croissance invasive encore plus sévèrement que $\Delta kss1$ (Conte et Curcio, 2000 ; Madhani et al., 1997). Ceci montre que Kss1 a une fonction inhibitrice indépendante de sa fonction kinase. La mutation *fus3-K42R*, mutation qui abolit l'activité kinase de Fus3, produit une croissance invasive sensiblement moins invasive que celle causée par la mutation *Afus3*. Ceci implique que Fus3 garde une action inhibitrice indépendante de sa fonction kinase.

Le modèle proposé (Cook et al., 1997) pour expliquer les résultats, est présenté sur la figure 4.3.

Kss1 non activé a une action inhibitrice. La phosphorylation de Kss1 par Ste7 lui donne les propriétés d'un activateur. Fus3 fonctionne comme un répresseur, qualité répressive qui est accentuée quand il est phosphorylé par Fus3.

Dans une souche diploïde, FUS3, entre autres gènes de la conjugaison, n'est pas exprimé. Le mécanisme d'action de Kss1 a été mieux compris en suivant l'effet de différentes mutations sur la croissance pseudohyphale, chez les diploïdes, en milieu carencé en azote. Des souches portant les mutations *STE11-4* et *STE7-P368* sont hyper-filamenteuses. L'introduction des délétions $\Delta kss1/\Delta kss1$ ou $\Delta ste7/\Delta ste7$, fait disparaître cette hyper-filamentation. Ceci est conforme au fait que l'action positive de Kss1 agit en aval de Ste7 ou Ste11. Des mutants kss1-K42R/kss1-K42R ou kss1-T183M/kss1-T183M qui ont perdu leur activité kinase ne filamentent pas. Ainsi, comme chez l'haploïde, Kss1 a un effet inhibiteur quand il a perdu sa fonction kinase. Le mutant $\Delta kss1/\Delta kss1$ filamente comme une souche sauvage, de même le double mutant $\Delta kss1/\Delta ks1$ $\Delta ste7/\Delta ste7$, tandis qu'une souche $\Delta ste7/\Delta ste7$ ne filamente pas. L'isolement des mutants kss1-E260G/kss1-E260G ou kss1-D249G/kss1-D249G qui ne sont pas défectueux dans la fonction kinase, mais qui induisent très fortement les pseudohyphes, est en faveur d'une absence de fonction inhibitrice de ces mutants kss1.



Le modèle proposé (Madhani et al., 1997) pour expliquer ces résultats, est présenté sur la figure 4.4.

On sait que Kss1 interagit avec Ste12-Tec1. Les mutants *kss1-E260G* est inhibé pour l'association avec Ste12-Tec1 et présente une forte induction de FG(TyA)::lacZ . (La transcription de FG(TyA)::lacZ est sous le contrôle d'un fragment du retro-transposon Ty1 dont le promoteur contient des sites FRE (Gavrias et al., 1996; Mosch et al., 1996).

L'activité kinase positive dépendante de Kss1 stimulant la filamentation nécessite les facteurs de transcription *DIG1* et *DIG2*. Une souche $\Delta dig1\Delta dig2$ est hyperfilamenteuse. La sur-expression de *KSS1* ou *DIG1* à partir d'un promoteur GAL inhibe la transcription dépendante de FRE. La sur-expression de *DIG1* dans une souche $\Delta kss1$ inhibe la transcription dépendante de FRE. Cependant la sur-expression de *KSS1* dans une souche $\Delta dig1$ n'inhibe pas la transcription dépendante de FRE. L'équipe de Tyers a montré que Dig1/2 forment un complexe avec Ste12-Tec1, Ste12-Ste12 et Kss1 ou Fus3. Un modèle d'action de Dig1/2 a été proposé par Thorner et al : en absence de stimulation de la voie MAPK, les protéines du complexe Kss1-Dig1/2-Ste12-Tec1 ne sont pas phosphorylées. En réponse à des signaux en amont, Ste7 phosphoryle et active Kss1 ce qui conduit une dissociation de Kss1 du complexe Dig1/2-Ste12-Tec1. Kss1 phosphoryle Dig1/2 et Ste12 ou/et Tec1 et empêche leur association. Il en résulte une plus forte transcription dépendante de FRE (Bardwell et al., 1998; Tedford et al., 1997; Cook et al., 1996) (Figure 4.5).

D'autres facteurs agissent en amont de la cascade MAPK régulant la transcription dépendante de FRE. Deux petites protéines G, Ras2 et Cdc42, régulent la filamentation. Un mutant dominant actif *RASVal19* stimule très fortement la filamentation dans une souche sauvage. Cependant ce mutant n'a pas d'effet dans une souche $\Delta ste20$ et présente une inhibition partielle de la filamentation dans une souche délétée pour *STE11* ou *STE12*. Un mutant dominant négatif *cdc42Ala118* inhibe la croissance pseudohyphale. Un mutant dominant actif *CDC42Val12* induit très fortement la croissance pseudohyphale. Cette induction est dépendante de la fonction de *STE20*. Un double mutant *RASVal19 cdc42Ala118* n'est pas filamenteux. Cependant le mutant *cdc42Ala118* n'inhibe pas l'hyper-filamentation du mutant *STE11-4* (Stevensen B.J. et al Gen. Dev.1992, 6.1293).



Figure 4.4 Mbdèle : fonction de Kssl dans une souche sauvage et dans les mutants *fus3* (A) Kssl est spécifique à la croissance filamenteuse et Fus3 est spécifique à la conjugaison. (B) En absence de Fus3, Kssl le remplace et active les voies de filamentation et la conjugaison, c'est pourquoi les phéromones induisent la filamentation dans ce mutant. (C) La kinase inactive Fus3K42R empèche Kssl d'activer la voie de conjugaison. (D'après Madhani et Fink, 1998)
L'ensemble de ces résultats suggère que *CDC42* est nécessaire pour l'activation de la filamentation dépendante de *RAS2* en agissant en aval de *RAS2* (Gimeno et al., 1992; Mosch et al., 1996).

D'autres facteurs sont nécessaires pour l'activation de la filamentation dépendante de RAS2. Les protéines 14-3-3 sont des protéines ubiquitaires hautement conservées dont la fonction n'est pas bien définie. Les homologues chez la levure BMH1 et BMH2 sont non essentiels pour la viabilité ou la conjugaison. Cependant une souche $\Delta bmh1\Delta bmh2$ et contenant RASVal19 ou CDC42Val12 ne filamente pas. Une souche surexprimant BMH1 ou BMH2 stimule l'élongation cellulaire. Le mutant $\Delta bmh1\Delta bmh2$ ne présente pas de cellules allongées, mais fore l'agar. Les protéines 14-3-3 interagissent physiquement avec Ste20. Chez des mutants bmh1 non filamenteux, le complexe Bmh1/2 interagit faiblement avec Ste20. Ainsi les protéines 14-3-3 sont spécifiquement nécessaires pour la signalisation dans la cascade RAS2 MAPK au cours du développement pseudohyphale (Roberts, et al., 1997). Bmh1et Bmh2 interagissent avec le domaine C-terminal de Ste20. Les protéines 14-3-3 sont des régulateurs positifs de Ste20. Un régulateur négatif de Ste20 a été isolé, il s'agit de Hsl7, c'est un régulateur négatif la protéine kinase Swe1, qui est responsable de la phosphorylation inhibitrice de la Tyr19 de Cdc28. Hsl7 interagit physiquement avec Ste20. Une souche $\Delta hsl7$ est déreprimée pour la filamentation. La sur-expression d'HSL7 inhibe la filamentation. Cette inhibition est levée par la sur-expression de CDC42. Ceci suggère qu'en réponse à des stimuli appropriés Ras2 active l'interaction de Cdc42 avec Ste20 et interfère avec la fixation d'Hsl7 avec Ste20 (Fujita et al., 1999). La protéine G Ras2 est un régulateur positif du niveau intracellulaire de l'AMPc. Un mutant RASVal19 constitutif induit très fortement la croissance pseudohyphale (Gimeno et al., 1992). L'augmentation du niveau de l'AMPc intracellulaire est une condition nécessaire à l'induction de la croissance pseudohyphale.



(C) Kssl, Dig1/2 et Ste12/Tec1 phosphorylées favorisent la dérépression totale

Figure 4.5 Modele : Kss1 phosphoryle DIG1/2 et Stel2.

6 Complexité des voies de régulation de la morphogenèse filamenteuse

La voie MAPK est une voie essentielle à la croissance filamenteuse, mais ce n'est pas la seule voie qui intervient dans la mise en place du processus de la différenciation filamenteuse. La régulation de ce processus apparaît être très complexe et fait intervenir plusieurs mécanismes semblables à ceux impliqués dans le développement des métazoaires.

Une protéine G, Gpa2, est un activateur de la synthèse de l'AMPc. Une souche $\Delta gpa2$ est inhibée pour la croissance pseudohyphale. Un allèle dominant actif gpa2Gly132Val induit très fortement la filamentation. Un allèle dominant négatif gpa2Glu299Ala inhibe fortement la filamentation. GPA2 ne régule pas la cascade MAPK. Cependant l'addition de l'AMPc au milieu de culture induit fortement la croissance pseudohyphale dans une souche sauvage et même dans une souche $\Delta gpa2$ ou $\Delta pde2$. *PDE2* est responsable de la conversion de l'AMPc en AMP (Kubler et al., 1997; Lorenz et Heitman, 1997).

La protéine Gpa2 agit en aval d'une perméase pour l'ammonium NH4+, Mep2, qui joue le rôle de senseur de NH4⁺. Mep2 est nécessaire pour la croissance pseudohyphale, elle ne régule pas la cascade MAPK. Cependant elle régule Ras2 et Gpa2. Marini et al., ont montré que le facteur de transcription Gln3 active la transcription de *MEP2*. Une souche *Agln3* est réprimée pour la croissance pseudohyphale (Marini et al., 1997). Le gène *URE2*, qui est homologue à celui d'une glutathione transférase, est nécessaire pour l'accumulation de l'ARNm de *MEP2* (Xu et al., 1995). Une souche *Aure2* est inhibée pour la croissance pseudohyphale. L'activité de la perméase Mep2 nécessite la fonction de la protéine kinase Npr1 (Vandenbol et al., 1990). Une souche *Anpr1* est inhibée pour la croissance pseudohyphale. La sur-expression à partir d'un promoteur GAL1 de *MEP2* ne restaure pas filamentation dans une souche *Agln3Aure2*. Il semblerait que les protéines Gln3, Ure2 et Npr1 sont nécessaires à la croissance pseudohyphale. Un modèle qui explique la régulation de la croissance pseudohyphale par *MEP2* et *GPA2* a été proposé par Lorenz et Heitman : la carence en azote est ressentie par Mep2, qui produit un signal activateur de Gpa2 induisant une libération de l'AMPc (Lorenz et Heitman, 1998).

Lorenz et al., ont révélé que Gpr1, un récepteur couplé à des protéines G, ressent la carence en azote et régule positivement la croissance pseudohyphale via la voie *GPA2* AMPc (Lorenz et al., 2000). La protéine Gpr1 s'associe à Gpa2. Cette association dépend de la

présence de la phospholipase Plc1 spécifique aux phosphatidylinositols. Plc1 interagit physiquement Gpa2 et Gpr1. Une souche *Aplc1* est inhibée pour la croissance pseudohyphale. L'ensemble des résultats permet d'élaborer un modèle intégrant l'ensemble des facteurs déjà cités : le récepteur membranaire Gpr1 ressent la carence en azote, se lie à la phospholipase Plc1, ceci induit l'association de Gpa2 au complexe Gpr1-Pcl1 et produit son activation. Gpa2 active la voie dépendante de l'AMPc (Ansari et al., 1999).

Les cibles de l'AMPc sont les protéines kinases PKA. Chez la levure, il existe trois PKA : TPK1, TPK2 et TPK3. Une souche Atpk2 est inhibée pour la croissance pseudohyphale. Cependant une souche $\Delta tpk3$ est fortement stimulée pour la croissance pseudohyphale. La délétion de TPK1 n'a pas d'effet sur la croissance pseudohyphale. Remarquablement un double mutant $\Delta tpk2\Delta tpk3$ présente le même phénotype que $\Delta tpk2$. La stimulation de la filamentation dans le mutant $\Delta tpk3$ nécessite la fonction de TPK2. La recherche de protéines interagissant avec Tpk2 par double hybride a permis d'isoler SFL1. C'est une protéine contenant un motif de liaison à l'ADN. Le mutant $\Delta sfl1$ est stimulé pour la croissance pseudohyphale. Un double mutant $\Delta sfl1\Delta tpk2$ présente le même phénotype que $\Delta sfl1$. Ceci suggère que SFL1 agit en aval de TPK2. Les souches $\Delta sfl1\Delta tpk2$ montrent une augmentation de la transcription de FLO11 (Robertson et Fink, 1998; Pan et Heitman, 1999). Cette dernière est une protéine de la paroi nécessaire pour la filamentation. Elle appartient à une famille de protéines FLO nécessaires à l'adhésion cellule-cellule. Parmi les membres de la famille FLO, la protéine Flo8, c'est un facteur de transcription nécessaire à la croissance filamenteuse (Liu et al., 1996). Rupp et al., ont montré que FLO8 est nécessaire à l'expression de *FLO11*. En effet, une souche $\Delta flo8$ présente une très faible expression de *FLO11*. *FLO8* est nécessaire à l'activation de la transcription de FLO11 par la voie AMPc. Le promoteur de FLO11 contient une séquence FRE, site de fixation de Ste12-Tec1. Le promoteur de FLO11 est très large, il contient au moins quatre séquences d'activation (UAS) et neuf éléments de répression, l'ensemble de ces séquences s'étale sur 2,8kb (Rupp et al., 1999; Lo et Dranginis, 1998; Lo et Dranginis, 1996; Gagiano et al., 1999). Une souche Δflo11 perd la capacité de former des filaments et de forer l'Agar. Cependant les cellules $\Delta flo11$ restent étroites et allongées, elles présentent une croissance polarisée de type pseudohyphale avec un retard en G2/M et une activité normale de la cascade MAPK /RAS (Ahn et al., 1999).

La protéine kinase Ime1 appartient à la famille Clk ou Cdk like kinase. Elle interagit avec la forme active Gpa2-GTP dans un test double hybride *in vitro*. La sur-expression d'*IME1* inhibe la croissance pseudohyphale (Donzeau et Bandlow, 1999).

La protéine Ash1 (Assymetric Synthesis of HO) inhibe la transcription de HO dans les cellules filles. La délétion d'ASH1 inhibe la filamentation alors que sa sur-expression induit très fortement la filamentation. ASH1 agit indépendamment de la voie MAPK. La double délétion de STE12 et ASH1 est nécessaire pour inhiber complètement la filamentation. La surexpression d'ASH1 n'a pas d'effet sur la filamentation dans une souche Aste20. Il semble que STE12 et ASH1 possèdent des effets additifs sur la filamentation. Ceci est vrai aussi pour le facteur de transcription *PHD1* qui induit fortement la différenciation pseudohyphale dans une souche Astel2 Aash1 (Chandarlapaty et Errede, 1998). Le facteur de transcription Phd1 appartient à une famille de protéines contenant un domaine de fixation à l'ADN du type Swi4/Mbp1. Cette famille regroupe les protéines suivantes : Phd1, Xbp1, Sok2 et Efg1 (Candida albicans). Remarquablement l'ensemble de ces protéines régulent la croissance pseudohyphale. La localisation de Phd1 est nucléaire. La sur-expression de PHD1 induit très fortement la croissance pseudohyphale chez le diploïde, mais elle n'a pas d'effet chez un haploïde. La délétion de PHD1 n'a pas d'effet sur la filamentation sur un milieu carencé en azote. Ces résultats suggèrent que *PHD1* n'est pas essentiel à la croissance pseudohyphale sur un milieu carencé en azote. Néanmoins il est possible que PHD1 soit impliqué dans la filamentation en réponse à des signaux autres que la carence en azote (Gimeno et Fink, 1994). La séquence de Phd1 est très similaire au facteur de transcription Sok2. Une souche $\Delta sok2$ est fortement déréprimée pour la croissance pseudohyphale. Toutefois la sur-expression de SOK2 n'a pas d'effet sur la différenciation pseudohyphale. Une souche $\Delta phd1\Delta sok2$ n'est pas déréprimée pour la croissance pseudohyphale. Ceci suggère que l'induction de la différenciation pseudohyphale dans une souche $\Delta sok2$ est un processus dépendant de la fonction de PHD1 (Ward et al., 1995). L'ensemble de ces observations génétiques doit être confirmé par des études biochimiques *in vivo* pour apporter une réponse claire sur le rôle de ces facteurs dans la croissance filamenteuse.

Il existe d'autres gènes qui régulent la croissance filamenteuse mais dont leur mode d'action reste à déterminer. Parmi ces gènes, l'ARNt-Glutamine qui semble être un détecteur de la nature de la source d'azote. Les mutations qui altèrent l'ARNt-Glutamine induisent fortement la croissance pseudohyphale. Cette induction est indépendante de la voie MAPK et de *STE20* (Murray et al., 1998). Ainsi des processus cellulaires généraux, ici la traduction, possèdent un lien avec la différenciation filamenteuse. La sécrétion polarisée au cours de l'exocytose fait intervenir un gène non essentiel et fortement conservé chez les eucaryotes, il s'agit de *SEM1*. Son homologue humain est *DSS1* qui semble jouer un rôle important dans les malformations des mains et des pieds. Une souche délétée pour *SEM1* est hyperfilamenteuse. Ce phénotype est rétabli par l'expression du gène humain *DSS1*. Ces résultats suggèrent la présence d'un lien entre la sécrétion polarisée et la croissance filamenteuse (Jantti et al., 1999).

La protéine Spa2 est localisée au niveau des sites de croissance. *SPA2* est nécessaire pour la morphogenèse polarisée au cours du bourgeonnement, de la conjugaison et de la croissance filamenteuse. Dans un test double hybride Spa2 interagit avec Stel1 et Ste7 (Roemer et al., 1998). Le même test montre une interaction entre Stel1, Ste7 et la protéine Sph1. Spa2 est nécessaire pour une bonne localisation de Sph1 au niveau du bourgeon. Les mutants $\Delta sph1$ ou $\Delta spa2$ ne sont pas filamenteux. Ces observations suggèrent que les protéines Spa2 et Sph1 sont essentielles à la croissance filamenteuse. *SPA2* et *SPH1* agissent ensemble pour réguler la morphogenèse polarisée à travers la régulation des voies de signalisation et de l'actine du cytosquelette (Sheu et al., 1998; Sheu et al., 2000).

Plusieurs mutations au niveau du gène *ACT1*, qui code pour l'actine, inhibent la filamentation (Cali et al., 1998). Dans un crible de recherche de mutants déficients dans la croissance filamenteuse, plusieurs mutations dans des gènes codant pour des protéines du cytosquelette ont été isolées : *TPM1* (Tropomyosine), *SRV2* (Protéine associée à la cyclase), *BNI1* (Formin) et *SCA2* (Talin) (Yang et al., 1997; Mosch et Fink, 1997).

7 Régulation du cycle cellulaire au cours de la morphogenèse filamenteuse

Pour maintenir une taille constante au cours de la prolifération cellulaire, la vitesse de croissance de la cellule doit être égale à la vitesse de division. Les facteurs qui gouvernent la croissance doivent donc coordonner la régulation de deux processus distincts : 1) la biosynthèse cellulaire qui conduit à l'accumulation du matériel cellulaire et 2) la progression à travers le cycle de division cellulaire (Neufeld et Edgar, 1998). Les premières études sur le cycle cellulaire des cellules en croissance pseudohyphale sont relativement récentes. En 1994, le groupe de Fink a décrit les différences macroscopiques dans le déroulement du cycle cellulaire entre la forme levure et la forme pseudohyphale. Kron a utilisé la video-microscopie

pour ces analyses. L'obstacle majeur pour étudier le cycle cellulaire pseudohyphale est l'absence de conditions permettant d'avoir des cellules en croissance pseudohyphale en culture liquide. C'est la raison pour laquelle il n'existe pas d'études biochimiques de la croissance pseudohyphale. Tous les résultats obtenus sur le processus de différenciation pseudohyphale sont issus d'études génétiques. On s'aperçoit que plusieurs données génétiques sur la croissance pseudohyphale sont très difficiles à interpréter et sont parfois contradictoires. Il est donc clair que des études biochimiques sont indispensables pour la compréhension d'un phénomène biologique complexe, en particulier l'étude des correspondances entre le changement de la morphologie de la cellule et les modifications du cycle cellulaire. Les modifications du cycle cellulaire sont-t-elles la cause ou la conséquence des changements observés au cours du développement ?

7.1 Régulation de la morphogenèse filamenteuse par les CDKs

La voie MAPK spécifique à la réponse aux phéromones présente une activité basale en absence de phéromones. Cette activité est régulée en fonction du cycle cellulaire. La transcription dépendante de STE12 est forte en G1 et diminue en phase S. La sur-expression GAL1::CLN2 inhibe fortement la transcription dépendante de STE12/FUS3 et induit une phosphorylation de Ste20. Des études d'épistasie montrent que les kinases Cln1/2-Cdc28 agissent au niveau de Ste20. La protéine kinase Ste20 est un substrat de Cdc28 in vitro (Wu et al., 1998). La sur-expression des cyclines CLN3, CLB2 ou CLB5 n'a pas d'effet sur le niveau de phosphorylation de Ste20. L'ensemble des formes phosphorylées de Ste20 sont capables de phosphoryler la protéine MBP (substrat classique des MAPK) (Oehlen et Cross, 1998). Lew et Reed ont montré que Cln1/2-Cdc28 sont nécessaires pour l'activation de la protéine G Cdc42 qui est responsable de la polarisation de l'actine du cytosquelette (Basco et al., 1995; Lew et Reed, 1995). Oehlen et Cross ont proposé le modèle suivant : les kinases Cln1/2-Cdc28 transforment la kinase Ste20 d'une forme active dans la réponse aux phéromones à d'autres formes actives dans la croissance filamenteuse. C'est un mécanisme permettant d'avoir une spécificité dans la transduction du signal en réponse à des signaux environnementaux acheminés par une même voie. Il est possible que la régulation des PAK (p21-Activated Kinases) (Ste20) par les CDKs soit un mécanisme universel assurant la spécificité de signalisation.

Une souche $\Delta cln1\Delta cln2$ inhibe la croissance invasive et l'hyperfilamentation induite par la mutation *STE11-4* (Madhani et al., 1999). Barral et Mann ont montré qu'un mutant *grr1*

stabilise les cyclines *CLN1* et *CLN2* et induit la croissance pseudohyphale (Barral et al., 1995; Barral et al., 1999). La protéine Grr1 est une composante de l'ubiquitine ligase SCF. Les souches $\Delta grr1\Delta ste12$ et $\Delta grr1\Delta ste20$ présentent une transcription normale de *FLO11*. La surexpression de *CLN1* ou *CLN2* provoque une élongation cellulaire, mais ne rétablit pas la croissance filamenteuse dans une souche $\Delta ste20$. L'ensemble de ces résultats suggère que Cln1/2-Cdc28 régule la filamentation en agissant en parallèle avec la cascade MAPK.

La protéine kinase Cdc28 est un régulateur central du cycle cellulaire. Des preuves génétiques montrent que tout mécanisme aboutissant à l'inhibition de l'activité kinase de Cdc28 induit une hyperfilamentation. L'ensemble de ces travaux ne montrent pas que l'activité kinase associée à Cdc28 est normalement inhibée dans les conditions physiologiques de la croissance filamenteuse, ni ne précise les mécanismes responsables de cette régulation négative. Plusieurs facteurs seraient candidats pour accomplir cette fonction d'inhibition. La protéine kinase Swe1 est responsable de la phosphorylation inhibitrice sur la Tyr19 de Cdc28. La transcription de *SWE1* est périodique, avec un pic en phase G1 tardive. La protéine Swe1 est instable pendant les phases G2 et M. La déphosphorylation de la Tyr19 n'est pas essentielle pour l'activation de Cdc28, alors que la déphosphorylation de l'homologue de cette Tyr chez la kinase Cdc2 est essentielle pour l'activité de Cdc2 (Amon et al., 1992). La phosphorylation de la Tyr19 par Swe1 inactive les complexes Cdc28-Clb1/2 et n'a pas d'effet sur les complexes Cdc28-Cln1/2 et Cdc28-Clb3/4. La sur-expression de SWE1 n'inhibe pas la transition G1/S, mais induit un arrêt du cycle cellulaire au stade deux lots d'ADN (Booher et al., 1993). La déphosphorylation de la Tyr19 est assurée par la protéine phosphtase Mih1. Une souche $\Delta mih1$ est hyperinvasive. La délétion de SWE1 inhibe la croissance invasive. SWE1 est nécessaire pour l'induction de la filamentation dans les mutants $\Delta hsl1$ et $\Delta elm1$. Hsl1 et Elm1 sont deux protéines kinases. Hsl1 est très similaire à la protéine kinase Nim1 de S. *pombe*. Nim1 est responsable de l'inhibition de la protéine kinase Wee1, homologue de Swe1 (Edgington et al., 1999). L'inhibition de Hsl1 induit une stabilisation de Swe1 et une hyperfilamentation. Un double mutant AhsllAswel est inhibé pour la filamentation. Les protéines Hsl1 et Hsl7 sont nécessaires pour la dégradation de Swe1 qui a lieu en phase G2/M (McMillan et al., 1999). Un mutant $\Delta elml$ est induit pour la croissance pseudohyphale (Blacketer et al., 1993). Un double mutant Aelm1Aswe1 est inhibé pour la croissance pseudohyphale. Les actions de SWE1, HSL1 et ELM1 sont indépendantes de la voie MAPK. Ces résultats suggèrent que HSL1 et ELM1 régulent l'activité de SWE1. La protéine Swe1 possède une activité inhibitrice indépendante de son activité kinase : Swe1 inhibe un mutant Cdc28Tyr19Phe (non phosphorylable par Swe1) (McMillan et al., 1999). Swe1 est une phosphoprotéine. La phosphorylation de Swe1 est corrélée avec l'activation de Cdc28 par Clb2. Une souche $\Delta elm1$ présente une hypophosphorylation de Swe1. Ces résultats suggèrent que le complexe Cdc28-Clb2 active la kinase Elm1 responsable de la phosphorylation de Swe1 (Sreenivasan et Kellogg, 1999). L'activation de la voie *ELM1-HSL1-SWE1* n'est pas essentielle à la croissance pseudohyphale diploïde. En effet, une souche haploïde $\Delta swe1$ est non invasive alors qu'une souche diploïde $\Delta swe1$ est filamenteuse. Fink et al suggèrent que la voie MAPK produit un inhibiteur du complexe Clb-Cdc28. Cet inhibiteur serait absent dans les cellules haploïdes. Ainsi la voie *SWE1* serait nécessaire pour la croissance invasive chez l'haploïde et n'interviendrait pas dans la croissance pseudohyphale diploïde (Edgington et al., 1999).

7.2 La croissance pseudohyphale est synchrone

Une caractéristique principale de la croissance pseudohyphale est la présence d'un contrôle de la taille cellulaire à la mitose pendant la division cellulaire. La cellule pseudohyphale possède un bourgeon qui croit jusqu'à atteindre la taille de la cellule mère. Durant cette période de bourgeonnement prolongée, les cellules mères présentent un phénotype qui ressemble à celui des cellules bloquées en G2 (Surana et al., 1991). Kron et al ont filmé des cellules en croissance sur milieu solide. Sur un milieu solide riche (YPD), le bourgeon d'une cellule sauvage doit croître jusqu'à atteindre les 2/3 de la taille de la cellule mère pour que le septum apparaisse. C'est un marqueur de la fin de la cytokinèse. La cellule mère bourgeonne de nouveau et la cellule fille continue de croître de manière isotrope, c'est-à-dire dans tous les sens, jusqu'à atteindre la taille de la cellule mère et la cellule fille (Kron et al., 1994).

Sur un milieu carencé en azote, le bourgeon croit jusqu'à atteindre la taille de la cellule mère. Après quoi un septum séparant la cellule mère et la cellule fille se met en place. Les cellules restent attachées et forment une chaîne. Les cellules mère et fille ont la même taille et bourgeonnent en même temps. C'est une croissance synchrone. Le septum sépare physiquement cellule mère et fille. Il n'existe pas de connexions cytoplasmiques ou de pores entre les deux types de cellules. En milieu riche la phase G1 correspond à une période de croissance isotrope de la cellule fille qui est nécessaire pour passer Start. Il existe un point de contrôle qui coordonne la taille de la cellule et l'entrée en Start. En milieu pauvre, la phase G1 est très courte ou inexistante. Les mécanismes moléculaires responsables du retard en G2 et de l'absence de phase G1 aboutissant à une synchronisation de la division entre cellule mère et fille sont inconnus. La synchronisation est le résultat d'un retard dans le temps dans l'achèvement d'évènement nécessaire pour le cycle cellulaire et la persistance de la croissance et le métabolisme de la cellule fille. En absence de contrôle de la taille, la cellule mère et fille initient leurs cycles cellulaires en même temps.

La synchronisation de la division cellulaire chez les cellules pseudohyphales serait le résultat de l'activité d'un point de contrôle dans le cycle cellulaire pseudohyphale qui empêche la cellule mère d'initier la division cellulaire avant que le bourgeon n'atteigne sa taille entière. On ne dispose pas de données claires permettant de situer ce point de restriction dans le cycle cellulaire pseudohyphale. Nos résultats et celle de Kron suggèrent que ce point de contrôle se situe en phase G2/M (Kron et al., 1994).

Le mutant STE11-4 induit constitutivement la croissance filamenteuse en milieu riche, les cellules s'accumulent en phase G2/M. Ce phénotype est similaire à celui observé chez une souche sauvage cultivée sur un milieu carencé en azote. Ces résultats suggèrent que la voie MAPK est à l'origine d'une régulation négative de la transition G2/M. La cible logique de cette régulation négative est l'activité kinase du complexe Clb2-Cdc28. La phosphorylation de la Tyr 19 de Cdc28 par la protéine kinase diminue l'activité Clb1/2-Cdc28. Cependant, une souche Aswe1STE11-4 n'est pas inhibée pour la filamentation, mais elle a un phénotype semblable à une souche STE11-4. Ceci suggère que l'action négative de la voie MAPK sur l'activité Clb1/2-Cdc28 est indépendante de SWE1. L'inhibition de l'expression de CLB1/2 abolit l'activité Clb1/2-Cdc28. Une souche délétée pour CLB1 ou CLB2 est très fortement déréprimée pour la croissance filamenteuse en milieu solide. En milieu liquide les cellules sont en partie allongées et elles présentent une accumulation en G2. La sur-expression de GAL-CLB1 ou CLB2 inhibe fortement la croissance filamenteuse. La sur-expression de CLB3 ou CLB4 ou CLB5 n'a pas d'effet sur la filamentation. Ceci suggère que Clb2-Cdc28 possède une fonction antagoniste directe de la voie MAPK. En milieu riche, une souche STE11-4 présente un niveau protéique de Clb2 normal. Fink et al., proposent que la voie MAPK ne régule pas l'expression ni la stabilité de la protéine Clb2. Que se passe - t - il réellement dans une souche sauvage en milieu carencé en azote? A quel niveau agit Clb2-Cdc28? Les doubles mutants $\Delta clb2\Delta ste20$, $\Delta clb2\Delta ste7$ et $\Delta clb2\Delta ste12$ sont inhibés pour la filamentation en milieu carencé en azote. Une souche sur-exprimant *CLB1* ou *CLB2* et contenant la mutation *RASVal19* est inhibée pour la filamentation. Ces données suggèrent que la voie RAS/MAPK agit en amont des cyclines mitotiques *CLB1/2* au cours de la croissance filamenteuse (Ahn et al., 1999). Chez le Xénope, des études suggèrent que la voie MAPK inhibe l'activité mitotique de la kinase Cdc2-cycline B (Palmer et Nebreda, 2000).

7.2.1 Le facteur de transcription Xbp1

L'expression de CLB2 est régulée par un facteur de transcription XBP1 (XhoI sitebinding protein). C'est un membre de la famille des protéines Swi4/Mbp1. Cette famille de protéine présente un domaine de fixation à l'ADN très conservé. Xbp1 est une petite protéine de 17kDa, elle contient un domaine central de 39 acides aminés qui présente 40 % d'identité et 77 % d'homologie avec la moitié du domaine C-terminal de fixation à l'ADN des facteurs de transcription Swi4 et Mbp1. Il n'y a pas d'homologie entre Xbp1 et Swi4/Mbp1 en dehors de la région de fixation à l'ADN. Le site consensus de liaison de Xbp1, GgCTCGAG/AGC/Aga/G, est une séquence palindromique avec un site de restriction pour l'enzyme XhoI au centre. Le site de liaison de Xbp1 est similaire aux sites de fixation de Swi4/Swi6 (SCB) et Mbp1/Swi6 (MCB), mais il diffère par rapport à ces éléments par une substitution d'une base au centre du consensus. Xbp1 ne se lie pas aux sites de fixation de Swi4/Swi6 ou Mbp1/Swi6. Le promoteur de Xbp1 contient plusieurs éléments de régulation par les signaux du stress. L'expression de Xbp1 est induite par un choc thermique, une forte pression osmotique, un stress oxydatif, des dommages à l'ADN ou une carence en glucose. L'expression de XBP1 est induite pendant la sporulation. La perte de XBP1 n'abolit pas la méiose, cependant la formation des asques est retardée de quelques heures (Mai et Breeden, 1997; Mai et Breeden, 2000).

La fusion de Xbp1 au domaine de liaison à l'ADN de LexA montre que Xbp1 agit comme un répresseur de la transcription. La protéine Xbp1 est le seul répresseur de la transcription connu dans la famille Swi4/Mbp1. La sur-expression de *XBP1* n'a pas d'effet global sur la transcription, elle induit une répression de l'expression des gènes des cyclines *CLN1*, *CLN3* et *CLB2*. La cycline G1, *CLN1* et son répresseur Xbp1 sont importantes pour une bonne efficacité de sporulation mais elles ne sont pas essentielles à ce processus (Mai et Breeden, 1997; Mai et Breeden, 2000; Colomina et al., 1999). Nous avons montré que *XBP1* est essentiel à la différenciation pseudohyphale (Miled et al., 2001).

