



**HAL**  
open science

**Etude de la voie de signalisation SnAK/SnRK1  
("SnRK1-Activating Kinase/SNF1-Related Kinase 1")  
chez *Arabidopsis thaliana***

Thomas Guérinier

► **To cite this version:**

Thomas Guérinier. Etude de la voie de signalisation SnAK/SnRK1 ("SnRK1-Activating Kinase/SNF1-Related Kinase 1") chez *Arabidopsis thaliana*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT: 2012PA112343 . tel-00833605

**HAL Id: tel-00833605**

**<https://theses.hal.science/tel-00833605>**

Submitted on 13 Jun 2013

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

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



UNIVERSITE PARIS-SUD – UFR des Sciences

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DU VEGETAL

## Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS SUD

Par

**Thomas GUERINIER**

# Etude de la voie de signalisation SnAK/SnRK1 ("SnRK1-Activating Kinase/SNF1-Related Kinase 1") chez *Arabidopsis thaliana*

Soutenance prévue le **18 décembre 2012**, devant le jury d'examen :

Elena BAENA-GONZALEZ  
Maryse LALOI  
Christian MEYER  
Guillaume TCHERKEZ  
Martine THOMAS

PI, Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras (Portugal)  
MCF, Université de Poitiers  
DR INRA – Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles  
Pr., Institut de Biologie des Plantes (UMR8618), Orsay  
MCF, Institut de Biologie des Plantes (UMR8618), Orsay

– Rapporteur  
– Rapporteur  
– Examineur  
– Examineur  
– Directrice de thèse





“Et je vous dis que la vie est en effet obscure sauf là où il y a élan,  
Et tout élan est aveugle sauf là où il y a la connaissance.  
Et toute connaissance est vaine sauf là où il y a le travail,  
Et tout travail est futile sauf là où il y a l'amour ;  
Et quand vous travaillez avec amour vous attachez votre être à votre être,  
et vous aux autres, et vous à Dieu.”

*Le prophète, Khalil Gibran*



## REMERCIEMENTS

I first want to sincerely thank Maryse Laloi and Elena Baena-González for the time you spent on this manuscript and for both the critical review and the helpful advices you provide to this work. Dear Elena, I spent so many hours on your paper during my PhD that if it should tell something about your personality, excepting the quality of the science you produce, I must know it! Maryse, c'est avec grand plaisir que nos chemins se croisent à nouveau et j'ose espérer que la lecture de ce manuscrit saura te convaincre du plaisir et de la passion qui ont accompagnés cette thèse.

Merci également à Guillaume Tcherkez et Christian Meyer dont les entrevues ici et là au cours de ces trois années m'ont dévoilé quelques couleurs du vaste tableau de la recherche en biologie végétale.

Martine, merci :

Sur les rives du fleuve recherche,  
Tu as pêché un Charentais.  
Fieffé jeunot en quête de perches,  
Sur sa route, sans un biais.

Intentionnellement ou non,  
Bravant ma Mansle natale,  
Paris, me voici, fais-toi une raison !

Dans cet univers citadin,  
C'est auprès de chef rouge-mèche  
Que j'ai vogué en fier bambin  
Sur les rives du fleuve recherche.

Irrésistiblement, sans aucune platitude,  
Bois ces paroles, mon cher Pierre !  
Par ces mots, ma prime gratitude.

Les vagues sont multiples,  
Tu n'as de cesse d'écoper,  
Afin qu'autour de toi, tes disciples  
S'épanouissent, talents développés.

Intensément, garde ton allant,  
Bonne Martine si passionnée.  
Permets-moi enfin, de te souhaiter bon vent.

J'ai grand peine à trouver les palabres adéquates, éviter les galimatias et autres amphigouris, pour que la justesse soit de mise. Jean, merci pour ta présence, ta patience, ton expérience et ton savoir.



Je n'oserais en aucune circonstance briser le si merveilleux triptyque qui me forma ! Pierre, tes qualités sont multiples et feront de toi, outre un brillant scientifique, un homme toujours à l'écoute de son prochain. Les voix du Seigneur sont impénétrables, mais je crois ne pas faire fausse route en affirmant ceci.

Au tour de l'équipe masculine d'à côté... un trio éclectique ! Mickael, au final il ne m'aura pas fallu si longtemps pour cerner qui était mon chef-chef. Rude mais jamais sans bonne raison. Pour le reste, que du bon ! Et ne sois pas si dur avec les anglais, ils ont bon fond ;-). Mathieu, des échanges multiples et très agréables qui m'ont dévoilé un calme olympien, une science rassurante et solide. Nous avons, entre autres choses partagées, une vision assez semblable du café et de ses bienfaits ! Je crois que l'équipe a une belle carte en main. Younes, euh... good luck ! Y'a du lourd dans ton sujet et un contexte enviable ; mélange bien, ajoute une pincée d'abnégation et il en ressortira, j'en suis convaincu, une belle thèse.

Nathalie, il y eu les manips, le soutien, les conseils avisés et le réconfort trouvé autour de thés/café/discussions. Je t'en suis très reconnaissant. Bon courage pour la suite, où qu'elle soit. Céline, à l'évidence je t'ai donné du fil à retordre, mais ne m'avait-on pas soufflé à ton arrivée : « Il faut qu'elle devienne vite le pilier de paillasse dont l'équipe a besoin ! ». Merci pour ton aide et ta jovialité constante, que seuls tes enfants (et les accrochages de voiture !) arrivent à perturber.

Mes mamies ! Malgré quelques remaniements, le « bureau de Françoise » n'a souffert que de devenir « celui de Chanchan ». Céline y a mis de l'ordre et de la discipline mais Jean y conserve le désordre de sa carrière ! Vous êtes incroyables d'attentions, de gentillesse et formez le « Laurel et Hardy » le plus détonnant qu'il m'ait été donné de rencontrer ! Gui, souvenons-nous du -14°C et des radiateurs, du rhum-pruneau et du punch Mathieu, des déménagements et du gramophone sans oublier les si bons repas à Marcoussis ou Gif. Grazie mille !

Ah, puisque j'aborde le fascisme. Tu m'auras rendu la monnaie de ma pièce en me nourrissant à ton tour, offert de découvrir la Guérinière (mais à quel prix ?!), initié à quelques-unes de tes multiples passions et j'en passe. C'était en septembre 2009, Pierre et Martine m'ont dit qu'un Charentais était au bout du couloir. Depuis, c'est du lourd, à base de POPOPOPO. Freine un peu par ci, accélère par là mais ne change pas de cap et garde-moi en co-pilote, des Thom-Thom et une chieuse pareille, ça n'a pas de prix ! Ménalos, je t'associe à ce paragraphe, ta place est bien ici, non ? Pour les entrées fromagères et l'assiduité dans le soutien, merci.

Laurine, merci et j'espère que nous continuerons un bon bout de chemin ensemble.



Les lignes dédiées aux potes, qui part le biais d'une mousse, d'un match, d'une bouffe ou de quelqu'autre détournement, m'ont éloigné quelques heures de cette thèse pour des moments toujours délicieux. Mat, Culotte, la biblio un dimanche aprem, je sais, je n'ai pas été cool...

Thibaut, Alex, Benjamin, Charley, et Briec, en solo ou en duo vous avez été formidables. Bosseurs, intelligents et plus qu'agréables, ce fut un plaisir de vous avoir à mes cotés. Master François, je ne sais plus qui doit une crasse à l'autre alors je te propose d'effacer l'ardoise afin que tu entames et réussisses ta nouvelle vie allégé et ton esprit libéré de toute tension !

Mr Eddy, les labos ont beaucoup à gagner en ramassant des post-docs tels que toi ! Je passe sous silence ton non-alcoolisme quotidien pour te remercier sincèrement d'avoir méchamment assuré le SAV de fin de thèse.

Je vous colle ici parce qu'il y a peu, Jean-Paul, tu m'as dit « lui et l'autre Edouard du second, ils sont tarés ! ». Punaise, j'aurai eu du plaisir à venir vous enquiquiner pour redémarrer ma 125, vérifier la pression, bricoler un énième système du siècle pour mes manips ou simplement bien me marrer autour d'un café ! Merci à vous deux JP et Eric, et j'espère qu'ils vont finir par comprendre qu'un bâtiment de recherche ne tient pas qu'avec quatre murs, un toit et quatre bouts de ficelle, même si avec quatre bouts de ficelle, vous faites des miracles ! Gilles, je n'ai toujours pas compris après trois années qui tu étais. Ah si, quelqu'un bourré de paradoxes ! Bref, merci pour les coups de main ici et là.

Jenny, ce fut la rencontre d'une belle personne, puis d'un beau couple ! En Belgique, en Charente ou ailleurs je n'ai aucun doute quant à nos prochains moments partagés qui seront au moins à la hauteur de ceux passés.

J'ai eu la chance de rencontrer des scientifiques et enseignants de premier rang au cours de cette thèse avec qui les échanges ici et là au détour d'un couloir ont contribué à construire ce que j'ai pu devenir en trois ans. Pour ne citer qu'eux, Michel, Loïc, Marie D., Marie G., Ariane, Cécile, Moussa, Catherine... un joli méli-mélo à qui je souhaite bon courage, car d'après ce que j'ai pu voir, il en faut un peu !

Il y a ceux enfin avec qui on prend trop peu de temps (ou seulement celui qu'une thèse vous laisse !) afin de mieux les connaître. Manon, Linda, Laure du second, Laure du troisième (grâces soit rendues au trouyotage du dimanche !), Anne-So, Jean-Chaude, Quentin, les Sophie, Erwan, au labo, à table ou en soirée. Je vous souhaite de réussir vos vies et carrières !

A Caroline et Astrid, mon profond soutien.

A Olivier, mon amitié éternelle.

A ma famille, toute ma gratitude. A ma nouvelle famille, ma fierté d'en être.

A Laure, mon amour.





## ABRÉVIATIONS

4EBP1	eIF4E-binding protein 1	P-Ser10	phosphorylation du résidu sérine 10
ABA	acide abscissique	p27 <sup>KIP1</sup>	p27 cyclin-dependent kinase inhibitor 1
ADNc	ADN complémentaire	PAK2	p21-activated kinase 2
ADP	adénosine diphosphate	PCR	polymerase chain reaction
AMP	adénosine monophosphate	PCBP2	poly(rC) binding protein 2
AMPK	AMP-activated protein kinase	Pcd4	programmed cell death 4
ADN-T	ADN de transfert	PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
AIC	Akaike information criterion	PEP	phosphoenol pyruvate
AKT	Ak-thymoma	PEPc	PEP carboxylase
APC1	anaphase promoting complex 1	Pi	Phosphate inorganique
API3	apetala3	PI	Pistillata3
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PI3K	phosphoinositide 3-kinase
ATG	autophagy gene	PIF	PDK1-interacting fragment
ATP	adénosine triphosphate	PKA	protein kinase A
Bet	bromure d'éthidium	PP2A	protein phosphatase 2A
CaMKK	calmodulin-dependant protein kinase kinase	PPP1R12C	protein phosphatase 1, regulatory subunit 12C
CDC27	cell division cycle protein 27 homolog	PRAS40	prolin-rich AKT substrate of 40kDa
CDK	cyclin-dependent kinase	PROTOR	protein observed with Rictor
CDS	coding DNA sequence	PTEN	phosphatase and TENsin homolog
CKI	CDK-inhibitor	Raptor	regulatory associated protein of TOR
Col	Columbia	Rictor	rapamycin-insensitive companion of TOR
Cr	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	RSK	ribosomal S6 kinase
CYC	cyclin	S6K	S6 kinase
dNTP	désoxynucléotide triphosphate	SAB	sérum albumine bovine
DO	densité optique	Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
DTT	dithiothréitol	SDS	sodium dodécyl sulfate
EDTA	ethylene diamine tétraacétique	SGK1	serum and glucocorticoid induced protein kinase 1
eIF4E/G	eukaryotic translation initiation factor 4E/G	Ser	sérine
EM	enzyme malique	SIN1	stress-activated protein kinase interacting protein 1
G6P	glucose-6-phosphate	SKAR	S6K1 Aly/REF-like target
GLUT4	glucose transporter 4	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2
GRIK1/2	geminivirus rep-interacting kinase 1/2	SnAK	SnRK1-activating kinase
GST	glutathione-S-transférase	SNF1/4	sucrose non fermenting-1/4
h	heure	SnRK1	SNF1-related protein kinase 1
HIS	histidine	STRAD $\alpha$	Ste-20-related adaptor $\alpha$
Hs	<i>Homo sapiens</i>	SUP	superman
IDP	intrinsically disordered protein	T6P	tréhalose-6-phosphate
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside	TAE	Tris-Acétate, EDTA
JNK	c-Jun N-terminal kinase	Tap42/46	type 2A phosphatase-associated protein of 42/46kDa
KRP	KIP-related protein	Thr	thréonine
LB	milieu de Luria-Bertini	TOR	target of rapamycin
LKB1	liver kinase B1	TORC1/2	TOR complex 1/2
LST8	lethal with Sec thirteen 8	TSC1/2	tuberous sclerosis complex 1/2
MAPK	mitogen-activated protein kinase	ULK1/2	unc-51-like kinase 1/2
MDH	malate dehydrogenase	UV	ultraviolet
MIG1	maltose-inducible gene 1	VIGS	virus-induced gene silencing
min	minute		
MO25 $\alpha$	mouse protein 25 $\alpha$ S		
MS	Murashige et Skoog		
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide		
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate		
NAP	Nac-like, activated by API3/PI		
NLS	nuclear localization signal		
NPM	nucleophosmin		
NRIP	N-receptor interacting protein		
OAA	Oxaloacetic acid		



## LISTE DES FIGURES

- Fig. 1. Représentation schématique des voies de transduction activées lors de la perception d'un signal extracellulaire
- Fig. 2. Schéma des interactions entre quelques intégrateurs majeurs des signaux stress perçus par les cellules chez les mammifères
- Fig. 3. Kinase-kinase interactome et interactants des intégrateurs SNF1 et TOR1/2 chez *S. cerevisiae* (D'après Breitkrutz et al., 2010)
- Fig. 4. Arbre phylogénétique simplifié de l'ensemble des kinases identifiées chez l'homme (D'après Manning et al., 2002)
- Fig. 5. Activation, cibles et fonctions connues de la 3-phosphoinositide-dependant kinase-1 (PDK1)
- Fig. 6. Mécanisme d'activation, cibles et grandes fonctions cellulaires régulées par AKT chez l'animal
- Fig. 7. Mécanisme d'activation, cibles et grandes fonctions cellulaires régulées par la S6 kinase chez l'animal
- Fig. 8. Mécanisme d'activation, cibles et grandes fonctions cellulaires régulées par la S6 kinase chez les plantes
- Fig. 9. Les complexes TORC1 et TORC2 chez les animaux (D'après Magnuson et al., 2012 et Weber et Gutmann, 2012)
- Fig. 10. Cibles et grandes fonctions cellulaires régulées par les complexes mTORC1/2 chez l'animal (D'après Weber et Gutmann, 2012)
- Fig. 11. Mécanismes d'activation, cibles et grandes fonctions cellulaires régulées par les complexes TOR chez les plantes
- Fig. 12. Evolution des publications concernant la voie de signalisation LKB1/AMPK
- Fig. 13. Les kinases AMPK et SnRK1 sont activées par le stress
- Fig. 14. Rôle de SNF1 dans la signalisation sucre chez la levure (D'après Rolland et al., 2006)
- Fig. 15. Rôle de SnRK1 dans la signalisation par le glucose chez les plantes (D'après Rolland et al. 2006 et Crozet 2010)
- Fig. 16. Les protéines kinases de type SNF1, hétérotrimères conservés chez la levure, les mammifères et les plantes
- Fig. 17. Phénotypes associés à des mutations/délétions de gènes codant des sous-unités régulatrices chez l'animal et à l'extinction des gènes *AtSnRK1α1* et *AtSnRK1α2* chez les plantes (D'après Baena-Gonzales/Rolland et al., 2007)
- Fig. 18. Fonctions de l'AMPK à l'échelle tissulaire chez l'homme
- Fig. 19. Effets de l'AMPK sur le métabolisme
- Fig. 20. Effets de SnRK1 sur le métabolisme
- Fig. 21. Activation de la sous-unité catalytique des kinases de la famille SNF1/AMPK/SnRK1 par des kinases amont conservées chez les eucaryotes
- Fig. 22. Jeu de phosphorylations croisées entre les protéines *AtSnAK1/2* et *AtSnRK1α1/2* (D'après Crozet et al., 2010)
- Fig. 23. Le niveau de phosphorylation de l'AMPKα, contrairement à celui d'*AtSnRK1α1*, est corrélé à son activation par le stress
- Fig. 24. Les sous-unités de type β, véritables « scaffold » des complexes AMPK
- Fig. 25. Participation des sous-unités de type β aux localisations tissulaire et cellulaire des complexes SNF1/AMPK/SnRK1
- Fig. 26. Structure des sous-unités de type γ et fixation des adénylates sur les domaines CBS
- Fig. 27. Concept et définition de la charge énergétique
- Fig. 28. Mécanisme d'activation de l'AMPK en réponse aux niveaux d'adénylates. (Modèle adapté de Hardie et al., 2012)
- Fig. 29. Mécanisme d'activation complet de l'AMPK
- Fig. 30. L'AMPK, réponse au concept de charge énergétique
- Fig. 31. Comparaison des effets de la reprogrammation transcriptomique induite par SnRK1 et celle induite par le tréhalose -6-phosphate
- Fig. 32. Chromatographie d'immuno-affinité *AtSnRK1α1*
- Fig. 33. Chromatographie d'immuno-affinité *AtSnRK1α1*



- Fig. 34. Détermination du Km apparent pour l'ATP des complexes AtSnRK1 immuno-purifiés
- Fig. 35. Effet des principaux effecteurs influençant l'activité des complexes AtSnRK1
- Fig. 36. Analyse de l'additivité de l'AMP et de l'ADP sur l'activité de complexes AtSnRK1 immuno-purifiés
- Fig. 37. Inhibition par l'ADP des complexes AtSnRK1 immunopurifiés: étude du type d'inhibition
- Fig. 38. Activité des complexes AtSnRK1 immuno-purifiés en fonction de la charge énergétique
- Fig. 39. Observation de protoplastes de feuilles d'*A. thaliana* après 5 et 6h d'incubation
- Fig. 40. Effet d'inhibiteurs de l'échangeur ATP/ADP mitochondrial (pyridoxal phosphate et acide bongkrelic) sur l'activité de AtSnRK1 dans des protoplastes de feuilles d'*Arabidopsis*
- Fig. 41. Effet du citrate sur l'activité de AtSnRK1 dans des protoplastes d'*Arabidopsis*
- Fig. 42. Stratégie de clonage retenue pour la production d'hétérotrimères de AtSnRK1 chez *E. coli*
- Fig. 43. Vecteurs de production bicistroniques obtenus après clonage des CDS de différentes sous-unités de type  $\beta$  et  $\gamma$
- Fig. 44. Production et activité kinase de trimères AtSnRK1 recombinants
- Fig. 45. Alignement des séquences protéiques des sous-unités de type  $\gamma$  humaines, de levure et d'*Arabidopsis*
- Fig. 46. Schéma des sites de liaison des adénylates sur les sous-unités de type  $\gamma$
- Fig. 47. Les pools d'adénylates (ATP, ADP et AMP) évoluent différemment entre cellules animale et végétale
- Fig. 48. Les kinases SNF1 de levure, AMPK de mammifères, SnRK1 de plantes et leurs kinases amont sont phylogénétiquement liées (D'après Shen et Hanley-Bawdoin, 2006)
- Fig. 49. Le complexe LKB1/STRADA/MO25 $\alpha$  régule de grandes fonctions cellulaires par l'intermédiaire de kinases apparentées à l'AMPK
- Fig. 50. Mécanisme d'activation de la CaMKK $\beta$
- Fig. 51. Arbre phylogénétique des Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinases (CaMK) et relation entre LKB1 (liver kinase B1), CaMKK $\beta$  (CaMK kinase) et les AMPK-related kinases (ARK) (D'après Manning et al., 2002)
- Fig. 52. Données d'expression des gènes AtSnAK1 et AtSnAK2 et détection des protéines correspondantes au cours du développement d'*A. thaliana*
- Fig. 53. Alignement des séquences des boucles d'activation (T-loop) des kinases de la famille SNF1/AMPK/SnRK1
- Fig. 54. Jeux de phosphorylation entre AtSnAK1 et AtSnRK1
- Fig. 55. Effet de différents métabolites d'intérêt sur l'activité des protéines recombinantes GST-AtSnAK1 et 2
- Fig. 56. Analyse de la compétitivité de l'ATP et de l'ADP vis-à-vis de GST-AtSnAK1 et GST-AtSnAK2
- Fig. 57. Analyse de la compétitivité de l'ATP et de l'AMP vis-à-vis de GST-AtSnAK1 et GST-AtSnAK2
- Fig. 58. Mutants d'insertion des gènes AtSnAK1 et AtSnAK2 utilisés au cours de ce travail
- Fig. 59. Description du matériel végétal utilisé lors de l'analyse des mutants perte-de-fonction *atsnak1* et *atsnak2*
- Fig. 60. Schéma des croisements effectués pour l'obtention des sesquimutants *snak1*<sup>-/-</sup>*snak2*<sup>+/-</sup> et *snak1*<sup>+/-</sup>*snak2*<sup>-/-</sup> et résultats des génotypages des plantes concernées
- Fig. 61. Amplification des d'ARNm des gènes *SnAK1* et *SnAK2* dans des mutants homozygotes simples et dans des sesquimutants *snak1* et *snak2*
- Fig. 62. Analyse phénotypique de la descendance des sesquimutants [*s1*<sup>-/-</sup>*s2*<sup>+/-</sup>] homozygotes pour *SnAK1* et [*s1*<sup>+/-</sup>*s2*<sup>-/-</sup>] homozygotes pour *SnAK2* en culture sur terreau 25 jours après semis
- Fig. 63. Observation des siliques des sesquimutants *snak1* et *snak2*
- Fig. 64. Observation des grains de pollen (coloration Alexander) des mutants *snak1* et *snak2*
- Fig. 65. Analyse phénotypique de la descendance des sesquimutants *snak1* et *snak2* semés sur milieu MS simple ou supplémenté en saccharose
- Fig. 66. Répartition de la population de la descendance des sesquimutants *s1*<sup>-/-</sup>*S2*<sup>+/-</sup> et *S1*<sup>+/-</sup>*s2*<sup>-/-</sup> en fonction de la longueur de leur racine principale
- Fig. 67. Analyse des sesquimutants s'étant développés sur milieu supplémenté en saccharose et transférés 6 jours après repiquage sur 1/2MS simple ou supplémenté de saccharose 3%
- Fig. 68. Activité SnRK1 spécifique des différents génotypes mutés pour les kinases amonts AtSnak1 et 2
- Fig. 69. Phénotype et effets sur le métabolisme des mutants *pdtpi*
- Fig. 70. Schématisation du cycle cellulaire chez les eucaryotes
- Fig. 71. Structure du complexe CDK2/cycA/p27<sup>KIP1</sup> de mammifères
- Fig. 72. La famille AtKRP, orthologues fonctionnels de p27<sup>KIP1</sup> chez *A. thaliana*



- Fig. 73. Arbre phylogénétique de la famille d'inhibiteurs du cycle cellulaire KRP et de leurs homologues fonctionnels chez les végétaux et les animaux
- Fig. 74. Profils d'expression des gènes de la famille d'inhibiteurs du cycle cellulaire KRP chez *A. thaliana*
- Fig. 75. Phénotypes de plantes surexprimant différents membres de la famille des KRP
- Fig. 76. Régulation de l'expression des transcrits des gènes KRP au cours du cycle et rôles putatifs dans l'endoréplication et/ou le cycle mitotique
- Fig. 77. Rôle particulier des KRP au cours de la transition G<sub>1</sub>/S et de leur homologue chez l'homme p27<sup>KIP1</sup> (D'après Millan, 2011)
- Fig. 78. Rôles de Hsp27<sup>KIP1</sup> dans le cycle cellulaire et au-delà
- Fig. 79. Les protéines AtKRP présentent des sites de phosphorylation SnRK1-consensus
- Fig. 80. Autoradiographie après expérience de western blot révélant les protéines recombinantes AtKRP6 (sauvage et formes mutées) et AtKRP7, étiquetées avec la GST
- Fig. 81. Les protéines AtKRP6 et 7 sont des protéines intrinsèquement non structurées
- Fig. 82. Les protéines recombinantes GST-AtKRP6 et GST-AtKRP7 sont phosphorylées *in vitro* par AtSnRK1α1
- Fig. 83. Test de phosphorylation des formes sauvage et mutées des protéines GST-AtKRP6 par AtSnRK1α1
- Fig. 84. AtSnRK1 immunopurifié phosphoryle GST-AtKRP6 and GST-AtKRP7 *in vitro*
- Fig. 85. AtSnRK1α1 et AtKRP6 interagissent physiquement dans le noyau de protoplastes de tabac BY-2
- Fig. 86. Les formes mutées GFP-KRP6<sup>T152A</sup> et GFP-KRP6<sup>T152D</sup> tout comme la forme sauvage GFP-KRP6<sup>WT</sup> sont localisées dans le noyau des cellules du mésophylle d'*Arabidopsis*
- Fig. 87. La forme AtKRP6<sup>T152D</sup>, mimant une protéine constitutivement phosphorylée, perd sa capacité d'inhibition de la cycline CDKA<sub>1</sub> d'*Arabidopsis* (D'après Millan 2011)
- Fig. 88. La forme AtKRP6<sup>T152D</sup>, mimant une protéine constitutivement phosphorylée, est capable d'interagir avec la AtCDKA<sub>1</sub> d'*A. thaliana* mais perd sa capacité d'interaction avec la cycline D3<sub>1</sub> (D'après Millan 2011)
- Fig. 89. L'augmentation du niveau de phosphorylation de la thréonine 152 atténue les phénotypes caractéristiques des plantes surexprimant AtKRP6
- Fig. 90. Modèle d'interaction de p27<sup>KIP1</sup> avec ses partenaires CDK2 et cycA (D'après Yoon *et al.*, 2012)
- Fig. 91. Les gènes AtSnRK1α1 et AtKRP6 sont exprimés dans des zones de division intense
- Fig. 92. Schéma intégratif des rôles des complexes SnRK1 à l'échelle de la plante entière
- Fig. 93. Représentations schématiques et graphiques des différents types d'inhibition
- Fig. 94. Système de filtration utilisé par Liley et collègues pour fractionner les différents organites à partir de protoplastes de blé. (D'après Liley *et al.*, 1982)
- Fig. 95. Systèmes de filtration utilisés pour le fractionnement des protoplastes
- Fig. 96. Principe de purification de métabolites chargés négativement sur colonne échangeuse d'anions DOWEX<sup>®</sup> 1x8
- Fig. 97. Préparation de protoplastes à partir de feuilles d'*Arabidopsis* (D'après Yoo *et al.*, 2008)
- Tab. 1. Abondance des protéines kinases chez les eucaryotes
- Tab. 2. Effet de différents métabolites sur l'activité de complexes AtSnRK1 immuno-purifiés
- Tab. 3. Masses moléculaires théoriques des complexes αβγ d'*A. thaliana*
- Tab. 4. Lien entre les analyses phénotypiques et génotypiques de la descendance des sesquimutants
- Tab. 5. Détail des masses moléculaires apparentes et réelles des protéines AtKRP6 et 7
- Tab. 6. Identification par spectrométrie de masse des résidus phosphorylés sur GST-AtKRP7, GST-AtKRP6<sup>WT</sup>, GST-AtKRP6<sup>T150A</sup>, GST-AtKRP6<sup>T150D</sup>, GST-AtKRP6<sup>T152A</sup> et GST-AtKRP6<sup>T152D</sup> par GST-AtSnRK1α1
- Tab. 7. Récapitulatif des conditions de production des différentes protéines recombinantes
- Tab. 8. Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail





## TABLE DES MATIERES

<b>1. ENTRE SIGNALISATION ET METABOLISME.....</b>	<b>1</b>
1.1. Préambule.....	1
1.2. De la perception des signaux environnementaux aux réponses cellulaires.....	1
1.3. Les intégrateurs, chefs d'orchestre de la cellule.....	2
1.4. Les protéines kinases, omniprésentes dans la signalisation métabolique.....	3
1.5. Les protéines kinases AGC au cœur de la croissance cellulaire.....	4
PDK1, véritable « hub » de la voie de signalisation des AGC kinases.....	4
AKT, cible de la PDK1 - intégration et propagation du signal perçu par la voie PI3K.....	5
Activation des kinases S6K et SGK1, cibles de la PDK1.....	7
La voie PDK1 chez <i>A. thaliana</i> .....	7
La S6K et son implication dans la croissance cellulaire et l'anabolisme.....	8
1.6. TOR, un intégrateur AGC-dépendant et indépendant ?.....	10
1.7. La voie de signalisation LKB1/AMPK-SnAK/SnRK1.....	12
Des kinases essentielles dans la signalisation.....	13
Une conservation remarquable chez les eucaryotes.....	14
Un rôle physiologique important pour les sous-unités des complexes AMPK et SnRK1.....	14
Intégration des signaux à l'échelle de l'organisme entier par l'AMPK.....	15
L'AMPK, un intégrateur intracellulaire central.....	16
SnRK1 sur les pas de son orthologue animal.....	19
Conservation étendue aux kinases amont activatrices.....	20
1.8. Objectifs de la thèse.....	21
<b>2. REGULATION DES COMPLEXES ATSNRK1 PAR LEUR ENVIRONNEMENT METABOLIQUE.....</b>	<b>23</b>
2.1. Introduction.....	23
Les sous-unités régulatrices des complexes AMPK et SnRK1.....	23
Les nucléotides, messagers directs de l'homéostasie énergétique - le concept de charge énergétique.....	26
L'AMPK, une enzyme régulée par la charge énergétique.....	26
Réponse de l'AMPK et SnRK1 aux signaux hormonaux et à l'environnement métabolique.....	28
Objectifs.....	29
2.2. De nouveaux régulateurs métaboliques des complexes AtSnRK1.....	31
Préambule aux résultats.....	31
Enrichissement en complexes natifs AtSnRK1 de feuilles de rosettes d' <i>Arabidopsis</i> .....	31
Propriétés biochimiques de l'enzyme.....	33
A la recherche de métabolites modulateurs de l'activité kinase AtSnRK1.....	34
L'AMP et l'ADP sont des inhibiteurs allostériques de AtSnRK1.....	35
Hypothèse d'une régulation liée au statut énergétique intracellulaire - concept de charge énergétique.....	36
Etude d'effecteurs de l'activité de SnRK1 dans des protoplastes d' <i>Arabidopsis</i> .....	37
Essais de production de trimères AtSnRK1 $\alpha/\beta/\gamma$ recombinants.....	39
2.3. Discussion.....	43
Les complexes AtSnRK1 immuno-purifiés actifs ont une très haute masse moléculaire.....	43
Le citrate et des composés azotés inhibent l'activité des complexes AtSnRK1 immuno-purifiés.....	44
A revers du dogme considérant l'AMP et l'ADP comme activateurs de l'AMPK... ..	46
SnRK1 est régulée par la charge énergétique.....	48
Perspectives du chapitre I.....	49
<b>3. LES KINASES SNAK1 ET 2, ACTEURS CLES DE LA VOIE DE SIGNALISATION SNAK/SNRK1.....</b>	<b>51</b>
3.1. Introduction.....	51
LKB1, kinase activatrice de l'AMPK.....	51
Régulation de l'AMPK par le calcium via sa kinase activatrice CaMKK $\beta$ .....	53
Complémentarité LKB1-CaMKK $\beta$ .....	53



Les kinases activatrices de SnRK1 chez <i>A. thaliana</i> .....	54
Objectifs et stratégies.....	55
3.2. La voie SnAK/SnRK1 est régulée par son environnement métabolique.....	56
Analyse de l'effet de quelques métabolites sur l'activité kinase de AtSnAK1 et 2.....	56
Focus sur l'effet inhibiteur de l'ADP et de l'AMP .....	57
AtSnRK1 et ses kinases amont répondent à des signaux métaboliques communs.....	57
3.3. Analyse de mutants perte-de-fonction des kinases AtSnAK1 et 2 .....	58
Recherche de mutants <i>snak1/snak2</i> .....	58
Recherche de conditions de culture permettant le développement des doubles mutants <i>snak1/2</i> .	60
Résultats préliminaires: mise en évidence de l'existence de kinases activatrices de SnRK1 alternatives.....	62
3.4. Discussion.....	63
Les kinases SnAK1/2 et SnRK1 répondent à des signaux métaboliques communs.....	63
Une implication dans la transition hétérotrophie/autotrophie de la jeune plantule ? .....	64
Y a-t-il d'autres kinases activatrices des complexes SnRK1 ? .....	65
Perspectives du chapitre II .....	65
<b>4. UN NOUVEAU LIEN ENTRE HOMEOSTASIE ENERGETIQUE ET PROLIFERATION CELLULAIRE CHEZ ARABIDOPSIS.....</b>	<b>67</b>
4.1. Introduction .....	67
Le cycle cellulaire chez les eucaryotes.....	67
Les inhibiteurs du cycle cellulaire.....	68
Les KRP et le cycle cellulaire.....	70
Régulation post-traductionnelle de p27 <sup>KIP1</sup> et ses conséquences au-delà du cycle cellulaire .....	71
Objectifs .....	73
4.2. La phosphorylation de KRP6 et 7, homologues de p27KIP1, par SnRK1, relie l'homéostasie énergétique et la prolifération cellulaire chez Arabidopsis .....	74
Les CKI d'Arabidopsis présentent des sites consensus de phosphorylation par SnRK1 .....	74
Production et défauts de migration des protéines AtKRP6 et AtKRP7 .....	74
AtSnRK1 $\alpha$ 1 phosphoryle AtKRP6 et AtKRP7 in vitro .....	75
AtKRP6 interagit physiquement avec AtSnRK1 $\alpha$ 1 et la phosphorylation sur la thréonine 152 ne modifie pas sa localisation nucléaire.....	77
La forme AtKRP6 <sup>T152D</sup> , mimant une protéine constamment phosphorylée, perd sa capacité à inhiber la division de la levure.....	77
Les phénotypes caractéristiques des surexprimeurs OE-AtKRP6 sont atténués lorsque les plantes ont un niveau accru de phosphorylation de la thréonine 152.....	78
4.3. Discussion.....	81
AtSnRK1 favorise la division cellulaire dans les tissus où la division est très active.....	81
Perspectives du chapitre III .....	83
<b>5. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>85</b>
5.1. Le paradoxe du rôle de AtSnRK1 dans la division cellulaire.....	85
Hors du contexte stress.....	85
Dans le contexte d'un stress .....	86
5.2. To be stressed or not to be... .....	86
5.3. Perspectives.....	88
<b>6. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>91</b>
6.1. Matériel biologique .....	91
Matériel végétal.....	91
<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	91
Suspension cellulaire de tabac "Bright Yellow-2" (BY-2).....	91
Souches bactériennes.....	91
Plasmides.....	92
Plasmides utilisés pour les clonages .....	92
Plasmides utilisés pour la production de protéines recombinantes chez <i>E. coli</i> .....	92



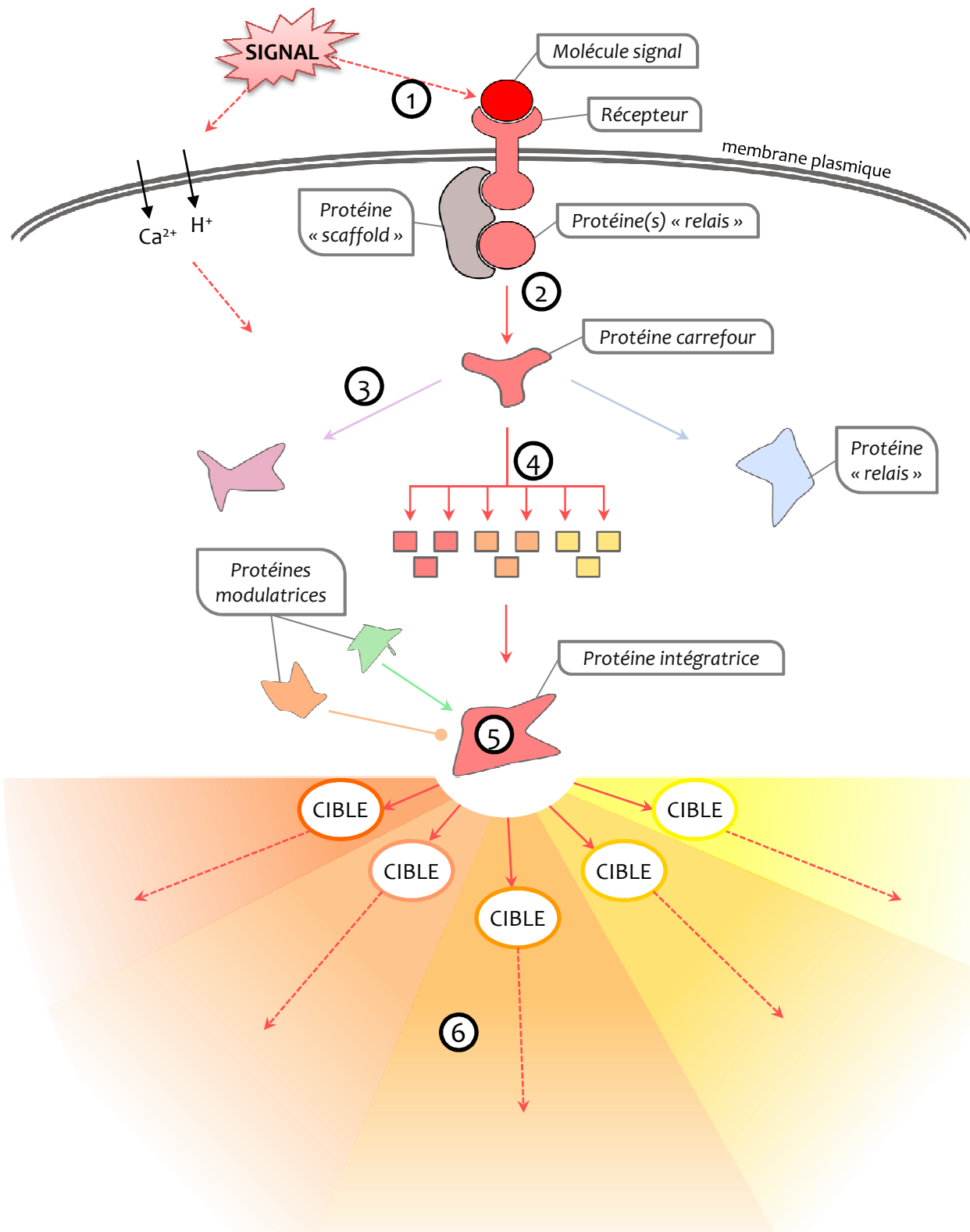
Plasmides utilisés pour la technique de BiFC (“Bimolecular Fluorescence Complementation”)	93
Anticorps	93
Oligonucléotides	93
6.2. Méthodes	93
Techniques de biologie moléculaire	93
Amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	93
Préparations plasmidiques	94
Digestions plasmidiques et purification de l’insert ou du vecteur	94
Ligation vecteur/insert	94
Techniques de clonage Gateway®	94
Préparation de bactéries électrocompétentes	95
Transformation des bactéries par électroporation	95
Extraction d’ADN génomique et géotypage	95
Extraction des ARN totaux	96
Transcription-inverse des ARNm	96
PCR semi-quantitative	96
Techniques de biochimie	97
Extraction de protéines totales de feuilles d’ <i>A.thaliana</i>	97
Dosage de protéines	97
Purification des anticorps	97
Immunoprécipitation des complexes AtSnRK1	98
Préparation de la colonne d’immuno-affinité	98
Purification de complexes AtSnRK1 par immuno-affinité	99
Production de protéines recombinantes	99
Purification de protéines recombinantes porteuses d’étiquette GST ou 6xHIS par chromatographie d’affinité GSH-agarose ou Ni-agarose	100
Electrophorèse de protéines	100
Coloration au bleu de Coomassie R250	100
Western-blot	101
Mesure d’activité kinase	101
Analyse de la compétitivité de différents adénylates	102
Dosage de métabolites à partir de protoplastes d’ <i>Arabidopsis</i>	102
Méthodes relatives aux plantes	105
Stérilisation des graines	105
Milieux de culture pour semis in vitro	105
Préparation et transformation de protoplastes	105
Méthodes de microbiologie	107
Transformation de levure par choc thermique	107
Etude du rôle de KRP6 en système hétérologue	108
Méthodes d’analyses histologiques et cytologiques	108
Décoloration des siliques au chloral hydrate	108
Observation de la taille des cellules épidermiques de feuilles de rosette	108
Coloration d’Alexander	108

**BIBLIOGRAPHIE** ..... 110

**ANNEXES** ..... 128

<b>Annexe I :</b> Spectres - Résultats des analyses LC-MS/MS des éluats d’immuno-purification des complexes AtSnRK1	128
<b>Annexe II :</b> Manuscrit – « Phosphorylation of p27KIP1 homologs KRP6 and 7 by SNF1-Related protein Kinase-1 links plant energy homeostasis and cell proliferation »	134
<b>Annexe III :</b> Vecteurs	179





**Figure 1. Représentation schématique des voies de transduction activées lors de la perception d'un signal extracellulaire.** Ce schéma intègre de façon simpliste les grands mécanismes des cascades de signalisation permettant à la cellule de mettre en place des réponses adaptées aux facteurs environnementaux influant sur l'organisme. (1) Le signal est perçu sous forme de molécules grâce à des récepteurs membranaires. (2) Ces récepteurs sont complexés à des protéines relais qui transmettent le signal à des acteurs en aval de la voie de signalisation. (3) Certains de ces acteurs peuvent être de véritables carrefours pour (re)diriger ou démultiplier les voies de signalisation. (4) De petits messagers secondaires peuvent être synthétisés afin d'amplifier la portée du signal. (5) Bien en aval de cette cascade de transduction, des protéines intégratrices perçoivent le message et (6) modulent des mécanismes clés ou induisent des réponses permettant à l'organisme de s'adapter.



## 1. ENTRE SIGNALISATION ET METABOLISME

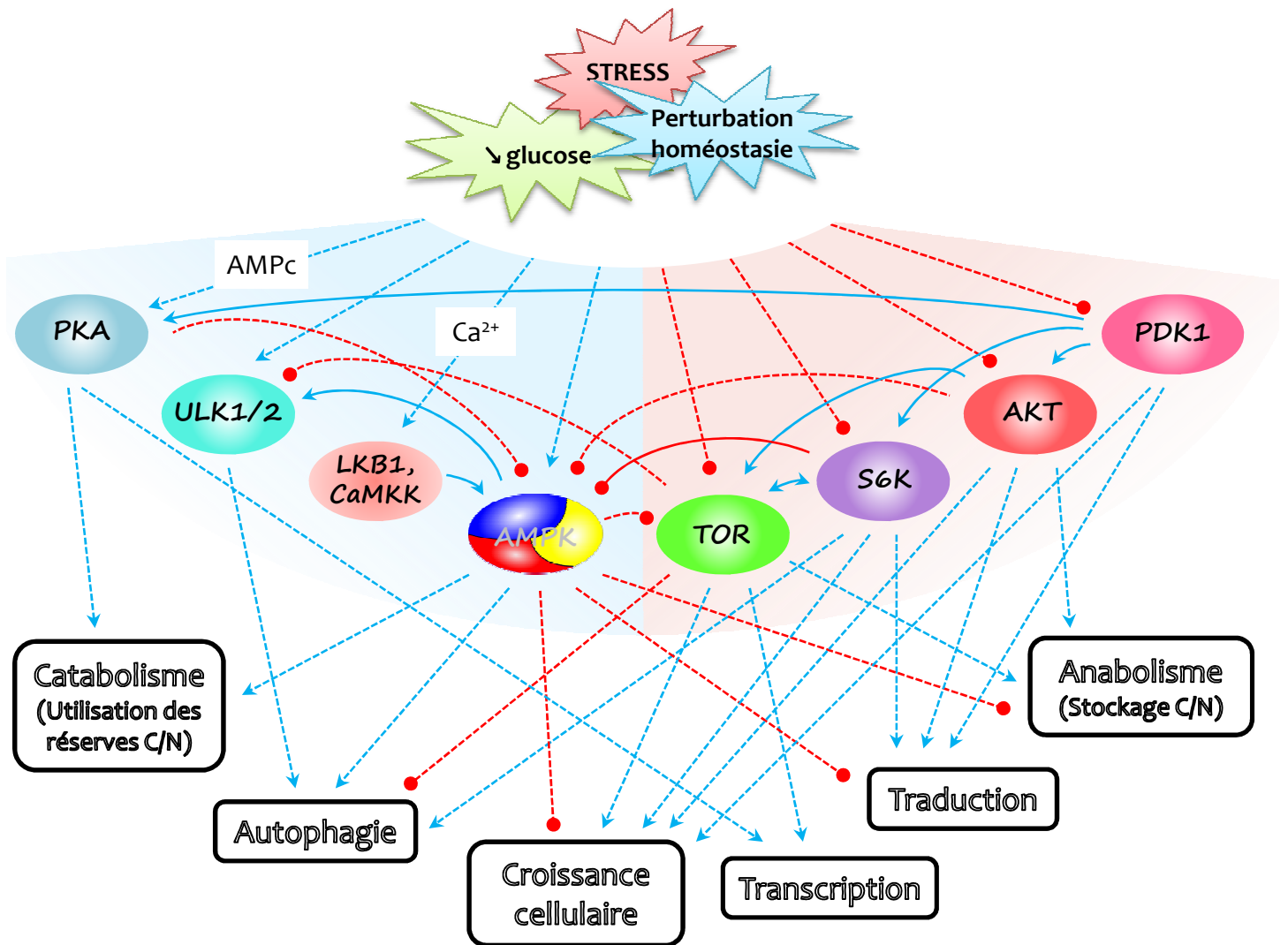
### 1.1. Préambule

La cellule est un référentiel en biologie. De sa première observation en 1665 par Hooke à aujourd'hui, elle n'a de cesse d'obséder les scientifiques de tous bords (Hooke, 1665). La cellule est une « structure microscopique complexe, constitutive de tous les êtres vivants et caractérisée par son pouvoir d'assimilation » (Larousse). Etendu au vocabulaire courant, une cellule correspond à « l'élément constitutif fondamental d'un ensemble organisé ». Etudier la cellule revient donc à s'imposer une échelle microscopique et un contexte complexe mais ubiquitaire chez les êtres vivants et indissociable de l'environnement dans lequel cette entité se trouve.

Que les organismes qu'elle(s) compose(nt) soient unicellulaires ou pluricellulaires, les cellules ne peuvent « évoluer », c'est-à-dire se multiplier, se diviser, s'allonger, se différencier... indépendamment des multiples signaux qu'elles reçoivent. Ces signaux, qu'ils soient sous forme de simples peptides (pour la communication lors de la conjugaison chez la levure par exemple) ou de molécules diverses (protéines, acides aminés, nucléotides, dérivés d'acides gras, gaz dissous...), sont perçus par les cellules au niveau de récepteurs. Après reconnaissance du signal par son récepteur (interaction ligand-récepteur), le message est transmis d'acteur en acteur jusqu'à déclencher la ou les réponses appropriée(s). Cette transmission de proche en proche jusqu'aux cibles du message est appelée cascade de transduction.

### 1.2. De la perception des signaux environnementaux aux réponses cellulaires

Il serait vain de s'essayer à réaliser un schéma type de l'ensemble des cascades de transduction connues. La figure 1 présente une vision simpliste, ni exclusive ni exhaustive, des grands mécanismes mis en jeu lors de la perception d'un signal environnemental jusqu'à la mise en place par la cellule de réponses adaptées. Deux événements rapides ont souvent lieu lorsqu'un signal extracellulaire intervient. D'une part un influx important de protons (provoquant une dépolarisation membranaire) et de calcium (ou « burst » calcique) induisant des réponses directes et rapides et, d'autre part, la perception de ce signal par des récepteurs transmembranaires. Certains récepteurs sont très bien décrits dans la littérature. C'est le cas des récepteurs de type NB-LRR (« Nucleoside-Binding site-Leucine-Rich Repeat ») intervenant dans les réponses aux stress biotiques chez les plantes (Eitas & Dangl, 2010). Ces récepteurs peuvent être associés à d'autres acteurs intracellulaires, premiers relais du signal. C'est le cas par exemple du système



**Figure 2. Schéma des interactions entre quelques intégrateurs majeurs des signaux stress perçus par les cellules chez les mammifères.** Un stress, de quelque nature qu'il soit, provoque un déséquilibre de l'homéostasie énergétique intracellulaire, se traduisant généralement par une augmentation des ratios AMP/ATP et ADP/ATP et un manque de glucose. Ce signal est relayé jusqu'à des intégrateurs via l'intervention ou non de messagers secondaires (AMP cyclique, calcium). Ces intégrateurs agissent ensuite sur des mécanismes cellulaires majeurs en les activant ou en les inhibant. Ces voies de signalisation sont largement interconnectées.

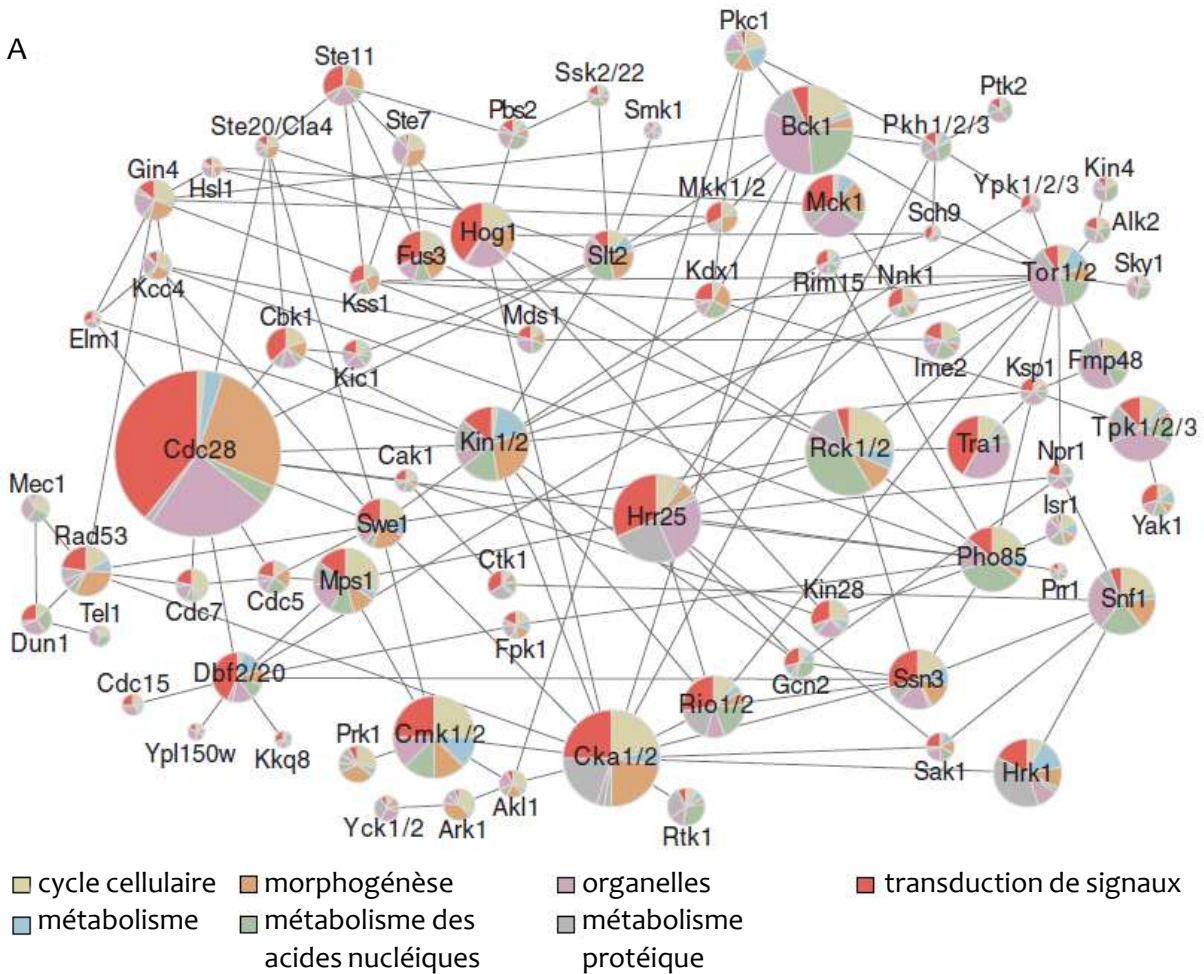
AMPc, AMP cyclique; AMPK, AMP-activated protein kinase; AKT, Ak-thymoma (NB: cette enzyme n'a pas d'orthologue connu chez les végétaux); C/N, carbone/azote; CaMKK, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase kinase; LKB1, liver kinase B1; PDK1, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; PKA, protein kinase A; S6K, S6-kinase; TOR, target of rapamycin; ULK1, unc-51-like kinase-1

Les flèches bleues figurent des activations, les traits pointillés rouges, des inhibitions. Les traits discontinus figurent des actions indirectes à l'inverse des traits pleins.

Pto-Ptr et des protéines de type Pto-like kinases dans le mécanisme de résistance de la tomate vis-à-vis du pathogène *Pseudomonas syringae* pv *tomato* ou encore de la protéine NRIP (« N-Receptor Interacting Protein »). Des protéines, souvent des kinases, vont ensuite transmettre le signal de proche en proche jusqu'à ce qu'il atteigne des protéines dites « carrefour » qui permettent la propagation de l'information vers d'autres voies de signalisation et/ou qu'il provoque la synthèse de petites molécules appelées messagers secondaires (tels que l'AMPc ou des produits de dégradation des phospholipides). Par exemple, la famille des MAPK (« Mitogen-Activated Protein Kinases ») impliquée dans la transduction de signaux, fait l'objet de nombreuses recherches, notamment chez le ver modèle *Caenorhabditis elegans* ou chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Chez cette dernière, 110 gènes codent des MAPK, qu'elles soient en amont de la transmission (MAPKKK, MAPK-Kinase-Kinase, 80 gènes chez *Arabidopsis thaliana*) ou cibles de ces premiers relais (MAPKK, 10 gènes et MAPK, 20 gènes) (Pitzschke et al., 2009). Enfin, des protéines intégratrices sont impliquées dans la modulation de mécanismes essentiels dans la réponse aux signaux environnementaux. Ces protéines agissent comme des « plaques tournantes » de la cellule afin de générer des réponses plus ou moins rapides, efficaces et adaptées. Ces réponses incluent par exemple la régulation de facteurs de transcription et la régulation de l'expression de différents gènes, la modification de processus métaboliques primaires ou secondaires et ce à des échelles plus ou moins importantes. Certains de ces mécanismes et le rôle de plusieurs protéines intégratrices vont être détaillés dans les paragraphes suivants.

### 1.3. Les intégrateurs, chefs d'orchestre de la cellule

Malgré une grande complexité liée aux multiples signaux environnementaux perçus par la cellule, le nombre d'acteurs situés en bout de chaîne et capables d'intégrer différents signaux et d'induire des réponses appropriées est relativement restreint. La figure 2 rassemble des acteurs clés dans le développement et l'adaptation aux dérégulations énergétiques chez les mammifères. Comme décrit dans le paragraphe précédent, certains de ces intégrateurs (« Protein Kinase A », PKA et « Calmodulin/calcium Kinase Kinase », CaMKK) répondent à des messagers secondaires (respectivement AMPc et calcium). Avant de développer les réponses complexes engendrées par l'activation ou l'inactivation de chacun de ces intégrateurs, il est aisé de remarquer qu'ils interagissent fortement les uns avec les autres. En effet, les signaux perçus traduisent des états physiologiques pouvant être délétères pour les cellules (manque de glucose et d'énergie lors d'un effort musculaire, hypoglycémie et diabète, cancers chez l'animal ; attaque pathogène, stress abiotiques divers chez les plantes...). Les réponses mises en place doivent donc être parfaitement adaptées et par conséquent finement régulées. Ainsi, ces protéines se regroupent en deux grands



**B**

SNF1	TOR1	TOR2
CDC14	CDC14	AVO1
GAL83	KOG1	LST8
SIP1	LST8	TSC11
SIP2	MKS1	CDC14
SNF4	TAX4	NPR1
NET1	TCO89	YPK1
HRK1	YLR108C	NNK1
NPR1	NPR1	ALK2
	FMP48	MIH1
	NNK1	BCK1
	KDX1	RIO2
	RCK1	
	SAP4	
	SAP185	
	SKY1	
	KSP1	
	CDC55	
	RTG3	

**Figure 3. Kinase-kinase interactome et interactants des intégrateurs SNF1 et TOR1/2 chez *S. cerevisiae* (D'après Breitskreutz et al., 2010).**

**(A)** Soixante-six des 75 kinases interagissant dans ce schéma contiennent des sites de phosphorylation documentés. **(B)** Interactants des deux intégrateurs SNF1 (Sucrose non fermenting-1) et TOR1/2 (Target of rapamycin 1/2).

ALK2, Ser/Thr harpin-like protein kinase; AVO1, partenaire de TOR; BCK1, MAPKK; FMP48, Ser/Thr kinase putative; GAL83, glucose repression protein-83 (partenaire de SNF1); HRK1, hygromycin resistance kinase-1; KDX1, Ser/Thr kinase impliquée dans la signalisation des MAPK; KOG1 ou RAPTOR1, regulatory associated protein of TOR; KSP1, Ser/Thr kinase inhibant l'autophagie via TORC1; LST8, lethal with Sec 13-8 (partenaire de TOR); MIH1, Mitotic inducer homolog-1; MKS1, Meckel syndrome type 1; NET1, neuroepithelial cell transforming-1; NNK1, Ser/Thr kinase putative; NPR1, nitrogen permease reactivator protein-1; RCK1, famille des MAPK; RIO2, Ser/Thr kinase; RTG3, retrograde regulation protein 3; SAP4/185, SIT4-associating protein 4/185; SIP1/2, SNF1-interacting protein-1/2 (partenaire de SNF1); SKY1, SR-protein-specific kinase from budding yeast-1; SNF4, sucrose non fermenting-4 (partenaire de SNF1); TAX4, unknown protein; TCO89, TOR complex-1 subunit 89kDa; TSC11, TOR complex 2 subunit TSC11; YKL171W, kinase interagissant avec TORC1; YPK1, yeast protein kinase-1; CDC14/55, cell division cycle-14/55

types de fonctions (bien que ceci ne soit pas nécessairement une règle d'or comme nous le verrons dans le chapitre III des résultats) : les régulateurs activés lors de ces périodes de stress (PKA ; « Unc-51-Like Kinase-1/2 », ULK1/2 ; « Liver Kinase B1 », LKB1 ; CaMKK et « AMP-activated protein Kinase », AMPK) et les protéines actives lorsque la disponibilité en énergie ne fait pas défaut (« 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1 », PDK1 ; « AK-Thymoma », AKT ; « S6-Kinase », S6K et « Target Of Rapamycin », TOR). Ces deux grands groupes ont donc des rôles partiellement antagonistes qui permettent à la cellule, soit de mettre en place les réponses nécessaires à la traversée d'une période de stress, soit d'activer le métabolisme en périodes normales (*i.e.* hors stress).

Il n'est pas anodin de noter que les huit intégrateurs représentés dans la figure 2 sont des protéines kinases. En effet, cette très large famille d'enzymes a un rôle prépondérant dans la signalisation métabolique. Ce point est illustré par la figure 3 représentant la schématisation d'un interactome kinase-kinase chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les portions rouges des diagrammes correspondant à l'implication de chacune de ces protéines dans la transduction de signaux (Breitkreutz *et al.*, 2010). De plus, nombre de ces kinases sont impliquées dans la régulation du métabolisme (portions bleues et vertes). Nous pouvons noter que c'est le cas des kinases SNF1 (« Sucrose Non Fermenting 1 »), orthologue chez la levure de l'AMPK de mammifères citée précédemment, et TOR1 et 2 (orthologue de mTOR de mammifères). Celles-ci sont bien impliquées dans ce réseau avec 8 (pour SNF1), 18 (pour TOR1) et 11 (pour TOR2) interactants recensés dans cette étude (Breitkreutz *et al.*, 2010), faisant état de leur rôle majeur dans la régulation globale du métabolisme chez les eucaryotes.