7.2.2 Les protéines FKH (Forkhead)

Les protéines FKH appartiennent à une famille conservée de facteurs de transcription. Les protéines de cette famille sont caractérisées par la présence d'un motif de fixation à l'ADN de 110 résidus. Chez les métazoaires, ces protéines sont impliquées dans l'embryogenèse et le développement. Chez l'homme, les protéines forkhead sont impliquées directement dans le cycle cellulaire (Pati et al., 1997). La protéine Fkh2 est localisée dans le noyau. Chez la levure, la délétion de *FKH2* provoque une réduction de l'expression de *CLB2*. La délétion de *FKH1* et *FKH2* retarde la progression dans le cycle cellulaire et induit fortement la croissance filamenteuse. Une souche *Afkh2* présente un petit fuseau mitotique et une migration anormale des noyaux. Ainsi *FKH1* et surtout *FKH2* affectent la migration nucléaire et la structure du fuseau mitotique. La délétion de *STE12* ou *FLO11* n'inhibe pas la filamentation dans une souche *Afkh1Afkh2* Cependant l'hyper-filamentation induite dans cette souche est supprimée en sur-exprimant *CLB2*. Ces résultats suggèrent que le rôle majeur des protéines Fkh1 et Fkh2 est de réduire l'activité kinase Clb2-Cdc28 au cours du cycle cellulaire (Hollenhorst et al., 2000).

Le motif de liaison de Fkh1 est très similaire au motif de liaison du facteur SFF (Swi Five Factor), dont les composantes sont inconnues. Ce motif se trouve en amont d'un groupe de gènes contenant *CLB2* et appelé « groupe *CLB2* ». La transcription de *FKH1* et *FKH2* est induite spécifiquement en phase S. L'expression de *CLB2* ou de *SW15* n'oscille pas dans une souche *Afkh2*, mais elle est très faiblement exprimée constamment durant le cycle cellulaire. D'une façon remarquable ; les protéines Fkh1 et Fkh2 peuvent être activateurs ou inhibiteurs de la transcription du même gène. Ceci est vrai pour la transcription du gène *SW15*. En réponse à la phéromone α , *SW15* n'est pas exprimé dans une souche sauvage mais il est exprimé dans une souche *Afkh1Afkh2*. Les puces à ADN ont montré qu'une souche *Afkh1Afkh2* traitée à la phéromone α présente un profil normal d'expression de la plupart des gènes, excepté ceux du groupe *CLB2* formé de 33 gènes. Parmi eux 20 gènes dont *CLB1* et *CLB2*, ne sont plus régulés au cours du cycle cellulaire et ont perdu l'oscillation de leur expression, en comparaison avec une souche sauvage. L'absence d'oscillation et l'expression faible mais constitutive de *CLB2* ont été observées dans une souche délétée pour les sites SFF du promoteur de *CLB2* (Maher et al., 1995). La transcription du groupe *CLB2* est activée par la kinase Clb2-Cdc28. Le mutant $\Delta fkh1\Delta fkh2$ induit une réduction de l'activité Clb2-Cdc28 et serait à l'origine de l'induction de la filamentation. La sur-expression de *FKH2* dans une souche sauvage inhibe fortement la filamentation. Un triple mutant $\Delta ste12/\Delta fkh1\Delta fkh2$ présente le même phénotype qu'une souche $\Delta fkh1\Delta fkh2$. La sur-expression de *FKH2* dans une souche $\Delta ste12$ n'inhibe pas la filamentation résiduelle. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le facteur de transcription Ste12 réprimerait l'expression de *FKH1/2* qui serait responsable, (quand il est exprimé) de la répression de la filamentation (Zhu et al., 2000).

CHAPITRE 5

Environnement et virulence chez *Candida albicans*

1 *C. albicans* est un pathogène majeur chez l'homme

La levure *S. cerevisiae* est généralement non pathogène. Néanmoins *S. cerevisiae* est à l'origine de quelques cas d'infections mortelles chez des patients transplantés ou immunodéprimés suite à une infection par le HIV ou atteints par un cancer, des vaginites ou des infections oropharyngiques (Bernhardt et al., 2000). Les souches pathogènes sont caractérisées par une capacité à croître à 42°C et à produire des filaments et elles sont résistantes aux agents antifongiques.

Les vaginites provoquées par les levures touchent près de 75 % des femmes à certains stades de leur vie. Près de 12 % souffrent des vaginites récurrentes qui persistent des mois et parfois une année. *C. albicans* est responsable de 90 % des cas (Fidel et Sobel, 1996; Murphy et Kavanagh, 2001). Malgré les thérapies appropriées, la mortalité due aux infections systémiques par *Candida albicans* est proche de 30 % (Gale et al., 1998).

C. albicans est un champignon pathogène très répandu chez l'homme, particulièrement chez les patients immunocompromis. Ce champignon peut coloniser une large gamme de micro-environnements dans l'organisme, y compris les vaisseaux sanguins, les muqueuses superficielles et la majorité des organes internes durant les maladies systémiques. C. albicans est pléiomorphique et subit des transitions morphogéniques réversibles entre les formes de croissance pseudohyphale et hyphale. Un pseudohyphae est formé par un ensemble de cellules attachées et séparées par un septum. Les cellules pseudohyphales terminales donnent naissance à des chlamydospores qui sont des cellules rondes très peu étudiées (Ernst, 2000). Les cellules formant une hyphe sont également attachées, mais ne présentent pas de septum entre les cellules. La forme pseudohyphale est un intermédiaire entre la forme levure (cellule isolée) et la forme hyphale, et il existe des différences claires entre les cycles cellulaires des différentes formes. Une variété de signaux déclenchent la morphogenèse in vitro (au laboratoire). Il est probable que plusieurs réponses à ces signaux reflètent des interactions qui s'établissent entre le champignon et son hôte in vivo. La morphogenèse filamenteuse est une condition nécessaire à la virulence, permettant à C. albicans d'envahir les tissus humains (Kondo et al., 1997). En général la forme levure prédomine durant une colonisation des muqueuses chez un individu normal, mais les formes filamenteuses émergent quand les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies.

Les signaux responsables de la morphogenèse chez *C. albicans* sont souvent liés au stress. Par exemple, des changements simultanés dans la température et le pH activent la filamentation. Plusieurs milieux de culture utilisés pour induire la croissance filamenteuse *in vitro* présentent une carence en azote. Par exemple, le sérum, le plus fort inducteur de la filamentation à 37°C est composé de nutriments très pauvres en azote et en carbone. L'addition de glucose et d'acides aminés au sérum provoque la réversion vers la forme levure. Les signaux produits par l'hôte changent au cours de l'infection en fonction de l'évolution du micro-environnement envahi par les cellules et le temps de progression de l'invasion. Les filaments sont produits au cours des étapes précoces de la colonisation des tissus, cependant la forme levure est observée dans les tissus nécrosés. Les cellules filamenteuses qui poussent dans un sérum *in vitro* réversent vers la forme levure seulement quand les protéines du sérum sont dégradées par les protéinases, ainsi les cellules filamenteuses donnent naissance à la forme levure lorsque les nouveaux tissus infiltrés deviennent nécrosés (Hube et al., 1994).

La compréhension des mécanismes moléculaires de la morphogenèse chez C. albicans est basée sur la très forte conservation au cours de l'évolution des voies de transduction du signal. La majorité des gènes impliqués dans la transduction du signal chez C. albicans ont été isolés en utilisant des cribles génétiques chez la levure S. cerevisiae. Ces cribles exploitent la capacité des gènes de signalisation de C. albicans de complémenter ou de supprimer (Liu et al., 1994) des défauts dans les gènes correspondants de S. cerevisiae. Récemment la séquence complète du génome de C. albicans a permis d'isoler directement les gènes impliqués dans la transduction signal les similitudes du en se basant sur de séquence (http://alces.med.umn.edu/Candida.html). Néanmoins, l'analyse fonctionnelle de ces gènes dépend encore fortement de S. cerevisiae parce que les hiérarchies des régulateurs des phénomènes de transduction sont bien mieux caractérisées dans cette levure.

Au cours des dernières années la fréquence des infections a augmenté considérablement. Les infections opportunistes chez les patients immunodéprimés représentent une cause commune de mortalité et de morbidité en forte augmentation (Fisher et al., 1998). Plusieurs facteurs ont contribué à l'augmentation des infections opportunistes : l'expansion du nombre de malades et/ou des populations atteints par le virus HIV, l'augmentation des naissances prématurées, les traitements prolongés par chimiothérapie et par immunosuppression après transplantation, l'utilisation extensive de la chirurgie, et l'augmentation de l'utilisation des prothèses et cathéters accompagnés par des traitements

avec les corticostéroïdes et les antibiotiques (Walsh et al., 2000).La seconde raison de l'augmentation des infections par *C. albicans* est liée à la mise en œuvre de traitements très peu efficaces, et ceci malgré l'existence de plusieurs produits antifongiques (Lundstrom et Sobel, 2001). En effet, ces médicaments sont souvent toxiques. Les agents antifongiques disponibles actuellement sont peu nombreux et appartiennent à un nombre de classes chimiques limitées. La lenteur des progrès dans la découverte des antifongiques est due au fait que les champignons sont des eucaryotes et les agents qui inhibent la synthèse des protéines, de l'ARN ou de l'ADN possèdent un grand potentiel de toxicité. Un autre problème surgi ces dernières années est l'apparition de résistances aux médicaments antifongiques en clinique. (Boschman et al., 1998). Tous ces aspects ont contribué à donner de l'importance à la recherche sur les infections fongiques. Récemment, un aspect qui a reçu beaucoup d'attention est celui de l'identification des facteurs de virulence qui contribuent à la pathogénicité de ces organismes.

2 *Candida albicans* et la réponse aux variations des conditions environnementales

Les souches sauvages de levures s'adaptent aux variations des conditions de l'environnement pour survivre. La physiologie cellulaire de ces microorganismes est facilement influencée par l'environnement. De nombreux signaux environnementaux activent diverses voies de signalisation dans la cellule induisant une régulation de cibles spécifiques. L'organisme humain possède des propriétés et des éléments favorables à l'expression de la virulence de *C. albicans*. La température corporelle, le sérum, le pH, la teneur en oxygène et la nature de la source de carbone et d'azote de l'organisme sont de régulateurs importants de la morphologie et du cycle cellulaires et en général du pouvoir pathogène de *C. albicans* (Ernst, 2000).

2.1 Effets de la température de l'organisme humain

Les faibles températures inhibent la croissance filamenteuse chez *S. cerevisiae* et *C. albicans* (Résultats et (Ernst, 2000)). La voie AMPc régule la croissance filamenteuse chez *S. cerevisiae* (Gimeno et al., 1992; Mosch et al., 1996) et *C. albicans*. La délétion des deux copies de *CaTPK2* inhibe fortement la croissance hyphale induite par le sérum ou par le milieu Spider seulement à 28°C alors que le mutant $\Delta tpk2$ homozygote présente une morphogénèse hyphale normale à 37°C. Ainsi la température élevée compense l'inactivation

de la voie AMPc chez C. albicans (Sonneborn et al., 2000). Le facteur de transcription EFG1 joue un rôle central dans le développement hyphal chez C. albicans. Un mutant homozygote $\Delta efgl$ ne forme pas d'hyphes en réponse aux inducteurs standards (Lo et al., 1997; Stoldt et al., 1997). Un apport faible d'oxygène induit la croissance filamenteuse chez une souche sauvage et une forte stimulation de la filamentation chez un mutant $\Delta efgl$ homozygote (Sonneborn et al., 1999). La croissance des colonies incrustées dans l'agar induit la filamentation du mutant Aefg1 (Riggle et al., 1999). Ces résultats suggèrent que le facteur de transcription EFG1 n'est pas essentiel à la filamentation induite par l'hypoxie ou l'incrustation des colonies dans l'agar, mais plutôt inhibe ce processus. Ceci suggère l'existence d'une autre voie indépendante d'EFG1 et qui serait activée en réponse à l'hypoxie ou l'incrustation des colonies dans l'agar. La sur-expression du facteur de transcription CZF1 stimule la croissance filamenteuse seulement dans les colonies incrustées dans l'agar. La délétion homozygote du gène EFG1 inhibe la filamentation dans les colonies incrustées dans l'agar seulement à 25°C et non pas à 37°C. Ceci suggère que CZF1 contribue à la filamentation en réponse à l'incrustation des colonies dans l'agar seulement à basses températures (Brown et al., 1999). Il est donc possible sinon probable que la température de 37°C active une autre voie (ou plusieurs) indépendante des facteurs EFG1 et CZF1 qui est essentielle à la croissance filamenteuse dans les souches $\Delta efgl$ et $\Delta czfl$. Ainsi des environnements différents de l'hôte activent des voies distinctes au cours de l'infection ; le sang renferme le sérum, qui est un puissant inducteur de la voie EFG1, le passage à travers les tissus peu oxygénés provoque une hypoxie, comparable à l'incrustation des colonies dans l'agar qui active la voie CZF1, enfin la température de 37°C induit une autre voie essentielle à la filamentation et la virulence, les éléments de cette voie hypothétique sont inconnus. Chez l'homme, il existe une corrélation entre la morphologie et la localisation de C. albicans au cours des infections fongiques. En effet, les cellules de C. albicans ont une forme ronde au cours des infections cutanées, où la température est inférieure à 37°C, alors que les formes filamenteuses sont prédominantes au cours des infections des organes internes où la température de l'organisme est de 37°C (Figure 5.1).



A





2.2 Environnement et sexualité

La levure *C. albicans* était longtemps considérée comme asexuelle. Le génome de *C. albicans* contient les homologues responsables du « mating » et de la méiose chez *S. cerevisiae*. Plusieurs de ces gènes complémentent des mutants stériles de *S. cerevisiae*. Chez les champignons, la reproduction sexuée est conservée et contrôlée par les gènes situés au niveau du locus MAT qui est généralement présent sous forme hétérozygote dans une souche diploïde. Hull et al ont construit des souches diploïdes a/a ura-/ura- et α/α ade-/ade-. Après un séjour de quelques heures dans une souris, des souches tetraploïdes sauvages a/a α/α ont été isolées. La conjugaison ne se produit que seulement entre des souches de sexes opposés. Ces observations suggèrent que *C. albicans* est capable de conjuguer pour former des tétraploïdes qui pourraient passer la méiose et donner des diploïdes. Les signaux qui déclenchent la conjugaison sont produits par l'hôte et sont inconnus (Gow et al., 2000; Hull et al., 2000; Magee et Magee, 2000; Odds et al., 2000).

2.3 Autres facteurs environnementaux

La carence en azote induit une élongation cellulaire en milieu solide et liquide chez *S. cerevisiae* (Miled et al., 2001; Gimeno et al., 1992). La carence en glucose induit la croissance invasive chez l'haploïde (Cullen et Sprague, 2000). La carence en azote ou en glucose induit la croissance filamenteuse chez *C. albicans* (Liu et al., 1994). La carence en azote induit la voie MAPK (Ste20, Ste7 et Kss1) et active le facteur de transcription Ste12 chez *S. cerevisiae*. La voie similaire chez *C. albicans* est composée des kinases Ste11, Hst7 et Cek1 et le facteur de transcription Cph1. Cette voie est essentielle à la croissance hyphale seulement en milieu SLAD et Spider solides, mais elle n'est pas essentielle en milieu liquide par exemple (Leberer et al., 1996). Les souches mutées dans *CST20, HST7* ou *CPH1* ne sont que partiellement avirulentes (Ernst, 2000; Whiteway, 2000) (Figure 5.2).

Chez *S. cerevisiae*, un pH égale 5 est favorable à l'élongation cellulaire en milieu liquide carencé en azote (Miled et al., 2001 et résultats). Chez *C. albicans*, un pH acide inhibe le développement hyphal. Le facteur de transcription *PRR2* induit l'expression des gènes spécifiques à la réponse au pH alcalin et réprime les gènes exprimés spécifiquement en réponse au pH acide (Ramon et al., 1999).

Les mutations dans le facteur général de transcription *TUP1* induit une croissance exclusivement pseudohyphale. Ainsi le facteur *TUP1* maintient la forme levure. Un modèle proposé par Magee suggère que l'expression d'*EFG1* suite à la levée de l'inhibition par le facteur de transcription Rbf1 induit une inhibition de *TUP1* (Magee et Magee, 2000; Braun et Johnson, 1997). La délétion du facteur *RBF1* stimule la croissance pseudohyphale chez *C*. *albicans* (Ishii et al., 1997).

La virulence est seulement atténuée dans un mutant $\Delta efg1$ (Ernst, 2000). La déacétylase *SIR2* contrôle la structure de la chromatine et l'expression génique (Landry et al., 2000). La protéine Rad6 (enzyme d'ubiquitination) intervient dans la protection contre les UV. Les facteurs *SIR2* et *RAD6* sont des répresseurs de la croissance hyphale chez *C. albicans* (Perez-Martin et al., 1999; Leng et al., 2000).



Partie II

Résultats

La répression de l'expression des cyclines B par Xbp1 contribue aux modifications de la morphologie et du cycle cellulaire en réponse à une carence en azote

1 Introduction

L'élongation cellulaire est la caractéristique principale des cellules en croissance pseudohyphale. La croissance polarisée du bourgeon commence au point Start du cycle cellulaire lorsque Cdc28 est activée par Cln1 et Cln2. Cette croissance est inhibée par l'activité kinase Cdc28-Clb1,2 à la fin de la phase S. L'inhibition de l'activité kinase mitotique serait à l'origine de la croissance hyperpolarisée et le retard observé dans la transition métaphase/anaphase dans des cellules sauvages sur-exprimant *PHD1* (Kron et al., 1994). Il existe au moins quatre mécanismes potentiellement responsable de l'inhibition de l'activité Cdc28Clb1/2 :

(1)La production d'un inhibiteur du complexe Cdc28-Clb.

(2)Une phosphorylation inhibitrice sur la tyrosine 19 de Cdc28 par la kinase Swe1.

(3)Une inhibition de l'expression des cyclines B.

(4)Une régulation négative de la phosphorylation activatrice de la thréonine 169 de Cdc28 par Cak1.

Swe1 semble ne pas avoir un rôle important dans l'élongation cellulaire. Les divers cribles génétiques utilisés pour identifier un inhibiteur hypothétique n'ont rien donné. Dans une souche *STE11-4* (hyperfilamenteuse) le niveau d'expression de *CLB2* n'est pas affecté (Ahn et al., 1999).

Nous avons utilisé un Chémostat pour montrer qu'en réponse à une carence en azote l'expression des cyclines mitotiques *CLB1* et *CLB2* sont en moindre quantité qu'en présence d'azote. La diminution de la quantité de *CLB1* et *CLB2* inhibe l'activité kinase des complexes Clb1/2-Cdc28, induisant ainsi un retard en G2 et une élongation cellulaire caractéristiques du développement filamenteux. Ceci résulte de la répression transcriptionnelle des gènes *CLB1* et *CLB2* par la protéine Xbp1. Nous avons découvert que le facteur de transcription *XBP1* est essentiel pour la différenciation filamenteuse et qu'il est fortement induit en réponse à une carence en azote.

2 Résultats

2.1 Les mutants de Cak1 présentent une dérépression de la croissance pseudohyphale

Les bases moléculaires de l'élongation cellulaire et de l'inhibition de la mitose au cours de la croissance pseudohyphale sont inconnues. Les mutants cakl (comme cakl-4) sont déréprimés pour la croissance pseudohyphale à température permissive. On observe le même phénomène dans les mutants cdc28 et les mutants $\Delta clb2$ (Figure 1 de l'article, page 102). Ces résultats montrent qu'une inhibition partielle de l'activité CAK induit la différenciation pseudohyphale. L'inactivation de la voie MAPK par délétion de STE20 ou STE12 ou TEC1, ou l'inactivation de la voie AMPc par délétion de GPA2 ou la sur-expression de PDE2 ou la délétion d'ASH1 ou PHD1 ou RAS2 inhibent fortement la croissance pseudohyphale dans un mutant cak1-4 (Figure 2 de l'article). Ainsi la dérépression de la croissance pseudohyphale dans le mutant cak1-4 dépend des voies de régulation normales de la différenciation pseudohyphale dans une souche sauvage. Un mutant CDC28-43244 porté par un plasmide multicopie inhibe la croissance pseudohyphale dans une souche cak1-4 et dans une souche sauvage sur un milieu solide pauvre en azote (Figure 1 de l'article). Ceci suggère que la déphosphorylation de la thréonine 169 de Cdc28 est nécessaire pour la croissance pseudohyphale. La sur-expression de CDC28 ou de CAK1 à partir d'un promoteur fort, GAL1, n'inhibe pas la filamententation dans une souche sauvage (Figure I.1).



wt

wt GAL-CDC28

wt GAL1-CAK1

Figure I.1 La sur-expression de CDC28 ou CAK1 ne supprime pas la croissance pseudohyphale. Les cellules sont cultivées pendant 1 jour à 28° C.

2.2 Les cultures en Chémostat permettent d'avoir une culture homogène de cellules

Les populations de cellules cultivées sur un milieu carencé en azote sur une boîte sont dans un état physiologique hétérogène ; une proportion très faible de cellules forment des filaments qui pénètrent à l'intérieur de l'agar. Les cellules qui se trouvent à l'intérieur de la colonie seraient plus carencées que les cellules aux frontières de la colonie ou celles qui forment les filaments projetés à l'extérieur de la colonie. Nous avons ensemencé un millier de cellules sur une boîte contenant un milieu carencé en azote et nous avons examiné l'état des cellules après 19, 36 et 72h à 25°C. Après 19h les cellules sont majoritairement bourgeonnantes, avec 4N ADN. Après 36h la majorité des cellules ne forment pas de bourgeon et contiennent 2N ADN. Après 2 jours, très peu de cellules forment des filaments. Les cellules produisant des filaments et qui présentent un cycle cellulaire actif sont minoritaires sur milieu carencé en azote solide (Figure 3A de l'article). Pour surmonter le problème de l'hétérogénéité des populations de cellules en culture sur milieu carencé en azote solide, nous avons choisi d'examiner les cultures cellulaires en chémostat.

Les cellules cultivées en milieu liquide carencé en azote dans un chémostat se trouvent dans un environnement homogène dans lequel le degré de carence en azote est strictement contrôlé et il est facile de préparer des quantités importantes de cellules pour les analyses biochimiques. Les cellules carencées en azote en chémostat sont plus fines et plus allongées comparées aux cellules cultivées en milieu riche. Les filaments ne sont pas observés en milieu carencé en azote en chémostat, mais occasionnellement des groupes de 3 ou 4 cellules sont visibles. Seules les cellules diploïdes carencées en azote sont allongées et filamentent (Gimeno et al., 1992). Nous avons trouvé que les cellules haploïdes ne sont pas allongées au cours de la croissance en milieu carencé en azote en chémostat. L'expression du mutant *CDC28-43244* inhibe l'élongation cellulaire et la filamentation des cellules sauvages en milieu carencé en azote en chémostat et également sur milieu solide (Figure 3C de l'article). Finalement l'expression du gène rapporteur Ty1-*LACZ* régulée par les facteurs de transcription *TEC1-STE12* est induite pendant la croissance filamenteuse et nous avons observé une très forte induction (12 fois) en milieu carencé en azote en chémostat comparée à un milieu riche (Figure 3D de l'article).

2.3 Effet du pH sur l'élongation cellulaire en milieu carencé en azote

Les conditions expérimentales du milieu solide carencé en azote, décrites pour la première fois par Gimeno (Gimeno et al., 1992), ne permettent pas d'avoir des populations cellulaires homogènes sur des boites carencées en azote. Cette hétérogénéité n'a pas été expliquée. Nous n'avons pas pu avoir des cellules allongées en milieu carencé en azote non tamponné en chémostat. Nous avons testé les tampons succinate, phosphate et phtalate et nous avons obtenu des cellules allongées à pH 5 seulement avec le tampon phtalate. A pH inférieur à 2,5 et au-dessus de 7 les cellules cultivées en milieu carencé en azote en chémostat ne s'allongent pas. Ceci montre que le pH optimum pour l'élongation en réponse à une carence en azote est proche de 5. Nous avons aussi observé que les colonies sur milieu tamponné carencé en azote en boîte sont homogènes (Figure I.2).



wt pH2,5 wt pH5

wt pH7

Figure I.2 A pH=2,5 ou à pH=7, les cellules ne sont pas allongées. A pH=5 les cellules sont allongées. Les cellules sont cultivées en chémostat en milieu carencé en azote pendant 2 jours à 25°C.

2.4 Réduction de l'expression des cyclines mitotiques au cours de la croissance en milieu carencé en azote.

Nos analyses par FACS et microscopie montrent que les cellules diploïdes carencées en azote en chémostat possèdent une proportion plus élevée de cellules sans bourgeon avec 2N ADN comparées aux cellules cultivées en milieu riche. Cette accumulation en phase G1 serait le reflet de l'inhibition de la croissance cellulaire et le passage de Start due à la carence en azote. Nous avons aussi comparé la fraction de cellules contenant un simple noyau (cellules en pré-anaphase) et les cellules contenant deux noyaux (cellules en post-anaphase). Les cellules diploïdes en croissance en milieu carencé en azote en chémostat possèdent une proportion plus élevée de cellules en pré-anaphase comparé aux cellules cultivées en milieu riche (Figure 3F de l'article). Ces résultats suggèrent que les cellules carencées en azote en chémostat sont retardées dans la transition métaphase à anaphase après avoir accumulé suffisamment de masse pour passer Start et commencer un nouveau cycle cellulaire.

Les résultats génétiques suggèrent que l'inhibition de l'activité Cdc28-cyclin B est responsable de l'élongation cellulaire et du retard en pré-anaphase observées en condition de carence en azote (Ahn et al., 1999). Nos résultats génétiques semblent indiquer que la déphosphorylation partielle de Cdc28 serait nécessaire à la croissance filamenteuse. C'est pourquoi nous avons examiné l'état de phosphorylation de Cdc28 au cours de la croissance en milieu carencé en azote. Cdc28 est majoritairement phosphorylée sur la thréonine 169 dans les cellules diploïdes cultivées en milieu riche. Cette thréonine est majoritairement déphosphorylée dans un mutant cak1-4 à température permissive et complètement déphosphorylée à la température restrictive de 37°C. Nous avons examiné le taux de phosphorylation de Cdc28 dans des cellules en chémostat à l'équilibre au cours de la croissance en milieu carencé en azote, en milieu carencé en glucose, dans des cellules à la surface des boîtes carencées en azote et dans des cellules en phase stationnaire. Nous avons observé une déphosphorylation partielle de Cdc28 en milieu carencé en glucose en chémostat, cependant Cdc28 est majoritairement phosphorylée sur la thréonine 169 dans des cellules sauvages en milieu carencé en azote en chémostat ou à la surface des boîtes carencées en azote après deux jours ou en phase stationnaire (Figure 4A de l'article). Ainsi la croissance en milieu carencé en azote ou en phase stationnaire n'induisent pas une déphosphorylation de Cdc28 sur la thréonine 169.

Puisque la phosphorylation activatrice de Cdc28 n'est pas réduite au cours de la carence en azote, nous avons examiné le niveau de la protéine Clb2 dans des cellules diploïdes sauvages cultivées en milieu carencé en azote en chémostat et en milieu riche. Le niveau protéique de Clb2 est fortement réduit dans des cellules cultivées en milieu carencé en azote. Au contraire le niveau protéique de Clb2 ne diminue pas dans des cellules haploïdes sauvages cultivées en milieu carencé en azote en chémostat ou dans des cellules diploïdes cultivées en milieu carencé en glucose en chémostat (Figure 4B de l'article). Ces résultats montrent que la diminution du niveau de Clb2 est spécifique au développement des cellules diploïdes en réponse à une carence en azote et ne représentent pas une réponse à une carence non spécifique.

Il a été montré que le niveau de Clb2 ne diminue pas dans un mutant *STE11-4* cultivé en milieu riche comparé au niveau de Clb2 dans une souche sauvage (Ahn et al., 1999). Les cellules *STE11-4* donnent des pseudohyphes sur un milieu riche et ont été proposées comme modèle pour l'étude de la croissance filamenteuse chez les cellules sauvages. Nous avons examiné le niveau de Clb2 dans les cellules *STE11-4* cultivées en milieu carencé en azote en chémostat. Contrairement aux cellules diploïdes sauvages, les cellules *STE11-4* ne présentent pas une diminution du niveau de Clb2 en milieu carencé en azote (Figure 4B de l'article). Ainsi la mutation *STE11-4* empêche la réduction du niveau de Clb2 observé dans les cellules sauvages cultivées en milieu carencé en azote en chémostat. Il semble que le mutant *STE11-4* ne reflète pas la réponse des cellules diploïdes en carence en azote.

2.5 Modification de l'expression génique au cours de la croissance en milieu carencé en azote en chémostat

Nous avons utilisé la RT-PCR quantitative pour déterminer si la chute au niveau protéique de Clb2 dans les cellules sauvages cultivées en milieu carencé en azote en chémostat est corrélée avec une chute du niveau des ARNm *CLB2*. Nous avons aussi déterminer le niveau d'expression d'autres cyclines. Nous avons utilisé le niveau des ARNm du gène *ACT1*, qui est constant au cours de la croissance en milieu carencé en azote en chémostat et en milieu riche, comme standard de normalisation. Le niveau des ARNm de *CLB1,2* et 5 est réduit d'un facteur de 5 à 7 dans les cellules sauvages cultivées en milieu carencé en azote en chémostat comparé au milieu riche en chémostat, cependant le niveau de *CLB3* est inchangé. Le niveau des ARNm de *CLN1,2* (Figure 5 de l'article) et des protéines

Cln1 (Figure I.3) diminuent faiblement en milieu carencé en azote en chémostat, les ARNm de *CLN3* augmentent faiblement.



Figure I.3 Le niveau protéique de Cln1
diminue faiblement en milieu carencé en azote en chémostat
1.wt (milieu riche)
2.wt (milieu carencé en azote en chémostat)
3.Δcln1(milieu riche)

L'expression de *CLB2* est réprimée par le répresseur Xbp1 au cours de la sporulation. L'expression de *XBP1* est induite en réponse aux stress (Mai et Breeden, 2000). Nous avons trouvé que le niveau des ARNm de *XBP1* augmente au moins 8 fois en milieu carencé en azote en chémostat dans des cellules sauvages comparé au milieu riche en chémostat. Xbp1 est nécessaire à la diminution de l'expression des ARNm de *CLB2*. En effet dans un mutant *Axbp1*, les niveaux des protéines et des ARNm de *CLB2* ne diminue pas en milieu carencé en azote en chémostat (Figure 4D de l'article). La réduction de l'expression de *CLB1* et *CLB2* réduit l'activité kinase de Cdc28-Clb1,2, ceci peut expliquer l'élongation cellulaire en milieu carencé en azote. Nous avons aussi trouvé que l'expression du rapporteur Ty1-*LACZ* augmente d'un facteur de 3 dans les mutants $\Delta clb2$, *cak1-4* et *cdc28-6* en milieu riche (Figure 3D de l'article). Cette induction de l'expression de *STE12-TEC1* est bien corrélée avec l'élongation cellulaire et l'augmentation de la filamentation dans ces mutants. Ceci suggère que Cdc28-Clb1,2 peut inhiber le complexe d'activation de la transcription Ste12-Tec1.

2.6 L'expression de Cks1, Cdc37 et Kin28 n'est pas modifiée en réponse à une carence en azote, mais Kin28 est déphosphorylée au cours de la croissance en milieu carencé en glucose en chémostat.

Nous avons montré que le niveau de phosphorylation de Cdc28 est réduit dans des cellules sauvages cultivées en milieu carencé en glucose en chémostat. Ceci suggère que l'activité CAK est réduite dans ces conditions. Nous avons donc analysé l'effet de la carence en glucose sur le niveau de phosphorylation de Kin28 dans une souche sauvage dans les mêmes conditions. Nous avons trouvé que le niveau de phosphorylation de Kin28 est fortement réduit comparé à la souche sauvage (Figure I.4). La déphosphorylation de la thréonine 162 de Kin28 est plus importante que la déphosphorylation de la thréonine 169 de Cdc28 dans les mêmes conditions. Ainsi Kin28 est plus sensible à une réduction de l'activité de Cak1 que Cdc28.



Figure I.4 Kin28HA est majoritairement non phosphorylée dans les cellules diploïdes en milieu carencé en glucose en chémostat.(1) Souche sauvage en YPD (2) Souche sauvage en milieu carencé en azote en chémostat (3) Souche sauvage en milieu carencé en azote sur boîtes (4) Souche sauvage en phase stationnaire (5) Souche sauvage en milieu carencé en glucose en chémostat (6) Souche sauvage en YPD, Kin28 n'a pas de HA.

Au cours de la croissance filamenteuse le profil général de l'expression protéique est modifié comme le montre la figure I.5.



Figure I.5 Profil d'expression protéique de cellules (A) cultivées en milieu riche liquide (YPD) et récoltées à DO=0,6 et (B) en milieu carencé en azote en chémostat à 25°C. M pour marqueur de poids moléculaires.

Cks1 est une petite protéine hautement conservée dont la fonction est très peu définie et qui s'associe au domaine C-terminal des CDKs (Bourne et al., 1996). Des interactions génétiques, physiques et fonctionnelles entre *CKS1*, *CDC28* et le protéasome sont décrites dans la littérature (Kaiser et al., 1999). Cdc37 est une co-chaperonne agissant de concert avec Hsp90. La fonction de Cdc37 est nécessaire à la stabilité de Cak1 (Farrell et Morgan, 2000). Des mutants de *CDC37* sont colétales avec des mutations dans les kinases *CAK1*, *CDC28* et *KIN28* (Faye, communication personnelle). Le niveau d'expression des protéines Cks1, Cdc37 et Kin28 n'est pas modifié en réponse à une carence en azote (Figure I.6).



Figure I.6 Le niveau protéique de Cks1 et de Cdc37ne change pas en milieu carencé en azote en chémostat. Cellules sauvages en (1) milieu riche (2) milieu carencé en azote en chémostat (3) milieu carencé en glucose en chémostat (4) phase stationnaire.

2.7 XBP1 est nécessaire à la croissance pseudohyphale

Nous avons construit une souche diploïde $\Delta xbp1$ et nous avons trouvé qu'elle est inhibée pour la filamentation pseudohyphale en milieu carencé en azote avec le dextrose ou le glycérol comme source de carbone. Les cellules diploïdes $\Delta xbpl$ ne sont pas allongées en milieu carencé en azote en chémostat. La sur-expression de XBP1 à partir d'un promoteur GAL1 stimule la croissance pseudohyphale (Figure 6 de l'article). Ainsi XBP1 est nécessaire à la croissance pseudohyphale dans les cellules diploïdes sauvages. Pour tester si XBP1 est requise pour la répression de *CLB2* au cours de la croissance en milieu carencé en azote, nous avons délété *CLB2* dans une souche $\Delta xbp1$. La délétion de *CLB2* restaure l'élongation et la filamentation cellulaire du mutant $\Delta xbp1$ sur boîte carencée en azote. Ainsi $\Delta clb2$ est largement épistatique sur Axbp1. Ces résultats suggèrent que CLB2 est une cible importante de répression par Xbp1 au cours de la croissance en milieu carencé en azote. Nous avons aussi analysé les interactions génétiques entre XBP1 et la voie MAPK qui régule la différenciation filamenteuse. L'activation constitutive de la voie MAPK par l'expression du mutant dominant STE11-4 restaure la filamentation dans une souche $\Delta xbp1$ en boîte carencée en azote. Au contraire la sur-expression de XBP1 dans les mutants $\Delta stel2$ et $\Delta tec1$ ne restaure pas le défaut de la filamentation (Figure 6 de l'article). Ces résultats montrent que l'activation constitutive de la voie MAPK peut détourner la nécessité de XBP1 dans la croissance filamenteuse, mais la sur-expression de XBP1 ne peut pas détourner la nécessité des facteurs de transcription TEC1 et STE12. Ainsi ces résultats placent la fonction de XBP1 en amont ou en parallèle de la voie MAPK.

3 Discussion

3.1 La répression de l'expression de *CLB2* par Xbp1 est nécessaire à l'élongation cellulaire en réponse à une carence en azote

L'élongation cellulaire est la caractéristique principale de la filamentation. Les mécanismes moléculaires responsables de cette élongation sont inconnus. Ce phénotype peut être expliqué par une absence d'inhibition de la croissance polarisée du bourgeon au cours de la phase G2. Il existe au moins quatre mécanismes potentiellement responsables de l'inactivation des complexes Cdc28-Clb1/2. L'inhibition de Cdc28 par une phosphorylation sur la tyrosine 19 par Swe1, inhibition de Cdc28-Clb1/2 par un inhibiteur du genre Sic1, une diminution de l'expression des cyclines *CLB1/2*, une diminution du niveau de la phosphorylation activatrice de Cdc28 par Cak1. Swe1 n'est pas nécessaire à l'élongation

cellulaire au cours de la croissance filamenteuse (Ahn et al., 1999). On n'a pas de preuves qui suggèrent la présence d'un inhibiteur Cdc28-Clb1/2. Cependant la sur-expression de CLB1 ou CLB2 (Ahn et al., 1999) ou le mutant CDC28-43244 (ce travail) inhibe l'élongation cellulaire et la filamentation en réponse à une carence en azote. La délétion de CLB2 ou l'inactivation partielle de CDC28 ou CAK1 stimule fortement l'élongation cellulaire et la filamentation. Nos résultats génétiques montrent qu'une réduction du niveau de CLB2 ou qu'une inhibition partielle de Cak1 ou Cdc28 pourraient être à l'origine d'une réduction de l'activité mitotique Cdc28-Clb2. Ainsi des analyses biochimiques sur des cellules sauvages sont nécessaires pour déterminer le mode de régulation de l'activité Cdc28-Clb2 au cours de la croissance dans un milieu carencé en azote. Les cellules cultivées sur un milieu solide carencé en azote se trouvent dans un état physiologique hétérogène. Les cellules à l'intérieur de la colonie sont plus carencées que les cellules à la périphérie des colonies ou que les cellules formant des filaments. Seulement quelques cellules à la périphérie et sous les colonies développent des filaments qui pénètrent dans l'agar ou s'étalent sur toute la surface de la boîte de culture après une longue période d'incubation. Nous avons utilisé les cultures en chémostat pour déterminer la voie responsable de l'élongation cellulaire en réponse à une carence en azote dans les cellules sauvages. Cette technique est simple et permet d'obtenir des quantités importantes de cellules homogènes nécessaires aux analyses biochimiques. Les cellules sauvages cultivées en milieu carencé en azote en chémostat sont plus fines et plus allongées que les cellules cultivées en milieu riche en chémostat. Cette élongation cellulaire est spécifique aux cellules diploïdes, en réponse à une carence en azote, et elle est accompagnée par une forte induction de la transcription à partir d'un promoteur dépendant des facteurs STE12-TEC1 spécifiques de la filamentation.

L'élongation cellulaire dépend aussi du pH du milieu de culture. Un pH égale à 5 est nécessaire à l'élongation cellulaire en réponse à une carence en azote en chémostat. L'utilisation des tampons succinate ou phosphate n'a pas permi d'obtenir des cellules allongées en réponse à une carence en azote en chémostat. Il est possible que ces tampons sont métabolisés en carence en azote ce qui inhibe l'élongation cellulaire. Nous avons donc choisi le phtalate parce qu'il n'est pas métabolisé par la cellule. Les cellules cultivées en milieu carencé en azote non tamponné sont à l'origine de l'acidification du milieu de culture qui serait responsable de l'inhibition de l'élongation cellulaire en réponse à une carence en azote. On peut imaginer qu'à pH 5 des senseurs sont activés et transmettent le signal pour activer des gènes spécifiques de l'élongation cellulaire.

3.2 La réduction de la phosphorylation activatrice de Cdc28 est une régulation possible en réponse à une carence en azote

Les conditions de carence en azote que nous avons testées n'ont pas permis d'observer une régulation de la phosphorylation activatrice de Cdc28 au cours de la filamentation en utilisant la technique de séparation des formes non phosphorylée et phosphorylée de Cdc28. Cette technique ne permet pas de distinguer entre une phosphorylation activatrice sur la thréonine 169 réalisée par Cak1 et une phosphorylation inhibitrice sur la tyrosine 19 réalisée par Swe1. En effet nous avons vu que Swe1 pourrait jouer un rôle dans la différenciation filamenteuse (Ahn et al., 1999), c'est pourquoi nous avons vérifié que le profil de migration de Cdc28 sur le gel, que nous avons utilisé, n'est pas modifié dans une souche sauvage cultivée dans un milieu carencé en azote en chémostat et exprimant un mutant *cdc28T169E*, qui n'est pas phosphorylable sur la thréonine 169. Ainsi toutes autres modifications apportées éventuellement sur Cdc28 ne modifient pas le profil de migration de Cdc28 dans ces conditions (Figure I.7).



Figure I.7 Le profil de migration de Cdc28T169E-HA n'est pas modifié dans les cellules diploïdes en milieu carencé en azote en chémostat. (1) Souche sauvage en YPD, Cdc28 n'a pas de HA (2) Souche sauvage en YPD (3) Souche sauvage portant un plasmide contenant un allèle *CDC28T169E* (*CDC28-43244*) en milieu carencé en azote en chémostat (4) Souche sauvage en milieu carencé en azote en chémostat (5) Mutant *cak1-4* (Les souches sont incubées à 25° C).

Nous avons observé une déphosphorylation partielle de Cdc28 sur la thréonine 169 en réponse à une carence en glucose. Le groupe de Sprague a montré que la carence en glucose induit une légère élongation cellulaire au cours de la croissance invasive chez les cellules haploïdes (Cullen et Sprague, 2000). Nous n'avons pas observé de diminution du niveau de *CLB2* au cours de la croissance des cellules haploïdes en milieu carencé en glucose en chémostat. La réduction de la phosphorylation de la thréonine 169 de Cdc28 en réponse à une carence en glucose pourrait expliquer le phénotype observé au cours de la croissance invasive. Il est possible d'envisager que la carence en azote doive être associée à d'autres conditions pour induire une régulation négative de la phosphorylation activatrice de Cdc28 par Cak1 en
réponse à une carence en azote dans une souche diploïde, pour expliquer les résultats génétiques que nous avons trouvé.

3.3 Xbp1 réprime l'expression de CLB2 en réponse à une carence en azote

XBP1 est un facteur de transcription induit en réponse aux stress. Nous avons trouvé que le facteur XBP1 est essentiel à la filamentation. XBP1 est très fortement induit en réponse à une carence en azote. L'induction de XBP1 dans les cellules sauvages cultivées en milieu carencé en azote en chémostat est très rapide (après 2 heures de culture). Les facteurs de transcription STE12 et TEC1 sont essentiels à la croissance filamenteuse. Les sites consensus reconnus par Ste12 et Tec1 sont présents dans le promoteur de XBP1. Ceci suggère que XBP1 pourrait être une cible de la voie MAPK. Les facteurs de transcription FKH1 et FKH2 sont des régulateurs négatifs de la croissance filamenteuse. La délétion des facteurs de transcription FKH1 et FKH2 induit une diminution de l'activité Cdc28-Clb2 (Zhu et al., 2000). Les gènes *FKH1* et *FKH2* renferment plusieurs sites consensus de fixation de Xbp1. Il est possible aussi qu'au cours de la filamentation, Xbp1 réprime l'expression des gènes FKH1 et FKH2 qui serait aussi à l'origine de la réduction de l'activité du complexe Cdc28-Clb2. Remarquablement le promoteur de XBP1 contient plusieurs sites consensus de fixation de FKH1 et FKH2. Ainsi une boucle de retrocontrôle négative serait responsable de l'inhibition de *FKH1* et *FKH2* par Xbp1 au cours de la filamentation et de l'inhibition de *XBP1* par Fkh1 et Fkh2 au cours de la croissance en milieu riche (Figure I.8 Modèle).



Figure I.8 Modèle : En milieu riche *FKH1*,2 répriment l'expression de *XBP1*, par contre en milieu carencé en azote *XBP1* réprime l'expression de *FKH1*,2.

3.4 Kin28 pourrait jouer un rôle mineur au cours de la différenciation filamenteuse, mais elle serait impliquée dans la réponse à une carence en glucose

Nous avons observé une forte réduction de la phosphorylation de la thréonine 162 de Kin28 au cours de la croissance d'une souche sauvage diploïde en milieu carencé en glucose. Cependant Cdc28 est moins fortement déphosphorylée dans les mêmes conditions. Il est possible que Cak1 phosphoryle Cdc28 avec une efficacité plus importante que Kin28. Il est possible aussi qu'en réponse à une carence en glucose, un inhibiteur du genre Far1 mais spécifique à kin28, empêcherait Cak1 de phosphoryler Kin28 et serait à l'origine de la chute du niveau de kin28 phosphorylée. Des tests d'activité de Cak1 dans ces conditions apportera une réponse claire.

Nos résultats génétiques suggèrent que Kin28 pourrait avoir un rôle mineur au cours de la croissance filamenteuse. En effet, nous avons observé une légère élongation cellulaire dans une souche mutante diploïde Σ homozygote *kin28-2*. Les mutations dans le gène *CDC28* induisent aussi une élongation cellulaire et une dérépression de la croissance filamenteuse, cependant les cellules sont moins allongées et filamentent moins, comparées au mutant *cak1-*4. Ceci suggére que l'élongation cellulaire observée chez les mutants *cak1* n'est pas du uniquement à la réduction de l'activité Cdc28-Clb2 et que la réduction de la phosphorylation de la thréonine 162 de Kin28 contribuerait à l'élongation cellulaire des mutants *cak1*. Ainsi l'inhibition de la CAK transmettrait un signal à deux voies parallèles, la voie *CDC28* qui régule le cycle cellulaire et la voie *KIN28* qui régule la transcription.

Nous avons observé aussi que la sur-expression de *CDK7* ou la cycline H dans une souche sauvage stimule fortement la filamentation et induit la formation des blastopores. Nos résultats montrent que la sur-expression de *CDK7* et de la cycline H ne complémente pas une souche *kin28-2* et *ccl1-1* respectivement à température restrictive. Ces résultats suggèrent que la sur-expression de *CDK7* et de la cycline H inhiberait l'activité de Cdc28 et/ou Kin28 et qui aurait pour conséquence une très forte induction de la filamentation, mais ceci n'explique pas l'induction de la différenciation blastoporale. Les mécanismes impliqués dans le développement des blastopores sont inconnus. Il est donc possible que la sur-expression de *CDK7* ou la cycline H induisent une signalisation spécifique à la différenciation blastoporale (Figure I.9).



Figure I.9 La sur-expression de *CDK7* ou de la cycline H stimulent fortement la croissance filamenteuse et la différenciation blastoporale. (A) Une souche sauvage diploïde sur-exprimant *CDK7* ou (B) Cycline H et incubée sur un milieu carencé en azote pendant 3 et 5 jours. Les cellules rondes sont appellées « Blastopores ».

4 Conclusion

Nous avons utilisé un Chémostat pour montrer qu'en réponse à une carence en azote, l'expression des cyclines *CLB1* et *CLB2* est réprimée par le facteur de transcription Xbp1 en réponse à une carence en azote. La diminution de la quantité de *CLB1* et *CLB2* inhibe l'activité kinase des complexes Clb1/2-Cdc28, induisant ainsi un retard en G2 et une élongation cellulaire (Figure I.10) caractéristiques de la différenciation filamenteuse. Nous avons découvert que le facteur de transcription *XBP1* est fortement induit en réponse à une carence en azote et qu'il est essentiel pour la filamentation (Figure I.11).



Figure I.10 Les cellules pseudohyphales sauvages présentent un rétard en G2, comparées aux cellules sauvages sur milieu riche. C'est un point de contrôle qui est responsable de l'élongation cellulaire et de la division synchrone entre cellules mères et filles. Les cellules pseudohyphales en G1 ne peuvent s'engager dans un nouveau cycle cellulaire que lorsqu'elles ont accucmulé suffisament de nutriment, d'où le retard en G1 comparable à la cellule fille des cellules en croissance sur milieu riche.



Figure 1.11 La répression de l'expression des cyclines B par Xb p1 contribue aux modifications de la morphologie et du cycle cellulaire en réponse à une carence en azote. La réduction de la phosphorylation activatrice de Cd c28 est une régulation possible en réponse à une carence en azote. Les deux mécanismes induisent une élongation cellulaire et un retard en G2. X: Forme Levure et ¥; forme pseudohyphale.

Xbp1-Mediated Repression of *CLB* Gene Expression Contributes to the Modifications of Yeast Cell Morphology and Cell Cycle Seen during Nitrogen-Limited Growth

CHAOUKI MILED,^{1,2} CARL MANN,^{2*} AND GÉRARD FAYE^{1*}

Institut Curie d'Orsay, Centre Universitaire, F-91405 Orsay,¹ and Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire, CEA/Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette,² France

Received 9 December 2000/Returned for modification 2 February 2001/Accepted 19 March 2001

Yeast cells undergo morphological transformations in response to diverse environmental signals. One such event, called pseudohyphal differentiation, occurs when diploid yeast cells are partially starved for nitrogen on a solid agar medium. The nitrogen-starved cells elongate, and a small fraction form filaments that penetrate the agar surface. The molecular basis for the changes in cell morphology and cell cycle in response to nitrogen limitation are poorly defined, in part because the heterogeneous growth states of partially starved cells on agar media are not amenable to biochemical analysis. In this work, we used chemostat cultures to study the role of cell cycle regulators with respect to yeast differentiation in response to nitrogen limitation under controlled, homogeneous culture conditions. We found that Clb1, Clb2, and Clb5 cyclin levels are reduced in nitrogen-limited chemostat cultures compared to levels in rich-medium cultures, whereas the Xbp1 transcriptional repressor is highly induced under these conditions. Furthermore, the deletion of *XBP1* prevents the drop in Clb2 levels and inhibits cellular elongation in nitrogen-limited chemostat cultures as well as inhibiting pseudohyphal growth on nitrogen-limited agar media. Deletion of the *CLB2* gene restores an elongated morphology and filamentation to the *xbp1*\Delta mutant in response to nitrogen limitation. Transcriptional activation of the *XBP1* gene and the subsequent repression of *CLB* gene expression are thus key responses of yeast cells to nitrogen limitation.

Many yeast cells in the wild undergo morphological transitions in response to diverse environmental signals. Transitions between yeast and filamentous forms have been implicated in foraging for nutrients, in the avoidance of toxins, and in the infection of plants and animals by fungal pathogens (33, 38). Most laboratory strains of Saccharomyces cerevisiae respond poorly to such environmental stimuli, apparently because early yeast geneticists selected mutants that maintained stable yeastform growth that were easier to cultivate in the laboratory (26). Recent work suggests that more feral yeast strains show morphological differentiation in response to a rich variety of signals. Diploid yeast cells undergo pseudohyphal differentiation in response to limited nitrogen starvation (16), in the presence of alcohols (9, 31), or in the presence of some types of sugars (14, 23, 46). Haploid yeast cells can show invasive growth on a nitrogen-rich agar medium in response to a depletion of fermentable carbon sources (8, 41). The best studied of these morphological transitions is that of diploid yeast cells subjected to a partial nitrogen starvation, in which case the starved cells elongate and are inhibited for entry into anaphase in mitosis (4, 22). On agar media containing limiting nitrogen, a fraction of the cells form pseudohyphal filaments that penetrate the agar surface.

Two major signal transduction pathways involving a mito-

gen-activated protein (MAP) kinase cascade and the cyclic AMP (cAMP)-dependent protein kinase pathway have been implicated in pseudohyphal differentiation (33, 37, 39). These pathways are thought to activate key transcription factors, Ste12-Tec1 (32) and Flo8 (26, 39, 42, 43), that control the expression of genes required for pseudohyphal differentiation. Both transcription factors contribute to the expression of FLO11, a gene encoding a cell surface protein implicated in the adhesion of cells that form pseudohyphal filaments (18, 23, 27, 28). Several other transcription factors, including Phd1 (15), Ash1 (5), and Sok2 (47), also regulate pseudohyphal growth and contribute to the expression of FLO11 (38). In addition, the related transcription factors Fkh1 and Fkh2 may repress some aspects of pseudohyphal growth by promoting the expression of a set of genes in S phase (the *CLB2* cluster) that includes the mitotic cyclin gene CLB2 (19, 40, 48).

Cellular elongation is one of the most evident aspects of nitrogen-limited growth of yeast cells. This elongation is due to a prolonged period of polarized growth to the bud apex (24). Polarized bud growth is initiated at the Start of the cell cycle, when Cdc28 is activated by the G_1 cyclins Cln1 and Cln2 (25), and inactivation of Cln1 and Cln2 inhibits pseudohyphal growth (29). Apical growth in yeast is blocked by the appearance of the Cdc28-Clb1,2 mitotic kinases (25), and it was suggested that an inhibition of this kinase activity explains the hyperpolarized growth and a delay at the metaphase-to-anaphase transition, seen in wild-type cells overexpressing the *PHD1* gene when they were spread on the surface of synthetic low-ammonium dextrose (SLAD) agar plates (22). The mechanism of this inhibition has not yet been elucidated. In this

^{*} Corresponding author. Mailing address for Carl Mann: SBGM-Bât. 142, CEA/Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France. Phone: 33-1 69 08 34 32. Fax: 33-1 69 08 47 12. E-mail: mann@jonas.saclay.cea .fr. Mailing address for Gérard Faye: Institut Curie d'Orsay, Centre Universitaire-Bât. 110, F-91405 Orsay, France. Phone: 33-1 69 86 30 29. Fax: 33-1 69 86 94 29. E-mail: faye@curie.u-psud.fr.

TABLE 1. Yeast strains^a

Strain	Genotype	Source
CSY1000	MATa leu2::hisG ura3-52	G. Fink
CSY1004	MATa leu2::hisG ura3-52 ras2::KANMX4	This study
CSY2003	MATa/a leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 civ1-4/civ1-4	This study
CSY2027	MATa/α leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 gpa2::KANMX4/gpa2::KANMX4	This study
CSY2029	MATa/α leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 ash1::KANMX4/ash1::KANMX4	This study
CSY2032	MATa/a leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 ash1::KANMX4/ash1::KANMX4 civ1-4/civ1-4	This study
CSY2034	MATa/a leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 gpa2::KANMX4/gpa2::KANMX4 civ1-4/civ1-4	This study
CSY2068	$MATa/\alpha$ ste20 Δ /ste20 Δ ura $\overline{3}$ -52/ura $\overline{3}$ -52 civ1-4/civ1-4	This study
CSY2069	MAT a / α ste12 Δ /ste12 Δ ura3-52/ura3-52 civ1-4/civ1-4	This study
CSY2124	MATa/a leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 xbp1::KANMX4/xbp1::KANMX4	This study
CSY2030	MATa/a leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 phd1::KANMX4/phd1::KANMX4	This study
CSY2033	MATa/a leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 phd1::KANMX4phd1::KANMX4 civ1-4/civ1-4	This study
CSY2125	MATa/a leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 tec1::KANMX4/tec1::KANMX4	This study
CSY2028	MATa/a leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 ras2::KANMX4/ras2::KANMX4	This study
CSY2031	MATa/a leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 ras2::KANMX4/ras2::KANMX4 civ1-4civ1-4	This study
CSY2123	MATa/a leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52	This study
CSY2126	MAT a /a leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 cdc28-6/cdc28-6	This study
CSY2127	MATa/a leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 clb2::KANMX4/clb2::KANMX4	This study
CSY2128	MATa/a leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 STE11-4-(URA3)/STE11-4-(URA3)	This study
CSY2222	MATa/α leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 xbp1::KANMX4/xbp1::KANMX4 clb2::KANMX4/clb2::KANMX4	This study
CSY2223	MATa/α leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 xbp1::KANMX4/xbp1::KANMX4 STE11-4-(URA3)/ STE11-4-(URA3)	This study
HLY952	$MATa/\alpha$ ste $12\Delta/ste12\Delta$ ura $3-52/ura3-52$	G. Fink
HLY492	$MAT\mathbf{a}/\alpha$ ste20 Δ /ste20 Δ ura3-52/ura3-52	G. Fink

^{*a*} All strains are congenic with Σ 1278b.

work, we used chemostats to study the regulation of Cdc28-Clb kinases in wild-type cells during nitrogen-limited growth.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and low-ammonium agar media. The yeast strains used in this work are listed in Table 1. PCR-based deletion of coding sequences with the KANMX4 cassette was performed as previously described (30) for MATa and $MAT\alpha$ haploid strains of the Σ 1278b background. Homozygous diploid strains were then produced by mating. The civ1-4 (45) and cdc28-6 mutant genes were introduced into the Σ 1278b background by cloning the mutant genes into the pRS306 (URA3) integrative vector and targeting the mutant genes to their corresponding chromosomal loci by digesting with a restriction enzyme that cuts once within the promoter region of the gene and transforming MATa ura3 and *MAT* α *ura3* haploid strains of the Σ 1278b background. Ura⁺ transformants were then streaked on 5-fluoro-orotic acid (5-FOA) plates at 24°C in order to select for excision of the integrated plasmid (2). Ura- colonies growing on the 5-FOA plates were then replica plated on yeast extract-peptone-dextrose (YPD) plates at 37°C to screen for those excision events that retained the civ1-4 and cdc28-6 thermosensitive mutations. The resulting haploid strains were then mated to generate homozygous diploid strains. Homozygous diploid civ1-4 ste20 Δ and civ1-4 ste12\Delta strains were constructed by integrating one copy of pRS306-civ1-4 into CSY2067 and CSY2066, followed by selection for plasmid excision on 5-FOA plates and, finally, retransformation with pRS306-civ1-4 and a second round of plasmid excision at 24°C on 5-FOA plates. The doubly transformed strains were then replica plated at 37°C to test for the replacement of both copies of the wild-type gene by the civ1-4 mutation.

SLAD agar medium was prepared as previously described (16). A low-ammonium glycerol medium (SLAYP) supported pseudohyphal growth of wild-type cells but not *xbp1* mutants (see Fig. 6). SLAYP was composed of 1.7 g of yeast nitrogen base (YNB) without amino acids and without ammonium sulfate (Difco) per liter, 50 mM sodium phthalate (pH 5), 25 mg of ammonium sulfate per liter, 3% glycerol, and 2% agar.

Plasmids. A SacI-HindIII XBP1 fragment (-1995 bp 5' of the ATG start codon and 187 bp downstream from the TAA stop codon) was prepared by PCR and inserted into the corresponding sites of the pRS416 (*CEN-URA3*) vector. A SacI-HindIII fragment beginning with the ATG start codon of XBP1 and ending 187 bp downstream of the TAA stop codon was prepared by PCR and cloned into the corresponding sites of the pYES2 (2µm URA3-pGAL) vector in order to place XBP1 under the control of the GAL promoter in a multicopy vector. The

CDC28-43244 gene was isolated from pSF19-CDC28-43244 (7) by partial digestion with XhoI and XbaI and inserted into the YEplac195 (2µm URA3) vector. The pFG(TyA)::*lacZ-LEU2* reporter construct was a gift from Gerry Fink, the STE11-4 gene was a gift from George Sprague, and pGR103 (2µm URA3-PDE2) was a gift from Georges Renault and Michel Jacquet.

Chemostat cultures. Chemostat cultures were performed at 25°C in a simple, custom-made 1-liter glass vessel (see Fig. 3B) and using general conditions that were outlined previously (4). Fresh medium was delivered from the reservoir to the culture vessel with a peristaltic pump at a flow rate of 100 ml/h. For nitrogen limitation studies, cells were cultured in a filter-sterilized, synthetic, low-ammonium phthalate medium (SLAP) composed of 1.7 g of YNB per liter without ammonium sulfate and without amino acids (Difco), 50 mM sodium phthalate (pH 5.0), 100 mg of ammonium sulfate per liter, and 30 g of dextrose per liter. Sodium phthalate is a nonmetabolizable pH buffer. Cells grown in rich-medium chemostats were cultivated in SLAP containing 5 g of ammonium sulfate per liter. Cells grown in glucose-limited chemostats were cultivated in medium containing 6.7 g of YNB without amino acids (Difco) per liter, 50 mM sodium phthalate (pH 5), and 0.5% glucose. In order to ensure equilibrium conditions in the chemostat, cells were cultivated for 40 to 45 h before harvesting for biochemical analyses, although similar results were obtained when cells were cultivated for as little as 20 h

Electrophoretic separation of nonphosphorylated Cdc28 from phospo-Thr-169 Cdc28. Conditions allowing the electrophoretic separation of Cdc28 phosphorylated on Thr-169 from unphosphorylated Cdc28 were adopted from those of Espinoza et al. (13). Cell extract (30 µg) was electrophoresed in thin (0.75mm) 24-cm-long Laemmli 12.5% polyacrylamide gels (acryl-bis, 30:0.8 or 29:1) for at least 15 h at 15 mA and 200 V with constant amperage. Acrylamide and bis-acrylamide were from Sigma, and ammonium persulfate and TEMED (N.N.N',N'-tetramethylethylenediamine) were from Bio-Rad. After electrophoretic transfer to 0.22-mm nitrocellulose membranes, Cdc28 was detected with rabbit polyclonal antibodies or, in the case of Cdc28-hemagglutinin, with mouse 12CA5 antihemagglutinin ascites fluid as the primary antibody and alkaline phosphatase-coupled anti-rabbit or anti-mouse antibodies as the secondary antibody. Bands were then revealed with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphatenitroblue tetrazolium colorimetric reagents, leading to a purple precipitate directly on the transfer membrane. Colorimetric detection yields bands that are finer than those obtained by chemiluminescence, although the colorimetric detection is less sensitive. The Cdc28 signal can be increased by immunoprecipitating from larger quantities of yeast protein extract, although we did not need to do so for the Western blot shown in Fig. 4.



FIG. 1. Partial inactivation of Cak1 stimulates pseudohyphal growth, whereas expression of a Cak1-independent form of Cdc28 represses pseudohyphal growth. Wild-type (CSY2123), *civ1-4* (CSY2003), *cdc28-6* (CSY2126), and *clb2*Δ (CSY2127) strains containing the YEplac195 vector and wild-type and *civ1-4* strains containing YEplac195-*CDC28-43244*, encoding a Cak1-independent form of Cdc28, were cultivated on SLAD plates for 20 h or 3 days at 25°C. The colonies at 20 h are shown at a higher magnification than the colonies photographed after 3 days of growth.

Quantitative RT-PCR. Quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR) was performed as described by Godon et al. (17). cDNAs were synthesized from 1 µg of total RNA using primers specific for each mRNA. PCR amplification with [³²P]dCTP was performed for 15 cycles for *ACT1* mRNA and 25 cycles for the remaining mRNAs using the following primers: *CLB1* (CCAGTCTAGGACGT TAGCGAAGTT and AGTAATTGGCAAACGGGATA), *CLB2* (CAGTCTC GAACTCTTGCCAAATTC and AGCCCATTGGACGGAAATTATAGA), *CLB3* (GAACGGCTTAGAATTTGAATTG and TAATGCTATCCACTTCG CTACGAT), *CLB5* (CATCGCACAACTATTTACTCGACA and ACATTGC CATTGCGCTTACGGTAG), *XBP1* (AGAGGTGACAGCGTTTCCACTAGC and GTAAGACTGGCAAATAAGGTCCC), and *ACT1* (TTGGATTCCGGT GATGGTGTACT and TGAAGAAGATTGAGCAGCGTTTG). ³²P-labeled PCR products were then separated by polyacrylamide gel electrophoresis and quantified with a PhosphorImager (Molecular Dynamics).

Microscopy and flow cytometry. Cells were visualized with a Zeiss Axiophot microscope fitted with a charge-coupled device camera for image acquisition. Cells were prepared for flow cytometry as previously described (36) and analyzed on a Becton Dickinson FACSCalibur.

RESULTS

Cak1 mutants show derepressed pseudohyphal growth. The molecular basis for yeast cell elongation and the inhibition of mitosis during pseudohyphal growth on nitrogen-limited media is unknown (22). We noticed that strains expressing mutations of the yeast Cdk-activating kinase (cak1/civ1) such as civ1-4 (45) show a derepressed pseudohyphal growth at the permissive temperature of 25°C similar to that seen with a $clb2\Delta$

mutant or with certain *cdc28* mutants (Fig. 1) (1, 10). This result indicates that partial inhibition of CAK activity can stimulate pseudohyphal growth. Several regulatory pathways are required for pseudohyphal differentiation in the wild-type strain (33). These include a MAP kinase and a cAMP kinase pathway (37, 39, 43) and a transcription factor called Ash1 (5). Inactivation of the MAP kinase pathway with *ste20* or *ste12* mutants or inactivation of the cAMP pathway with a *gpa2* mutant or through the overexpression of the cAMP phosphodiesterase Pde2, or deletion of the *ASH1* gene, all eliminated or severely inhibited pseudohyphal growth in the *civ1-4* mutant (Fig. 2). The derepressed pseudohyphal growth of the *civ1-4* mutant thus depends on the normal regulatory pathways that are required for pseudohyphal growth in the wild-type strain.

Cak1 phosphorylates Cdc28 on Thr-169 (12, 20, 45). This phosphorylation is required for Cdc28 kinase activity. Partial inactivation of Cak1 leads to reduced activating phosphorylation of Cdc28 and a decrease in Cdc28 protein kinase activity. Cross and Levine isolated multiply mutated forms of Cdc28 that no longer require Cak1 phosphorylation for its activity (6, 7). One such mutant, Cdc28-43244, was introduced into the wild type and the *civ1-4* mutant on a multicopy plasmid in order to test its effect on pseudohyphal growth. Strikingly, Cdc28-43244 strongly inhibited pseudohyphal growth of both



FIG. 2. The derepressed pseudohyphal growth of *civ1-4* (CSY2003) mutants requires the function of the *STE* MAP kinase pathway, the cAMP pathway, and the Ash1 transcription factor, as for the pseudohyphal growth of wild-type cells. Cells with the $2\mu m$ *PDE2* construct overexpress the *PDE2* gene on a multicopy plasmid. Colonies are shown after 3 days of growth on SLAD plates at 25°C. Colonies are shown at the same magnification.

the wild type and the *civ1-4* mutant on a low-nitrogen (SLAD) agar medium (Fig. 1). This result suggested that dephosphorylation of Cdc28 might be required for pseudohyphal growth.

Chemostat cultures provide homogeneous nitrogen-limited growth for biochemical investigations. Cells grown on nitrogen-limited agar media are in heterogeneous physiological states; although most cells are elongated relative to cells grown in rich media, only a small percentage of cells form pseudohyphal filaments that penetrate the agar surface (Fig. 1). Furthermore, cells that are at the interior of colonies will be more starved than cells that are at the edge of the colonies or that are in filaments projecting from the colonies. We examined the DNA content of wild-type diploid yeast cells growing on nitrogen-limited SLAD agar medium (Fig. 3A). Approximately 1,000 cells were spread on the surfaces of SLAD plates and incubated for 19, 36, or 72 h at 25°C. Cells were then scraped from the surface, and their DNA content was analyzed by flow cytometry. Cells grown for 19 h on SLAD plates were mainly budded with a 4N DNA content, but by 36 h of culture most cells accumulated in the unbudded state with a 2N DNA content. Infrequent filament formation became visible on these plates after about 2 days of culture. The accumulation of unbudded 2N cells after 36 h of growth on the SLAD plates can be accounted for by the nitrogen starvation experienced by most of the cells. The cycling cells that generate the pseudohyphal filaments represent only a small percentage of the total number of cells on the SLAD plates.

In order to overcome the problems inherent in the analysis of heterogeneous cell populations on agar media, we chose to examine chemostat cultures (Fig. 3B) as a source of nitrogenlimited cells (4). Cells growing in liquid chemostat cultures are in a homogeneous environment in which the degree of nitrogen starvation is precisely controlled, and it is easy to prepare large quantities of biomass for biochemical characterization. As observed for cells grown on nitrogen-limited agar media, yeast cells grown in nitrogen-limited chemostat cultures are elongated compared to cells grown in rich media (Fig. 3C). Extended filaments of cells were not found in the chemostats, but occasional clusters of three or four cells were observed. Cell elongation and pseudohyphal filamentation on nitrogenlimited SLAD plates requires the diploid cell state (16), and we found that haploid cells were not highly elongated during growth in nitrogen-limited chemostats (Fig. 3C). Expression of the Cak1-independent Cdc28-43244 mutant prevented cellular elongation of wild-type diploid cells in nitrogen-limited chemostats (Fig. 3C), as it did for cells on the surfaces of SLAD plates (Fig. 1 and data not shown). Finally, expression of a Ty1-lacZ reporter construct by the Ste12-Tec1 transcription factor is increased during pseudohyphal growth (32), and we found that there was a strong 12-fold induction of Ty1-lacZ expression for cells grown in nitrogen-limited chemostat cultures compared to rich media (Fig. 3D). These results show that nitrogen-limited growth in a chemostat shares many characteristics of nitrogen-limited growth on agar media.

Flow cytometry and microscopic analysis showed that diploid cells grown in nitrogen-limited chemostats had an increased proportion of unbudded cells with a 2N DNA content compared to cells grown in rich media (Fig. 3E and F). This G_1 -phase accumulation may reflect an inhibition of cell growth and the passage of Start due to the partial nitrogen starvation. We also compared the fraction of budded cells containing a single nucleus (pre-anaphase cells) versus those containing two nuclei (post-anaphase cells). Cells grown in nitrogen-limited chemostats had an increased proportion of pre-anaphase cells compared to those grown in rich media (Fig. 3F). This result suggests that cells in nitrogen-limited chemostats are delayed at the metaphase-to-anaphase transition after having accumulated sufficient mass to pass Start and enter a new cell cycle.