### 1.4. Les protéines kinases, omniprésentes dans la signalisation métabolique

Chez la plante modèle *A. thaliana*, 4% des séquences codantes possèdent des domaines kinases, soit 1400 gènes sur les 28000 recensés. Cette proportion est bien supérieure à celle déterminée pour l'homme (2,5%) et pour la levure (2,2%) (Tableau 1). Parmi ces protéines kinases (PK), 2/3 (soit environ 1000 gènes) codent des sérine/thréonine PK (Champion *et al.*, 2004). Des projets de « kinomes » ont été réalisés, en 2002 pour l'homme (Manning *et al.*, 2002) et en 2010 pour la levure (Breitkreutz *et al.*, 2010) ; quant à *Arabidopsis*, une analyse poussée du génome séquencé a été effectuée par Champion et collègues (2004) concernant les sérine/thréonine PK. L'analyse de cette très grande famille chez l'homme a permis de dresser un arbre phylogénétique dont une représentation simplifiée est donnée dans la figure 4. Environ 500 kinases ont ainsi été classées en 7 familles et un groupe dit « autres ou atypiques » :



Tableau 1. Abondance des protéines kinases chez les eucaryotes.

	Taille du génôme (pb)	Nb de gènes	Nb de kinases	% kinases	Ref.
<i>A. thaliana</i>	1,1 x 10 <sup>8</sup>	~28000	1114	4	<a href="http://plantsp.sdsc.edu/">http://plantsp.sdsc.edu/</a>
<i>H. sapiens</i>	3,3 x 10 <sup>9</sup>	~21000	518	2,5	Manning et al., 2002
<i>S. cerevisiae</i>	1,2 x 10 <sup>7</sup>	5770	129	2,2	Breitkreutz et al., 2010

La proportion des protéines possédant un domaine kinase (prédit comme fonctionnel ou non) chez les eucaryotes représente une part importante des séquences codantes. Chez *A. thaliana*, on dénombre presque deux fois plus de kinases potentielles que chez la levure.

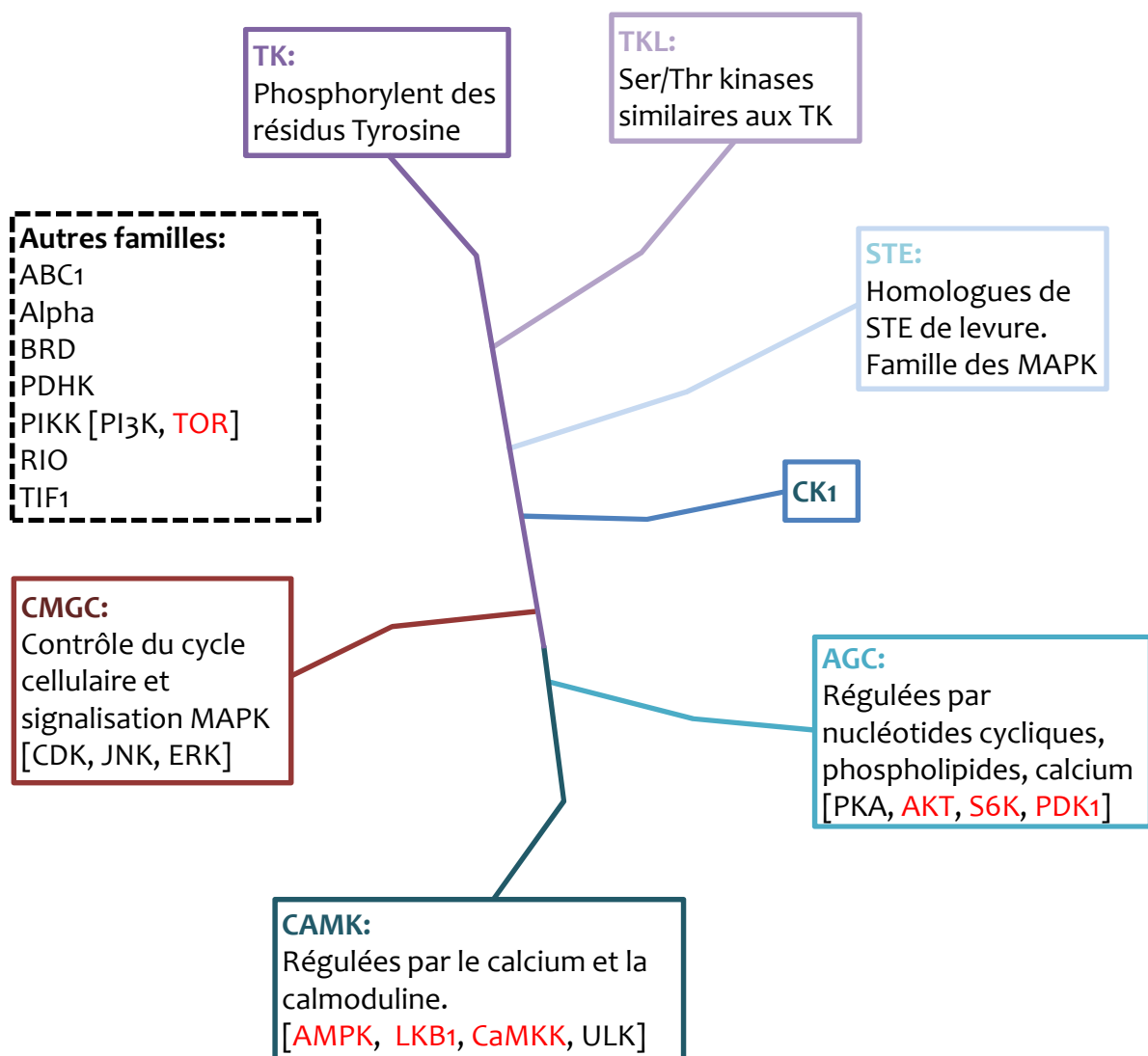


Figure 4. Arbre phylogénétique simplifié de l'ensemble des kinases identifiées chez l'homme (D'après Manning et al., 2002). Quelques kinases importantes dans la signalisation sont mentionnées entre crochets et celles faisant l'objet d'un intérêt particulier dans l'introduction sont notées en rouge.

AGC, famille composée notamment des protéines PKA, PKG et PKC; CAMK, calcium/calmodulin regulated kinases; CK1, cell kinase-1; CMGC, famille composée notamment de CDK, MAPK, GSK3 et CLK; STE, homologues de STE de *S. cerevisiae*; TK, tyrosine kinase; TKL, tyrosine kinase-like

- AGC: famille regroupant notamment les PKA, PKG et PKC. Ces kinases sont régulées par des nucléotides cycliques (la PKA régulée par l'AMPc et la PKG par le GMPc), des phospholipides (PKC) ou le calcium. Les PKA, AKT, PDK1 et S6K (mentionnées auparavant et dans la figure 2) sont membres de ce groupe.
- CMGC: famille regroupant notamment des protéines CDK, MAPK, GSK3 et CLK. Ces kinases interviennent principalement dans le contrôle du cycle cellulaire (CDK) et dans la signalisation MAPK citée précédemment.
- CAMK: protéines kinases régulées par le calcium et la calmoduline (bien que quelques exceptions soient intégrées). Cette famille inclut entre autres LKB1, ULK1 et l'AMPK.
- CK1: famille des « Cell Kinases-1 ».
- STE: kinases homologues de STE1, STE11 et STE20 de levure. Il s'agit de la grande famille des MAPK.
- TK: kinases phosphorylant un résidu tyrosine.
- TKL: kinases similaires aux TK mais phosphorylant des résidus sérine et thréonine.
- Autres/atypiques: quelques groupes se détachent de cet arbre phylogénétique et parmi eux, les PIKK dont font partie la « phosphoinositide 3-kinase » (PI3K) impliquée dans la signalisation TOR et TOR elle-même.

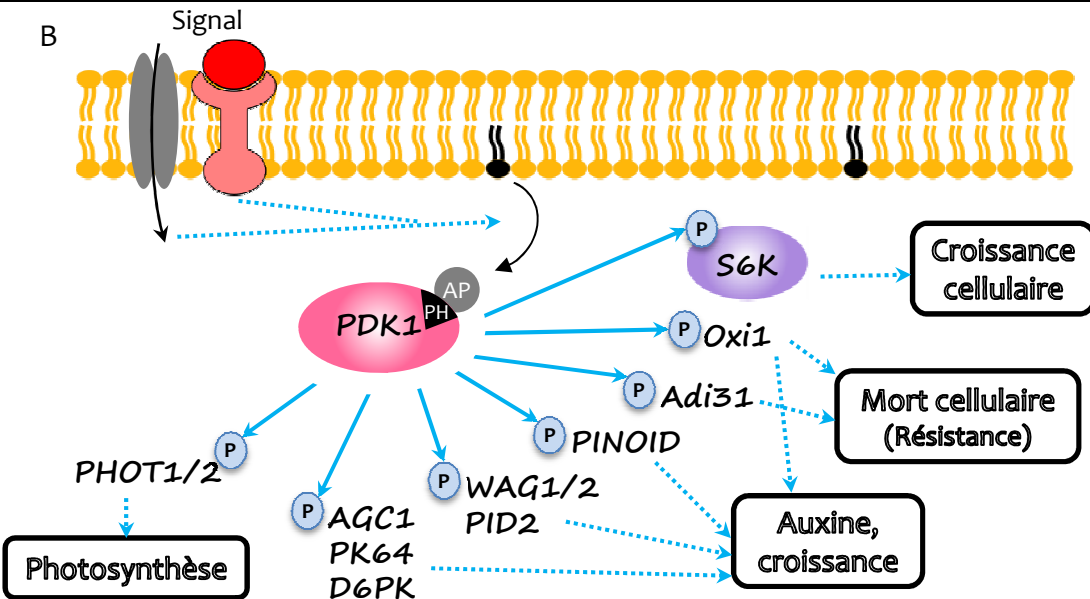
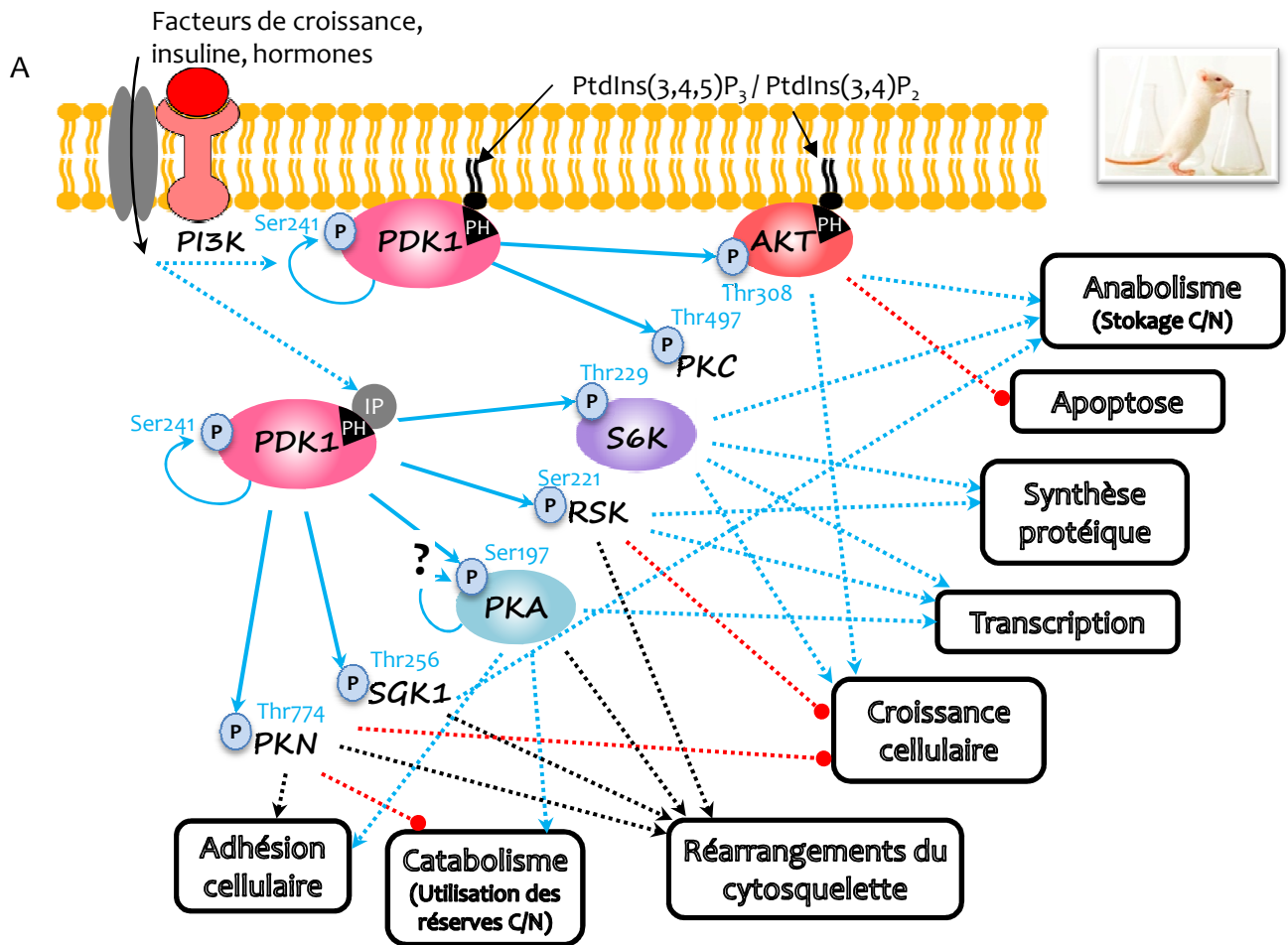
Ces grandes familles semblent communes aux eucaryotes puisqu'elles sont présentes également chez *Arabidopsis* (Champion *et al.*, 2004). Les kinases citées en exemple sont très impliquées dans la régulation du métabolisme et/ou la mise en place de réponses à l'échelle de la cellule entière. Les paragraphes suivants vont s'attacher à présenter les interactions et les rôles des intégrateurs majeurs présentés dans la figure 2.

### 1.5. Les protéines kinases AGC au cœur de la croissance cellulaire

On parle aisément de « signalisation des AGC kinases » tant cette voie de réponse métabolique implique un nombre important d'acteurs clés s'ajustant finement pour engendrer les réponses adaptées aux signaux extracellulaires tels que les facteurs de croissance et l'insuline. Trente-neuf membres ont été recensés chez *Arabidopsis* (Bögge *et al.*, 2003) et 60 chez l'homme (Pearce *et al.*, 2010).

#### *PDK1, véritable « hub » de la voie de signalisation des AGC kinases*

Parmi les messagers secondaires activant des mécanismes de réponse à l'intérieur des cellules figurent en première place les produits de dégradation des phospholipides membranaires. Par



**Figure 5. Activation, cibles et fonctions connues de la 3-phosphoinositide-dependant kinase-1 (PDK1).** (A) Chez les animaux. (B) Chez les plantes.

Les phospholipides membranaires peuvent être dégradés en inositols phosphates solubles par des phospholipases, composés permettant la localisation cytoplasmique de la PDK1 et/ou être modifiés par la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) en phosphatidylinositols (PtdIns) propices à l'ancrage de la PDK1 à la membrane par l'intermédiaire de son domaine PH (pleckstrin homology). Ces PtdIns peuvent être déphosphorylés par des phosphoinositides phosphatases (telles que la Phosphatase and TENSin homolog, PTEN), événement contrecarrant la signalisation PI3K (Bögge et al., 2003).

AKT, Ak- thymoma; Adi3, AvrPto-dependent Pto-interacting protein-3 (tomate); AP, acide phosphatidique; D6PK, D6 protein kinase; IP, inositol phosphate.; Oxi1 (AGC2), oxidative signal inducible-1; PKA/C/N, protein kinase A/C/N; RSK, ribosomal S6 kinase; S6K, S6-kinase; SGK, serum and glucocorticoid induced protein kinase.

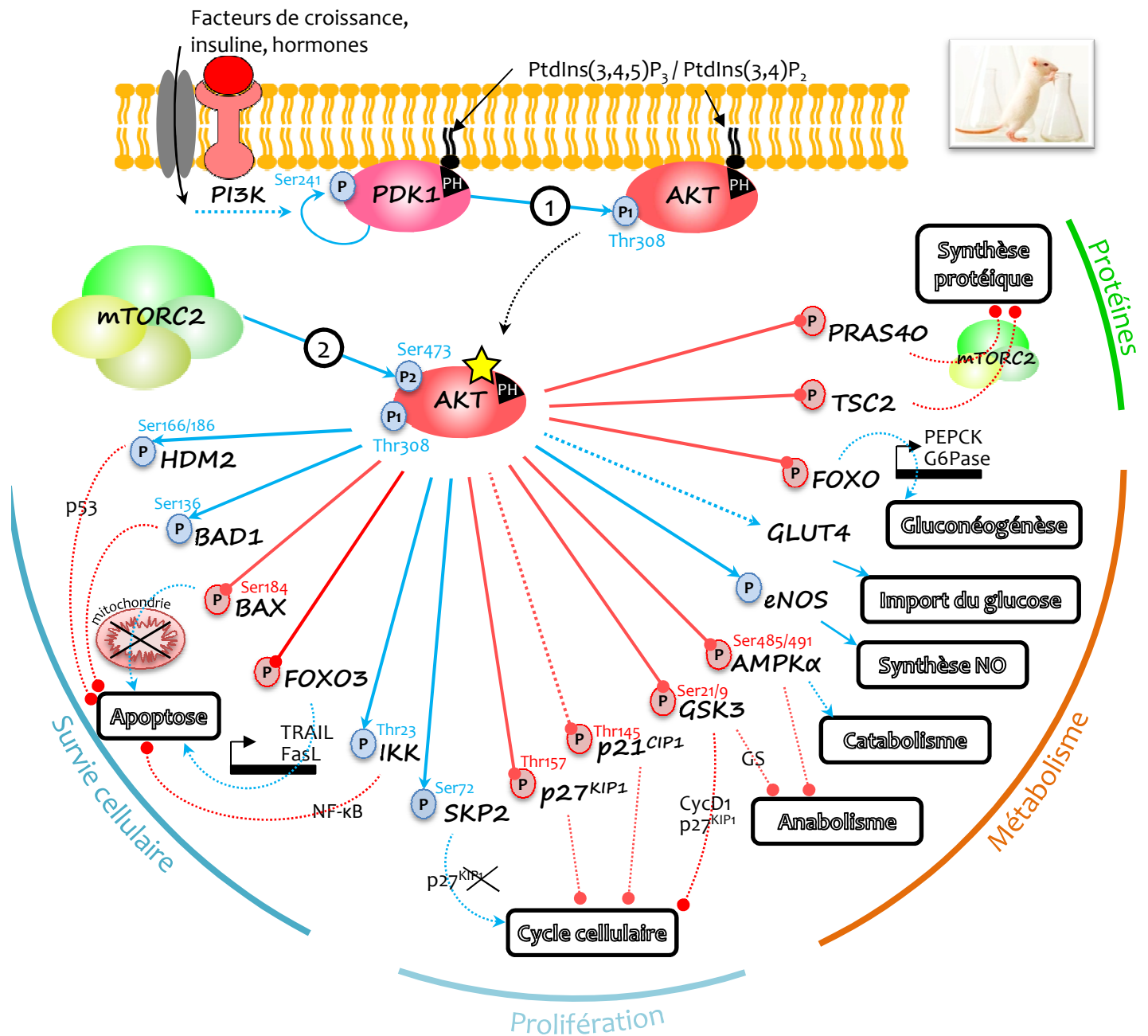


l'intermédiaire des deux mécanismes décrits dans la légende de la figure 5, la PDK1 est en mesure d'atteindre à la fois ses cibles membranaires et cytosoliques. Ce mécanisme est très bien décrit chez l'animal (Figure 5A) (Pearce *et al.*, 2010) mais reste incomplet chez *Arabidopsis* (malgré la conservation du domaine « pleckstrin homology » (PH)) chez lequel aucun homologue de la PI3K (kinase essentielle dans la formation de phosphatidylinositols (PtdIns) signaux) n'a été identifié à ce jour (Figure 5B). *Via* ce mécanisme, la PDK1 est la véritable plaque tournante de cette voie de signalisation et peut atteindre ses cibles en quelques minutes seulement après la perception du signal et la synthèse de messagers (Mora *et al.*, 2004). De plus, la PDK1 étant capable de s'autophosphoryler sur sa Ser241, cette protéine est constitutivement active (Casamayor *et al.*, 1999) et la phosphorylation de cibles en aval (telle qu'AKT) ne dépend donc que de la perception des messagers secondaires décrits plus haut (Figure 5).

### AKT, cible de la PDK1 - intégration et propagation du signal perçu par la voie PI3K

La phosphorylation par la PDK1 de la PK AKT (également appelée PKB) sur sa thréonine 308 (Alessi *et al.*, 1997; Stokoe *et al.*, 1997) ne confère pas à cette dernière une activité totale. Afin d'être pleinement activée, une seconde modification par le complexe kinase mTORC2 (« mammalian TOR-Complex 2 ») sur la sérine 473 d'AKT est nécessaire (Sarbasov *et al.*, 2005). Ce mécanisme, ainsi que l'importance de cette kinase AGC dans la croissance cellulaire chez les mammifères, sont schématisés dans la figure 6.

L'activation d'AKT dans des conditions « normales », c'est-à-dire lorsque la cellule ne perçoit pas de signaux nécessitant la mise en place de réponses de défense ou de survie, entraîne son implication dans le maintien de mécanismes propices à la croissance et au développement, en parallèle de l'inactivation des fonctions associées au stress et en particulier de l'apoptose (Sussman *et al.*, 2011). En effet, le mécanisme d'apoptose est mis en place en réponse à une perturbation forte de l'homéostasie énergétique nécessitant une forme de « suicide cellulaire » préférable à la dégénérescence de la cellule et au développement de tumeurs (Liang & Slingerland, 2003). AKT va ainsi cibler toute une batterie de protéines impliquées dans l'apoptose. Parmi celles-ci, la phosphorylation/activation de l'ubiquitine ligase E3 HDM2 (« Human Double Minute-2 ») empêche l'accumulation du facteur apoptotique p53 (Meek & Knippschild, 2003; Milne *et al.*, 2004). AKT exerce également un effet anti-apoptotique *via* la famille de protéines Bcl2, en empêchant d'une part la dégénérescence mitochondriale provoquée par la protéine BAX (« Bcl2-Associated protein X ») (Gardai *et al.*, 2004) et d'autre part en activant un interactant de la famille Bcl2, BAD1 (« Bcl2-Antagonist of Death-1 »), inhibiteur de l'apoptose (Datta *et al.*, 1997).



**Figure 6. Mécanisme d'activation, cibles et grandes fonctions cellulaires régulées par AKT chez l'animal.** AKT est activée en réponse à des facteurs environnementaux tels que l'insuline ou des facteurs de croissance par l'intermédiaire de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et de la 3-phosphoinositide-dépendent protein kinase-1 (PDK1, cf. figure 5). Une première étape de phosphorylation (P1) par la PDK1 au niveau membranaire (par l'intermédiaire du domaine PH, pleckstrin homology) permet une seconde phosphorylation (P2) par le complexe kinase mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex-2), conférant une activité complète à AKT (symbolisée par une étoile). Les flèches bleues indiquent une activation, les rouges une inhibition. Les traits en pointillés indiquent un mécanisme indirect.

TRAIL et FasC sont des ligands de récepteurs de mort cellulaire conduisant vers l'apoptose. Nuclear factor-kappa B (NF-κB) est un facteur de transcription impliqué dans l'inhibition de l'apoptose. AMPKα, AMP-activated protein kinase subunit α; BAD1, bcl2-antagonist of death-1; BAX, Bcl2-associated protein X; CycD1, cyclin D1; eNOS, endothelial nitric oxid synthase; FOXO3, forkhead transcription factor-3; G6Pase, glucose-6-phosphatase; GLUT4, glucose transporter-4; GS, glycogen synthase; GSK3, GS kinase-3; HDM2, human double minute-2; IKK, IKB kinase; p21<sup>CIP1</sup>; p27<sup>KIP1</sup>; p27<sup>KIP1</sup>, p27 cyclin-dependent kinase inhibitor; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxylase-kinase; PRAS40, proline-rich Akt Substrate of 40kDa; PtdInsP, phosphatidilinositol-phosphate; SKP2, S-phase kinase-associated protein-2; TSC2, tuberous sclerosis complex-2

Finalement, la phosphorylation/activation de la Thr23 de l'IKK (« IKB Kinase ») provoque l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, empêchant la mise en place de l'apoptose (Ozes et al., 1999).

Lorsque l'environnement physiologique est propice au développement, AKT s'avère également être un activateur de la division cellulaire. Ceci s'effectue par l'inactivation d'inhibiteurs du cycle cellulaire et de la transition G1-S tels que p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup> (Rössig et al., 2001; Shin et al., 2002; Liang et al., 2002) et par l'activation de la protéine F-box SKP2 (« S-phase Kinase-associated Protein-2 »), elle-même activatrice du cycle cellulaire par l'intermédiaire de la dégradation de p27<sup>KIP1</sup> (Lin et al., 2009). AKT phosphoryle et inhibe également les deux isoformes existantes de la « Glycogen Synthase Kinase-3 » (GSK3), un autre substrat impliqué dans la régulation du cycle cellulaire (Cross et al., 1995). Or ces protéines régulent négativement la division cellulaire en phosphorylant et stabilisant p27<sup>KIP1</sup> (Surjit & Lal, 2007) et en conduisant la cycline D1 vers la dégradation (Diehl et al., 1998), ce qui renforce le rôle d'AKT dans la progression du cycle cellulaire.

Un autre aspect essentiel de cette kinase AGC est son impact majeur sur le métabolisme avec une fonction globale de régulation du développement et des biosynthèses. Ceci se traduit en premier lieu par l'activation de la relocalisation des transporteurs de glucose GLUT4 (« GLUcose Transporter 4 ») au niveau de la membrane plasmique, favorisant l'import de sucre dans la cellule, notamment en réponse à un pic d'insuline (Cong, 1997; Wang et al., 1999b). La synthèse du glycogène est également favorisée par l'intermédiaire de l'inhibition de la GSK3. Des facteurs de transcription FOXO sont également ciblés et engendrent l'expression de gènes tels que la PEPCK (« PhosphoEnolPyruvate Carboxyl Kinase ») et la G6Pase (« Glucose 6-Phosphatase »), induisant par conséquent la néosynthèse de glucose. Le métabolisme carboné est également régulé *via* la phosphorylation de l'AMPK sur sa sérine 485 (AMPK $\alpha$ 1) ou 491 (AMPK $\alpha$ 2) (Horman et al., 2006). Nous reviendrons plus en détail sur cette kinase par la suite (*cf.* Introduction 1.7). Enfin il est à noter un rôle essentiel d'AKT dans la phosphorylation de la « Nitric Oxid Synthase » endothéliale (eNOS) et l'activation ainsi engendrée de la synthèse de l'oxyde nitrique, essentielle dans la vasodilatation et la contraction cardiaque (Sussman et al., 2011).

A ce jour, aucun orthologue d'AKT n'a été identifié chez les végétaux, ce qui peut sembler étonnant étant donné ses rôles primordiaux dans la cellule animale. D'autres acteurs pourraient remplacer cette enzyme et il a notamment été proposé que les 23 AGC kinases du groupe AGCVIII



seraient les orthologues chez les plantes à fleur des kinases AKT, PKC et PKG (Galván-Ampudia & Offringa, 2007).

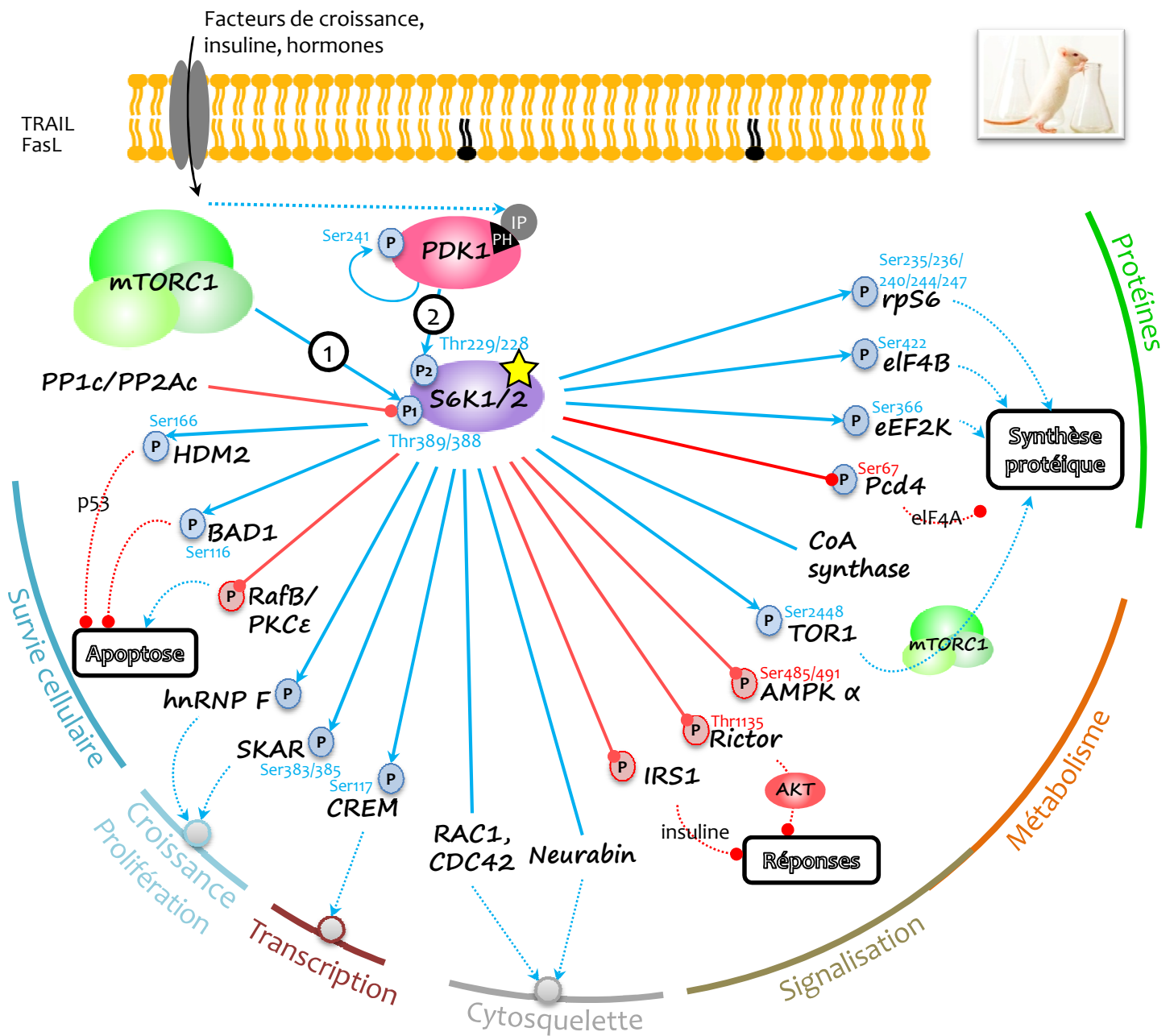
### Activation des kinases S6K et SGK1, cibles de la PDK1

Deux substrats particuliers de la PDK1 sont la S6K et la SGK1 (« Serum and Glucocorticoid induced protein Kinase 1 ») (Figure 5A). Ces deux kinases, membres également de la famille AGC, présentent un mécanisme d'activation intéressant. Toutes deux nécessitent d'être primo-phosphorylées sur un résidu situé dans leur poche de liaison hydrophobe PIF (« PDK1 Interacting Fragment »), condition nécessaire à l'interaction de ce domaine avec la PDK1 (Biondi *et al.*, 2001). S'en suit une activation par phosphorylation sur le résidu Thr229 de la S6K (Pullen *et al.*, 1998; Alessi *et al.*, 1998) ou sur la Thr256 de SGK1 (Kobayashi & Cohen, 1999; Park *et al.*, 1999). Il est à noter que ces sites de phosphorylation sont situés sur la boucle d'activation dite « T-loop » des kinases AGC (boucle commune et essentielle à l'activation de l'ensemble des kinases). Ce mécanisme complexe d'activation est conservé chez *Arabidopsis*. Récemment, il a été montré que les résidus Thr449 (S6K1) et Thr455 (S6K2) sont phosphorylés par TOR (Xiong & Shen, 2012), autorisant l'interaction (en réponse à un stress osmotique) de la S6K avec TOR et l'activation subséquente par la PDK1 (Otterhag *et al.*, 2006; Mahfouz *et al.*, 2006).

La phosphorylation de la SGK1 impacte entre autres la régulation du transport d'ions (calcium, chlore, potassium, sodium), l'import de sucres (transporteurs d'hexoses GLUT1/4) et la dynamique du cytosquelette (Lang *et al.*, 2009). L'activation de la S6K conduit quant à elle à la synthèse de protéines importantes dans le stockage des acides aminés et pour la croissance cellulaire (Mora *et al.*, 2004). Le rôle et la régulation de cette dernière sont développés ultérieurement.

### La voie PDK1 chez *A. thaliana*

Chez *Arabidopsis*, la voie PDK1 joue un rôle essentiel dans la signalisation de l'auxine, une hormone végétale bien connue pour son rôle dans la croissance et le développement. La majorité des kinases du groupe AGCVIII est ciblée par la PDK1 et possède un motif PIF, identique à celui présent sur les PKC et AKT animales, sous-entendant l'existence d'un mécanisme d'activation similaire en réponse aux lipides membranaires (Zegzouti *et al.*, 2006b). C'est le cas de kinases impliquées dans le transport de l'auxine, telles que la « D6 Protein Kinase » (D6PK) et les kinases AGC1 (Zourelidou *et al.*, 2009), ou encore de la kinase PINOID responsable de l'efflux d'auxine hors de la cellule (Zegzouti *et al.*, 2006a) et de ses proches homologues PID2, WAG1 et WAG2 dont



**Figure 7. Mécanisme d'activation, cibles et grandes fonctions cellulaires régulées par la S6 kinase chez l'animal.** La S6K est phosphorylée deux fois pour être pleinement activée (en premier par mTORC1, mécanisme réversible via l'action de phosphatases, puis par PDK1).

Les flèches bleues indiquent une activation, les rouges une inhibition. Les traits bleus indiquent une interaction stabilisatrice. Les traits en pointillés indiquent un mécanisme indirect.

AMPK $\alpha$ , AMP-activated protein kinase subunit  $\alpha$ ; BAD1, bcl2-antagonist of death-1; CDC42, cell division cycle-42; eEF2K, elongation factor 2K; eIF4B, eukaryotic initiation factor 4B; HDM2, human double minute-2; hnRNP F, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F; IRS1, insulin receptor substrate 1; Neurabin, neural tissue-specific F-actin binding protein; Pcd4, programmed cell death protein 4; PKC $\epsilon$ , protein kinase C epsilon; PP, protein phosphatase; RAC1, Ras-related protein C; RafB, galactoside permease; Rictor, rapamycin-independent companion of TOR, complex 2; SKAR, S6K1 Aly/REF-like target; TOR, target of rapamycin

la délétion des gènes provoque de fortes perturbations dans l'organogénèse d'*Arabidopsis* (Santner & Watson, 2006; Cheng *et al.*, 2008). Deux kinases phosphorylant la phototropine (photorécepteur de la lumière bleue), PHOT1 et 2, sont également impliquées dans cette voie de signalisation et régulent le phototropisme dans des conditions de faible (PHOT1) ou forte (PHOT2) intensité lumineuse (Galván-Ampudia & Offringa, 2007) (Figure 5B).

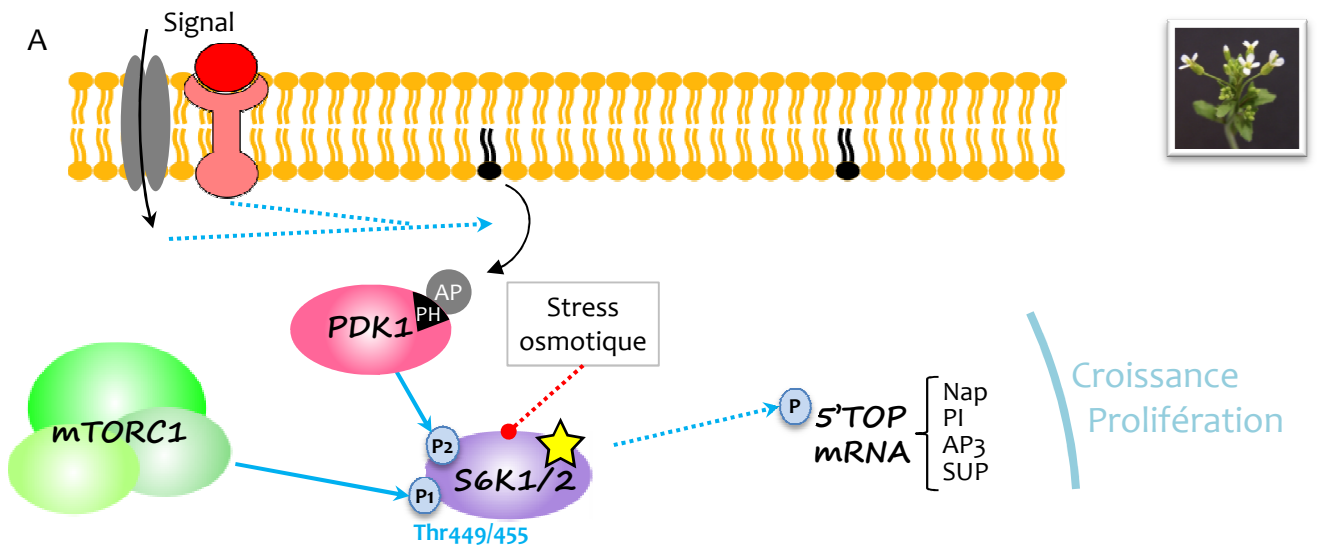
Bien que l'orthologie complète de cette voie PI3K/PDK1 entre les mammifères et les plantes ne soit pas totale, il apparaît clairement que les conséquences de son activation par des facteurs de croissance (reflétant un état physiologique non stressé) sont similaires, c'est à dire la mise en place de mécanismes permettant à la cellule de croître, de se diviser (évidences chez l'animal) et à l'organisme de se développer (évidences à la fois chez l'animal et chez les plantes).

### La S6K et son implication dans la croissance cellulaire et l'anabolisme

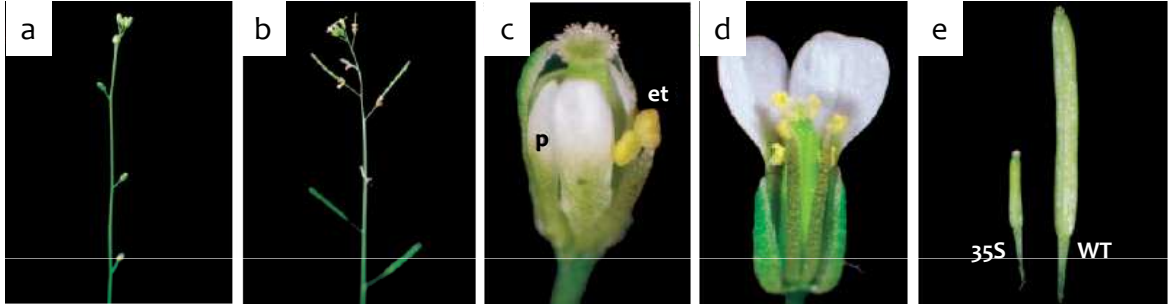
Chez l'animal, de nombreuses cibles directes de la protéine S6K ont été caractérisées. Certaines sont communes à AKT (Figure 7), comme les protéines HDM2 et BAD1, inhibitrices de l'apoptose (Harada *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2006), alors que d'autres sont indépendantes d'AKT comme la formation d'un complexe S6K2/PKCε/RafB empêchant la mise en place de l'apoptose (Pardo *et al.*, 2006). De même, la S6K joue un rôle similaire à AKT en faveur de la croissance et de la prolifération cellulaire en réponse à des stimuli physiologiques favorables. La phosphorylation/activation par la S6K2 de la hnRNP F (« heterogeneous RiboNucleoProtein F »), promeut la prolifération cellulaire et ce mécanisme implique un partenaire désormais indissociable de cette voie de signalisation, la kinase mTOR qui sera traitée plus en détail dans la partie suivante (Goh *et al.*, 2010). En outre, il a été montré en 2004 que la S6K1 active spécifiquement le facteur de croissance cellulaire SKAR (« S6K1 Aly/REF-like target ») (Richardson *et al.*, 2004). Les spécificités mises en évidence dans ces travaux laissent présager un niveau de régulation fin de cette voie de signalisation, passant par l'activité de l'une ou l'autre des isoformes S6K1 et S6K2.

Un rôle prépondérant dans la régulation du métabolisme est également à souligner puisque la S6K a pour cible des protéines régulatrices clés du métabolisme carboné et de la synthèse protéique telle que l'AMPK. En phosphorylant sa Thr485 (AMPKα1) ou sa Thr491 (AMPKα2), la S6K éteint les réponses au stress associées à cet intégrateur clé des signaux environnementaux (Dagon *et al.*, 2012). Par ailleurs, il a été montré, *in vitro* et *in vivo* dans des cellules de mammifères, que la CoA synthase (impliquée dans la synthèse de la coenzyme-A) interagit avec la S6K1, suggérant un rôle de cette enzyme dans la biosynthèse de molécules s'associant à ce





B



**Figure 8. Mécanisme d'activation, cibles et grandes fonctions cellulaires régulées par la S6 kinase chez les plantes.**

(A) Schéma de l'activation et des cibles de la S6K. La S6K de plantes nécessite deux événements de phosphorylation comme son orthologue animale pour être pleinement active. Elle est connue pour favoriser la synthèse d'ARNm impliqués dans la traduction. (B) Phénotypes floraux d'*Arabidopsis* surexprimant le gène S6K1 (d'après Tzeng *et al.*, 2009). Les inflorescences de plantes surexprimant le S6K présentent des siliques courtes et des fleurs fermées (a) comparées aux siliques développées et aux fleurs ouvertes et/ou sénescentes de plantes sauvages (b); les pétales (p) et les étamines (et) des surexprimeurs sont plus courtes (c) que celles des fleurs sauvages (d); les siliques s'arrêtent de croître à environ 1/3 de la taille attendue (e).

Les flèches bleues indiquent une activation, les rouges une inhibition. Les traits en pointillés indiquent un mécanisme indirect.

AP3, apetala 3; Nap, Nac-like, activated by AP3/PI; PI, pistillata; SUP, superman



cofacteur essentiel dans le métabolisme primaire (cycle de Krebs,  $\beta$ -oxydation des acides gras) (Nemazanyy *et al.*, 2004).

Par ailleurs, s'il est un mécanisme finement régulé par la S6K, il s'agit de la synthèse protéique. Cette enzyme a notamment été mise en avant pour sa capacité à phosphoryler la sous-unité de 40kDa S6 ribosomale, et ainsi activer la traduction (Shima *et al.*, 1998). Trois autres protéines sont phosphorylées par la S6K, permettant l'initiation puis l'élongation de la synthèse protéique. Il s'agit du facteur d'initiation eIF4B (Raught *et al.*, 2004), du facteur d'élongation eEF2K (Wang *et al.*, 2001) et de l'inhibiteur de traduction, Pcd4 (Dorrello *et al.*, 2006) (Figure 7).

Une telle influence sur la cellule (survie cellulaire, régulation du métabolisme, traduction, dynamique du cytosquelette...) ne saurait avoir lieu sans l'existence de « parachutes ». La S6K est donc capable d'intervenir sur sa propre voie de signalisation et à ce jour, deux mécanismes de rétrocontrôle ont été mis en évidence. Le premier passe par la phosphorylation/inactivation de la protéine IRS1 (« Insulin Receptor Substrate 1 »), contrecarrant l'effet activateur initial de l'insuline sur cette voie (Harrington *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2004); le second met en jeu la phosphorylation de la protéine Rictor, membre du complexe mTORC2 et activateur d'AKT (Dibble *et al.*, 2009; Treins *et al.*, 2010; Julien *et al.*, 2010) (*cf.* figure 5). Qui plus est, l'activation de la S6K requiert, comme cité dans le paragraphe concernant la PDK1, un double événement de phosphorylation dont le mécanisme exact reste encore à préciser (Alessi *et al.*, 1997; Burnett *et al.*, 1998; Weng *et al.*, 1998; Isotani *et al.*, 1999; Magnuson *et al.*, 2012). La complexité de régulation subie par la S6K reflète la convergence et la nécessité d'une intégration fine des signaux perçus par la cellule.

Concernant les plantes, deux isoformes de la protéine S6K ont été identifiées chez *Arabidopsis*, la S6K1 (ou ATPK1) et la S6K2 (ATPK19) (Zhang *et al.*, 1994; Mizoguchi *et al.*, 1995). Bien que leur environnement métabolique ne soit pas aussi bien connu que chez leurs orthologues de mammifères, des études les rendent d'ores-et-déjà clés dans la signalisation PDK1 (Figure 8). L'ARNm du gène S6K1 est exprimé dans des tissus où la division est rapide (zones méristématiques, organes des jeunes boutons floraux) (Tzeng *et al.*, 2009) et la surexpression de la S6K1 chez *Arabidopsis* altère le développement des étamines et des pétales, phénomène empêchant le développement normal des fleurs et l'obtention de siliques (Figure 8). Les auteurs émettent l'hypothèse que la protéine S6K1 serait importante dans la prolifération des cellules des tissus floraux (et par extension des zones de forte division) *via* la régulation d'ARN messagers dits « 5'TOP mRNA » (*i.e.* possédant une étiquette oligopyrimidique sur leur séquence; chez l'animal, cette signature est caractéristique d'ARNm impliqués dans la traduction et activés par la S6K1

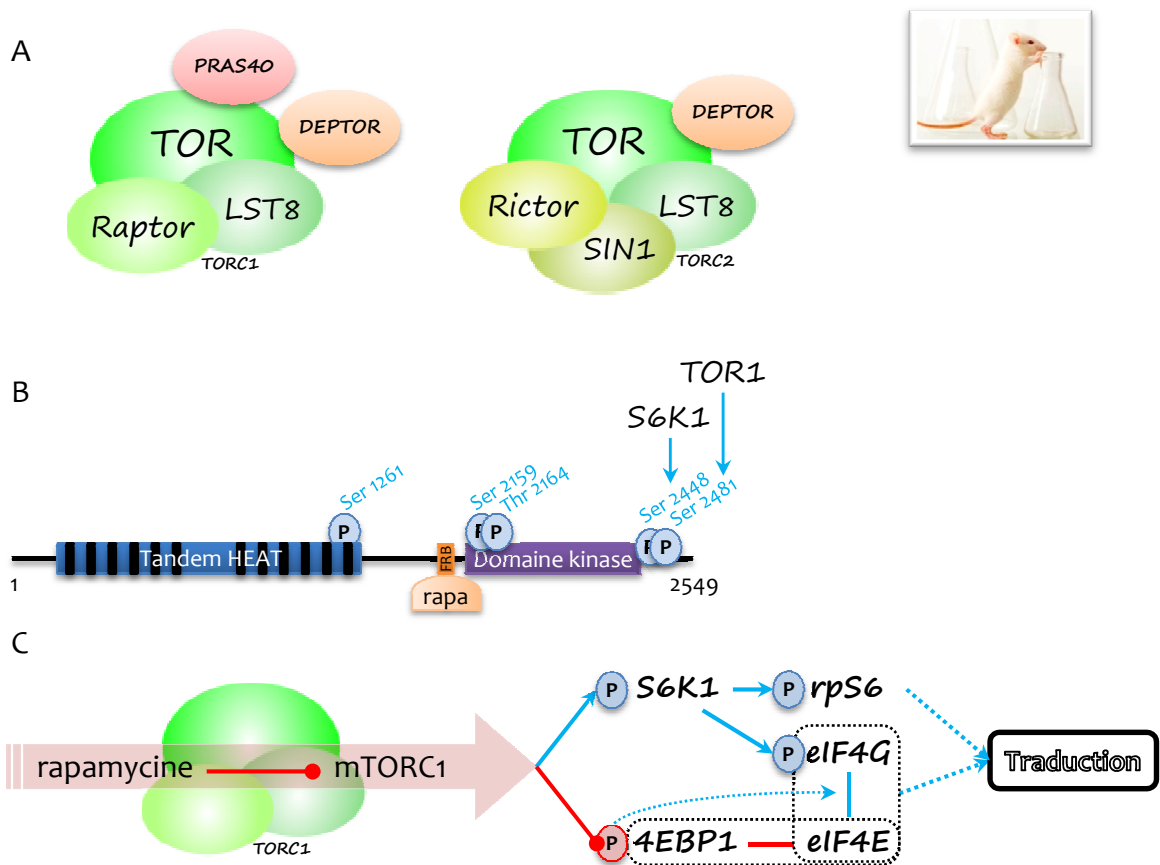


Figure 9. Les complexes TORC1 et TORC2 chez les animaux (D'après Magnuson *et al.*, 2012 et Weber & Gutmann, 2012).

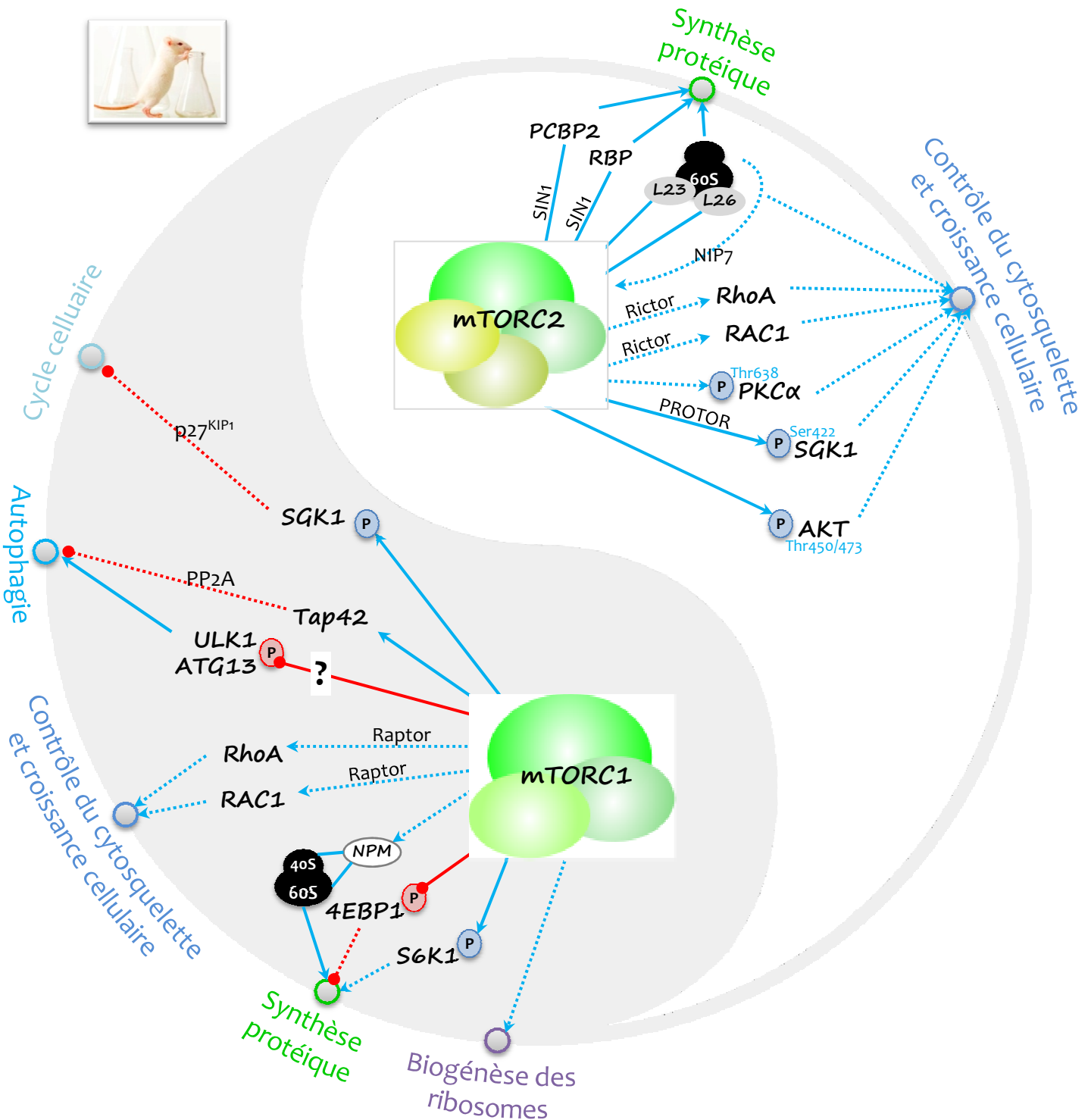
- (A) **Deux complexes TOR coexistent chez la levure et l'animal.** Le complexe TORC1 est composé de la kinase TOR1 ou TOR2 et des interactants LST8 (lethal with sec thirteen 8) et Raptor (regulatory associated protein of TOR). Le complexe TORC2 est composé de la kinase TOR1 ou TOR2 et des interactants, Rictor (rapamycin-insensitive companion of TOR) et SIN1 (stress-activated MAPK interacting protein). PRAS40 (prolin-rich AKT substrate of 40kDa) et DEPTOR (DEP domain-containing) sont des régulateurs négatifs.
- (B) **Schéma de la structure de la protéine mTOR1 et des principaux sites d'activation par phosphorylation.** Le motif répété HEAT (tandem) (Huntington, elongation factor 3, A subunit of PP2A phosphatase and TOR1) semble être impliqué dans les interactions protéine-protéine; la rapamycine (rapa) se fixe au domaine FRB (FKBP12-rapamycin binding). Les phosphorylations des résidus Ser1261, Ser2159 et Thr 2164 promeuvent la signalisation mTORC1; une fois activée, TOR1 est capable de s'autophosphoryler sur sa sérine 2481 et subit un rétrocontrôle positif de la S6 kinase (S6K) sur sa sérine 2448.
- (C) **Conséquences d'un traitement par la rapamycine sur deux cibles du complexe mTORC1.** La S6K1 est phosphorylée/activée sur sa Thr389 engendrant l'activation de la protéine ribosomale S6 (rpS6) nécessaire à la synthèse protéique. Le facteur 4EBP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1) inhibant l'initiation de la traduction en s'associant au facteur eIF4E est phosphorylé par mTORC1, libérant eIF4E qui, en s'associant au facteur eIF4G phosphorylé par la S6K, déclenche l'initiation de la traduction (Pause *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1994).  
Les flèches bleues indiquent une activation, les rouges une inhibition. Les traits en pointillés indiquent un mécanisme indirect.

(Weber & Gutmann, 2012)) tels que les gènes « Nac-like, activated by AP3/PI » (NAP), Pistillata (PI), Apetala 3 (AP3) et Superman (SUP).

### 1.6. TOR, un intégrateur AGC-dépendant et indépendant ?

Comme cité à plusieurs reprises dans les paragraphes précédents, les protéines mTOR1 et 2 sont indissociables de cette voie de signalisation PDK1 bien qu'ayant, comme ceci va être explicité maintenant, leurs propres voies de réponse. Chez l'animal, deux complexes mTORC1 et mTORC2 coexistent et sont associés à des partenaires pour former deux multimères protéiques distincts aux fonctions variables (Figure 9A). Bien que répondant tous deux à des stimuli pro-développementaux (hormones, facteurs de croissance, facteurs mitotiques...), ces deux complexes ne montrent pas la même sensibilité vis-à-vis de la rapamycine, un immunosuppresseur utilisé en médecine. En effet, le complexe mTORC1 est sensible à cette molécule tandis que mTORC2 y est insensible. De même, les grandes fonctions qu'ils régulent, bien que toutes aboutissant à la croissance cellulaire, semblent diverger. En effet, le premier, bien caractérisé, est impliqué dans l'activation des processus anaboliques (synthèse protéique) et l'inhibition de processus cataboliques comme l'autophagie, alors que mTORC2 semble principalement promouvoir la prolifération et la survie cellulaire (Magnuson *et al.*, 2012). Cependant, la situation est peut-être plus complexe, la récente implication de mTORC2 dans la synthèse protéique semblant indiquer une certaine redondance de fonction entre les deux acteurs (Weber & Gutmann, 2012).

Chez les animaux, TORC1 est un complexe composé de la kinase mTOR1 (ou mTOR2) et de deux protéines compagnes, Raptor (« Regulatory Associated Protein of TOR ») et LST8 (« Lethal with Sec Thirteen 8 »). Dans le complexe TORC2, la PK mTOR s'associe à Rictor (« Rapamycin-Insensitive Companion of TOR »), LST8 et SIN1 (« Stress-activated MAPK Interacting protein ») (van Dam *et al.*, 2011). Se trouvent également parfois associés à ces complexes les régulateurs négatifs de l'activité de cette enzyme DEPTOR (« DEP domain-containing mTOR-interacting protein ») et PRAS40 (« Prolin-Rich AKT Substrate of 40kDa ») (Weber & Gutmann, 2012) (Figure 9A). Lorsqu'il est activé par des facteurs de croissance, le complexe TOR s'autophosphoryle sur sa sérine 2481 et subit également un rétrocontrôle positif d'une de ses cibles majeures, la S6K (Figure 9B). La S6K1 répondant à la voie dépendante de la rapamycine, l'ensemble des réponses relayées par la S6K1 sont donc propres à TORC1, sensible à cet agent, tandis que celles relayées par AKT mettent en jeu TORC2 (*cf.* figure 5). A l'inverse, TORC2, par l'intermédiaire de Rictor, est



**Figure 10. Cibles et grandes fonctions cellulaires régulées par les complexes mTORC1/2 chez l'animal (D'après Weber & Gutmann, 2012).** Les deux types de complexes partagent certaines fonctions (activation de la traduction) mais ont également leurs spécificités. Par exemple, par l'intermédiaire de SIN1, le complexe TORC2 est capable d'interagir avec les protéines PCBP2 et RBP essentielles dans la stabilisation et la traduction des ARN messagers (Ghosh et al., 2008).

Les flèches bleues indiquent une activation, les rouges une inhibition. Les traits entre protéines figurent des interactions. Les traits en pointillés indiquent un mécanisme indirect.

Les simples traits entre protéines figurent des interactions. 4EBP1, eIF4E-binding protein 1; AKT, Ak-thymoma; NPM, nucleophosmin; PCBP2, poly(rC) binding protein 2; p27<sup>KIP1</sup>, p27 cyclin-dependent kinase inhibitor 1; PKCα, protein kinase C alpha; RAC1, Ras-related protein C-1; PP2A, protein phosphatase 2A; PROTOR, protein observed with Rictor; Raptor, Rapamycin-associated protein of TOR; RBP, ribosome binding protein; Rictor, rapamycin-independant companion of TOR, complex 2; S6K1, S6 kinase 1; SGK1, serum and glucocorticoid induced protein kinase 1; SIN1, stress-activated protein kinase interacting protein 1; Tap42, type 2A phosphatase-associated protein of 42kDa; TOR, target of rapamycin

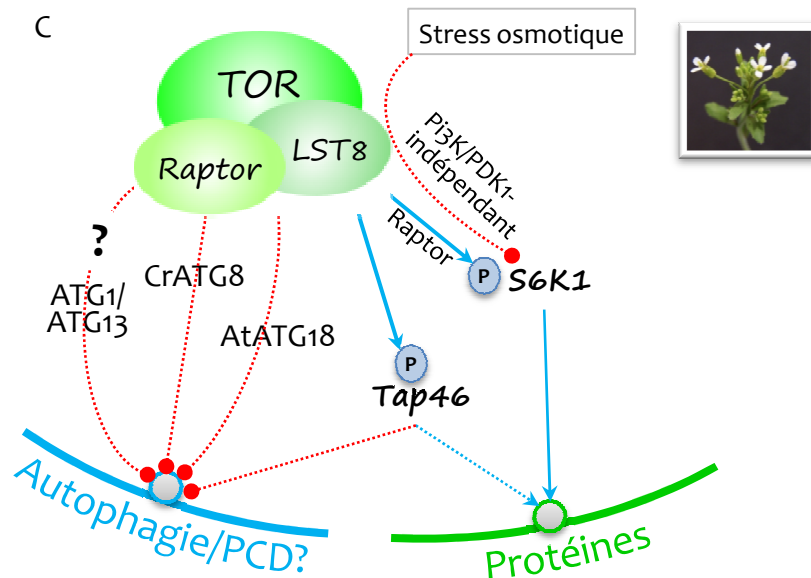
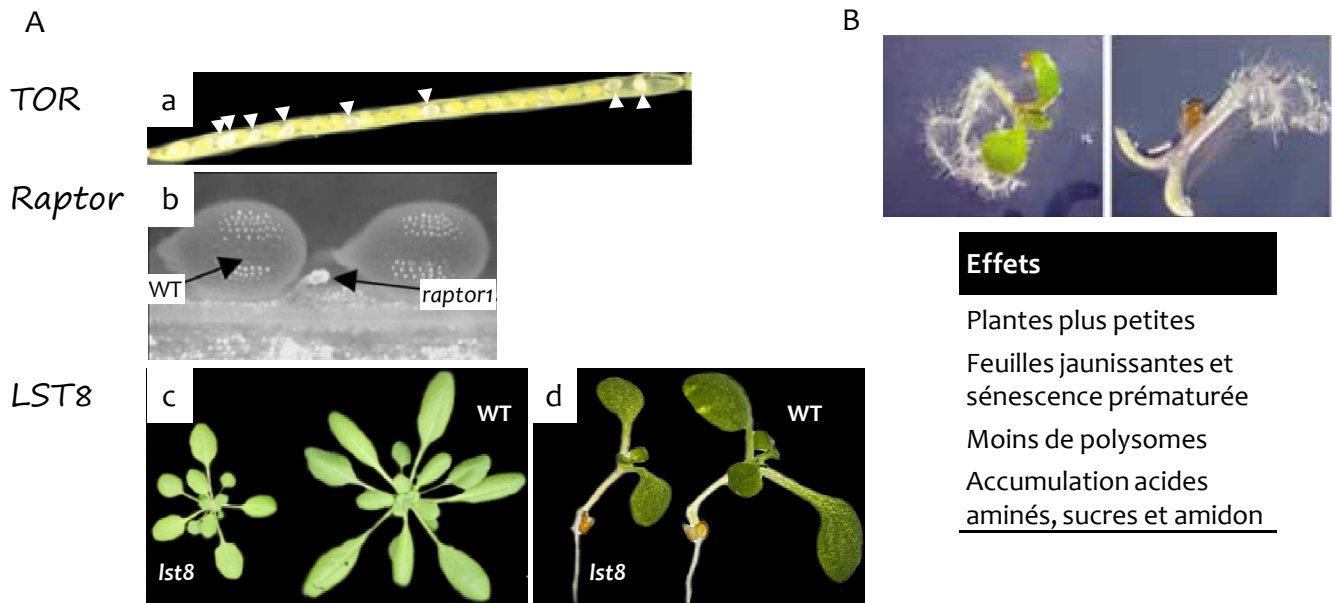
inhibé par la S6K1, mécanisme donnant lieu à une très étroite relation entre la S6K, TORC1, TORC2 et AKT.