Cdc28 is not dephosphorylated during nitrogen-limited growth in chemostats or on agar plates, but mitotic cyclin levels are reduced. Genetic results suggest that inhibition of Cdc28-cyclin B activity is responsible for the cell elongation and the pre-anaphase delay observed in cells growing in nitrogen-limited conditions (21, 22). Given our genetic results suggesting that partial dephosphorylation of Cdc28 might be re-



FIG. 3. (A) The vast majority of wild-type cells accumulate with a G_1 -phase 2N DNA content after 36 h of growth on SLAD plates. (B) Schematic diagram of the chemostat used in this work. (C) Morphology of cells grown in chemostats. Wild-type diploid cells (CSY2123) in nitrogen-limited chemostats (-N) are elongated compared to those in rich medium. Wild-type haploid (CSY1000) cells do not elongate in response to the nitrogen limitation, and cellular elongation is blocked in diploid cells by the expression of Cdc28-43244, a Cak1-independent form of Cdc28. (D) Transcription of the Ste12-Tec1 Ty1-*lacZ* reporter construct [pFG(TyA)::*lacZ-LEU2*] is highly induced in wild-type (wt) cells grown in nitrogen-limited chemostats compared to that in rich medium. Ty1-*lacZ* transcription is also induced at lower levels in *civ1-4* (CSY2003), *cdc28-6* (CSY2126), and *clb2*Δ (CSY2127) mutants grown in a rich medium at 25°C. (E) Wild-type diploid cells (CSY2123) grown in nitrogen-limited chemostats contain a higher proportion of pre-anaphase to post-anaphase mitotic cells than do the same cells grown in a rich-medium chemostat.

quired for filamentous growth, we examined whether phosphorylation of Cdc28 is altered during nitrogen-limited growth of wild-type cells. Under appropriate electrophoretic conditions, Cdc28 phosphorylated by Cak1 on Thr-169 migrates slightly faster than unmodified Cdc28 (13). Cdc28 was mainly phosphorylated on Thr-169 in wild-type cells growing in rich media, whereas it was mainly dephosphorylated in the civ1-4 mutant at the permissive temperature of 24°C and totally dephosphorylated in this mutant at the restrictive temperature of 37°C (Fig. 4A). We then examined the level of Cdc28 phosphorylation in cells growing at equilibrium in chemostats under nitrogen-limited or glucose-limited growth conditions, in cells on the surfaces of SLAD plates, and in cells in stationary phase in rich medium (YPD) batch cultures. A slight dephosphorylation of Cdc28 was observed in glucose-limited chemostat cultures, but Cdc28 was mainly in the Thr-169phosphorylated form in cells grown in nitrogen-limited chemostats or on the surfaces of nitrogen-limited SLAD plates after 2 days of growth or in stationary-phase cells in batch cultures (Fig. 4A). Thus, growth in nitrogen-limited media and growth to stationary phase in rich media do not induce dephosphorylation of Cdc28 on Thr-169.

Since activating phosphorylation of Cdc28 was not reduced during nitrogen limitation, we decided to examine the levels of Clb2 protein in wild-type diploid cells grown in nitrogen-limited chemostats and rich media. Clb2 protein levels were greatly reduced in extracts from diploid cells growing in nitrogen-limited chemostats, as determined by immunoblotting with anti-Clb2 antibodies (Fig. 4B). In striking contrast, Clb2 protein levels were not decreased in wild-type haploid cells growing in nitrogen-limited chemostats (Fig. 4C) or in diploid wildtype cells growing in glucose-limited chemostats (data not shown). These results show that the decrease in Clb2 levels is a diploid-specific developmental response to the partial nitrogen starvation and does not represent a nonspecific starvation response.

It was previously reported that Clb2 levels are not diminished in STE11-4 mutant cells grown in a rich medium compared to levels in wild-type cells (1). Ste11-4 is a constitutively active form of the MEK kinase that is thought to be turned on during pseudohyphal growth (41, 44). STE11-4 cells show a pseudohyphal phenotype even when they are grown in rich media, and these cells have been proposed as a model for studying filamentous growth in wild-type cells (1). We examined Clb2 levels in a STE11-4 mutant grown under nitrogen limitation in a chemostat. In striking contrast to the wild-type diploid cells, the STE11-4 mutant did not show reduced levels of Clb2 during nitrogen-limited growth (Fig. 4B). The STE11-4 mutation thus prevents a reduction of Clb2 levels that is observed in the wild-type diploid strain during continuous nitrogen-limited growth in a chemostat. We thus feel that the STE11-4 mutant does not accurately reflect the response of wild-type diploid cells to nitrogen limitation, although it may be a valid model for other types of filamentous growth (8, 9, 23, 31, 46).

Modification of gene expression during nitrogen-limited growth in chemostats. We used quantitative RT-PCR to determine whether the drop in Clb2 protein levels during nitrogen-limited growth was correlated with a drop in *CLB2* mRNA levels, and to monitor the transcriptional response of a series



FIG. 4. (A) Cdc28 is mainly phosphorylated on Thr-169 in cells grown under nitrogen limitation. Thr-169-phosphorylated and nonphosphorylated forms of Cdc28 were electrophoretically separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Protein extracts were prepared from the following strains: the wild type (CSY2123) in rich medium at 25°C (lane 1), the civ1-4 mutant (CSY2003) in rich medium at the restrictive temperature of 37°C (lane 2), the wild type in a nitrogen-limited chemostat at 25°C (lane 3), the civ1-4 mutant (CSY2003) in rich medium at 25°C (lane 4), the wild type (CSY2123) scraped from the surface of nitrogen-limited SLAD plates after 2 days of incubation at 25°C (lane 5), the wild type (CSY2123) grown in a glucose-limited chemostat at 25°C (lane 6), and the wild type (CSY2123) in stationary phase in YPD (lane 7). (B) Clb2 protein levels are significantly reduced in wild-type diploid cells (CSY2123), but not in STE11-4 diploid cells (CSY2128), grown in nitrogen-limited chemostats. Clb2 and hexokinase protein levels in whole-cell protein extracts were determined by immunoblotting for the following strains: the wild-type diploid (CSY2123) grown in a nitrogenlimited chemostat (lane 1), the wild-type diploid (CSY2123) grown in a rich medium (lane 2), a $clb2\Delta$ strain (CSY2127) grown in a rich medium (lane 3), a STE11-4 diploid (CSY2128) grown in a nitrogenlimited chemostat (lane 4), and a STE11-4 diploid (CSY2128) grown in a rich medium (lane 5). (C) The wild-type haploid strain (CSY1000) grown in a nitrogen-limited chemostat (lane 2) does not have reduced levels of Clb2p compared to the same strain grown in a rich medium (lane 1). Lane 3 contains a protein extract from a $clb2\Delta$ mutant (CSY2127) grown in a rich medium. (D) A homozygous diploid $xbp1\Delta$ mutant (CSY2124) has no less Clb2p when grown in a nitrogen-limited chemostat (lane 2) than when grown in a rich medium (lane 1).



FIG. 5. Quantitative RT-PCR of *CLB*, *CLN*, *XBP1*, and *ACT1* mRNA levels in wild-type (wt) diploid cells (CSY2123) grown in rich-medium and nitrogen-limited chemostats. *CLB1*, *CLB2*, and *CLB5* mRNA levels are decreased, *CLB3* and *ACT1* mRNA levels are constant, *CLN1* and *CLN2* mRNA levels are slightly decreased, *CLN3* mRNA levels are slightly increased, and *XBP1* mRNA levels are increased eightfold in nitrogen-limited chemostats compared to rich-medium chemostats. The decrease in *CLB2* mRNA levels is blocked in a homozygous diploid *xbp1* mutant (CSY2124) grown in a nitrogen-limited chemostat.

of cyclin genes (Fig. 5). ACT1 mRNA levels were unchanged in nitrogen-limited and rich-medium cultures, and they were thus used as a normalization standard. *CLB1*, *CLB2*, and *CLB5* mRNA levels were reduced five- to sevenfold in wild-type cells grown in nitrogen-limited chemostats compared to rich-medium chemostats, whereas *CLB3* levels were unchanged. We also examined the mRNA levels for the *CLN1*, *CLN2*, and *CLN3* G₁ cyclin genes. The *CLN1* and *CLN2* mRNA levels showed a modest decline during growth in nitrogen-limited chemostats, whereas the *CLN3* mRNA was slightly increased (Fig. 5).

XBP1 codes for a repressor of CLN1 and CLB2 expression during sporulation, and XBP1 expression is induced by diverse stresses (34, 35). We found that XBP1 mRNA levels were increased eightfold in nitrogen-limited chemostats compared to rich-medium chemostats. Xbp1 is required for some of the transcriptional modifications observed during nitrogen-limited growth in chemostats, since the decreases in CLB2 mRNA (Fig. 5) and Clb2 protein (Fig. 4D) were abolished in an xbp1 Δ mutant grown in a nitrogen-limited chemostat. The absence of significant *CLN1* repression in the presence of eightfold-elevated *XBP1* mRNA is not exceptional; a similar result was reported for cells treated with diamide (35). Reduced *CLB1,2* expression will limit Cdc28-Clb1,2 kinase activity, which in turn could explain the elongated cell morphology of cells grown in nitrogen-limited media. Furthermore, we found that Ty1-*lacZ* activity was increased threefold in *clb2* Δ , *civ1-4*, and *cdc28-6* mutants grown in rich medium compared to the wild-type strain (Fig. 3D). This stimulation of the expression of a Ste12-Tec1 reporter gene correlates well with the enhanced pseudohyphal growth shown by these mutants (Fig. 1) and suggests that Cdc28-Clb2 can inhibit the Ste12-Tec1 transcriptional activation complex.

XBP1 is required for pseudohyphal growth. We made an $xbp1\Delta$ homozygous diploid strain and found that it was inhibited for pseudohyphal filament formation on low-ammonium dextrose (SLAD) and glycerol (SLAYP) agar media (Fig. 6C through F). Moreover, individual $xbp1\Delta$ cells did not show the characteristic elongated cell shape exhibited by wild-type diploid cells on nitrogen-limited media (Fig. 6A through D). Fi-



N stel2 A P tecla

FIG. 6. Homozygous diploid xbp1 mutant cells (CSY2124) are inhibited for cellular elongation in nitrogen-limited chemostats (A and B) or after 20 h of growth on SLAD plates (C and D). Deletion of XBP1 completely blocks filament formation of the wild-type strain (CSY2123) on SLAYP plates, even after 5 days of growth at 30°C (E and F). Overexpression of XBP1 from the GAL promoter stimulates filamentation on plates containing synthetic low-ammonium medium with 2% galactose compared to the same strain expressing XBP1 from its normal promoter on a centromeric plasmid (G and H). Cells in panels A and B are shown at a higher magnification than cells in panels C through H. (I through P) Colonies of cells of the indicated genotypes after growth for 3 days (I, J, M, N, O, and P) or 7 days (K and L) on SLAD plates at 30°C.

nally, overexpression of XBP1 from the GAL promoter stimulated pseudohyphal growth (Fig. 6G and H). Thus, XBP1 is required for normal pseudohyphal differentiation. We next deleted the CLB2 gene in an $xbp1\Delta$ mutant in order to test the importance of CLB2 as a target of Xbp1-mediated repression during nitrogen-limited growth. Deletion of CLB2 largely restored elongated cell growth and filamentation to an $xbp1\Delta$ mutant on a nitrogen-limited SLAD agar medium (Fig. 6I, compare with Fig. 6C and J). $clb2\Delta$ was thus largely epistatic to

L

STE11-4

 $xbp1\Delta$. These results suggest that CLB2 is an important repression target of Xbp1 during nitrogen-limited growth.

We also attempted to place XBP1 action with regard to the MAP kinase pathway regulating pseudohyphal growth by genetic epistasis experiments. Constitutive activation of the MAP kinase pathway through the expression of STE11-4 restored filamentous growth to the $xbp1\Delta$ mutant on nitrogen-limited SLAD plates (Fig. 6K and L). In contrast, XBP1 overexpression from the GAL promoter did not suppress the filamentation defect of $ste12\Delta$ and $tec1\Delta$ mutants (Fig. 6M through P). These results show that constitutive activation of the MAP kinase cascade by the *STE11-4* mutation can bypass the requirement for Xbp1 in pseudohyphal growth, but overexpression of *XBP1* cannot bypass the requirement for the Ste12 and Tec1 transcription factors. These results thus place *XBP1* function upstream of or in parallel to the MAP kinase cascade and Ste12-Tec1 transcription factor function.

DISCUSSION

Xbp1-mediated repression of CLB2 expression can explain the elongated phenotype of wild-type yeast cells under nitrogen-limited growth conditions. Cellular elongation is one of the most evident phenotypes associated with the growth of wild-type diploid yeast cells in nitrogen-limited media (4, 16, 21, 22). This phenotype can be explained by a delayed or inefficient repression of polarized growth to the bud tip by Cdc28-Clb1,2 protein kinases (24, 25). There are four known mechanisms that could potentially account for Cdc28-Clb1,2 protein kinase inhibition: Swe1 inhibitory phosphorylation of Cdc28 Tyr-19 (3), inhibition of Cdk-Clb1,2 activity by a Cdk inhibitor such as Sic1 (1), a decrease in Clb1,2 protein levels, and a decrease in Cak1 activating phosphorylation of Cdc28. Although Swe1 inhibition of Cdc28 may contribute to filamentous growth in certain circumstances (10), it is not required for cellular elongation during nitrogen-limited growth (1, 22), and no clear evidence has yet been found for the role of a Cdk inhibitor in filamentous growth. In contrast, overexpression of CLB2 (1, 10, 22) and expression of a Cak1-independent form of Cdc28 (this paper) both block cellular elongation and pseudohyphal growth in response to a nitrogen starvation. Moreover, deletion of CLB2 or partial inactivation of Cak1 stimulates cellular elongation and pseudohyphal growth. Thus, the genetic analyses suggest that reduced Clb2 levels or reduced activating phosphorylation of Cdc28 could be responsible for inhibition of Cdc28-Clb2 kinase activity during nitrogen-limited growth. Unfortunately, the genetic analyses do not indicate which of these pathways are actually used by wild-type diploid yeast cells during pseudohyphal growth. Thus, direct biochemical analysis of wild-type cells during pseudohyphal growth is required to determine which regulatory pathways are really employed during this growth state. However, the heterogeneous physiological states of wild-type cells undergoing pseudohyphal differentiation on nitrogen-limited agar media are an obstacle to their biochemical analysis. Filament formation is observed for only a small fraction of wild-type cells growing on nitrogen-limited agar media. Furthermore, cells within colonies are likely to be highly starved for nitrogen, whereas cells on the outer edges of colonies and in penetrating filaments will experience different degrees of starvation. It is thus impossible to prepare physiologically homogeneous populations of wild-type cells from nitrogen-limited agar plates on which pseudohyphal growth is typically studied. We therefore used chemostat cultures to determine whether either of these two regulatory pathways could be implicated in cellular elongation during nitrogen-limited growth of wild-type diploid yeast cells. Chemostats provide a simple means of preparing large quantities of homogeneous cultures in which cells are grown under continuous, precisely defined conditions of nutrient limitation for biochemical analysis. It was previously shown that wild-type diploid cells are elongated when they are grown in nitrogen-limited, but not glucose-limited, chemostats (4). We show here that as for growth on nitrogen-limited agar media, this elongation response is specific for diploid cells (Fig. 3), is partially dependent on Ste20 and Ste12 (data not shown), and is accompanied by the transcriptional induction of a Ste12-Tec1 reporter construct (Fig. 3). On the other hand, we saw little or no indication of filament formation in our nitrogenlimited chemostats, and we observed low levels of expression of FLO11 (data not shown), which encodes a cell surface adhesion protein implicated in filament formation on agar plates (23, 27, 39, 43). The weak FLO11 expression in our nitrogenlimited glucose-rich chemostats may be due to glucose repression of FLO11 transcription (14). We observed frequent chains of cells and increased expression of FLO11 in nitrogen-limited chemostat cultures containing 3% galactose instead of 3% glucose, although the individual cells in the chains were less elongated then when cells were cultivated in glucose (data not shown). Altogether, these results suggest that our nitrogenlimited chemostat cultures reproduce many, but not all, aspects of nitrogen-limited pseudohyphal growth on solid agar media.

We found no evidence for a decrease in the level of Cdc28activating phosphorylation during nitrogen-limited growth (Fig. 4) despite strong genetic data suggesting that a decrease in activating phosphorylation was required for pseudohyphal growth. How can this apparent contradiction be resolved? It is possible that partial inactivation of Cak1 mimics an event, such as inhibition of Cdc28-Clb1,2 activity, that normally occurs by a distinct mechanism in wild-type cells during nitrogen-limited growth, and it remains possible that Cdc28-activating phosphorylation is regulated during other conditions that lead to filamentous growth (8, 9, 23, 31, 46). However, it is less clear how the Cak1-independent Cdc28-43244 mutant is so effective in blocking pseudohyphal growth (Fig. 1) and cellular elongation (Fig. 3C) in response to nitrogen starvation. Possibly, this inhibition may be related to the weak kinase activity associated with Cdc28-43244–Cln2 in vitro (7). The Cln1 and Cln2 G_1 cyclins are required for pseudohyphal growth (29), so the weak in vitro kinase activity of Cdc28-43244-Cln2 could mean that this mutant, although active in the absence of Cak1, may not sustain sufficient G1 cyclin kinase activity in vivo to support pseudohyphal growth.

Although we did not observe decreased activating phosphorylation of Cdc28, we did observe significant decreases in CLB1, CLB2, and CLB5 gene expression during nitrogen-limited growth. Xbp1 is synthesized in response to diverse types of stress and it is required for repression of CLN1 and CLB2 transcription during sporulation (34, 35). We showed that XBP1 is highly expressed during growth of wild-type yeast cells in nitrogen-limited chemostats (Fig. 5). Deletion of XBP1 prevents the fall in Clb2 levels normally observed in wild-type cells grown under nitrogen limitation, as well as inhibiting cellular elongation in nitrogen-limited chemostats and cellular elongation and pseudohyphal filament formation on nitrogen-limited agar media (Fig. 6). CLB2 overexpression also inhibits cellular elongation and filament formation (1, 10). Furthermore, CLB2 deletion restored cellular elongation and pseudohyphal growth to an *xbp1* Δ mutant (Fig. 6). These combined results strongly suggest that transcriptional induction of the XBP1 gene and

subsequent repression of CLB2 gene expression is a key response to nitrogen limitation leading to modifications of the yeast cell cycle and cell morphology. Further work is necessary to determine the functional significance of the CLB5 transcriptional repression, to specify the mechanism of action of Xbp1 with regard to CLB gene repression, and to order the action of Xbp1 and Clb1,2 with regard to the different signal transduction pathways implicated in pseudohyphal growth. Finally, many genes involved in filamentation in S. cerevisiae have apparent orthologs in Candida albicans that have been implicated in morphogenetic pathways contributing to the virulence of this pathogenic yeast (11). A sequence coding for a protein with low but significant similarity to Xbp1 is found in the C. albicans genome (http://www-sequence.stanford.edu/group/ candida), and it will be interesting to determine whether it also contributes to morphogenesis and virulence in Candida.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gerry Fink, George Sprague, Georges Renault, Michel Jacquet, and Anne Dranginis for the gifts of strains and plasmids and Jean-Marie Buhler for advice on quantitative PCR. We are grateful to David Morgan, Sue Jasperson, and Herman Espinoza for teaching C. Miled how to electrophoretically separate phospho-Thr-169 Cdc28 from the nonphosphorylated form. We thank Samia BenHassine for assistance and we are grateful to Céline Facca for technical help with the experiments involving *XBP1*.

The doctoral work of \tilde{C} . Miled was financed with funds provided by Hoechst-Marion-Roussel (currently Aventis), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

REFERENCES

- Ahn, S. H., A. Acurio, and S. J. Kron. 1999. Regulation of G2/M progression by the STE mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast filamentous growth. Mol. Biol. Cell 10:3301–3316.
- Boeke, J. D., F. LaCroute, and G. R. Fink. 1984. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. Mol. Gen. Genet. 197:345–346.
- Booher, R. N., R. J. Deshaies, and M. W. Kirschner. 1993. Properties of Saccharomyces cerevisiae wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. EMBO J. 12:3417–3426.
- Brown, C. M., and J. S. Hough. 1965. Elongation of yeast cells in continuous culture. Nature 206:676–678.
- Chandarlapaty, S., and B. Errede. 1998. Ash1, a daughter cell-specific protein, is required for pseudohyphal growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 18:2884–2891.
- Cross, F. R., and K. Levine. 2000. Genetic analysis of the relationship between activation loop phosphorylation and cyclin binding in the activation of the *Saccharomyces cerevisiae* Cdc28p cyclin-dependent kinase. Genetics 154:1549–1559.
- Cross, F. R., and K. Levine. 1998. Molecular evolution allows bypass of the requirement for activation loop phosphorylation of the Cdc28 cyclin-dependent kinase. Mol. Cell. Biol. 18:2923–2931.
- Cullen, P. J., and G. F. Sprague, Jr. 2000. Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13619–13624.
- Dickinson, J. R. 1996. 'Fusel' alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. Microbiology 142:1391–1397.
- Edgington, N. P., M. J. Blacketer, T. A. Bierwagen, and A. M. Myers. 1999. Control of *Saccharomyces cerevisiae* filamentous growth by cyclin-dependent kinase Cdc28. Mol. Cell. Biol. 19:1369–1380.
- Ernst, J. F. 2000. Transcription factors in *Candida albicans*—environmental control of morphogenesis. Microbiology 146:1763–1774.
- Espinoza, F. H., A. Farrell, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D. O. Morgan. 1996. A cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK. Science 273:1714–1717.
- Espinoza, F. H., A. Farrell, J. L. Nourse, H. M. Chamberlin, O. Gileadi, and D. O. Morgan. 1998. Cak1 is required for Kin28 phosphorylation and activation in vivo. Mol. Cell. Biol. 18:6365–6373. (Erratum, 20:1898, 2000.)
- Gagiano, M., D. van Dyk, F. F. Bauer, M. G. Lambrechts, and I. S. Pretorius. 1999. Msn1p/Mss10p, Mss11p and Muc1p/Flo11p are part of a signal transduction pathway downstream of Mep2p regulating invasive growth and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 31:103–116.

- Gimeno, C. J., and G. R. Fink. 1994. Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PHD1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. Mol. Cell. Biol. 14:2100–2112.
- Gimeno, C. J., P. O. Ljungdahl, C. A. Styles, and G. R. Fink. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. Cell 68:1077–1090.
- Godon, C., G. Lagniel, J. Lee, J. M. Buhler, S. Kieffer, M. Perrot, H. Boucherie, M. B. Toledano, and J. Labarre. 1998. The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 273:22480–22489.
- Guo, B., C. A. Styles, Q. Feng, and G. R. Fink. 2000. A Saccharomyces gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:12158–12163.
- Hollenhorst, P. C., M. E. Bose, M. R. Mielke, U. Muller, and C. A. Fox. 2000. Forkhead genes in transcriptional silencing, cell morphology and the cell cycle. Overlapping and distinct functions for *FKH1* and *FKH2* in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 154:1533–1548.
- Kaldis, P., A. Sutton, and M. J. Solomon. 1996. The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. Cell 86:553–564.
- Kron, S. J., and N. A. Gow. 1995. Budding yeast morphogenesis: signalling, cytoskeleton and cell cycle. Curr. Opin. Cell Biol. 7:845–855.
- Kron, S. J., C. A. Styles, and G. R. Fink. 1994. Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell. 5:1003– 1022.
- Lambrechts, M. G., F. F. Bauer, J. Marmur, and I. S. Pretorius. 1996. Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8419–8424.
- Lew, D. J., and S. I. Reed. 1995. Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. Curr. Opin. Genet. Dev. 5:17–23.
- Lew, D. J., and S. I. Reed. 1993. Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. J. Cell Biol. 120:1305–1320.
- Liu, H., C. A. Styles, and G. R. Fink. 1996. Saccharomyces cerevisiae S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. Genetics 144:967–978.
- Lo, W. S., and A. M. Dranginis. 1998. The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae* Mol. Biol. Cell 9:161–171.
- Lo, W. S., and A. M. Dranginis. 1996. FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. J. Bacteriol. 178:7144– 7151
- Loeb, J. D., T. A. Kerentseva, T. Pan, M. Sepulveda-Becerra, and H. Liu. 1999. Saccharomyces cerevisiae G1 cyclins are differentially involved in invasive and pseudohyphal growth independent of the filamentation mitogenactivated protein kinase pathway. Genetics 153:1535–1546.
- Longtine, M. S., A. McKenzie III, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen, and J. R. Pringle. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14:953–961.
- Lorenz, M. C., N. S. Cutler, and J. Heitman. 2000. Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell 11:183–199.
- Madhani, H. D., and G. R. Fink. 1997. Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. Science 275:1314–1317.
- Madhani, H. D., and G. R. Fink. 1998. The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. Trends Cell Biol. 8:348–353.
- Mai, B., and L. Breeden. 2000. CLN1 and its repression by Xbp1 are important for efficient sporulation in budding yeast. Mol. Cell. Biol. 20:478–487.
- Mai, B., and L. Breeden. 1997. Xbp1, a stress-induced transcriptional repressor of the Saccharomyces cerevisiae Swi4/Mbp1 family. Mol. Cell. Biol. 17:6491–6501.
- Mann, C., J. Y. Micouin, N. Chiannilkulchai, I. Treich, J. M. Buhler, and A. Sentenac. 1992. *RPC53* encodes a subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase C (III) whose inactivation leads to a predominantly G1 arrest. Mol. Cell. Biol. 12:4314–4326.
- Mosch, H. U., E. Kubler, S. Krappmann, G. R. Fink, and G. H. Braus. 1999. Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell 10:1325–1335.
- Pan, X., T. Harashima, and J. Heitman. 2000. Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Opin. Microbiol. 3:567–572.
- Pan, X., and J. Heitman. 1999. Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 19:4874–4887.
- Pic, A., F. L. Lim, S. J. Ross, E. A. Veal, A. L. Johnson, M. R. Sultan, A. G. West, L. H. Johnston, A. D. Sharrocks, and B. A. Morgan. 2000. The forkhead protein Fkh2 is a component of the yeast cell cycle transcription factor SFF. EMBO J. 19:3750–3761.
- Roberts, R. L., and G. R. Fink. 1994. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. Genes Dev. 8:2974–2985.
- 42. Robertson, L. S., and G. R. Fink. 1998. The three yeast A kinases have

specific signaling functions in pseudohyphal growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95:**13783–13787.

- 43. Rupp, S., E. Summers, H. J. Lo, H. Madhani, and G. Fink. 1999. MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. EMBO J. 18:1257–1269.
- Stevenson, B. J., N. Rhodes, B. Errede, and G. F. Sprague, Jr. 1992. Constitutive mutants of the protein kinase *STE11* activate the yeast pheromone response pathway in the absence of the G protein. Genes Dev. 6:1293–1304.
 Thuret, J. Y., J. G. Valay, G. Faye, and C. Mann. 1996. Civ1 (CAK in vivo),
- Thuret, J. Y., J. G. Valay, G. Faye, and C. Mann. 1996. Civ1 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase. Cell 86:565–576.
- 46. Vivier, M. A., M. G. Lambrechts, and I. S. Pretorius. 1997. Coregulation of starch degradation and dimorphism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 32:405–435.
- Ward, M. P., C. J. Gimeno, G. R. Fink, and S. Garrett. 1995. SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. Mol. Cell. Biol. 15: 6854–6863.
- Zhu, G., P. T. Spellman, T. Volpe, P. O. Brown, D. Botstein, T. N. Davis, and B. Futcher. 2000. Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. Nature 406:90–94.

RESULTATS II

La température de l'hôte induit la déphosphorylation de la thréonine activatrice des CDKs chez *Candida albicans*

1 Introduction

La levure C. albicans subit des transitions morphogéniques réversibles entre les formes de croissance pseudohyphales et hyphales. L'élongation cellulaire est la caractéristique principale des cellules en croissance pseudohyphale et hyphale chez C. albicans. Les mécanismes moléculaires de l'élongation cellulaire et des changements du cycle cellaire au cours de la croissance filamenteuse chez C. albicans sont inconnus. Une variété de signaux déclenchent l'élongation cellulaire in vitro. Les faibles températures inhibent la croissance filamenteuse chez S. cerevisiae (nos résultats) et C. albicans (Ernst, 2000). Les facteurs CaTpk2, Czf1 et Efg1 sont essentiels à la croissance filamenteuse chez C. albicans à 28°C. Cependant la température de 37°C est capable d'induire la filamentation dans les mutants $\Delta Catpk2$, $\Delta efg1$ et $\Delta czf1$ dans certaines conditions. Nous avons isolé les homologues fonctionnels de ScCak1 chez C. albicans, S. pombe et K. lactis. Les protéines Cak1 forment une nouvelle famille de protéines kinases caractérisée par un nouveau mode de fixation de l'ATP et probablement un nouveau mécanisme catalytique. Nous avons découvert qu'en réponse aux fortes températures, la phosphorylation activatrice au niveau de la boucle T de CaCdc28 est très fortement réduite. La réduction de l'activité associée à CaCdc28 serait à l'origine de l'élongation cellulaire caractéristique de la différenciation hyphale et pseudohyphale chez C. albicans.

2 Une famille de protéines kinases Cak1 est spécifique aux champignons

Cak1 est responsable de la phosphorylation activatrice de Cdc28 chez *S. cerevisiae* (Espinoza et al., 1996; Kaldis et al., 1996). C'est une protéine kinase très inhabituelle et qui a très fortement divergé de la grande famille des protéines kinases. La lysine hautement conservée en position N-terminal et la boucle riche en glycine sont nécessaires à la fixation de l'ATP chez la majorité des protéines kinases, mais cette boucle riche en glycine est absente chez Cak1 et la lysine n'est pas essentielle (voir Résultats III). Nous avons cherché chez les champignons *Candida albicans*, *S. pombe* et *Kluyveromyces lactis* les homologues de *CAK1* et chez les eucaryotes supérieurs. Nous avons isolé des homologues fonctionnels de *CAK1* par complémentation d'une souche *cak1-4* thermosensible à température restrictive de 37^{0} C. Le tableau II.1 résume l'ensemble des résultats obtenus.

L'alignement de séquences de l'ensemble des kinases Cak1 montre que la boucle riche en glycine est absente chez toutes ces kinases. Le seul motif évident caractéristique de la famille Cak1 est la séquence PPH en position N-terminal (Figure II.1 et Tableau II.2a page 120).

ORGANISME	Nombre total de transform- ants	Nombre total de candidats potentiels	Suppresseurs	САК	Source de la banque	
	F	Eucaryotes su	périeurs			
Homme	4 10 ⁶	0	0	0	F.Lacroute	
Drosophile	5 10 ⁶	1	TCP1	0	P.Léopold	
CHAMPIGNONS						
Candida albicans	10 ⁵	10	?	CaCAK1	F.Bordon-Pallier	
Candida parapsilosis	5 10 ⁴	13	?	?	H.Fukuhara	
Kluyveromyces lactis	3 10 ⁴	9	?	KICAK1	M.Louvel	
Yarrowia lipolytica	4 10 ⁶	2	YISPT4	?	C.Gaillardin	
Schizosaccharomyces pombe	10 ⁶	12	?	CSK1	P.Nurse	
Tableau II.1IsolementdeshomologuesfonctionnelsdeScCAK1par						

complémentation d'une souche *cak1-4*, en utilisant des banques génomiques et d'ADNc d'expression chez *S. cerevisiae*.

ScCak1	MKL	DSIDITHC	DLVKSTRTA-RIY	RSDTYAIKCL	ALDFDIPPHNAK
CaCak1	MKLSDYY	ID K ELIYNS	- SAISDIY TA IDKF	NNLPVCLKIVI	EDFSLPPHSIH
KlCak1	M	TNKTNMTTF	IKIO T GCADLEL	FPDIV-VKRII	DLELORPPHNAH
Csk1	MKSVGHFVPWL	TDIRHLTDO	TISEVFVGERKN	SKKLYV <mark>IK</mark> VOO	LVFKRPPHDAM
Structure	β		β	α	COUDE (α /CDKs)
ScCak1	FEVSILNI	K lgnk CK hi	LPLLES KATDNN	DL l LL F P F EEM	1NLYE FMQ MH
CaCak1	REVLILK	TLKPH-PNI	IEYFNDLKICDD	II LVTK LJ	RY DL S Q LIEIT
KlCak1	TELEILK	TISNKHV	IPLL G S ETSPR-	YVTFKFKRY	QC DL N QFM DQ H
Csk1	RGK LI LE:	SI G HPHI	ERIVD S FIDNEA	GS -V YLITSFR	(SFV L SDV MD EI
Structure	α		β	α	
ScCak1	VKRDRRK				SISE-FROMVE
CaCak1		TOFTVC		OVTIANETEEL	
KlCak1					
Cek1	STDTKCK				
CSKI	SIDI R CR.	101			
Structure					α
ScCak1	GTAFLHE	NKTTHRDTK	PONTML TNNTST		TSYDMANNSOT
CaCak1	GLEFTHS	OGTTHRDTK	PSNTFFAR_DDT	TOPITGDFI	
KlCak1	GLVYTHG	NGTTHRDVK	PONTMINSYNEV	VLGDFO	TSYNRNI.DN
Csk1	OISSALE	YLEKHGILH	IRDTHPNNTLLDS	MNGPAYLSDES	TAWSKOH
obili					
Structure	α	β	β	β	
ScCak1	SAEPMDSI	KVT-DISTO	TYKAPEVI.FGVK	CYDGGVDVWSI	J.T.T.T.SOWFORET
CaCak1		K-YIDVSTC	TYKAPELTLGTT	NYEVETDIWSI	GILLTGLYSENF
KlCak1	EAI	K-TCDCSTS	TYKAPELLESVS	NYKFETDTWAT	AVI.TSOLWNDKT
Csk1	PGEEVOEI		HYRATETLEGCH	SYGHEVDRWTH	GTLTAEL
ODKI		un gioio			
Structure					α
ScCak1	SRMGHVP	AMIDDGSD	MNSDG <mark>SD</mark> FRLIC	SIFEKLGIPS]	OKWEEVAOHG
CaCak1	0S V]	LVKDDKELT	NDSHVSDLYLLN	OIFENFGTPNI	TDFED
KlCak1	os kskssi	KV ID I D F D E	C <mark>SD</mark> IKLVL	- TLFDKFGKPSN	ie dwp ovtkn-
Csk1	FSNQA	ALF <mark>DDGS</mark> SE	-GWP <mark>S</mark> ELRLTS	S I IQTL <mark>G</mark> T PN E	SMWPELST
Structuro				~~~~~	
Structure					
ScCak1	SVDAFVG	M FG ADGDGK	YVLDQEK D VQIS	IVERNMPRLDE	IADV KV KQK F I
CaCak1	E	L F CDEYNNE	N LH FKKFNL QK Y	PRKDWI	IILP RCNDD F M
KlCak1	ESFNG	MFGNVSSDN	IF LH RRPI DEQ LI	QVYKWMPLITI	N PK LAKMW-
Csk1			FP D WN K F	IFHEYP P KPWS	SE I L P SVDTSIQ
				-	
Structure			α		α
ScCak1	NCIL-GM	VSFSPNERW	I S CQR ILQ E L EKP	,	
CaCak1	KE I FTK M I	IR YD RSK <mark>RI</mark>	TSKE ILQ-L MLD)	
KlCak1	L-RM	VKFDGNL <mark>R</mark> I	SAEQLLVSI		
Csk1	-YIVSHL	VTYSNRA	SP S FVIESFPKV	SARLSQYA	
- .					
structure	α		α		

Figure II.1 Alignement multiple de ScCak1, CaCak1, KlCak1, Csk1. Les résidus en vert sont conservés au moins dans 2 CAKs de deux espèces différentes. Les résidus en bleu sont conservés dans les quatre CAKs. Les résidus en rouge présentent le seul motif évident conservé dans les quatre CAKs. α : hélice α , β : feuillet β . Sc : *Saccharomyces cerevisiae*, Ca : *Candida albicans*, Kl : *Kluyveromyces lactis*, Sp : *Schizosaccharomyces pombe*.