La figure 10 synthétise les effets communs et divergents, voire antagonistes, des voies de signalisation en aval des deux complexes TORC1 et TORC2 chez les mammifères. Outre leur action sur la S6K1 et sur le facteur d'élongation 4EBP1 (cf. figure 9C), ces kinases ont un rôle prépondérant dans la synthèse protéique par l'intermédiaire d'autres acteurs. Il a ainsi été montré que TORC1 induit la traduction de la protéine « NucleoPhosMin » (NPM) qui participe à l'assemblage des sous-unités du ribosome et à leur export vers le cytosol (Olanich *et al.*, 2011). TORC2, via l'interaction avec diverses protéines, est également un activateur très impliqué dans la traduction (Ghosh *et al.*, 2008). Comme TORC1, TORC2 interagit avec des partenaires du ribosome, ici les protéines L23 et L26 de la sous-unité 60S (Oh *et al.*, 2010; Zinzalla *et al.*, 2011; Xie & Guan, 2011). Ainsi, il s'agit d'un véritable point de contrôle de la croissance cellulaire mettant en jeu une association entre TORC2 et le ribosome (par l'intermédiaire des sous-unités Rictor et SIN1) conduisant à l'activation de ce dernier, association répondant à la signalisation PI3K (Zinzalla *et al.*, 2011).

La S6K et AKT ne sont pas les seules kinases AGC à être ciblées par TOR. En effet, la SGK1, mentionnée auparavant et impliquée dans la survie cellulaire, est activée par la PDK1 suite à la primo-phosphorylation par le complexe TORC2. Ceci a lieu par l'intermédiaire de Protor (« PROTein Observed with Rictor », protéine capable de s'associer au complexe TORC2) (García-Martínez & Alessi, 2008; Pearce *et al.*, 2011). SGK1 est également la cible de TORC1 qui, par cet intermédiaire, induit la relocalisation cytoplasmique de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27<sup>KIP1</sup> (cf. chapitre III des résultats) (Hong *et al.*, 2008). La PKC $\alpha$  est également phosphorylée sur sa thréonine 638 de façon TORC2-dépendante, mécanisme convergent également vers la croissance cellulaire (Ikenoue *et al.*, 2008).

Enfin, les GTPases RhoA et RAC1 sont des cibles communes des deux complexes TORC, dont l'activation a été mise en évidence par l'intermédiaire des interactants Raptor et Rictor ainsi que par des approches d'inhibition des complexes TORC1/2 (Gulhati *et al.*, 2011). Ces cibles impliquent TOR dans le réarrangement du cytosquelette et l'adhésion cellulaire.

Chez *Arabidopsis*, ces complexes font également l'objet d'études approfondies (Dobrenel *et al.*, 2011; Robaglia *et al.*, 2012). Les protéines TOR, Raptor et LST8 ont leurs équivalents chez la plante modèle (van Dam *et al.*, 2011). Bien que la sous-unité catalytique TOR soit présente,



**Figure 11. Mécanismes d'activation, cibles et grandes fonctions cellulaires régulées par les complexes TOR chez les plantes.**

**(A) Phénotypes associés aux mutations des membres du complexe TOR.** (a) D'après Menand *et al.*, 2002 : siliques de mutants hétérozygotes *tor*<sup>+/-</sup>, les flèches pointent des « graines » blanches correspondant aux mutants *tor* embryo-létaux; (b) D'après Deprout *et al.*, 2005 : agrandissement de graines dans les siliques de mutants hétérozygotes *raptor1*<sup>+/-</sup>; D'après Moreau *et al.*, 2012 : les mutants *lst8* présentent un phénotype développemental retardé sur terreau (c) et *in vitro* (d).

**(B) Effet de l'inhibition par RNAi des transcrits du gène TOR chez *Arabidopsis*** (D'après Deprout *et al.*, 2007).

**(C) Schéma de l'implication du complexe TOR dans le métabolisme.** Le complexe TORC1 est composé de la kinase TOR1 ou TOR2 et de ses partenaires, Raptor (Rapamycin-associated protein of TOR) et LST8. ATG, Autophagy gene; Cr, *Chlamydomonas reinhardtii*; S6K1, S6 kinase 1.

Les flèches bleues indiquent une activation, les rouges une inhibition. Les traits en pointillés indiquent un mécanisme indirect.

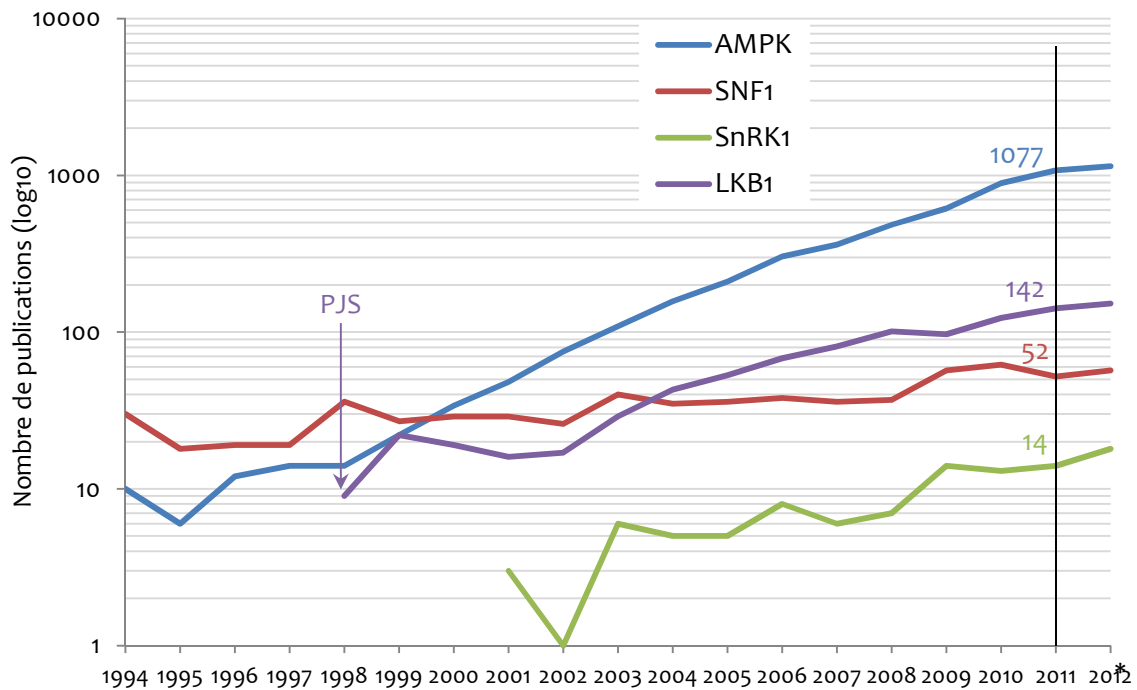


certaines parties de la protéine divergent. C'est le cas en particulier du domaine FRB où se fixe la rapamycine, ce qui pourrait expliquer pourquoi le complexe AtTORC est insensible à la rapamycine bien que celle-ci se fixe au domaine FBR de la PK végétale (Menand *et al.*, 2002). La délétion de ces gènes cause de profonds troubles du développement. En effet, l'extinction du gène *AtTOR* est embryo-létale (Menand *et al.*, 2002), celle de *RAPTOR* cause un arrêt du développement de l'embryon très précoce (Deprost *et al.*, 2005), tandis que des mutants d'insertion *LST8* présentent un retard de croissance important (Moreau *et al.*, 2012) (Figure 11A). Les plantes RNAi inductibles ciblant les transcrits du gène *AtTOR* sont plus petites, présentent des feuilles jaunissantes, moins de polysomes et accumulent anormalement les acides aminés, les sucres et l'amidon (Deprost *et al.*, 2007) (Figure 11B). D'un point de vue métabolique, le complexe AtTOR a été impliqué dans la régulation de l'autophagie par l'intermédiaire de différents gènes de la famille ATG (AuTophagy Gene) (Díaz-Troya *et al.*, 2008). Ainsi, *via* le complexe ATG1/ATG13 (ATG1 étant l'orthologue de la protéine ULK1/2 de mammifères, *cf.* figure 2), la voie TOR serait en mesure d'inhiber l'apoptose chez les plantes. Ce mécanisme, bien décrit chez la levure, nécessite cependant encore davantage d'études chez les mammifères et les plantes. Chez *Arabidopsis*, un tel mécanisme a également été mis en évidence en réponse à un manque d'énergie (Suttangkakul *et al.*, 2011) (Figure 11C). C'est aussi le cas chez d'autres espèces, comme chez *Chlamydomonas reinhardtii* où la protéine CrATG8 est induite en réponse à la rapamycine, inhibiteur de la voie de signalisation TOR chez cette algue, et en réponse à différents stress (manque d'azote, obscurité, stress oxydant) (Pérez-Pérez *et al.*, 2010).

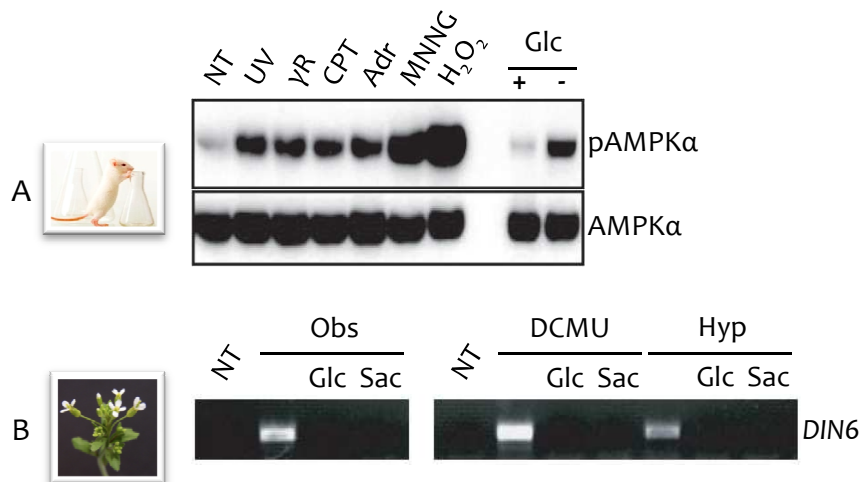
Tous ces effets et la relation étroite existant entre les complexes TORC et la famille de protéines ATG, acteurs principaux de la mise en place de l'autophagie chez les eucaryotes, indiquent un rôle important joué par cette kinase AGC, en terme de régulation de la mise en place d'un tel système de recyclage intracellulaire lorsque les conditions énergétiques ne nécessitent pas une réponse aussi drastique (Liu & Bassham, 2010).

### 1.7. La voie de signalisation LKB1/AMPK-SnAK/SnRK1

Il apparaît logique que la cellule ait également, au cours de l'évolution, mis en place des moyens de réponse aux conditions défavorables de développement, aux stress environnementaux. Parmi ces mécanismes de réponse figure en première place la voie de signalisation LKB1/AMPK et la famille de kinases SNF1/AMPK/SnRK1 (levure/mammifères/plantes) qui fait l'objet d'une recherche très active depuis les années 1990 (Figure 12). La caractéristique



**Figure 12. Evolution des publications concernant la voie de signalisation LKB1/AMPK.** Les mots clés « AMPK », « SNF1 », « SnRK1 » ou « LKB1 » ont été utilisés sur la base de données Pubmed. Les chiffres apparaissant sur le graphique correspondent aux nombres de publications pour l'année 2011. \* Pour l'année 2012, le nombre de publications parues jusqu'au 28 septembre 2012 a été extrapolé jusqu'à la fin de l'année. L'intérêt porté pour LKB1 a été décuplé lorsqu'un lien de causalité a été établi avec le syndrome de Peutz-Jeghers (PJS).



**Figure 13. Les kinases AMPK et SnRK1, famille de protéines activées par différents stress.** (A) Western-blot anti-AMPKα pThr172 (pAMPKα) et anti-AMPKα réalisé à partir d'échantillons protéiques de cultures cellulaires non traitées (NT) ou après traitement aux ultra-violets (UV), aux rayonnements gamma (γR), par un inhibiteur de la topoisomérase (camptothécine, CPT), par un agent intercalant de l'ADN (Adr), par l'agent mutagène/cancérogène MNNG et sous stress oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). D'après Bungard et al. 2010. (B) Niveaux de transcrits analysés par RT-PCR semi-quantitative du gène DIN6, rapporteur de l'activité de AtSnRK1 dans des feuilles d'*Arabidopsis* non traitées (NT), placées à l'obscurité (Obs), traitées par un inhibiteur de la photosynthèse (DCMU) ou placées en hypoxie (Hyp). L'activation du gène DIN6 par ces stress est inhibée par les sucres (Glc, glucose; Sac, saccharose). D'après Baena-González/Rolland et al., 2007.

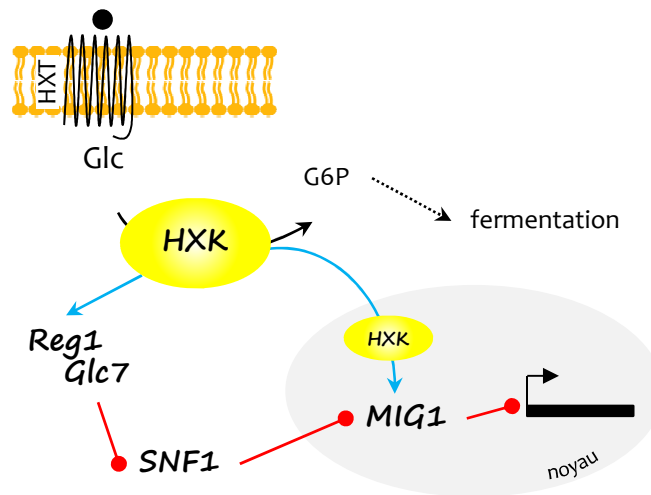


majeure de ces protéines est leur activation en condition de stress de nature très variée (Figure 13).

### Des kinases essentielles dans la signalisation

Historiquement, la kinase SNF1 a été identifiée lors d'un crible de mutants de levure sur la base de leur incapacité à utiliser des sources alternatives de carbone telles que le saccharose et le raffinose (Neugeborn & Carlson, 1984). En présence de glucose et en réponse à l'activation par l'hexokinase de la PP1 (« Protein Phosphatase 1 », composée des deux sous-unités Glc7 et Reg1), SNF1 est déphosphorylée/inactivée, mécanisme empêchant l'expression de gènes inhibés par le facteur de transcription MIG1 (« Maltose-Inducible Gene 1 ») et essentiels à la fermentation (Rolland *et al.*, 2006) (Figure 14). Chez les plantes, SnRK1 (SNF1-Related protein Kinase 1) est également un élément clé de la signalisation carbonée (Rolland *et al.*, 2006; Baena-González *et al.*, 2007; Polge & Thomas, 2007; Jossier *et al.*, 2009). A ce jour, trois voies de signalisation par le glucose sont connues dont deux impliquent l'hexokinase. La première dite « dépendante de l'hexokinase », utilise cette dernière, en plus de sa fonction enzymatique, en tant que senseur direct du glucose. L'effet principal de cette voie est de réprimer l'expression de gènes impliqués dans la photosynthèse tels que le gène codant la petite sous-unité de la RuBisCO. La seconde, dite « dépendante du métabolisme », impliquant un senseur du glucose situé en aval de l'hexokinase, induit, entre autres, l'expression de gènes de défense (*PR1*, *PR5*...). La dernière voie est indépendante de l'hexokinase, l'expression de certains gènes répondant directement au glucose (*CHS*, *PAL1*) (Rolland *et al.*, 2006) (Figure 15). Notre équipe a démontré l'implication d'AtSnRK1 au sein de cette signalisation par les sucres. Des plantes transgéniques surexprimant la sous-unité AtSnRK1 $\alpha$ 1 sont hypersensibles au glucose et voient la régulation par le glucose du gène *PR1* abolie, ainsi que celle des gènes *PR2* et *PR5* diminuée en réponse à ce sucre, résultats convaincants du rôle de cette kinase dans la voie de signalisation dépendante du métabolisme (Jossier *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'utilisation d'analogues de glucose et des travaux d'autres groupes ont permis de suggérer que SnRK1 serait impliquée dans plusieurs autres voies (voie dépendante de l'hexokinase potentiellement *via* l'acide abscissique (ABA) (Jossier *et al.*, 2009) et voie du tréhalose (Zhang *et al.*, 2009)).

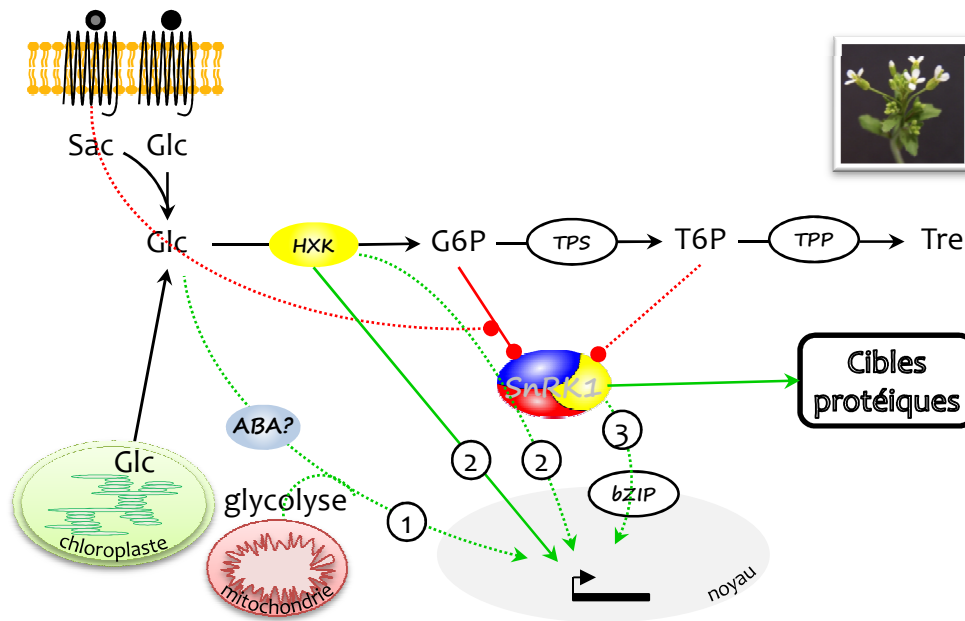
Au-delà de son rôle dans la signalisation par les sucres, les kinases AtSnRK1 ont été impliquées dans la réponse à des stress très variés tels que l'hypoxie, l'obscurité prolongée ou le DCMU. Baena-González/Rolland et collègues (2007) ont ainsi démontré que plus de 1000 gènes voient leur expression modulée dans des protoplastes surexprimant AtSnRK1 $\alpha$ 1 de façon transitoire.



**Figure 14. Rôle de SNF1 dans la signalisation sucre chez la levure (D'après Rolland et al., 2006).** L'hexokinase (HXK) agit en amont de la kinase SNF1 (sucrose non-fermenting 1) et l'inactive pour inhiber la synthèse de gènes inutiles lorsque le glucose est disponible pour la levure.

Les flèches bleues indiquent une activation, les rouges une inhibition. Les traits en pointillés indiquent un mécanisme indirect.

G6P, glucose-6-phosphate; HXT, hexose transporter; MIG1, maltose-inducible gene 1; Glc7 et Reg1 sont les deux sous-unités de la phosphatase PP1.



**Figure 15. Rôle de SnRK1 dans la signalisation par le glucose chez les plantes (D'après Rolland et al., 2006 et Crozet, 2010).** Trois voies de signalisation par le glucose sont connues chez les plantes. Une dépendante de l'hexokinase et faisant intervenir l'acide abscissique (ABA) (1), une autre dite dépendante de l'hexokinase dans laquelle SnRK1 serait impliquée (2) et enfin une voie dépendante du métabolisme dans laquelle SnRK1 interviendrait également (3).

Les traits pointés rouges figurent une inhibition. Les traits en pointillés indiquent un mécanisme indirect.

bZIP, basic leucine zipper; G6P, glucose-6-phosphate; Glc, glucose; HXK, hexokinase; Sac, saccharose; SnRK1, SNF1-related protein kinase 1; T6P, tréhalose-6-phosphate; TPP, T6P phosphatase; TPS, T6P synthase; Tre, tréhalose.

Trois cent vingt-deux gènes sont à la fois réprimés par la surexpression de la sous-unité catalytique et par des conditions de faible teneur en glucose ; à l'inverse, 278 gènes sont co-activés dans ces deux conditions. Ces travaux ont constitué un tournant dans la compréhension de l'implication des complexes SnRK1 de plante dans la régulation du métabolisme en condition de stress puisqu'il s'agit de la première analyse globale *in vivo* du rôle de ces régulateurs chez les plantes.

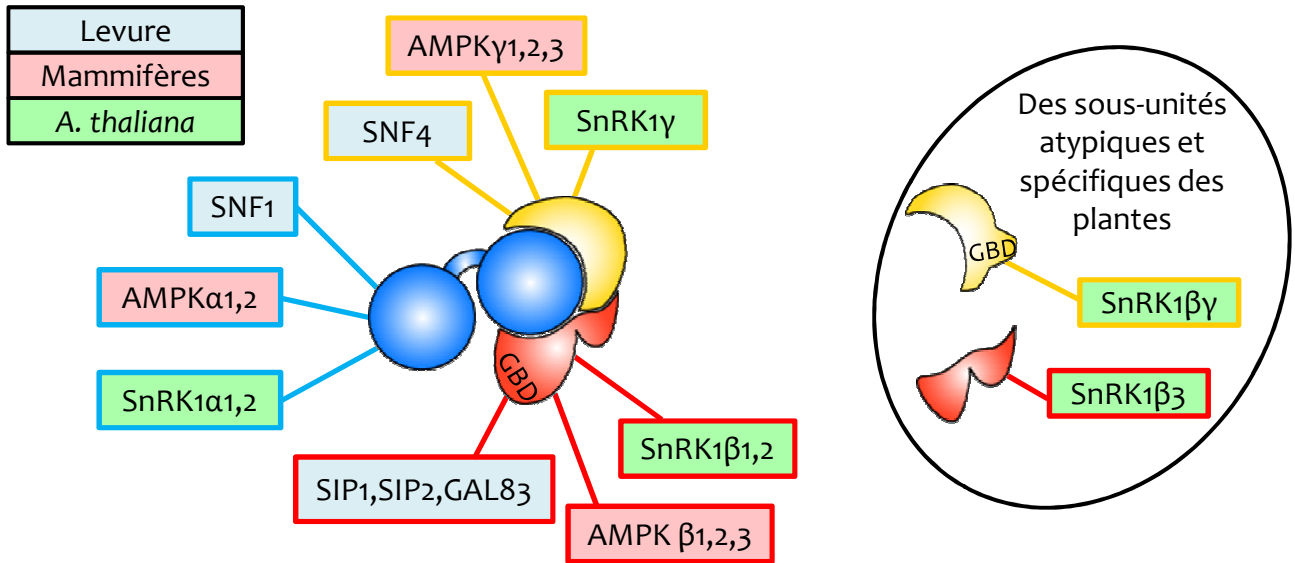
### Une conservation remarquable chez les eucaryotes

Les protéines SNF1/AMPK/SnRK1 forment une famille très conservée chez les eucaryotes (Figure 16) notamment de par leur structure hétérotrimérique composée d'une sous-unité catalytique  $\alpha$  et de deux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$  (Polge & Thomas, 2007).

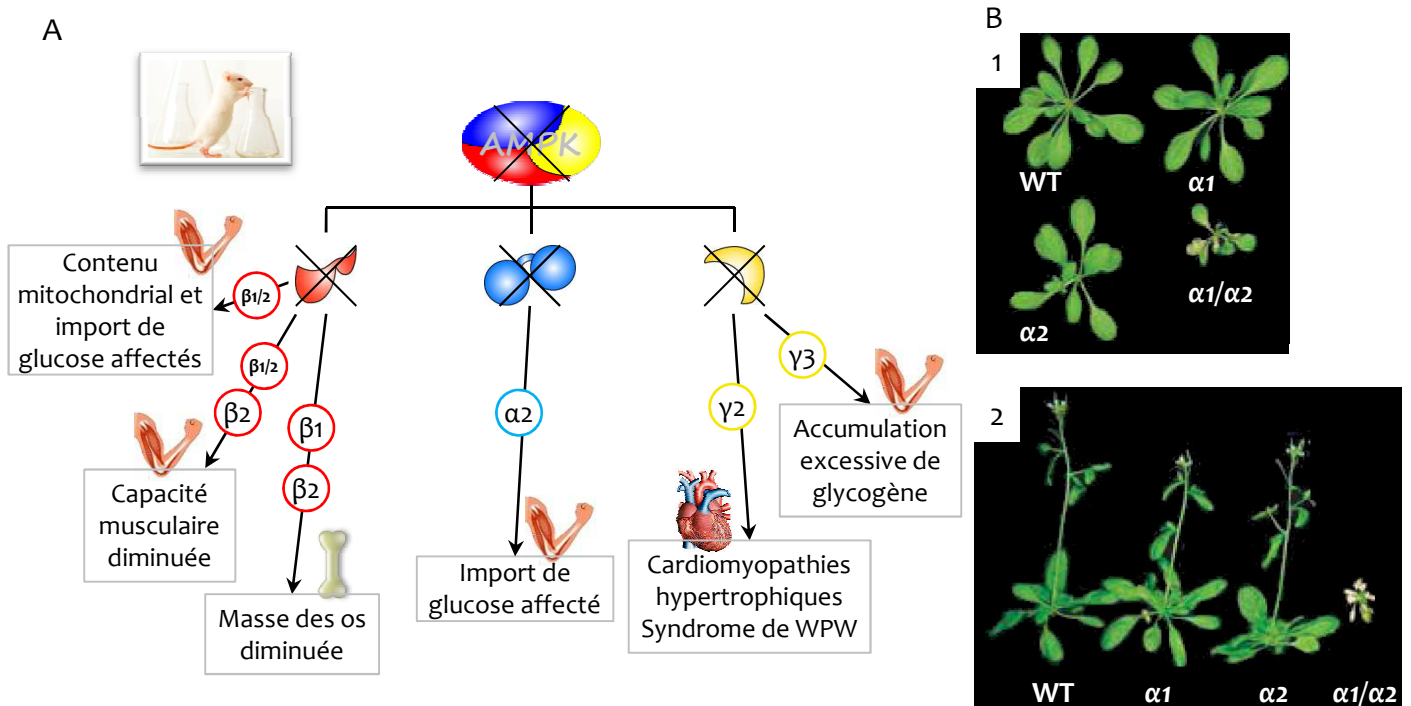
Chez la levure, SNF1 interagit avec SNF4, apparentée aux sous-unités de type  $\gamma$ , et avec 3 sous-unités de type  $\beta$  différentes, SIP1, SIP2 et GAL83 (Jiang & Carlson, 1997). Chez les mammifères, il existe 2 sous-unités de type  $\alpha$  (AMPK $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2), 2 sous-unités de type  $\beta$  (AMPK $\beta$ 1/ $\beta$ 2) et 3 sous-unités de type  $\gamma$  (AMPK $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2/ $\gamma$ 3). Enfin chez les plantes, il existe 3 gènes codant une sous-unité catalytique (AtSnRK1 $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2/ $\alpha$ 3),  $\alpha$ 3 s'avérant être très probablement un pseudo-gène (Halford *et al.*, 2000), 3 codant une sous-unité de type  $\beta$  (AtSnRK1 $\beta$ 1/ $\beta$ 2/ $\beta$ 3) et 2 codant une sous-unité de type  $\gamma$  (AtSnRK1 $\gamma$ / $\beta$  $\gamma$ ). Il est à noter que deux sous-unités sont atypiques et seulement présentes chez les plantes. De façon intrigante, AtSnRK1 $\beta$ 3, bien que capable de compléter le triple mutant de levure *sip1/sip2/gal83*, est plus courte que AtSnRK1 $\beta$ 1 et  $\beta$ 2, la région N-terminale et le domaine GBD, présents sur les deux autres sous-unités, étant absents de cette isoforme (Gissot *et al.*, 2004). Ce domaine GBD (« Glycogen Binding Domain »), a été ainsi nommé car capable d'interagir avec du glycogène chez les animaux. Au contraire, la sous-unité de type  $\gamma$  appelée AtSnRK1 $\beta$  $\gamma$  apparaît comme une sous-unité ayant résulté de la « fusion » d'une sous-unité de type  $\gamma$  et d'un domaine GBD. Cependant, malgré cette particularité, AtSnRK1 $\beta$  $\gamma$  complète le mutant *snf4* de levure au contraire de la sous-unité « classique » AtSnRK1 $\gamma$  (Gissot *et al.*, 2006; Polge & Thomas, 2007) (Figure 16).

### Un rôle physiologique important pour les sous-unités des complexes AMPK et SnRK1

Preuve de leurs rôles intracellulaire et physiologique essentiels, des mutations ponctuelles ou la délétion de sous-unités des complexes AMPK et SnRK1 sont responsables de troubles physiologiques importants, que ce soit chez les animaux ou chez les plantes.



**Figure 16. Les protéines kinases de type SNF1, hétérotrimères conservés chez la levure, les mammifères et les plantes.** Les sous-unités catalytiques  $\alpha$  sont en bleu, les sous-unités régulatrices  $\beta$  en rouge et  $\gamma$  en jaune. Chez *Arabidopsis*, il existe deux sous-unités atypiques spécifiques des plantes, SnRK1 $\beta\gamma$  et SnRK1 $\beta3$ . AMPK, AMP-activated protein kinase; GBD, glycogen binding domain; SNF1, sucrose non fermenting kinase 1; SnRK1, SNF1-related kinase 1



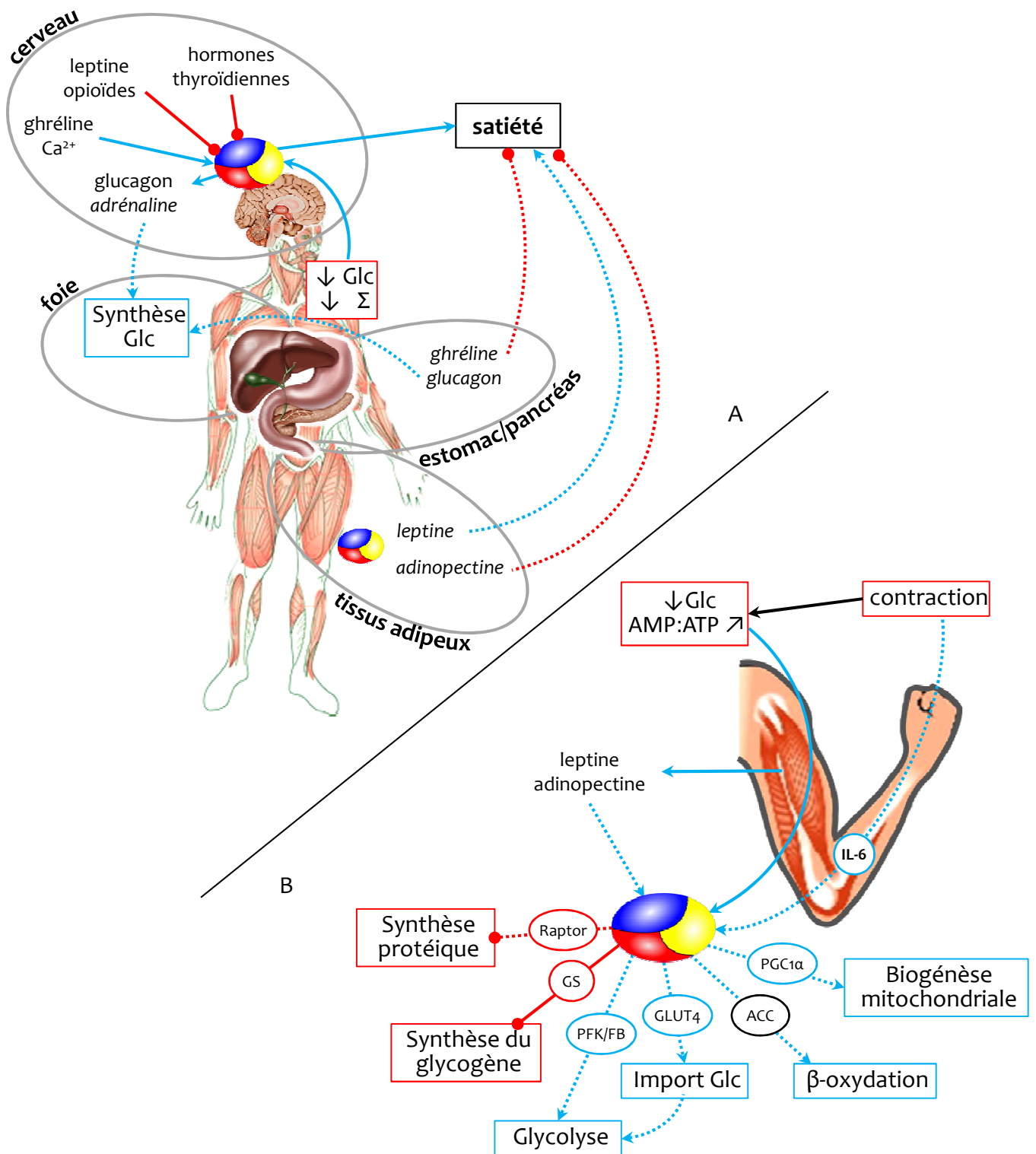
**Figure 17. Phénotypes associés à des mutations/délétions de gènes codant des sous-unités régulatrices chez l'animal et à l'extinction des gènes *AtSnRK1α1* et *AtSnRK1α2* chez les plantes.** (A) Des mutations ou délétions des gènes codant des sous-unités des complexes AMPK chez l'animal sont associées à de fortes perturbations physiologiques dont le syndrome de Wolff-Parkinson-White (WPW) (trouble du rythme cardiaque). Les tissus/organes concernés sont figurés par des images (cœur, muscles squelettiques et os).  $\beta1/2$  signifie que les deux sous-unités sont mutées,  $\beta1$  ou  $\beta2$ , une seule des 2 mutée. (B) D'après Baena-Gonzales/Rolland et al., 2007. Les plantes RNA1  $\alpha1$  et VIGS  $\alpha2$  mutées dans une seule des 2 sous-unités catalytiques des complexes AtSnRK1 ( $\alpha1$ ,  $\alpha2$ ) ne présentent pas de phénotype particulier au niveau des rosettes (1) mais un léger retard du développement de l'inflorescence par rapport aux plantes sauvages (WT) (2). Le double mutant  $\alpha1/\alpha2$  est quant à lui très affecté dans l'ensemble du développement de la plante (1 et 2).

Bien que son implication directe reste à élucider, l'AMPK a depuis longtemps été associée à l'obésité, à la résistance à l'insuline (diabète de type 2) et au cancer de par les voies métaboliques qu'elle régule (Steinberg & Kemp, 2009). Chez l'homme, plusieurs mutations de la sous-unité AMPK $\gamma$ 2 sont associées à des cardiomyopathies hypertrophiques et au syndrome de Wolff-Parkinson-White, un trouble du rythme cardiaque (Blair *et al.*, 2001). Par exemple, des cochons porteurs d'une mutation sur la sous-unité régulatrice AMPK $\gamma$ 3 accumulent du glycogène en excès dans les cellules des muscles squelettiques (Granlund *et al.*, 2010). Par ailleurs, la délétion du gène codant la sous-unité AMPK $\beta$ 2 chez la souris est responsable d'une forte diminution de la capacité maximale à l'exercice et de l'endurance, associée à une plus faible activité des kinases AMPK $\alpha$ 1 et AMPK $\alpha$ 2 dans les muscles squelettiques (Steinberg *et al.*, 2010). Une autre étude sur des souris KO (« Knock-Out ») AMPK $\beta$ 1 ou AMPK $\beta$ 2 a révélé une forte réduction du volume et de la masse des os (Quinn *et al.*, 2010). Le rôle de l'AMPK dans le métabolisme osseux fait l'objet de nouvelles données régulières, allant jusqu'à soulever la question de son implication dans l'ostéoporose (Jeyabalan *et al.*, 2012) (Figure 17A).

Chez *Arabidopsis*, aucune étude sur des mutants d'insertion des sous-unités catalytiques n'a pu être menée jusqu'à ce jour. En effet, seul un mutant d'insertion du gène *AtSnRK1 $\alpha$ 1* est répertorié dans la base de données SIGnAL (<http://signal.salk.edu/>) dont l'ADN-T est situé à l'extrémité C-terminale du gène, *i.e.* hors du domaine kinase situé du côté N-terminal de la protéine. Ceci est en accord avec des données obtenues au laboratoire révélant qu'environ 90% de l'activité *AtSnRK1* était relative à cette sous-unité (Jossier *et al.*, 2009) et que la délétion de ce gène pourrait s'avérer létale. Cependant, l'étude de mutants ARNi du gène *AtSnRK1 $\alpha$ 1* et de mutants VIGS (« Virus-Induced Gene Silencing ») du gène *AtSnRK1 $\alpha$ 2* a montré que les simples mutants, malgré un léger retard de développement de la hampe florale, ne présentent pas de phénotype particulier, les auteurs suggérant une redondance fonctionnelle des deux kinases. Par contre, les mêmes auteurs montrent que la diminution des transcrits des deux gènes (« double mutant » ARNi *atsnrk1 $\alpha$ 1* / VIGS *atsnrk1 $\alpha$ 2*) altère quant à elle drastiquement le développement d'*Arabidopsis* et empêche notamment la remobilisation de l'amidon en fin de nuit (Baena-González *et al.*, 2007) (Figure 17B).

### Intégration des signaux à l'échelle de l'organisme entier par l'AMPK

L'un des mécanismes les mieux connus à l'heure actuelle concernant l'implication de l'AMPK à une échelle globale de l'organisme est la régulation du métabolisme glucidique en réponse à une



**Figure 18. Fonctions de l'AMPK à l'échelle tissulaire chez l'homme. (A)** Implication de l'AMPK dans la sensation de faim. Les hormones sont notées en italique lorsque situées dans l'organe où elles sont synthétisées. **(B)** Fonction et régulation de l'AMPK dans le muscle et en réponse à un effort musculaire. Lors d'une contraction musculaire, l'AMPK est activée par divers mécanismes se traduisant par une baisse de la ressource carbonée et une augmentation du ratio AMP:ATP.

Les flèches bleues indiquent une activation, les rouges une inhibition. Les traits en pointillés indiquent un mécanisme indirect.

ACC, acétyl-CoA carboxylase; Glc, glucose; GLUT4, glucose transporter 4; GS, glycogène synthétase; IL-6 interleukine 6; PFKFB, phosphofructo kinase/fructose biphosphatase; PGC1 α, proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α; Raptor, rapamycin-associated protein of TOR; Σ, énergie



faible glycémie. C'est l'ensemble de ces éléments qui en font un sujet de recherche très actif autour du diabète de type 2 (non insulino-dépendant) (Steinberg & Kemp, 2009).

Dans l'hypothalamus, les hormones thyroïdiennes, telles que la leptine (hormone produite dans les adipocytes) et les opioïdes ont un effet inhibiteur sur l'AMPK. A l'inverse, le glucagon, la ghréline (hormones produites dans le pancréas) et le calcium activent cette dernière et promeuvent la synthèse de glycogène en réponse à une glycémie et à un niveau énergétique global faibles (Hardie *et al.*, 2012) (Figure 18A).

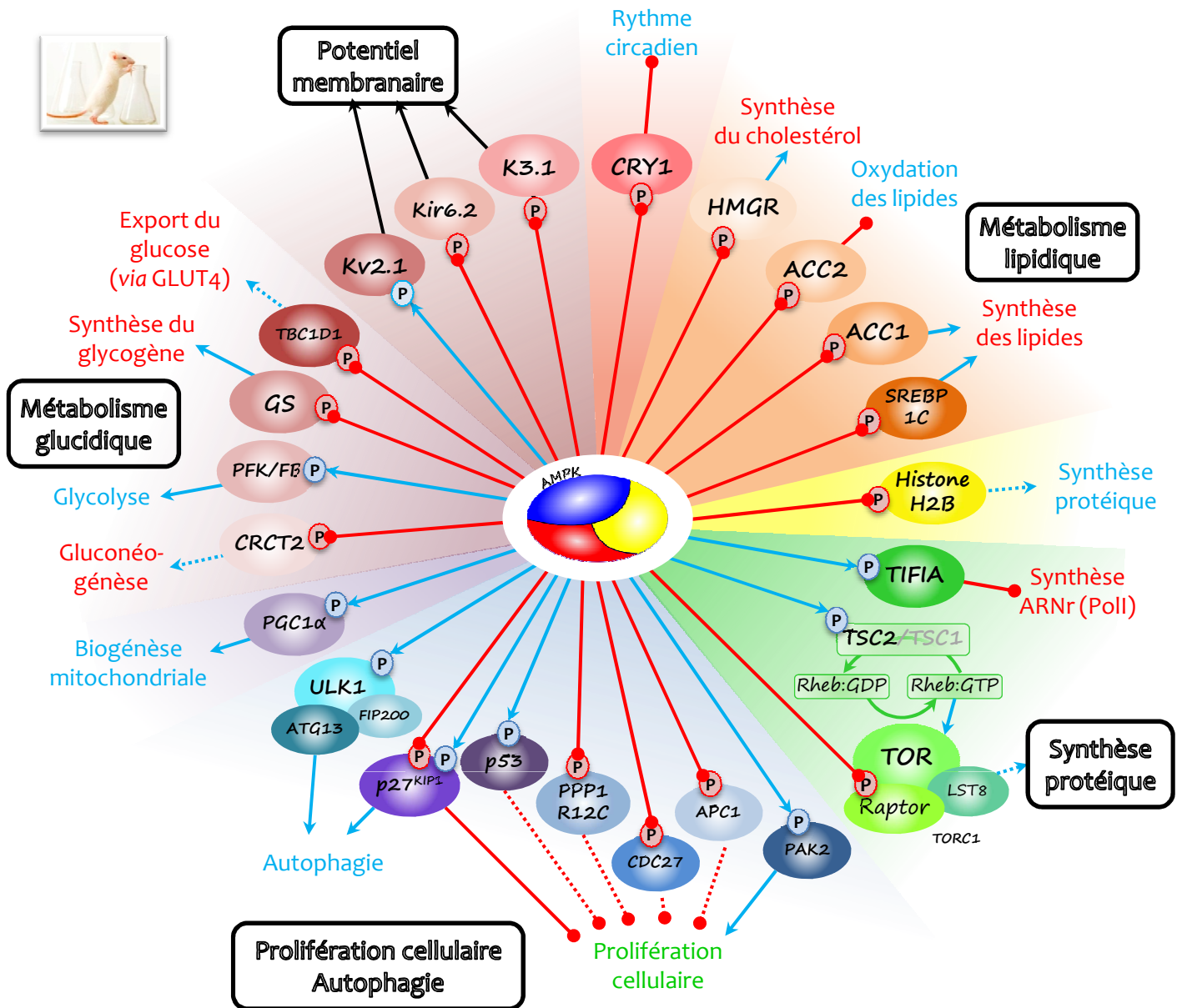
A l'échelle tissulaire et dans un contexte d'effort, une cohérence forte existe dans les mécanismes déclenchés par l'AMPK. En effet, la contraction musculaire entraîne un brusque changement d'état énergétique intracellulaire et la sécrétion d'hormones (leptine, adinopectine), ce qui provoque l'activation rapide de l'AMPK. Les réponses en découlant permettent aux cellules musculaires de répondre rapidement et de façon coordonnée en fournissant à la cellule l'énergie nécessaire. De façon concomitante, l'anabolisme (protéines et glycogène) est inhibé afin d'éviter toute fuite énergétique vers des processus demandeurs et temporairement inappropriés (Figure 18B).

### L'AMPK, un intégrateur intracellulaire central

De nombreux mécanismes moléculaires impliquant l'AMPK animale et SNF1 de levure ont été mis à jour. Il est désormais largement admis que cette kinase agit comme un véritable chef d'orchestre du métabolisme en réponse à un stress. En outre, et ceci sera introduit à la fin de ce paragraphe, de plus en plus de données en font également un régulateur important d'autres mécanismes.

### L'AMPK dans le métabolisme glucidique

Comme introduit dans les figures 14 et 15, la famille de kinases SNF1/AMPK/SnRK1 est, depuis sa découverte, étroitement liée au métabolisme carboné. L'ensemble des données accumulées convergent vers son rôle premier de gardien de l'énergie intracellulaire, en inhibant les voies anaboliques consommatrices et en activant les voies cataboliques productrices d'énergie. De façon cohérente avec sa fonction à l'échelle tissulaire (Figure 19), l'AMPK promeut la relocalisation du transporteur de glucose GLUT4 en phosphorylant/inhibant la protéine TBC1D1 associée aux vésicules de stockage du transporteur (Chen *et al.*, 2008; Pehmøller *et al.*, 2009) et active la PFK/FB qui, en générant du fructose-2,6-bisphosphate, active à son tour la glycolyse (Marsin *et al.*, 2000). En parallèle, la gluconéogenèse et la synthèse de glycogène sont inhibées



**Figure 19. Effets de l'AMPK sur le métabolisme.** De nombreuses cibles sont directement phosphorylées par l'AMPK et voient leur(s) fonction(s) favorisée(s) (flèches bleues) ou inhibée(s) (traits pointés rouges). Bien que pour certains aspects du métabolisme tels que la dépolarisation membranaire et la prolifération cellulaire, la compréhension intégrée nécessite davantage de travaux, l'AMPK favorise globalement le catabolisme et inhibe l'anabolisme.

Les flèches et textes bleus figurent une activation, les rouges une inactivation. Les traits en pointillés figurent un mécanisme indirect.

P, événement de phosphorylation. ACC1/2, acétyl CoA carboxylase 1/2; APC1, anaphase promoting complex 1; ATG13, autophagy-related gene 13; CDC27, cell division cycle protein 27 homolog; CRCT2, CREB-regulated transcription coactivator 2; CRY1, cryptochrome 1; FIP200, focal adhesion kinase family-interacting protein of 200kDa; GS, glycogène synthétase; HMGR, hydroxyméthylglutaryl CoA réductase; LST8, lethal with sec13 protein 8; SREBP1, sterol regulatory element-binding protein; TIFIA, transcription initiation factor IA; TSC1/2, tuberous sclerosis complex 1/2; Rheb, Ras homolog enriched in brain ; TOR(C1), target of rapamycin (complex 1); Raptor, regulatory associated protein of TOR; p27<sup>KIP1</sup>, p27 cyclin-dependent kinase inhibitor; PAK2, p21-activated kinase 2; PGC1α, proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α; PFK, phosphofructo kinase/fructose biphosphatase; PPP1R12C, protein phosphatase 1, regulatory subunit 12C; TBC1D1, Tre-2/Bub2/Cdc16 domain-containing protein domain family member 1; ULK1, UNC51 like kinase 1



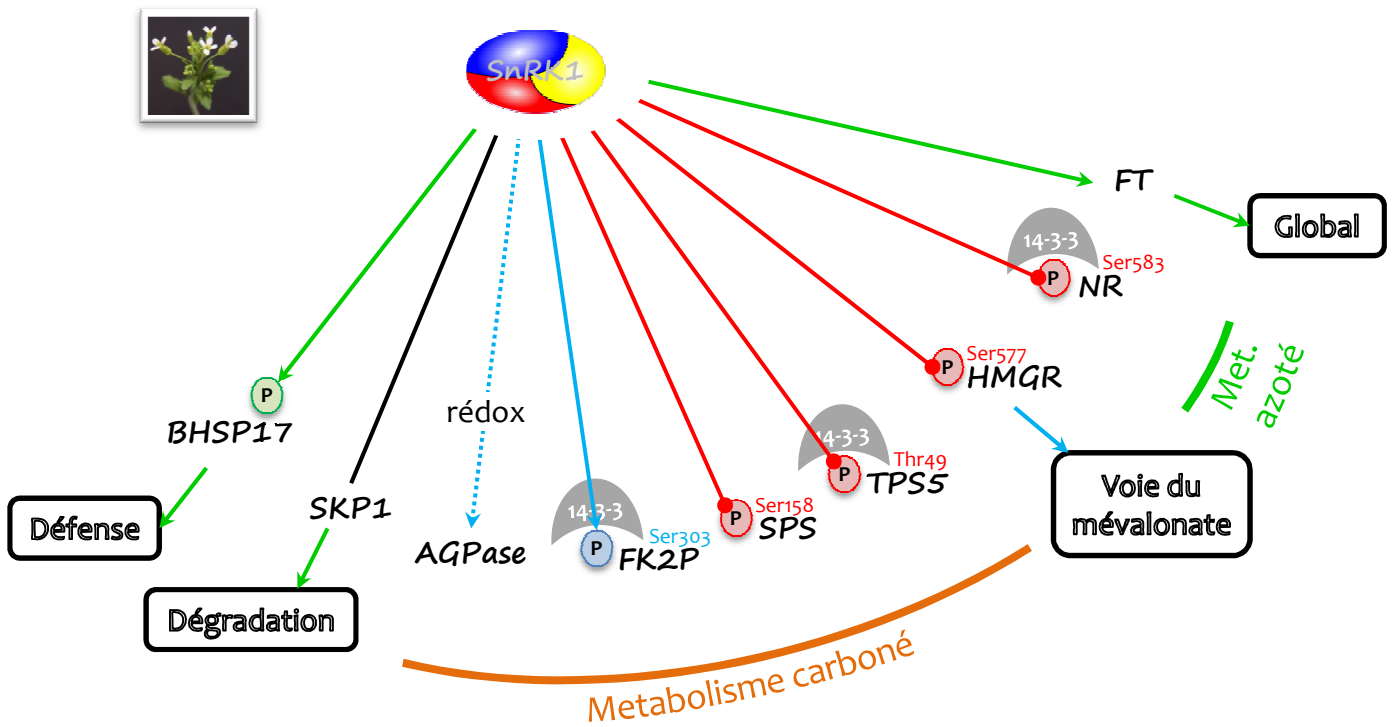
(Figure 19) (Hardie *et al.*, 2012). L'une des cibles pouvant être associée à cette régulation métabolique est le PGC1 $\alpha$  (« Proliferator-activated receptor-Gamma Co-activator 1 $\alpha$  »), une protéine considérée comme cardinale dans la biogénèse mitochondriale. Par son activation, l'AMPK autoriserait PGC1 $\alpha$  (régulateur de facteurs de transcription modulant l'expression de gènes mitochondriaux) à promouvoir cette biogénèse et donc à augmenter la capacité de la cellule à produire de l'énergie (Jäger *et al.*, 2007).

### L'AMPK dans le métabolisme protéique

Le métabolisme protéique est également modulé par l'activation de l'AMPK. De façon assez globale, l'AMPK inhibe la synthèse des ARN ribosomiaux en phosphorylant le facteur d'initiation de la transcription TIFIA (Hoppe *et al.*, 2009). Elle intervient également encore plus en amont en phosphorylant/activant l'histone H2B, responsable du contrôle de la transcription de gènes activés en condition de stress (Bungard *et al.*, 2010). Les modifications suivantes révèlent un point de convergence évident entre les voies de signalisation TOR et AMPK, évoqué comme « module TOR/SnRK1 » chez les plantes par Robaglia et co-auteurs (2012). En premier lieu, l'AMPK phosphoryle/active TSC2, une protéine responsable de l'inactivation (*via* les protéines Rheb) du complexe mTORC1 (Inoki *et al.*, 2003). Un second niveau de régulation se situe directement au niveau de ce complexe, l'AMPK étant capable de phosphoryler la protéine Raptor et par voie de conséquence, d'inactiver la kinase TOR1 et la synthèse protéique (*cf.* partie 1.6) (Gwinn *et al.*, 2008; Hardie *et al.*, 2012) (Figure 19).

### L'AMPK dans le métabolisme lipidique

En dernier lieu, le métabolisme lipidique est également sous le contrôle de ce régulateur. Historiquement, l'AMPK fut caractérisée comme la kinase responsable de la régulation de deux enzymes clés du métabolisme lipidique, l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMGR) et l'acétyl-CoA carboxylase 1 (ACC1), enzymes essentielles dans les synthèses respectives du cholestérol et des acides gras (Carling *et al.*, 1987). L'AMPK les inhibe toutes deux afin de détourner la cellule de mécanismes consommateurs d'énergie (Clarke & Hardie, 1990; Davies *et al.*, 1992). L'inhibition par l'AMPK de l'autre isoforme ACC2 engendre une diminution de la synthèse du malonylCoA, molécule capable d'inhiber l'acyltransférase catalysant le transfert de l'acylCoA de la carnitine sur l'acylcarnitine, étape clé de l'import des acides gras dans la mitochondrie en vue de leur dégradation (Dzamko *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2010). Finalement, la synthèse des lipides est également régulée par l'inactivation du facteur de transcription SREBP1C, régulant la transcription de l'ACC1 (Li *et al.*, 2011) (Figure 19).



**Figure 20. Effets de SnRK1 sur le métabolisme.** Les complexes SnRK1 de plantes sont impliqués dans les métabolismes (met.) azoté et carboné, mais aussi dans d'autres mécanismes cellulaires incluant la dégradation de protéines et la défense.

Les flèches bleues figurent une activation, les rouges une inactivation. Les flèches vertes traduisent un effet global. Les traits en pointillés figurent un effet indirect.

P, évènement de phosphorylation. AGPase, ADP-glucose pyrophosphorylase; BHSP17, class I heat shock protein 17; FK2P, phosphofructokinase/fructose-2,6-bisphosphatase; FT, facteur de transcription; HMGR, hydroxymethylglutaryl-CoA reductase; NR, nitrate réductase; SKP1, S-phase kinase-associated protein 1; SPS, sucrose phosphate synthase; TPS5, tréhalose-6-phosphate synthase 5

### Autres fonctions de l'AMPK au-delà du métabolisme

Le rôle de l'AMPK dans la régulation du métabolisme fait consensus dans la communauté scientifique depuis la fin des années 1990 (Hardie *et al.*, 1998) mais récemment, de nombreux travaux ont élargi son rôle à d'autres mécanismes intracellulaires. En particulier, trois études l'ont impliquée dans la régulation du potentiel membranaire par l'intermédiaire de la phosphorylation de transporteurs de potassium (Chang *et al.*, 2009; Klein *et al.*, 2009; Ikematsu *et al.*, 2011). Globalement, l'AMPK apparaît comme régulatrice de ces potentiels mais une certaine versatilité peut trouver une explication, ici encore, dans une distribution de ses spécificités à l'échelle tissulaire ou de l'organisme (Figure 19). En effet, l'une de ces études pointe une activation du transporteur Kv2.1 et un rôle de protection des neurones en condition de stress en limitant leur excitabilité (Ikematsu *et al.*, 2011) alors que la phosphorylation par l'AMPK est inhibitrice dans les deux autres études.

En 2009, l'AMPK a été impliquée dans la régulation du rythme circadien, par la phosphorylation du cryptochrome CRY1 (Lamia *et al.*, 2009). Les auteurs montrent que la phosphorylation de cette protéine par l'AMPK provoque sa dégradation, la kinase n'influant pas l'amplitude du cycle mais sa durée (Lamia *et al.*, 2009; Hardie *et al.*, 2012).

Enfin, de multiples travaux ont émergé ces dix dernières années sur des mécanismes cellulaires complexes, avec en arrière-plan l'avancée des connaissances en matière de cancérologie. Ces domaines couvrent la prolifération cellulaire et l'autophagie. Plusieurs études convergent vers une régulation positive du facteur de transcription et protéine oncogène p53 par l'AMPK (Imamura *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2005), régulation associée à une augmentation des transcrits de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21<sup>CIP1</sup>. D'autre part, un lien étroit a été établi entre l'inhibiteur du cycle cellulaire p27<sup>KIP1</sup> et l'AMPK (Short *et al.*, 2008, 2010). L'introduction du chapitre III des résultats revient en détails sur ce lien et ses effets. De façon surprenante, l'AMPK a également été montrée comme favorisant la division cellulaire par l'intermédiaire, entre autres, de la protéine PPP1R12C (Protéine Régulatrice de la Protéine Phosphatase 1) (Hardie *et al.*, 2012). Cette régulation contradictoire est discutée et analysée dans le chapitre III. Enfin, la phosphorylation du complexe protéique ULK1/ATG13/FIP200 place l'AMPK aux prémices de la mise en place de l'autophagie. En effet, la protéine ULK1, initiateur de l'autophagie, est ciblée et activée par l'AMPK (Egan *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011). Il est à noter un mécanisme intéressant de rétro-inhibition de l'AMPK par ULK1, reflétant l'importance de cette relation dans le déclenchement de ce mécanisme de survie (Löffler *et al.*, 2011; Alers *et al.*, 2012).

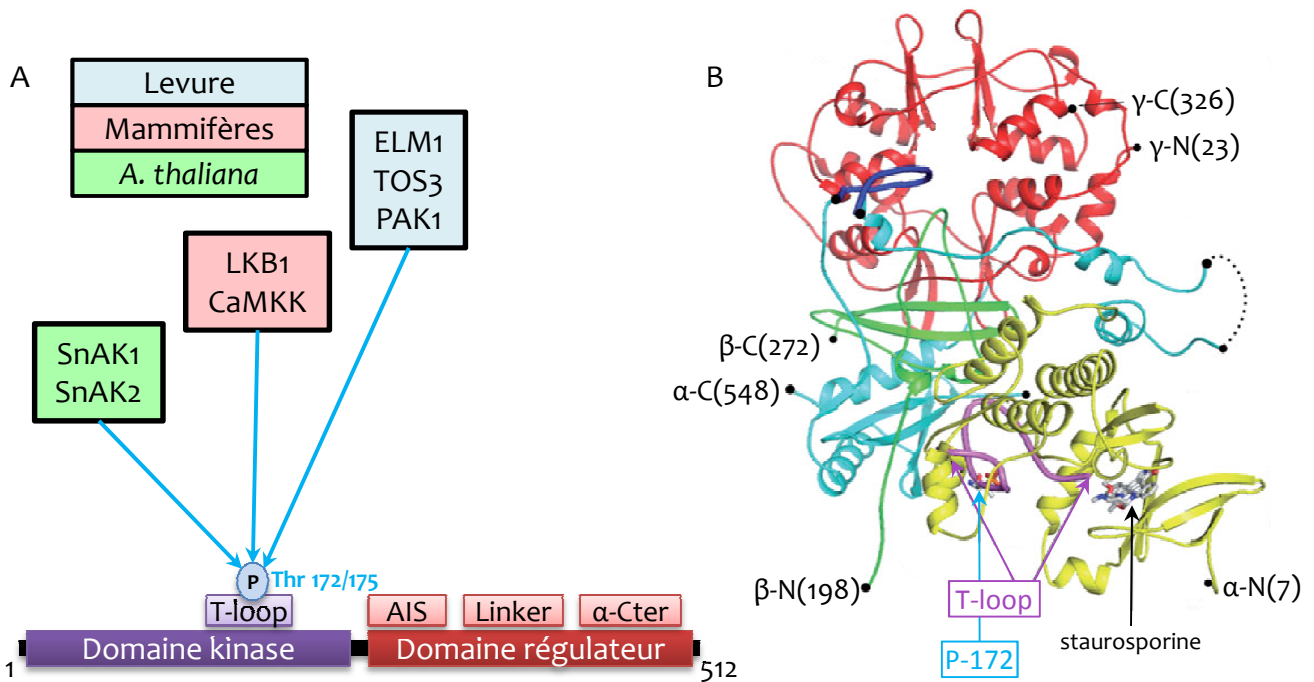


### SnRK1 sur les pas de son orthologue animal

Bien que les connaissances concernant l'orthologue végétal SnRK1 soient bien plus restreintes, les efforts consacrés à l'étude de ces complexes, notamment chez *Arabidopsis* mais également chez des espèces d'intérêt agronomique (pomme de terre, orge...), n'ont cessé d'augmenter durant la dernière décennie (cf. figure 12).