La recherche de séquence homologue à Cak1 dans les banques de données nous a permis d'identifier des séquences homologues à Cak1 chez Zygosaccharomyces rouxii et (http://natchaug.labri.u-bordeaux.fr/Genolevures/Genolevures.php3) Yarrowia lipolytica (Figure II.2). La phylogénie de la nouvelle famille des kinases Cak1 est présentée dans la figure II.c. Cependant la recherche d'homologues fonctionnels à partir de banques d'ADNc humain, murin et de drosophile exprimés chez S. cerevisiae n'a pas permis d'isoler des protéines kinases proches de Cak1, mais nous avons isolé le gène TCP1 de la drosophile comme suppreseur du défaut de CAK1 à température restrictive dans la souche cak1-4 chez S. cerevisiae. Nous avons montré aussi que les trois gènes TCP (ScCCT3, ScCCT2, ScCCT7) de S. cerevisiae sont des suppresseurs de cak1-4 à température restrictive. Ces gènes appartiennent à la famille TCP qui codent pour des chaperonnes impliquées dans la structure du cytosquelette. La famille TCP est hautement conservée d'E. coli à l'homme. La comparaison entre les séquences des protéines codées par les quatre TCP que nous avons isolé et les protéines TCP de six autres espèces montre une forte identité de séquence entre les protéines TCP des eucaryotes : 73 % et 37 % d'identité entre Tcp1 α de la drosophile et Tcp1 de l'homme et GroEL de Thermoplasma volcanium (archea-bactérie) respectivement (Figure II.2b). Nous avons également isolé le gène YISPT4 de Yarrowia lipolytica comme suppresseur de l'allèle cak1-4 de S. cerevisiae (Tableau II.1). Nous n'avons pas trouvé de séquences similaires à l'ensemble des protéines kinases de cette nouvelle famille CAK1 dans les banques de données. La protéine kinase Cdk7 associée à la cycline H possède une activité CAK chez les eucaryotes supérieurs. Nous avons montré que la coexpression de CDK7 et cycline H complémente un mutant cak1-4 à température restrictive alors que la seule expression de CDK7 ne suffit pas pour se substituer à la fonction de CAK1 chez S. cerevisiae. Ainsi Cdk7cycline H possède une activité CAK in vivo chez S. cerevisiae. Les résultats suggèrent très fortement que la kinase CAK1 est spécifique aux champignons et ne présente pas d'homologues évidents chez les eucaryotes supérieurs et il semblerait que Cdk7-cycline H soit une véritable CAK in vivo chez les eucaryotes supérieurs, mais ceci n'exclut pas la présence d'autres kinases avant une activité CAK et ne possédant pas de séquences similaires aux membres de la famille CAK1.

ScCak1	MKLDSIDITHCQLVKSTRTARIYRSDTYAIKCLALDFDIPPHNAKFEVSIL
ZrCak1	
KlCak1	MTNKTNMTTPIKIQTGCADLELFPDIVVKRIDLELQRPPHNAHTELEIL
CaCak1	MKLSDYYIDKELIYNSAISDIYTAIDKFNNLPVCLKIVDEDFSLPPHSIHREVLIL
YlCak1	DSSDDEMWG
SpCsk1	MKSVGHFVPWLTDIRHLTDGTISEVFVGERKNSKKLYVIKVQGLVFKRPPHDAMRGKLIL
С	: :+ .::.::+++.:++
ScCak1	NKLGNKCKHILPLLESKATDNNDLLLLFPFEEMNLYEFMQMHYKRDRRKKNPYYDLLNPS
ZrCak1	IHASCYRPPKKNSKKFNPYLSFTG
KlCak1	KTISNKHVIPLLGSETSPRYVTFKFKRYQCDLNQFMDQHWKAKY
CaCak1	KTLKPH-PNIIEYFNDLKICDDIILVTKLYRYDLSQLIEITKYCKRTTRFIYGINGNLVS
YlCak1	DSGQVFTKQQVLVFNYYPYTLEDLAKGYHKAI
SpCsk1	ESIGHPHIERIVDSFIDNEAGSVYL
C	
ScCak1	IPIVADPPVQKYTNQLDVNRYSLSFFRQMVEGIAFLHENKIIHRDIKPQNIMLTNNTSTV
ZrCak1	-AQTVDDQPQVCENQLDVDRYAYDFFLQLSSALQFIHSHGIIHRDLKPQNVLLNRVE
KlCak1	NPYLLDNSTKTYSNTIPLD-HSTVIIRQIIEGLVYIHGNGIIHRDVKPQNIMLNS
CaCak1	NQYTLANEIEEKDIKLWLKSMSSGLEFIHSQGIIHRDIKPSNIFFARDD
YlCak1	FPTLIEPGGDTMRNKFPEE-KAIEIITAVASGLEYIHOEGIIHRDIKPENIMFKTK
SpCsk1	ITSFKSFVLSDVMDEISID-TKCKIVLOISSALEYLEKHGILHRDIHPNNILLDSM
C	
ScCak1	SPKLYIIDFGISYDMANNSOTSAEPMDSKVTDISTGIYKAPEVLFGVKCYDGGVDVWSLL
ZrCak1	NPOLVLTDFGISYDTEDPIOLOREDPNAKITDVSTSIYKAPELLFGVXNYKFSVXVWAFL
KlCak1	YNEVVLGDFGISYNRNLDNEAKTCDCSTSIYKAPELLFSVSNYKFEIDIWALA
CaCak1	ITOPIIGDFDICYDLKLPPKDEPPMAKYIDVSTGIYKAPELILGITNYEYEIDIWSLG
YlCak1	DSEPVLIDFGVSWKDGGSEKADEKITDVGTGVWRAPELLFGIRGYDDKVDIWSLG
SpCsk1	NGPAYLSDFSIAWSKOHPGEEVOELIPOIGTGHYRAIETLFGCHSYGHEVDRWTFG
C	·····:+.DF+*++: : . *···:*::*:+T++*A*E+***::Y··:+*:W:+.
ScCak1	IIISOWFORETSRMGHVPAMIDDGSDDMNSDGSDFRLICSIFEKLGIPSIOKWEEVAOHG
ZrCak1	IIISOCFKPMLIFRORLYLLLFITVSVNZ
KlCak1	VI.TSOLWNDKTOSKSKSSKVTDTDFDCSDTKLVI.TLFDKFGKPSNEDWPOVTKN-
CaCak1	TILTGLYSENFOSVLVKDDKELTNDSHVSDLYLLNOTFENFGTPNLTDFEDELFCD
VlCak1	CTLAYLLTRNGKPFFSNFVODGVSDLRLVADTFEKLGTPSAKTWPEVACVP
SpCsk1	TLTAELFSNOALFDDGSSEGWPSELRLTSSTTOTLGTPNPSMWPELSTFP
C	+++::+:
ScCak1	SVDAFVGMFGADGDGKYVLDOEKDVOTSTVERNMPRLDETADVKVKOKFTNCTLGMVSFS
ZrCak1	
KlCak1	ESENGMEGNUSSDNELHERPIDEOLTOVYKWMPI.TUDNPKLAKMWI.RMVKED
CaCak1	
VlCak1	AFESMNESETOGNGLSLLR
SpCak1	
Speaki	
ScCabl	
JCCakl 7rCabl	
ZICARI KlCaki	
CaCaki	
VICabl	
IICAKI	
SPCSKI	L9LATE9LAVA9AKT9ÄIV

C ...+::. .:.. .

Figure II.2 Alignement des séquences de ScCak1, ZrCak1, KlCak1, CaCak1, YlCak1 et Csk1 Les séquences de ZrCak1 et YlCak1 sont publiées sur le site :

(http://natchaug.labri.u-bordeaux.fr/Genolevures/Genolevures.phpKlCak1)

Sc : Saccharomyces cerevisiae, Zr : Zygosaccharomyces rouxii, Kl : Kluyveromyces lactis, Ca : Candida albicans, Yl : Yarrowia lipolitica, Sp : Schizosaccharomyces pombe

Données de Clustal : Le consensus est matérialisé par une séquence de caractères qui, selon la situation rencontrée en une position donnée, seront les suivants :

"." si le caractère majoritaire a une représentation >= 10%

":" si le caractère majoritaire a une représentation >= 20% "+" si le caractère majoritaire a une représentation >= 60%

"*" si le caractère majoritaire a une représentation >= 80%

le caractère lui-même, si celui-ci est identique pour l'ensemble des séquences.

	% d'identité avec Cak1	% d'identité avec Cdc28	Complémentation de <i>Sccak1-4</i>	Essentiel	Boucle GGG	Motif
CaCak1	35	26	+++	?	non	РРН
KlCak1	36	26	+++	?	non	РРН
Csk1	25	30	++	non	2 ^{ème} G	РРН

Tableau II.2a. Divergence des CAKs isolées. Les quatre CAKs étudiées, ScCak1, CaCak1, KlCak1 et Csk1, ont gardé une activité enzymatique de type CAK, mais elles ont divergé du point de vue séquence



Figure II.c Arbre phylogénique de la nouvelle famille Cak1

DmTcp1 α	MSTLASP-LSIAGTRQSGASVRTQNVMAALSISNIVKSSLGPVGLD
HsTcp1	MEGP-LSVFGDRSTGETIRSQNVMAAASIANIVKSSLGPVGLD
XlTcp1	MEGP-LAVFGERSTGEVVRSONVMAAASIANIVKSSLGPVGLD
CeTcp1a	MASAGDSTLALTGKRTTGOGTRSONVTAAVATANTVKSSLGPVGLD
AtTcp1a	
Actopia Anna 1-1	
sprepia	
Scrept	MSQLFNNSRSDTLFLGGEKISGDDIRNQNVLATMAVANVVKSSLGPVGLD
DdTcp1	MSNKVLMIDGDRISGNEVRAQNVLAVTAIANIVKTSFGPIGLD
TvGroEL	MMTGQVPILVLKEGTQREQGKNAQRNNIEAAKAIADAVRTTLGPKGMD
EcGroEL	MAAKDVKFGNDARVKMLRGVNVLADAVKVTLGPKGRN
DmTcp1a	KMLUDDTGDUWUWUDGAWTLRLEVEHPAAKULUELAOLODEEUGD
Uallan 1	
HSTCp1	
XITCPI	KMLVDGIGDVTITNDGATILKLLEVEHPAAKVLCELADLQDNEVGD
CeTcplα	KMLVDDVGDVIVTNDGATILKQLEVEHPAGKVLVELAQLQDEEVGD
AtTcp1 $lpha$	KMLVDDIGDVTITNDGATILRMLEVEHPAAKVLVELAELQDREVGD
SpTcp1 α	KMLVDDIGDVTVTNDGATILSLLDVEHPAGKVLVELAQQQDKEVGD
ScTcp1	KMLVDDIGDFTVTNDGATILSLLDVQHPAGKILVELAQQQDREIGD
DdTcp1	KMLIDNIGSIVVTNDGATILOKIDIEHPAAKILVOLSELODOEVGD
TVGroEL	KMLVDSIGDIIISNDGATILKEMDVEHPTAKMIVEVSKAODTAVGD
EcGroEL	VVLDKSFGAPTITKDGVSVAREIELEDKFENMGAOMVKEVASKANDAAGD
DmTcp1 α	GTTSVVILAAELLKNADELVKQKIHPTSIISGYRIACKEACKYISEHLTA
HsTcp1	GTTSVVIIAAELLKNADELVKQKIHPTSVISGYRLACKEAVRYINENLIV
XlTcp1	GTTSVVIIAAELLKNADELVKQKIHPTSVIGGYRLACKEAVRYINENLTI
CeTcp1 α	GTTSVVIVAAELLKRADELVKQKVHPTTIINGYRLACKEAVKYISENISF
AtTcp1 α	GTTSVVIVAAELLKRANDLVRNKIHPTSIISGYRLAMRESCKYIEEKLVT
SpTcp1a	GTTSVVTTAAELLRRANELVKNKTHPTTTTGYRLATREAVKFMTDVLSC
Saman1	
Ddman1	
TVGTOEL	GTTTAVVLSGELLKQAETLLDQGVHPTVISNGYRLAVNEARKIIDEI
ECGroEL	GTTTTATVLAQA11TEGLKAVAAGMNPMDLKRG1DKAVTA
DmTcp1a	PVDELGRDSLINIAKTSMSSKIIGADAEFESAMVVDAAOSVKITDPRG
Uamon1	
NJR1	
XITCPI	NTDELGKECLLNAAKTSMSSKIIGIDGDFSSAMVVDAALAVKYVDPKG
Cercp1a	TSDS1GRQSVVNAAKTSMSSK11GPDADFFGELVVDAAEAVR-VENNG
AtTcp1 α	KVEKLGKVPLINCAKTSMSSKLISGDSDFFANLVVEAVLSVKMTNQRG
SpTcp1 α	SVDSLGKESLINVAKTSMSSKIIGNDSDFFSTMAVDAMLSVKTSNSKG
ScTcp1	SVDTLGKETLINIAKTSMSSKIIGADSDFFSNMVVDALLAVKTQNSKG
DdTcp1	KVETLPKDFIVNIAKTSMSSKTINDDSDFFSKIVIEAITRVKTIDYKG
TVGroEL	SVKSTDDETLRKIALTALSGKNTGLSNTFLADLVVKAVNAV-AEERDG
EcGroEL	AVEELKALSVPCSDSKAIAQVGTISANSDETVGKLIAEAMDKV
DmTcp1 α	QAAYSIKAINVLKAHGKSARESVLIPGYALNCTIASQQMPKKIVNAKI
HsTcp1	QPRYPVNSVNILKAHGRSQMESMLISGYALNCVVGSQGMPKRIVNAKI
XlTcp1	QARYPINSVNVLKAHGRSQMESILVNGYALNCIVGSQSMNKRIVNAKI
CeTcp1α	KVTYPINAVNVLKAHGKSARESVLVKGYALNCTVASOAMPLRVONAKI
AtTcp1a	EIKVPIKGINII.KAHGOSARDSVII.NGVAI.NTGRAAOGMPI.RVSPAKT
SpTcp1a	
Spicpia Comeni	
Sciepi Ddm1	
	DVKIPINAINILKAHGKSAKESTLVEGIALNCTVASEGMPKRIQGAKI
TVGTOEL	KIIVDTANIKVDKKSGGSINDTQFISGIVVDKEKVHSKMPDVVKDAKI
ECGroEL	GKEGV1TVEDGTGLQDELDVVEGMQFDRGYLSPYF1NKPETGAVEL
DmTcp1a	ACLDFSLOKTKMKMGVOVLINDPDKLEATRARELDTTKERTNMTLGTGVN
HsTcp1	ACLDESLOKWKMKLGVOVVTUDPEKLDOTROPESDTUKERTOKTLAUGAN
NJmon1	
cercpia	ACLDFSLMKAKMHLGISVVVEDPAKLEAIRREEFDITKRRIDKILKAGAN
AtTcplα	ACLDFNLQKTKMQLGVQVVVNDPRELEKIRQREADMTKERIEKLLKAGAN
SpTcp1 α	AVLDMDLQKTKMALGVHVTIDDPDQLEKIREREVMITLERVKKILNAGAN
ScTcp1	ACLDLNLQKARMAMGVQINIDDPEQLEQIRKREAGIVLERVKKIIDAGAQ
DdTcp1	AFLDFNLAKTKLKLGQKVIVTNVNDLEAIRDRENDIVKERISLIIKSGAT
TvGroEL	ALIDSALEIKKTEIEAKVQISDPSKIQDFLNQETSTFKEMVEKIKKSGAN
EcGroEL	ES-PFILLADKKISNIREMLPVLEAVAKAGKPLLIIAEDVEGEALATA
D	
DWICDIC	VVLVSGGVDDLCMKYFVEAGAMAVRRVKKSDLKIIAKATGAAFITSLTNM
HsTcpl	VILTTGGIDDMCLKYFVEAGAMAVRRVLKRDLKRIAKASGATILSTLANL
XlTcp1	VILTTGGIDDMCLKYFVDAGAMAVRRVLKKDLKRIAKATGATMCSTLANL
CeTcp1 α	VVLTTGGIDDLCLKQFVESGAMAVRRCKKSDLKRIAKATGATLTVSLATL
AtTcp1α	VILTTKGIDDMALKYFVEAGAIAVRRVRKEDMRHVAKATGATLVTTFADM
SpTcp1a	VILTTKGIDDI.CLKSIIFAGAMAVRRCKKEDI.RRIAKASGATI.SSI.SNI.
Soucol	
Ddma-1	WITH MUNCIPPICITY PARTING ARCANED AND AND AND AND AND AND AND AND AND AN
Durchi Machine	VVLIINGIDDLUNIFVEAGUMAVKKUKEDLKKIAKSUGGTVLITLANL
TVGTOEL	
ECGroEL	VVNTIRGIVKVAAVKAPGFGDRRKAMLQDIATLTGGTVISEEIGM

DmTcp1 α	DGEESFDASMVGEAAEVAQERICDDELILIKGTKARAAASIILRGPNDFY
HsTcp1	EGEETFEAAMLGQAEEVVQERICDDELILIKNTKARTSASIILRGANDFM
XlTcp1	EGEESFEASMLGQAEEVVQERICDDELILVKNTKARTCASIILRGANDFM
CeTcp1 α	EGDEAFDASLLGHADEIVQERISDDELILIKGPKSRTASSIILRGANDVM
AtTcp1 α	EGEETFDPAHLGSADEVVEERIADDDVILIKGTKTSSAVSLILRGANDYM
SpTcp1 α	EGEETFESSYLGSAEEVVQEKFSDDECILVKGTKAYSSASIVLRGPNEYS
ScTcp1	EGEETFESSYLGLCDEVVQAKFSDDECILIKGTSKHSSSSIILRGANDYS
DdTcp1	EGEESFDTTALGIADEVVQDRLADDELIIVKNSNKKS-ASIILRGANELM
TvGroEL	TPSVLGEAEKVEERKIGDDRMTFVTGCKNPKAVSILIRGGTEHV
EcGroEL	ELEKA-TLEDLGQAKRVVINKDTTTIIDGVGEEAAIQGRVAQIRQQIEEA
DmTcp1 α	CDEMERS-VHDALCVVKRVLESKKVVAGGGCVEAALSIYLENFATS
HsTcp1	CDEMERS-LHDALCVVKRVLESKSVVPGGGAVEAALSIYLENYATS
XlTcp1	CDEMERS-VHDALCVVKRVLESKSVVPGGGAVEAALSIYLENYATS
CeTcp1 α	LDEMERS-VHDSLCVVRRVLESKKLVAGGGAVETSLSLFLETYAQT
AtTcp1 α	LDEMERA-LHDALCIVKRTLESNTVVAGGGAVESALSVYLEHLATT
SpTcp1 α	LDEMERS-MHDSLSVVKRTLESGKVVPGGGAVETALSIYLENFATS
ScTcp1	LDEMERS-LHDSLSVVKRTLESGNVVPGGGCVEAALNIYLDNFATT
DdTcp1	LDEMERS-IHDSLCIVKRTLESGTIVPGGGAVESALSIYLDNIAAT
TvGroEL	VSEVERA-LNDAIRVVAITKEDGKFLWGGGAVEAELAMRLAKYANS
EcGroEL	TSDYDREKLQERVAKLAGGVAVIKVGAATEVEMKEKKARVEDALHAT
DmTcp1 α	LASREQLAIAEFAKSLLVIPKTLSVNAAKDATDLVAKLRSYHNS
HsTcp1	MGSREQLAIAEFARSLLVIPNTLAVNAAQDSTDLVAKLRAFHNE
XlTcp1	MGSREQLAIAEFARALLVIPKTLAVNAAQDSTDLVAKLRAFHNE
CeTcp1 α	LSSREQLAVAEFASALLIIPKVLASNAARDSTDLVTFLRAYHSK
AtTcp1 α	LGSREQLAIAEFADALLIIPKVLAVNAAKDATELVAKLRAYHHT
SpTcp1 α	LGSREQLAIAEFAQALLIIPRTLAVNAAKDSTELTAKLRAYHAA
ScTcp1	VGSREQLAIAEFAAALLIIPKTLAVNAAKDSSELVAKLRSYHAA
DdTcp1	MGSRKQLAISEFAESLLVVPKQLAVNAALDASDLVSKLKAYHHA
TvGroEL	VGGREQLAIEAFAKALEIIPRTLAENAGIDPINTLIKLKSEHEK
EcGroEL	RAAVEEGVVAGGGVALIRVASKLADLRGQNEDQNVGIKVALRAMEAPLRQ
DmTcp1 α	SQTKPERSDLKWTGLDLIEGVVRDNKKAGVLEPAMSKIKS
HsTcp1	AQVNPERKNLKWIGLDLSNGKPRDNKQAGVFEPTIVKVKS
XlTcp1	AQVNPERKNLKWIGLDLLNGKPRDNKQAGVFEPTLVKTKS
CeTcp1α	AQLIPQLQHLKWAGLDLEEGTIRDNKEAGILEPALSKVKS
AtTcp1 α	AQTKADKKHYSSMGLDLVNGTIRNNLEAGVIEPAMSKVKI
SpTcp1a	SQNAEVTDVKKRGYKNYGLDLLNGVIRDNVKAGVLEPSMSKLKS
ScTcp1	SQMAKPEDVKRRSYRNYGLDLIRGKIVDEIHAGVLEPTISKVKS
DdTcp1	AQTDPSKKSYAYSGLDLFNNKVRNNLEAGVLEPAIAKIKC
TvGroEL	GKISMGVDLDSNGAGDMSKKGVIDPVRVKTHA
EcGroEL	IVLNCGEEPSVVANTVKGGDGNYGYNAATEEYGNMIDMGILDPTKVTRSA
DmTcp1 α	LKFATEAAITILRIDDMIKLNPEDKSGKSYADACAAGELDG
HsTcp1	LKFATEAAITILRIDDLIKLHPEILRIKHGSYEDAVHSGALND
XlTcp1	LKFATEAAITILRIDDVIKLHPEA-KEEKGKYHEAVQSGSIEN
CeTcp1α	LKFATEAAITILRIDDLIKLDKQEPLGGDDCHA
- AtTcp1α	IQFATEAAITILRIDDMIKLVKDESOGEE
SpTcp1a	LKSAVEACIAILRIDTSIKLDPEROPEDPHAGLH
ScTcp1	LKLALEACVAILRIDTMITVDPEPPKEDPHD-H
DdTcp1	IKFATESAITILRIDDKITLNPREOOGGDHEGHGH
TvGroEL	LESAVEVATMILRIDDVIASKKSTPPSNOPGOGAGAPGGGMPEY-
ECGrOEL	LOYAASVAGIMTTTECMVTDLPKNDAADLGAAGGMGGMGGMGGMM

Figure II.2b Alignement multiple de DmTcp1a, HsTcp1, XlTcp1, CeTcp1a, AtTcp1a, SpTcp1a, ScTcp1, DdTcp1, TvGroEL et EcGroEL

Les séquences des TCPs des eucaryotes sont hautement conservées.

Sc : Saccharomyces cerevisiae

Sp : Schizosaccharomyces pombe

Tv : Thermoplasma volcanium

Hs : *Homo sapiens*

Dm : *Drosophila melanogaster*

At : Arabidopsis thaliana

Ce : Caenorhabditis elegans

Ec : E. coli

Xl : Xenopus lavis

Puisque *CAK1* est probablement spécifique aux champignons, il constitue une cible sérieuse pour les antifongiques. Nous avons entrepris des études biochimiques et génétiques sur la kinase *CaCAK1* de *C. albicans*.

3 Les cellules mutantes *Cacak1* sont déreprimées pour la croissance hyphale et pseudohyphale

Le gène *CaCAK1* complémente une souche *\DeltaSccak1*. Nous avons isolé plusieurs mutants conditionnels de *Cacak1* (Tableau II.2). Nous avons délété une copie de *CaCAK1* chez *C. albicans* en utilisant le système hisG-*URA3*-hisG. Nous avons intégré les mutants *Cacak1-URA3* à la place de la copie non délétée. Ainsi les souches obtenues possèdent une copie delétée de *CaCAK1* et une copie mutante du même gène. Les souches mutantes présentent une croissance extrêmement ralentie à 37^oC. A 28^oC les cellules sont très fortement allongées et présentent une croissance hyphale et pseudohyphale en milieu riche (YPD) sur boite, comparées à une souche délétée seulement pour une copie de *CaCAK1*. Les cellules mutantes cultivées en milieu riche (YPD) liquide sont allongées comparées à la souche *CaCAK1/\DeltaCacak1* (Figure II.3).

4 La température de 37[°]C induit une réduction de la phosphorylation activatrice de CaCdc28

Les protéines kinases CaCdc28 et ScCdc28 de poids moléculaires respectives 36 et 34 kDa présentent 80 % de résidus identiques et 90 % d'homologie. Nous disposons d'anticorps polyclonaux dirigés contre ScCdc28. L'inhibition de l'activité kinase associée à Cdc28-Clb1,2 est responsable de l'élongation cellulaire observée au cours de la différenciation pseudohyphale en milieu carencé en azote (Miled et al., 2001).

L'inhibition de CaCak1 dans les mutants de *C. albicans* induit une forte élongation cellulaire et une stimulation de la croissance filamenteuse. L'ensemble des résultats chez *S. cerevisiae* et *C. albicans* suggère fortement que l'inhibition de l'activité kinase de CaCdc28 pourrait être nécessaire à l'élongation cellulaire et la croissance filamenteuse chez *C. albicans* et par conséquence à sa virulence. La température interne des hôtes de *C. albicans* est de 37⁰C. Nous avons aussi observé que la croissance filamenteuse est fortement inhibée chez *S. cerevisiae* à basses températures.

Allèle Cacak1	Croissance pendant 4 jours sur milieu YPD				
	16°C	25°C	filamentation à 28°C	34°C	37°C
1	+	++	+	++	-
2	+	++	+	+-	-
3	+++	+++	+	+	-
4	+	++	+	++	-
5	++	++	+	++	-
6	-	+	++	++	-
7	+++	+++	+	+++	-
8	++	++	+-	-	-
9	+-	+	++	++	-
10	+++	+++	+	+++	-
11	++	++	+	++	-
13	+	++	++	++	-
14	++	++	+-	++	-
15	++	++	+	++	-
16	++	++	+-	+-	-
17	+	++	+	++	-
18	++	++	+	++	-
19	+-	++	+-	++	-
20	++	++	+	++	-
21	++	++	+	++	-
23	+++	+++	+	+	-
24	+-	++	+	+-	-
26	++	+++	+	++	-
27	++	++	+	++	-
28	++	+++	+	+++	-
wt	+++	+++	+	+++	+-

Tableau II.2 **Isolement de mutants** *Cacak1ts/cs* dans *S. cerevisiae* Les mutants *Cacak1* conditionnels ont été isolé par complémentation et recherche d'allèles thermosensibles ou/et cryosensibles chez un mutant *Sccak1-4* de *S. cerevisiae*.



Figure II.3 La souche mutante Cacak I-16 est déreprimee pour la croissance hyphale et pseudohyphale (A) Souche sauvage sur boîte YPD (B) Souche Cacak I-16 sur boîte YPD (C) Souche sauvage en YPD liquide (D) Souche Cacak I-16 en YPD liquide (E) Croissance de la souche Cacak I-16 à 30°C et 37°C sur YPD Nous avons, donc testé l'effet de la température sur le niveau de phosphorylation de CaCdc28. Chez *S. cerevisiae*, la forme phosphorylée de ScCdc28 migre plus vite que la forme non phosphorylée Nos données semblent indiquer que la protéine CaCdc28 préparée à partir de cellules sauvages de *C. albicans* cultivées à 37^oC migre plus lentement que la protéine CaCdc28 préparée à partir de cellules cultivées à 28^oC. La forme rapide de la protéine est absente dans la souche mutante *Cacak1-16* cultivée à température permissive de 28^oC (Figure II.4).



Figure II.4 (A) CaCdc28 préparée à partir de *C. albicans* cultivée dans un milieu YPD pendant une nuit jusqu'à DO=0,6 à 1 (1) Souche sauvage à 28°C (2) Souche sauvage à 37°C (3) Souche mutante *Cacak1-16* à 28°C. (B) ScCdc28 préparée à partir de *S. cerevisiae* cultivée dans un milieu YPD pendant une nuit jusqu'à DO=06 (1) Souche sauvage à 28°C (2) Souche mutante *Sccak1-4* à 37°C (3) Souche sauvage à 28°C. Les protéines CaCdc28 et ScCdc28 sont immunorévélées par des anticorps polyclonaux dirigés contre ScCdc28.

5 Discussion

Nous avons isolé les homologues fonctionnels de *ScCAK1* chez *C. albicans*, *S. pombe* et *K. lactis* par complémentation d'un mutant *Sccak1-4* à température restrictive. Nous appelons les kinases que nous avons identifiées chez *C. albicans* et *K. lactis CaCAK1* et *KlCAK1* respectivement. Les kinases CaCak1, KlCak1 et Csk1 présentent 35 %, 36 % et 25 % d'identité respectivement avec ScCak1 et 26 %, 26 % et 30 % respectivement avec ScCdc28. Ainsi les quatre CAKs étudiées ont gardé une activité enzymatique de type CAK, mais elles ont divergé du point de vue séquence. Remarquablement, la séquence de Csk1 est plus proche de la séquence de ScCdc28 (30 %) que de la séquence de ScCak1 (25 %) (Tableau II.2a). La séquence de ScCdc28 présente aussi 25 % d'identité avec ScCak1, néanmoins elle ne supprime pas la thermosensibilité du mutant *Sccak1* et Csk1 ne complémente pas un mutant

Sccdc28 à température restrictive. Il faut noter que la complémentation de ASccak1 par CSK1 n'est pas totale. En effet, les cellules sont toujours déréprimées pour la filamentation, alors que les cellules de la souche $\triangle Sccak1$ complémentées par CaCAK1 ou KlCAK1 ne le sont pas. Ceci suggère que CSK1 est moins proche des kinases ScCAK, CaCAK1 et KlCAK1. Ainsi les protéines kinases de la nouvelle famille Cak1 semblent avoir conservé les résidus essentiels au processus catalytique dans une configuration structurale permettant une activité enzymatique de type CAK. Cependant, elles ont divergé fortement au niveau des résidus non essentiels à leur activité enzymatique, ceci est confirmé par des études phylogéniques récentes sur l'ensemble des CDKs et sur ScCak1 et Csk1, qui semblent former une famille distincte du reste des CDKs (Figure II.5) (Liu et Kipreos, 2000). Nous avons montré que les 68 résidus en C-terminal de ScCak1 ne sont pas essentiels à son activité à température permissive (Voir Résultats III). Enke et al., ont montré que les 31 résidus en N-terminal ne sont pas essentiels aussi (Enke et al., 1999). Il est possible qu'une grande partie des résidus des protéines kinases de la famille Cak1 ne contribue pas à l'édification de la poche catalytique et ne sont pas régulés par d'autres protéines. Le seul motif conservé est la séquence PPH en N-terminal de la famille Cak1, cette séquence pourrait être impliquée dans le mécanisme catalytique de ces kinases et notamment dans la fixation de l'ATP.

Les mutants *Cacak1* sont très allongés et ressemblent fortement aux mutants *Sccak1*. Nos résultats sur *S. cerevisiae* montrent que la réduction de l'activité mitotique associée à ScCdc28 est essentielle à l'élongation cellulaire au cours de la différenciation filamenteuse. La dérépression de la différenciation filamenteuse dans les souches mutantes de *C. albicans* et la forte réduction du niveau de phosphorylation de la thréonine activatrice de CaCdc28 à 37°C montrent qu'en réponse à une augmentation de la température (qui correspond à la température interne de l'hôte de *C. albicans*) les cellules s'allongent et modifient leur cycle cellulaire et ces changements peuvent bien être expliqués par une réduction de la phosphorylation activatrice de CaCdc28. Loeb et al., ont montré que les cyclines G1 sont essentielles à la croissance hyphale chez *C. albicans* (Loeb et al., 1999). Cependant, les séquences des cyclines G1 de *C. albicans* présentent moins de 11 % d'identité comparées aux cyclines G1 de *S. cerevisiae*. Ainsi il est possible que les les cyclines G1 de *C. albicans* ne soient pas associées à CaCdc28.



Figure II.5 Phylogénie des CDKs de S. cerevisiae, S.pombe, D. melanogaster, C. elegans et Humaines. (Daprès Liu et al., 2000)

On peut imaginer aussi que le complexe CaCdc28-Cln non phosphorylé sur la thréonine activatrice de CaCdc28, possède une activité réduite mais suffisante pour faire fonctionner le cycle cellulaire pseudohyphal et hyphale. Chen et al ont identifié une kinase très proche des CDKs chez *C. albicans*, Crk1 (Chen et al., 2000). Cette kinase est essentielle à la différenciation filamenteuse, mais elle n'est pas requise pour la croissance non filamenteuse. Crk1 possède plusieurs sites potentiels de phosphorylation par Cdc28 et il est possible qu'elle soit un substrat de Cdc28 et que cette phosphorylation soit inhibitrice. D'où, en réponse à une augmentation de la température, le niveau de phosphorylation de Crk1 par Cdc28 est réduit, ceci aurait pour conséquence une activation de la filamentation dépendante de Crk1.

6 Conclusion

La communauté scientifique considère que la phosphorylation activatrice des CDKs par Cak1 est constitutive (Harper et Elledge, 1998). Nous avons identifié une nouvelle famille de protéines kinases responsables de la phosphorylation activatrice des CDKS : la famille *CAK1*. Cette famille semble être spécifique aux champignons et ne présente pas d'homologue chez les eucaryotes supérieurs. La température de 37°C est nécessaire pour induire la filamentation chez *C. albicans* (Braun et Johnson, 1997; Riggle et al., 1999; Sonneborn et al., 1999; Ernst, 2000). Les voies de signalisation cellulaires activées par la température de 37°C sont inconnues. Nous avons découvert que la température de l'hôte induit une forte réduction de la phosphorylation activatrice de CaCdc28 (Figure II.6), qui serait responsable de l'élongation cellulaire au cours des développements pseudohyphal et hyphal chez *C. albicans*.

7 Partie expérimentale

7.1 Isolement de mutants conditionnels de CaCAK1

Un fragment génomique de 5 kb contenant le gène *CaCAK1* a été amplifié par PCR mutagène. Les fragments sont clonés dans le plasmide pRS314 digéré par les enzymes ClaI et BamHI. Une souche de *S. cerevisiae* délétée pour le gène *ScCAK1* et complémenté par le plasmide pJG43 contenant le gène sauvage *ScCAK1* et le marqueur *URA3* a été transformé par la banque de plasmides pRS314-*Cacak1* puis incubé sur 5FOA pour contre-sélectionner le plasmide pJG43. Les souches obtenues ont été testées pour leur croissance à différentes températures. Le gène *CaURA3* a été amplifié par PCR en utilisant des oligonucléotides flanqués par 45bp présents dans la séquence 3' de *CaCAK1* et intégré à 150 bp du codon stop de *Cacak1ts* par recombinaison homologue chez *S. cerevisiae*.



7.2 Isolement de *CaCAK1*, *KlCAK1*, *CSK1* et *DmTCP1*

La souche cak1-4 a été transformée par trois banques génomiques provenant de *C*. *albicans*, *S. pombe* et *K. lactis* et une banque d'ADNc de drosophile. Les plasmides permettant une croissance à température restrictive ont été séquencés. L'origine des banques est indiquée sur le tableau II.1.

Souches et plasmides

Souche ou plasmide	Génotype ou description	Source
Souches de <i>C. albicans</i> Caf4-2 UC258 CSA4000	Δura3::hisG/Δura3::hisG Δura3::hisG/Δura3::hisG ΔCacak1::hisG Δura3::hisG/Δura3::hisG ΔCacak1::hisG/Cacak1-16	B.Pallier Ce travail Ce travail
Souches de <i>S. cerevisiae</i> GF2913 GF2168 Plasmide	MATa his3 Sccak1-4 MATa ura3-52 leu2 lys2 Δcak1 ::LEU2 TRP1 ::CycloS (pJG43)	Faye
pVL1319-MO15 pCS976 pVL1319-cycH pCS50 pCS150 pCM185	MO15 dans pGEX MO15 de pVL1319-MO15 dans pYES2 Cycline H dans PVL1319 Cycline H de PVL1319-cycH dans pRS314 Cycline H de pCS50 dans pCM185	JM Egly Ce travail JM Egly Ce travail Ce travail J.Wiley

Milieux de culture

Les cellules de *C. albicans* disruptées par la cassette de *HisG::Cacak1*, ont poussé sur SD puis passées sur du SD contenant 0,625mg/ml de 5FOA et 0,1mg/ml d'uridine.

RESULTATS III

Régulation et localisation de Cak1
1 Localisation de Cak1

Nous avons fusionné la protéine GFP aux extrémités N- et C-terminales de Cak1 et les constructions obtenues ont été clonées derrière le propre promoteur de *CAK1* ou derrière le promoteur GAL. La fusion de GFP à l'extrémité C-terminale de Cak1 ne complémente pas une souche $\Delta cak1$ et la localisation de la protéine de fusion est majoritairement nucléaire. La fusion de GFP à l'extrémité N-terminale de Cak1 complémente une souche $\Delta cak1$ et la protéine de fusion est localisée dans le noyau et dans le cytoplasme (Figure III.1). La localisation cellulaire n'est pas affectée par la nature du promoteur d'expression de la protéine de fusion.

2 L'intégrité du domaine C-terminale de Cak1 est nécessaire à son activité

La fusion de GFP à l'extrémité C-terminale de Cak1 inhibe son activité. Pour confirmer l'importance du domine C-terminal de Cak1 pour son activité, nous avons fusionné un peptide de 70 acides aminés (ils succèdent le codon stop de *CAK1*) à l'extrémité C-terminale de Cak1. Cette protéine de fusion ne complémente pas une souche *cak1-4* à température restrictive. Nous avons aussi construit une souche diploïde homozygote Σ dans laquelle Cak1 est fusionnée par son extrémité C-terminale à la séquence HA. Cette souche présente une élongation cellulaire dans un milieu carencé en azote en chémostat ne contenant pas le tampon phtalate. En absence de phtalate l'élongation cellulaire n'est pas observée dans une souche sauvage. Ceci suggère que l'activité de la fusion Cak1-HA est partiellement inhibée par la présence du peptide HA en C-terminal de Cak1.

Remarquablement la délétion des 68 acides aminés en position C-terminale de Cak1 n'est pas essentielle à son activité à température permissive dans le mutant *cak1-1* (Figure III.2). Cette séquence contient des résidus conservés chez les autres CDKs et en particulier un résidu R essentiel au processus catalytique chez la majorité des protéines kinases. Ceci montre que les résidus qui interviennent dans le mécanisme catalytique dans la protéine kinase Cak1 sont en partie différents des résidus conservés chez les protéines de la grande famille des kinases.



DAPI

Cak1-GFP

Souche Cak1-4 à 28°C GFP en C-terminal de CAK1



DAPI

GFP-Cak1

Souche sauvage à 28°C GFP en N-terminal de CAKI

Figure III.1 Localisation de GFP-Cak1

<i>Kinases Cdk</i> ScCakl	k k k •*•* •* *• MKLDSIDITHC(•+ QLVKSTRTARIYRSI	k + *•)TY AIK CLALD	k •* •+ *+• FDIPPHNA	•+••• KF E VSI L NF	• + (LG N KCE	+ •• KHILP L LESKAT	••••+	PFEE
ScCdc28 MSGELAN HsCdk2 MEN HsCdc2 MEN SpCrKSDKWI HsCdk7 -VKSRAKF ScKin28 ME	NYKRLEKVGEGTYGV NFQKVEKIGEGTYGV NYQKVEKIGEGTYGV PYVKERKVGEGTYAV RYEKLDFLGEGQFAV EYTKEKKVGEGTYAV	VVYKALDLRPGQGQF VVYKARNKLTGF VVYKARHKLSGF VVFLGRQKETNF VVYKARDKNTNÇ VVYLGCQHSTGF	RVVALKKIRLESE RVVALKKIRLDTE RIVAMKKIRLEDE RVAIKKIKVG RVAIKKIKLGHR RKIAIKEIKTS	DEGVPSTA TEGVPSTA SEGVPSTA -QFKDGIDISA SEAKDGINRTA EFKDGLDMSA 	IREISLLKE IREISLLKE IREISLLKE LREIKFLRE LREIKLLQE IREVKYLQE	LKDD N – – – LNHP N – – – VNDE N NRS SRHD N – – LSHP N – – MQHP N – –	IVRLYDIVHS IVKLLDVIHT SNCVRLLDILHA VIELVDVFST IIGLLDAFGH VIELIDIFMA	DAHKLYLVFI EN-KLYLVFI ES-KLYLVFI KS-NLNIILI KS-NISLVFI YD-NLNLVLI	SFLD SFLH SFLD SFLD DFME SFLP
Structure	β	β	β		α		β	β	
Kinases k Cdk *+ ScCakl MNLYFMG ScCdc28LDLKRYME HSCdk2 QDLKKFME SpCrk1 SDLEMLIK HSCdk7 TDLEVIIF ScKin28TDLEVVIF	2MHYKRDRRKKNPY 3GIPK DASAL RISE KDKF KDNS KDKS	YDLLNPSIPIVADP	VQKYTNQLDVNR DQPLGAL TGIPLF TGATSLDPR IVFQPA LVLTPS LFTPA	+ • + RYSLSFFRQMVE DIVKKFMNQLCK PLIKSVLFQLLQ RLVQKFTYQLVN HIKSWMVMLLR BHIKAYMLMTLQ ADIKAWMLMTLR	•*+++*+ GIAFLHENF GIAYCHSHF GLAFCHSHF GVNFCHSRF GLHHIHSRF GLEYLHQHW GVYHCHRNF	+ +•* XIIHRDIKI XLHRDLKI XLHRDLKI XIIHRDLKI YILHRDLKI YILHRDLKI	* **** PQNILINND PQNLLINTE PQNLLIDKE PNNLLISSD PNNLLLSPD	+++*•••• GNLKLGDF GAIKLADF GNLKLADF GVLKLADF GVLKLADF GVLKLADF	GISYDMA GLARAFG GLARAFG GLARSFG GLSRDFG GLAKSFG GLARAIP
Structure a				α		β	β	β	α
Kinases Cdk ScCakl NNSQTSAE ScCdc28 HsCdk2 SpCrk1 HsCdk7 ScKin28	* * *** ++* EPMDSKVT-DISTGI -VPLRAYTHEIVTLV -VPVRTYTHEVVTLV -VPLRNYTHEIVTLV -TPSHMSHQVITRV -SPNRAYTHQVVTRV -APHEILTSNVVTRV	k ********* IYKAPEVLFGVKCYI WYRAPEVLLGGKQYS WYRAPELLLGCKYS WYRPPELFMGCRSYC WYRPPELFMGCRSYC WYRPPELFGARMYC WYRPPELFGARMYC WYRPPELFGARMYC ************************************	k •• +• o•++• c GGVDVWSLLIII STGVDTWSIGCIF STGVDIWSVGCIF STGVDIWSVGCIF SGVDMWAVGCIF SGVDMAVGCIF SG	SQWFQRETSRM YAEMCNRKPIF- YAEMURRALF- YAEMIRRSPLF- YAELMLRTPYL- JAELLLRVPFL- YAELMLRIPYL-	GHVPAMID	••• ••• •• •• •• •• •• •• •• •	••• +•++ + OGSDFRLICSIF SDSEIDQIFKIF SDSEIDQIFRIF SDSEIDEIFKIF SESDLDQLNVIF SDSDLDQLTRIF SQNDVDQMEVTF	EKLGIPSIQ RVLGTPNEAJ RTLGTPDEVV QVLGTPNEEV RALGTPEPEV ETLGTPTEEQ RALGTPTDRI	KWEEVAQHGS IWPDIVYLPD WPGVTSMPD WPGVTLLQD VIKSMQQLPN 2WPDMCSLPD DWPEVSSFMT
Structure			α				α		
Kinases k Cdk ScCakl DAFVGM ScCdc28FKPS HSCdc2YKPS SpCrkl -VEMKK HSCdk7 -VTFKS ScKin28 -NKLQI	HPGADGDGKYVLDQI SPPQWRR SPPKWAR SPPKWRR IPPPNG SPPG	SKDVQISIVERNMPF CDLSQVVPS -QDFSKVVPP	LDEIADVKVKQK LDPR 	+ GIDLLDKLLAY OGRSLLSQMLHY DAIELLSAMLVY SEIDLLKMMLDY ULDLIQGLFLF γALDFMCGMLTM α	+ SPNERWSCQ DPINRISAF DPNRRISAF DPAHRISAF NPYRRPTAQ NPCARITAT NPQKRWTAV α	RALLQELEI RAAIHPYI (AALAHPFI (RALQQNYI) QALEHHYI 'QALKMKYI 'QCLESDYI 	KP 7Q 7Q 1R 7S 7S 7K		

Figure III.2 Alignement multiple des Cdks et Cak1. La délétion des 68 résidus du côté C-terminal (en rouge) dans la protéine mutante ScCak1-1 n'affecte pas la fonction de la protéine *in vivo*. Les 31 résidus du côté N-terminal (en vert, Résultats de Kaldis et al) ne sont pas essentiels à la fonction de ScCak1. Ainsi les résidus catalytiques dans la protéine kinase Cak1 sont en partie différents des résidus conservés chez les protéines de la grande famille des kinases.

Localisation des mutations dans le mutant cak1-4: (en bleu : résidus de la protéine sauvage et en violet : résidus dans la protéine mutante ScCak1-4). (TDN \rightarrow TGN, GVD \rightarrow GED, GSD \rightarrow GCD et KVK \rightarrow KGK)

k: résidu conservé dans la majorité des protéines kinases
.: résidu conservé dans la famille des CDKs
*: résidu présent dans toutes CDKs
+: résidu conservé dans Cakl et les CDKs.
α: hélice α
β: feuillet β

3 Les thréonines en position 192 et 202 de Cak1 ne sont pas essentielles *in vivo et in vitro*

Plusieurs protéines kinases subissent une ou plusieurs phosphorylations activatrices au niveau de la boucle T. Ces phosphorylations sont essentielles pour l'activité de plusieurs Cdks, par exemple : Cdc28, Cdk2, Cdc2 et Cdk7. L'alignement des séquences de la boucle T de différentes CDKs et de Cak1 montre que la thréonine en position 202 de Cak1 est alignée avec la thréonine ou la sérine activatrice de plusieurs CDKs (Figure III.3).

ScCak1	179	192	202	2 213
ScCak1	DFGIS	YDMANNSQTS	AEPMDSKVTI	D-ISTGIYKAP <mark>E</mark>
ScCdc28	DFGLA	RAFGV	PLRAYTI	HEIVTLWYRAP <mark>E</mark>
HsCdk2	DFGLA	RAFGV	PVRTYTI	HEVVTLWYRAP <mark>E</mark>
SpCdc2	DFGLA	RSFGV	PLRNYTI	HEIVTLWYRAPE
HsCdc2	DFGLA	RAFGI	PIRVYTI	HEVVTLWYRSPE
HsCdk6	DFGLA	RIYSF	QM-ALTS	SVVVTLWYRAP <mark>E</mark>
SpCrk1	DFGLS	RDFGT	P-SHM <mark>S</mark> I	HQVITRWYRPPE
HsCdk7	DFGLA	KSFG <mark>S</mark> -	PNRAYTI	HQVVTRWYRAPE
XlMo15	DFGLA	KSFGS	PNRIYTI	HQVVTRWYRSPE
ScKin28	DFGLA	RAIPA	PHEILTS	SNVVTRWYRAP <mark>E</mark>
mutations	R	Α	А	K

Les résidus T192 et T202 ne sont pas essentiels *in vitro* et *in vivo*. Les résidus D179 et E213 sont essentiels *in vitro* et *in vivo*.

ScCak1		31
ScCak1	MKLDSIDITH	CQLVKSTRTARIYRSDTYAI K
	g g g	
ScCdc28 -	ANYKRLEKVE <mark>G</mark> TYG- <mark>G</mark> V	VYKALDLRPG-QGQRVV-AL <mark>K</mark>
HsCdk2	MENFQKVEKIGEGTYG V	VYKARN-KLTG-EVVAL <mark>K</mark>
SpCdc2	MENYQKVEKIGEGTYGV	VYKARH-KLSGRIV-AM <mark>K</mark>
HsCdc2	MEDYTKIEKIGEGTYG V	VYKGRH-KTTG-QVVAM <mark>K</mark>
HsCdk6	DQQYECVAEIGEGAYGK	VFKARDLKNGGRFV-AL <mark>K</mark>
SpCrk1	KWTYVKERKVGEGTYA V	VFLG-RQ-KETNRRV-AI <mark>K</mark>
HsCdk7	AKRYEKLDFLGEGQFAT	VYKARD-KNTN-QIVAI <mark>K</mark>
X1Mo15	AKQYEKLDFLGEGQFAT	VYKARD-KNTDRIV-AI <mark>K</mark>
ScKin28	MEYTKEKKVGEGTYAV	VYLGCQHSTGRKI-AI <mark>K</mark>
mutation		A

Figure III.3 Le résidu K31 n'est pas essentiel *in vivo* et possède moins de 10 % d'activité *in vitro*.

Nous avons muté les thréonines en position 192 et 202 en alanine. Les mutants cak1T192A et cak1T202A complémentent une souche Acak1. Nous avons purifié les protéines mutantes en utilisant une colonne de chromatographie Ni-NTA-Agarose suivie par une chromatographie sur Superdex75 (Figures III.4). Nous avons trouvé que l'activité kinase des protéines Cak1T192A et Cak1T202A sur les substrats de Cak1, Cdc28 et Cdk2 est comparable à la protéine Cak1 sauvage. Ces résultats suggèrent fortement que les thréonines en position 192 et 202 de Cak1 ne sont pas essentielles à l'activité de Cak1 in vivo et in vitro (Figure III.5.). Nous avons aussi montré que la protéine Cak1 purifiée à partir d'E. coli est capable de phosphoryler ses substrats Cdc28 et Cdk2. Ceci suggère fortement que Cak1 ne subit pas des modifications postraductionnelles pour son activité in vitro.

4 La lysine en position 31 de Cak1 n'est pas essentielle *in vivo*

La lysine hautement conservée en position N-terminale des protéines kinases est essentielle à la coordination de l'ATP et au processus catalytique. La mutation de cette lysine abolit l'activité kinase par inhibition de la fixation de l'ATP (De Bondt et al., 1993; Hanks et al., 1988). Nous avons muté la lysine en position 31 en alanine. Le mutant cak1K31A complémente une souche Acak1. Nous avons purifié la protéine mutante Cak1K31A en utilisant une chromatographie Ni-NTA-Agarose suivie par une chromatographie sur Superdex75. Nous avons trouvé que l'activité kinase de la protéine Cak1K31A sur les substrats de Cak1, Cdc28 et Cdk2 est d'environ 10% comparée à l'activité kinase de la protéine Cak1 sauvage (figure III.5). Ainsi la lysine en position 31 de Cak1 n'est pas essentielle à l'activité de Cak1 in vivo et in vitro.



ou





5 L'aspartate 179 et la glutamate 213 sont essentielles

Les résidus D et E de la séquence DFG—APE (segment d'activation) sont essentiels au processus catalytique de la majorité des protéines kinases. Nous avons muté le résidu D179 de Cak1 en R et le résidu E213 en K. Les mutants *cak1D179R* et *cak1E213K* ne complémentent pas une souche *Acak1*. Nous avons purifié les protéines mutantes Cak1D179R et Cak1E213K en utilisant une chromatographie Ni-NTA-Agarose suivie par une chromatographie sur Superdex75. Nous avons trouvé que l'activité kinase des protéines Cak1D179R et Cak1E213K sur les substrats de Cak1, Cdc28 et Cdk2 est inférieure à 2 % comparée à l'activité kinase de la protéine Cak1 sauvage (figure 6). Ainsi les résidus D179 et E213 de Cak1 sont essentiels à l'activité de Cak1 in *vivo* et *in vitro*.

6 La Myelin Basic Protein (MBP) est un substrat de Cak1 in vitro

La protéine MBP est un substrat classique des MAPK. C'est une petite molécule de 18 kDa très riche en résidus sérine et thréonine. Pour tester l'activité kinase de Cak1, on utilise les protéines Cdc28 et Cdk2. La purification de ces deux protéines est relativement difficile. Nous avons donc cherché d'autres molécules commercialisées et phosphorylables par Cak1. L'histone H1 est un substrat classique de Cdc28 et Cdk2, mais il n'est pas phosphorylé par Cak1. Nous avons trouvé que la protéine sauvage Cak1 hautement purifiée phosphoryle la protéine MBP. La phosphorylation de la protéine MBP par la protéine Cak1K31A est quasiment nulle. Ces résultats montrent clairement que la protéine MBP est un substrat de la kinase Cak1 *in vitro*. La séquence reconnue par Cak1 et contenant la thréonine phosphorylée dans la protéine Cdc28 est RXXT169H. On trouve un peptide similaire de séquence RX-T94H dans la protéine MBP et qui pourrait être phosphorylé par Cak1 (Figure III. 6).

PM=18kDa Substrat classique des MAPK

La séquence reconnue par Cak1 (Cdc28) est RXXT*H La séquence contenant la Thr94 (MBP) est RX--T*H

AAQKRPSQRSKYLASASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSLGRFFGSDRGAPKR GSGKDGHHAA<mark>RTT*H</mark>YGSLPQKAQGHRPQDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQG KGRGLSLSRFSWGAEGQKPGFGYGGRASDYKSAHKGLKGHDAQGTLSKIFK LGGRDSRSGSPMARR

Figure III.6 La protéine MBP est un nouveau substrat de Cak1 in vitro

7 Rôles de Cak1 à 37°C

Les résultats de Levine et Cross (Levine et al., 1998) suggèrent que le seul rôle essentiel de Cak1 est la phosphorylation de Cdc28 sur la thréonine 169. En effet, le mutant de Cdc28-43244 complémente une souche $\Delta cak1 \Delta cdc28$ à 25°C. Le groupe de Morgan a montré que Cak1 phosphoryle la protéine kinase Kin28 au niveau de la thréonine activatrice de la boucle T, mais cette phosphorylation n'est pas essentielle à la survie cellulaire (Espinoza et al., 1998). Nous avons trouvé que le mutant Cdc28-43442 ne complémente pas une souche *cak1-4* à température restrictive. Les souches mutantes *cak1-4* haploïde et diploïde sont de fonds génétique Σ . Ces résultats suggèrent que la protéine Cak1 possède un ou plusieurs rôles essentiels à 37°C.

8 Le niveau protéique de Cak1 diminue en phase stationnaire

En phase stationnaire, les cellules arrêtent la division cellulaire. Nous avons montré que le niveau protéique de Cak1 dans une souche sauvage diminue fortement après quatre jours de culture sur un milieu riche comparé à la même souche préparée à partir d'une culture en phase exponentielle après 16 heures (Figure III.7).



Figure III.7 Le niveau protéique de Cak1 est réduit dans les cellules diploïdes en phase stationnaire. Souche sauvage en (1) YPD à DO=0,6 (2) chémostat en milieu carencé en azote (3) phase stationnaire.

Cak1 phosphoryle Cdc28 et également Kin28. Les formes phosphorylées de Kin28 migrent plus vite que les formes non phosphorylées sur gel SDS-PAGE. Nous n'avons pas trouvé une déphosphorylation nette de Cdc28 en phase stationnaire, mais nous avons observé que la majorité de Cdc28 est phosphorylée. Par contre dans les mêmes conditions nous avons trouvé que la protéine Kin28 est largement sous formes déphosphorylées et migre plus lentement en phase stationnaire comparé à la même souche sauvage en phase exponentielle (Figure III.8). Ces résultats montrent qu'en phase stationnaire la phosphorylation de Kin28 au niveau de la thréonine 162 est fortement réduite.



Figure III.8 Kin28HA est majoritairement non phosphorylée dans les cellules diploïdes en phase stationnaire.(1) Souche sauvage en Chémostat en carence en azote. (2) Souche sauvage en YPD. (3) Mutant $\Delta cak1KIN28T162E$ en YPD. (4) Souche sauvage sur boite carencée en azote. (5) Souche sauvage en phase stationnaire. Moins de protéines ont été chargé dans les puits 1 et 3.

9 Mutants *cak1* thermosensibles et leur phénotype

L'isolement de mutants *cak1* thermosensibles avait été effectué dans le laboratoire de G. Faye avant mon arrivée. Je rappellerai que pour les produire, le gène *CAK1* a été amplifié par PCR dans des conditions permettant de générer des erreurs (Faye et al., 1997). Les fragments obtenus ont été intégrés dans le génome de levure. Le protocole utilisé a été publié (Thuret et al., 1996). Soixante et un mutants thermosensibles ont été retenus. Plusieurs d'entre eux avaient une morphologie anormale (cellules allongées) et développaient, sur des boîtes YPD, des colonies présentant des pseudohyphes. Notons que le contexte génétique de ces mutants est celui des souches du laboratoire de G. Faye, contexte qui est différent de celui des souches dérivées de Σ 1278b (souches dont je ferai précéder le nom par Σ quand je les nommerai par la suite).

Nous avons croisé ces mutants avec une souche sauvage pour obtenir des ségrégants de sexes opposés, portant une mutation *cak1* thermosensible et les marqueurs génétiques convenables. Des diploïdes homozygotes pour chaque mutation *cak1-ts* ont été isolés. Leurs capacités à sporuler et à produire des pseudohyphes ont été testées.

Pour suivre la sporulation, les diploïdes ont été sélectionnés sur milieu SD (-lys,-his) puis leur aptitude à utiliser le glycérol comme source de carbone a été vérifiée. Ces diploïdes furent mis à sporuler sur milieu SPO2 pendant 6 jours à 28°C. Sur 40 mutants diploïdes étudiés, 7 avaient une sporulation nulle (aucune tétrade), 13 une sporulation déficiente (nombre de tétrades faible, tétrades incomplètes, spores en fuseau), 20 une sporulation apparemment normale. Ce résultat confirme que Cak1 joue un (ou des) rôle(s) essentiel(s) dans le déroulement de la sporulation.

Les mêmes 40 diploïdes ont été sous-clonés sur milieu carencé en azote (milieu SLAD (Gimeno et al., 1992) ou sur milieu YPD et placés à 28°C. Les colonies se développant furent observées après 16 heures puis 48 heures. Comme contrôle, nous avons ajouté un diploïde $\Sigma wt/\Sigma wt$ et un diploïde $\Sigma cak1-4/\Sigma cak1-4$. L'observation des colonies sur milieu carencé en azote, nous a conduit à classer les diploïdes dans plusieurs groupes selon leur production de pseudohyphes : 4 diploïdes formaient des pseudohyphes en quantité comparable à celle de $\Sigma cak1-4/\Sigma cak1-4$, 9 diploïdes en produisaient comme $\Sigma wt/\Sigma wt$, d'autres diploïdes montraient peu de pseudohyphes, une douzaine de diploïdes étaient sans pseudohyphes et finalement 4 diploïdes avaient du mal à pousser. Les diploïdes produisant beaucoup de pseudohyphes sur

milieu carencé en azote en formaient également beaucoup sur YPD, cependant après 48 heures de croissance, il semblait que cette production régressait.

10 Révertants extragéniques

Pour découvrir des composants cellulaires interagissant avec Cak1, nous avons entrepris une recherche de révertants extragéniques à partir des 61 mutants *cak1-ts* disponibles. Ces mutants ont d'abord été sous-clonés sur YPG. Pour chacun, 5 colonies ont servi à ensemencer 5 cultures de 2,5 ml de YPG. Après croissance pendant 5 jours à 25°C, les culots de cellules sont étalés sur boîtes YPD et mis à 37°C. Les boîtes sont observées à 5, 9 et 14 jours. Seuls 10 mutants donnèrent un total de 75 révertants. Ces derniers ont été croisés avec une souche sauvage, les diploïdes obtenus mis à sporuler et 10 tétrades furent disséquées pour chaque révertant et ceci pour déterminer si les révertants étaient intragèniques ou très liés ((4 + / 0 ts) ou extragèniques et non liés (3 + / 1 ts). Il est apparu que seuls les révertants de *cak1-ts2334* étaient extragèniques. Nous avons poursuivi l'analyse de l'un d'entre eux. Nous avons trouvé qu'il était dominant. Nous avons transformé le mutant *cak1-ts2334* avec une banque génomique préparée à l'aide de l'ADN du révertant, après l'avoir partiellement digéré avec Sau3A. Le gène suppresseur a été identifié. Il s'agit d'un ARN de transfert sérine muté dans son anticodon. Ce résultat n'est pas celui que nous cherchions.

11 Recherche de mutations co-létales avec les mutations cak1-2 et cak1-4

Une autre approche génétique pour identifier des interactions cellulaires est la recherche de mutations co-létales avec une mutation donnée. Nous avons suivi la méthode de (Bender et Pringle, 1991). Nous avons construit quatre souches : deux de sexes opposés et portant les mutations *cak1-2, ade2* et *ade3* et deux autres souches également de sexes opposés et portant les mutations *cak1-4, ade2* et *ade3*. Ces quatre souches contenaient le plasmide p562 qui est multicopie (2μ) et dans lequel sont insérés les gènes *CAK1* et *ADE3* sauvages. Ces quatre souches ont été irradiées par les UV (taux de survie 10 %), puis étalées, après dilutions convenables, sur boîtes YPD contenant 8% de glucose. Sur ce milieu, les souches perdent facilement le plasmide p562 (*CAK1*) et les colonies se développant sont blanches ou sectorisées. Si une cellule a été mutée dans un gène dont la fonction interfère avec celle de Cak1 de telle sorte que la présence des deux mutations soient létale pour la cellule, alors le plasmide p562 ne peut pas être perdu et la colonie qui se développera sera rouge.

Les nombres des candidats retenus pour les quatre souches ont été respectivement : 26, 13, 18, 14. Nous avons tenté d'établir les groupes de complémentation en croisant les candidats MATa cak1-2 avec les candidats MATa cak1-2 et les candidats MATa cak1-4 avec les candidats MATa cak1-4. Cependant les tableaux obtenus ont été difficiles à interpréter, peut-être à cause de phénomènes de semi-dominance. Nous nous sommes contentés d'analyser les mutants co-létaux thermosensibles. Huit candidats ont été étudiés plus avant. Nous les avons transformés avec une banque génomique sauvage monocopie (vecteur Ycp50). Nous avons isolé des plasmides rendant ces mutants thermorésistants et capables de produire des colonies sectorisées. Les gènes responsables de ces complémentations ont été identifiés. Nous avons ainsi trouvé les gènes KIN28, YDJ1, PAF1, CTR9, GPI1. Ydj1 est une chaperonne du type Hsp40 associée à Hsp70 et qui agissant avec Cdc37 et Hsp90, participe au repliement des protéines kinases. Paf1 et Ctr9 sont deux composants d'un complexe qui semble s'associer à l'ARN polymérase II. Ce complexe est sensible aux signaux véhiculés par la voie MAP kinase Pkc1-Mpk1 (chocs thermiques, faible pression osmotique, déformations de la membrane cellulaire) et influencerait l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi cellulaire ou dans la recombinaison (Chang et al., 1999). Gpi1 est une protéine essentielle qui joue un rôle, en fait mal défini, dans la première étape de la biosynthèse du glycosylphosphatidylinositol (GPI). Rappelons que le GPI est un glycolipide qui est ajouté, au niveau de l'ergasptoplasme, à l'extrémité C-terminale de protéines qui sont transférées à la surface membranaire ou qui sont libérées dans la paroi cellulaire (Herscovics et Orlean, 1993). Chez S. cerevisiae, 33 protéines, dont la protéine Flo11, ont été reconnues comme subissant cette modification.

Ainsi en plus de phosphoryler Kin28, Cak1 interagit avec d'autres facteurs de transcription tels Ctr9 et Paf1. Ce qui peut indiquer qu'une fonction importante de Cak1 serait de moduler l'expression du transcriptome quand la cellule subit des conditions stressantes.

12 Discussion

Nous avons fusionné la protéine GFP à l'extrémité N-terminale de Cak1 et nous avons trouvé que GFP-Cak1 est localisée dans le noyau et dans le cytoplasme *in vivo*. Kaldis et al ont trouvé que Cak1 est localisée exclusivement dans le cytoplasme en utilisant des expériences d'immunofluorescence et de fractionnement cellulaire (Kaldis et al., 1998). Kin28 est un substrat de Cak1 et est localisée dans le noyau ce qui suggère que Cak1 est localisée également dans le noyau. La localisation cytoplasmique et nucléaire de GFP-Cak1 *in*

vivo est vraisemblable. La fusion entre GFP et d'autres protéines est couramment utilisée dans les expériences de localisation. La fusion de GFP à l'extrémité C-terminale de Cak1 favorise une localisation nucléaire de Cak1-GFP. La fusion de GFP ou d'un peptide de 70 acides aminés à l'extrémité C-terminale de Cak1 inhibe l'activité Cak1. La fusion de GFP, GST, GAL4 ou LEXA à l'extrémité N-terminale de Cak1 semble ne pas interférer avec l'activité de Cak1 *in vivo* et *in vitro*. Ceci suggère que le domaine C-terminal serait impliqué fortement dans l'interaction de Cak1 avec ses substrats et particulièrement Cdc28. Il est possible aussi que la protéine de fusion GFP du côté C-terminal de Cak1 soit mal repliée. Remarquablement la séquence d'un mutant *cak1-1* montre que la délétion des 68 derniers acides aminés en position C-terminale n'affecte pas la fonction de Cak1 à température permissive. Ainsi, les 68 acides aminés en C-terminal de Cak1 ne sont pas essentiels à l'activité de Cak1 (Figure III.2). Le peptide délété contient un résidu R en position 324 qui est hautement conservé chez les protéines kinases et qui est essentiel dans le processus catalytique.

Plusieurs protéines kinases possèdent une thréonine activatrice au niveau de la boucle T. Nous avons muté des thréonines potentiellement homologues aux T/S activatrices dans la protéine Cak1. Les expériences génétiques et biochimiques ont montré que les thréonines 192 et 202 ne sont pas essentielles à l'activité de Cak1 in vivo et in vitro. Généralement, la phosphorylation de la thréonine activatrice de la boucle T est essentielle pour neutraliser les charges basiques au niveau de la poche catalytique et permettre l'accès des substrats au site de catalyse. Ceci suggère que le site catalytique de Cak1 n'est pas auto-inhibé par la boucle T et qu'il est accessible aux substrats de Cak1 en absence de phosphorylation de la (les) thréonine hautement conservée. Le groupe de Solomon a montré aussi que les sérines en position 190 et 199 appartenant à la boucle T ne sont pas essentielles à l'activité de Cak1. Il reste possible aussi qu'une ou plusieurs phosphorylations au niveau de la boucle T seraient plutôt inhibitrices dans certaines conditions. Ainsi la régulation de l'activité enzymatique de Cak1 est très différente de celle de la grande famille des protéines kinases. Le mode de fixation de l'ATP par les protéines kinases est très conservée. La coordination de la molécule d'ATP nécessite la présence d'une boucle riche en glycine et une lysine en position N-terminale. La protéine Cak1 ne contient pas la boucle riche en glycine, nous avons mesuré la constante de dissociation de Cak1 sauvage pour l'ATP ($K_d=2.10^{-6}$). Cette constante est très proche de la constante de dissociation de Cdk7 ($K_d=10^{-6}$) (Figure III.9).



Figure III.9 Détermination de la constante de dissociation de Cak1 sauvage par spectrophotométrie. Kd=2.10⁻⁶ (G.Divita).

Nous avons trouvé que la lysine hautement conservée en position 31 n'est pas essentielle à l'activité Cak1 *in vivo* et *in vitro*. La délétion des 31 acides aminés en position N-terminal n'inhibe pas l'activité de Cak1. L'ensemble de ces résultats montre que Cak1 a très fortement divergé de la grande famille des protéines kinases et suggère que Cak1 pourrait avoir une structure 3D différente des autres kinases. Il serait utile de déterminer la structure cristallographique de Cak1. La recherche d'homologues fonctionnels de Cak1 suggère fortement que Cak1 est spécifique aux champignons. Grâce à ces travaux, Cak1 constitue une cible sérieuse pour les antifongiques, actuellement exploitée par la Société Aventis.