Tout comme son homologue mammifère, SnRK1 est reconnue pour son implication dans l'activation du catabolisme et l'inactivation de l'anabolisme (Figure 20). Cependant, la seule cible directe actuellement caractérisée *in vivo* chez les plantes et impliquée dans l'activation d'un processus fournissant de l'énergie est la FK2P (phosphofructokinase/fructose-2,6-bisphosphatase), cible conservée entre animaux et végétaux (Marsin *et al.*, 2000). En phosphorylant cette enzyme sur sa Ser303, SnRK1 active l'activité phosphofructokinase de l'enzyme et la synthèse de fructose-2,6-bisphosphate, molécule activatrice de la glycolyse (Kulma *et al.*, 2004). Trois autres cibles impliquées dans le métabolisme ont été découvertes de concert (Sugden *et al.*, 1999b). Les activités de l'HMGR, de la NR et de la SPS sont en effet inhibées *in vitro* par phosphorylation des résidus Ser577, Ser583 et Ser158 respectivement. Toutes sont clés dans l'anabolisme puisque la première est à l'origine de la voie de biosynthèse du mévalonate (synthèse des terpénoïdes notamment), la seconde est impliquée dans les premières étapes de l'assimilation de l'azote et de la synthèse des acides aminés et enfin la dernière est impliquée dans la synthèse de l'amidon. Cependant, les travaux de Sugden et collègues ont été effectués *in vitro* et, à ce jour, seule l'interaction entre la sous-unité AtSnRK1 $\beta$ 1 et la NR (Polge *et al.*, 2008) et une modulation de l'activité de cette enzyme dans des plantes surexprimant AtSnRK1 $\alpha$ 1 (Jossier *et al.*, 2009) atteste de l'existence d'une relation *in planta*. C'est également le cas de la tréhalose-6-phosphate synthase (TPS) 5 pour laquelle un élégant travail biochimique a montré que la phosphorylation de la Thr49 était responsable de l'inhibition de l'enzyme par l'intermédiaire d'une protéine 14-3-3, sans pour autant que cet effet n'ait été confirmé *in vivo* (Harthill *et al.*, 2006).

Différents travaux montrent également que cette kinase influe de façon étonnante sur le métabolisme carboné dans son ensemble (Halford & Hey, 2009). Dans des organes de stockage tels que les graines ou les tubercules, SnRK1 est indispensable à la synthèse d'amidon. Par exemple, l'expression du gène codant l'AGPase, enzyme essentielle dans la biosynthèse de l'amidon, est induite dans des tubercules de pomme de terre surexprimant SnRK1 (McKibbin *et al.*, 2006). De même, des grains de pollen d'orge dans lesquels l'activité SnRK1 a été inhibée, ne sont plus en mesure d'accumuler d'amidon (Zhang *et al.*, 2001). Or, il apparaît évident que cette kinase



**Figure 21. Activation de la sous-unité catalytique des kinases de la famille SNF1/AMPK/SnRK1 par des kinases amont conservées chez les eucaryotes. (A)** Il existe 3 kinases amont chez la levure (ELM1, TOS3, PAK1, en bleu), 2 chez les mammifères (CaMKK, calmodulin-dependent protein kinase kinase et LKB1, liver kinase B1, en rose) et 2 chez *Arabidopsis* (SnAK1/2, SnRK1-activating kinases, en vert). Outre l'activation du domaine kinase sur la thréonine 172 (AMPK) ou 175 (*Arabidopsis*) de la boucle d'activation « T-loop », la sous-unité catalytique possède un domaine régulateur avec une séquence AIS d'auto-inhibition et un domaine C-terminal de liaison aux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$  (Linker et  $\alpha$ -Cter). **(B)** Structure 3D de l'hétérotrimère de mammifères  $\alpha_1\beta_2\gamma_1$  actif (D'après Xiao et al., 2011). Le phosphate sur la Thr172 de la T-loop active la kinase.

n'est pas induite dans ce contexte par une condition de stress ou de déficience énergétique. Il est donc important de ne pas présenter le rôle de cette kinase de façon trop réductrice.

Toutefois, il est indéniable, au vu de l'étude globale de transcriptomique menée par E. Baena-González et F. Rolland (Baena-González *et al.*, 2007), que les kinases SnRK1 $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 ont conservé leur rôle de senseur de stress. En effet, comme cité précédemment, plus de 1000 gènes voient leur activité modulée en réponse à différents stress par l'intermédiaire de la phosphorylation de facteurs de transcription (GBF5 et bZIP). Les gènes cibles de SnRK1 $\alpha$ 1 dans cette étude corrèlent positivement avec le profil d'expression génique en réponse à une déficience énergétique et négativement avec celui de plantules ayant poussé sur saccharose ou glucose.

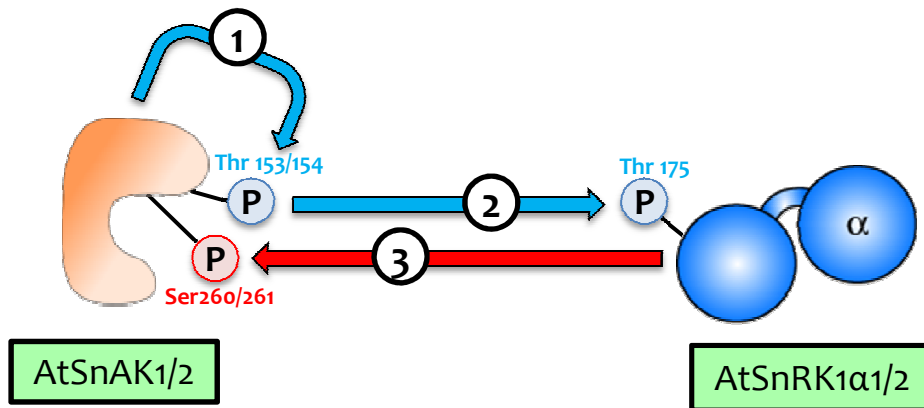
Il apparaît donc que, de façon analogue au système animal, le contexte dans lequel les complexes SnRK1 sont étudiés (conditions de stress ou non, organes, tissus...) est fondamental lorsqu'il s'agit d'interpréter ou de projeter des résultats dans un ensemble physiologique cohérent.

### Conservation étendue aux kinases amont activatrices

Il a très tôt été démontré que les sous-unités catalytiques de la famille SNF1/AMPK/SnRK1 nécessitent d'être activées par phosphorylation sur leur boucle « T-loop » (Hawley *et al.*, 1996; Sugden *et al.*, 1999a; Stein *et al.*, 2000; Momcilovic *et al.*, 2006) (Figure 21). L'ATP, premier substrat des kinases, se fixe sur le petit lobe de la kinase et rend possible le transfert de phosphate sur une cible.

Chez la levure, trois protéines kinases activatrices (ELM1, TOS3 et SAK1) ont été caractérisées. En effet, chacune est capable de phosphoryler la kinase SNF1 et le triple mutant de levure *elm1/tos3/pak1* est, comme le mutant *snf1*, incapable de pousser sur source alternative de carbone (Sutherland *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2003; Nath *et al.*, 2003) (Figure 21). La complémentation de ce triple mutant de levure s'est avérée être un outil essentiel dans la caractérisation des kinases activatrices chez les mammifères et chez les plantes.

Ainsi, il a été montré que deux kinases de mammifères sont capables d'activer SNF1 dans le triple mutant *elm1/tos3/pak1* (Hong *et al.*, 2005). Toutes deux sont capables de phosphoryler la Thr172 de l'AMPK. La première identifiée, LKB1 (Woods *et al.*, 2003), qui était déjà bien connue comme protéine suppresseur de tumeurs, fait désormais l'objet de très nombreux travaux (cf. figure 12) (Vaahtomeri & Mäkelä, 2011). Cette protéine s'associe à deux autres protéines pour former un trimère LKB1/STRAD $\alpha$ /MO25 actif (Boudeau *et al.*, 2004; Zeqiraj *et al.*, 2009). La seconde



**Figure 22. Jeu de phosphorylations croisées entre les protéines AtSnAK1/2 et AtSnRK1α1/2 (D'après Crozet et al., 2010).** Les numéros ont été attribués selon la cinétique des différents événements de phosphorylation: (1) autophosphorylation activatrice d'AtSnAK; (2) phosphorylation activatrice de SnRK1α par AtSnAK; (3) phosphorylation inhibitrice d'AtSnAK par SnRK1.  
AtSnAK, *A. thaliana* SnRK1 activating kinase; SnRK1α, SNF1-related protein kinase subunit α



kinase amont, la CaMKK (Hurley *et al.*, 2005; Hawley *et al.*, 2005) est sensible au calcium et permet une autre voie d'activation de l'AMPK en réponse à l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (Birnbaum, 2005).

Chez les plantes, deux protéines ont été identifiées et sont également en mesure de compléter le mutant de levure (Hey *et al.*, 2007). Ces protéines, initialement nommées GRIK1 et GRIK2 (« Geminivirus Rep-Interacting Kinase 1 et 2 ») (Shen & Hanley-Bowdoin, 2006) sont désormais appelées respectivement « SnRK1-Activating Kinase » (SnAK) 2 et 1. Ces protéines activent SnRK1 en phosphorylant la Thr175 des sous-unités  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  (Hey *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2009; Crozet *et al.*, 2010). Une présentation plus détaillée de ces kinases amont sera faite dans le chapitre II des résultats.

A l'exposé de l'ensemble de ces éléments, il apparaît évident qu'une grande conservation de la voie LKB1/AMPK existe chez les eucaryotes. Pour illustration, LKB1 et CaMKK sont capables de phosphoryler SnRK1 *in vitro* (Harthill *et al.*, 2006; Jossier *et al.*, 2009). L'idée d'un complexe ancestral remontant à 1,5 milliard d'années, période estimée pour la divergence entre levures, animaux et plantes (Wang *et al.*, 1999a), est évoquée dans la littérature (Polge & Thomas, 2007). Cependant, il va sans dire que certaines spécificités déjà évoquées ou à venir dans ce manuscrit ont dû ensuite apparaître au cours de l'évolution. L'une d'elles pourrait être la relation entre la kinase et ses substrats. Par exemple, un très fin jeu de phosphorylations croisées a été mis en évidence dans notre laboratoire entre SnRK1 et ses kinases amonts, mécanisme qui n'a jusqu'à présent pas été décrit dans les autres règnes (Figure 22). Dans ces travaux, Crozet *et al.* (2010) mettent en évidence par diverses approches biochimiques une activation séquentielle de SnRK1. Une première auto-phosphorylation de la kinase amont AtSnAK (AtSnAK1<sup>Thr153</sup>, AtSnAK2<sup>Thr154</sup>) permet sa propre activation. S'en suivent deux événements de phosphorylation dans un échange qualifié de « baiser mortel » par les auteurs, l'un *via* AtSnAK activant la sous-unité catalytique  $\alpha 1/\alpha 2$  (AtSnRK1 $\alpha 1/\alpha 2$ <sup>Thr175</sup>) et l'autre *via* AtSnRK1 $\alpha$  rétro-inhibant la kinase amont (AtSnAK1<sup>Ser260</sup>, AtSnAK2<sup>Ser261</sup>), (Figure 22).

### 1.8. Objectifs de la thèse

Dans un tel contexte métabolique, il est apparu comme essentiel de développer des systèmes d'étude et des techniques permettant de simplifier les problématiques. Ainsi, avant mon arrivée au laboratoire, différentes stratégies avaient été mises en place. La première, au travers de la mise au point d'un protocole de purification de complexes SnRK1 d'*A. thaliana*, s'est inscrite dans une problématique de régulation des trimères SnRK1 et fait l'objet du premier chapitre des



résultats de cette thèse : **I) Les complexes AtSnRK1 sont régulés par leur environnement métabolique.**

Ensuite, toujours dans le contexte de la régulation de ces protéines, une impulsion particulière a été donnée à l'étude des kinases activatrices AtSnAK1 et AtSnAK2, comme le démontrent les travaux récents menés dans le laboratoire (Crozet *et al.*, 2010). Cette stratégie passe par le développement d'une approche biochimique importante incluant notamment la production de protéines recombinantes. Afin de compléter cette approche, l'utilisation de plantes transgéniques mutées dans les gènes AtSnAK1 et AtSnAK2 nous est apparue importante. Ces travaux constituent le second chapitre : **II) Les kinases amont SnAK1 et 2, acteurs clés de la voie de signalisation SnAK/SnRK1.**

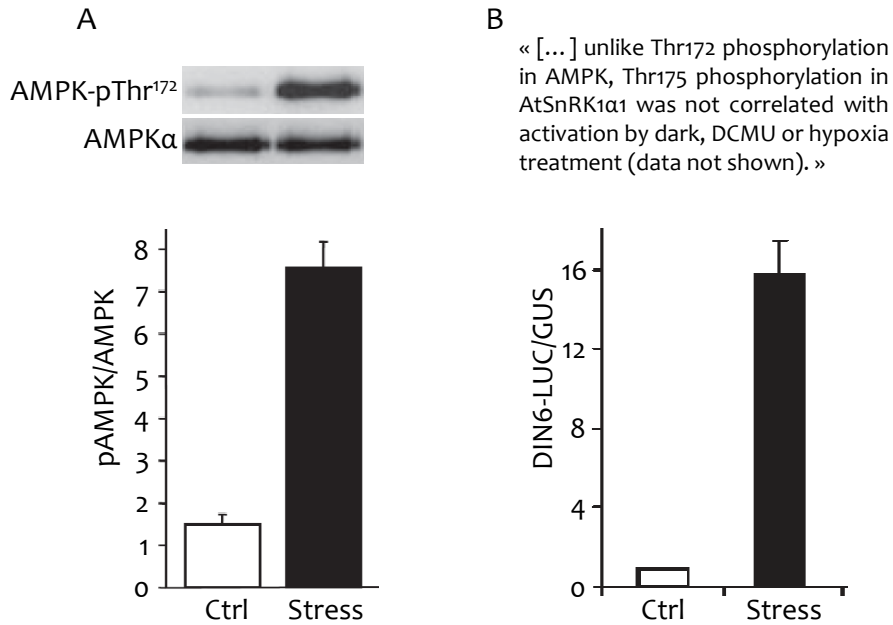
Enfin, comme l'introduction le précise, bien que l'implication des complexes SnRK1 dans la régulation du métabolisme ne fasse aucun doute, peu de cibles directes ont été caractérisées. Des travaux publiés ces dernières années chez l'animal ont impliqué l'AMPK dans le contrôle du cycle cellulaire. Nous avons en parallèle souhaité creuser cette nouveauté importante en vérifiant si un tel lien existait chez les plantes et en étudiant son impact sur le développement. Ces questions font l'objet de la troisième partie de ces travaux : **III) Un nouveau lien entre homéostasie énergétique et prolifération cellulaire chez les plantes.**



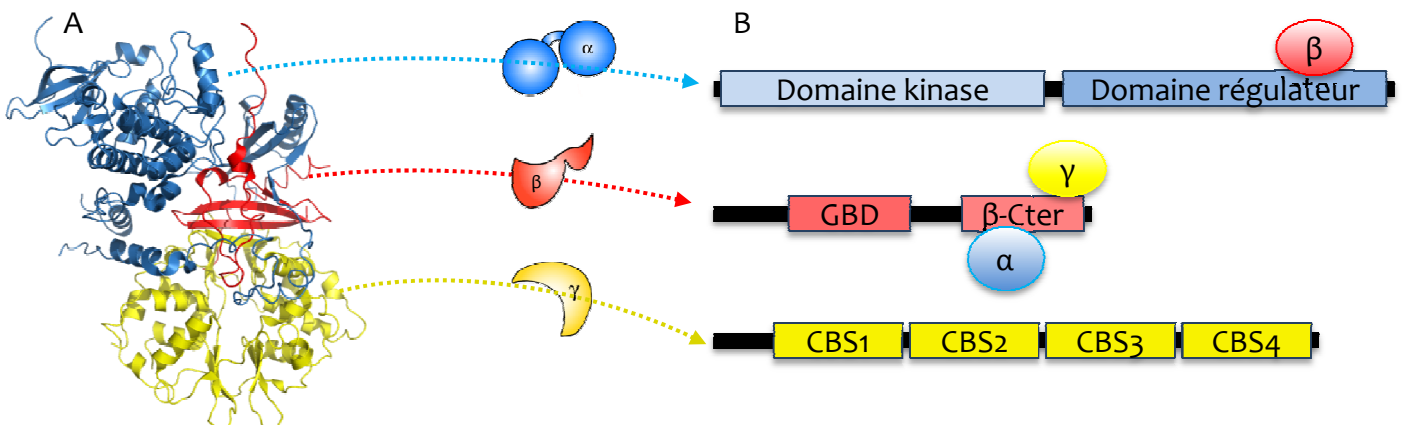
# Résultats I

## Régulation des complexes AtSnRk1 par leur environnement métabolique

Manuscrit en révision



**Figure 23. Le niveau de phosphorylation de l'AMPKα, contrairement à celui d'AtSnRK1α1, est corrélé à son activation par le stress. (A)** Western blot anti-AMPK-P<sup>(Thr172)</sup> et anti-AMPKα et ratio des deux signaux à partir d'extraits protéiques de cellules placées en conditions de stress (hypoxie) ou en conditions normales (Ctrl). (Soltys *et al.*, 2006). **(B)** Activité luciférase normalisée du gène DIN6, rapporteur de l'activité de SnRK1α1, dans des protoplastes co-transformés par les constructions DIN6-LUC et 35S-GUS. Après transformation, les protoplastes ont été placés en conditions normales ou de stress (hypoxie). La citation des auteurs est rapportée au-dessus de la figure. (Baena-González/Rolland *et al.*, 2007).



**Figure 24. Les sous-unités de type β, véritables « scaffold » des complexes AMPK.** La sous-unité α est représentée en bleu, la β en rouge et la γ en jaune. **(A)** Structure de l'hétérotrimère de mammifères α1β2γ1 actif (PDB 2Y94). **(B)** Représentation schématique des trois sous-unités du complexe. La sous-unité α possède un domaine kinase et un domaine régulateur (cf. figure 22) sur lequel se situe un domaine de liaison à la sous-unité β. Cette dernière possède, sur son domaine C-terminal, un site de liaison pour chacun des deux autres membres du trimère. La sous-unité γ possède 4 domaines CBS (Cystathionine-β-Synthase).

### 2. REGULATION DES COMPLEXES ATSNRK1 PAR LEUR ENVIRONNEMENT METABOLIQUE

#### 2.1. Introduction

Comme souligné par Baena-González/Rolland (2007) dans leur étude transcriptomique sur *Arabidopsis*, l'augmentation d'activité d'AtSnRK1 observée en réponse à un stress (cf. figure 13B) a lieu sans modulation significative du niveau de phosphorylation de la Thr175 de la sous-unité catalytique  $\alpha$ , contrairement à son homologue chez les mammifères (Figure 23). Cette observation implique par conséquent l'intervention d'autres mécanismes d'activation. L'hypothèse qui a servi de point de départ aux travaux présentés dans ce chapitre, projet initié au cours de la thèse de Pierre Crozet, consiste en une régulation par l'environnement métabolique des complexes SnRK1.

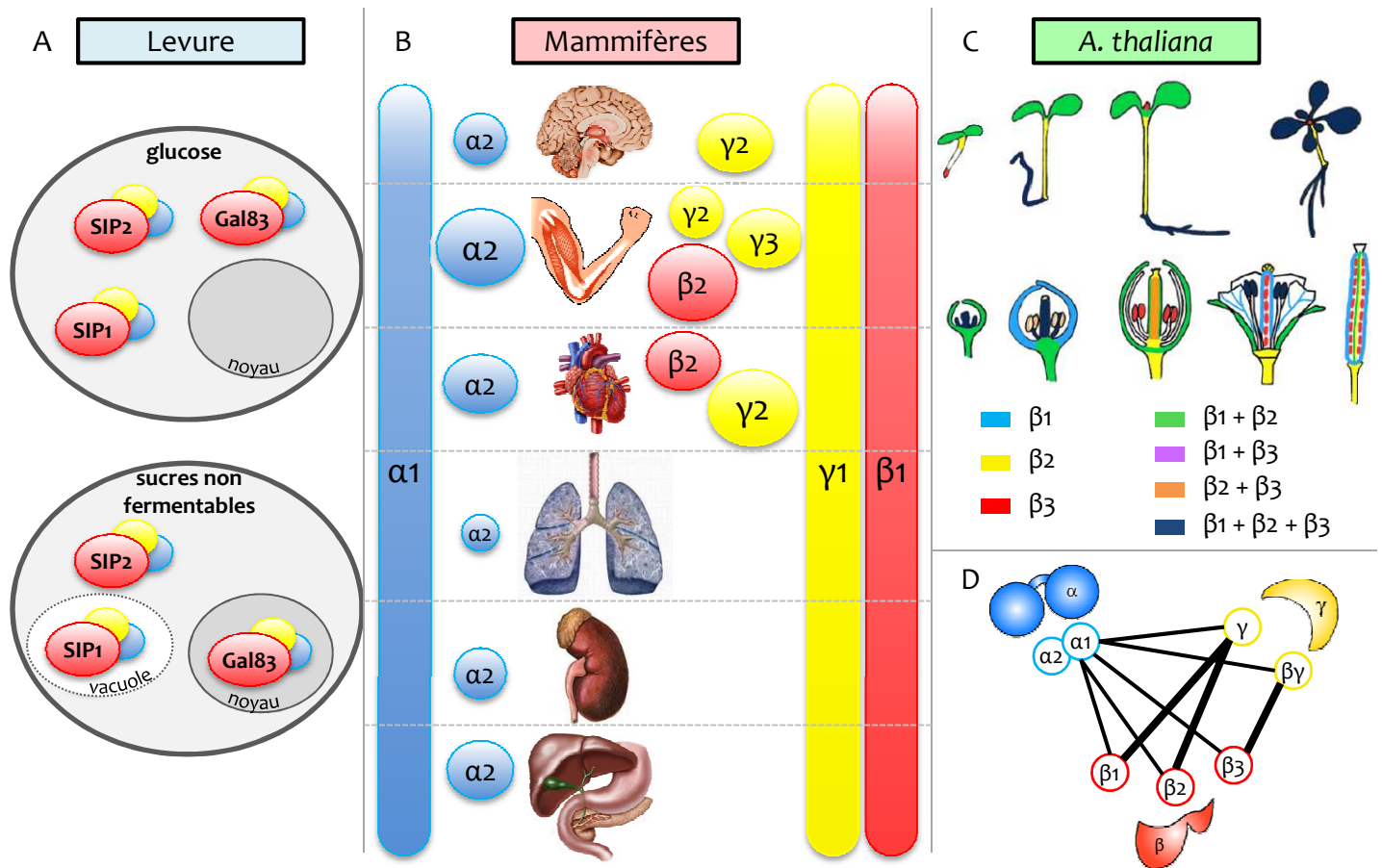
#### Les sous-unités régulatrices des complexes AMPK et SnRK1

Les deux sous-unités non-catalytiques  $\beta$  et  $\gamma$  sont des éléments essentiels à la fonctionnalité des complexes SNF1/AMPK/SnRK1. Les paragraphes ci-dessous synthétisent les nombreuses données accumulées, notamment depuis la résolution récente de plusieurs structures par différentes équipes, allant de la structure monomérique dans un premier temps, jusqu'à celle de l'hétérotrimère actif (Xiao *et al.*, 2011).

#### Les sous-unités de type $\beta$

L'état des connaissances actuelles atteste que les sous-unités de type  $\beta$  jouent un rôle majeur au sein des complexes. Historiquement, la première fonction qui leur a été attribuée est celle de protéine « scaffold » vis-à-vis de l'assemblage des hétérotrimères (Figure 24). Des données plus récentes chez la levure (Jin *et al.*, 2007) et chez les mammifères (Xiao *et al.*, 2011) montrent que cette sous-unité est véritablement imbriquée dans le complexe (Figure 24A) et confirment cette fonction. De plus, cette sous-unité est pourvue sur sa partie C-terminale de domaines d'interaction avec chacune des deux autres sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  (Figure 24B).

D'autre part, un certain nombre de travaux font état de l'impact de ces sous-unités sur la localisation intracellulaire et tissulaire des complexes. Chez la levure, Vincent et collègues (2001) ont montré, au moyen de fusions avec la protéine GFP, que la localisation des trois sous-unités de type  $\beta$  de levure (SIP1, SIP2 et Gal83) était dépendante des sucres (Vincent *et al.*, 2001). En effet, en présence de glucose, toutes trois sont localisées dans le cytoplasme. A l'inverse, en absence de



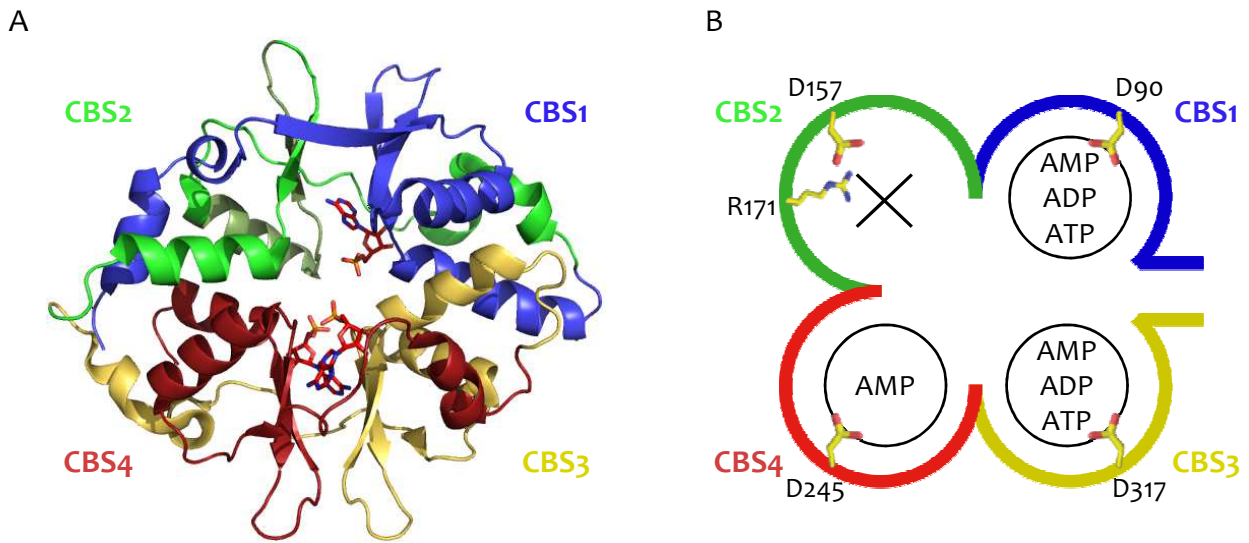
**Figure 25. Participation des sous-unités de type  $\beta$  aux localisations tissulaire et cellulaire des complexes SNF1/AMPK/SnRK1.** (A) Localisation intracellulaire des complexes SNF1 en réponse au sucre. En présence de sucres non fermentables (NF), Gal83 véhicule le complexe dans le noyau tandis que SIP1 le dirige dans la vacuole. (Données: Vincent *et al.*, 2001) (B) Localisation tissulaire des différentes sous-unités des complexes AMPK. Ces résultats sont basés sur des données de qRT-PCR, northern blot et immunoblotting ( $\beta 1$ ); qRT-PCR, northern blot ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ) et qRT-PCR ( $\beta 1$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ) (Données: Steinberg & Kemp, 2009). Les images représentent de haut en bas: le cerveau, les muscles squelettiques, le cœur, les poumons, les reins, le foie et l'estomac. (C) Localisation tissulaire des sous-unités du complexe SnRK1 d'*Arabidopsis*. (D'après Polge *et al.*, 2008). (D) Schéma des interactions observées entre les sous-unités du complexe AtSnRK1. L'épaisseur des liens reflète l'intensité des interactions estimées par expériences de double hybride (D'après Polge & Thomas, 2007).



ce sucre et lorsque la source de carbone disponible dans le milieu est non fermentable, les auteurs observent une relocalisation de Gal83 au niveau du noyau et de SIP2 dans la vacuole alors que SIP1 reste dans le cytosol (Figure 25A). Chez les mammifères, les complexes AMPK sont retrouvés dans le noyau ou dans le cytosol ou encore ancrés à la membrane par le biais d'une myristoylation de la sous-unité  $\beta$  (Warden *et al.*, 2001; Steinberg & Kemp, 2009). Une telle modification post-traductionnelle des sous-unités  $\beta$  a également été mise en évidence sur les sous-unités AtSnRK1 $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 (Pierre *et al.*, 2007). Les complexes AtSnRK1 ont, quant à eux, été observés dans le cytosol, le noyau, les chloroplastes et au niveau des membranes (Gissot *et al.*, 2006; Jossier, 2007; Pierre *et al.*, 2007; Fragoso *et al.*, 2009).

A une échelle plus globale, des travaux sur l'animal et *Arabidopsis* ont permis d'obtenir un aperçu de la répartition des différentes sous-unités du complexe dans l'organisme (Figure 25). Ainsi, des expériences de PCR quantitative et de northern blot montrent que le complexe AMPK $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\gamma$ 1 est ubiquitaire. La protéine AMPK $\alpha$ 2, bien que présente également dans tous les tissus, est détectée majoritairement dans les muscles squelettiques et, à une échelle moindre, dans les cellules hépatiques et du myocarde. Le gène codant la sous-unité AMPK $\beta$ 2 est fortement exprimé dans les cellules musculaires, tandis que l'expression des gènes codant les sous-unités AMPK $\gamma$ 2 et  $\gamma$ 3 est détectée dans le cerveau, les muscles squelettiques et le cœur (Steinberg & Kemp, 2009) (Figure 25B). Chez la plante modèle, notre laboratoire a contribué fortement à la vision actuelle de la localisation des différentes sous-unités des complexes AtSnRK1. Au travers de l'étude poussée de plantes transgéniques exprimant les promoteurs des sous-unités  $\beta$  fusionnés au gène rapporteur GUS, Polge *et al.* (2008) ont montré une distribution tissulaire variable des sous-unités  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 au cours du développement (Figure 25C). Quelques singularités sont à mentionner. Dans les graines, seule la sous-unité atypique  $\beta$ 3 est exprimée. Alors que l'on trouve à la fois  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 dans les cotylédons de la jeune plantule,  $\beta$ 2 est exprimée seule dans les tissus conducteurs et  $\beta$ 3 seule dans les méristèmes (racinaire et apical). De même, ces trois sous-unités régulatrices semblent avoir des distributions différentes lors du développement des organes floraux.

Ainsi, les données actuelles semblent indiquer des spécificités tissulaires dans la répartition des hétérotrimères. Par exemple, chez l'animal, le complexe AMPK $\alpha$ 2 $\beta$ 2 $\gamma$ 1 est l'hétérotrimère majoritaire des muscles squelettiques (Oakhill *et al.*, 2010). Chez *Arabidopsis*, si l'on se base sur la localisation tissulaire de l'expression ainsi que sur les interactions mises en évidence entre les sous-unités (Figure 25D) (Bouly *et al.*, 1999; Polge *et al.*, 2008), au moins dix complexes de compositions différentes en sous-unités pourraient coexister dans certains organes et à certains



**Figure 26. Structure des sous-unités de type  $\gamma$  et fixation des adénylates sur les domaines CBS.** (A) Structure de la sous-unité AMPK $\gamma$ 1 de rat (D'après Xiao *et al.*, 2007; PDB 2V8Q). (B) Représentation schématique des quatre domaines CBS (Cystathionine- $\beta$ -Synthase) de l'AMPK $\gamma$ 1 de l'homme (D'après Oakhill *et al.*, 2011). Le CBS2 de AMPK $\gamma$ 1 ne fixe aucun adénylate et le CBS4 fixe de façon permanente une molécule d'AMP; les CBS 1 et 3 échangent ATP, ADP et AMP. La présence de l'arginine 171 sur le CBS2 empêcherait la fixation des adénylates en interférant avec l'aspartate 157.

stades de développement alors que seuls certains hétérotrimères (voire un seul) seraient présents dans d'autres organes. D'avantage d'études sont à présent nécessaires, en particulier chez *Arabidopsis*, afin d'obtenir une vision plus fine de la composition en hétérotrimères intégrant la distribution tissulaire au cours du développement.

Enfin, l'hypothèse selon laquelle les sous-unités de type  $\beta$  pourraient conférer directement une spécificité de substrat, est étayée par quelques travaux (Vincent & Carlson, 1999; Polge *et al.*, 2008). Par exemple, la sous-unité  $\beta_2$  d'*A. thaliana* n'est pas capable d'interagir avec la nitrate réductase (NR) tandis que  $\beta_1$  interagit fortement avec cette cible de SnRK1 (Polge *et al.*, 2008).

Prises dans leur ensemble, les spécificités de localisation tissulaire, cellulaire et sub-cellulaire ainsi que la spécificité d'interaction des sous-unités de type  $\beta$  avec les cibles appuient un rôle essentiel de ces protéines dans la spécificité de substrat des complexes.

### Les sous-unités de type $\gamma$

Les sous-unités de type  $\gamma$  ont un rôle prépondérant dans la régulation de l'activité kinase des complexes. Elles ont en effet été qualifiées de sous-unités « activatrices » depuis qu'il a été montré que le mutant *snf4*, tout comme le mutant *snf1*, est incapable de pousser sur une source non-fermentable de carbone (Neigeborn & Carlson, 1984) et que SNF1 ne peut atteindre son activité maximale *in vitro* qu'en présence de SNF4 (Celenza & Carlson, 1989). De même, il avait été montré, dès 1989, que l'AMP activait de façon allostérique la sous-unité kinase  $\alpha$  du complexe (Carling *et al.*, 1989). Cette activation passe par la sous-unité de type  $\gamma$  et la fixation de l'AMP protège également la sous-unité  $\alpha$  de la déphosphorylation de la Thr172 (Sanders *et al.*, 2007). En 2007, la sous-unité AMPK $\gamma_1$  de l'homme a été cristallisée en présence d'AMP et d'ATP, révélant des premières données très précises sur le mécanisme d'activation de l'AMPK (Figure 26A) (Xiao *et al.*, 2007). Ces travaux suggéraient que les quatre domaines CBS, répartis en deux domaines appelés « Bateman » (Bateman, 1997), ne fixaient pas les nucléotides de façon similaire. Il faut cependant attendre 2011 et de nouvelles données structurales extrêmement précises pour comprendre la finesse du mécanisme d'activation de l'AMPK, mécanisme décrit dans cette introduction (paragraphe « L'AMPK, une enzyme régulée par la charge énergétique ») (Xiao *et al.*, 2011; Oakhill *et al.*, 2011; Hardie *et al.*, 2011, 2012). La figure 26B rassemble l'ensemble des connaissances actuelles sur ces domaines. Les CBS 1 et 3 sont capables de fixer l'AMP, l'ADP et l'ATP tandis que le CBS4 ne fixe que l'AMP. Enfin, le CBS2 ne fixe pas de nucléotide ; l'explication avancée est la présence d'une arginine en position 171, en face de l'aspartate 157 essentiel pour la fixation du nucléotide.

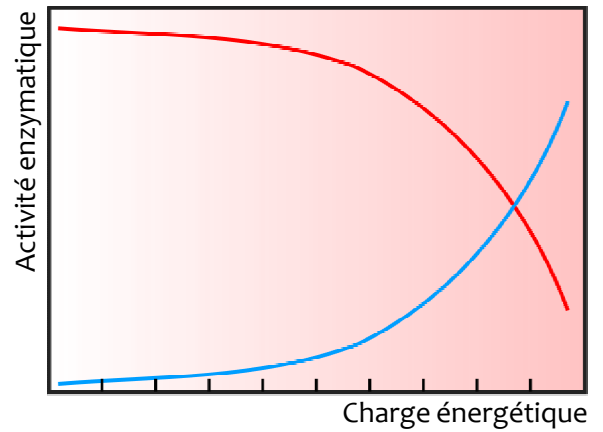
A

ATPases:  $ATP \rightleftharpoons ADP + P_i$   
Ligases:  $ATP \rightleftharpoons AMP + PP_i$   
ATP synthétases:  $ADP + P_i \rightleftharpoons ATP$   
Adénylate kinase:  $2ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$

Charge énergétique:

$$\frac{ATP + 1/2ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

B



**Figure 27. Concept et définition de la charge énergétique. (A)** Réactions enzymatiques convertissant l'ATP, l'ADP et l'AMP (D'après Hardie & Hawley, 2001). **(B)** Réponses types d'enzymes sensibles à la charge énergétique. La courbe rouge correspond à des enzymes impliquées dans la production d'énergie, la courbe bleue à des enzymes impliquées dans la biosynthèse de molécules de stockage. (D'après Atkinson, 1968).

## Résultats I – Régulation métabolique des complexes AtSnRK1

En 2004, Adams et collègues apportent des éléments permettant de discuter l'insensibilité à l'AMP des complexes de levure grâce à un modèle de la sous-unité AMPK $\gamma$ 1 (Adams *et al.*, 2004). A ce jour, les complexes de plantes ne semblent pas être activés par l'AMP non plus. Il est uniquement fait état d'un effet protecteur de l'AMP contre la déphosphorylation de la sous-unité SnRK1 $\alpha$ 1 (Sugden *et al.*, 1999a).

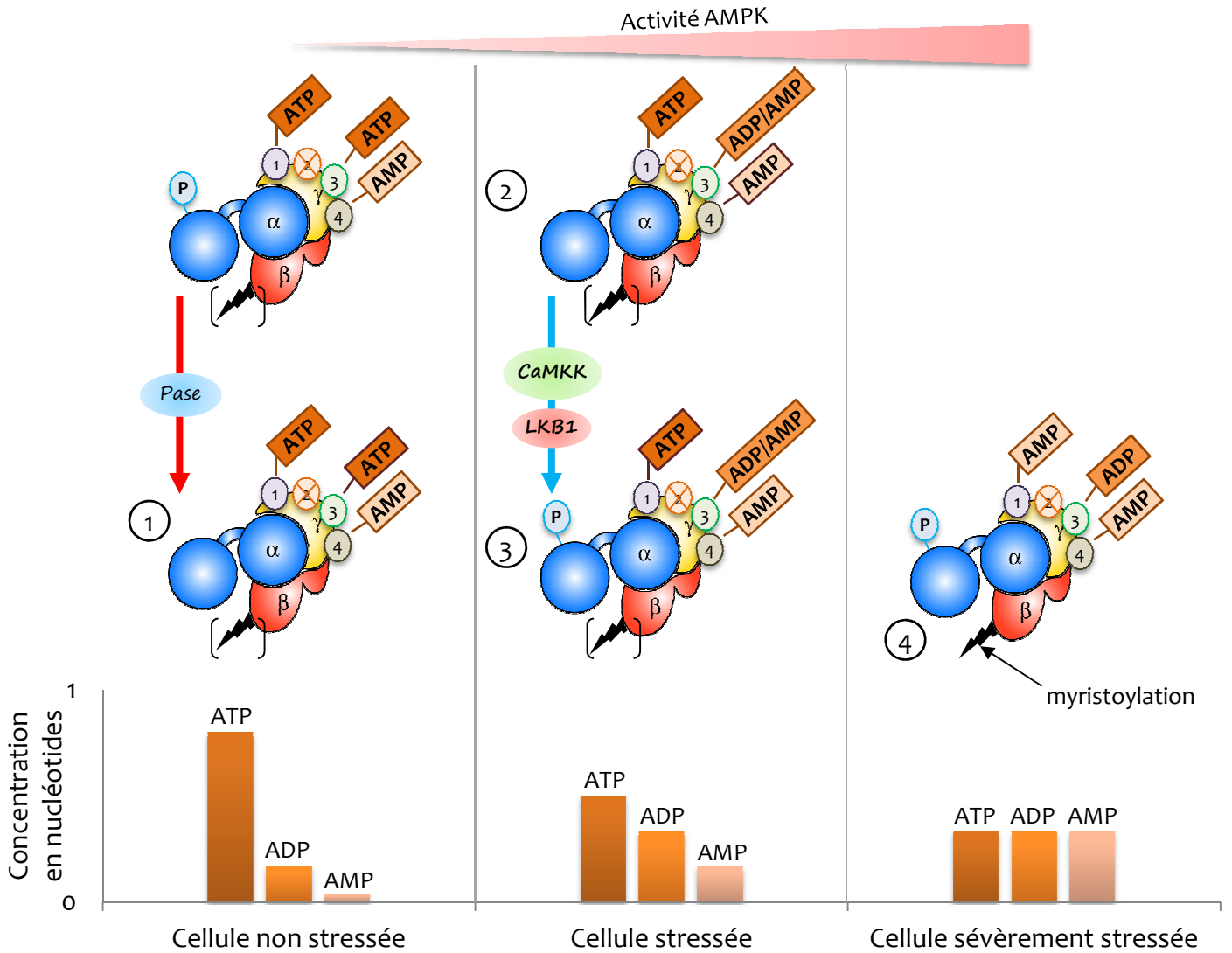
### Les nucléotides, messagers directs de l'homéostasie énergétique – le concept de charge énergétique

Il apparaît donc clair que les adénylates jouent un rôle important dans la régulation de cette famille de kinases. L'implication de nucléotides dans le contrôle de l'activité d'enzymes a été pour la première fois avancée en tant que concept en 1964 par Atkinson lors d'une étude sur la phosphofructokinase (PFK) (Ramaiah *et al.*, 1964). Le concept de « charge énergétique » consiste en la considération des mécanismes producteurs et consommateurs d'énergie avec, au centre, l'inter-conversion de l'ATP, l'ADP et l'AMP par le biais des ATPases, des ligases, des ATP synthétases et de l'adénylate kinase (Figure 27A) (Hardie & Hawley, 2001). La prise en compte de l'ensemble de ces réactions conduit à la définition de la charge énergétique (Atkinson, 1968). Selon ce concept, des enzymes telles que la PFK, la pyruvate déshydrogénase, la citrate synthase et l'isocitrate déshydrogénase sont inhibées par une charge énergétique élevée (proche de 1), *i. e.* lorsque le niveau d'ATP est élevé (Figure 27B, courbe rouge) ; à l'inverse, la pyrophosphorylase, l'aspartokinase, la citrate lyase et la phosphoribosyl pyrophosphate synthétase sont activées dans de telles conditions et inhibées lorsque le niveau d'ATP est faible (Figure 27B, courbe bleue).

### L'AMPK, une enzyme régulée par la charge énergétique

Depuis deux décennies, l'AMPK est considérée comme une enzyme essentielle dans la réponse aux changements de niveaux en AMP et ATP. Néanmoins, ce n'est que très récemment que son statut a évolué d'une enzyme « sensible au ratio ATP:AMP » vers celui d'une enzyme « sensible à la charge énergétique intracellulaire » (Jin *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2011; Hardie *et al.*, 2012) avec la mise en évidence de la fixation de l'ADP, au même titre que l'AMP, sur les CBS 1 et 3 des sous-unités  $\gamma$ .

Dans une cellule non stressée, l'ATP est présent en concentration élevée, autour de 10mM dans des cellules du muscle squelettique et cardiaque par exemple (Hardie *et al.*, 2011). A cette concentration, c'est l'unique molécule capable de se fixer sur les CBS1 et 3 (capables de fixer ATP, ADP et AMP). Lorsque la concentration en ATP diminue et que celles en ADP et AMP augmentent,

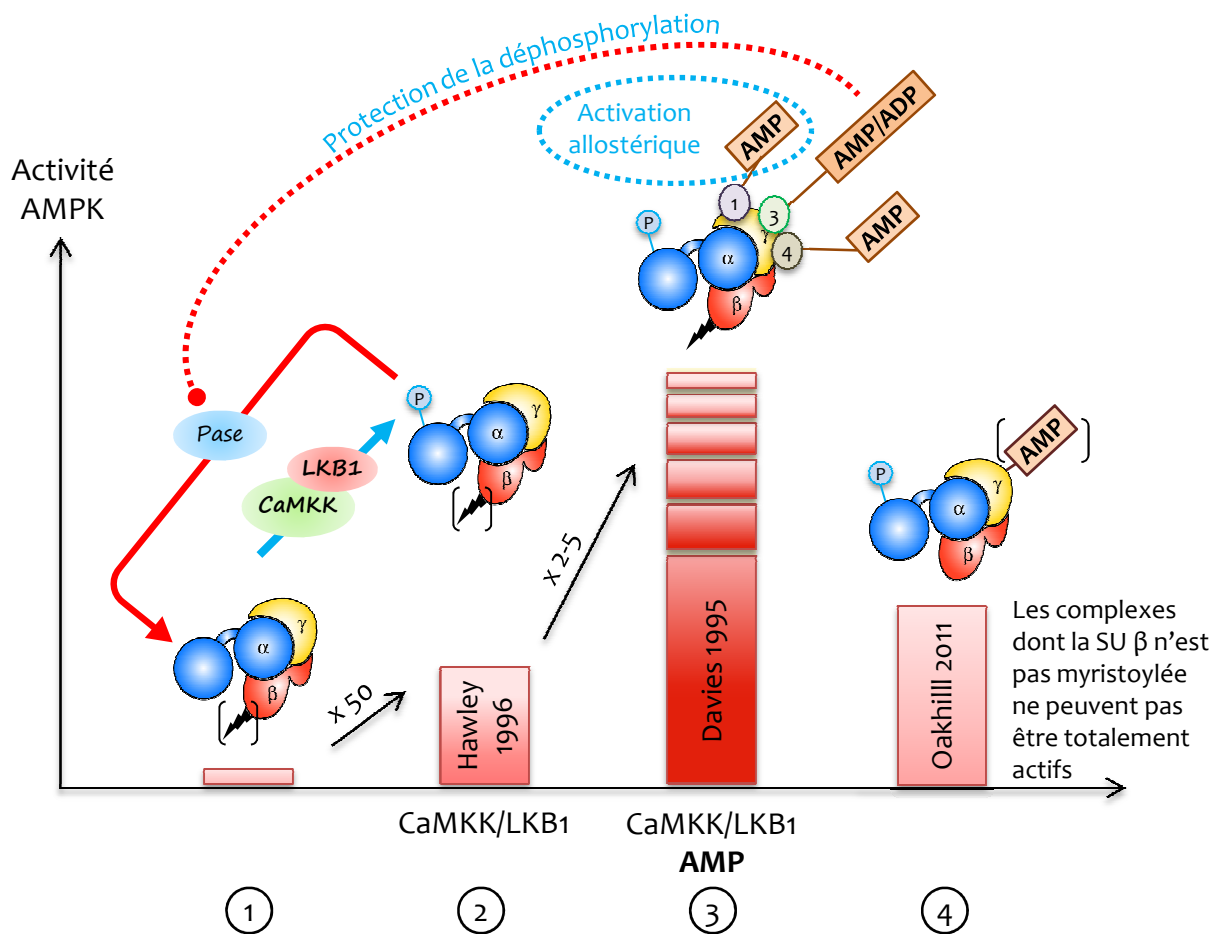


**Figure 28. Mécanisme d'activation de l'AMPK en réponse aux niveaux d'adénylates. (Modèle adapté de Hardie et al., 2012).** Lorsque la cellule évolue dans des conditions non stressantes, l'AMPK est inactive (1), son résidu Thr172 déphosphorylé par l'action de phosphatases (Pase) et l'ATP, présent en forte concentration dans la cellule est fixé aux domaines CBS (Cystathionine- $\beta$ -Synthase) 1 et 3. Le CBS2 de la sous-unité AMPK $\gamma$ 1 ne peut pas fixer d'adénylates tandis que le CBS4 fixe de manière permanente l'AMP. Dans une cellule stressée, l'ADP ou l'AMP, présents en plus fortes concentrations, entrent en compétition avec l'ATP au niveau des CBS1 et 3 (2) tandis que la CaMKK et LKB1 activent par phosphorylation la sous-unité catalytique AMPK $\alpha$  (3). Dans une cellule sévèrement stressée, les niveaux d'adénylates sont sévèrement changés et l'ATP n'est plus fixé sur le complexe, assurant une activité maximale de la kinase (4).

alors petit à petit, l'ADP ou l'AMP remplacent l'ATP sur ces deux CBS et l'enzyme devient active. Enfin, lors d'un stress prononcé (effort musculaire long, cellule stressée dans le cadre d'une pathologie), aucune molécule d'ATP n'est fixée sur la sous-unité  $\gamma$  et le complexe devient alors pleinement actif (Hardie *et al.*, 2012) (Figure 28).

Pour compléter ce mécanisme, il est essentiel de prendre en considération les deux modifications post-traductionnelles subies par le complexe (Figure 29). L'évènement primaire du mécanisme séquentiel d'activation de l'AMPK est la phosphorylation de la T-loop par LKB1 ou la CaMKK, cette phosphorylation activant jusqu'à 50 fois l'enzyme *in vitro* (Hawley *et al.*, 1996). Ces kinases « amont » seront présentées dans l'introduction du chapitre II des résultats. La fixation de l'AMP et de l'ADP ont par la suite un rôle majeur dans l'activité et le maintien de l'enzyme à un niveau très actif. En effet, l'AMP active de façon allostérique le complexe, très probablement en se fixant sur le CBS1 (Davies *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 2011). De plus, l'AMP et l'ADP sont capables d'inhiber la déphosphorylation de la Thr172, maintenant ainsi un complexe pleinement actif (Davies *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 2011; Oakhill *et al.*, 2011). Enfin, un impressionnant travail biochimique mené par Oakhill et collègues (2010) a montré que la myristoylation de la sous-unité  $\beta$  était une condition *sine qua non* pour l'activation maximale du complexe. Cette même équipe a appuyé cette observation lors de la cristallisation de complexes AMPK $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\gamma$ 1 en montrant que cette modification post-traductionnelle était essentielle pour la stimulation par l'AMP de la Thr172 et que, de façon encore plus exclusive, l'ADP perdait son effet favorable sur la phosphorylation en absence de myristoylation de la sous-unité  $\beta$  (Oakhill *et al.*, 2011).

Dans ce contexte, il est possible de proposer un modèle d'activation de l'AMPK cohérent avec le concept de charge énergétique énoncé dans le paragraphe précédent. Lorsque la disponibilité en énergie sous forme d'ATP est élevée, l'enzyme est inactive (déphosphorylée, ATP fixé sur la sous-unité  $\gamma$ ). A l'inverse, lorsque les niveaux d'AMP et d'ADP augmentent, c'est-à-dire, lorsque la charge énergétique diminue, l'AMPK devient active et est en mesure d'exercer ses effets sur le métabolisme, et ce afin de rééquilibrer la balance ou homéostasie énergétique intracellulaire (Figure 30A). Ce modèle, proposé par D. G. Hardie (Hardie & Hawley, 2001; Hardie *et al.*, 2011), a été confirmé par l'analyse de plusieurs cristaux de trimères  $\alpha\beta\gamma$ , ainsi que par l'étude menée par Oakhill et collègues (2011). Pour preuve, l'AMPK $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\gamma$ 1 présente un niveau de phosphorylation de la Thr172 (et donc une activité) inversement proportionnel à la charge énergétique (Figure 30B).



**Figure 29. Mécanisme d'activation complet de l'AMPK.** La première étape essentielle pour l'activation de la kinase est la phosphorylation de la Thr172 de la sous-unité AMPK $\alpha$ , étape inhibée par l'activité de phosphatases (Pase) en conditions énergétiques favorables (1). Cette phosphorylation entraîne une activité *in vitro* 50 fois supérieure à la forme non phosphorylée (2), mais pouvant être encore améliorée de 2 à 5 fois (selon la composition  $\alpha\beta\gamma$ ) allostériquement par l'AMP fixé sur le CBS (Cystathionine- $\beta$ -Synthase) 1, domaine dit de forte affinité. L'AMP ou l'ADP fixés sur le CBS3 (dit de faible affinité) protègent de la déphosphorylation du résidu Thr172 et maintiennent le complexe actif (3). La myristoylation ( ⚡ ) de la sous-unité AMPK $\beta$  est indispensable pour une activité maximale de la kinase (4).

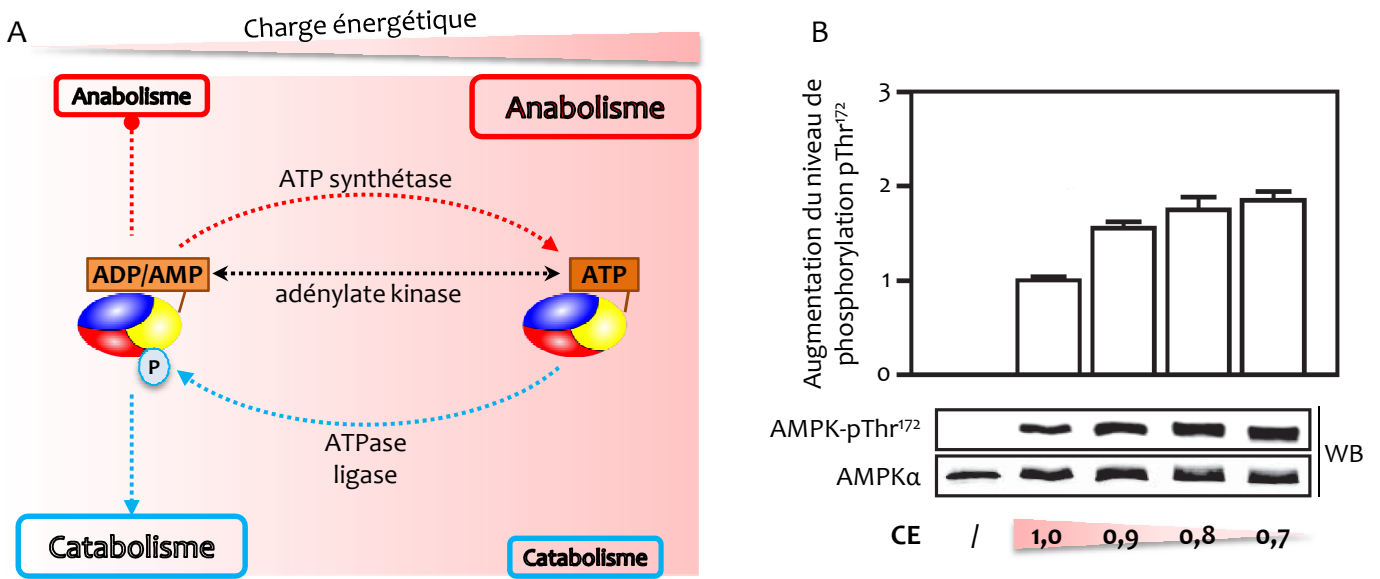


### Réponse de l'AMPK et SnRK1 aux signaux hormonaux et à l'environnement métabolique

En dehors des adénylates, d'autres molécules sont capables de moduler directement ou indirectement l'activité des complexes AMPK et SnRK1. C'est en premier lieu le cas du calcium qui active l'AMPK par l'intermédiaire de la CaMKK (Hurley *et al.*, 2005; Hawley *et al.*, 2005). Comme nous l'avons précisé précédemment (*cf.* Introduction 1.7), l'AMPK a un rôle important dans la glycémie et la sensation de satiété (*cf.* figure 19). A ce titre, elle est activée par la leptine et inhibée par diverses molécules dont la ghréline et les cannabinoïdes (Kola *et al.*, 2005; Hardie *et al.*, 2012). Récemment, il a été montré que l'acide salicylique activait directement l'AMPK de façon analogue à l'AMP (activation allostérique et inhibition de la déphosphorylation) (Hawley *et al.*, 2012) au même titre que la metformine utilisée dans le traitement contre le diabète de type 2 et bien connue pour sa capacité à activer l'AMPK. Ces données pourraient expliquer les effets bénéfiques de ces deux molécules (aspirine et metformine) sur l'homme.

En ce qui concerne la kinase végétale, plusieurs travaux font état de l'effet de sucres sur l'activité de l'enzyme. Des travaux antérieurs avaient montré une inhibition directe *in vitro* de l'enzyme activatrice de la SPS et de la NR par le G6P (McMichael *et al.*, 1995). Cependant, lorsque SnRK1 a été identifiée comme kinase amont de ces deux enzymes, l'effet du G6P sur l'activité de celle-ci a été contesté (Sugden *et al.*, 1999b). En 2000, Toroser et collègues relancent le débat en montrant que l'activité de SnRK1 d'épinard est inhibée de 70% en présence de 10mM de glucose-6-phosphate (G6P). En 2009, Zhang et collègues clarifient en partie ce point en montrant qu'à 1mM ce sucre phosphate n'inhibe pas l'activité de AtSnRK1 tandis qu'à 10mM une inhibition comparable à celle de Toroser et collègues est relatée (Toroser *et al.*, 2000). De façon moins significative, d'autres sucres tels que le fructose-1,6-bisphosphate et le mannose-6-phosphate inhibent l'activité de SnRK1. Par contre, ni l'AMP, ni le glucose n'ont affecté son activité dans cette étude. Cependant, un lien existe entre le glucose, le saccharose et la kinase puisque, comme évoqué dans l'introduction, ces deux sucres abolissent l'activation de SnRK1 observée à l'obscurité dans des protoplastes d'*Arabidopsis* (*cf.* figure 13), indiquant un rôle inhibiteur sur la kinase. Ces inhibitions sont par ailleurs cohérentes avec le rôle de senseur de l'état énergétique intracellulaire imputé à l'enzyme.

La régulation par les sucres la plus documentée à ce jour est celle mise en évidence en 2009 par Zhang et collègues. Des travaux rapportent une inhibition de l'ordre de 50% par le tréhalose-6-phosphate (T6P) à 20mM sur des extraits protéiques bruts de jeunes plantules, cette inhibition n'étant pas observée à partir de feuilles âgées (Zhang *et al.*, 2009). Ils mettent en évidence la présence d'un intermédiaire nécessaire à l'inhibition de l'activité SnRK1 par le T6P, uniquement



**Figure 30. Réponse au concept de charge énergétique de l'AMPK. (A)** Modèle d'activation de l'AMPK par la charge énergétique (CE). Lorsque la CE est élevée (fond rouge), l'ATP est présent à un niveau élevé dans la cellule, inhibant l'AMPK. A l'inverse, lorsque la CE est faible (fond blanc), l'AMP et l'ADP sont présents en plus fortes concentrations, activent l'AMPK qui exerce ses effets sur le métabolisme (D'après Hardie 2001, 2007). **(B)** Régulation de la phosphorylation de l'AMPK par la charge énergétique. Les niveaux de phosphorylation de la Thr172 ont été mesurés par western-blot (WB) sur des trimères recombinants  $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ , en présence de la CaMKK et avec différentes concentrations en ATP, ADP et AMP, traduisant une charge énergétique variant de 1 à 0,7 (Oakhill et al., 2011).

dans les stades précoces du développement d'*Arabidopsis*. Les auteurs précisent qu'il s'agit d'une inhibition non-compétitive vis-à-vis de l'ATP (Zhang et al., 2009). L'inhibition de SnRK1 par le T6P a également été mise en évidence dans des tubercules de pomme de terre (Debast et al., 2011). Deux lignées ont été utilisées dans cette étude, l'une surexprimant la tréhalose-6-phosphatase (OE-TPP) et accumulant moins de T6P (5µM) que dans les tubercules de plantes sauvages (12-15µM), l'autre surexprimant la tréhalose-6-phosphate-synthase (OE-TPS) bactérienne et accumulant effectivement plus de T6P (100-380µM). A ces dernières concentrations, l'activité de SnRK1 est inhibée à hauteur de 30%. De plus, des marqueurs de l'activité de SnRK1 définis lors de cette étude (la TPS8 et 11, la FBPase, la saccharose synthase (SuSy2)) suivent également le niveau de T6P (et par conséquent l'activité modulée de la kinase). De façon intéressante, l'expression de la sous-unité non-catalytique SnRK1γ est accrue dans les tubercules OE-TPP et diminuée dans les tubercules OE-TPS. Cette observation concorde avec le postulat émis au laboratoire et par Baena-González/Rolland et collègues selon lequel, dans des plantes surexprimant *AtSnRK1α1*, soit suffisamment de sous-unités régulatrices seraient présentes pour « prendre en charge » l'excès de sous-unités catalytiques, soit cette surexpression provoquerait une régulation positive sur les autres sous-unités du complexe (Baena-González et al., 2007; Jossier, 2007).