13 Conclusion

Nos résultats montrent que GFP-Cak1 est localisée dans le noyau et dans le cytoplasme. Les thréonines en position 192 et 202 de Cak1 ne sont pas essentielles *in vivo et in vitro*. Remarquablement la lysine hautement conservée et participant à la fixation de l'ATP n'est pas essentielle *in vivo*. Cependant l'aspartate 179 et le glutamate 213 sont essentiels. Ces mutans ont permis de montrer que la Myelin Basic Protein (MBP) est un substrat de Cak1 *in vitro*. Nos études *in vivo* attribuent un rôle essentiel à Cak1 à 37°C indépendamment de la phosphorylation activatrice de Cdc28. Nous avons également montré que le niveau protéique de Cak1 diminue en phase stationnaire. Par contre, nos résultats suggèrent fortement que Cak1 est essentielle à la sporulation. Enfin nous avons trouvé que les mutations dans les gènes *paf1, ctr9* et gpi1 sont co-létales avec les mutations *cak1-2* et *cak1-4*. Ainsi il existe des interactions génétiques entre *CAK1* et les gènes *PAF1, CTR9* et *GP11*. Des expériences biochimiques sont en cours pour savoir si la protéine Cak1 interagit physiquement avec les facteurs Paf1, Ctr9 et Gpi1.

14 Partie expérimentale

14.1 Purification d' His6-Cak1 à partir d'E. coli

La souche *E. coli* BL21 (*pHIS6-CAK1*) pLys est cultivée dans 100ml LBA-Cm jusqu'à DO=0,9 à 37°C, puis à 16°C pendant 16h. L'induction est réalisée avec 0,4mM IPTG pendant 23h. Le culot est lavé avec 0,9 % NaCl et resuspendu dans le tampon M (20ml) 50mM Tris-HCl pH7,5, 1mM imitable, 300mM NaCl, 10% glycérol contenant la DNaseI 10U/ml, 2mM pefabloc et 10µg/ml de chaque chymostatin, leupeptin, pepstatin et aprotinin). Après sonication et centrifugation à 16000 rpm 20mn et 45000 rpm 1h. 20ml de l'extrait sont chargés dans une colonne NiNTA-Agarose (0,25ml)équilibrée avec la tampon M, puis lavée avec 2.5ml du tampon M, 2.5ml et du tampon F (50mM Tris-HCl pH7,5, 20mM imidazole, 300mM NaCl,, 10% glycérol). L'élution est faite avec 5ml de 250mM imidazole, 50mM Tris-HCl pH7,5 et 300mM NaCl contenant les inhibiteurs des protéases.

Souches et plasmides

Souche ou plasmide de S.	cerevisiae	
Souche ou plasmide	Génotype ou description	Source
Souches de S. cerevisiae		
GF0000	Δcak1Δcdc28 CDC28-43244	Ce travail
GF2913	MATa his3 Sccak1-4 ura3-52 trp1 leu2-3 lys2	Ce travail
CSY2003	MATa/a leu2::hisG/LEU2 trp1::hisG/TRP1 ura3-52/ura3-52 cak1-4/cak1-4	Ce travail
Plasmide		
PCS102	PRS426-CAK1-GFP	Ce travail
PCS900	PRS426-GFP-CAK1	Ce travail
PCS101	PRS426-CAK1-peptide68	Ce travail
PCS431	pFus CAK1K31A	Ce travail
PCS4192	pFus CAK1T193A	Ce travail
PCS4202	pFus CAK1T202A	Ce travail
PCS4213	pFus CAK1E213A	Ce travail
PCS4179	pFus CAK1D179A	Ce travail
PFusionator (pFus)	LEU2 pGAL1	Ce travail
PHE90	CAK1-HA	D Morgan

RESULTATS IV

Régulation de la différenciation filamenteuse par les phosphatases *CDC14*, *GLC7*, *PPH21*, *PPH22*, *PPH3*, *PPZ1*, *PPZ2*, *PTC2*, *PTC3* et *SIT4* et isolement des phosphatases de Cdc28

1 Introduction

Le but de cette étude a été d'identifier les phosphatases responsables de la déphosphorylation de la thréonine activatrice en position 169 de Cdc28 et d'une façon plus générale, d'isoler des phosphatases impliquées dans la régulation de la différenciation filamenteuse.

Les phosphatases sont au nombre de 32 chez *S. cerevisiae* et sont classées en trois catégories : (1) Les protéines phosphatases à thréonine et/ou une sérine (2) Les protéines phosphatases à thréonine et/ou une sérine et tyrosine dites phosphatases à double spécificité. (3) Les protéines phosphatases à tyrosine

La protéine Cdc28 est phosphorylée sur la thréonine 169 par la protéine kinase Cak1. On pense que les phosphatases responsables de la déphosphorylation de la thréonine 169 appartient aux deux premières catégories et dont le nombre est 22. Nous avons réalisé l'alignement multiple des séquences de ces 22 phosphatases ainsi que des phosphatases à tyrosine. L'alignement met en évidence la présence de résidus conservés à des positions bien déterminées propres à chaque famille.

Nous avons montré que la déphosphorylation de la thréonine 169 de Cdc28 induit une très forte stimulation de la filamentation (Miled et al., 2001). La sur-expression des phosphatases responsables de la déphosphorylation de Cdc28T169 devrait stimuler la croissance filamenteuse. Nous avons donc cloné l'ensemble des 22 phosphatases contenant virtuellement les phosphatases responsables de la déphosphorylation de Cdc28T169 dans un plasmide multicopie. Les constructions ont été introduites dans des souches sauvages diploïdes et haploïdes de fonds génétique Σ .

2 Effet de la sur-expression des phosphatases sur la croissance cellulaire

Les souches haploïdes sur-exprimant *CDC14*, *GLC7* et *PPT1* présentent un retard de croissance à 16°C, 25°C, 28, 30°C et 32°C, mais ne poussent pas ou très peu à 37°C sur un milieu riche ou carencé en azote. Les souches diploïdes sur-exprimant *PPH21*, *PPH22*, *PPT1*, *PPZ2* et *YCR079C* présentent un retard de croissance à 37°C. Remarquablement la croissance est rétabli à 37°C sur un milieu carencé en azote (Figure IV.1).

Figure IV.1 Effet de la sur-expression des phosphatases sur la croissance cellulaire en milieu riche et carencé en azote à 28°C et 37°C



haploïdes sur milieu pauvre De gauche à droite : CDC14, CMP2, CNA1, GLC7,PPG1, PPH21, PPH22, PPH3, PPQ1, PPT1, PPZ1, PPZ2, SIT4, YBR125C, YCR079c, YIL113W, YNR022C, YOR0090C,YVH1

3 Effet de la sur-expression des phosphatases sur la filamentation

La sur-expression des phosphatases *CDC14*, *GLC7*, *PPH21*, *PPH22*, *PPH3*, *PPZ1*, *PPZ2*, *PTC2*, *PTC3* et *SIT4* stimulent la croissance filamenteuse dans les souches diploïdes et haploïdes sur un milieu carencé en azote. Ces résultats suggèrent que les phosphatases *CDC14*, *GLC7*, *PPH21*, *PPH22*, *PPH3*, *PPZ1*, *PPZ2*, *PTC2*, *PTC3* et *SIT4* pourraient réguler la croissance filamenteuse dans une souche sauvage en réponse à une carence en azote. Il est possible que les phosphatases de la thréonine activatrice de Cdc28 soient parmi ces phosphatases (Figure IV.2).

4 Analyse des interactions génétiques entre CDC28 et CDC14, GLC7, PPH21, PPH22, PPH3, PPZ1, PPZ2, PTC2, PTC3 et SIT4

Si parmi les stimulateurs de la croissance filamenteuse *CDC14*, *GLC7*, *PPH21*, *PPH22*, *PPH3*, *PPZ1*, *PPZ2*, *PTC2*, *PTC3* et *SIT4* une ou plusieurs phosphatases seraientt responsables de la déphosphorylation de la thréonine activatrice de Cdc28, la co-expression du mutant *CDC28-43244* avec l'une de ces phosphatases supprimerait le phénotype hyper-filamenteux observé dans ces souches. La co-expression du mutant *CDC28-43244* dans les souches sur-exprimant *CDC14*, *PTC2* et *PTC3* inhibe l'hyper-filamentation dans ces souches sur un milieu carencé en azote. La co-expression du mutant *CDC28-43244* dans les souches sur-exprimant *GLC7*, *PPH21*, *PPH22*, *PPH3*, *PPZ1*, *PPZ2* et *SIT4* n'affecte pas ou peu l'hyper-filamentation de ces souches sur un milieu carencé en azote. Sur un milieu carencé en azote. Ces résultats suggèrent que les phosphatases *CDC14*, *PTC2* et *PTC3* pourraient être des phosphatases agissant sur la thréonine 169 de Cdc28 (Figure IV.3).



pRS426

CDC14



PPH22



PPH3

PPZ2



PPZ1

Figure IV.2 Sur-expression des phosphatases CDC14, GLC7, PPH21, PPH22, PPH3, PPZ1, PPZ2, PTC2, PTC3 et SIT4 exprimées à partir d'un plasmide multicopie dans une souche sauvage sur un milieu carencé en azote pendant un jour à 28°C.



pRS426





PPH21

PPH22



PPH3

PPZ2



PPZ1

Figure IV.3 Co-expression des phosphatases CDC14, GLC7, PPH21, PPH22, PPH3, PPZ1, PPZ2, PTC2, PTC3, SIT4 et de CDC28-43244 exprimées à partir d'un plasmide multicopie dans une souche sauvage sur un milieu carencé en azote pendant un jour à 28°C.

5 Analyse des interactions génétiques entre les phosphatases CDC14, GLC7, PPH21, PPH22, PPH3, PPZ1, PPZ2, PTC2, PTC3, SIT4 et les voies : MAPK, ASH1, GPA2, PHD1 et XBP1

L'inactivation de la voie MAPK par délétion de *STE20* ou *TEC1* ou l'inactivation de la voie AMPc par délétion de *GPA2* ou par délétion d'*ASH1*, *PHD1* ou *RAS2* inhibent fortement la filamentation dans les souches sur-exprimant les phosphatases *PPH21*, *PPH22*, *PPH3*, *PPZ2*, *PTC2*, *PTC3*. La sur-expression de *CDC14* rétablit la croissance filamenteuse dans les souches $\Delta ste20$, $\Delta tec1$, $\Delta ras2$, $\Delta gpa2$, $\Delta ash1$, $\Delta phd1$ et $\Delta xbp1$ (Figure IV.4-1/7). La sur-expression de *GLC7* induit la filamentation dans la souche $\Delta gpa2$ (Figure IV.4-1). Finalement, la sur-expression de *PPZ1* et *SIT4* rétablit la différenciation filamenteuse dans les souches $\Delta phd1$ et $\Delta xbp1$, la sur-expression de *PPZ1* induit aussi la filamentation dans la souche $\Delta ash1$ (Figures IV.4-2, IV.4-3, IV.4-4). Ainsi la stimulation de la croissance filamenteuse dans les souches sur-exprimant ces phosphatases dépend des voies de régulation normales de la différenciation filamenteuse dans une souche sauvage.

6 Recherche de suppresseurs multicopies du phénotype hyperfilamenteux du mutant *cak1-4*

Nous avons cherché des gènes interagissant avec CAK1/CDC28 au cours de la croissance filamenteuse en utilisant une banque génomique de sur-expression dans la souche diploïde $\Sigma cak1$ -4. En effet, la sur-expression des gènes activateurs de CAK1 augmenterait l'activité kinase de Cdc28 et rétablirait une filamentation proche de la souche sauvage. Cette approche nous a permis d'isoler des gènes dont la sur-expression induit ou réprime l'hyper-filamentation dans la souche cak1-4. Nous avons choisi les candidats induisant une plus forte invasivité que la souche cak1-4 diploïde. Ce crible nous a permis d'isoler les gènes suivants que nous n'avons pas étudié par manque de temps : GAL11, GSH2, SSP1 et SPA2. Nous avons aussi des gènes dont la sur-expression supprime le phénotype hyper-filamenteux de la souche cak1-4, il s'agit du gène KNS1 et d'un plasmide contenant un fragment génomique contenant les gènes SCO2 et MRF1'. Nous n'avons pas déterminé lequel de ces deux gènes est responsable de la suppression.





∆gpa2 pRS426





PPH22

PPH3





PPZ1

PPH21

Figure IV.4-1 Sur-expression des phosphatases CDC14, GLC7, PPH21, PPH22, PPH3, PPZ1, PPZ2, PTC2, PTC3 et SIT4 exprimées à partir d'un plasmide multicopie dans une souche Agpa2 sur un milieu carencé en azote pendant un jour à 28°C.



Aphd1 pRS426





PPH22

GLC7

PPH21



PPH3

PPZ1

PPZ2



Figure IV.4-2 Sur-expression des phosphatases CDC14, GLC7, PPH21, PPH22, PPH3, PPZ1, PPZ2, PTC2, PTC3 et SIT4 exprimées à partir d'un plasmide multicopie dans une souche Aphd1 sur un milieu carencé en azote pendant un jour à 28°C.



Axbp 1 pRS426

Figure IV.4-3 Sur-expression des phosphatases CDC14, GLC7, PPH21, PPH22, PPH3, PPZ1, PPZ2, PTC3, PTC3 et SIT4 exprimées à partir d'un plasmide multicopie dans une souche Axbp1 sur un milieu carencé en azote pendant un jour à 28°C.





∆ash1 pRS426





PPH22



GLC7

PPZ2



PPZ1

PPH21

Figure IV 4-4 Sur-expression des phosphatases CDC14, GLC7, PPH21, PPH22, PPH3, PPZ1, PPZ2, PTC2, PTC3 et SIT4 exprimées à partir d'un plasmide multicopie dans une souche Aash1 sur un milieu carencé en azote pendant un jour à 28°C.



∆ste 20 pRS426



GLC7

PPH3

PPH21



PPZ2



PPZ1

Figure IV.4-5 Sur-expression des phosphatases CDC14, GLC7, PPH21, PPH22, PPH3, PPZ1, PPZ2, PTC2, PTC3 et SIT4 exprimées à partir d'un plasmide multicopie dans une souche Aste 20 sur un milieu carencé en azote pendant un jour à 2S°C.



Atec 1 pRS426

CDC14









Figure IV.4-6 Sur-expression des phosphatases CDC14, GLC7, PPH21, PPH22, PPH3, PPZ1, PPZ2, PTC2, PTC3 et SIT4 exprimées à partir d'un plasmide multicopie dans une souche Atec1 sur un milieu carencé en azote pendant un jour à 28°C.







GLC7

PPH21



PPH3

PPZ2

PPH22



Figure IV.4-7 Sur-expression des phosphatases CDC14, GLC7, PPH21, PPH22, PPH3, PPZ1, PPZ2, PTC2, PTC3 et SIT4 exprimées à partir d'un plasmide multicopie dans une souche Aras2 sur un milieu carencé en azote pendant un jour à 28°C.

7 Discussion

Le groupe de Solomon a purifié les activités responsables de la déphosphorylation de la thréonine 169 de Cdc28 à partir d'extraits bruts de *S. cerevisiae*. Leurs résultats sont en accord avec nos résultats et montrent que *PTC2* et *PTC3* sont deux phosphatases de la thréonine activatrice de Cdc28. Ils montrent aussi que la sur-expression de *PTC2* et *PTC3* dans un mutant thermosensible *cak1-22* est létale à température permissive.

Le rétablissement de la croissance filamenteuse par la sur-expression de *CDC14 dans* les souches *Aste20, Atec1, Aras2, Agpa2, Aash1, Aphd1* et *Axbp1* suggère que la phosphatase *CDC14* régule la différenciation filamenteuse indépendamment de ces voies. Les voies STE20, *TEC1, RAS2, GPA2, ASH1* et *PHD1* semblent être nécessaires à l'induction de la filamentation par les phosphatases *PPH21, PPH22, PPH3, PPZ2 PTC2*, et *PTC3*. La voie *XBP1* semble aussi être nécessaire à la stimulation de la filamentation par les phosphatases *PPH21, PPH22, PPH3, PPZ2*. La voie *ASH1* semble ne pas être essentielle à l'induction de la filamentation par PPZ1. Finalement, les voies *XBP1* et *PHD1* ne seraient pas impliquées dans la transmission des signaux stimulateurs de la différenciation filamenteuse produits par les phosphatases *PPZ1* et *SIT4*.

La recherche de séquences similaires à la phosphatase humaine responsable de la déphosphorylation de la thréonine activatrice de Cdk2, KAP, donne le score le plus élevé à la protéine phosphatase Cdc14. Cdc14 et KAP présentent 30 % d'identité de séquence et 50 % de similitude (Figure IV.5). L'ensemble des résultats génétiques et l'homologie de séquence entre Cdc14 et KAP suggèrent que *CDC14* pourrait avoir une activité phosphatase de la thréonine activatrice de Cdc28. Néanmoins, nous n'avons pas observé une interaction entre Cdc28 et Cdc14 par le test double-hybride.

Des études récentes ont confirmé le rôle essentiel du gène *SPA2* dans la différenciation filamentateuse (Mosch et Fink, 1997; Roemer et al., 1998; Sheu et al., 2000; Sheu et al., 1998). La protéine Gal11 est un composant de l'holoenzyme ARN polymérase II (médiateur) (Myers et Kornberg, 2000). C'est un régulateur transcriptionnel positif et négatif de nombreux gènes, entre autres ceux impliqués dans la conjugaison. Plusieurs éléments de la voie de réponse aux phéromones régulent également la différenciation filamenteuse. Il est donc

possible que le facteur *GAL11* soit un régulateur de la croissance filamenteuse dans une souche sauvage.

Cdc14	DPPFMPFRDAGYSNADFEITIQDVVYGVWRAKEKGLIDLHSFNLESYEKYEHVEFGDFNV
KAP	MKPPSSIQTSEFDSSDEEPIEDEQTPIHISWLSLSRVNCSQFLG
Cdc14	LTPDFIAFASPQEDHPKGYLATKSSHLNQPFKSVLNFFANNNVQLVVRLNSHLYNKKHFE
KAP	LCALPGCKFKDVRRNVQKDTEELKSCGIQDIFVFCTRGELSKYRVPNLLDLYQ
Cdc14	DIGIQHLDLIFEDGTCPDLSIVKNFVGAAETIIKRGGKIAVHCKAGLGRTGCLIGAHLIY
KAP	QCGIITHHHPIADGGTPDIASCCEIMEELTTCLKNYRKTLIHCYGGLGRS-CLVAACLLL
Cdc14	TYGF <mark>T</mark> ANECIGFLRFIRPGMVVGPQQHWLYLHQNDFREWKYTTRISLKP <mark>S</mark> EAIGGLYP
KAP	YLSD <mark>T</mark> ISPEQAIDSLRDLRGSGAIQTIKQYNYLHEFRDKLAAHLSSRDSQ- <mark>S</mark> RSVSR

Figure IV.5 Alignement de séquences des phosphatases Cdc14 de *S. cerevisiae* et la KAP humaine. En rouge les résidus identiques.

Le gène *SSP1* est impliqué dans le contrôle de la méiose et la formation des spores. Son rôle potentiel dans la filamentation reste à confirmer. Le gène *GSH2* code pour une glutathione synthétase. Les enzymes de cette famille sont exprimées en réponse aux stress. La carence en azote peut être considérée comme un stress. Ceci suggère que les cellules carencées en azote induisent des gènes de lutte contre les stress environnementaux. Nous avons vu que *XBP1* est un autre exemple de gène exprimé en réponse aux stress (Mai et Breeden, 1997) et essentiel à la différenciation filamenteuse (Miled et al., 2001). Le rôle des gènes SCO2 ou MRF1' reste à définir. Des études génétiques et biochimiques plus approfondies seront nécessaires pour attribuer un rôle à chacun des gènes suppresseurs isolés dans cette étude.

8 Conclusion

Le crible génétique que nous avons utilisé a permis d'identifier deux phosphatases responsable de la déphosphorylation de la thréonine 169 de Cdc28, PTC2 et PTC3. Nos résultats montrent que la sur-expression des phophatases *CDC14, GLC7, PPH21, PPH22, PPH3, PPZ1, PPZ2, PTC2, PTC3* et *SIT4* stimule la croissance filamenteuse. L'action de ces phosphatases dépend des voies de régulation normales de la différenciation filamenteuse dans une souche sauvage.

Nous avons également isolé les gènes *GAL11*, *GSH2*, *SSP1*, *SPA2* et *SCO2/MRF1*' comme inducteurs et suppresseurs du phénotype hyper-filamenteux de la souche *cak1-4* respectivement.

9 Partie expérimentale

Souches et plasmides

Souche ou plasmide de <i>S. cerevisiae</i>				
Souche ou plasmide	Génotype ou description	Source		
Souches de S. cerevisiae	2			
CSY2000	MATa/ $\alpha \Sigma$ leu2::hisG/ leu2::hisG ura3-52/ura3-52	Ce travail		
GF3310	MATa/ $\alpha \Sigma$ trp1::hisG/ trp1::hisG ura3-52/ura3-52	Ce travail		
Plasmide				
pCS1	pRS426 CDC14	Ce travail		
pCS2	pRS426 <i>CMP2</i>	Ce travail		
pCS3	pRS426 CNA1	Ce travail		
pCS4	pRS426 GLC7	Ce travail		
pCS5	pRS426 PPG1	Ce travail		
pCS6	pRS426 PPH21	Ce travail		
pCS7	pRS426 PPH22	Ce travail		
pCS8	pRS426 PPH3	Ce travail		
pCS9	pRS426 PPQ1	Ce travail		
pCS10	pRS426 PPT1	Ce travail		
pCS11	pRS426 PPZ1	Ce travail		
pCS12	pRS426 PPZ2	Ce travail		
pCS13	pRS426 SIT4	Ce travail		
pCS14	pRS426 <i>YBR125C</i>	Ce travail		
pCS15	pRS426 YCR079W	Ce travail		
pCS16	pRS426 <i>YIL113W</i>	Ce travail		
pCS17	pRS426 <i>YNR022C</i>	Ce travail		
pCS18	pRS426 YORO090C	Ce travail		
pCS19S	pRS426 <i>YVH1</i>	Ce travail		
pCS20	pRS424 <i>CDC14</i>	Ce travail		
pCS21	pRS424 PPH21	Ce travail		
pCS22	pRS424 PPH22	Ce travail		
pCS23	pRS424 <i>PPH3</i>	Ce travail		
pCS24	pRS424 <i>SIT4</i>	Ce travail		
pCS19	pLac195 CDC28-43244	Ce travail		
pGFCross	pRS315 CDC28-43244	Ce travail		
pMC2	pGAL1 PTC2	C.Mann		
pMC3	pGAL1 PTC3	C.Mann		
pMC1	pGAL1 PTC1	C.Mann		
pCS27	pB42AD CDC28	Ce travail		
pCS29	pGilda CDC14	Ce travail		

Conclusion et Perspectives

Nous avons utilisé un Chémostat pour montrer qu'en réponse à une carence en azote, l'expression des cyclines *CLB1* et *CLB2* est réprimée par le facteur Xbp1. La diminution de la quantité de *CLB1* et *CLB2* réduit l'activité kinase des complexes Clb1/2-Cdc28, induisant ainsi un retard en G2 et une élongation cellulaire caractéristiques de la différenciation filamenteuse. Nous avons découvert que le facteur de transcription *XBP1* est essentiel pour la filamentation. Il est probable que Xbp1 régule l'expression d'autres gènes impliqués dans la différenciation pseudohyphale. Le facteur Xbp1 est exprimé en réponse aux stress. Peut-on considérer que la différenciation filamenteuse est une forme de réponse aux stress ? Nous avons également isolé le gène *GSH2* qui code pour une glutathione syntétase, exprimée aussi en réponse aux stress. L'ensemble de nos résultats suggèrent fortement que la différenciation filamenteuse est régulée par des facteurs impliqués dans la réponse aux stress.

En carence en glucose, la croissance invasive est déclenchée l'expression des cyclines *CLB1* et *CLB2* n'est pas modifiée cependant, la phosphorylation activatrice de Cdc28 est réduite. La réduction de l'activité kinase associée à Cdc28 est nécessaire pour coordonner la croissance cellulaire et le niveau de nutriment disponible dans l'habitat des cellules. Nous avons montré aussi que le niveau de Cak1 est fortement réduit en phase stationnaire. L'ensemble de nos résultats montrent que l'activité kinase associée à Cdc28 joue un rôle clé au cours des modifications du cycle cellulaire et de la morphologie cellulaire en réponse à des changements environnementaux. La réduction du niveau de phosphorylation de Cdc28T169 en réponse à une carence en glucose est due soit à une inhibition de la CAK, soit à une activation des phosphatases déphosphorylation de la thréonine activatrice de Cdc28, il s'agit de PTC2 et PTC3. Lors de cette recherche nous avons montré aussi que les phosphatases *CDC14*, *GLC7*, *PPH21*, *PPH22*, *PPH3*, *PPZ1*, *PPZ2*, *PTC2*, *PTC3* et *SIT4* stimulent la croissance filamenteuse. Les voies de régulation de la différenciation

Nous avons également isolé les gènes *GAL11*, *GSH2*, *SSP1*, *SPA2* et *SCO2/MRF1*' comme inducteurs et suppresseurs du phénotype hyper-filamenteux de la souche *cak1-4* respectivement.

Nous avons trouvé que les mutations dans les gènes *PAF1*, *CTR9* et *GP11* sont colétales avec les mutations *cak1-2* et *cak1-4*. Ainsi il existe des interactions génétiques entre *CAK1* et les gènes *PAF1*, *CTR9* et *GP11*. L'équipe de Morgan a montré que Cak1 phosphoryle Kin28 sur la thréonine 162 et suggère que Cak1 pourrait réguler la transcription. Néanmoins un mutant Kin28T162A n'a pas de phénotype apparent. Nos résultats suggèrent fortement que Cak1 joue un rôle dans la régulation de la machinerie de la transcription. Des expériences biochimiques sont en cours pour savoir si la protéine Cak1 interagit physiquement avec les facteurs Paf1, Ctr9 et Gpi1. Il est donc possible que Cak1 coordonne l'avancement dans le cycle cellulaire et l'expression génique.

La régulation de la phosphorylation activatrice n'a jamais été décrite chez la levure. La communauté scientifique considère que la phosphorylation activatrice des CDKs par Cak1 est constitutive. Nous avons identifié une nouvelle famille de protéines kinases responsables de la phosphorylation activatrice des CDKs : la famille *CAK1*. Cette famille semble être spécifique aux champignons et ne présente pas d'homologue chez les eucaryotes supérieurs. La température de 37°C est nécessaire pour induire la filamentation chez *C. albicans*. Les voies de signalisation cellulaires activées par la température de 37°C sont inconnues. Nous avons découvert que la température de l'hôte semble induire une forte réduction de la phosphorylation activatrice de CaCdc28.

Finalement, nos résultats génétiques suggèrent que la kinase *JNK3* humaine pourrait avoir une activité CAK chez la levure. En effet, la sur-expression de cette kinase supprime le défaut de croissance du mutant *cak1-4*. Des efforts considérables de plusieurs laboratoires ont été consacrés à la recherche de l'homologue humain de Cak1. Des études biochimiques et génétiques sur des cellules de mammifères sont indispensables pour attribuer une activité CAK à la kinase *JNK3*.



Figure V. Régulation de la filamentation par Cak1, Clb2 et Xbp1. Le complexe CDK-Cycline B actif réprime la filamentation. La reduction de la phosphorylation activatrice de Cdc2S déréprime la filamentation au cours de la croissance hyphale chez *C. albicans* et la croissance invasive chez *S. cerevisiae*. Ce mécanisme reste possible chez les cellules diploïdes de *S. cerevisiae*. Cependant la réduction de l'expression de CLB2 est suffisante pour induire une élongation cellulaire chez les cellules diploïdes de *S. cerevisiae*.
Références

A

Ahn, S. H., Acurio, A., et Kron, S. J. (1999). Regulation of G2/M progression by the STE mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast filamentous growth. Mol Biol Cell *10*, 3301-16.

Ammerer, G. (1994). Sex, stress and integrity: the importance of MAP kinases in yeast. Curr Opin Genet Dev 4, 90-5.

Amon, A. (1997). Regulation of B-type cyclin proteolysis by Cdc28-associated kinases in budding yeast. Embo J *16*, 2693-702.

Amon, A., Irniger, S., et Nasmyth, K. (1994). Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. Cell 77, 1037-50.

Amon, A., Surana, U., Muroff, I., et Nasmyth, K. (1992). Regulation of p34CDC28 tyrosine phosphorylation is not required for entry into mitosis in S. cerevisiae. Nature *355*, 368-71.

Amon, A., Tyers, M., Futcher, B., et Nasmyth, K. (1993). Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. Cell 74, 993-1007.

Ansari, K., Martin, S., Farkasovsky, M., Ehbrecht, I. M., et Kuntzel, H. (1999). Phospholipase C binds to the receptor-like GPR1 protein and controls pseudohyphal differentiation in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 274, 30052-8.

Aprelikova, O., Xiong, Y., et Liu, E. T. (1995). Both p16 and p21 families of cyclindependent kinase (CDK) inhibitors block the phosphorylation of cyclin-dependent kinases by the CDK- activating kinase. J Biol Chem 270, 18195-7.

B

Bardwell, L., Cook, J. G., Zhu-Shimoni, J. X., Voora, D., et Thorner, J. (1998). Differential regulation of transcription: repression by unactivated mitogen-activated protein kinase Kss1 requires the Dig1 and Dig2 proteins. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 15400-5.

Barral, Y., Jentsch, S., et Mann, C. (1995). G1 cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast. Genes Dev 9, 399-409.

Barral, Y., Parra, M., Bidlingmaier, S., et Snyder, M. (1999). Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. Genes Dev *13*, 176-87.

Basco, R. D., Segal, M. D., et Reed, S. I. (1995). Negative regulation of G1 and G2 by S-phase cyclins of Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol *15*, 5030-42.

Bender, A., et Pringle, J. R. (1991). Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressee mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol *11*, 1295-305.

Bernhardt, J., Zimmermann, K., Schulz, K., Knoke, M., et Bernhardt, H. (2000). Oesophageal candidosis in intensive care patients. Mycoses *43*, 377-9.

Blacketer, M. J., Koehler, C. M., Coats, S. G., Myers, A. M., et Madaule, P. (1993). Regulation of dimorphism in Saccharomyces cerevisiae: involvement of the novel protein kinase homolog Elm1p and protein phosphatase 2A. Mol Cell Biol *13*, 5567-81.

Booher, R. N., Deshaies, R. J., et Kirschner, M. W. (1993). Properties of Saccharomyces cerevisiae weel and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. Embo J *12*, 3417-26.

Boschman, C. R., Bodnar, U. R., Tornatore, M. A., Obias, A. A., Noskin, G. A., Englund, K., Postelnick, M. A., Suriano, T., et Peterson, L. R. (1998). Thirteen-year evolution of azole resistance in yeast isolates and prevalence of resistant strains carried by cancer patients at a large medical center. Antimicrob Agents Chemother *42*, 734-8.

Bourne, Y., Watson, M. H., Hickey, M. J., Holmes, W., Rocque, W., Reed, S. I., et Tainer, J. A. (1996). Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. Cell *84*, 863-74.

Braun, B. R., et Johnson, A. D. (1997). Control of filament formation in Candida albicans by the transcriptional repressor TUP1. Science 277, 105-9.

Broek, D., Bartlett, R., Crawford, K., et Nurse, P. (1991). Involvement of p34cdc2 in establishing the dependency of S phase on mitosis. Nature *349*, 388-93.

Brown, D. H., Jr., Giusani, A. D., Chen, X., et Kumamoto, C. A. (1999). Filamentous growth of Candida albicans in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. Mol Microbiol *34*, 651-62.

Buck, V., Russell, P., et Millar, J. B. (1995). Identification of a cdk-activating kinase in fission yeast. Embo J 14, 6173-83.

C

Cali, B. M., Doyle, T. C., Botstein, D., et Fink, G. R. (1998). Multiple functions for actin during filamentous growth of Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell *9*, 1873-89.

Chandarlapaty, S., et Errede, B. (1998). Ash1, a daughter cell-specific protein, is required for pseudohyphal growth of Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol *18*, 2884-91.

Chang, M., French-Cornay, D., Fan, H. Y., Klein, H., Denis, C. L., et Jaehning, J. A. (1999). A complex containing RNA polymerase II, Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, and Ccr4p plays a role in protein kinase C signaling. Mol Cell Biol *19*, 1056-67.

Chant, J. (1999). Cell polarity in yeast. Annu Rev Cell Dev Biol 15, 365-91.

Chen, J., Zhou, S., Wang, Q., Chen, X., Pan, T., et Liu, H. (2000). Crk1, a novel Cdc2-related protein kinase, is required for hyphal development and virulence in Candida albicans. Mol Cell Biol *20*, 8696-708.

Chen, M. X., McPartlin, A. E., Brown, L., Chen, Y. H., Barker, H. M., et Cohen, P. T. (1994). A novel human protein serine/threonine phosphatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus. Embo J *13*, 4278-90.

Cheng, A., Ross, K. E., Kaldis, P., et Solomon, M. J. (1999). Dephosphorylation of cyclindependent kinases by type 2C protein phosphatases. Genes Dev 13, 2946-57.

Choi, Y. J., Kim, S. K., Kim, S. H., Lee, K. S., et Choi, K. Y. (2000). Saccharomyces cerevisiae Ste5 is important for induction and substrate specificity of Fus3 MAP kinase in the pheromone signaling pathway. Mol Cells *10*, 301-8.

Cismowski, M. J., Laff, G. M., Solomon, M. J., et Reed, S. I. (1995). KIN28 encodes a C-terminal domain kinase that controls mRNA transcription in Saccharomyces cerevisiae but lacks cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) activity. Mol Cell Biol *15*, 2983-92.

Clotet, J., Gari, E., Aldea, M., et Arino, J. (1999). The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. Mol Cell Biol *19*, 2408-15.

Colomina, N., Gari, E., Gallego, C., Herrero, E., et Aldea, M. (1999). G1 cyclins block the Ime1 pathway to make mitosis and meiosis incompatible in budding yeast. Embo J *18*, 320-9.

Conte, D., Jr., et Curcio, M. J. (2000). Fus3 controls Ty1 transpositional dormancy through the invasive growth MAPK pathway. Mol Microbiol *35*, 415-27.

Cook, J. G., Bardwell, L., Kron, S. J., et Thorner, J. (1996). Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Genes Dev *10*, 2831-48.