De façon plus générale, la comparaison des analyses transcriptomiques faites à partir de protoplastes d'*Arabidopsis* surexprimant la sous-unité catalytique *AtSnRK1α1* (Baena-González et al., 2007) et à partir de tubercules de pomme de terre surexprimant la TPS bactérienne (Zhang et al., 2009) montre que le T6P induit une reprogrammation transcriptomique opposée à celle induite par SnRK1 (Figure 31).

### Objectifs

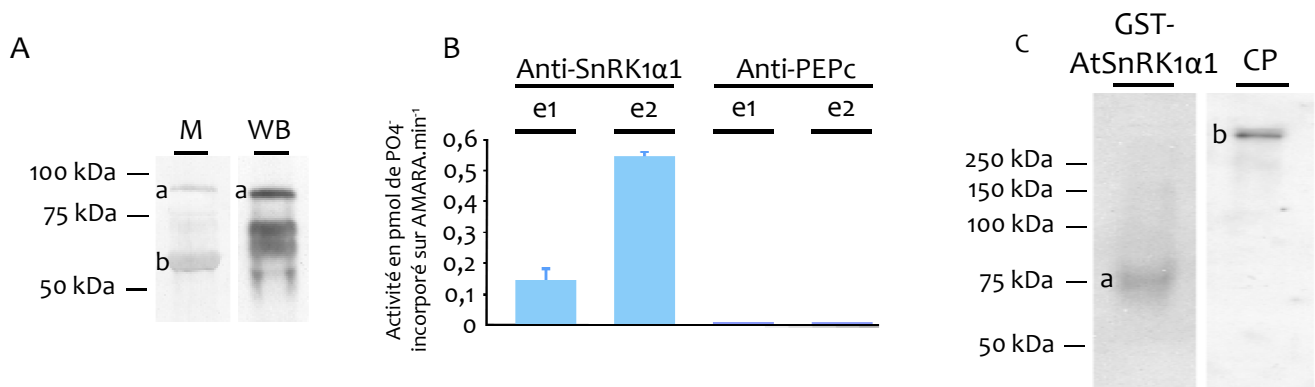
La différence majeure entre l'activation de l'AMPK et de SnRK1 peut *a priori* être principalement liée à la phosphorylation de la boucle d'activation de la sous-unité catalytique (Thr172 de l'enzyme animale et Thr175 de l'enzyme végétale) qui, dans le cas de l'enzyme végétale, n'est pas corrélée à son activité (cf figure 23). Cette observation nous a orienté vers l'hypothèse d'une régulation métabolique des complexes végétaux. Afin de pouvoir tester l'effet de divers métabolites sur l'activité SnRK1, il nous a semblé nécessaire de travailler sur des complexes isolés de plante. Dans ce but, une méthode d'enrichissement en complexes *AtSnRK1* a été mise au point au laboratoire afin de réaliser ce crible métabolique sur un complexe actif, le plus proche possible de son état *in planta*. Dans un premier temps l'effet d'une quarantaine de métabolites sur les complexes natifs d'*A. thaliana* a été testé. Après cette approche biochimique,

		OE-SnRK1α1	- Sac	"OE-TPS"	+ Sac
Photosynthèse		Blue	Red	Red	Red
Photorespiration		Blue	Red	Red	Red
Acides aminés	Anabolisme	Blue	Red	Red	Red
	Catabolisme	Red	Blue	Blue	Blue
Nucléotides	Anabolisme	Blue	Red	Red	Red
	Catabolisme	Red	ND	Blue	Blue
Protéines	Anabolisme	Blue	Red	Red	Red
	Catabolisme	Red	Blue	Blue	Blue
Amidon	Anabolisme	Blue	Red	Red	Red
	Catabolisme	Red	Blue	Blue	Blue
Paroi	Anabolisme	Blue	Red	Red	Red
	Catabolisme	Red	Blue	Blue	Blue

**Figure 31. Comparaison des effets de la reprogrammation transcriptomique induite par SnRK1 et de celle induite par le tréhalose-6-phosphate.** Synthèse des d'analyses transcriptomiques faites à partir de protoplastes d'*Arabidopsis* surexprimant la sous-unité catalytique AtSnRK1α1 (OE- AtSnRK1α1) ou placés en présence ou absence de saccharose (+/-Sac) (Baena-González *et al.*, 2007) ou à partir de tubercules de pomme de terre surexprimant la tréhalose-6-phosphate synthase (TPS) bactérienne (Zhang *et al.*, 2009). Les couleurs symbolisent l'activation (bleu) ou l'inactivation (rouge) des gènes impliqués dans le processus. ND, non déterminé.

## Résultats I – Régulation métabolique des complexes AtSnRK1

quelques tests préliminaires en système de protoplastes d'*Arabidopsis* ont été réalisés pour valider les métabolites candidats *in vivo*.



**Figure 32. Chromatographie d'immuno-affinité AtSnRK1α1.** (A) Caractérisation des anticorps polyclonaux anti-AtSnRK1α1; détection de GST-AtSnRK1α1 avec les anticorps anti-AtSnRK1α1. M, membrane colorée au bleu de Coomassie (après transfert des protéines du gel SDS-PAGE); WB (western-blot); a, recombinante GST-AtSnRK1α1; b, contaminant bactérien GroEL. (B) Activité kinase des protéines éluées de la colonne immuno-absorbante. Les mesures ont été effectuées sur deux éluâts successifs e1 et e2 (10μL) provenant d'une colonne anti-SnRK1α1 ou anti-PEPc en présence du peptide AMARA (90μM), de 2μCi d'ATP radiomarqué et de 20μM d'ATP. (C) Western-blot des protéines éluées de la colonne immuno-absorbante. Des protéines recombinantes (GST-AtSnRK1α1) et des complexes natifs purifiés (CP, 20μL) ont été soumis à une électrophorèse en conditions non-dénaturantes et analysés par des expériences de western-blot avec les anticorps polyclonaux anti-AtSnRK1α1. a, GST-AtSnRK1α1; b, complexe AtSnRK1.

### 2.2. De nouveaux régulateurs métaboliques des complexes AtSnRK1

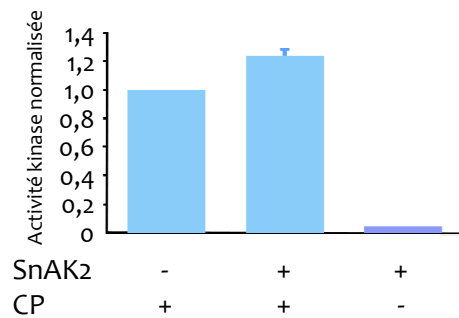
#### Préambule aux résultats

L'ensemble des travaux réalisés dans cette partie est le fruit d'un travail en étroite collaboration avec Pierre Crozet qui avait amorcé l'investigation d'une telle hypothèse de régulation métabolique au cours de sa thèse soutenue en septembre 2011. Cette collaboration se poursuit dans le cadre de son stage post doctoral à l'IGC d'Oeiras (Lisbonne).

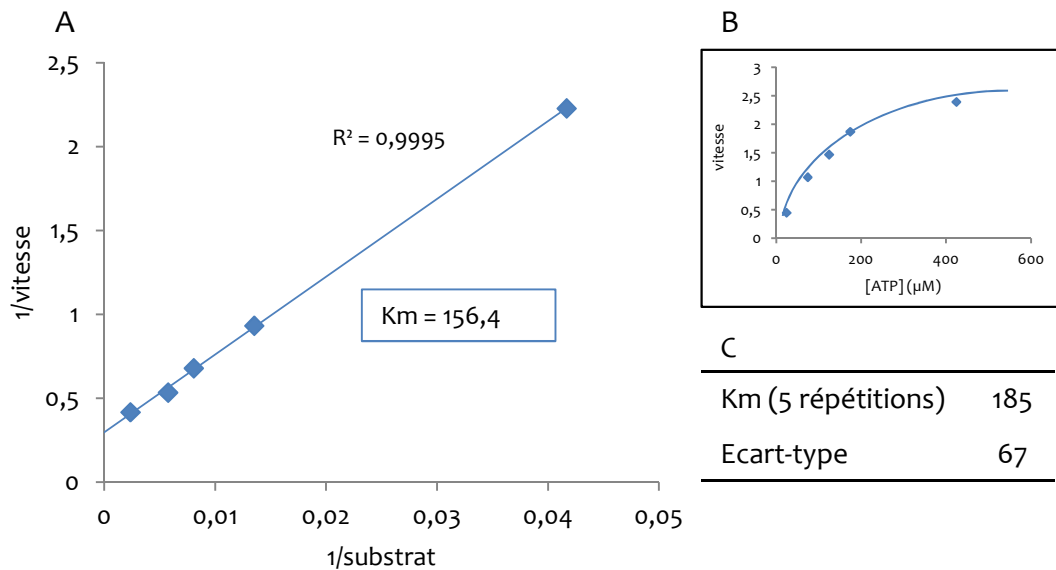
#### Enrichissement en complexes natifs AtSnRK1 de feuilles de rosettes d'*Arabidopsis*

Les premières mesures d'activité kinase SnRK1 ont été réalisées sur des extraits protéiques bruts à partir de feuilles d'épinard (Sugden *et al.*, 1999a). En 2009 Zhang et collègues ont également rapporté des mesures d'activité SnRK1 sur extraits protéiques d'*Arabidopsis*. Ces essais, basés sur la seule reconnaissance du peptide substrat AMARA (Dale *et al.*, 1995), n'assurent cependant pas une spécificité parfaite et n'excluent pas l'absence de molécules régulatrices (protéines notamment). Par ailleurs Sugden et collègues (1999a), dans une optique de caractérisation biochimique de l'enzyme, ont mis au point un protocole de purification de SnRK1 ; cette technique requiert cependant l'utilisation d'une grande quantité de matériel végétal (600g) et de nombreuses et longues étapes de chromatographie (plusieurs jours de travail).

Dans le but d'effectuer une étude de la régulation des complexes SnRK1, il nous a semblé nécessaire de mettre au point une méthode rapide d'enrichissement en complexes natifs AtSnRK1. Cette méthode, décrite dans son intégralité dans la partie Méthodes 2.2, consiste en l'immuno-purification des complexes AtSnRK1 à l'aide d'anticorps polyclonaux (Bouly *et al.*, 1999) à partir de feuilles de rosettes d'*Arabidopsis*. Ces anticorps ont été préalablement purifiés à partir d'antisérum AtSnRK1 disponible et caractérisé au laboratoire (Jossier *et al.*, 2009), grâce à des protéines recombinantes GST-AtSnRK1 $\alpha$ 1 (Crozet *et al.*, 2010) fixées sur des billes de sépharose. La figure 32A atteste de la spécificité de ces anticorps lorsqu'utilisés pour reconnaître la protéine recombinante GST-AtSnRK1 et permet de valider leur utilisation dans ce cadre. Par ailleurs, ces anticorps polyclonaux ont également été fréquemment utilisés au laboratoire pour immuno-précipiter des complexes AtSnRK1 capables de phosphoryler le peptide AMARA lors d'essais kinases *in vitro* (Jossier *et al.*, 2009). Les IgG anti-AtSnRK1 $\alpha$ 1 ont été fixés de façon covalente à des billes de sépharose. Dans un premier temps, cette colonne d'immuno-absorption a été testée pour sa capacité à retenir une activité kinase AMARA-spécifique ; en parallèle une colonne anti-PEPc a été préparée de façon similaire (Vidal *et al.*, 1980) (Figure 32B) (NB : la mise au point de la



**Figure 33. Activité kinase SnRK1 des protéines éluées après chromatographie d'immuno-affinité et activation par la protéine amont AtSnAK.** La kinase amont recombinante GST-AtSnAK2 a été utilisée pour activer le complexe SnRK1 dans un milieu réactionnel contenant le peptide AMARA (90µM), 2µCi d'ATP radiomarqué et 20µM d'ATP. Le complexe purifié (CP, 10µL) a été incubé en présence ou non de 1µg de production de protéine recombinante GST-AtSnAK2.



**Figure 34. Détermination du Km apparent pour l'ATP des complexes AtSnRK1 immuno-purifiés.** Essai kinase réalisé en présence du peptide AMARA (90µM), de 2µCi d'ATP radiomarqué et de 20µM d'ATP. **(A)** Représentation de Lineweaver et Burk; la vitesse est exprimée en pmoles de PO4 incorporé sur le peptide AMARA par minute et le substrat est l'ATP. **(B)** Représentation michaelienne. **(C)** Km apparent obtenu sur 5 répétitions.



colonne et les tests de validation avaient été effectués au cours de la thèse de P. Crozet). L'élution des complexes retenus sur la colonne s'appuie sur l'interaction hydrophobe que peut constituer une partie de la liaison anticorps/antigène. En effet, dans notre cas, l'élution en deux étapes par de l'eau ultrapure a bien permis d'obtenir une fraction protéique présentant une activité kinase AMARA-spécifique en milieu reconstitué alors que la colonne anti-PEPc se révèle incapable de retenir des protéines présentant une telle activité (Figure 32B). Il est cependant essentiel de noter que l'activité obtenue par cette technique de purification ne représente très certainement qu'une très faible proportion de l'activité totale présente dans l'échantillon protéique initial puisqu'une telle élution ne permet que le décrochage très partiel des complexes fixés sur la colonne. De ce fait, la régénération de la résine s'effectue par un choc acide fort au citrate pH2,8. Les premières expériences effectuées au laboratoire nécessitaient de partir de 30g de matière fraîche. Un réajustement du protocole nous a récemment permis d'obtenir des éluats enrichis en complexes natifs à partir de seulement 5 à 10g de matériel végétal. Ces modifications de protocole concernent majoritairement des raccourcissements de la durée de certaines étapes (centrifugation, lavages...). De façon manifeste, le facteur temps (environ 3h avec notre dernier protocole) est un élément clé dans ce protocole de purification ainsi que nous l'avons souligné en début de paragraphe. Dans un second temps, nous avons validé l'efficacité de la colonne par l'utilisation de la protéine recombinante ayant servi à purifier les anticorps (GST-AtSnRK1 $\alpha$ 1) (Figure 32B).

Nous avons par la suite analysé l'éluat obtenu à partir d'un extrait protéique végétal. Cet éluat a été soumis à une électrophorèse en conditions natives suivi d'une immuno-détection grâce aux anticorps anti-AtSnRK1 $\alpha$ 1 (Figure 32C). De façon très intéressante, nous avons observé après autoradiographie une bande supérieure à 250kDa qui, après analyse en spectrométrie de masse, s'est avérée contenir au moins la sous-unité AtSnRK1 $\alpha$ 1 et la sous-unité régulatrice AtSnRK1 $\gamma$  (Annexe I). Les masses théoriques calculées pour des complexes hétérotrimériques  $\alpha/\beta/\gamma$  avoisinant les 130/150kDa, ce résultat suggère la présence de multimères protéiques *in vivo*. Néanmoins, la sous-unité de type  $\beta$  n'a pas été détectée en tandem MS/MS mais plusieurs hypothèses incluant sa présence au sein de ces multimères peuvent être avancées pour expliquer ce résultat. En premier lieu, cette sous-unité étant sujette à plusieurs modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation (Iseli *et al.*, 2008) ou la myristoylation (Pierre *et al.*, 2007), elle pourrait de ce fait être moins encline à la protéolyse et donc moins détectable en spectrométrie de masse (Benoit Valot, communication personnelle). En second lieu, cette sous-unité régulatrice est connue chez les mammifères et la levure pour son rôle de « scaffolding » du

Tableau 2. Effet de différents métabolites sur l'activité de complexes AtSnRK1 immuno-purifiés.

Materiel biologique	Type de Métabolite	Métabolite	Effet	Détails		
				[Métabolite] (mM)	Effet (%)	Ecart-type (%)
Complexes AtSnRK1 immuno-purifiés	Sucres	Glucose	Aucun	5	/	/
		Glucose-1P	Aucun	5	/	/
		<b>Glucose-6P</b>	<b>Inhibition</b>	<b>5</b>	<b>28</b>	<b>32</b>
		UDP-Glucose	Aucun	50	/	/
		Fructose	Aucun	5	/	/
		Fructose-1P	Aucun	50	/	/
		Frucose-6P	Aucun	5	/	/
		Fructose1,6bP	Aucun	5	17	18
		Galactose	Aucun	5	/	/
		Saccharose	Aucun	5	/	/4
		Saccharose-6P	Aucun	50	/	/
		Glyceraldéhyde-3P	Inhibition	5	15	2
		Tréhalose	Aucun	5	/	/
	Tréhalose-6-P	Aucun	0,2	/	/	
	Nucléotides	<b>AMP</b>	<b>Inhibition</b>	<b>0,1</b>	<b>41</b>	<b>8,5</b>
		<b>AMP</b>	<b>Inhibition</b>	<b>1</b>	<b>66</b>	<b>3,7</b>
		<b>ADP</b>	<b>Inhibition</b>	<b>0,1</b>	<b>59</b>	<b>13,2</b>
		NAD	Aucun	/	/	/
		NADH	Aucun	/	/	/
		NADP	Aucun	/	/	/
		NADPH	Aucun	/	/	/
		AMPc	Aucun	/	/	/
		Adénosine	Aucun	/	/	/
		GMP	Aucun	/	/	/
	Acides organiques	2-oxoglutarate	Aucun	5	/	/
		<b>Citrate</b>	<b>Inhibition</b>	<b>2</b>	<b>23</b>	<b>5</b>
		<b>Citrate</b>	<b>Inhibition</b>	<b>5</b>	<b>58</b>	<b>4,5</b>
		Isocitrate	Aucun	5	/	/
		Malate	Inhibition	5	15	2,6
		Pyruvate	Aucun	5	/	/
		PEP	Aucun	5	/	/
	Composés azotés	Succinate	Aucun	5	/	/
		Acétyl-CoA	Aucun	1	/	/
<b>Glutamate</b>		<b>Inhibition</b>	<b>5</b>	<b>28</b>	<b>3,8</b>	
<b>Glutamine</b>		<b>Inhibition</b>	<b>5</b>	<b>41</b>	<b>7,8</b>	
<b>Aspartate</b>		<b>Inhibition</b>	<b>5</b>	<b>31</b>	<b>6,8</b>	
<b>Asparagine</b>		<b>Inhibition</b>	<b>5</b>	<b>23</b>	<b>4,4</b>	
<b>Nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)</b>		<b>Inhibition</b>	<b>5</b>	<b>45</b>	<b>15,2</b>	
Nitrite (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )		Aucun	1	/	/	
Ammonium (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	Aucun	1	/	/		
Sel	NaCl	Aucun	0,5	/	/	
Sous-unité GST-SnRK1α1 recombinante	Nucléotides	AMP	Aucun	1	/	/
		<b>ADP</b>	<b>Inhibition</b>	<b>0,1</b>	<b>25</b>	<b>2,8</b>
	Acides organiques	Citrate	Aucun	5	/	/
		Malate	Aucun	5	/	/
	Composés azotés	Glutamate	Aucun	5	/	/
		Glutamine	Aucun	5	/	/
		Aspartate	Aucun	5	/	/
Asparagine		Inhibition	5	15	12,6	
Nitrate (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Aucun	5	/	/		

L'activité des complexes immuno-purifiés incubés avec chacun des métabolites a été mesurée en présence du peptide AMARA (90µM), d'ATP (20µM) et de 2µCi d'ATP radiomarqué. Les pourcentages d'inhibition par rapport au témoin (complexes incubés en l'absence de métabolites) sont indiqués et sont la moyenne de 3 répétitions indépendantes. Les inhibitions supérieures à 20% sont notées en gras.

## Résultats I – Régulation métabolique des complexes AtSnRK1

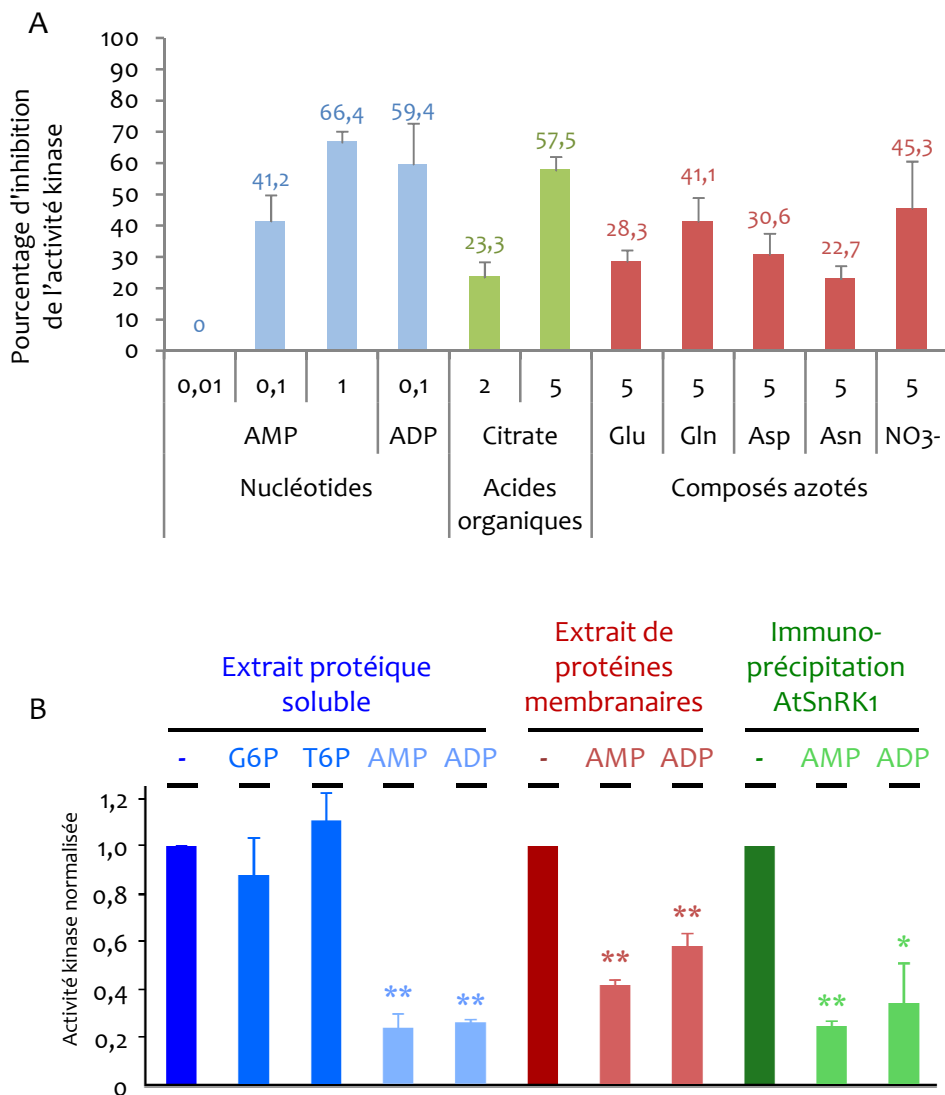
complexe, devenant indispensable à son activation (Townley & Shapiro, 2007; Oakhill *et al.*, 2010). Il est donc peu probable que cette sous-unité soit totalement absente. Cependant, ce rôle de mise en place du complexe, bien qu'indispensable, pourrait être un événement dynamique.

Une fois notre technique de purification validée, il nous a semblé important d'essayer d'estimer l'état de phosphorylation des complexes en sortie de colonne. Il est évident que la résine immuno-absorbante ainsi générée n'est pas en mesure de discriminer les complexes phosphorylés sur leur T-loop (actifs) des complexes non phosphorylés (inactifs). Comme montré précédemment au laboratoire (Crozet *et al.*, 2010), la protéine recombinante GST-AtSnRK1 $\alpha$ 1 produite dans la bactérie nécessite d'être pré-activée par sa kinase amont AtSnAK1/2. Il est très intéressant de remarquer que 23% ( $\pm$  5%) d'activité AMARA-spécifique additionnelle est obtenue lorsque le complexe immuno-purifié est pré-incubé avec la protéine recombinante GST-AtSnAK2 (Figure 33). Ce résultat indique qu'une grande majorité du pool de complexes AtSnRK1 obtenus est phosphorylé et actif. Ceci peut paraître surprenant car *a priori*, les feuilles de rosettes dont est issu l'extrait protéique n'étaient soumises à aucun stress.

L'ensemble de ces premières données nous permettent d'affirmer que ce protocole d'immuno-purification est un outil précieux permettant l'obtention rapide en une étape d'éluats fortement enrichis en complexes SnRK1 principalement actifs.

### Propriétés biochimiques de l'enzyme

L'étude de la régulation des complexes AtSnRK1 nécessite au préalable une meilleure caractérisation de ceux-ci et notamment la détermination des propriétés biochimiques de l'enzyme. Ainsi, le pH optimum de l'enzyme se situe autour de 7,3, valeur cohérente avec le pH des cellules du mésophylle (Taiz & Zeiger, 1991) (Donnée obtenue par P. Crozet). Le Km apparent des complexes élués de la colonne a été évalué à 185 $\mu$ M ( $\pm$  67 $\mu$ M) (Figure 34). La variation relativement importante de 67 $\mu$ M observée au cours de nos expériences peut s'expliquer par la multiplicité de complexes potentiellement présents dans les feuilles (et par conséquent présents dans l'éluat) et pour lesquels il est raisonnable de penser que les propriétés biochimiques pourraient ne pas être similaires (Polge & Thomas, 2007). Cette valeur concorde avec des données de la littérature donnant un Km de 80 $\mu$ M pour l'AMPK purifiée à partir de foie de rat (Carling *et al.*, 1989). Par ailleurs, Zhang et collègues (2009) analysent l'inhibition du T6P sur les complexes AtSnRK1 dans des milieux réactionnels contenant 200 $\mu$ M d'ATP. Le Km apparent pour le second substrat de l'enzyme, le peptide AMARA, se situe autour de 100 $\mu$ M ( $\pm$  30 $\mu$ M), concentration une fois encore cohérente avec la littérature (55 $\mu$ M, Dale *et al.*, 1995). Ceci est par



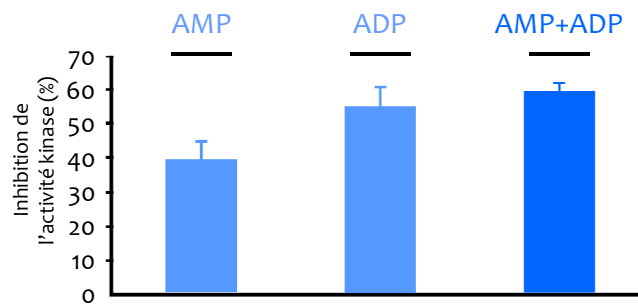
**Figure 35. Effet des principaux effecteurs influençant l'activité des complexes AtSnRK1.** Essais kinases réalisés en présence ou non d'un métabolite dans un milieu réactionnel contenant le peptide AMARA (90µM), 2µCi d'ATP radiomarqué et 20µM d'ATP. **(A)** Inhibition de l'activité de complexes AtSnRK1 par les métabolites entraînant les effets les plus remarquables lors du crible. Glu, glutamate; Gln, glutamine; Asp, aspartate; Asn, asparagine; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, nitrate. Les valeurs indiquées sont la moyenne de trois expériences indépendantes. **(B)** Effet de l'AMP, de l'ADP, du G6P et du T6P sur différents matériels biologiques. Les activités kinases ont été effectuées à partir d'extraits protéiques bruts (bleu), membranaires (rouge) ou à partir de complexes immuno-purifiés (vert) en présence de glucose-6-phosphate (G6P, 5mM), de tréhalose-6-phosphate (T6P, 1mM), d'AMP (1mM) ou d'ADP (1mM). L'activité est normalisée par rapport au témoin (-). \*p<0,01; \*\*p<0,001.

ailleurs en accord avec le fait que ce peptide correspond à la séquence consensus du motif reconnu par la famille SNF1/AMPK/SnRK1 (Dale *et al.*, 1995).

### A la recherche de métabolites modulateurs de l'activité kinase AtSnRK1

Fondée sur des résultats antérieurs indiquant que l'activation d'AtSnRK1 en réponse à un stress, n'était pas corrélée à une modification du niveau de phosphorylation de la Thr175, l'hypothèse d'une régulation métabolique avait été avancée au laboratoire. Pour la tester, nous avons observé l'effet de 39 métabolites sur les extraits enrichis en complexes AtSnRK1 préparés comme décrit ci-dessus. L'ensemble des résultats est consigné dans le Tableau 2 et l'effet de quelques métabolites d'intérêt est détaillé dans la figure 35. Dans un premier temps, l'emphase a été mise sur les sucres puisque cette kinase est impliquée dans la régulation du métabolisme glucidique et que certains sucres (glucose, saccharose) sont capables de bloquer la réponse aux stress SnRK1-dépendante (Baena-González *et al.*, 2007; Jossier *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). De façon surprenante, aucun des 14 sucres et sucres-phosphate testés n'a modulé significativement l'activité kinase des complexes. Il est à noter une inhibition très faible, de l'ordre de 20% (non significative cependant), du G6P (5mM), cohérente avec l'ambiguïté existant dans la littérature sur l'effet de ce métabolite sur SnRK1 (Sugden *et al.*, 1999a; Toroser *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009). Le T6P, connu comme régulateur indirect de l'activité de la kinase (Zhang *et al.*, 2009), ne présente aucun effet direct sur la kinase dans notre étude. Cependant, dans leurs travaux, Zhang et collègues soulignent que l'effet du T6P est observé sur de jeunes plantules d'*Arabidopsis* mais que celui-ci est absent dans des feuilles matures. Nos résultats sont en parfait accord avec ces observations puisqu'aucun effet n'a pu être observé, ni directement sur nos extraits enrichis en complexes SnRK1 (Tableau 2), ni sur extrait protéique brut de feuilles âgées de 4 à 6 semaines (données non présentées).

A l'inverse, le citrate s'est avéré être un inhibiteur fort de l'activité de AtSnRK1 (58% à 5mM, figure 35A). D'autres métabolites, issus du métabolisme azoté, inhibent l'activité kinase SnRK1 dans nos conditions et à des concentrations physiologiques (5mM). Ainsi, le nitrate inhibe l'enzyme à hauteur de 45%, le glutamate et la glutamine à hauteur de 28% et 41%. En outre, l'aspartate réduit l'activité SnRK1 de 31% et l'asparagine de 23% (Tableau 2, figure 35A). Enfin, des résultats très intéressants ont été obtenus avec les nucléotides. Alors que certains d'entre eux (dérivés du nicotinamide, AMPc, GMP et l'adénosine) ne semblent avoir aucun effet sur la kinase, l'AMP et l'ADP se sont avérés être des inhibiteurs forts de SnRK1 avec des diminutions respectives d'activité de 41% et 59% à 0,1mM. Ce fort effet inhibiteur de l'AMP était inattendu puisque, d'une



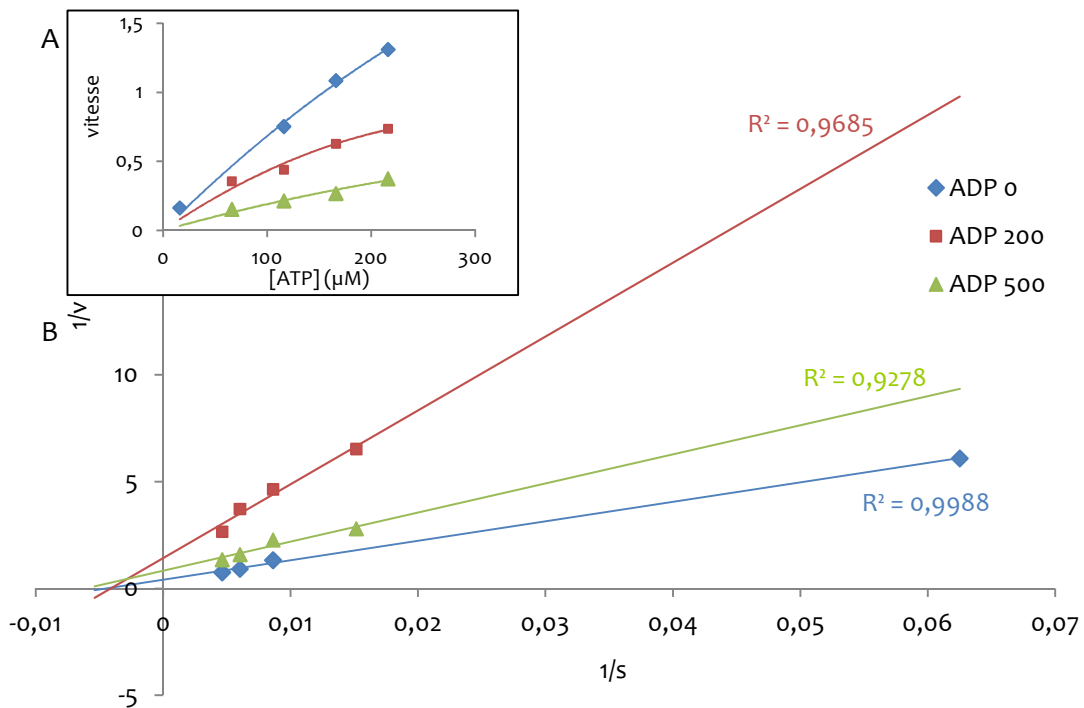
**Figure 36. Analyse de l'additivité de l'AMP et de l'ADP sur l'activité de complexes AtSnRK1 immuno-purifiés.** Essais kinases réalisés en présence de 10 $\mu$ L de complexes immuno-purifiés, 1mM d'AMP et/ou d'ADP dans un milieu réactionnel contenant le peptide AMARA (90 $\mu$ M), 2 $\mu$ Ci d'ATP radiomarqué et 50 $\mu$ M d'ATP. L'activité est comparée à celle de complexes incubés sans métabolite.

part, Sugden et collègues (1999a) n'avaient pas noté un tel effet sur l'enzyme d'épinard et que, d'autre part, l'AMPK de mammifères est connue pour être au contraire fortement activée par ce nucléotide (Carling *et al.*, 1989).

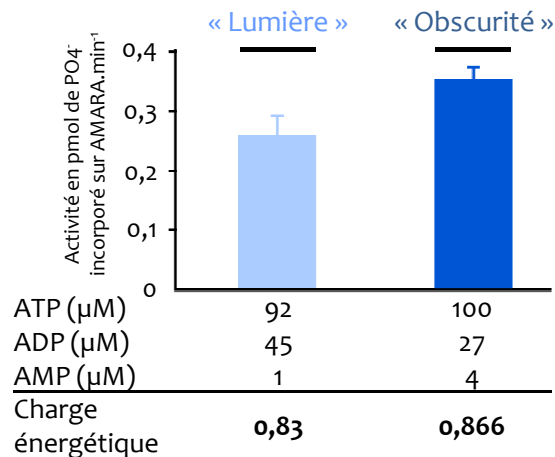
### L'AMP et l'ADP sont des inhibiteurs allostériques de AtSnRK1

Ces derniers résultats concernant les nucléotides ont été surprenants tant il est ancré que l'AMPK est une kinase activée par l'AMP (ce dogme lui ayant donné son nom : « AMP-activated protein kinase ») (Davies *et al.*, 1989) et ce nucléotide étant par ailleurs inefficace sur l'enzyme de levure SNF1 (Wilson *et al.*, 1996). Très récemment, il a également été établi que l'ADP est un effecteur positif de l'activité de l'AMPK (Xiao *et al.*, 2011) et de SNF1 (Mayer *et al.*, 2011) qui agit en protégeant les kinases de mammifères et de levure de l'action de leur phosphatase. Il nous a donc semblé indispensable de confirmer les inhibitions observées pour ces deux nucléotides. Nous avons ainsi testé l'effet de l'AMP et de l'ADP sur un extrait de protéines solubles rapidement précipitées au sulfate d'ammonium (Figure 35B, en bleu), ainsi que sur des complexes immuno-précipités selon la méthode décrite par Jossier *et al.* (2009) (Figure 35B, en vert) et sur des extraits de protéines membranaires (Figure 35B, en rouge). En effet, il avait été décrit précédemment que les sous-unités  $\beta_1$  et  $\beta_2$  étaient myristoylées, indiquant qu'une partie des complexes SnRK1 pourraient être associés aux membranes (Pierre *et al.*, 2007). Dans tous les cas, l'activité est fortement inhibée (entre 65 et 80%) par 1mM de ces effecteurs (Figure 35).

Nous avons ensuite souhaité renforcer ces premiers résultats par une étude plus poussée de l'effet de ces deux nucléotides. En premier lieu, il nous a semblé intéressant d'analyser leur effet cumulé sur l'activité SnRK1. Comme présenté dans la figure 36, lorsque les deux nucléotides sont présents dans le milieu d'activité, aucun effet inhibiteur additif significatif n'est observable. Quelques analyses de compétitivité entre le substrat (ATP) et un inhibiteur (ADP) ont également permis de mettre en exergue la non-compétitivité de ces deux nucléotides, suggérant fortement que l'inhibiteur se fixe sur un site différent de l'ATP (Figure 37). Un tel résultat était cependant attendu. En effet, en parallèle du crible métabolique effectué sur le complexe immuno-purifié, nous avons testé l'effet des métabolites les plus intéressants sur la protéine recombinante GST-AtSnRK1 $\alpha_1$  seule (*cf.* tableau 2). Aucun des composés azotés testés (nitrate, aspartate, asparagine, glutamate et glutamine) n'inhibe l'activité de la protéine recombinante seule. Le citrate, pourtant inhibiteur fort de l'activité du complexe (58% à 5mM) n'a pas non plus d'effet significatif sur la sous-unité catalytique seule. Seul l'ADP à 0,1mM a inhibé l'activité de GST-



**Figure 37. Inhibition par l'ADP des complexes AtSnRK1 immunopurifiés : étude du type d'inhibition.** Essais kinases réalisés en présence de 200 $\mu\text{M}$  du peptide AMARA, 2 $\mu\text{Ci}$  d'ATP radiomarqué, 50 $\mu\text{M}$  d'ATP et des concentrations variables d'ADP (0 à 500 $\mu\text{M}$ ) (A) Représentation michaelienne. (B) Représentation de Lineweaver et Burk montrant une inhibition non-compétitive. La vitesse ( $v$ ) est exprimée en pmoles de  $\text{PO}_4^-$  incorporé sur le peptide AMARA par minute et le substrat ( $s$ ) est l'ATP.



**Figure 38. Activité des complexes AtSnRK1 immuno-purifiés en fonction de la charge énergétique.** Les concentrations cytosoliques en adénylates (ATP, ADP et AMP), déterminées par Hampp et collègues (1982) à l'obscurité ou à la lumière dans le cytoplasme de protoplastes de blé, constituent les deux valeurs de charge énergétique que nous avons appliquées sur le complexe AtSnRK1 immuno-purifié.



## Résultats I – Régulation métabolique des complexes AtSnRK1

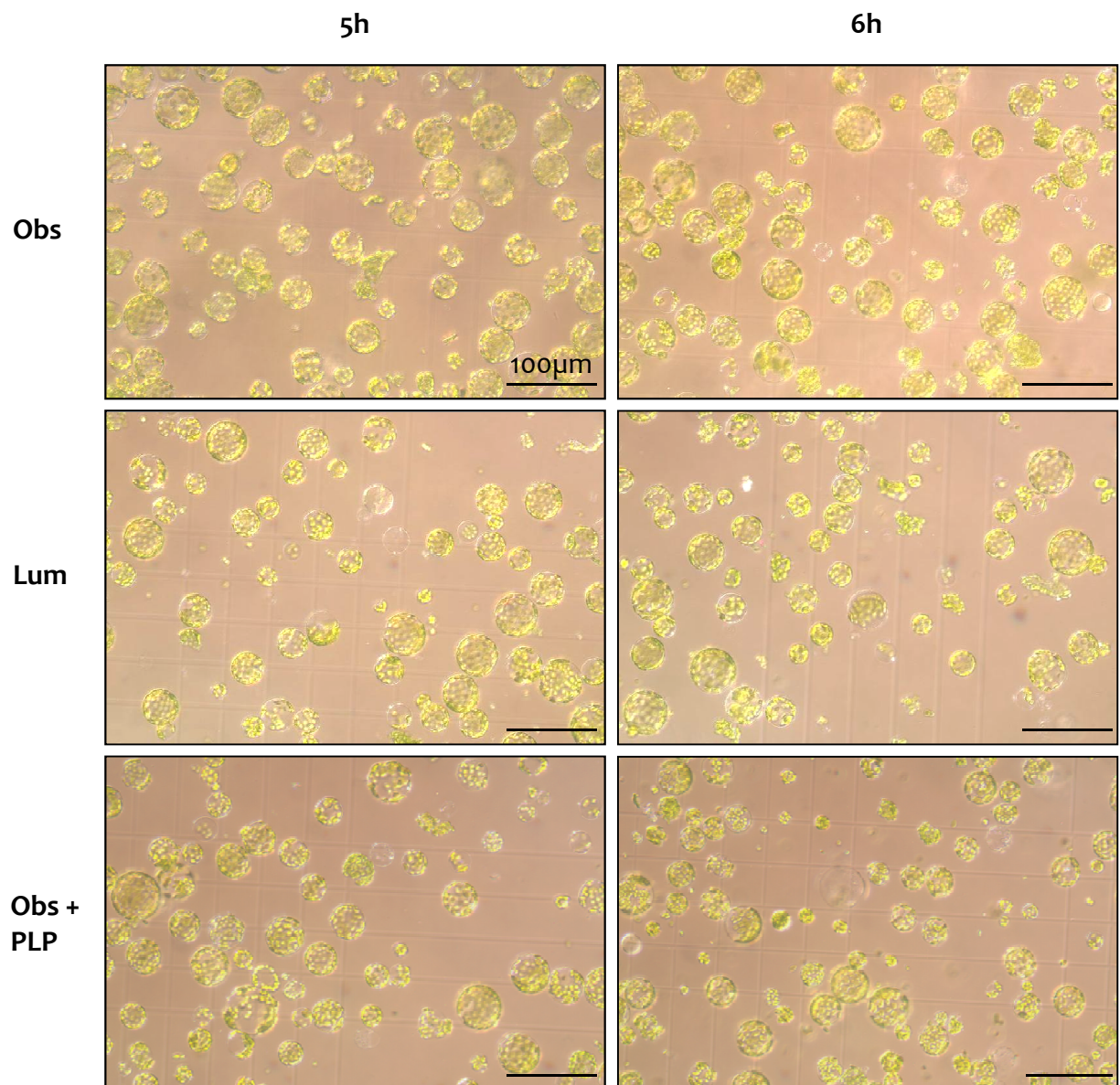
AtSnRK1 $\alpha$ 1 à hauteur de 25%, effet qui reste cependant bien inférieur à celui observé sur le complexe (60% à la même concentration).

### Hypothèse d'une régulation liée au statut énergétique intracellulaire – concept de charge énergétique

La mise en évidence que les concentrations en adénylates ont un impact sur l'activité des complexes AtSnRK1 *in vitro* nous a orientés vers l'existence potentielle d'une réponse aux stress environnementaux *via* ces nucléotides. Comme évoqué précédemment (cf. figure 27), le pool de nucléotides ATP, ADP et AMP est à considérer comme un ensemble et toute altération de cet ensemble, par l'intermédiaire d'un stress, conduit à la mise en place de mécanismes visant à amoindrir les pertes énergétique, voire à produire de l'énergie. Dans ce modèle, AtSnRK1 serait un senseur primaire d'un déséquilibre énergétique menant à une diminution de la concentration en ADP cytosolique. Le concept de charge énergétique (CE) intègre l'effet du pool d'ATP, d'ADP et d'AMP qui, en considérant les enzymes majeures capables de convertir ces nucléotides (les ATPases, les ligases, les ATP synthétases et l'adénylate kinase), évolue entre 0 (niveau énergétique théorique nul sans ATP) et 1 (niveau énergétique théorique maximal sans ADP et AMP) selon l'équation suivante :

$$\text{Charge Énergétique (CE)} = 0 \leq \frac{ATP + \frac{1}{2}ADP}{ATP + ADP + AMP} \leq 1$$

Afin de tester cette hypothèse dans notre cas, nous avons appliqué différentes valeurs de charge énergétique sur le complexe immuno-purifié. Aucune étude précise n'ayant été réalisée sur *A. thaliana*, le choix de ces valeurs s'est basé sur les concentrations en nucléotides calculées par Hampp et collègues (1982) dans le cytosol de protoplastes de feuilles de blé placés à la lumière (CE = 0,83) ou à l'obscurité (CE = 0,866). Dans ces conditions, la figure 38 montre qu'à l'obscurité, *i.e.* lorsque la concentration en ADP cytosolique diminue, l'activité des complexes AtSnRK1 s'accroît d'environ 30% alors que la variation de charge énergétique calculée n'est que de 0,033. Ces résultats sont en adéquation avec l'hypothèse selon laquelle un statut énergétique faible global mais une diminution de l'ADP cytosolique engendrerait une activation de la kinase régulatrice.



**Figure 39. Observation de protoplastes de feuilles d'*A. thaliana* après 5 et 6h d'incubation.** Les protoplastes, préparés selon Yoo et al., (2007), sont incubés pendant 6h à la lumière (Lum, 150µE) ou à l'obscurité (Obs) en présence ou non de PLP (0,5mM) et observés après 5h et 6h. PLP, pyridoxal phosphate

### Etude d'effecteurs de l'activité de SnRK1 dans des protoplastes d'*Arabidopsis*

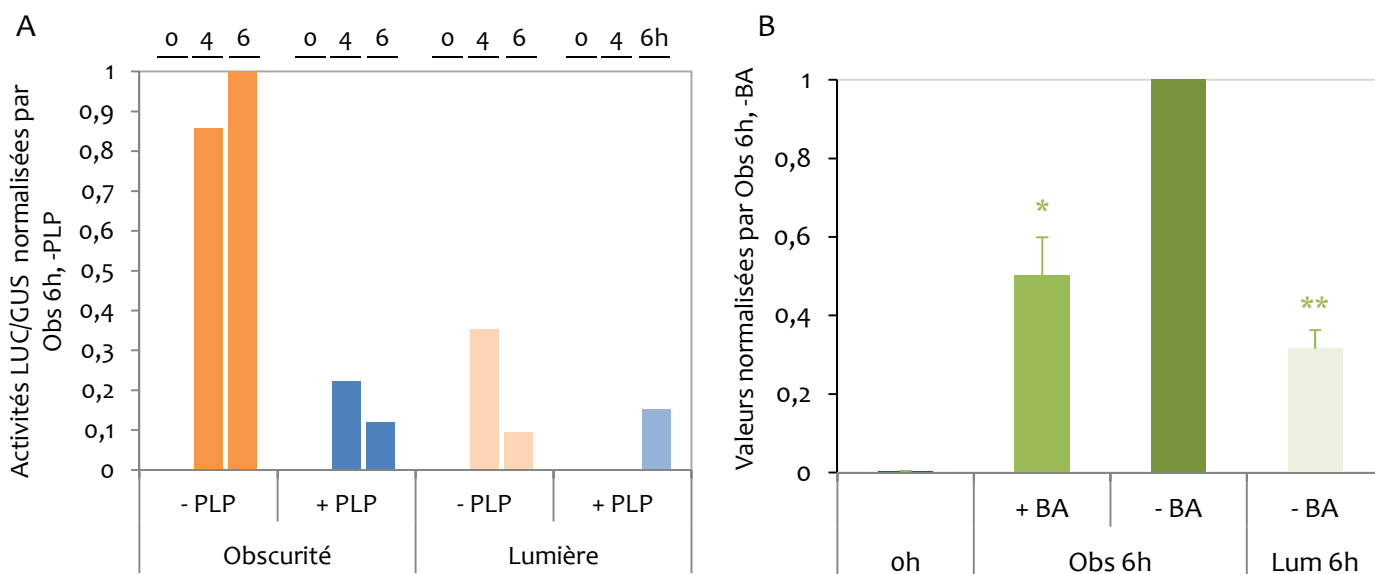
L'objectif des manipulations réalisées sur des protoplastes de feuilles de rosettes d'*A. thaliana* est de mettre en évidence l'effet *in cellulo* des principaux métabolites issus du crible effectué *in vitro*.

### Obtention de protoplastes de mésophylle d'*Arabidopsis* de bonne qualité

En 2008, en complément de la publication phare impliquant la kinase AtSnRK1 dans un réseau de signalisation génique d'envergure (Baena-González *et al.*, 2007), le groupe de J. Sheen a publié un protocole de préparation et de transformation de protoplastes à partir de mésophylle de feuilles d'*Arabidopsis* (Yoo *et al.*, 2007). Profitant de l'expérience de l'équipe d'Elena Baena-González à l'IGC d'Oeiras (Portugal), nous avons réalisé, en collaboration avec Pierre Crozet, une série d'expériences visant à s'approcher d'un contexte *in planta*. Néanmoins, la prise en main de cette approche cellulaire au sein de notre laboratoire et l'obtention de préparations de protoplastes répétables et de bonne qualité n'ont pas été immédiates. Une illustration de la qualité de protoplastes obtenus après différentes incubations est présentée en figure 39.

### Approche pharmacologique sur protoplastes

A la lumière, la source énergétique majeure à l'intérieur de la cellule végétale est le chloroplaste au travers des squelettes carbonés produits par la photosynthèse. A l'obscurité, c'est la mitochondrie qui est seule en mesure de maintenir une homéostasie énergétique satisfaisante pour les cellules. Les réserves glucidiques accumulées dans le chloroplaste au cours de la journée sont consommées la nuit et constituent la garantie énergétique du développement de la plante en l'absence de photosynthèse. L'ATP produit par la mitochondrie est véhiculé dans le cytosol par un échangeur ATP/ADP. En d'autres termes, lorsque la mitochondrie produit de l'énergie en grande quantité, elle puise l'ADP cytosolique, ce qui résulte en une chute de la concentration en ADP dans ce compartiment. Cette analyse théorique est en accord avec les observations faites par Hampp et collègues (1982). En effet ces auteurs notent une redistribution des pools d'adénylates importante lorsque des protoplastes de blés sont incubés pendant 60sec à la lumière puis de 30sec à 5min à l'obscurité. C'est dans le compartiment cytosolique qu'ont lieu les plus importantes variations. Juste après incubation à la lumière, le ratio ATP:ADP et la charge énergétique (CE) sont très élevés (8,33 et 0,95 respectivement), preuve d'un niveau énergétique élevé. Ces valeurs chutent drastiquement lorsque les protoplastes sont placés pendant 5min à l'obscurité avec un ratio ATP:ADP égal à 3,66 et une CE de 0,89. Cependant, aucune étude dans la littérature ne nous permet de statuer sur le devenir de ces ratios et des niveaux de charge



**Figure 40. Effet d'inhibiteurs de l'échangeur ATP/ADP mitochondrial (PLP, pyridoxal phosphate et BA, acide bongkreikic) sur l'activité de AtSnRK1 dans des protoplastes de feuilles d'*Arabidopsis*.** Des protoplastes ( $100\mu\text{L}$  à une concentration de  $2 \times 10^5$  protoplastes. $\text{mL}^{-1}$ ) d'*Arabidopsis* ont été transformés avec les constructions DIN6::LUC ( $20\mu\text{g}$ ) et Ubq::GUS ( $0,5\mu\text{g}$ ). Les activités luciférase ont été normalisées par les activités  $\beta$ -glucuronidase (GUS) afin de palier à d'éventuelles différences d'efficacité de transformation des protoplastes entre les conditions. **(A)** Etude préliminaire de l'effet du pyridoxal phosphate. Des cinétiques d'incubation des protoplastes (0, 4 et 6h) à la lumière ou à l'obscurité, en présence ou non de PLP  $0,5\text{mM}$  (-/+ PLP) dans le milieu d'incubation, ont été effectuées. Il s'agit d'un résultat préliminaire effectué une seule fois. Les valeurs sont normalisées par rapport au témoin « Obscurité sans PLP dans le milieu à  $t=0\text{h}$  ». **(B)** Effet de l'acide bongkreikic. Les valeurs des différentes conditions sont ici présentées par rapport à la référence « Obscurité 6h sans BA dans le milieu ». oh, mesure à  $t=0\text{h}$ ; Obs 6h, 6h d'incubation à l'obscurité; Lum 6h, 6h d'incubation à la lumière; +/- BA, en présence ou non de BA ( $20\mu\text{M}$ ) dans le milieu d'incubation. Les valeurs sont la moyenne de 5 répétitions indépendantes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ .

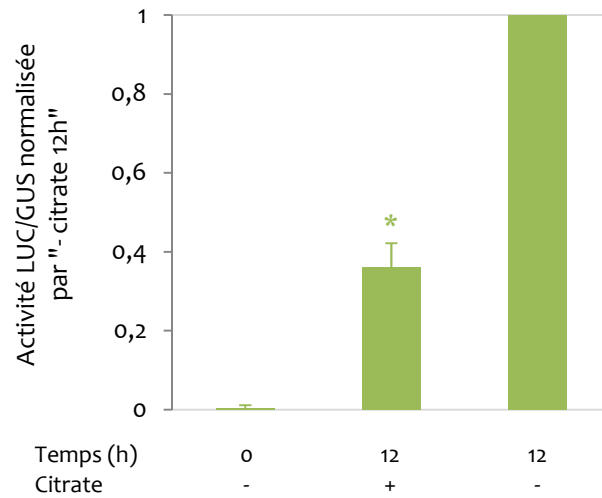
énergétique sur des temps plus longs, synonymes de stress dans le cadre duquel la cellule serait amenée à tenter de maintenir un niveau énergétique cytosolique fort pour assurer ses activités métaboliques.

### Inhibition de l'échangeur ATP/ADP mitochondrial

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle la cellule, en conditions de stress (obscurité prolongée), s'efforcerait de maintenir un niveau énergétique fort, nous avons envisagé d'empêcher l'import d'ADP dans la mitochondrie. Pour cela, l'approche pharmacologique choisie a consisté à placer nos préparations de protoplastes en présence de différents inhibiteurs de l'antiporteur ATP/ADP situé sur la membrane interne de la mitochondrie. Les tests préliminaires réalisés en présence de 0,5mM de pyridoxal phosphate (PLP) ont été très encourageants. Comme décrit par Baena-Gonzales et collègues (2007), des protoplastes transformés par la construction DIN6::luciférase et placés à l'obscurité montrent une fluorescence forte, preuve de l'activité de SnRK1. En effet cette fluorescence reflète l'activation du promoteur du gène DIN6, par l'intermédiaire d'un facteur de transcription bZIP directement phosphorylé/activé par AtSnRK1. Les mêmes protoplastes, incubés à la lumière, présentent une fluorescence beaucoup plus faible (Figure 40A). Lorsque le PLP est ajouté dans le milieu d'incubation, l'activation du gène DIN6 à l'obscurité disparaît et le niveau de fluorescence est comparable aux conditions « lumière » (Figure 40A). Cependant, le PLP étant, entre autres, un cofacteur enzymatique, nous avons décidé de répéter cette expérience en utilisant l'acide bongkrelic (BA), un autre composé spécifique de cet échangeur mitochondrial. De la même façon, un niveau de fluorescence fort est détecté dans des protoplastes placés à l'obscurité en comparaison à ceux placés à la lumière (Figure 40B). Comme attendu, lorsque 20µM de BA sont ajoutés dans le milieu d'incubation à l'obscurité, cette activation est abolie (Figure 40B).

### Effet du citrate

De la même façon, le citrate s'étant avéré être un fort inhibiteur de l'activité de AtSnRK1 *in vitro*, nous avons souhaité étudier son effet dans le système protoplastes. La figure 41 compare l'activité luciférase de préparations de protoplastes en présence ou non de citrate 5mM. Comme attendu, des protoplastes placés à l'obscurité ont une activité luciférase forte (Figure 41 « - citrate 12h »). Lorsque le citrate est ajouté au milieu d'incubation, une inhibition significative de l'ordre de 60% de l'activité luciférase est observée (Figure 41). Ce chiffre est en parfait accord avec l'inhibition de 58% observée *in vitro* sur les complexes natifs immuno-purifiés en présence de citrate à la même concentration (cf. tableau 2).



**Figure 41. Effet du citrate sur l'activité de AtSnRK1 dans des protoplastes d'Arabidopsis.** Des protoplastes d'Arabidopsis ( $100\mu\text{L}$  à une concentration de  $2 \times 10^5$  protoplastes. $\text{mL}^{-1}$ ) ont été co-transformés avec les constructions AtSnRK1 $\alpha$ 1-HA ( $20\mu\text{g}$ ), DIN6::LUC ( $20\mu\text{g}$ ) et Ubq::GUS ( $0,5\mu\text{g}$ ) puis incubés pendant 12h à l'obscurité en présence ou non de citrate 5mM. Les activités luciférase ont été normalisées par GUS afin de palier à d'éventuelles différences d'efficacité de transformation entre les conditions. Les valeurs sont représentées en comparaison à la condition sans citrate. Les valeurs sont la moyenne de 4 répétitions indépendantes. \* $p < 0,01$ .



## Résultats I – Régulation métabolique des complexes AtSnRK1

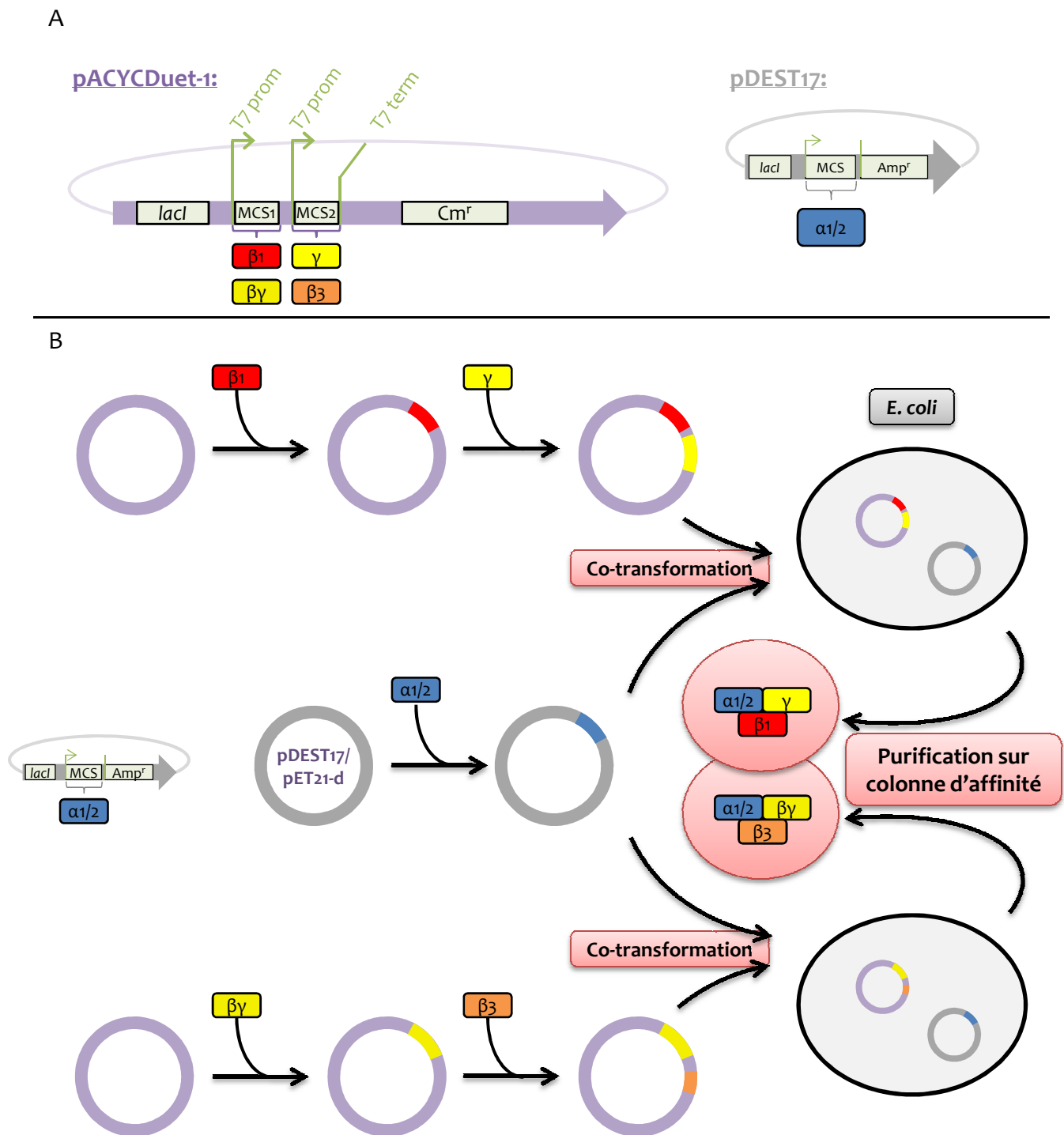
Cette approche pharmacologique sur protoplastes d'*Arabidopsis* appuie fortement les effets inhibiteurs de l'ADP et du citrate observés *in vitro* sur l'activité des complexes AtSnRK1.