Cook, J. G., Bardwell, L., et Thorner, J. (1997). Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the S. cerevisiae filamentous-growth signalling pathway. Nature *390*, 85-8.

Cross, F. R., et Levine, K. (2000). Genetic analysis of the relationship between activation loop phosphorylation and cyclin binding in the activation of the Saccharomyces cerevisiae Cdc28p cyclin-dependent kinase. Genetics *154*, 1549-59.

Cullen, P. J., et Sprague, G. F., Jr. (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 13619-24.

D

Damagnez, V., et Cottarel, G. (1996). Candida albicans CDK1 and CYB1: cDNA homologues of the cdc2/CDC28 and cdc13/CLB1/CLB2 cell cycle control genes. Gene *172*, 137-41.

Damagnez, V., Makela, T. P., et Cottarel, G. (1995). Schizosaccharomyces pombe Mopl-Mcs2 is related to mammalian CAK. Embo J *14*, 6164-72.

Darbon, J. M., Devault, A., Taviaux, S., Fesquet, D., Martinez, A. M., Galas, S., Cavadore, J. C., Doree, M., et Blanchard, J. M. (1994). Cloning, expression and subcellular localization of the human homolog of p40MO15 catalytic subunit of cdk-activating kinase. Oncogene *9*, 3127-38.

Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. Cell 103, 239-52.

De Bondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., et Kim, S. H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. Nature *363*, 595-602.

Desai, D., Gu, Y., et Morgan, D. O. (1992). Activation of human cyclin-dependent kinases in vitro. Mol Biol Cell *3*, 571-82.

Desai, D., Wessling, H. C., Fisher, R. P., et Morgan, D. O. (1995). Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2. Mol Cell Biol *15*, 345-50.

Devault, A., Martinez, A. M., Fesquet, D., Labbe, J. C., Morin, N., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Cavadore, J. C., et Doree, M. (1995). MAT1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and Xenopus CAK. Embo J 14, 5027-36.

Di Como, C. J., Bose, R., et Arndt, K. T. (1995). Overexpression of SIS2, which contains an extremely acidic region, increases the expression of SWI4, CLN1 and CLN2 in sit4 mutants. Genetics *139*, 95-107.

Di Como, C. J., Chang, H., et Arndt, K. T. (1995). Activation of CLN1 and CLN2 G1 cyclin gene expression by BCK2. Mol Cell Biol *15*, 1835-46.

Diehl, J. A., Zindy, F., et Sherr, C. J. (1997). Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. Genes Dev 11, 957-72.

Dirick, L., Bohm, T., et Nasmyth, K. (1995). Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of Saccharomyces cerevisiae. Embo J *14*, 4803-13.

Dirick, L., et Nasmyth, K. (1991). Positive feedback in the activation of G1 cyclins in yeast. Nature *351*, 754-7.

Donzeau, M., et Bandlow, W. (1999). The yeast trimeric guanine nucleotide-binding protein alpha subunit, Gpa2p, controls the meiosis-specific kinase Ime2p activity in response to nutrients. Mol Cell Biol *19*, 6110-9.

Doree, M., et Galas, S. (1994). The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. Faseb J *8*, 1114-21.

Drapkin, R., Le Roy, G., Cho, H., Akoulitchev, S., et Reinberg, D. (1996). Human cyclindependent kinase-activating kinase exists in three distinct complexes. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 6488-93.

Drubin, D. G., and Nelson, W. J. (1996). Origins of cell polarity. Cell 84, 335-44.

E

Edgington, N. P., Blacketer, M. J., Bierwagen, T. A., et Myers, A. M. (1999). Control of Saccharomyces cerevisiae filamentous growth by cyclin- dependent kinase Cdc28. Mol Cell Biol *19*, 1369-80.

Elion, E. A. (2000). Pheromone response, mating and cell biology. Curr Opin Microbiol 3, 573-81.

Enke, D. A., Kaldis, P., Holmes, J. K., et Solomon, M. J. (1999). The CDK-activating kinase (Cak1p) from budding yeast has an unusual ATP- binding pocket. J Biol Chem 274, 1949-56.

Ernst, J. F. (2000). Transcription factors in Candida albicans - environmental control of morphogenesis. Microbiology 146, 1763-74.

Errede, B., et Ammerer, G. (1989). STE12, a protein involved in cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast, is part of protein-DNA complexes. Genes Dev 3, 1349-61.

Espinoza, F. H., Farrell, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., et Morgan, D. O. (1996). A cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK. Science *273*, 1714-7.

Espinoza, F. H., Farrell, A., Nourse, J. L., Chamberlin, H. M., Gileadi, O., et Morgan, D. O. (1998). Cak1 is required for Kin28 phosphorylation and activation in vivo. Mol Cell Biol *18*, 6365-73.

Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., et Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. Cell *33*, 389-96.

F

Farrell, A., et Morgan, D. O. (2000). Cdc37 promotes the stability of protein kinases Cdc28 and Cak1. Mol Cell Biol *20*, 749-54.

Faye, G., Simon, M., Valay, J. G., Fesquet, D., et Facca, C. (1997). Rig2, a RING finger protein that interacts with the Kin28/Ccl1 CTD kinase in yeast. Mol Gen Genet 255, 460-6.

Feaver, W. J., Svejstrup, J. Q., Henry, N. L., et Kornberg, R. D. (1994). Relationship of CDKactivating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIH/TFIIK. Cell *79*, 1103-9. Fernandez-Sarabia, M. J., Sutton, A., Zhong, T., et Arndt, K. T. (1992). SIT4 protein phosphatase is required for the normal accumulation of SWI4, CLN1, CLN2, and HCS26 RNAs during late G1. Genes Dev *6*, 2417-28.

Fesquet, D., Labbe, J. C., Derancourt, J., Capony, J. P., Galas, S., Girard, F., Lorca, T., Shuttleworth, J., Doree, M., et Cavadore, J. C. (1993). The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. Embo J *12*, 3111-21.

Fidel, P. L., Jr., et Sobel, J. D. (1996). Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. Clin Microbiol Rev 9, 335-48.

Fisher, N. C., Cooper, M. A., Hastings, J. G., et Mutimer, D. J. (1998). Fungal colonisation and fluconazole therapy in acute liver disease. Liver 18, 320-5.

Fisher, R. P., Jin, P., Chamberlin, H. M., et Morgan, D. O. (1995). Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase. Cell *83*, 47-57.

Fisher, R. P., et Morgan, D. O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. Cell 78, 713-24.

Fujita, A., Tonouchi, A., Hiroko, T., Inose, F., Nagashima, T., Satoh, R., et Tanaka, S. (1999). Hsl7p, a negative regulator of Ste20p protein kinase in the Saccharomyces cerevisiae filamentous growth-signaling pathway. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 8522-7.

G

Gagiano, M., van Dyk, D., Bauer, F. F., Lambrechts, M. G., et Pretorius, I. S. (1999). Msn1p/Mss10p, Mss11p and Muc1p/Flo11p are part of a signal transduction pathway downstream of Mep2p regulating invasive growth and pseudohyphal differentiation in Saccharomyces cerevisiae. Mol Microbiol *31*, 103-16.

Gale, C. A., Bendel, C. M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J. M., Berman, J., et Hostetter, M. K. (1998). Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in Candida albicans to a single gene, INT1. Science 279, 1355-8.

Gancedo, J. M. (2001). Control of pseudohyphae formation in Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiol Rev 25, 107-23.

Garrington, T. P., et Johnson, G. L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Curr Opin Cell Biol *11*, 211-8.

Gavrias, V., Andrianopoulos, A., Gimeno, C. J., et Timberlake, W. E. (1996). Saccharomyces cerevisiae TEC1 is required for pseudohyphal growth. Mol Microbiol *19*, 1255-63.

Ghislain, M., Udvardy, A., et Mann, C. (1993). S. cerevisiae 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase. Nature *366*, 358-62.

Gimeno, C. J., et Fink, G. R. (1994). Induction of pseudohyphal growth by overexpression of PHD1, a Saccharomyces cerevisiae gene related to transcriptional regulators of fungal development. Mol Cell Biol *14*, 2100-12.

Gimeno, C. J., et Fink, G. R. (1992). The logic of cell division in the life cycle of yeast. Science 257, 626.

Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A., et Fink, G. R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast S. cerevisiae lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. Cell *68*, 1077-90.

Glotzer, M., Murray, A. W., et Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. Nature *349*, 132-8.

Gow, N. A., Brown, A. J., et Odds, F. C. (2000). Candida's arranged marriage. Science 289, 256-7.

Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., et Brent, R. (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. Cell 75, 791-803.

Η

Hadwiger, J. A., Wittenberg, C., Richardson, H. E., de Barros Lopes, M., et Reed, S. I. (1989). A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A *86*, 6255-9.

Hanks, S. K., Quinn, A. M., et Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science 241, 42-52.

Hannon, G. J., Casso, D., et Beach, D. (1994). KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin- dependent kinases. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 1731-5.

Harper, J. W., et Elledge, S. J. (1998). The role of Cdk7 in CAK function, a retroretrospective. Genes Dev 12, 285-9.

Hartwell, L. H. (1974). Saccharomyces cerevisiae cell cycle. Bacteriol Rev 38, 164-98.

Herscovics, A., et Orlean, P. (1993). Glycoprotein biosynthesis in yeast. Faseb J 7, 540-50.

Herskowitz, I. (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. Cell 80, 187-97.

Hisamoto, N., Sugimoto, K., et Matsumoto, K. (1994). The Glc7 type 1 protein phosphatase of Saccharomyces cerevisiae is required for cell cycle progression in G2/M. Mol Cell Biol *14*, 3158-65.

Hollenhorst, P. C., Bose, M. E., Mielke, M. R., Muller, U., et Fox, C. A. (2000). Forkhead genes in transcriptional silencing, cell morphology and the cell cycle. Overlapping and distinct functions for FKH1 and FKH2 in Saccharomyces cerevisiae. Genetics *154*, 1533-48.

Hube, B., Monod, M., Schofield, D. A., Brown, A. J., et Gow, N. A. (1994). Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in Candida albicans. Mol Microbiol 14, 87-99.

Hull, C. M., Raisner, R. M., et Johnson, A. D. (2000). Evidence for mating of the "asexual" yeast Candida albicans in a mammalian host. Science 289, 307-10.

I

Ishii, N., Yamamoto, M., Yoshihara, F., Arisawa, M., et Aoki, Y. (1997). Biochemical and genetic characterization of Rbf1p, a putative transcription factor of Candida albicans. Microbiology *143*, 429-35.

J

Jantti, J., Lahdenranta, J., Olkkonen, V. M., Soderlund, H., et Keranen, S. (1999). SEM1, a homologue of the split hand/split foot malformation candidate gene Dss1, regulates exocytosis and pseudohyphal differentiation in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 909-14.

Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., et Pavletich, N. P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. Nature *376*, 313-20.

Johnson, A., et Rothstein, H. (1970). Amphibian lens histones and their relation to the cell cycle. J Gen Physiol 55, 688-702.

Johnson, A. D. (1995). Molecular mechanisms of cell-type determination in budding yeast. Curr Opin Genet Dev 5, 552-8.

K

Kaiser, P., Moncollin, V., Clarke, D. J., Watson, M. H., Bertolaet, B. L., Reed, S. I., et Bailly, E. (1999). Cyclin-dependent kinase and Cks/Suc1 interact with the proteasome in yeast to control proteolysis of M-phase targets. Genes Dev *13*, 1190-202.

Kaldis, P., Pitluk, Z. W., Bany, I. A., Enke, D. A., Wagner, M., Winter, E., et Solomon, M. J. (1998). Localization and regulation of the cdk-activating kinase (Cak1p) from budding yeast. J Cell Sci *111*, 3585-96.

Kaldis, P., et Solomon, M. J. (2000). Analysis of CAK activities from human cells. Eur J Biochem 267, 4213-21.

Kaldis, P., Sutton, A., et Solomon, M. J. (1996). The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. Cell *86*, 553-64.

Knighton, D. R., Xuong, N. H., Taylor, S. S., et Sowadski, J. M. (1991). Crystallization studies of cAMP-dependent protein kinase. Cocrystals of the catalytic subunit with a 20

amino acid residue peptide inhibitor and MgATP diffract to 3.0 A resolution. J Mol Biol 220, 217-20.

Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S., et Sowadski, J. M. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. Science *253*, 407-14.

Kominami, K., DeMartino, G. N., Moomaw, C. R., Slaughter, C. A., Shimbara, N., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Hisamatsu, H., Tanahashi, N., Shimizu, Y.,et al. (1995). Nin1p, a regulatory subunit of the 26S proteasome, is necessary for activation of Cdc28p kinase of Saccharomyces cerevisiae. Embo J *14*, 3105-15.

Kominami, K., et Toh-e, A. (1994). Characterization of the function of the NIN1 gene product of Saccharomyces cerevisiae. Exp Cell Res *211*, 203-11.

Kondo, M., Weissman, I. L., et Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. Cell *91*, 661-72.

Kron, S. J. (1997). Filamentous growth in budding yeast. Trends Microbiol 5, 450-4.

Kron, S. J., et Gow, N. A. (1995). Budding yeast morphogenesis: signalling, cytoskeleton and cell cycle. Curr Opin Cell Biol 7, 845-55.

Kron, S. J., Styles, C. A., et Fink, G. R. (1994). Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell *5*, 1003-22.

Kubler, E., Mosch, H. U., Rupp, S., et Lisanti, M. P. (1997). Gpa2p, a G-protein alphasubunit, regulates growth and pseudohyphal development in Saccharomyces cerevisiae via a cAMP-dependent mechanism. J Biol Chem 272, 20321-3.

L

Labbe, J. C., Martinez, A. M., Fesquet, D., Capony, J. P., Darbon, J. M., Derancourt, J., Devault, A., Morin, N., Cavadore, J. C., et Doree, M. (1994). p40MO15 associates with a p36 subunit and requires both nuclear translocation and Thr176 phosphorylation to generate cdk-activating kinase activity in Xenopus oocytes. Embo J *13*, 5155-64.

Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L., et Sternglanz, R. (2000). The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 5807-11.

Larochelle, S., Pandur, J., Fisher, R. P., Salz, H. K., et Suter, B. (1998). Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity. Genes Dev *12*, 370-81.

Leberer, E., Harcus, D., Broadbent, I. D., Clark, K. L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N. A., Brown, A. J., et Thomas, D. Y. (1996). Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus Candida albicans. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 13217-22.

Leng, P., Sudbery, P. E., et Brown, A. J. (2000). Rad6p represses yeast-hypha morphogenesis in the human fungal pathogen Candida albicans. Mol Microbiol *35*, 1264-75.

Levine, K., Oehlen, L. J., et Cross, F. R. (1998). Isolation and characterization of new alleles of the cyclin-dependent kinase gene CDC28 with cyclin-specific functional and biochemical defects. Mol Cell Biol *18*, 290-302.

Lew, D. J., et Reed, S. I. (1995). Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. Curr Opin Genet Dev 5, 17-23.

Lim, H. H., Loy, C. J., Zaman, S., et Surana, U. (1996). Dephosphorylation of threonine 169 of Cdc28 is not required for exit from mitosis but may be necessary for start in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol *16*, 4573-83.

Lin, F. C., et Arndt, K. T. (1995). The role of Saccharomyces cerevisiae type 2A phosphatase in the actin cytoskeleton and in entry into mitosis. Embo J *14*, 2745-59.

Liu, H., Kohler, J., et Fink, G. R. (1994). Suppression of hyphal formation in Candida albicans by mutation of a STE12 homolog. Science *266*, 1723-6.

Liu, H., Styles, C. A., et Fink, G. R. (1993). Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. Science *262*, 1741-4.

Liu, H., Styles, C. A., et Fink, G. R. (1996). Saccharomyces cerevisiae S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. Genetics *144*, 967-78.

Liu, J., et Kipreos, E. T. (2000). Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDKactivating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. Mol Biol Evol *17*, 1061-74.

Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., et Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous C. albicans mutants are avirulent. Cell *90*, 939-49.

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, 161-71.

Lo, W. S., et Dranginis, A. M. (1996). FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. J Bacteriol *178*, 7144-51.

Loeb, J. D., Sepulveda-Becerra, M., Hazan, I., et Liu, H. (1999). A G1 cyclin is necessary for maintenance of filamentous growth in Candida albicans. Mol Cell Biol *19*, 4019-27.

Lorenz, M. C., et Heitman, J. (1998). The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in Saccharomyces cerevisiae. Embo J 17, 1236-47.

Lorenz, M. C., et Heitman, J. (1998). Regulators of pseudohyphal differentiation in Saccharomyces cerevisiae identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. Genetics *150*, 1443-57.

Lorenz, M. C., et Heitman, J. (1997). Yeast pseudohyphal growth is regulated by GPA2, a G protein alpha homolog. Embo J *16*, 7008-18.

Lorenz, M. C., Pan, X., Harashima, T., Cardenas, M. E., Xue, Y., Hirsch, J. P., et Heitman, J. (2000). The G protein-coupled receptor gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in Saccharomyces cerevisiae. Genetics *154*, 609-22.

Lundstrom, T., et Sobel, J. (2001). Nosocomial candiduria: a review. Clin Infect Dis 32, 1602-7.

Μ

Madden, K., et Snyder, M. (1998). Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. Annu Rev Microbiol 52, 687-744.

Madhani, H. D., et Fink, G. R. (1997). Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. Science 275, 1314-7.

Madhani, H. D., et Fink, G. R. (1998). The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. Trends Cell Biol *8*, 348-53.

Madhani, H. D., et Fink, G. R. (1998). The riddle of MAP kinase signaling specificity. Trends Genet 14, 151-5.

Madhani, H. D., Galitski, T., Lander, E. S., et Fink, G. R. (1999). Effectors of a developmental mitogen-activated protein kinase cascade revealed by expression signatures of signaling mutants. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 12530-5.

Madhani, H. D., Styles, C. A., et Fink, G. R. (1997). MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. Cell *91*, 673-84.

Magee, B. B., et Magee, P. T. (2000). Induction of mating in Candida albicans by construction of MTLa and MTLalpha strains. Science 289, 310-3.

Maher, M., Cong, F., Kindelberger, D., Nasmyth, K., et Dalton, S. (1995). Cell cycleregulated transcription of the CLB2 gene is dependent on Mcm1 and a ternary complex factor. Mol Cell Biol *15*, 3129-37.

Mai, B., et Breeden, L. (2000). CLN1 and its repression by Xbp1 are important for efficient sporulation in budding yeast. Mol Cell Biol 20, 478-87.

Mai, B., et Breeden, L. (1997). Xbp1, a stress-induced transcriptional repressor of the Saccharomyces cerevisiae Swi4/Mbp1 family. Mol Cell Biol 17, 6491-501.

Makela, T. P., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Frutiger, S., Hughes, G. J., et Weinberg, R. A. (1994). A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. Nature *371*, 254-7.

Marini, A. M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., et Andre, B. (1997). A family of ammonium transporters in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol *17*, 4282-93.

Martinez, A. M., Afshar, M., Martin, F., Cavadore, J. C., Labbe, J. C., et Doree, M. (1997). Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity. Embo J *16*, 343-54.

Matsuoka, M., Kato, J. Y., Fisher, R. P., Morgan, D. O., et Sherr, C. J. (1994). Activation of cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) by mouse MO15-associated kinase. Mol Cell Biol *14*, 7265-75.

McMillan, J. N., Sia, R. A., Bardes, E. S., et Lew, D. J. (1999). Phosphorylation-independent inhibition of Cdc28p by the tyrosine kinase Swe1p in the morphogenesis checkpoint. Mol Cell Biol *19*, 5981-90.

Miled, C., Mann, C., et Faye, G. (2001). Xbp1-mediated repression of clb gene expression contributes to the modifications of yeast cell morphology and cell cycle seen during nitrogenlimited growth. Mol Cell Biol *21*, 3714-24.

Mizunuma, M., Hirata, D., Miyaoka, R., et Miyakawa, T. (2001). GSK-3 kinase Mck1 and calcineurin coordinately mediate Hsl1 down- regulation by Ca2+ in budding yeast. Embo J *20*, 1074-85.

Molz, L., et Beach, D. (1993). Characterization of the fission yeast mcs2 cyclin and its associated protein kinase activity. Embo J 12, 1723-32.

Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. Annu Rev Cell Dev Biol 13, 261-91.

Morgan, D. O. (1996). Under arrest at atomic resolution. Nature 382, 295-6.

Morgan, D. O., et De Bondt, H. L. (1994). Protein kinase regulation: insights from crystal structure analysis. Curr Opin Cell Biol *6*, 239-46.

Mosch, H. U., et Fink, G. R. (1997). Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 145, 671-84.

Mosch, H. U., Roberts, R. L., et Fink, G. R. (1996). Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 5352-6.

Murphy, A. R., et Kavanagh, K. A. (2001). Adherence of clinical isolates of Saccharomyces cerevisiae to buccal epithelial cells. Med Mycol *39*, 123-7.

Murray, A. W., et Kirschner, M. W. (1989). Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. Nature *339*, 275-80.

Murray, A. W., Solomon, M. J., et Kirschner, M. W. (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. Nature *339*, 280-6.

Murray, L. E., Rowley, N., Dawes, I. W., Johnston, G. C., et Singer, R. A. (1998). A yeast glutamine tRNA signals nitrogen status for regulation of dimorphic growth and sporulation. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 8619-24.

Myers, L. C., and Kornberg, R. D. (2000). Mediator of transcriptional regulation. Annu Rev Biochem 69, 729-49.

N

Nagahara, H., Ezhevsky, S. A., Vocero-Akbani, A. M., Kaldis, P., Solomon, M. J., et Dowdy, S. F. (1999). Transforming growth factor beta targeted inactivation of cyclin E:cyclindependent kinase 2 (Cdk2) complexes by inhibition of Cdk2 activating kinase activity. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 14961-6.

Nasmyth, K. (1993). Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. Curr Opin Cell Biol 5, 166-79.

Neufeld, T. P., et Edgar, B. A. (1998). Connections between growth and the cell cycle. Curr Opin Cell Biol *10*, 784-90.

Newport, J. W., et Kirschner, M. W. (1984). Regulation of the cell cycle during early Xenopus development. Cell 37, 731-42.

Nigg, E. A. (1996). Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? Curr Opin Cell Biol *8*, 312-7.

Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. Bioessays 17, 471-80.

Nilsson, I., et Hoffmann, I. (2000). Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. Prog Cell Cycle Res *4*, 107-14.

Noton, E., et Diffley, J. F. (2000). CDK inactivation is the only essential function of the APC/C and the mitotic exit network proteins for origin resetting during mitosis. Mol Cell 5, 85-95.

Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. Nature *344*, 503-8.

0

Odds, F. C., Brown, A. J., et Gow, N. A. (2000). Might Candida albicans be made to mate after all? Trends Microbiol *8*, 4-6.

Oehlen, L. J., et Cross, F. R. (1998). Potential regulation of Ste20 function by the Cln1-Cdc28 and Cln2-Cdc28 cyclin-dependent protein kinases. J Biol Chem *273*, 25089-97.

P

Padmashree, C. G., et Surana, U. (2001). Cdc28-Clb mitotic kinase negatively regulates bud site assembly in the budding yeast. J Cell Sci 114, 207-218.

Palmer, A., et Nebreda, A. R. (2000). The activation of MAP kinase and p34cdc2/cyclin B during the meiotic maturation of Xenopus oocytes. Prog Cell Cycle Res *4*, 131-43.

Pan, X., et Heitman, J. (1999). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol *19*, 4874-87.

Parker, L. L., et Piwnica-Worms, H. (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. Science *257*, 1955-7.

Pati, D., Keller, C., Groudine, M., et Plon, S. E. (1997). Reconstitution of a MEC1independent checkpoint in yeast by expression of a novel human fork head cDNA. Mol Cell Biol 17, 3037-46.

Perez-Martin, J., Uria, J. A., et Johnson, A. D. (1999). Phenotypic switching in Candida albicans is controlled by a SIR2 gene. Embo J 18, 2580-92.

Peter, M. (1997). The regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). Prog Cell Cycle Res 3, 99-108.

Peter, M., Gartner, A., Horecka, J., Ammerer, G., et Herskowitz, I. (1993). FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. Cell *73*, 747-60.

Peter, M., et Herskowitz, I. (1994). Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. Science *265*, 1228-31.

Pines, J. (1995). Cell cycle. Confirmational change. Nature 376, 294-5.

Poon, R. Y., et Hunter, T. (1995). Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclindependent kinase- interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. Science 270, 90-3.

Poon, R. Y., Toyoshima, H., et Hunter, T. (1995). Redistribution of the CDK inhibitor p27 between different cyclin.CDK complexes in the mouse fibroblast cell cycle and in cells arrested with lovastatin or ultraviolet irradiation. Mol Biol Cell *6*, 1197-213.

Poon, R. Y., Yamashita, K., Adamczewski, J. P., Hunt, T., et Shuttleworth, J. (1993). The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. Embo J *12*, 3123-32.

Posas, F., Takekawa, M., et Saito, H. (1998). Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. Curr Opin Microbiol *1*, 175-82.

Ramon, A. M., Porta, A., et Fonzi, W. A. (1999). Effect of environmental pH on morphological development of Candida albicans is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by PRR2. J Bacteriol *181*, 7524-30.

Rao, P. N., et Johnson, R. T. (1970). Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. Nature 225, 159-64.

Reed, S. I. (1992). The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition. Annu Rev Cell Biol 8, 529-61.

Reed, S. I., Hadwiger, J. A., Richardson, H. E., et Wittenberg, C. (1989). Analysis of the Cdc28 protein kinase complex by dosage suppression. J Cell Sci Suppl *12*, 29-37.

Richardson, H., Lew, D. J., Henze, M., Sugimoto, K., et Reed, S. I. (1992). Cyclin-B homologs in Saccharomyces cerevisiae function in S phase and in G2. Genes Dev 6, 2021-34.

Richardson, H. E., Wittenberg, C., Cross, F., et Reed, S. I. (1989). An essential G1 function for cyclin-like proteins in yeast. Cell *59*, 1127-33.

Riggle, P. J., Andrutis, K. A., Chen, X., Tzipori, S. R., et Kumamoto, C. A. (1999). Invasive lesions containing filamentous forms produced by a Candida albicans mutant that is defective in filamentous growth in culture. Infect Immun *67*, 3649-52.

Roberts, R. L., et Fink, G. R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in Saccharomyces cerevisiae mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. Genes Dev *8*, 2974-85.

Roberts, R. L., Mosch, H. U., et Fink, G. R. (1997). 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in S. cerevisiae. Cell *89*, 1055-65.

Robertson, L. S., et Fink, G. R. (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 13783-7.

Roemer, T., Vallier, L., Sheu, Y. J., et Snyder, M. (1998). The Spa2-related protein, Sph1p, is important for polarized growth in yeast. J Cell Sci *111*, 479-94.

Ross, K. E., Kaldis, P., et Solomon, M. J. (2000). Activating phosphorylation of the Saccharomyces cerevisiae cyclin- dependent kinase, cdc28p, precedes cyclin binding. Mol Biol Cell *11*, 1597-609.

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 J *18*, 1257-69.

S

Sakumoto, N., Mukai, Y., Uchida, K., Kouchi, T., Kuwajima, J., Nakagawa, Y., Sugioka, S., Yamamoto, E., Furuyama, T., Mizubuchi, H., Ohsugi, N., Sakuno, T., Kikuchi, K., Matsuoka,

I., Ogawa, N., Kaneko, Y., et Harashima, S. (1999). A series of protein phosphatase gene disruptants in Saccharomyces cerevisiae. Yeast 15, 1669-79.

Schwob, E., Bohm, T., Mendenhall, M. D., et Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in S. cerevisiae. Cell *79*, 233-44.

Serizawa, H., Conaway, J. W., et Conaway, R. C. (1994). An oligomeric form of the large subunit of transcription factor (TF) IIE activates phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl- terminal domain by TFIIH. J Biol Chem *269*, 20750-6.

Serizawa, H., Makela, T. P., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Weinberg, R. A., et Young, R. A. (1995). Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIIH. Nature *374*, 280-2.

Sheu, Y. J., Barral, Y., et Snyder, M. (2000). Polarized growth controls cell shape and bipolar bud site selection in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol *20*, 5235-47.

Sheu, Y. J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C., et Snyder, M. (1998). Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. Mol Cell Biol *18*, 4053-69.

Shiekhattar, R., Mermelstein, F., Fisher, R. P., Drapkin, R., Dynlacht, B., Wessling, H. C., Morgan, D. O., et Reinberg, D. (1995). Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIIH. Nature *374*, 283-7.

Simon, M., Seraphin, B., et Faye, G. (1986). KIN28, a yeast split gene coding for a putative protein kinase homologous to CDC28. Embo J *5*, 2697-701.

Solomon, M. J., Harper, J. W., et Shuttleworth, J. (1993). CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. Embo J *12*, 3133-42.

Sonneborn, A., Bockmuhl, D. P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D., et Ernst, J. F. (2000). Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of Candida albicans. Mol Microbiol *35*, 386-96.

Sonneborn, A., Tebarth, B., et Ernst, J. F. (1999). Control of white-opaque phenotypic switching in Candida albicans by the Efg1p morphogenetic regulator. Infect Immun *67*, 4655-60.

Sreenivasan, A., et Kellogg, D. (1999). The elm1 kinase functions in a mitotic signaling network in budding yeast. Mol Cell Biol *19*, 7983-94.

Stark, M. J. (1996). Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. Yeast 12, 1647-75.

Stark, M. J., Black, S., Sneddon, A. A., et Andrews, P. D. (1994). Genetic analyses of yeast protein serine/threonine phosphatases. FEMS Microbiol Lett *117*, 121-30.

Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, C. E., et Ernst, J. F. (1997). Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen Candida albicans, is a member of a

conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. Embo J 16, 1982-91.

Surana, U., Robitsch, H., Price, C., Schuster, T., Fitch, I., Futcher, A. B., et Nasmyth, K. (1991). The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast S. cerevisiae. Cell *65*, 145-61.

Sutton, A., et Freiman, R. (1997). The Cak1p protein kinase is required at G1/S and G2/M in the budding yeast cell cycle. Genetics *147*, 57-71.

T

Tassan, J. P., Jaquenoud, M., Fry, A. M., Frutiger, S., Hughes, G. J., et Nigg, E. A. (1995). In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. Embo J *14*, 5608-17.

Tedford, K., Kim, S., Sa, D., Stevens, K., et Tyers, M. (1997). Regulation of the mating pheromone and invasive growth responses in yeast by two MAP kinase substrates. Curr Biol *7*, 228-38.

Thuret, J. Y., Valay, J. G., Faye, G., et Mann, C. (1996). Civ1 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase. Cell *86*, 565-76.

U

Umeda, M., Bhalerao, R. P., Schell, J., Uchimiya, H., et Koncz, C. (1998). A distinct cyclindependent kinase-activating kinase of Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 5021-6.

V

Valay, J. G., Dubois, M. F., Bensaude, O., et Faye, G. (1996). Ccl1, A cyclin associated with protein kinase Kin28, controls the phosphorylation of RNA polymerase II largest subunit and mRNA transcription. C R Acad Sci III *319*, 183-9.

Valay, J. G., Simon, M., Dubois, M. F., Bensaude, O., Facca, C., et Faye, G. (1995). The KIN28 gene is required both for RNA polymerase II mediated transcription and phosphorylation of the Rpb1p CTD. J Mol Biol *249*, 535-44.

Valay, J. G., Simon, M., et Faye, G. (1993). The kin28 protein kinase is associated with a cyclin in Saccharomyces cerevisiae. J Mol Biol 234, 307-10.

Vandenbol, M., Jauniaux, J. C., et Grenson, M. (1990). The Saccharomyces cerevisiae NPR1 gene required for the activity of ammonia-sensitive amino acid permeases encodes a protein kinase homologue. Mol Gen Genet 222, 393-9.

W

Wagner, M., Pierce, M., et Winter, E. (1997). The CDK-activating kinase CAK1 can dosage suppress sporulation defects of smk1 MAP kinase mutants and is required for spore wall morphogenesis in Saccharomyces cerevisiae. Embo J *16*, 1305-17.

Walsh, T. J., Viviani, M. A., Arathoon, E., Chiou, C., Ghannoum, M., Groll, A. H., et Odds, F. C. (2000). New targets and delivery systems for antifungal therapy. Med Mycol *38*, 335-47.

Ward, M. P., Gimeno, C. J., Fink, G. R., et Garrett, S. (1995). SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. Mol Cell Biol *15*, 6854-63.

Whiteway, M. (2000). Transcriptional control of cell type and morphogenesis in Candida albicans. Curr Opin Microbiol *3*, 582-8.

Willems, A. R., Lanker, S., Patton, E. E., Craig, K. L., Nason, T. F., Mathias, N., Kobayashi, R., Wittenberg, C., et Tyers, M. (1996). Cdc53 targets phosphorylated G1 cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway. Cell *86*, 453-63.

Wittenberg, C., Sugimoto, K., et Reed, S. I. (1990). G1-specific cyclins of S. cerevisiae: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34CDC28 protein kinase. Cell *62*, 225-37.

Wu, L., et Russell, P. (1993). Nim1 kinase promotes mitosis by inactivating Wee1 tyrosine kinase. Nature *363*, 738-41.

Wu, L., Yee, A., Liu, L., Carbonaro-Hall, D., Venkatesan, N., Tolo, V. T., et Hall, F. L. (1994). Molecular cloning of the human CAK1 gene encoding a cyclin-dependent kinase-activating kinase. Oncogene *9*, 2089-96.

X

Xu, S., Falvey, D. A., et Brandriss, M. C. (1995). Roles of URE2 and GLN3 in the proline utilization pathway in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol *15*, 2321-30.

Y

Yang, S., Ayscough, K. R., et Drubin, D. G. (1997). A role for the actin cytoskeleton of Saccharomyces cerevisiae in bipolar bud-site selection. J Cell Biol *136*, 111-23.

Yee, A., Nichols, M. A., Wu, L., Hall, F. L., Kobayashi, R., et Xiong, Y. (1995). Molecular cloning of CDK7-associated human MAT1, a cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) assembly factor. Cancer Res *55*, 6058-62.

Z

Zhan, X. L., Deschenes, R. J., et Guan, K. L. (1997). Differential regulation of FUS3 MAP kinase by tyrosine-specific phosphatases PTP2/PTP3 and dual-specificity phosphatase MSG5 in Saccharomyces cerevisiae. Genes Dev *11*, 1690-702.

Zhu, G., Spellman, P. T., Volpe, T., Brown, P. O., Botstein, D., Davis, T. N., et Futcher, B. (2000). Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. Nature *406*, 90-4.

Zindy, F., Quelle, D. E., Roussel, M. F., et Sherr, C. J. (1997). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. Oncogene *15*, 203-11.