### Essais de production de trimères AtSnRK1 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ recombinants

Les travaux présentés dans cette première partie du travail montrent que des effets de certains métabolites sont observés sur des complexes immuno-purifiés natifs mais pas sur la protéine recombinante GST-AtSnRK $\alpha$ 1 seule. Ainsi, l'AMP et l'ADP sont en mesure d'inhiber fortement l'activité des complexes et ceci, probablement de façon allostérique. Ces résultats laissent penser que les sous-unités régulatrices jouent un rôle clé dans ces inhibitions. Malgré l'intérêt technique indéniable apporté par ce protocole de purification rapide de complexes AtSnRK1, cette méthode ne permet pas de travailler sur des complexes de composition  $\alpha\beta\gamma$  connue, ni sur un seul type de trimère. En effet, il est très probable, comme cela a été expliqué dans l'introduction, que co-existent différents types de complexes dans certains tissus. Par exemple, les sous-unités  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 sont toutes trois présentes en même temps dans les feuilles de rosettes, matériel que nous avons utilisé pour préparer nos extraits enrichis en complexes SnRK1 (Polge *et al.*, 2008) (cf. figure 25C).

### Contexte et stratégie

Au cours des dernières années, une quantité impressionnante de travaux sur l'AMPK et SNF1 a permis de préciser les sites de fixation de l'AMP et de l'ADP sur la sous-unité de type  $\gamma$  (Xiao *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2011; Oakhill *et al.*, 2011) (cf. figure 26). Ces travaux ont notamment été rendus possibles grâce au déverrouillage technique qu'a apporté la production de trimères recombinants (complets ou partiels) (Neumann, 2003; Ramanathan *et al.*, 2010). Au cours de ce travail, nous avons tenté de produire des trimères recombinants pour AtSnRK1. Cette stratégie s'inscrit dans une double optique visant d'une part à étudier l'impact de deux combinatoires  $\alpha\beta\gamma$  différentes sur leur propriétés biochimiques et leur spécificité potentielle de substrat et d'autre part à analyser la régulation des métabolites d'intérêt identifiés précédemment sur différentes sous-unités de type  $\gamma$ , puisque des sites CBS de liaison des adénylates existent sur ces sous-unités. Ainsi, une stratégie de production de protéines recombinantes a été mise en place. Lors de sa thèse, Pierre Crozet avait essayé de reconstituer des complexes *in vitro* à partir des protéines recombinantes de chacune des sous-unités. Des premiers essais de production des différentes sous-unités en fusion à 6 histidines (6xHIS) n'ont pas abouti car ces protéines étaient absentes de la fraction protéique soluble. Pour palier à l'insolubilité des protéines, des fusions à la Glutathion-S-Transférase (GST) ont été effectuées et ont permis d'obtenir des protéines solubles (Crozet,



**Figure 42. Stratégie de clonage retenue pour la production d'hétérotrimères de AtSnRK1 chez *E. coli*.** La co-transformation de bactéries avec un vecteur porteur de la sous-unité catalytique  $\alpha$  et un vecteur porteur de deux sous-unités non-catalytiques  $\beta$  et  $\gamma$  a été choisie pour la production d'hétérotrimères de composition connue. **(A)** Le vecteur bicistronique pACYCDuet-1 confère la résistance au chloramphénicol et permet l'insertion de deux séquences sous le contrôle du même promoteur T7; le vecteur pDEST17 confère la résistance à l'ampicilline et permet la fusion de 6xHIS à la protéine d'intérêt; le vecteur pET21-d confère la résistance à l'ampicilline. Le vecteur pDEST17 a été utilisé dans une première série d'essais puis le vecteur pET21-d lui a été préféré par la suite, évitant la fusion de la sous-unité catalytique avec une étiquette 6xHIS. **(B)** L'insertion dans le vecteur pACYCDuet-1 soit de  $\beta_1$  dans le premier site multiple de clonage (MCS1) et de  $\gamma$  dans le MCS2, soit de  $\beta\gamma$  dans le MCS1 puis de  $\beta_3$  dans le MCS2 du vecteur pDuet-1, permet, en le couplant à un second vecteur porteur de la sous-unité  $\alpha$ , la production des complexes de type  $\alpha/\beta_1/\gamma$  et  $\alpha/\beta_3/\beta\gamma$  respectivement.



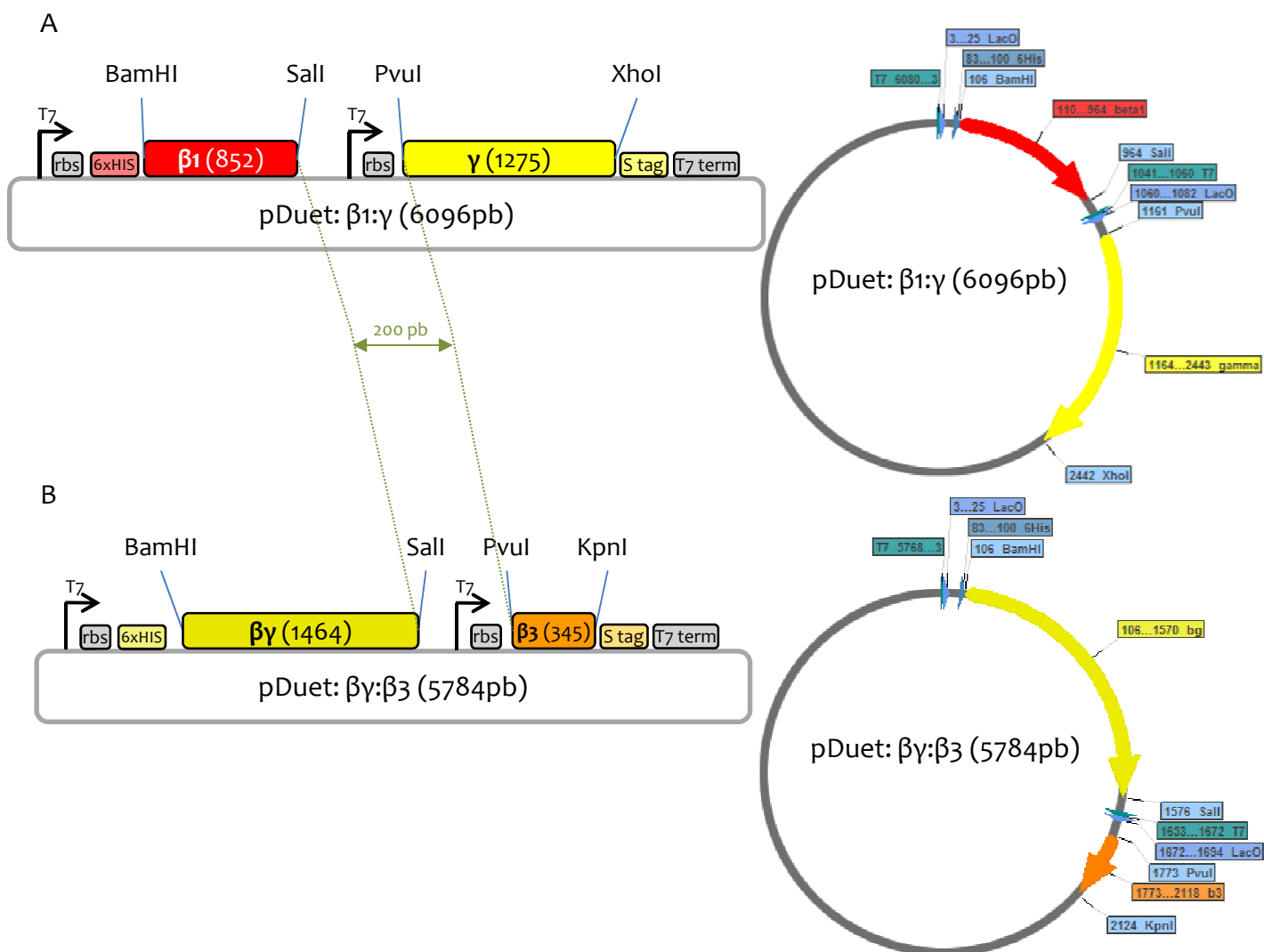
2010). Toutefois, bien que ces productions aient permis l'étude fine des mécanismes de phosphorylations croisées entre GST-AtSnRK1 $\alpha$ 1/2 et de GST-AtSnAK1/2 (Crozet et al., 2010), cette stratégie ne s'est pas avérée fructueuse pour la reconstitution de complexes *in vitro* et plusieurs explications peuvent être avancées: (1) la fusion de chacune des sous-unités avec l'étiquette GST empêche l'association des 3 sous-unités  $\alpha\beta\gamma$  entre elles; (2) la pureté et la quantité de protéines produites ne sont pas suffisantes, notamment en ce qui concerne les protéines GST-AtSnRK1 $\alpha$ 1 et GST-AtSnRK1 $\alpha$ 2 (cf. figure 32); (3) les conditions dans lesquelles cette reconstitution a été tentée *in vitro* ne permettent pas la formation du complexe ou bien celui-ci nécessite des protéines chaperonnes pour sa trimérisation. Récemment, plusieurs équipes travaillant sur les complexes AMPK chez les mammifères ont relevé ce challenge et réussi à produire des complexes hétérotrimériques fonctionnels. En 2003, l'insertion séquentielle des 3 sous-unités  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1 et  $\gamma$ 1 de l'AMPK dans un vecteur d'expression de type pET a permis de produire chez *E. coli* un complexe dont la sous-unité  $\alpha$ 1 est fusionnée à 6xHIS (Neumann, 2003). En 2010, un complexe de composition AMPK $\alpha$ 2/ $\beta$ 2/ $\gamma$ 3 a été produit à la fois dans un système de production bactérien (Rajamohan et al., 2010) et avec le système baculovirus/cellules d'insectes (Ramanathan et al., 2010). Enfin, plusieurs études de cristallisation du complexe ont été réalisées. Chez la levure *Schyziosaccharomyces pombe*, la coexpression de deux vecteurs, un premier portant une partie du CDS de la sous-unité  $\alpha$  (136 aa du domaine régulateur) et un second portant une partie du CDS de la sous-unité  $\beta$  (93 aa) ainsi que la sous-unité  $\gamma$  complète, a permis de produire un complexe en quantité et qualité suffisantes pour une telle étude (Jin et al., 2007).

Au cours de ce travail, nous avons choisi de produire les complexes de compositions suivantes : SnRK1 $\alpha$ / $\beta$ 1/ $\gamma$  et SnRK1 $\alpha$ / $\beta$ 3/ $\beta$  $\gamma$ , ce dernier complexe comprenant les deux sous-unités atypiques et spécifiques des plantes. La stratégie retenue est la coproduction des 3 sous-unités  $\alpha\beta\gamma$  après co-transformation de 2 vecteurs,  $\alpha$  étant produite à partir d'un vecteur et les 2 sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  à partir d'un second vecteur (Figures 42 et 43).

### Production de complexes recombinants

#### Recherche de conditions adéquates pour la production de trimères recombinants

La recherche de conditions de culture permettant une telle production protéique a nécessité beaucoup d'essais et s'est fortement inspirée de la littérature (essais fructueux de production de trimères de l'AMPK) et d'une étude menée en 2005 dans laquelle Studier relate un nombre impressionnant de paramètres influant de près ou de loin le rendement lors de productions protéiques (Studier, 2005). Trois types de milieux ont ainsi été testés : le milieu LB, le milieu TB



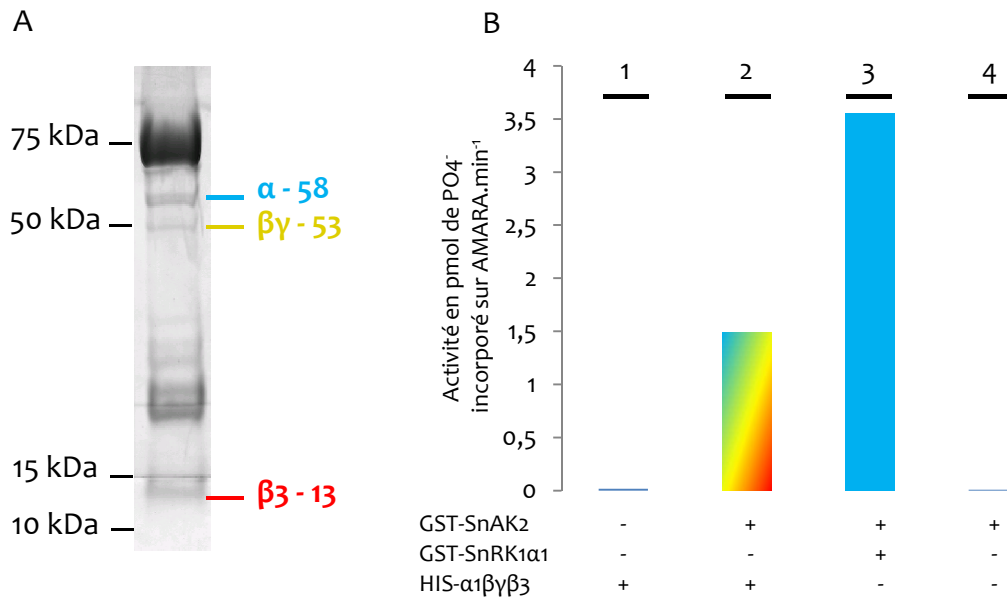
**Figure 43. Vecteurs de production bicistroniques obtenus après clonage des CDS de différentes sous-unités de type  $\beta$  et  $\gamma$ .** (A) Vecteur de production porteur des CDS d'*AtSnRK1 $\beta$ 1* et d'*AtSnRK1 $\gamma$* . (B) Vecteur de production porteur des CDS d'*AtSnRK1 $\beta$  $\gamma$*  et d'*AtSnRK1 $\beta$ 3*. Les cartes des plasmides ont été réalisées à l'aide du logiciel Virtual Cloner.

## Résultats I – Régulation métabolique des complexes AtSnRK1

(Terrific Broth) et le milieu ZYM5052. Le premier est un milieu de culture utilisé classiquement en biologie moléculaire et lors de la production de protéines recombinantes (LB = 10g de Bacto tryptone, 5g de Bacto yeast extract et 10g de NaCl). Le milieu TB est plus riche et peut permettre d'obtenir de meilleurs rendements en protéines recombinantes (TB = 12g de Bacto tryptone, 24g de Bacto yeast extract, 5g de glycérol additionnés de 17mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 72mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ). Dans notre étude, ce milieu n'a pourtant pas permis d'obtenir des conditions de culture favorables à la production de trimères  $\alpha\beta\gamma$  d'*A. thaliana*. Enfin, le milieu ZYM5052, mis au point par Studier, est un milieu dit « auto-inductif ». En effet, alors que le système de production T7 polymérase des bactéries *E. coli* BL21 nécessite l'ajout d'IPTG (un analogue du lactose non métabolisable), ce milieu n'en requiert pas. L'astuce consiste à utiliser du glucose et du lactose à des concentrations telles que la population bactérienne aura consommé tout le glucose lorsqu'elle aura atteint sa phase exponentielle de croissance. Le lactose alors présent dans le milieu sera utilisé comme source alternative de carbone, déclenchant le système de production T7 polymérase. En plus de ces différents milieux, des essais de production ont été effectués à 37°C, 30°C ou 25°C et les temps d'induction ont varié de 4h à 48h. Les conditions finales en milieu ZYM5052 ayant permis d'obtenir les meilleurs résultats sont détaillées dans le tableau 7 de la partie Matériel et Méthodes.

### Premiers résultats de production d'un trimère $\alpha\beta\gamma$ actif

Après production dans les conditions décrites précédemment, plusieurs essais de purification ont été réalisés (principalement en ce qui concerne les concentrations en compétiteur utilisées pour l'élué des protéines étiquetée 6xHIS). Les éluats ont ensuite été soumis à des électrophorèses (en conditions natives ou dénaturantes) afin de détecter la présence de protéines aux tailles attendues. De premiers résultats encourageants ont permis d'obtenir des protéines après électrophorèse SDS-PAGE aux tailles attendues de 58, 53 et 13kDa environ pouvant correspondre aux protéines recombinantes AtSnRK1 $\alpha_1$ ,  $\beta\gamma$  et  $\beta_3$  (Figure 44A). Un essai de phosphorylation du peptide substrat AMARA a ensuite été entrepris révélant une activité SnRK1 nette pour l'échantillon  $\alpha_1\beta\gamma\beta_3$  (Figure 44B). Cette activité est d'autant plus encourageante que ce même échantillon, en l'absence de la protéine recombinante GST-AtSnAK2 activatrice de la sous-unité catalytique (Shen *et al.*, 2009; Crozet *et al.*, 2010), n'a aucune activité AMARA-spécifique (Figure 44B). Cependant, il n'est pas exclu qu'une partie de cette activité puisse être allouée à la protéine recombinante HIS-AtSnRK1 seule. En effet, dans cette première série de production, deux des 3 sous-unités produites sont porteuses d'une étiquette 6xHIS, celle dont le CDS a été cloné sur le vecteur pDEST17 ainsi que celle dont le CDS a été cloné dans le MCS1



**Figure 44. Production et activité kinase de trimères AtSnRK1 recombinants.** Les résultats présentés ici sont ceux obtenus après co-transformation de *E. coli* avec les vecteurs pDEST17::α1 et pACYCDuet-1::βγβ3. **(A)** Gel SDS-PAGE, coloré au bleu de Coomassie, obtenu à partir d'une production (800mL) purifiée sur colonne nickel. Le pic d'éluat (500μl) présentant le plus de protéines (mesure à 280nm au NanoDrop) a été concentré jusqu'à environ 20μl et déposé intégralement. **(B)** Activité kinase en présence de la kinase recombinante amont activatrice GST-AtSnAK2 réalisée avec l'éluat d'une production/purification d'un trimère recombinant α1βγβ3 en comparaison avec la protéine recombinante GST-AtSnRK1α1 seule. L'activité a été réalisée en présence du peptide AMARA (200μM), de 2μCi d'ATP radiomarqué et de 200μM d'ATP pendant 1h.

## Résultats I – Régulation métabolique des complexes AtSnRK1

du pDUET-1 (Figure 44). Par conséquent, une autre série de productions a été mise en place en clonant la sous-unité catalytique dans le plasmide pET21-d, ne permettant pas la fusion avec une étiquette 6xHIS lorsque le codon stop du CDS est conservé lors du clonage. Malheureusement, et malgré de multiples conditions testées (température, induction, milieu de culture...), ces essais se sont avérés infructueux et les tests de production de trimères recombinants chez *E. coli* n'ont pas été poursuivis plus avant dans le cadre de cette thèse.

Tableau 3. Masses moléculaires théoriques des complexes  $\alpha\beta\gamma$  d'*A. thaliana*.

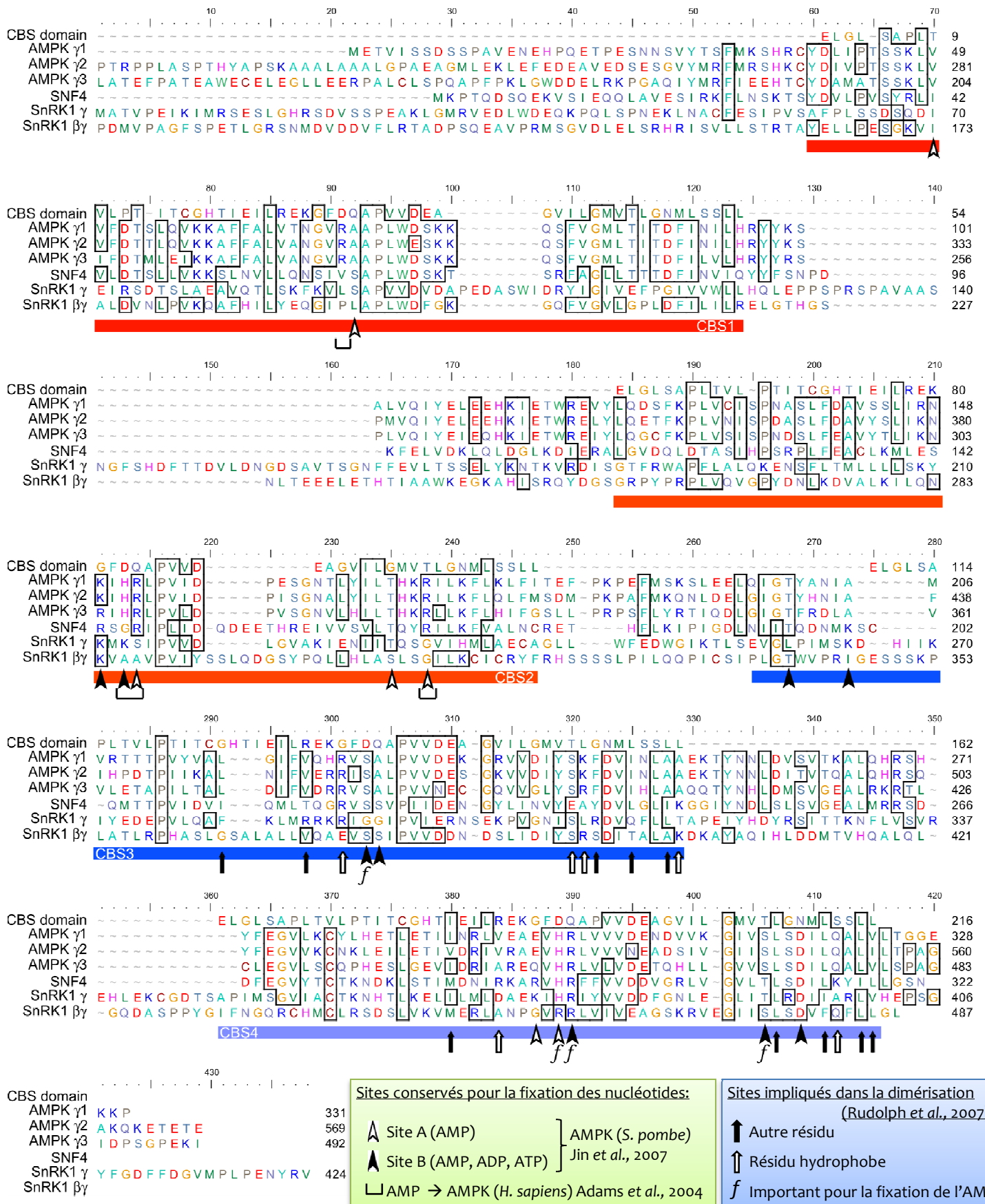
Complexe	Masse moléculaire (kDa)
$\alpha_{1/2}-\beta_1-\gamma$	136
$\alpha_{1/2}-\beta_2-\gamma$	138
$\alpha_{1/2}-\beta_3-\gamma$	119
$\alpha_{1/2}-\beta_1-\beta\gamma$	142
$\alpha_{1/2}-\beta_2-\beta\gamma$	144
$\alpha_{1/2}-\beta_3-\beta\gamma$	125

### 2.3. Discussion

#### Les complexes AtSnRK1 immuno-purifiés actifs ont une très haute masse moléculaire

Afin d'entreprendre la recherche d'éléments régulateurs des complexes SnRK1, une méthode rapide d'enrichissement en complexes AtSnRK1 en une étape, par opposition au long protocole développé par Sugden et collègues (1999b), avait été développée dans notre laboratoire juste avant mon arrivée. Conscients de l'importance du facteur temps dans l'obtention de complexes actifs et aussi proches que possible de leur état *in planta*, nous nous sommes attachés à améliorer ce protocole, en particulier en raccourcissant davantage la durée. Ces améliorations font de ce protocole un outil particulièrement précieux pour l'étude biochimique des complexes.

Bien que la sous-unité de type  $\beta$  n'ait jamais été détectée en spectrométrie de masse (tandem MS-MS), la détection des sous-unités catalytique  $\alpha 1$  et régulatrice  $\gamma$ , combinée aux analyses en gel gradient natif PAGE, suggèrent fortement que ce protocole permet l'enrichissement en complexes AtSnRK1 composés des trois sous-unités. En effet, la masse moléculaire observée en gel natif couplé à une analyse de type western blot est supérieure à 250kDa c'est-à-dire bien au-delà des masses moléculaires théoriques de trimères AtSnRK1  $\alpha\beta\gamma$  estimées à environ 140kDa (Tableau 3). Cette observation va dans le sens d'une possible dimérisation des trimères AtSnRK1 de plante, comme suggéré par les travaux de López-Paz et collègues (2009). En effet, il a été démontré que la sous-unité AtSnRK1 $\beta\gamma$  était capable de se dimériser par l'intermédiaire de ses domaines GBD et Bateman, cette association stabilisant la protéine. De la même façon, la sous-unité SNF4 (sous-unité de type  $\gamma$  chez la levure) peut se dimériser par l'intermédiaire de son domaine Bateman 2 (Rudolph *et al.*, 2007). De plus, il a été montré chez l'animal que la sous-unité catalytique AMPK $\alpha$  est également capable de se dimériser *via* son hélice  $\alpha G$  (Scholz *et al.*, 2009). La figure 45 présente un alignement des sous-unités de type  $\gamma$  de la levure, de l'homme et d'*A. thaliana* sur lequel sont annotés un certain nombre de résidus remarquables. Dans une étude s'intéressant à la dimérisation des sous-unités de type  $\gamma$  de la levure et à la liaison de l'AMP, Rudolph et collègues (2007) ont mis en évidence des résidus essentiels (notamment hydrophobes) à cette dimérisation, l'association entre sous-unités  $\gamma$  permettant la formation de poches de liaison à l'AMP. Il est intéressant de remarquer que, même lorsque ces acides aminés hydrophobes ne sont pas retrouvés dans les séquences végétales, ils sont presque systématiquement remplacés par des résidus conservant cette propriété. Cette analyse, ajoutée à la capacité des sous-unités AtSnRK1 $\beta\gamma$  à s'associer (López-Paz *et al.*, 2009), appuie fortement l'hypothèse selon laquelle les complexes végétaux seraient en mesure de se dimériser.



**Figure 45. Alignement des séquences protéiques des sous-unités de type  $\gamma$  humaines, de levure et d'*Arabidopsis*.** Les sous-unités de type  $\gamma$  de la levure *S. pombe* (SNF4), de l'homme (AMPK $\gamma$ 1/2/3) et d'*Arabidopsis* (SnRK1 $\gamma$ / $\beta\gamma$ ) possèdent 4 domaines CBS (Cystathionine- $\beta$ -synthase) de liaison des adénylates.



### Le citrate et des composés azotés inhibent l'activité des complexes AtSnRK1 immuno-purifiés

Lors du crible métabolique réalisé, nous avons testé l'effet d'une quarantaine de métabolites sur l'activité des complexes AtSnRK1 immuno-purifiés. Nous avons ainsi mis en évidence un fort et insoupçonné effet inhibiteur de plusieurs métabolites (citrate, AMP, ADP) alors que d'autres métabolites, notamment les sucres et sucres phosphates (Glu, Fru, Sac, F6P, G6P, T6P...), n'avaient aucun effet dans nos conditions expérimentales. Ce dernier résultat peut paraître surprenant étant donné qu'il a été montré à plusieurs reprises que la voie de signalisation SnRK1 répond aux sucres (Baena-González *et al.*, 2007; Jossier *et al.*, 2009) et que le glucose et le saccharose sont capables de contrecarrer l'activation de SnRK1 en réponse à des stress de diverses natures (Baena-González *et al.*, 2007). Il est cependant très probable que, soit d'autres métabolites, dérivés de ces composés primaires, sont actifs sur la kinase, soit que ces sucres agissent en amont de cette voie de signalisation (notamment *via* les kinases activatrices SnAK1 et 2).

Comme exposé dans l'introduction de ce chapitre, le T6P (et le G6P dans une moindre mesure) font l'objet d'une attention particulière depuis quelques années. Cependant, entre nos mains, ni l'un ni l'autre de ces sucres phosphates n'a affecté l'activité des complexes AtSnRK1 natifs. L'inhibition du G6P est toutefois sujette à controverse car son effet n'est observé qu'à des concentrations fortes (10mM), effet perdu à une concentration physiologique de 1mM (Toroser *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009; Debast *et al.*, 2011). Ni l'activité SnRK1 des complexes immuno-purifiés, ni celle d'extraits protéiques bruts, ni encore celle de complexes immuno-précipités à l'aide d'anticorps anti-SnRK1 $\alpha$ 1 n'est affectée par le T6P. Ceci reste néanmoins en accord avec les résultats obtenus par Zhang et collègues (2009) qui ont démontré que l'inhibition observée nécessitait un intermédiaire non identifié à ce jour et uniquement présent dans de jeunes plantules d'*Arabidopsis*. Le matériel végétal utilisé dans nos expériences (feuilles de rosettes âgées d'environ 5 semaines) ne permettrait donc pas d'observer cette régulation. De plus, il est probable que notre méthode d'enrichissement ne permette pas d'entraîner la co-purification de cet intermédiaire.

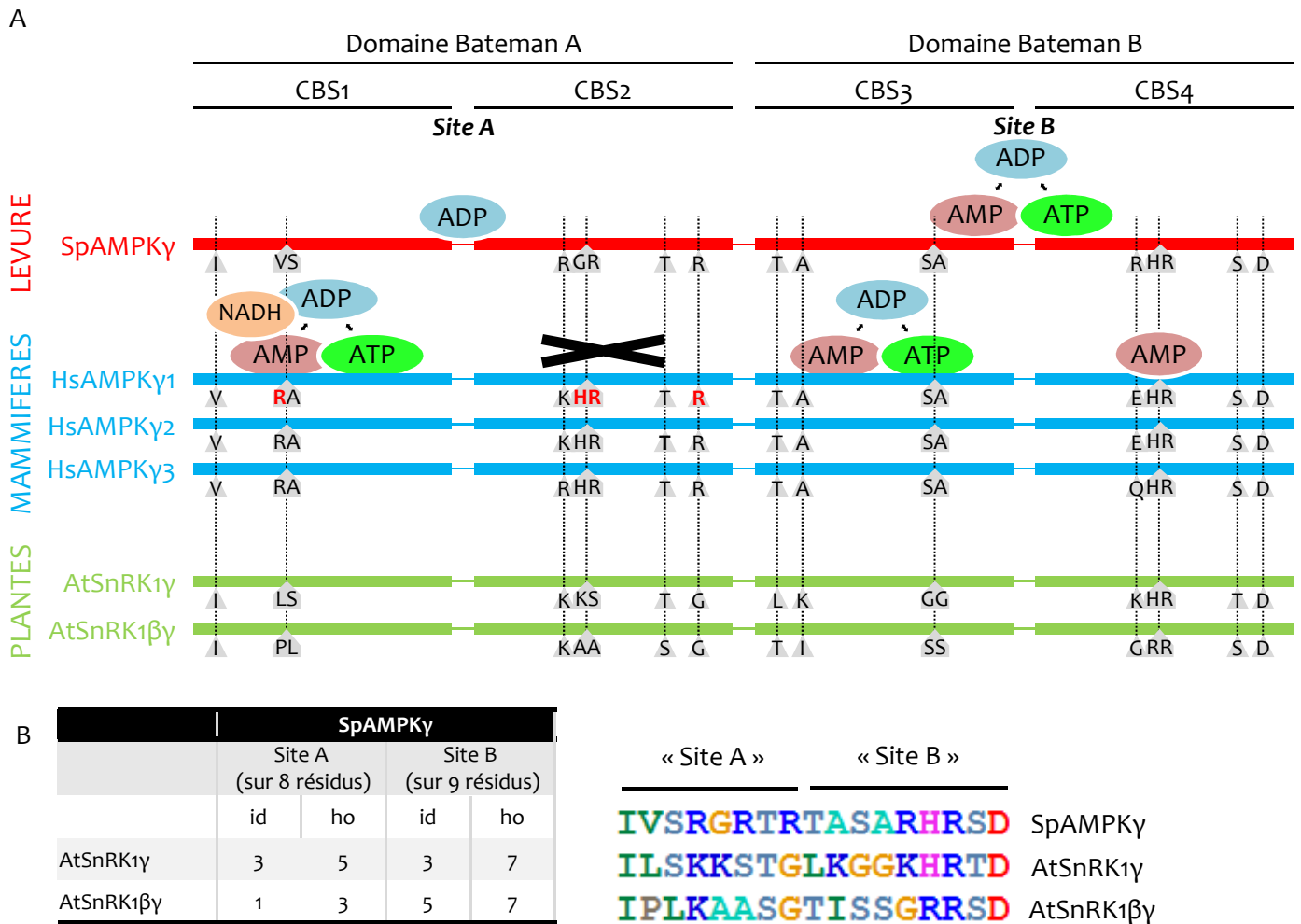
Un certain nombre de composés azotés (glutamate, glutamine, aspartate, asparagine, nitrate et citrate) se sont montrés répresseurs de l'activité de l'enzyme dans nos conditions. Ces métabolites pourraient refléter l'état énergétique intracellulaire et permettre l'ajustement de processus métaboliques primaires, afin de réorienter le métabolisme cellulaire en faveur de



## Résultats I – Régulation métabolique des complexes AtSnRK1

l'anabolisme lorsque l'environnement y est favorable et ainsi s'opposer à l'effet de SnRK1. Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs ayant impliqué SnRK1 dans la régulation du métabolisme azoté (Sugden *et al.*, 1999b; Polge *et al.*, 2008; Jossier *et al.*, 2009). En effet, cette kinase phosphoryle et inhibe *in vitro* l'activité de la nitrate réductase (NR), cible interagissant spécifiquement avec la sous-unité de type AtSnRK1 $\beta$ 1. Le lien entre ces protéines *in planta* est apporté par la mise en évidence de la modulation de l'activité NR de plantes transgéniques surexprimant SnRK1 $\alpha$ 1. L'inhibition par le nitrate observée dans notre étude s'inscrit pleinement dans ce contexte. Le nitrate, en tout début de processus d'assimilation de l'azote par les plantes, serait un signal primaire, maintenant les complexes SnRK1 inactifs. A l'inverse, lorsque les conditions environnementales sont défavorables et que la quantité d'azote disponible dans la cellule diminue, l'inhibition serait levée, les complexes actifs limitant l'activité de la NR et concentrant l'effort métabolique en faveur des processus cataboliques. Quant aux quatre autres métabolites, tous étant des produits directs (Glu, Gln) ou des composés proches (Asp, Asn) du cycle GS/GOGAT (« glutamine synthetase/glutamine oxoglutarate amino-transferase ») véritable carrefour de la biosynthèse des acides aminés, leur fonction pourrait être de refléter cette disponibilité en azote dans la cellule. Toutefois, les effets sont moindres en comparaison à celui du citrate et la validité physiologique de telles inhibitions, bien que trouvant tout son sens dans un contexte de stress, reste à confirmer.

L'inhibition de l'activité des complexes AtSnRK1 par le citrate a particulièrement retenu notre attention. En effet, cet acide organique est un intermédiaire du cycle de Krebs et sa conversion en isocitrate puis en 2-oxoglutarate par la citrate synthase et l'isocitrate déshydrogénase (ICDH) est considérée comme essentielle dans la régulation du cycle de Krebs. De plus, la production de NADPH par l'ICDH fournit à la cellule du pouvoir réducteur nécessaire aux processus de biosynthèses cytosoliques ou dans l'assimilation de l'azote dans le chloroplaste (Popova & Pinheiro de Carvalho, 1998). Cette analyse concorde parfaitement avec de très récents résultats indiquant que l'AMPK maintient la balance NADP/NADPH en faveur de la forme réduite afin de limiter le stress oxydatif dans des cellules cancéreuses (Jeon *et al.*, 2012). Bien que l'effet direct du citrate sur la kinase n'ait encore jamais été démontré, des rats à jeun (dont l'AMPK est très active) soumis à une injection intracérébro-ventriculaire de citrate, voient leurs niveaux de phosphorylation de l'AMPK et de l'une de ses cibles majeures, l'ACCase, fortement diminués (Cesquini *et al.*, 2008). Ces données indiquent par conséquent une implication majeure encore récemment insoupçonnée des complexes AMPK et SnRK1 dans la régulation du métabolisme primaire.



**Figure 46 Schéma des sites de liaison des adénylates sur les sous-unités de type  $\gamma$ .** (A) Les sous-unités de type  $\gamma$  de *S. pombe* (SpAMPK $\gamma$ ), de l'homme (HsAMPK $\gamma$ 1/2/3) et d'*Arabidopsis* (AtSnRK1 $\gamma/\beta\gamma$ ) possèdent 2 domaines Bateman comprenant chacun 2 domaines CBS (Cystathionine- $\beta$ -Synthase) capables de lier les adénylates de façon variable. Chez l'animal, les domaines 1 et 3 sont capables de fixer l'ATP, l'ADP et l'AMP tandis que seul l'AMP a été observé sur le site 4 et que le second site ne fixe aucun des trois nucléotides. Il a récemment été mis en évidence que le NADH se fixait sur le CBS4 de l'AMPK. Les acides aminés essentiels pour la liaison des nucléotides sont rappelés dans les flèches grises (v) et sont notés en rouge gras (x) lorsqu'ils sont essentiels dans l'activation allostérique par l'AMP (Scott et al 2004; Jin et al 2007). (B) Comparaison des r sids importants pour la fixation des adénylates. id, identité; ho, homologie comparées aux 8 (site A) ou 9 (site B) r sids importants de la séquence de levure.

### A revers du dogme considérant l'AMP et l'ADP comme activateurs de l'AMPK...

Les résultats les plus surprenants mis à jour au cours de ces travaux sont indéniablement les effets négatifs de l'AMP et de l'ADP sur l'activité de SnRK1. En effet, l'AMP inhibe l'enzyme, qu'elle soit immuno-purifiée, immuno-précipitée, membranaire ou bien au sein d'un extrait protéique brut de feuilles de rosettes d'*A. thaliana*. Par contre, cet effet n'est pas observé sur la protéine GST-AtSnRK1 $\alpha$ 1 recombinante seule *i.e.* dépourvue de ses sous-unités catalytiques. Ces résultats, ajoutés à nos données préliminaires semblant indiquer que cette inhibition est allostérique, suggèrent que les sous-unités non-catalytiques jouent un rôle prépondérant dans la médiation de cette inhibition.

Comme cela a été détaillé dans l'introduction de ce chapitre, l'AMP joue un rôle essentiel quasi dogmatique dans l'activation de l'AMPK (activation allostérique et protection contre la déphosphorylation de la sous-unité catalytique). Ce n'est pourtant pas le cas de l'enzyme de levure pour laquelle aucun effet similaire n'a été observé (Wilson *et al.*, 1996) bien que l'AMP se fixe sur la sous-unité de type SNF4 (Townley & Shapiro, 2007). A ce jour, aucun effet activateur n'a été rapporté concernant l'enzyme végétale. Cependant nos résultats diffèrent des observations faites par Sugden et collègues (1999a) qui n'ont pas relevé d'effet de l'AMP sur l'activité de complexes SnRK1 d'épinard. Dès 2004, il a été clairement établi que l'activation allostérique de l'AMPK par l'AMP avait lieu par l'intermédiaire de la fixation du nucléotide sur les domaines CBS de la sous-unité AMPK $\gamma$  (Scott *et al.*, 2004). Le schéma de l'alignement des sous-unités de type  $\gamma$  de la levure, de l'homme et d'*Arabidopsis* présenté dans la figure 46 offre une base pour l'analyse des raisons pouvant expliquer de telles différences. Ces sous-unités sont toutes composées de deux domaines « Bateman » possédant chacun deux domaines CBS, cette structure offrant ainsi quatre sites de fixation aux adénylates. Diverses données (notamment structurales) ont démontré que ces sites ne lient pas les nucléotides de façon similaire. Par exemple, le site A de liaison (correspondant au Bateman 1) de la levure semble fixer de façon spécifique l'ADP (Jin *et al.*, 2007). De même, l'AMP est fixé de façon non-échangeable sur le CBS4 de l'AMPK humaine (Xiao *et al.*, 2011) alors que le site B équivalent de la protéine de la levure *S. pombe* fixe l'ATP, l'ADP ou l'AMP. Des éléments d'explication peuvent être apportés en analysant les acides aminés ayant été montrés comme importants dans la fixation des adénylates et l'activation allostérique de l'AMP (Scott *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2007). Si une certaine conservation existe entre les sous-unités animales et de levure, seuls 2 des 4 sites essentiels à cette activation sont conservés sur la séquence de levure SNF4 et aucun ne l'est sur les deux séquences AtSnRK1 $\gamma$  et AtSnRK1 $\beta\gamma$  d'*Arabidopsis* (R70 sur le CBS1; H151, R152 et R171 sur le CBS2) (Figure 46). Comme énoncé

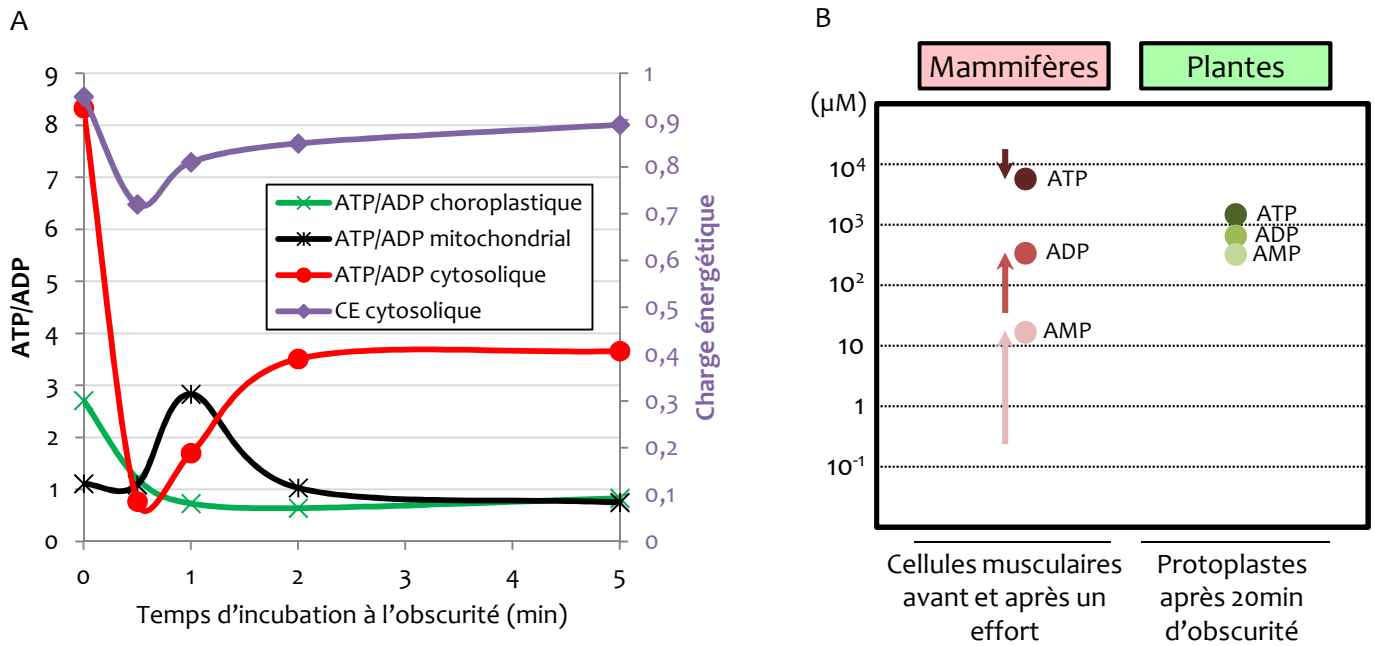


## Résultats I – Régulation métabolique des complexes AtSnRK1

auparavant, un mécanisme d'activation allostérique tel que celui mené par l'AMP (et l'ADP en considérant la protection contre la déphosphorylation) nécessite très certainement une affinité bien déterminée pour chacun des sites, en adéquation avec les concentrations en adénylates présentes autour de la protéine. Puisque des variations mineures entre les séquences des protéines animales et de levure semblent être responsables de la perte du mécanisme d'activation allostérique de l'AMP lié au site A chez la levure (CBS1 + CBS2) ou au CBS1 chez l'animal, l'absence totale d'identité avec les séquences des CBS de plantes pourrait au moins en partie expliquer les résultats que nous avons obtenus si l'AMP se fixe allostériquement sur la sous-unité de type  $\gamma$ , comme le suggèrent nos analyses.

D'autre part, nous avons observé que l'ADP est également un inhibiteur fort de l'activité des complexes AtSnRK1 $\alpha$ 1. A la différence de l'AMP, une légère inhibition de l'activité de la protéine recombinante GST-AtSnRK1 $\alpha$ 1 seule a également été observée en présence d'ADP. Ce nucléotide, en plus de sa fixation majoritairement allostérique sur une sous-unité régulatrice, pourrait avoir un effet compétiteur vis-à-vis de l'ATP au niveau du site actif. De plus, puisque nous n'avons pas observé d'effet additif de l'AMP et de l'ADP sur les complexes AtSnRK1 immuno-purifiés, il est possible que ces adénylates partagent le(s) même(s) site(s) de fixation. Récemment un certain nombre d'études structurales ont démontré le rôle prépondérant de l'ADP dans la régulation de cette famille d'enzymes. Jin et collègues (2007) ont en effet montré qu'un certain nombre de résidus étaient importants pour la fixation des adénylates (et notamment de l'ADP) sur les deux domaines Bateman de la sous-unité SNF4. De plus, très récemment, un rôle essentiel de l'ADP dans la protection contre la déphosphorylation (en se fixant sur les CBS3 de l'AMPK en particulier) a été mis en avant chez la protéine animale (Xiao et al., 2011). Les acides aminés importants dans la fixation sont précisés sur le schéma de la figure 46A et détaillés dans la partie B. Si une faible conservation est observée pour le site A, 7 résidus sur 9 sont conservés entre la séquence de levure et les séquences végétales. Ainsi en ce qui concerne les protéines végétales, le premier site pourrait ne pas être efficace pour la liaison de l'AMP et/ou de l'ADP tandis que le site B, capable d'échanger AMP, ADP et ATP chez la levure et l'animal, pourrait être fonctionnel.

Considérant l'ensemble de ces observations, il est possible que la levure, dont l'activité de la sous-unité catalytique est insensible à l'AMP, ait vu son enzyme évoluer vers un état neutre et que les enzymes végétales et animales aient elles évoluées de façon différente, en fonction de leurs caractéristiques propres (AMP et ADP favorables à l'activité de l'AMPK et AMP et ADP inhibiteurs de l'activité de SnRK1).



**Fig 47. Les pools d'adénylates (ATP, ADP et AMP) évoluent différemment entre cellules animale et végétale. (A)** Ratios ATP/ADP et charge énergétique de protoplastes de blé illuminés 60sec puis placés à l'obscurité pendant 5min (D'après Stitt *et al.*, 1982). **(B)** Concentrations en adénylates dans des cellules musculaires chez l'homme ou dans des protoplastes de blé. Les flèches indiquent l'évolution pendant l'effort musculaire de la concentration en ATP, ADP et AMP. Les points sont les niveaux en fin de stress (D'après Stitt *et al.*, 1982 et Hardie *et al.*, 2011).



### SnRK1 est régulée par la charge énergétique

Comme évoqué précédemment, l'AMPK est depuis quelques années considérée comme une enzyme répondant à la charge énergétique, c'est-à-dire aux concentrations en ATP, ADP et AMP prises dans leur ensemble afin de réguler le métabolisme en faveur du maintien de l'homéostasie énergétique (Carling *et al.*, 2011; Hardie *et al.*, 2011). Il en va de même chez les plantes où SnRK1 contrôle la balance catabolisme/anabolisme en faveur du maintien d'un niveau énergétique élevé lors d'un stress (Baena-González *et al.*, 2007). Cette même étude précise que le niveau de phosphorylation de la sous-unité catalytique AtSnRK1 $\alpha$ 1 n'évolue pas dans des protoplastes en état de stress. Ceci dénote une différence majeure entre l'enzyme animale et l'enzyme végétale qui impliquerait que le mécanisme moléculaire de protection contre la déphosphorylation de l'AMPK $\alpha$  du à la fixation de l'AMP et de l'ADP sur le CBS3 de la sous-unité AMPK $\gamma$ , n'aurait pas lieu d'être chez les plantes. Les résultats obtenus lors de notre étude ne permettent pas de mieux intégrer les adénylates directement dans ce contexte. Du fait de la présence des plastes, différents états subcellulaires nécessitent d'être considérés, selon si l'activité photosynthétique est élevée (à la lumière) ou nulle (à l'obscurité). Des études précédentes avaient révélé que les ratios ATP/ADP pouvaient grandement varier entre le cytosol, la mitochondrie et le chloroplaste, le ratio ATP:ADP passant d'environ 8,5 dans le cytosol de protoplastes illuminés à 3,7 dans des protoplastes de blé (Stitt *et al.*, 1982). Ceci a lieu sans que ce même ratio n'évolue beaucoup dans la mitochondrie et le chloroplaste. Il en va de même pour la CE cytosolique variant de 0,95 (lumière) à 0,72 (lumière puis 30sec d'obscurité) (Figure 47A). Lorsque nous avons appliqué deux valeurs de CE (correspondant à des situations « obscurité » et « lumière »), les complexes AtSnRK1 immuno-purifiés ont présenté une activité supérieure lorsque celle-ci reflétait un état d'obscurité. D'autre part, cette équipe avait également montré de façon très intéressante que la concentration en ADP chute d'un facteur 2 à l'obscurité dans le cytosol (Hampp *et al.*, 1982), celui-ci étant littéralement « pompé » hors de ce compartiment par la mitochondrie. Les résultats obtenus lors de nos expériences de pharmacologie sur protoplastes semblent indiquer que l'inhibition de l'échangeur ATP:ADP mitochondrial à l'obscurité, permettrait d'empêcher l'activation classique de SnRK1 observée par Baena-González et collègues (2007) dans ces conditions. Nous n'avons malheureusement pas pu corrélérer ces données à une augmentation du niveau en ADP dans le compartiment cytosolique, n'ayant pu mesurer les concentrations en adénylates cytosoliques de façon satisfaisante. Prises dans leur ensemble, ces données semblent indiquer que les complexes SnRK1 répondent au concept de CE proposé par Atkinson en 1964 mais de façon opposée à son orthologue chez les mammifères (Figure 47).



## Résultats I – Régulation métabolique des complexes AtSnRK1

Un autre argument vient également étayer la thèse selon laquelle les complexes SnRK1 seraient activés par une CE croissante au contraire de l'AMPK. D'après les données existantes dans la littérature, les concentrations des trois adénylates diffèrent radicalement entre une cellule végétale et une cellule animale. Par exemple, l'AMP est présent à des concentrations de l'ordre du micromolaire dans les cellules des tissus musculaires de l'homme (Hardie *et al.*, 2011) tandis que la concentration en AMP mesurée par Stitt et collègues dans des protoplastes de blé avoisine les 500 $\mu$ M (Figure 47B). Il est ainsi concevable que ces deux enzymes (mammifère et plante), bien qu'ayant une fonction identique de régulation du métabolisme, aient évolué de manière divergente dans la perception de leur environnement énergétique.

### Perspectives du chapitre I

La mise en évidence, dans cette partie du travail, de l'effet inhibiteur de l'AMP (et de l'ADP) était inattendue et particulièrement intéressante car allant à l'encontre de la situation dogmatique existant chez les animaux. L'une des premières expériences pouvant être menée au laboratoire afin d'appuyer les résultats obtenus consiste à tester l'effet de l'AMP et de l'ADP sur l'AMPK purifiée (à partir de foie par exemple) dans nos conditions expérimentales.

Par ailleurs aucune étude ne s'attarde sur ce qu'il advient à long terme des pools de nucléotides. Comme le suggèrent diverses données de la littérature, la baisse du niveau énergétique intracellulaire se traduit par une chute du ratio ATP:ADP ainsi qu'une augmentation de la concentration en AMP. Théoriquement, ceci pourrait évoluer jusqu'à ce que ces niveaux s'équilibrent dans une cellule sévèrement stressée où l'activité des complexes AMPK est très élevée (Hardie *et al.*, 2012). Le parallèle peut être fait dans le contexte de la cellule végétale, où les concentrations en ADP (et AMP) cytosoliques continueraient de s'effondrer lors d'un stress prolongé. Il en résulterait une activation forte de SnRK1. La recherche d'une corrélation entre les concentrations en adénylates intracellulaires et les concentrations que nous avons déterminées comme capables d'inhiber significativement les complexes SnRK1 est un défi essentiel dans ce contexte. En effet, le  $K_m$  apparent de la kinase purifiée avoisine les 200 $\mu$ M et il est probable que les concentrations cytosoliques d'ATP oscillent autour de cet ordre de grandeur. Ainsi, cet effet substrat pourrait s'ajouter à l'effet inhibiteur de l'AMP et de l'ADP de façon très significative. Suite aux nombreux essais infructueux menés au laboratoire, il semble que seul un équipement comparable à celui utilisé par le groupe de M. Stitt dans les années 1980 sera à même d'apporter la qualité et la précision nécessaires à ces mesures.



## Résultats I – Régulation métabolique des complexes AtSnRK1

Enfin, l'approche pharmacologique menée sur protoplastes d'*Arabidopsis* et en particulier l'utilisation du BA nous a fourni des résultats très encourageants. Elle nécessite cependant quelques expériences complémentaires. En effet, bien que nous ayons vérifié que l'acide bongkreikic n'avait pas d'effet direct sur l'activité de la protéine recombinante GST-SnRK1 $\alpha$ 1, il sera nécessaire d'évaluer l'impact de telles drogues sur la physiologie des protoplastes traités, par exemple par la mesure de l'activité photosynthétique au cours du traitement. De même, l'effet du citrate observé sur ces mêmes préparations de protoplastes est extrêmement intéressant. Toutefois, nous n'avons pas d'information concernant les concentrations intracellulaires atteintes lorsque les protoplastes sont incubés dans un milieu contenant 5mM de citrate. L'utilisation de citrate radiomarqué ( $^{14}\text{C}$ -citrate) pourrait apporter des éléments de réponse sur ce point.



# Résultats II

Les kinases amont SnAK1 et 2,  
acteurs clés de la voie de  
signalisation SnAK/SnRK1

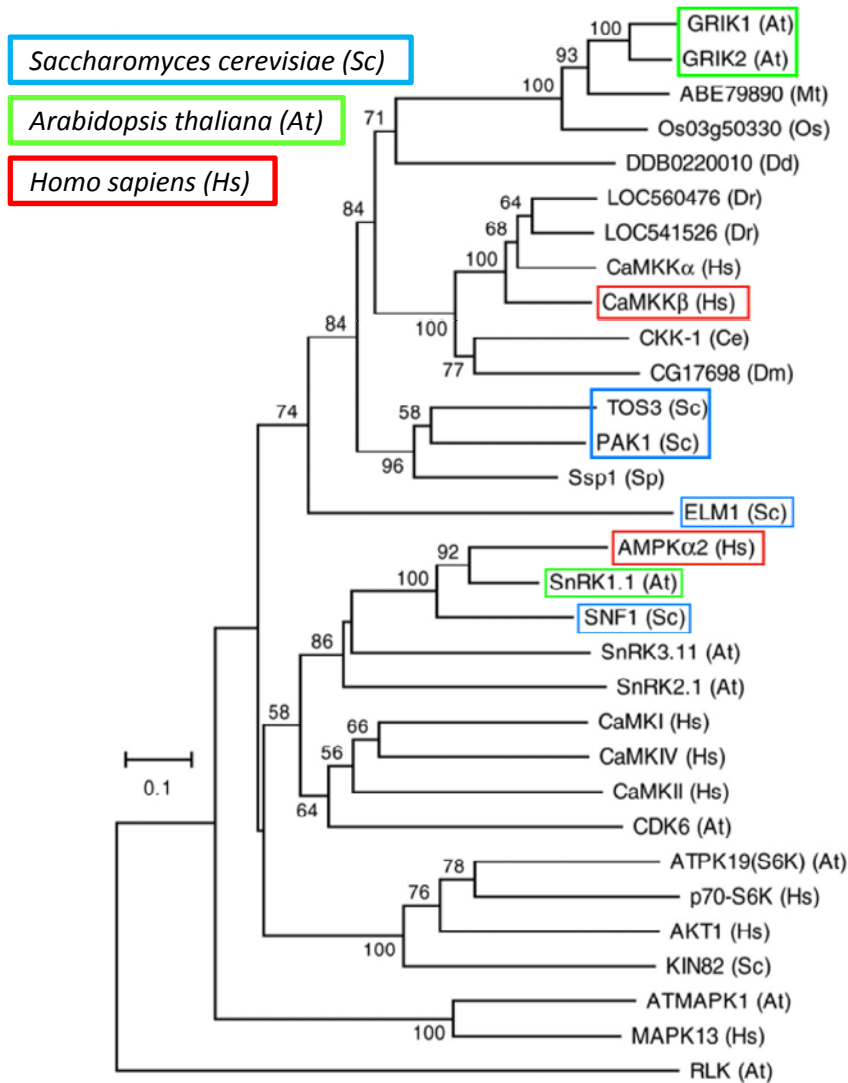


Figure 48. Les kinases SNF1 de levure, AMPK de mammifères, SnRK1 de plantes et leurs kinases amont sont phylogénétiquement liées (D'après Shen & Hanley-Bawdoin, 2006). GRIK1 (geminivirus rep Interacting protein Kinase 1) et GRIK2 correspondent respectivement aux kinases AtSnAK2 et 1.



### 3. LES KINASES SNAK1 ET 2, ACTEURS CLES DE LA VOIE DE SIGNALISATION SNAK/SNRK1

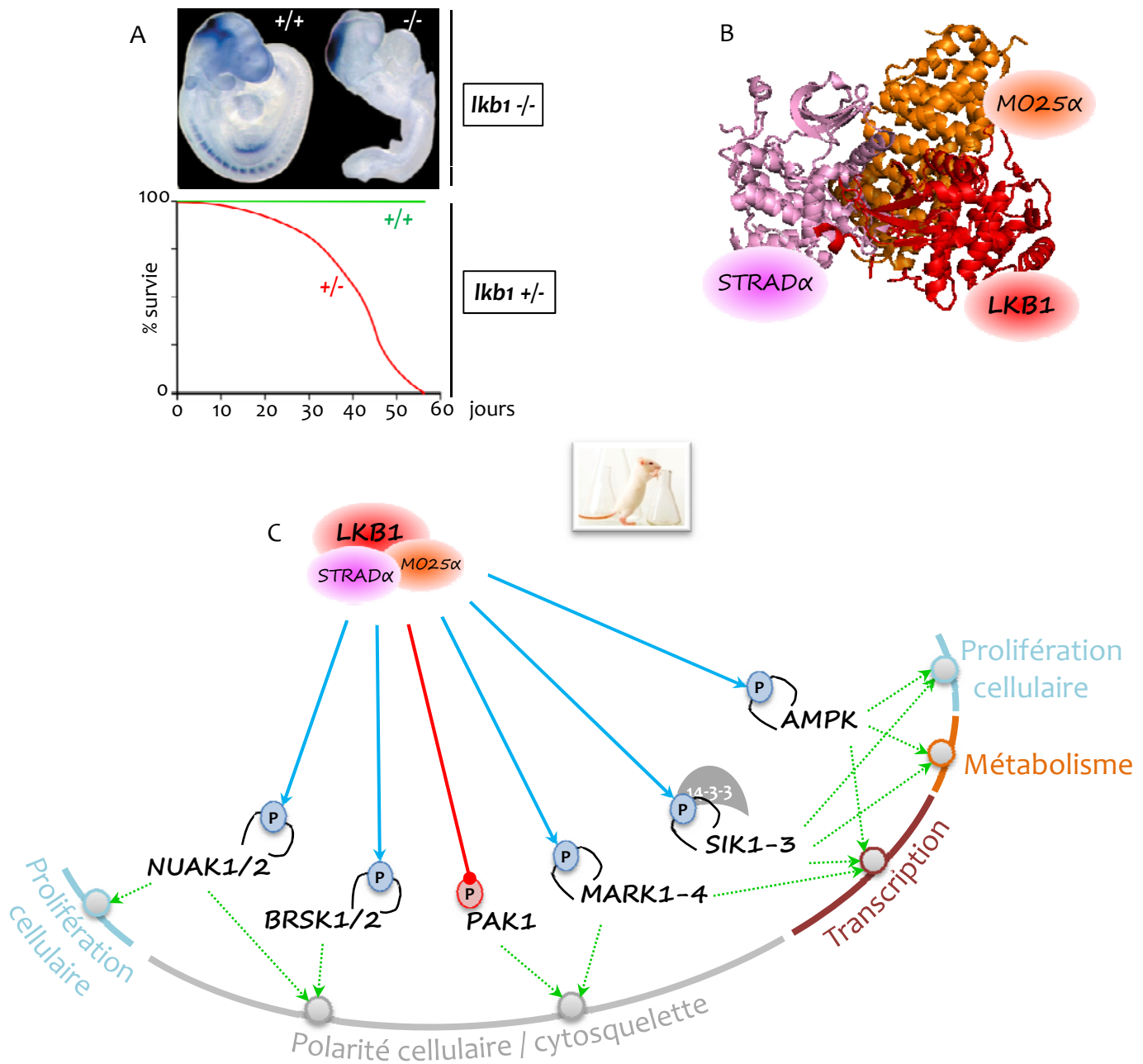
#### 3.1. Introduction

Plusieurs kinases activatrices de la famille SNF1/AMPK/SnRK1 ont été mises en évidence ces dernières années. Les premiers éléments de cette avancée importante dans l'étude de cette voie de signalisation ont été apportés chez la levure, lors de cribles génétiques à grande échelle ayant conduit à l'identification de trois kinases, ELM1, SAK1 et TOS3, toutes capables d'activer les complexes SNF1 (Sutherland *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2003; Nath *et al.*, 2003). A ce jour, deux kinases amont de l'AMPK sont clairement caractérisées chez l'animal (LKB1 et CaMKK $\beta$ ) et deux chez *A. thaliana* (AtSnAK1/GRIK2 et AtSnAK2/GRIK1). Il est intéressant de remarquer que les trois kinases de levure, les deux d'*A. thaliana* et la CaMKK $\beta$  sont phylogénétiquement proches les unes des autres (Figure 48).

#### LKB1, kinase activatrice de l'AMPK

##### Implication de la protéine LKB1 dans des cancers chez l'homme

L'identification de la kinase LKB1 (« Liver Kinase B1 ») remonte à 1998 lorsque deux équipes ont associé cette sérine/thréonine kinase au syndrome de Peutz-Jegher (PJS) (Hemminki *et al.*, 1998; Jenne *et al.*, 1998). Cette maladie se caractérise par des excroissances intestinales appelées polypes, localisées principalement dans l'intestin grêle, conduisant à des troubles gastriques et à des douleurs abdominales. Les cancers couramment associés à ce syndrome sont d'origine gastro-intestinale (intestin grêle, colon, pancréas) bien que des tumeurs puissent également se développer au niveau des ovaires, de l'utérus, des testicules, des poumons et de l'œsophage. Parmi les causes du PJS figurent des mutations somatiques. Bien que la fréquence de mutations du gène *LKB1* associées aux carcinomes pancréatiques et de la vésicule biliaire ne soit pas élevée (4-6%), elle augmente considérablement dans le cas des cancers du poumon (au-delà de 30%) et du col de l'utérus (20%). De façon intéressante, les cellules HeLa (cellules isolées à partir de tumeurs cervicales de la patiente Henrietta Lacks, décédée en 1951), utilisées comme lignée cellulaire modèle en biologie humaine, ne produisent pas de protéine LKB1. En effet, outre la mutation homozygote du gène, cette lignée cellulaire présente une hyperméthylation du promoteur de *LKB1*. C'est également le cas des cellules cancéreuses de 45% des cancers du sein papillaires (Shorning & Clarke 2011). Chez la souris, les mutants homozygotes *lkb1*<sup>-/-</sup> sont embryolétaux (Ylikorkala *et al.*, 2001) mais les mutants hétérozygotes *lkb1*<sup>+/-</sup> survivent, bien que sujets à



**Figure 49. Le complexe LKB1/STRAD $\alpha$ /MO25 $\alpha$  régule de grandes fonctions cellulaires par l'intermédiaire de kinases apparentées à l'AMPK. (A)** Phénotype de souris déficientes en LKB1. Les embryons homozygotes (-/-) pour la mutation ne survivent pas (D'après Ylikorkala *et al.*, 2001); les souris hétérozygotes (+/-) présentent les symptômes de la maladie de Peutz-Jegher et survivent en moyenne seulement 43 jours (D'après Bardeesy *et al.*, 2002). **(B)** Structure du complexe LKB1-STRAD $\alpha$ -MO25 $\alpha$  (D'après Zeqiraj *et al.*, 2009; PDB 2WTK). **(C)** Kinases AMPK-related (ARK) phosphorylées par le complexe LKB1 et grandes fonctions cellulaires affectées. La boucle noire représente la boucle d'activation/T-loop. Par l'intermédiaire des protéines NUAK (SNF1-like kinase), LKB1 joue un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1-S (mécanisme impliquant le facteur de transcription p53 et l'inhibiteur du cycle cellulaire p21<sup>CIP1</sup>) ou encore dans l'adhésion cellulaire (Hou *et al.* 2011; Zagórska *et al.* 2010). Un rôle dans le réarrangement du cytosquelette est renforcé par l'activation des protéines BRSK (brain-specific kinase) et MARK (MAP/microtubule affinity regulating kinase) et l'inhibition de PAK1 (p21-activated kinase 1). Les MARK sont très étudiées chez l'homme pour leur rôle dans la dynamique des microtubules et l'établissement de la polarité cellulaire (Hayashi *et al.* 2012).

AMPK, AMP-activated kinase ; SIK, salt-inducible kinase

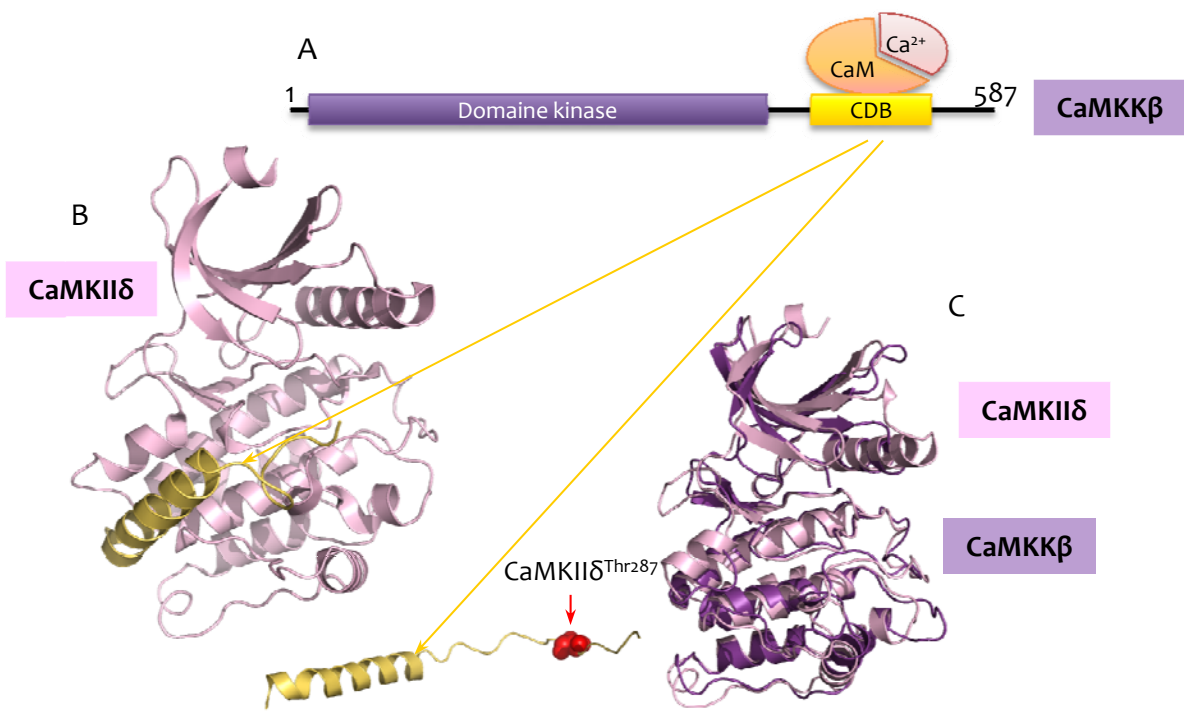
de sévères polyposes intestinales, *in fine* mortelles après une moyenne de 43 semaines (Bardeesy et al., 2002) (Figure 49A).

### Le complexe LKB1/STRAD $\alpha$ /MO25 $\alpha$

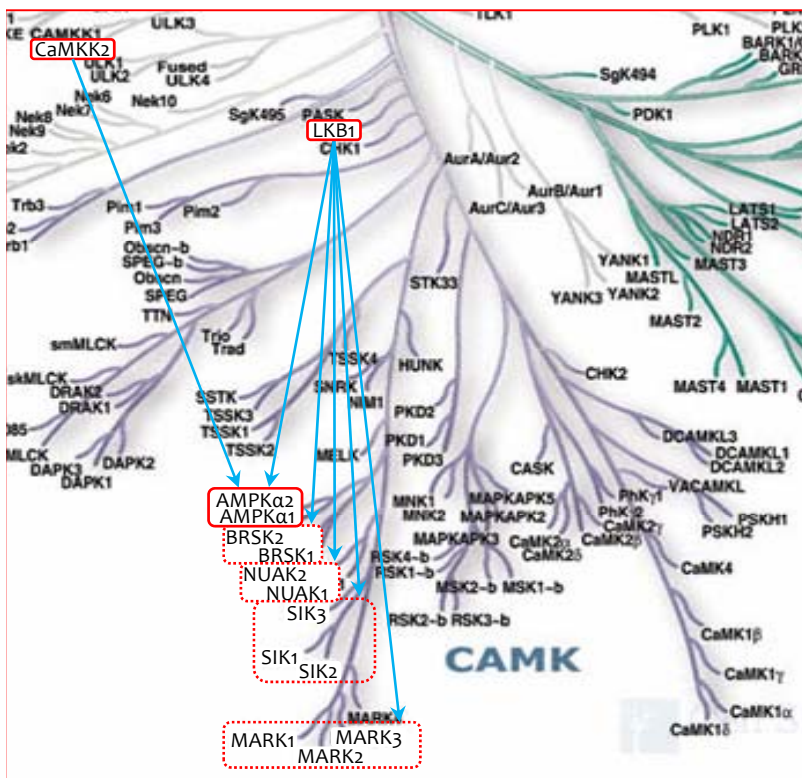
La kinase LKB1 n'active que faiblement l'AMPK sous sa forme monomérique et nécessite la présence de deux autres protéines pour former le complexe cytosolique pleinement actif LKB1/STRAD $\alpha$ /MO25 $\alpha$  (Boudeau et al., 2003; Hawley et al., 2003; Boudeau et al., 2004) (Figure 49B). Les auteurs soulignent également un mécanisme atypique d'activation de cette kinase puisque la phosphorylation de la Thr212 située sur la T-loop de LKB1 n'est pas nécessaire pour que la kinase soit fonctionnelle. STRAD $\alpha$  (« Ste-20-Related ADaptor  $\alpha$  ») est une pseudokinase ciblant LKB1 comme pseudosubstrat. MO25 $\alpha$  (« MOuse protein 25 $\alpha$  »), capable d'interagir à la fois avec LKB1 et STRAD $\alpha$ , permet de stabiliser le complexe au travers d'un mécanisme d'activation dit allostérique puisque n'incluant pas la phosphorylation de la T-loop (Boudeau et al., 2004; Zeqiraj et al., 2009). Le fait que cette phosphorylation sur la T-loop, pourtant considérée classiquement comme essentielle à l'activation des protéines kinases, soit ici accessoire est justifié dans la littérature par le fait que LKB1 est en début de chaîne de transmission des signaux perçus par la cellule et qu'à ce titre, un mécanisme d'activation ne requérant pas de kinase amont paraît justifié en terme évolutif. Dans ce contexte c'est MO25 $\alpha$  qui stabilise une conformation active (induite par la fixation de STRAD $\alpha$ ) de la T-loop de LKB1 (Zeqiraj et al., 2009; Sebbagh et al., 2011). En accord avec les dysfonctionnements métaboliques énumérés dans le paragraphe précédent, une étude a montré qu'une douzaine de mutations ponctuelles de la kinase LKB1 empêchant l'interaction avec STRAD $\alpha$  et MO25 $\alpha$  étaient associées à des cancers chez l'homme (Boudeau et al., 2004).

### LKB1 et la régulation de nombreuses fonctions cellulaires

La démonstration par plusieurs équipes que LKB1 est une AMPKK a permis de confirmer le lien soupçonné entre le métabolisme énergétique et la croissance tumorale, et de ce fait de décrypter le rôle de suppresseur de tumeurs de LKB1 (Hawley et al., 2003; Woods et al., 2003). Cependant, le contrôle d'autres grandes fonctions cellulaires lui est attribué. Ces fonctions recouvrent la prolifération, la survie cellulaire, la polarité et l'adhésion cellulaire (Shorning & Clarke 2011). Lizcano et collègues (2004) ont ainsi identifié 13 kinases de la sous-famille ARK (« AMPK-Related Kinase ») phosphorylées par LKB1. La figure 49C propose une vision générale des aspects cellulaires régulés par LKB1 au travers de ses cibles.



**Figure 50. Mécanisme d'activation de la CaMKKβ.** (A) Schéma de la protéine CaMKKβ et interaction avec la calmoduline (CaM) et le calcium. (B) Autoinhibition de la CaMKIIδ par le domaine CDB. Le domaine C-terminal, en jaune, est replié, la partie non structurée après le domaine de liaison de la calmoduline bloquant l'accès du substrat au sillon catalytique. (PDB 2VN9). (C) Superposition des structures de la CaMKIIδ (rose, PDB 2WEL) et de la CaMKKβ (violet, PDB 2VZ2). Le domaine protéique comprenant les 140 acides aminés à l'extrémité C-terminale (C-ter) (et donc le domaine de fixation de la calmoduline) n'ayant pas été cristallisé, la structure de cette kinase a été superposée à la structure disponible de la CaMKIIδ possédant également un domaine de ce type. La fixation de la calmoduline entraîne le dépliement de l'hélice α présente en C-ter, libérant totalement le sillon catalytique et l'accès au substrat de la kinase. Ces protéines sont capables de s'auto-phosphoryler *via* un mécanisme bimoléculaire sur la portion dépliée où se trouve une thréonine (Thr287). Cet évènement stabilise le module Ca<sup>2+</sup>/CaM/kinase dans un état pleinement actif.  
CDB, CaM-binding domain



**Figure 51. Arbre phylogénétique des Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinases (CaMK) et relation entre LKB1 (liver kinase B1), CaMKKβ (CaMK kinase) et les AMPK-related kinases (ARK)** (D'après Manning *et al.*, 2002). Les deux isoformes AMPKα1 et α2 ainsi que les kinases activatrices LKB1 et CaMKK2 (ou CaMKKβ) sont encadrées en rouge. Les cibles spécifiques de LKB1 sont encadrées en pointillés rouges. Les flèches bleues reflètent une activation par phosphorylation directe de la boucle d'activation des kinases cibles.  
AMPK, AMP-activated kinase; BRSK, brain-specific kinases; MARK, microtubule affinity-regulating kinases; NUAK, SNF1-like kinase; SIK, salt-inducible kinase

### Régulation de l'AMPK par le calcium via sa kinase activatrice CaMKK $\beta$

CaMKK ( $\alpha$  et  $\beta$ ), la seconde AMPKK, a été caractérisée dans trois études parues en 2005, montrant que l'AMPK est régulée par le calcium et mettant en évidence dans des cellules MEF *lkb1<sup>-/-</sup>* une activité AMPK basale pouvant être inhibée par déphosphorylation et par l'ajout de STO-609, l'inhibiteur spécifique des CaMKK (Hawley *et al.*, 2005; Woods *et al.*, 2005; Hurley *et al.*, 2005). Les deux kinases CaMKK $\alpha$  et  $\beta$  appartiennent à la famille des « calcium/calmoduline ( $\text{Ca}^{2+}$ /CaM)-Activated protein Kinase Kinases » et avaient initialement été identifiées comme kinases amont des CaMKI et CaMKIV (Anderson *et al.*, 1998). Bien que la CaMKK $\alpha$  soit capable d'activer l'AMPK, son efficacité est bien inférieure à celle de la CaMKK $\beta$ .

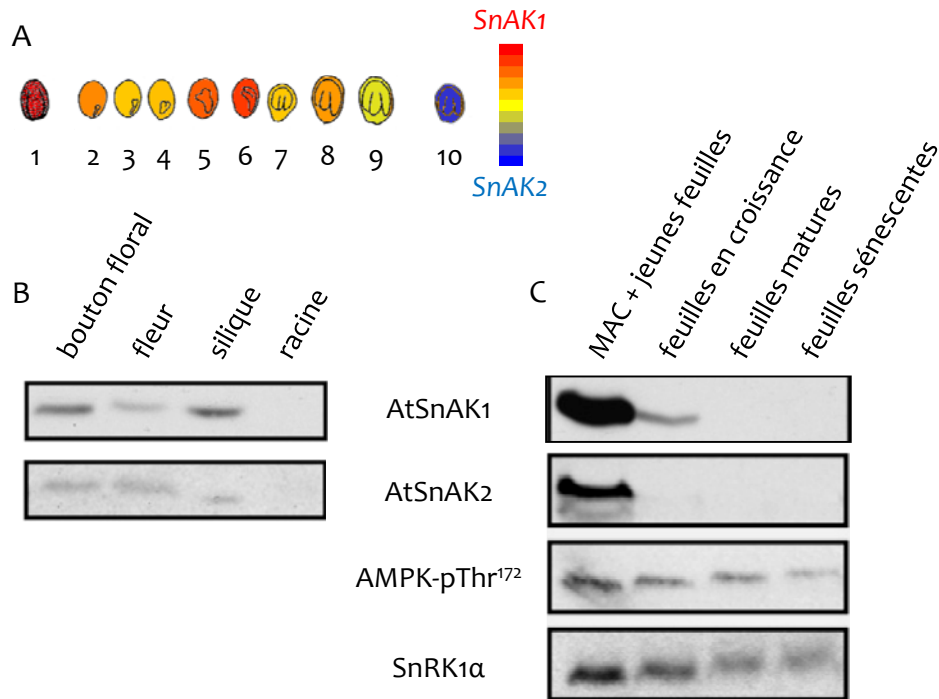
L'activité des CaMK est totalement dépendante de l'association avec la calmoduline. Cette dernière, de par sa capacité à lier le calcium, fait de cette famille de kinases des senseurs directs du « burst calcique » intervenant lors d'un stress cellulaire (Figure 50A). Le mécanisme d'auto-inactivation de la CaMKK $\beta$  et de stabilisation du module  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM/CaMKK $\beta$  est schématisé dans la figure 50B (Rellos *et al.*, 2010).

Les kinases CaMKK $\beta$  et LKB1 ayant toutes deux pour cible l'AMPK, la question s'est posée de savoir si les autres cibles de LKB1 membres de la famille des ARK (SIK1-3, NUAK1/2 et MARK1-3) étaient également des cibles de la CaMKK $\beta$  (Figure 51). Ainsi l'activité de ces kinases a été recherchée dans des cellules HeLa, *i.e.* n'exprimant pas LKB1. Les résultats de ces travaux indiquent que ces membres proches de l'AMPK ne sont pas des substrats de la CaMKK $\beta$  (Fogarty *et al.*, 2010). Il en va de même pour les kinases BRSK1 et 2 qui ne sont pas activées *in vitro* par la CaMKK $\beta$ .

### Complémentarité LKB1-CaMKK $\beta$

Au contraire de LKB1 dont l'expression est ubiquitaire, la CaMKK $\beta$  n'est présente que dans les tissus nerveux, les lymphocytes T et les cellules endothéliales (Hardie, 2007). Ce profil en fait une kinase importante dans l'activation de l'AMPK au niveau des neurones, cette dernière étant de plus activée de façon dépendante de la CaMKK $\beta$  par une dépolarisation membranaire des neurones (Hawley *et al.*, 2005). Cette kinase serait à l'origine d'une réponse rapide à l'entrée brutale de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule, présageant une demande en ATP massive (Hardie, 2007). A *contrario* il semble que seule LKB1 permette l'activation à long terme de l'AMPK et la mise en place de ses effets profonds sur le métabolisme en réponse à une perturbation de l'homéostasie énergétique. Une étude menée en 2009 sur des larves de nématode au stade dauer (*i.e.* état larvaire, s'apparentant à l'hibernation, atteint lorsque les conditions environnementales sont





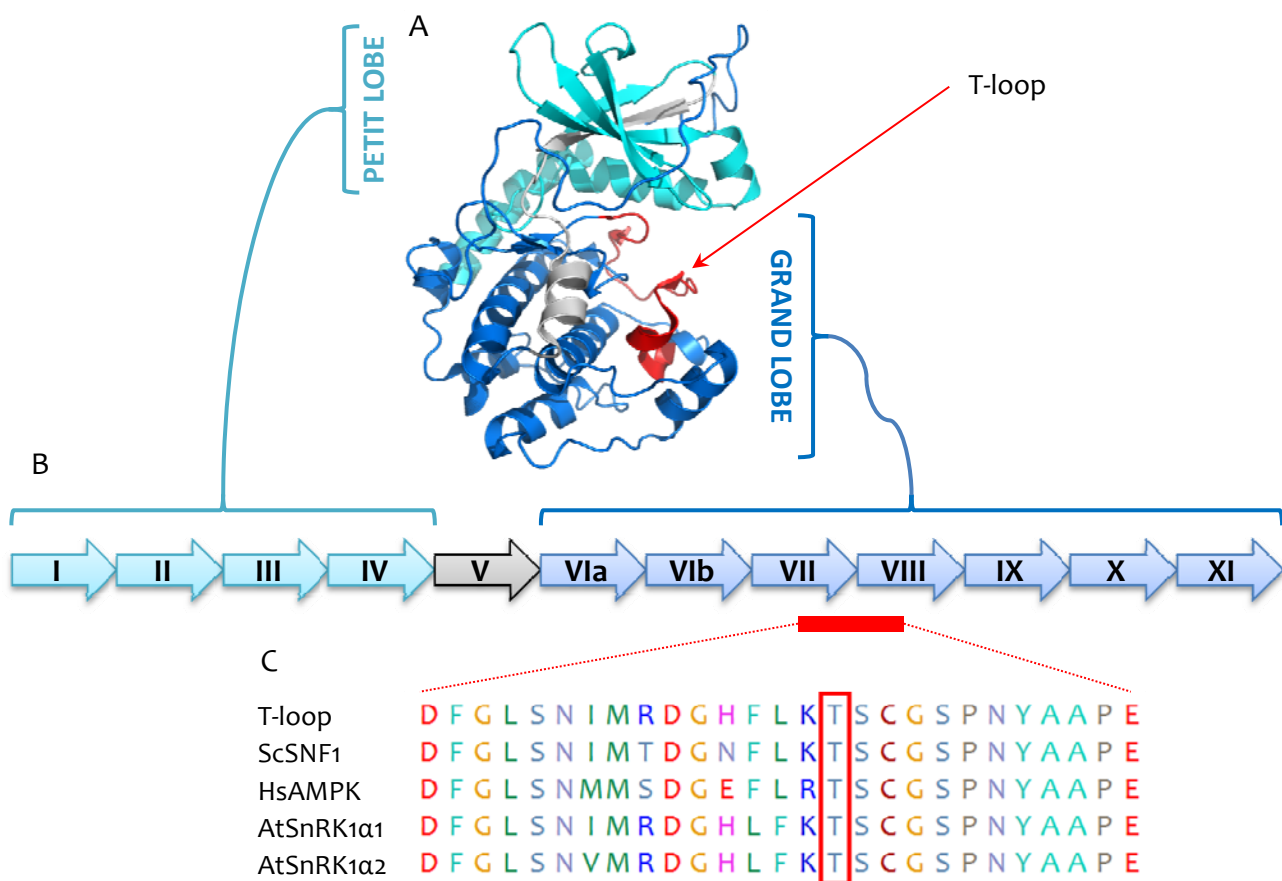
**Figure 52. Données d'expression des gènes *AtSnAK1* et *AtSnAK2* et détection des protéines correspondantes au cours du développement d'*A. thaliana*.** (A) Comparaison des profils d'expression des gènes *AtSnAK1* et *AtSnAK2* dans le grain de pollen (1), au cours du développement de l'embryon (2-9) et dans la graine sèche (10). (Puces Affymétrie, BAR eFP Browser). (B) Western blot réalisé avec des anticorps dirigés contre les protéines *AtSnAK1* et *AtSnAK2* dans différents organes d'*Arabidopsis*. (C) Western blots réalisés avec des anticorps dirigés contre les protéines *AtSnAK1* et *AtSnAK2*, contre le site de phosphorylation Thr172 de l'AMPK (croisant avec le site de Thr175 de SnRK1, AMPK-pThr<sup>172</sup>) et contre la protéine SnRK1α (D'après Shen & Hanley-Bowdoin, 2006 et Shen *et al.*, 2009).

défavorables) montre un rôle essentiel de la voie LKB1/AMPK dans la survie à long terme (Narbonne & Roy, 2009). Ainsi des larves mutantes *aak-2<sup>-/-</sup>* (gène codant l'AMPK $\alpha$ 2) ne survivent pas à long terme et la mutation du gène *par-4* codant LKB1 chez *C. elegans* mime ce phénotype. Les auteurs démontrent dans ces travaux que la voie LKB1/AMPK chez le modèle nématode est indispensable pour une consommation des lipides mesurée et régulée, au cours de l'hibernation ou de jeûnes de longue durée. Cette étude a impliqué pour la première fois la voie LKB1/AMPK dans la longévité cellulaire.

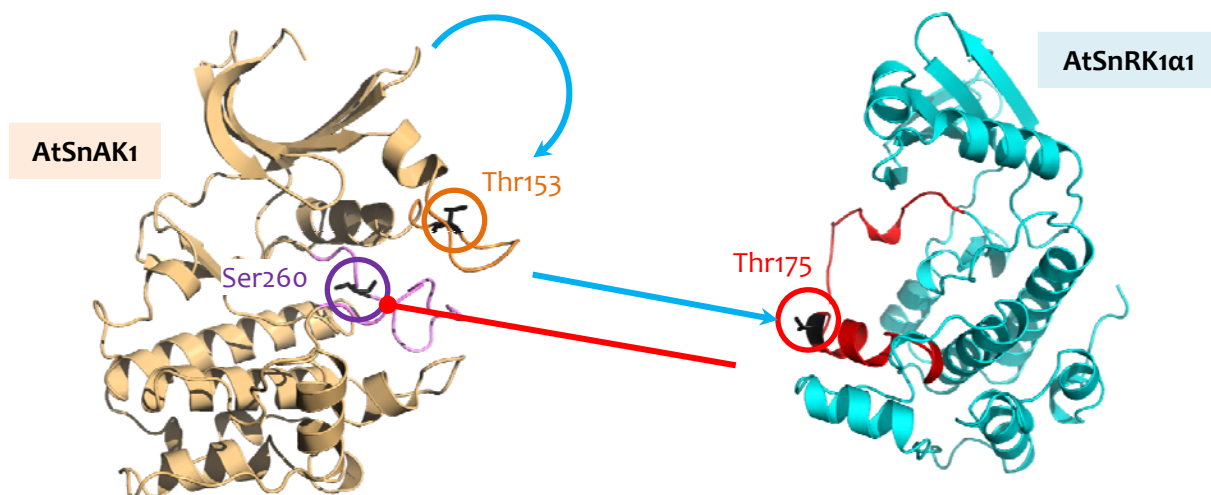
### Les kinases activatrices de SnRK1 chez *A. thaliana*

Après la découverte des kinases amont de levure et animales, deux équipes ont rapidement établi le rapprochement, par comparaison de séquences, avec plusieurs kinases végétales (Figure 48). Deux protéines candidates sont ressorties de ces analyses, les kinases AtSnAK1/GRIK2 et AtSnAK2/GRIK1 (« *A. thaliana* SnRK1-Activating Kinases1/2 » / « Geminivirus Rep-Interacting Kinase 2/1 ») (Shen & Hanley-Bowdoin, 2006; Hey *et al.*, 2007). Ces protéines avaient initialement été identifiées comme capables d'interagir avec la protéine Rep du Gémiovirus (Kong & Hanley-Bowdoin, 2002), protéine essentielle à la réplication de l'ADN viral dans la cellule végétale hôte (Elmer *et al.*, 1988). Ces deux kinases, dont seules les dénominations SnAK1 et SnAK2 seront utilisées lors de cette thèse, complètent le triple mutant de levure *elm1 sak1 tos3* en restaurant la capacité de cet organisme à pousser sur une source alternative de carbone (Hey *et al.*, 2007) (cf. Introduction 1.7).

Les données des puces Affymetrix nous renseignent sur les profils d'expression des gènes SnAK1 et SnAK2. Globalement, SnAK1 est 5 à 7 fois plus exprimé que SnAK2 dans l'ensemble de la plante. Les ARNm des deux gènes, bien que détectés tout au long du développement d'*Arabidopsis*, sont fortement accumulés pendant les stades précoces. En effet, AtSnAK1 est spécifiquement exprimé dans le grain de pollen alors qu'AtSnAK2 l'est dans la graine et tous deux sont présents au cours du développement embryonnaire (Figure 52A). Si l'on s'intéresse aux produits de ces gènes, il est très intéressant de remarquer que cette expression concentrée dans les tissus reproducteurs se confirme. Ainsi les deux protéines sont détectées par western-blot dans les boutons floraux, les fleurs et les siliques avec un avantage certain une fois encore pour AtSnAK1 (Figure 52B) (Shen & Hanley-Bowdoin, 2006). Ces protéines ont également été détectées dans les très jeunes tissus de plantules (méristème apical caulinaire et premières feuilles) (AtSnAK1 et 2) et dans les feuilles en croissance (AtSnAK1) (Shen & Hanley-Bowdoin, 2006; Shen *et al.*, 2009). Cette même équipe a démontré que la protéine AtSnAK2 était présente en même



**Figure 53. Alignement des séquences des boucles d'activation (T-loop) des kinases de la famille SNF1/AMPK/SnRK1.** (A) Structure type d'une protéine kinase avec ses deux lobes et sa boucle d'activation située au niveau du sillon catalytique (Structure de la PKA, PDB 3KKV). (B) Schéma des 12 domaines d'une protéine kinase. (C) Alignement des domaines T-loop des kinases de la famille SNF1/AMPK/SnRK1 de la levure (Sc, *S. cerevisiae*), de l'homme (Hs, *H. sapiens*) et d'*A. thaliana* (At). La thréonine conservée et phosphorylée est encadrée en rouge.



**Figure 54. Jeux de phosphorylation entre AtSnAK1 et AtSnRK1.** Dans un premier temps, AtSnAK1 s'auto-phosphoryle sur son résidu Thr153, mécanisme bimoléculaire activant cette protéine. Dans un second temps, la kinase amont et AtSnRK1 se phosphorylent réciproquement, AtSnAK1 activant sa cible (P-Thr175) et AtSnRK1 rétro-inhibant sa kinase amont (P-Ser206). Les modèles ont été réalisés par P. Crozet au cours de sa thèse en collaboration avec S. Nessler, AtSnAK1 à partir de la structure de MEK1 (PDB 3E8N) et AtSnRK1α1 à partir de AMPK α2 (PDB 2H6D).



temps que AtSnRK1 $\alpha$ 1 au début du développement de la jeune plantule et que ceci pouvait être corrélé avec la phosphorylation activatrice de la Thr175 de AtSnRK1 $\alpha$ 1 (Figure 52C) (Shen *et al.*, 2009).

Les travaux menés en parallèle par l'équipe de L. Hanley-Bowdoin et au sein de notre laboratoire ont établi la relation étroite existant entre ces kinases amont et les sous-unités catalytiques des complexes SnRK1. Le premier élément liant les deux acteurs est l'activation par phosphorylation de la thréonine 175 d'AtSnRK1 $\alpha$ 1, située sur la boucle d'activation conservée chez les protéines kinases (Thr176 dans le cas d'AtSnRK1 $\alpha$ 2) (Figure 53) (Shen *et al.*, 2009; Crozet *et al.*, 2010). Cette activation est cohérente avec l'observation faite par ces auteurs qu'une protéine recombinante AtSnRK1 $\alpha$ 1 produite chez *E. coli* ne possède qu'une très faible activité basale si ce résidu n'est pas phosphorylé. La séquence complète de régulation des kinases végétales AtSnRK1 $\alpha$ 1/2 par AtSnAK1/2 s'avère être un mécanisme complexe (Crozet *et al.*, 2010). Dans un premier temps, AtSnAK1 s'auto-phosphoryle sur sa thréonine 153 (154 dans le cas de AtSnAK2), ce qui active la protéine. Par la suite, les deux kinases se phosphorylent l'une et l'autre. Tandis que la kinase amont active sa cible AtSnRK1 $\alpha$ 1/2 sur les résidus Thr175/176 comme décrit précédemment, cette dernière est capable de rétro-inhiber AtSnAK1 en ciblant le résidu Ser260 (ou Ser261 dans le cas de AtSnAK2) (Figure 54).

La relation entre ces deux kinases végétales, inédite chez les eucaryotes, peut être interprétée comme un mécanisme finement contrôlé de l'activation des complexes AtSnRK1.

### Objectifs et stratégies

Dans cette optique de compréhension de la régulation de la voie de signalisation SnAK/SnRK1, nous avons opté pour une approche biochimique des kinases activatrices SnAK1 et 2 en parallèle de l'étude des mutants perte-de-fonction correspondants. Dans un premier temps une approche *in vitro* nous a permis de simplifier notre modèle et de nous pencher sur l'étude d'une éventuelle régulation métabolique de ces kinases. En second lieu, les mutants d'insertion ADN-T se sont révélés un outil pertinent d'analyse de la fonction de ces protéines dans les stades précoces du développement d'*Arabidopsis*.

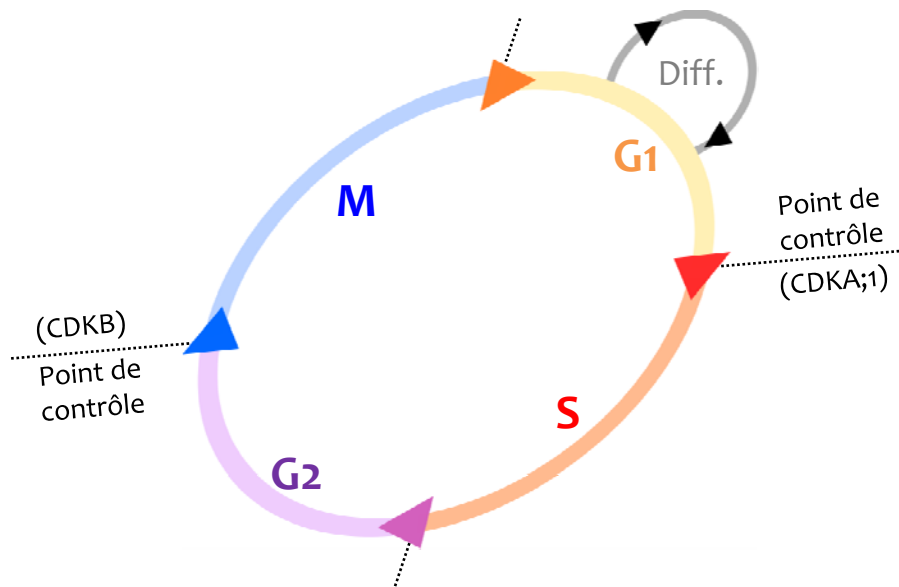
Pour des raisons de confidentialité, les résultats de cette partie seront rendus disponibles le 1er janvier 2014.

# Résultats III

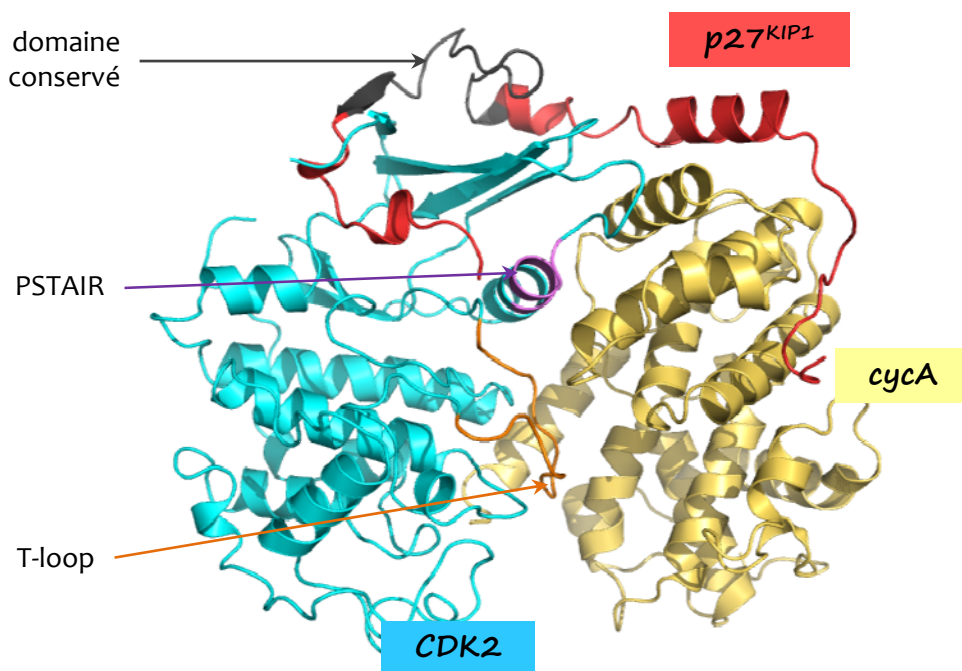
Un nouveau lien entre homéostasie  
énergétique et prolifération  
cellulaire chez les plantes

Manuscrit soumis à la revue « *The Plant Journal* » le 19 octobre 2012

(Annexe II, p. 134)



**Figure 70. Schématisation du cycle cellulaire chez les eucaryotes.** Le cycle se déroule en 4 phases: deux phases dites « Gap » (G1 et G2) séparant la phase de réplication de l'ADN nucléaire S et la phase de division mitotique M. Les « cyclin-dépendent kinase » (CDK) majeures d'*Arabidopsis* intervenant dans les deux points de contrôle sont indiquées. Diff., différenciation.



**Figure 71. Structure du complexe CDK2/cycA/p27<sup>KIP1</sup> de mammifères.** Les fragments suivants ont été cristallisés: CDK2, résidus 13 à 298 (Cyclin-Dependent Kinase, en cyan); cycA, résidus 175 à 432 (cycline, en jaune); p27<sup>KIP1</sup>, résidus 25 à 93 (p27<sup>KIP1</sup> « cyclin-dépendent kinase inhibitor », en rouge). La boucle d'activation (T-loop) de la CDK est en orange et son domaine d'interaction « PSTAIR » avec la cycline en violet. Le domaine conservé avec les KRP (« KIP-Related protein kinase ») est en noir (cf. figure IR3.3) (PDB 1JSU).

## 4. UN NOUVEAU LIEN ENTRE HOMEOSTASIE ENERGETIQUE ET PROLIFERATION CELLULAIRE CHEZ ARABIDOPSIS

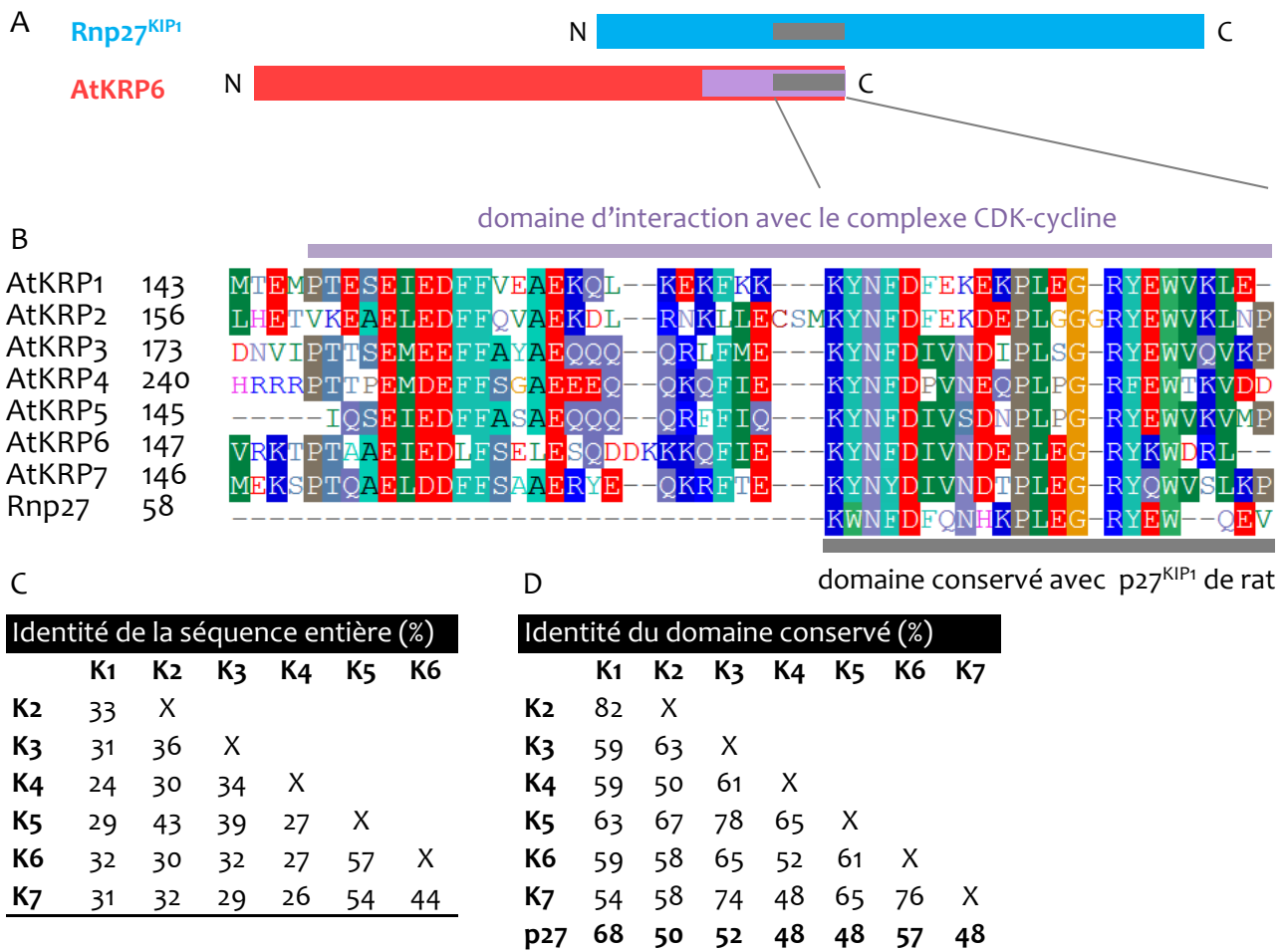
### 4.1. Introduction

Contrairement à son orthologue animale, peu de cibles directes de SnRK1 ont été caractérisées à ce jour (cf. figure 21). La fonction primaire de gardien de l'homéostasie énergétique semble bien conservée chez les plantes, mais par quelles voies traduit-elle cette fonction sur le métabolisme et la cellule ? De plus, cette fonction apparaissant dogmatique, il est intéressant de se demander si un tel régulateur, à l'image d'autres protéines telles que AKT ou TOR, pourrait s'en écarter et accomplir d'autres fonctions. Récemment, la mise en évidence d'une nouvelle cible de l'AMPK, l'inhibiteur de cycle cellulaire p27<sup>KIP1</sup>, a retenu notre attention. L'existence de la petite famille multigénique des KRP, orthologues de cette kinase chez *A. thaliana*, nous a amenés à rechercher si un tel lien entre métabolisme et cycle cellulaire existait chez les plantes.

#### Le cycle cellulaire chez les eucaryotes

Chez les eucaryotes, le cycle cellulaire se divise en deux étapes principales, la réplication ou synthèse de l'ADN durant la phase S et la répartition du matériel génétique répliqué en deux cellules filles lors de la mitose (ou phase M). Ces deux intervalles sont séparés par deux phases dites « gap », G1 précédant la phase S et G2 précédant la phase M. Lors de la phase G1, la cellule intègre les signaux favorables ou non à la division cellulaire (facteurs mitogènes ou anti-mitogènes). La phase G2 est une période de latence nécessaire à la vérification du matériel génétique néo-synthétisé ainsi qu'à la synthèse des protéines intervenant dans la suite du cycle (Figure 70) (Komaki & Sugimoto, 2012). Une « déviation » de ce cycle peut intervenir lorsque les cellules abandonnent la prolifération au profit de la différenciation. Cette étape peut s'accompagner d'une augmentation de la ploïdie par le phénomène d'endoréplication. L'augmentation stable du génome résultant d'une succession de phases S sans mitose, peut être associée à une croissance cellulaire (Komaki & Sugimoto, 2012). Chez les plantes, le phénomène de différenciation est réversible, on parle de totipotence des cellules végétales, celles-ci étant capables de réintégrer un cycle prolifératif.

Un premier point de contrôle intervient à la transition G1-S, n'autorisant la réplication de l'ADN que si les conditions endogènes et environnementales sont favorables. Un second intervient à la transition G2-M, ne permettant l'entrée en mitose que si les protéines nécessaires ont été synthétisées. Les mécanismes régulant la progression du cycle cellulaire impliquent trois groupes



**Figure 72. La famille AtKRP, orthologues fonctionnels de p27<sup>KIP1</sup> chez *A. thaliana*.** (A) Localisation de la séquence partagée entre p27<sup>KIP1</sup> de rat et les KRP (en gris). Le domaine d'interaction avec les complexes CDK-cycline est en violet. (B) Les protéines AtKRP1-7 sont les homologues de p27<sup>KIP1</sup> sur la base de l'homologie d'une partie du domaine d'interaction avec le complexe CDK-cycline. (C) Les 7 protéines AtKRP présentent une identité de séquence variant de 26 à 57% entre elles. (D) L'identité du domaine conservé avec Rnp27<sup>KIP1</sup> varie de 48 à 82% entre les AtKRP et de 48 à 68% entre les AtKRP et Rnp27<sup>KIP1</sup>. Rn, *Rattus norvegicus*.

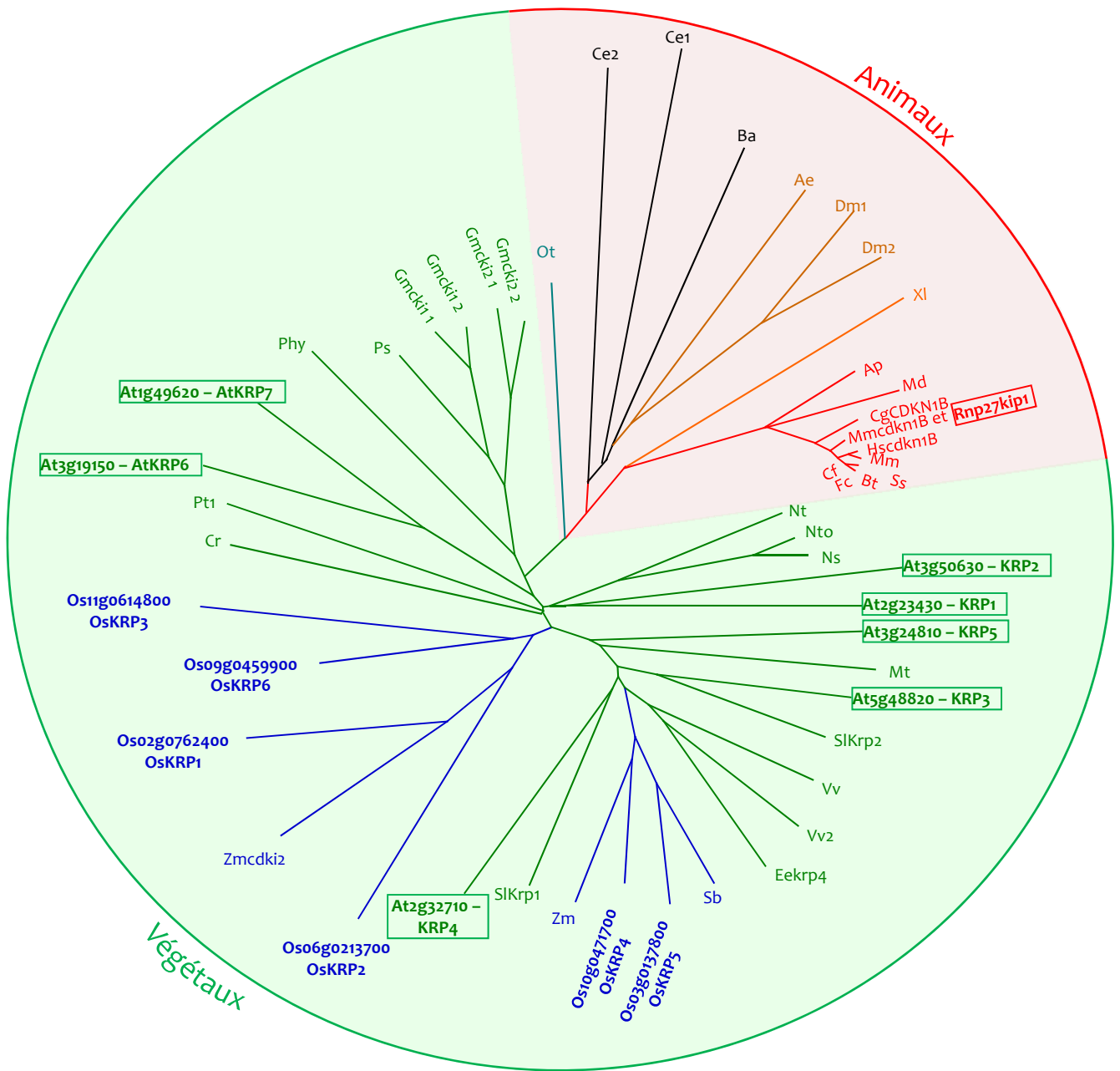
majeurs de protéines. Les « Cyclin-Dependent Kinases » (CDK) s'associent avec des cyclines (cyc) afin de réguler les deux transitions G1-S et G2-M. Ce module hétérodimérique CDK-cycline est très bien conservé chez les eucaryotes. Les derniers acteurs de ce module de contrôle sont les inhibiteurs du cycle cellulaire ou « CDK Inhibitors » (CKI). Dès 1996, Russo et collègues ont résolu la structure du complexe CDK2-cycA-p27<sup>KIP1</sup> (Figure 71) (Russo et al., 1996). Une des difficultés surmontées par cette équipe est inhérente à une particularité de cet inhibiteur. En effet, il s'agit d'une protéine dite intrinsèquement non conformée ou non-structurée (IDP, « Intrinsically Disordered Protein ». En ne produisant qu'un fragment recombinant de cette protéine (du résidu 25 au résidu 93) les auteurs ont réussi à montrer qu'il présentait un repliement partiel en hélice alpha au contact du complexe CDK2-cycA.

Chez *Arabidopsis*, ce sont principalement la CDKA;1 d'une part et les CDKB1 et 2 d'autre part qui régissent respectivement les transitions G1-S et G2-M. L'orchestration de ces acteurs est à l'origine d'un contrôle complexe et fin du cycle cellulaire (De Clercq & Inzé, 2006; Van Leene et al., 2007, 2011; Komaki & Sugimoto, 2012). Une particularité des végétaux est de compter un grand nombre de membres de chacune de ces trois familles. Chez *Arabidopsis*, plusieurs familles de CDK (A-G) sont décrites mais seule l'unique CDKA (CDKA;1) s'apparente aux CDK humaines et complète le mutant de levure thermosensible *cdc2/cdc28* (De Clercq & Inzé, 2006). La CDKA;1 est la kinase majeure régulant la transition G1-S tandis que les CDKB1 et B2 contrôlent le passage de la phase G2 à la mitose (Figure 70) (Komaki & Sugimoto, 2012). Ces kinases ne sont actives que si leur T-loop est phosphorylée (notamment par les CDKD et F chez *A. thaliana*) et associées à une cycline par l'intermédiaire du domaine PSTAI/LR dans le cas des CDK de type A. Ces deux événements permettent le positionnement correct de la boucle d'activation dans le sillon catalytique de la kinase et en conséquence son activation (Figure 71) (Dissmeyer et al., 2007; Takatsuka et al., 2009). Comme présenté précédemment, les CKI, qui ont principalement un effet inhibiteur sur les complexes CDK-cycline, ont également un rôle majeur dans la régulation du cycle cellulaire chez les végétaux (De Clercq & Inzé, 2006).

### Les inhibiteurs du cycle cellulaire

#### Chez les mammifères

Chez les mammifères, il existe deux familles de CKI, les INK4 (avec 4 membres) et les Cip/Kip (avec trois membres). Les INK4 sont connus pour leur capacité à entrer en compétition avec les cyclines D dans l'interaction avec CDK4 ou CDK6, résultant en l'inhibition de leur activité kinase (De Clercq & Inzé, 2006). La seconde famille d'inhibiteurs comprend p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> et p57<sup>KIP2</sup> qui partagent un domaine d'interaction avec les complexes CDK-cyclines sur leur partie N-terminale. La surexpression de p21<sup>CIP1</sup> conduit à l'arrêt du cycle en phase G1 (Harper et al., 1995). p21<sup>CIP1</sup> et



**Figure 73. Arbre phylogénétique de la famille d'inhibiteurs du cycle cellulaire KRP et de leurs homologues fonctionnels chez les végétaux et les animaux.** Les relations ont été analysées sur la base de la conservation des domaines d'interaction avec les complexes CDK-cycline (cf. figure IR3.3). Arbre réalisé avec le logiciel TreeView par le Dr Yves Henry.

At, *Arabidopsis thaliana*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Mm, *Mus musculus*; Os, *Oryza sativa*; Rn, *Rattus norvegicus*.

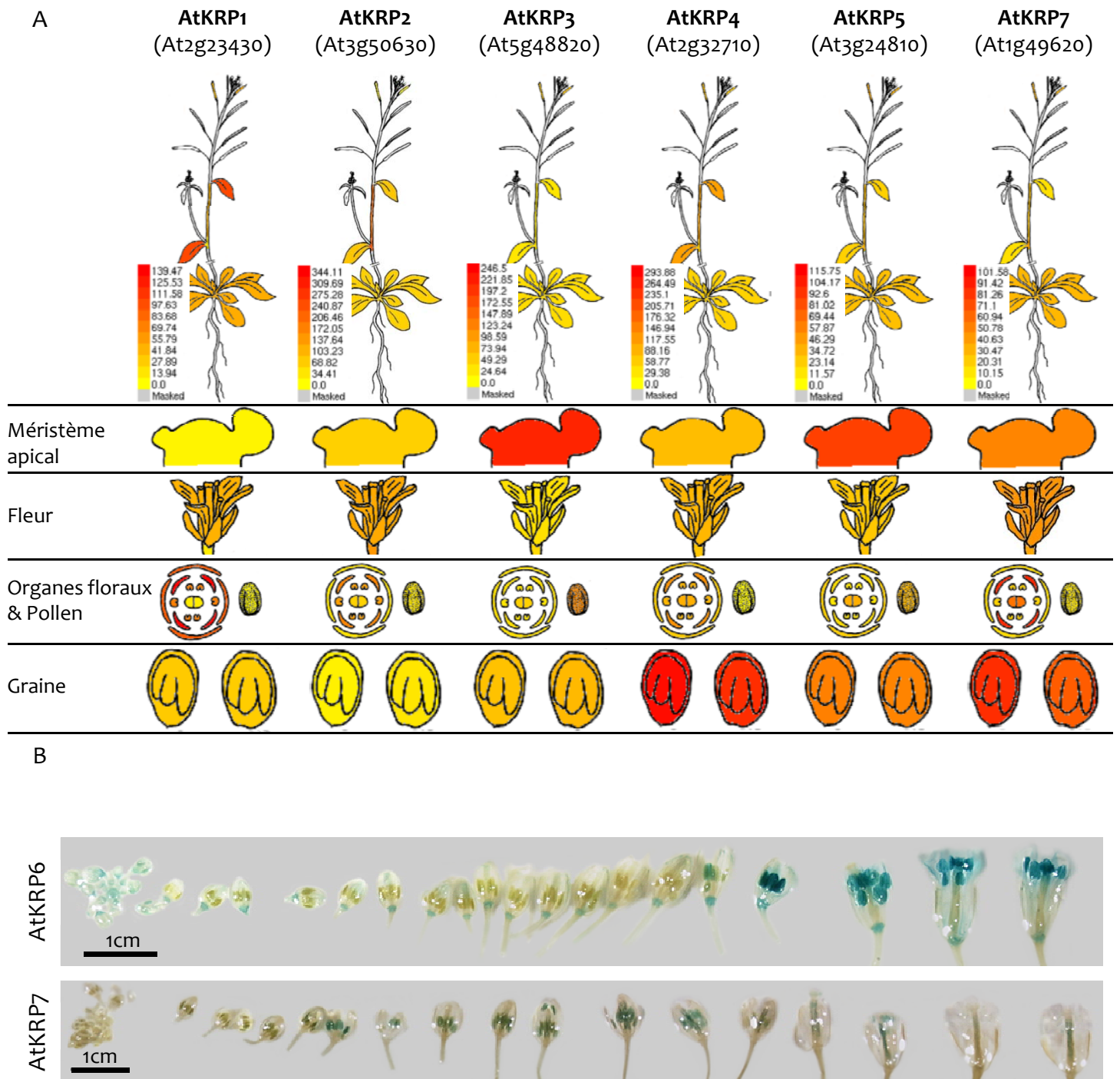


p27<sup>KIP1</sup> s'associent aux complexes CDK1-cycA et inhibent tous deux leur activité (Chibazakura *et al.*, 2004) (Figure 71). Ils sont également capables de s'associer aux complexes CDK2-cyclines (p21<sup>CIP1</sup> et p27<sup>KIP1</sup>) et CDK4-cycD (p27<sup>KIP1</sup>). Toutefois, il a été montré que ces CKI sont capables d'interagir avec des cyclines de type E dans un mécanisme favorable à la progression du cycle (Sherr & Roberts, 1999). p27<sup>KIP1</sup> favorise en outre l'association et l'import dans le noyau des complexes CDK4/6-cycD (Coqueret, 2003). De même, il a été montré que p21<sup>CIP1</sup> est présent en association avec des complexes CDK-cycline dans des cellules cyclantes, dénotant deux fonctions antagonistes, réintroduites et discutées plus loin dans ce chapitre (De Clercq & Inzé, 2006).

### Chez *Arabidopsis thaliana*

Chez la plante modèle, deux familles d'inhibiteurs sont connues. La famille SIM/SMR (« Siamese/Siamese-related », identifiée relativement récemment, avait été précédemment impliquée dans l'endoréplication (Walker *et al.*, 2000). Les 14 protéines, la protéine SIM et 13 SMR, ont par la suite clairement été décrites comme inhibitrices du cycle (Churchman *et al.*, 2006; Peres *et al.*, 2007). Cette famille intervient notamment dans la différenciation des trichomes (Van Leene *et al.*, 2011). La seconde famille tient son nom de l'homologie, bien que limitée, avec l'inhibiteur animal p27<sup>KIP1</sup> (« Kip-Related Proteins » 1 à 7, KRP1-7) (De Veylder *et al.*, 2001; Nakai *et al.*, 2006). L'homologie de séquence entre elles correspond au domaine d'interaction avec les complexes CDK-cyclines situé sur la partie N-terminale de p27<sup>KIP1</sup> et à l'extrémité C-terminale des KRP (Figure 72). Ce domaine est en outre essentiel à l'activité inhibitrice des CKI. C'est sur la base de ce domaine qu'a été réalisé l'arbre phylogénétique de la figure 73 présentant la parenté apparemment commune des CKI végétaux de cette famille. Nous pouvons également remarquer que sur cette base KRP6 et KRP7 sont deux inhibiteurs du cycle d'*Arabidopsis* très proches phylogénétiquement. Par ailleurs, il a été montré, cette fois sur la base d'alignements de séquences entières et par la réalisation d'un modèle évolutif des inhibiteurs végétaux (Torres Acosta *et al.*, 2011), que KRP1, KRP2, KRP6 et KRP7 forment un premier groupe capable d'interagir avec les CDC2a et les cyclines de type D, et que KRP3, KRP4 et KRP5 forment un second groupe, plus éloigné de p27<sup>KIP1</sup>, et n'interagissant qu'avec les cyclines de type D (Zhou *et al.*, 2002).

Les KRP montrent des profils d'expression en partie redondants notamment au niveau des feuilles (Figure 74A), ce qui explique certainement pourquoi les mutants d'insertion *krp2*, *krp3*, *krp6* ou *krp7* d'*A. thaliana* ne montrent pas d'altération phénotypique apparente. De même, les doubles mutants d'insertion *krp6/krp7* (ou des plantes modifiées par la méthode d'ARN interférant ciblant ces deux gènes) ne montrent pas de phénotype particulier. Enfin, même le triple mutant *krp3/krp6/krp7* se développe comme une plante sauvage (Millan, 2011). Cette absence de phénotype lorsque les deux gènes *KRP6* et *KRP7* sont affectés peut cependant



**Figure 74. Profils d'expression des gènes de la famille d'inhibiteurs du cycle cellulaire KRP chez *A. thaliana*.** (A) Profils d'expression des membres de la famille AtKRP. BAR - Arabidopsis EFP Browser (NB: AtKRP6 ne figure pas dans ces bases de données). (B) Profil de l'activité des séquences promotrices de KRP6 (1433pb en amont de l'ATG) et KRP7 (947pb) au cours du développement floral d'*Arabidopsis* (D'après Millan, 2011).

paraître surprenante puisque ces deux inhibiteurs, proches phylogénétiquement, présentent des profils d'expression différents au cours du développement floral. En effet, KRP6 est exprimé dans le réceptacle floral puis fortement dans les grains de pollen tandis que KRP7 est exprimé dans les anthères, puis les grains de pollen et enfin, les gamétophytes femelles (Figure 74B). Par contre, la surexpression des gènes de cette famille entraîne un phénotype très caractéristique. Les plantes surexprimant *AtKRP1*, *AtKRP2*, *AtKRP3*, *AtKRP4* ou *AtKRP6* ont des feuilles plus petites que les plantes sauvages et présentant une forte dentelure (Figure 75). L'inflorescence de ces plantes est dite « en grappe » et, de façon générale, la floraison a lieu de façon précoce (De Veylder *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2008). De plus, il a été montré chez le tabac que la surexpression de *NtKIS1a* augmente la taille des cellules du mésophylle et réduit la capacité des cellules de feuilles de rosette à la callogénèse (Jasinski *et al.*, 2002; Le Foll *et al.*, 2008).

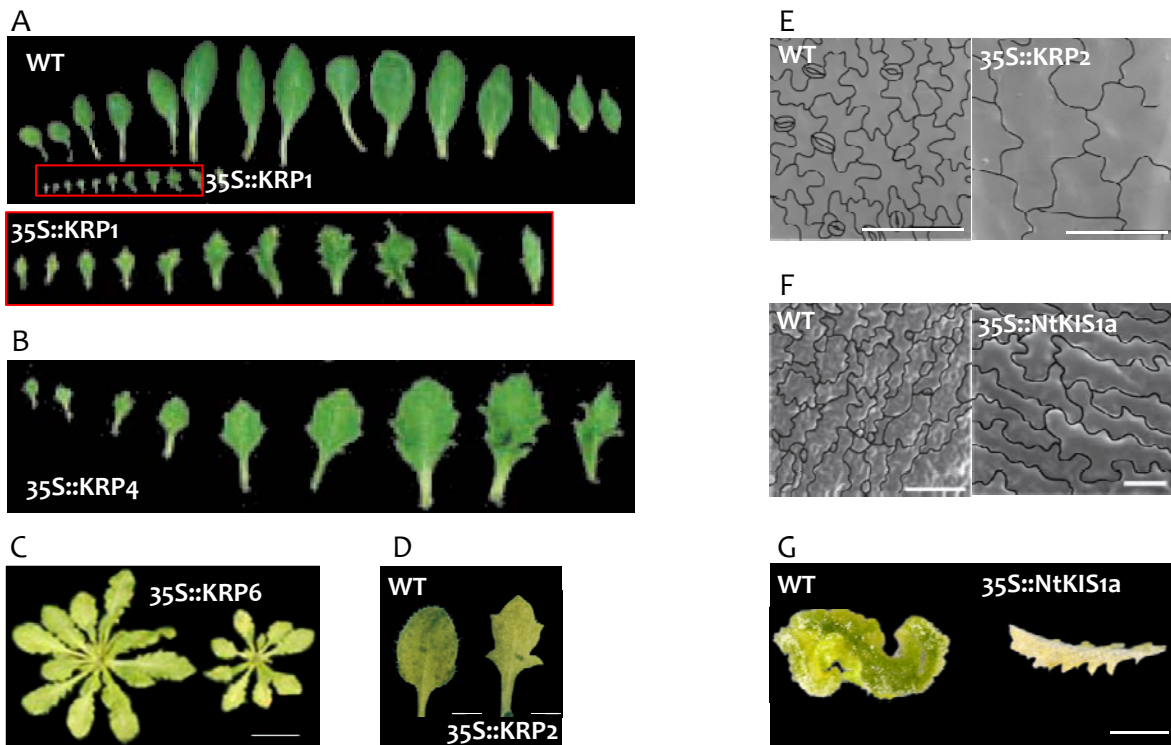
### Les KRP et le cycle cellulaire

#### Profils d'expression des KRP

Sur la base de leur profil d'expression tissulaire, De Clercq et Inzé (2006) ont classé les KRP en trois groupes, suggérant l'existence d'une ou plusieurs fonction(s) particulière(s) pour chacun. Le premier groupe comprend *KRP1* et *KRP2* dont l'expression semble cantonnée aux tissus en endoréplication et leur rôle pourrait être de promouvoir la polyploïdie. Le second groupe est constitué des gènes *KRP3*, *KRP6* et *KRP7* exprimés dans les cellules en endoréplication et cyclantes, indiquant un rôle important de ces protéines à la fois dans la prolifération cellulaire et dans l'endoréplication. Enfin, *KRP4* et *KRP5* ont une expression cantonnée au cycle mitotique et leur rôle pourrait donc s'y restreindre (Figure 76) (Ormenese *et al.*, 2004; Komaki & Sugimoto, 2012). D'autre part, des données d'expression obtenues à partir de suspensions cellulaires permettent de visualiser des différences notables d'expression de ces gènes au cours du cycle. Par exemple, *KRP2* et *KRP7* sont exprimés tout au long du cycle tandis que certains inhibiteurs ont des profils plus spécifiques. C'est le cas de *KRP1*, dont l'expression apparaît comme spécifique des transitions G1-S et G2-M ou de *KRP5*, spécifique de la phase S (Menges *et al.*, 2005). L'ensemble des données d'expression des gènes KRP suggère une distribution tissulaire différentielle de ces sept protéines (Figure 74), en fonction de l'état cyclant ou non des cellules, et amène l'hypothèse de rôles variés des inhibiteurs d'*Arabidopsis* dans la progression du cycle (Figure 76).

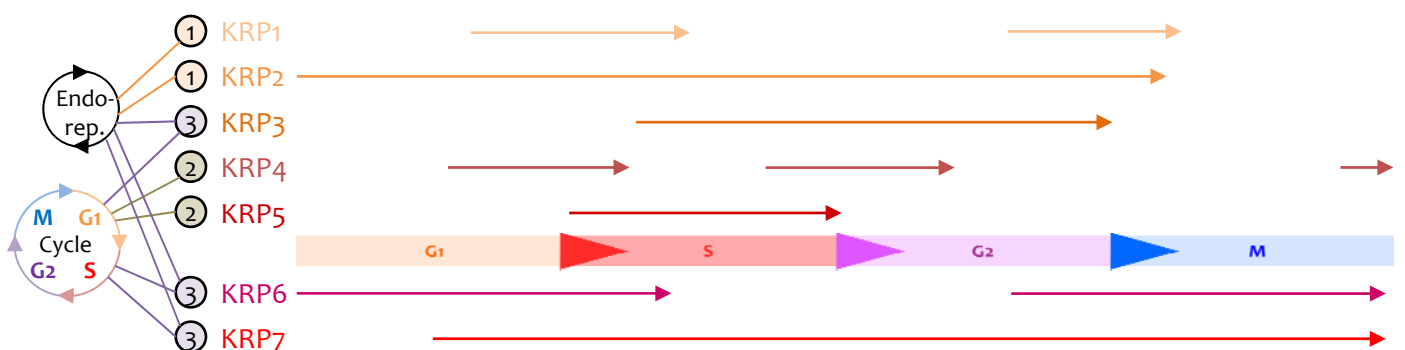
#### Rôle de p27<sup>KIP1</sup> et des KRP dans la transition G1-S du cycle cellulaire

La protéine de mammifères p27<sup>KIP1</sup>, tout comme les protéines végétales KRP, intervient notamment dans la transition G1-S du cycle cellulaire. p27<sup>KIP1</sup>, en se fixant aux complexes CDK2-cycE, inhibe leur activité et maintient les cellules en phase G1. C'est uniquement lorsque les complexes composés des CDK4 ou 6 et de la cycline D recrutent l'inhibiteur que les complexes



**Figure 75. Phénotypes de plantes surexprimant différents membres de la famille des KRP.** (A) Phénotype de feuilles d'*Arabidopsis* surexprimant KRP1 (zone encadrée en rouge) en comparaison avec des feuilles de plantes sauvages (WT). (B) Phénotype de feuilles d'*Arabidopsis* surexprimant KRP4. (C) Phénotype de rosettes et feuilles d'*Arabidopsis* surexprimant AtKRP6. (D) Phénotype de rosettes et feuilles d'*Arabidopsis* surexprimant AtKRP2. (E) Taille des cellules du mésophylle d'*Arabidopsis* surexprimant AtKRP2. Les barres correspondent à 100µm. (F) Taille des cellules du mésophylle de plantes de tabacs surexprimant NtKIS1a. Les barres correspondent à 100µm. (G) Aptitude à la callogénèse altérée de disques foliaires de tabac surexprimant NtKIS1a. La barre correspond à 1cm.

A, B et C d'après Zhou *et al.*, 2002. D d'après Jasinski *et al.*, 2002 et Liu *et al.*, 2008. E, F et G d'après Jasinski *et al.*, 2002 et Le Foll *et al.*, 2008.



**Figure 76. Régulation de l'expression des transcrits des gènes KRP au cours du cycle et rôles putatifs dans l'endoréplication et/ou le cycle mitotique.** La famille KRP se répartit en trois profils d'expression tissulaire: le groupe 1 (AtKRP1 et 2) est exprimé dans les cellules en endoréplication, le groupe 2 (AtKRP3, 6 et 7) est exprimé uniquement dans des cellules mitotiques et le groupe 3 (AtKRP4 et 5) comprend des KRP exprimées dans les deux types cellulaires. Les flèches indiquent la présence des transcrits au cours du cycle.

CDK2-cycE peuvent enclencher la transition G1-S et la poursuite du cycle (Winston *et al.*, 1996). A ce stade, la CDK2 phosphoryle p27<sup>KIP1</sup> sur sa thréonine 187, mécanisme conduisant l'inhibiteur vers une dégradation dépendante du protéasome 26S (Figure 77) (Morisaki *et al.*, 1997; Sheaff *et al.*, 1997).

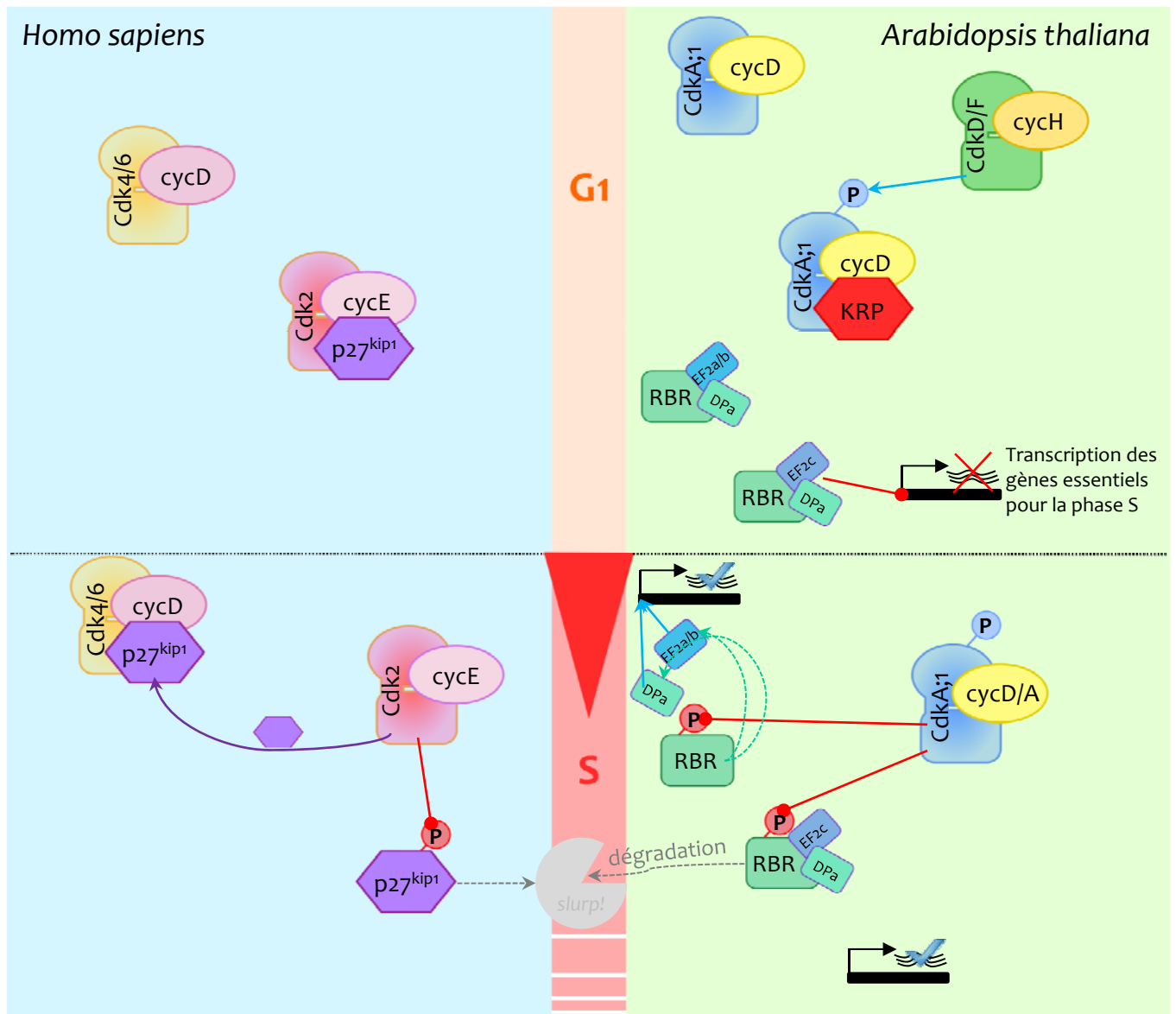
Chez *Arabidopsis*, la transition G1-S fait intervenir les complexes CDKA;1-cycD (Figure 77) (Kono *et al.*, 2006; Van Leene *et al.*, 2010). Ceux-ci nécessitent d'être activés par les complexes CDKD/F-cycH. En réponse à des facteurs anti-mitogènes, les hétérodimères CDKA;1-cycD sont alors inhibés par les KRP (Van Leene *et al.*, 2010). L'engagement en phase S est rendu possible par l'activation des complexes CDKA;1-cycD/A. En effet, la phosphorylation des protéines RBR, impliquées dans les interactions protéine-protéine, libère les facteurs DP/E2Fa-b activateurs de la transcription d'une part et d'autre part la phosphorylation/inhibition des ensembles RBR/DP/EF2c active la transcription. Il en résulte l'expression de gènes essentiels pour la phase S, parmi lesquels figurent en bonne place les CDKB (Van Leene *et al.*, 2010, 2011).

### Régulation post-traductionnelle de p27<sup>KIP1</sup> et ses conséquences au-delà du cycle cellulaire

La protéine p27<sup>KIP1</sup> est sujette à de nombreux événements de phosphorylation (Vervoorts & Lüscher, 2008), conduisant pour certaines à l'export nucléaire ou la séquestration cytoplasmique de l'inhibiteur (Figure 78A). Qu'en est-il alors des conséquences d'une telle relocalisation sur la fonction de cette protéine ? Une fonction majeure associée à cette fraction cytoplasmique est la régulation de la mobilité ou migration cellulaire. Plusieurs études ont en effet montré que p27<sup>KIP1</sup> est capable d'inhiber la mobilité cellulaire lors du développement embryonnaire ou neuronal. Ce mécanisme implique l'association avec les protéines RhoA et l'inhibition de leur activité favorable à la synthèse des filaments d'actine et aux interactions actine-myosine (Besson *et al.*, 2004, 2008). Récemment, la mutation de la kinase JNK (« c-Jun N-terminal Kinase ») a été corrélée à une baisse du niveau de phosphorylation du résidu Ser10 et à une diminution de l'adhésion cellulaire (Kim *et al.*, 2012). Par ailleurs, Serres et collègues (2011) ont montré que la transformation de souris par une forme modifiée de p27<sup>KIP1</sup>, incapable d'interagir avec les CDK-cyclines, résultait en l'augmentation du nombre et de l'agressivité des tumeurs chez ces animaux en comparaison à des mutants KO p27<sup>KIP1</sup><sup>-/-</sup>, suggérant l'acquisition d'une nouvelle fonction en plus de la perte de leur rôle d'inhibiteur du cycle. Ces phénomènes concordent avec la classification de p27<sup>KIP1</sup> en tant qu'oncogène, puisque le relâchement du cytosquelette et la perte d'adhésion cellulaire sont tous deux des facteurs associés au développement de zones tumorales.

La phosphorylation d'un même site par différentes kinases est également intrigante. Ainsi, AKT phosphoryle p27<sup>KIP1</sup> sur sa Thr157 mais SGK1 est également capable de cibler ce résidu. Il a été montré que cet événement faisait intervenir les complexes TORC1. L'introduction générale a



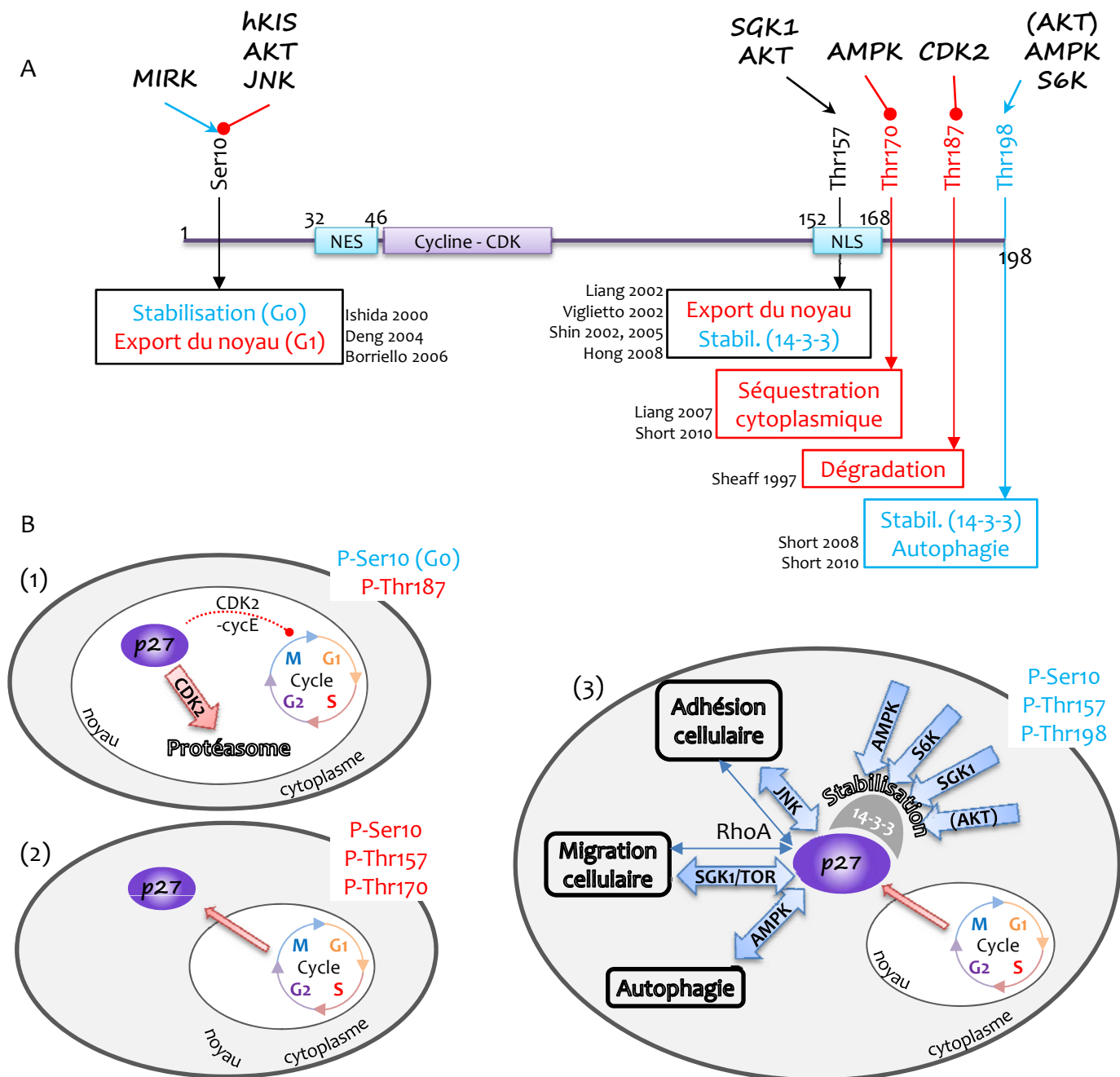


**Figure 77. Rôle particulier des KRP au cours de la transition G1/S et de leur homologue chez l'homme p27<sup>KIP1</sup> (D'après Millan, 2011).** Chez l'homme, p27<sup>KIP1</sup> empêche la transition G1-S en se fixant aux complexes CDK2-cycE. Cette transition n'a lieu que lorsque les complexes CDK4/6-cycD recrutent l'inhibiteur et libèrent les hétérodimères CDK2-cycE. De plus, ces derniers phosphorylent p27<sup>KIP1</sup> conduisant à la dégradation de la protéine. Chez *A. thaliana*, les KRP empêchent la transition G1-S en s'associant aux complexes CDKA;1-cycD. La transition vers la phase S n'est permise qu'en réponse à des facteurs mitogènes favorables. Les CDKA;1-cycD sont activées par les complexes CDKD/F-cycH et libèrent la synthèse de gènes essentiels pour le déroulement de la phase S. Ce schéma intègre les connaissances actuelles et parcellaires chez *A. thaliana*. RBR, « ring between ring fingers »

précédemment détaillé la relation existant entre ces kinases. Le complexe mTOR-Raptor se lie et active SGK1, promouvant la phosphorylation de la Thr157 de p27<sup>KIP1</sup> et son exclusion du noyau (Hong *et al.*, 2008). Ceci est appuyé par l'accumulation de cet inhibiteur dans le noyau en réponse à un traitement par la rapamycine (Moss *et al.*, 2010). Toutefois, il ne s'agit pas de l'unique relation existant entre cet inhibiteur de mammifères et les complexes TOR puisque, dans cette même étude, les auteurs démontrent que la migration cellulaire est affectée lorsque les transcrits des gènes codant les membres du complexe TORC2 sont inhibés, ceci étant dépendant de p27<sup>KIP1</sup>.

Par ailleurs, les fonctions de p27<sup>KIP1</sup> dans les tissus en développement semblent différentes de celles associées aux tissus cancéreux. Par exemple, Godin et collègues (2012) ont montré que p27<sup>KIP1</sup> s'associe directement aux microtubules et promeut leur polymérisation, favorisant la migration des neurones. Il est également intéressant de noter que, dans un contexte de stress métabolique (carence en glucose), p27<sup>KIP1</sup> est dégradé par le protéasome, mécanisme ayant pour conséquence de réduire la mobilité cellulaire et potentiellement de prévenir la dégénérescence cellulaire (Nagano *et al.*, 2011).

Enfin, une relation étroite a été établie entre p27<sup>KIP1</sup> et l'AMPK dans plusieurs études successives. En 2007, des travaux ont mis en évidence la phosphorylation de la Thr198 par l'AMPK (Liang *et al.*, 2007). L'utilisation de protéines chimériques exprimant la protéine fluorescente YFP montre que la forme mutée YFP-p27<sup>T198D</sup> (Thr198 mutée en aspartate, modification mimant une phosphorylation constitutive de par la charge négative apportée) est plus stable que les formes sauvage YFP-p27<sup>WT</sup> et non phosphorylable YFP-p27<sup>T198A</sup> (Thr198 mutée en alanine). Les auteurs précisent que la forme « phosphorylée » p27<sup>T198D</sup> induit l'arrêt en phase G1 du cycle, résultat logique aux vues du rôle de p27<sup>KIP1</sup> à l'intérieur du noyau de cellules cyclantes mais incohérent avec les observations faites plus loin dans cette étude. En effet, les auteurs observent une augmentation du nombre de vésicules autophagiques dans le cytoplasme de cellules exprimant p27<sup>KIP1</sup> en comparaison à des cellules p27<sup>KIP1-/-</sup>. En 2008, un second événement de phosphorylation de cet inhibiteur par l'AMPK est mis en évidence sur le résidu Thr170, cette phosphorylation provoquant la séquestration cytoplasmique de p27<sup>KIP1</sup> (Short *et al.*, 2008). Ce n'est qu'en 2010 que cette même équipe parvient à associer ces deux phosphorylations séquentielles en proposant un modèle selon lequel p27<sup>KIP1</sup> serait primo-phosphorylée sur sa Thr170, puis, après la relocalisation cytoplasmique engendrée, phosphorylée une seconde fois par l'AMPK sur son résidu Thr197 (correspondant au résidu Thr198 de p27<sup>KIP1</sup> chez le rat) (Short *et al.*, 2010). Ceci réorienterait l'inhibiteur du cycle vers une fonction favorable au maintien de l'autophagie. Ce mécanisme, ainsi que sa pertinence physiologique prenant en considération le rôle de l'AMPK, sont discutés à la fin de ce chapitre.



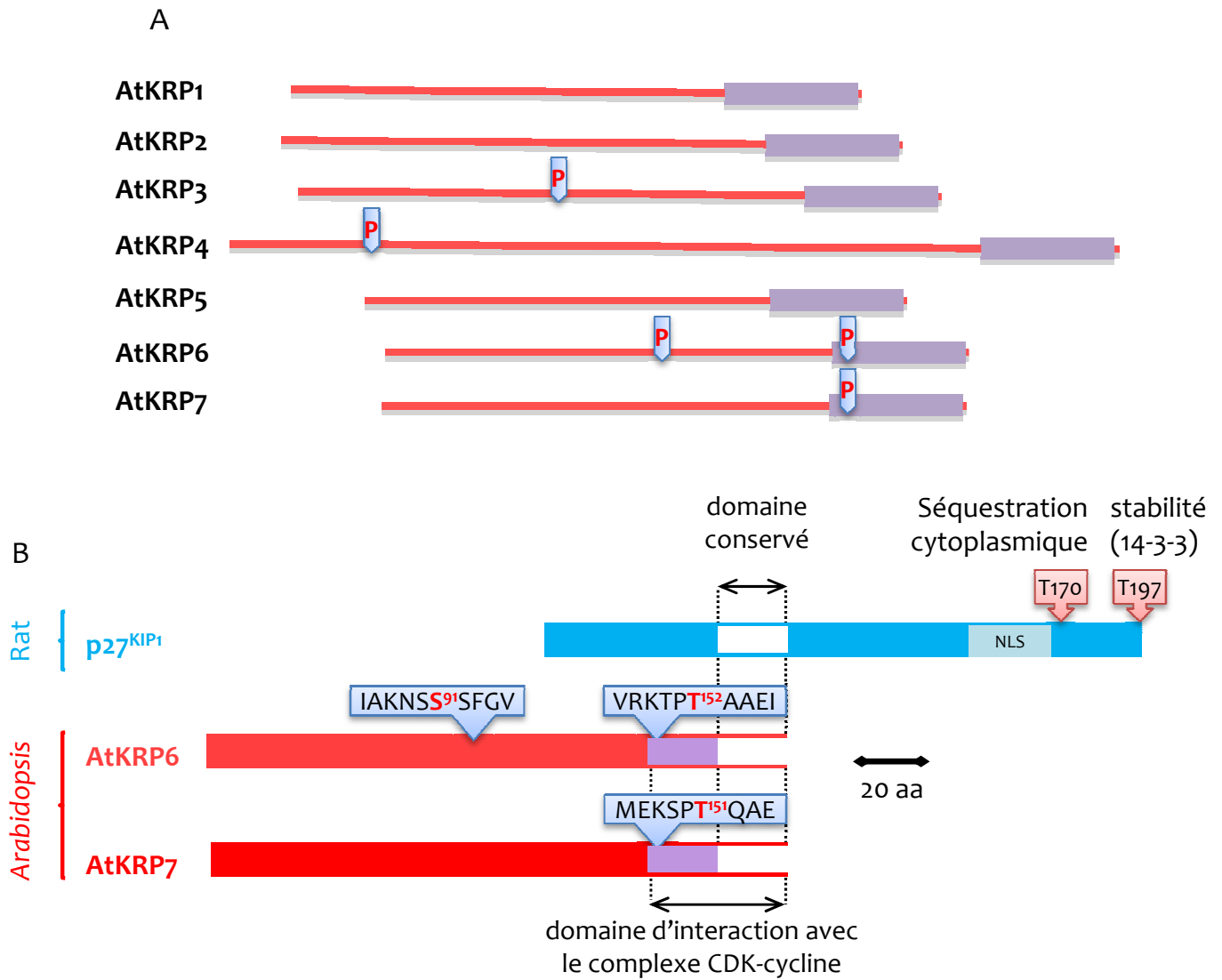
**Figure 78. Rôles de Hsp27<sup>KIP1</sup> dans le cycle cellulaire et au-delà. (A)** Localisation et fonctions des événements de phosphorylation de la protéine Hsp27<sup>KIP1</sup>. (Actualisé d'après Vervoorts et al., 2008). Les phosphorylations en faveur de la fonction inhibitrice de p27<sup>KIP1</sup> sont en bleu, celles l'inhibant sont en rouge. Le domaine d'interaction avec les complexes CDK-cycline est représenté en violet. **(B)** Fonctions associées à l'état de phosphorylation de p27<sup>KIP1</sup>. (1) CDK2 est capable de phosphoryler p27<sup>KIP1</sup> et de l'empêcher d'exercer son rôle d'inhibiteur en provoquant sa dégradation (Sheaff et al., 1997). (2) Plusieurs phosphorylations séquestrent l'inhibiteur dans le cytoplasme. Dans les cellules mitotiques, la P-Ser10 joue ce rôle mais, dans les cellules non cyclantes (Go), ce même site conduit à une stabilisation de la protéine (Ishida et al., 2000; Deng et al., 2004; Borriello et al., 2006). L'export induit par la P-Thr157 va de pair avec la phosphorylation par AKT de la Thr157 qui induit l'interaction avec une protéine de type 14-3-3 et la séquestration dans le cytoplasme (Shin et al., 2002/2005; Liang et al., 2002; Viglietto et al., 2002) (3). La P-Thr170 a un effet similaire. Plusieurs sites ont un rôle de stabilisation de la protéine dans le cytoplasme (Ser10, Thr157 et Thr198) conduisant p27<sup>KIP1</sup> vers d'autres fonctions., notamment le réarrangement du cytosquelette par l'intermédiaire des GTPases RhoA. Les phosphorylations ayant un effet positif sur p27<sup>KIP1</sup> sont en bleu, celles ayant un effet négatif en rouge .

AMPK, « AMP-activated kinase »; AKT, « Ak-thymoma »; CDK, « cyclin-dependent kinase »; hKIS, « human kinase interacting stathmin »; JNK, « c-Jun N-terminal kinase »; MIRK, « minibrain-related kinase »; NES, « nuclear export signal »; NLS, « nuclear localisation signa »; S6K, « S6-kinase »; SGK1, « stress-activated protein kinase interacting protein 1 »; Stab. (14-3-3), « stabilisation par interaction avec une protéine de type 14-3-3 »



### Objectifs

La relation décrite entre p27<sup>KIP1</sup> et l'AMPK chez l'animal a ouvert un nouveau pan d'investigation. Dans ce contexte, la question de l'existence de cette relation, et plus largement, du lien entre métabolisme et cycle cellulaire, nous a semblé très intéressante. Dans un premier temps, nous avons recherché un lien biochimique entre SnRK1α1 et les membres de la famille KRP d'*Arabidopsis*. La mise en évidence d'un tel lien entre les deux partenaires a soulevé la question de la fonction biologique de cette relation. Afin d'y répondre, des expériences en système hétérologue ont été conduites. Finalement, nous avons souhaité comprendre quel était l'impact à l'échelle de la plante entière d'un tel mécanisme et quelle était sa pertinence physiologique dans le cadre des fonctions connues de SnRK1.



**Figure 79. Les protéines AtKRP présentent des sites de phosphorylation SnRK1-consensus. (A)** L'analyse *in silico* des 7 membres de la famille AtKRP1-7 avec la séquence consensus [MLVFI]-X(0,1)-[RKH]-X(2,3)-[ST]-X(3)-[MLVFI] révèle des sites de phosphorylation potentiels par SnRK1 (ExPaSy, ScanProsite, DeCastro et al., 2006). **(B)** Les protéines AtKRP1-7 sont les orthologues de p27<sup>KIP1</sup> sur la base de l'homologie d'une partie du domaine d'interaction avec le complexe CDK/cycline. Les sites de phosphorylation potentiels par AtSnRK1 ont été positionnés, le résidu potentiellement phosphorylé est en rouge.

#### 4.2. La phosphorylation de KRP6 et 7, homologues de p27KIP1, par SnRK1, relie l'homéostasie énergétique et la prolifération cellulaire chez Arabidopsis

Les résultats présentés dans ce chapitre sont le fruit de travaux menés en collaboration étroite avec Laurine Millan au cours de sa thèse (en particulier pour les expériences de levure). François Rey et Mélanie Héry, respectivement stagiaires de M2 et de BTS en 2011, ont également largement contribué à ces travaux qui n'auraient vu le jour sans la curiosité scientifique de Pierre Crozet.

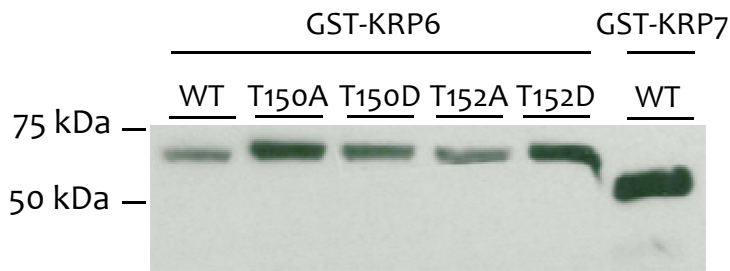
##### Les CKI d'Arabidopsis présentent des sites consensus de phosphorylation par SnRK1

Dans un premier temps, une étude *in silico* des 7 membres de la famille AtKRP a permis de mettre en évidence la présence de sites de phosphorylation consensus de SnRK1 ([MLVFI]-X(0,1)-[RKH]-X(2,3)-[ST]-X(3)-[MLVFI]) sur les protéines AtKRP3, 4, 6 et 7 (Figure 79A). De manière intéressante, AtKRP6 et 7 présentent un site de phosphorylation sur un résidu conservé (Thr 152 et 151 respectivement), situé dans le domaine d'interaction avec le complexe CDK/cycline (Figure 79). De plus, il est intéressant de noter l'existence d'un second site de phosphorylation (Ser91) sur AtKRP6, absent de la protéine AtKRP7. L'alignement protéique présenté en figure 79B. de ces deux protéines avec l'homologue p27<sup>KIP1</sup> du rat indique clairement que les sites prédits diffèrent de ceux déjà identifiés chez ce dernier, présentés dans l'introduction de ce chapitre, et caractérisant la relation entre l'AMPK et l'inhibiteur de mammifères.

##### Production et défauts de migration des protéines AtKRP6 et AtKRP7

Comme présenté précédemment (Chapitre I des résultats), la production des sous-unités du complexe s'est préalablement apparentée à un défi et seule la fusion à une étiquette GST, située en amont de la séquence d'intérêt, a permis d'obtenir suffisamment de protéines dans la fraction bactérienne soluble (Crozet, 2010). La production des inhibiteurs du cycle cellulaire AtKRP6 et AtKRP7 a également nécessité plusieurs étapes de mise au point avant d'obtenir des rendements satisfaisants. Une stratégie semblable à celle utilisée pour les protéines SnRK1 a finalement été adoptée. Les phases ouvertes de lecture, après avoir été clonées par restriction dans le vecteur d'entrée du système Gateway®, ont été transférées par recombinaison dans le vecteur pDEST15, permettant la fusion d'une étiquette GST à l'extrémité N-terminale. Ces protéines chimériques ont ensuite été produites chez *E. coli* dans les conditions récapitulées dans le tableau 7. L'autoradiographie (Figure 80) atteste de la qualité des productions des protéines de fusion GST-AtKRP6 et GST-AtKRP7.

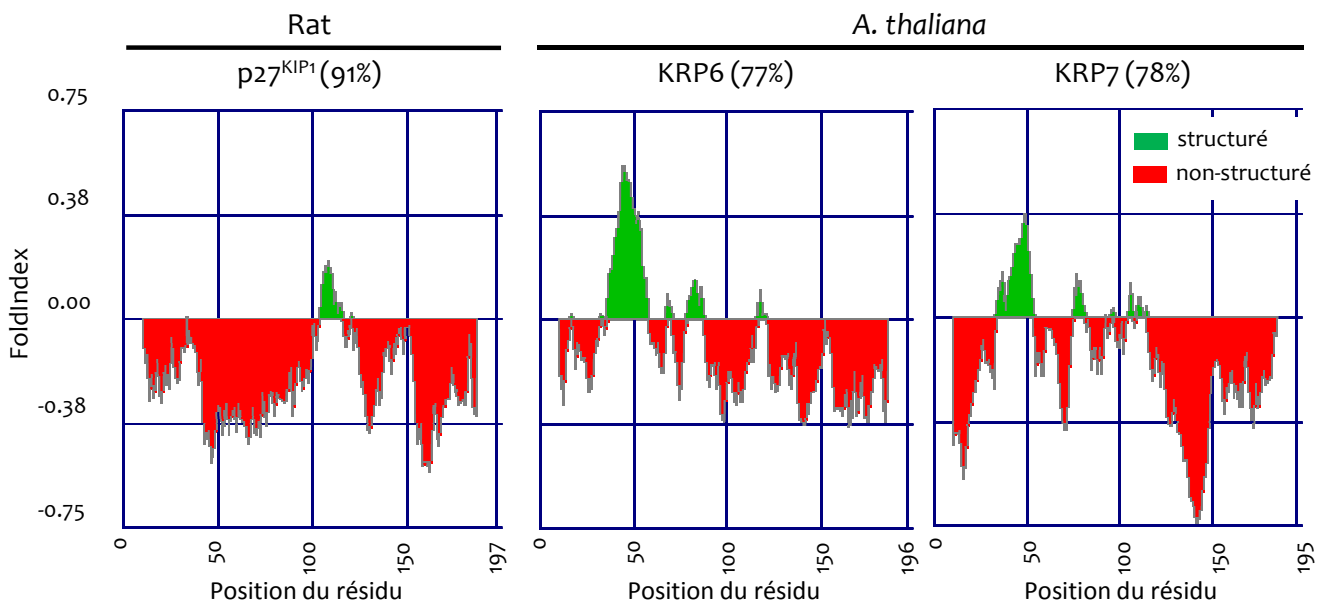
Il est ici nécessaire de souligner une particularité des protéines GST-AtKRP6 (21,4kDa) et AtKRP7 (21,9kDa) (Tableau 5). Ces deux inhibiteurs présentent un index de repliement négatif



**Figure 80. Production des protéines recombinantes AtKRP6 (sauvage et formes mutées) et AtKRP7, étiquetées avec la GST.** Autoradiographie après expérience de western blot. Les formes sauvages (AtKRP6<sup>WT</sup>, AtKRP7<sup>WT</sup>) et mutées (AtKRP6<sup>T150A</sup>, AtKRP6<sup>T150D</sup>, AtKRP6<sup>T152A</sup>, AtKRP6<sup>T152D</sup>) ont été produites fusionnées en N-ter à une étiquette GST. La révélation par des anticorps dirigés contre la GST atteste de la qualité des productions protéiques.

**Tableau 5. Détail des masses moléculaires apparentes et réelles des protéines AtKRP6 et 7.**

	Protéine (kDa)	Protéine + GST (kDa)	Masse observée sur gel (kDa)
AtKRP6	21,4	46,4	~ 65
AtKRP7	21,9	46,9	~ 60



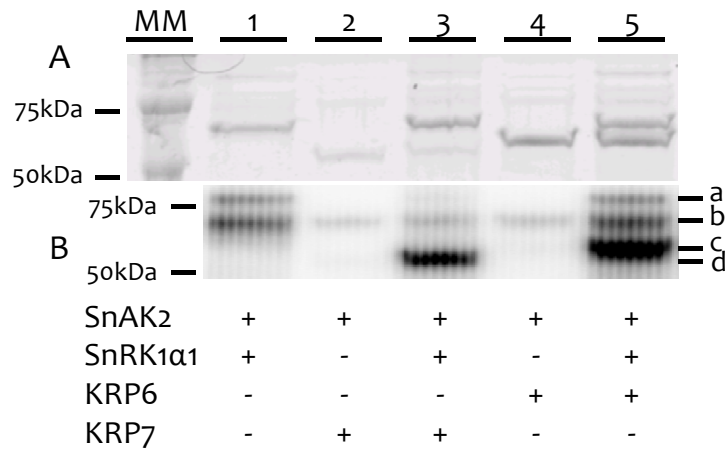
**Figure 81. Les protéines AtKRP6 et 7 sont des protéines intrinsèquement non structurées.** L'analyse des séquences protéiques avec le logiciel FoldIndex© (Prilusky et al., 2006) révèle un index de repliement négatif sur 77% de la protéine pour KRP6 et 78% pour KRP7. Cette caractéristique est connue pour leur homologue p27<sup>KIP1</sup> (91% chez le rat).

d'une grande partie de leur séquence (77% pour KRP6 et 78% pour KRP7), ce qui est le cas également pour la protéine p27<sup>KIP1</sup> avec 91%, alors que ce taux n'est respectivement que de 29% et 33% pour SnRK1 $\alpha$ 1 et CDKA ;1 (FoldIndex©) (Prilusky et al., 2005) (Figure 81). Cet index de repliement négatif élevé suggère que ces protéines n'adoptent pas de conformation et sont intrinsèquement non-structurées. De ce fait, de telles protéines peuvent présenter des défauts de migration sur gel SDS-PAGE comme le soulignent Westerhuis et collègues dans leur analyse du comportement de différentes protéines soumises à électrophorèse en gel de polyacrylamide (Westerhuis et al., 2000). Ainsi, lors des expériences d'électrophorèse effectuées au cours de nos travaux, GST-AtKRP6 et GST-AtKRP7 migrent à des distances correspondant à des masses moléculaires d'environ 65kDa et 60kDa respectivement, alors que leurs valeurs théoriques sont de 46,4kDa et 46,9kDa (Tableau 7).

#### AtSnRK1 $\alpha$ 1 phosphoryle AtKRP6 et AtKRP7 *in vitro*

Des essais kinases ont été effectués pour tester la capacité de la protéine recombinante GST-AtSnRK1 $\alpha$ 1 à phosphoryler les protéines GST-AtKRP6 et GST-AtKRP7. Ces tests d'activité ont été effectués dans un milieu contenant la kinase GST-AtSnRK1 $\alpha$ 1, sa kinase amont GST-AtSnAK2 activatrice ainsi que GST-AtKRP6/7, en présence d'ATP radiomarqué. Après électrophorèse, les phosphorylations croisées entre AtSnRK1 $\alpha$ 1 et ses kinases amont AtSnAK1 et 2 (Crozet et al., 2010) va se traduire par la mise en évidence de deux signaux autoradiographiques. Ainsi le signal observé à 83kDa traduit la phosphorylation/activation de la sous unité AtSnRK1 $\alpha$ 1 par AtSnAK2 (Figure 82, pistes 1,3,5, bande a), alors que celui à 68kDa reflète à la fois l'autophosphorylation/activation de AtSnAK2 et la rétrophosphorylation/inactivation de AtSnAK2 par AtSnRK1 $\alpha$ 1 (Figure 82 pistes 1-5, bande b). La présence additionnelle de signaux à ~65kDa (Figure 82 piste 5, bande c) et ~60kDa (Figure 82 pistes 3, bande d) s'est avérée un résultat très encourageant quant à la réalité *in vitro* d'un événement de phosphorylation de AtKRP6 et AtKRP7. De plus, cette modification post-traductionnelle apparaît bien SnRK1-dépendante puisque la kinase AtSnAk2 seule s'avère incapable d'incorporer du phosphate radiomarqué sur ces inhibiteurs du cycle cellulaire (Figure 82 pistes 2,4).

L'analyse en spectrométrie de masse (tandem MS/MS, travail réalisé par Benoit Valot, plateforme PAPPSO, INRA du Moulon) a permis d'identifier clairement le résidu Thr151 de AtKRP7 comme cible de la phosphorylation (Tableau 6). Par contre, lors d'une première série d'analyses LC-MS/MS, il n'a pas été possible de discriminer les deux thréonines 150 et 152 de AtKRP6, ces deux résidus se trouvant sur le même peptide. La modification de masse de 79,9 g.mol<sup>-1</sup> correspondant à l'ajout d'un phosphate (PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) nous avait néanmoins informés de l'existence d'un événement de phosphorylation unique sur ce peptide. Nous avons donc décidé de mettre en



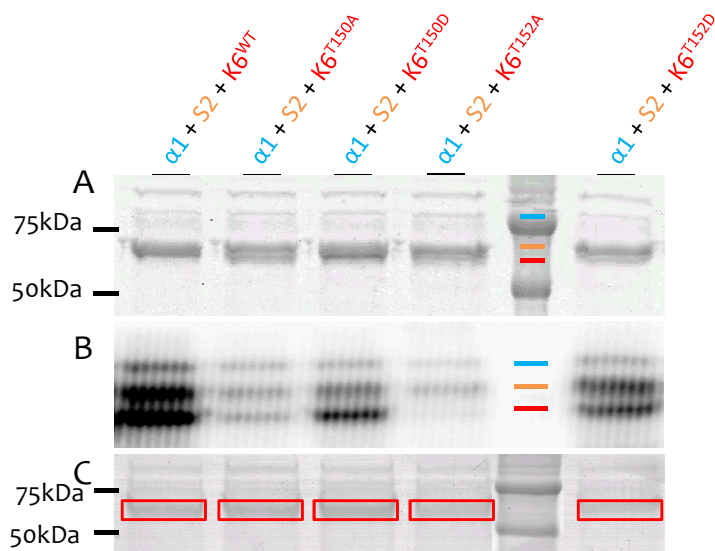
**Figure 82. Les protéines recombinantes GST-AtKRP6 et GST-AtKRP7 sont phosphorylées *in vitro* par AtSnRK1α1. (A)** Coloration au bleu de Coomassie des protéines après SDS-PAGE des milieux réactionnels de phosphorylation de GST-AtKRP6 et GST-AtKRP7 par AtSnRK1α1. **(B)** Autoradiographie du gel révélant l'incorporation de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  sur les protéines GST-AtSnRK1α1 (a), GST-AtSnAK2 (b) GST-AtKRP6 (c) et GST-AtKRP7 (d).

**Tableau 6. Identification par spectrométrie de masse des résidus phosphorylés sur GST-AtKRP7, GST-AtKRP6<sup>WT</sup>, GST-AtKRP6<sup>T150A</sup>, GST-AtKRP6<sup>T150D</sup>, GST-AtKRP6<sup>T152A</sup> et GST-AtKRP6<sup>T152D</sup> par GST-AtSnRK1α1.**

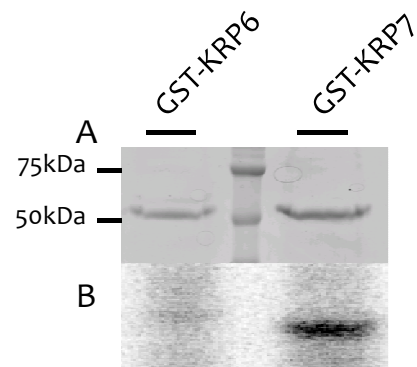
Numéro du gène chez <i>Arabidopsis</i>	Description du gène	Nb de peptides	Pourcentage de couverture de la protéine	Peptide	Résidu et modification de masse
At1g49620	KRP7	9	52	SPTQAE <del>L</del> DDFFSAAER	T3:+79.96633
At3g19150	KRP6	7	54	KTPT <del>T152</del> AAEIEDLFSELESQDDKKK ELAEEAS <del>S13</del> STSFSP <del>L</del> KK	T4:+79.96633
	KRP6 <sup>T150A</sup>	13	54	KAPT <del>T152</del> AAEIEDLFSELESQDDKKK	T4:+79.96633
	KRP6 <sup>T150D</sup>	10	54	KDPT <del>T152</del> AAEIEDLFSELESQDDKKK	T4:+79.96633
	KRP6 <sup>T152A</sup>	9	54	T <del>150</del> PA <del>A</del> AAEIEDLFSELESQDDKKK ELAEEAS <del>S13</del> STSFSP <del>L</del> KK(K)	no S7: +79.96633
	KRP6 <sup>T152D</sup>	9	54	T <del>150</del> PA <del>A</del> AAEIEDLFSELESQDDKKK ELAEEAS <del>S13</del> STSFSP <del>L</del> KK	no S7: +79.96633

place une approche de mutagenèse dirigée afin d'identifier sans ambiguïté la Thr concernée. Les formes mutées suivantes ont été produites chez *E. coli* : GST-AtKRP6<sup>T150A</sup>, GST-AtKRP6<sup>T150D</sup>, GST-AtKRP6<sup>T152A</sup> et GST-AtKRP6<sup>T152D</sup> (les conditions de culture de chaque forme sont récapitulées dans la partie Méthodes, Tableau 1). La mutation d'une thréonine en alanine rend impossible la phosphorylation tandis que la mutation en aspartate (chargé négativement) mime une protéine constitutivement phosphorylée. La figure 83 présente la phosphorylation par SnRK1 $\alpha$ 1 de l'ensemble de ces variants protéiques. Comme décrit précédemment, nous retrouvons les phosphorylations des protéines GST-AtSnAK2 et GST-AtSnRK1  $\alpha$ 1 (bandes bleue et orange). Pour l'ensemble des formes sauvage et mutantes d'AtKRP6 testées, un signal radioactif plus ou moins intense selon les pistes est détecté. Malgré la volonté d'utiliser des quantités égales de chacune des protéines (dosages effectués au nanodrop et par la technique de Bradford), il s'avère que l'intensité des signaux varie fortement d'un puits à l'autre pour la protéine AtKRP6 mais également pour les deux kinases AtSnRK1 $\alpha$ 1 et AtSnAK2, empêchant par conséquent toute conclusion relative à une quantification ou à une comparaison du niveau de phosphorylation. Cette manipulation a été répétée 4 fois avec, à chaque reprise, des résultats variables pour les formes mutantes (la forme sauvage GST-AtKRP6<sup>WT</sup> donnant cependant toujours lieu à un signal radioactif). Il ne nous a donc pas été possible de conclure clairement par cette seule approche et une analyse en spectrométrie de masse s'est avérée nécessaire. Les résultats de l'analyse en tandem MS-MS, détaillés dans le tableau 6, statuent clairement en faveur de la phosphorylation du résidu Thr152 de la protéine GST-AtKRP6. Il est en second lieu très intéressant de noter l'existence d'un second site de phosphorylation lorsque ce résidu 152 est muté et donc non-phosphorylable par la kinase. Ce site (Ser13) a été également détecté, après une seconde analyse des échantillons, sur la forme sauvage GST-AtKRP6<sup>WT</sup> mais jamais sur les formes GST-AtKRP6<sup>T150A</sup> et GST-AtKRP6<sup>T150D</sup>, révélant une possible relation entre ces deux événements de phosphorylation (Thr152 et Ser13). Enfin, cette analyse a également révélé trois sites de phosphorylation sur la GST (Thr16, Ser108 et Thr 194) expliquant, au-delà de la multiphosphorylation des formes GST-AtKRP6<sup>WT</sup>, GST-AtKRP6<sup>T152A</sup> et GST-AtKRP6<sup>T152D</sup>, la difficulté à analyser correctement les autoradiographies (Figure 83B).

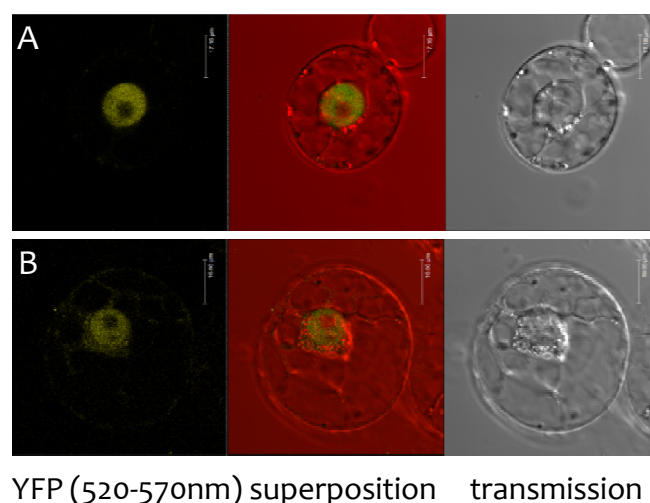
Par ailleurs, nous avons confirmé ce résultat en analysant la capacité de complexes immunopurifiés à partir d'extraits protéiques de feuilles d'*A. thaliana* à phosphoryler les protéines recombinantes GST-AtKRP6<sup>WT</sup> et GST-AtKRP6<sup>WT</sup>. Deux signaux autoradiographiques sont visibles sur la figure 84B correspondant aux tailles des deux protéines recombinantes. Ce résultat est très encourageant puisqu'attestant de la capacité des complexes immunopurifiés natifs à phosphoryler GST-AtKRP6<sup>WT</sup> et GST-AtKRP6<sup>WT</sup>. Une analyse en tandem MS/MS s'avèrera



**Figure 83. Test de phosphorylation des formes sauvage et mutées des protéines GST-AtKRP6 par AtSnRK1α1 recombinante.** (A) Gel SDS-PAGE de dissociation des milieux réactionnels radioactifs (3h d'incubation à 30°C en présence de 2μCi de [γ-32P]ATP, 1μg de GST-SnAK2, 3μg de GST-SnRK1α1 et 2μg de GST-KRP6/7). (B) Autoradiographie du gel. (C) Gel SDS-PAGE de dissociation des milieux réactionnels sans ATP radiomarqué (ATP 1mM); les bandes encadrées ont été analysées en LC-MS/MS.



**Figure 84. Test de phosphorylation de GST-AtKRP6 and GST-AtKRP7 par AtSnRK1 immunopurifié .** (A) Gel SDS-PAGE de dissociation des milieux réactionnels radioactifs (3h d'incubation à 30°C en présence de 2μCi de [γ-32P]ATP, 2μg de GST-KRP6/7 et 17μL de complexe immunopurifié (cf. Méthodes 2.2)). (B) Autoradiographie du gel.



YFP (520-570nm) superposition transmission

**Figure 85. AtSnRK1α1 et AtKRP6 interagissent physiquement dans le noyau de protoplastes de tabac BY-2.** La technique de BiFC a permis de mettre en évidence l'interaction de la protéine AtKRP6-YFP<sup>N</sup> avec les protéines de fusion AtSnRK1α1-YFP<sup>C</sup> (A) et YFP<sup>C</sup>- AtSnRK1α1 (B).



nécessaire afin de confirmer que les événements de phosphorylation se situent bien sur les sites identifiés lors des essais précédents.

### **AtKRP6 interagit physiquement avec AtSnRK1 $\alpha$ 1 et la phosphorylation sur la thréonine 152 ne modifie pas sa localisation nucléaire**

Suite à ces expériences visant à mettre en évidence la réalité biochimique d'une modification post-traductionnelle liant AtSnRK1 et AtKRP6, il nous a semblé essentiel de vérifier si ces deux acteurs étaient capables d'interagir physiquement *in vivo*. Pour ce faire, des protoplastes de tabac BY-2 ont été transformés avec les plasmides pUC-SPYCE et pUC-SPYNE porteurs des phases ouvertes de lecture des gènes AtKRP6 et AtSnRK1 $\alpha$ 1 respectivement. La technique de BiFC (« Bimolecular Fluorescence Complementation ») a permis de mettre en évidence l'interaction de la protéine AtKRP6-YFPN avec AtSnRK1 $\alpha$ 1-YFPC (Figure 85A) ou YFPC- AtSnRK1 $\alpha$ 1 (Figure 85B) exclusivement dans le noyau. Cette co-localisation est en accord avec les données de localisation intracellulaire de ces deux protéines. En effet, l'inhibiteur AtKRP6 est localisé dans le noyau (Bird *et al.*, 2007) et AtSnRK1 $\alpha$ 1 est une protéine nucléo-cytoplasmique (Jossier, 2007; Bitrián *et al.*, 2011).

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'impact direct de la phosphorylation du résidu 152 sur cette localisation. En effet, chez les mammifères, la phosphorylation de la Thr170 de p27<sup>KIP1</sup> entraîne l'exclusion du noyau et la séquestration dans le cytosol de l'inhibiteur. Pour rechercher si un tel mécanisme existe lors de la phosphorylation de AtKRP6 par AtSnRK1 $\alpha$ 1 chez *Arabidopsis*, nous avons suivi le comportement de protéines chimériques GFP-AtKRP6<sup>WT</sup>, GFP-AtKRP6<sup>T152A</sup> et GFP-AtKRP6<sup>T152D</sup> exprimées transitoirement dans des protoplastes d'*Arabidopsis* (Figure 86). La forme sauvage, comme attendu, est présente dans le noyau, à l'exclusion du nucléole. C'est également le cas des deux formes mutées (GFP-AtKRP6<sup>T152A</sup> non-phosphorylable et GFP-AtKRP6<sup>T152D</sup> mimant une phosphorylation). Ceci nous indique donc que, tout au moins dans ces conditions, la phosphorylation du résidu Thr152 n'entraîne pas la relocalisation de l'inhibiteur AtKRP6 chez *Arabidopsis*.

### **La forme AtKRP6<sup>T152D</sup>, mimant une protéine constamment phosphorylée, perd sa capacité à inhiber la division de la levure**

Sur la piste de la caractérisation de la fonction biologique du lien biochimique précédemment caractérisé entre AtSnRK1 et AtKRP6, nous nous sommes efforcés d'apporter des preuves de l'impact de cette phosphorylation *in vivo*. Dans cette démarche, Laurine Millan a mis en place au laboratoire une expérience élégante en système hétérologue. Une souche de levure sauvage est bien entendu capable de se diviser normalement à 25°C et 35°C (Figure 87A). Lorsque son unique CDK, la Cdc28-4, est mutée, *S. cerevisiae* ne peut se diviser qu'à la température dite « permissive »

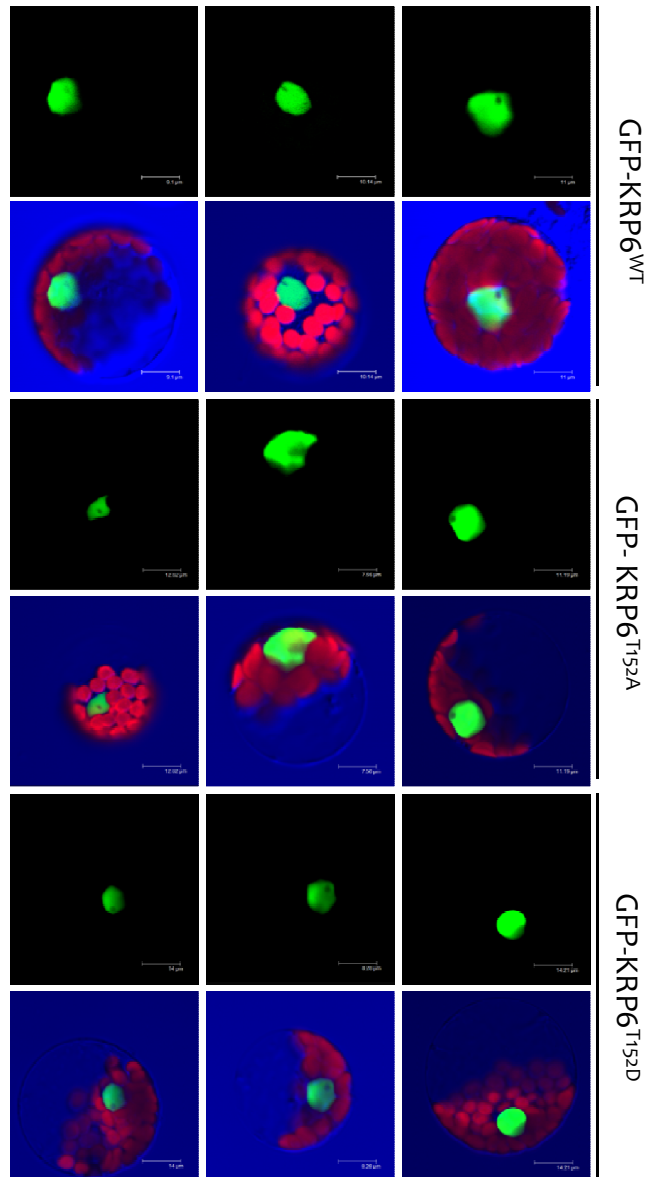


Figure 86. Les formes mutées GFP-KRP6<sup>T152A</sup> et GFP-KRP6<sup>T152D</sup> tout comme la forme sauvage GFP-KRP6<sup>WT</sup> sont localisées dans le noyau des cellules du mésophylle d'*Arabidopsis*.

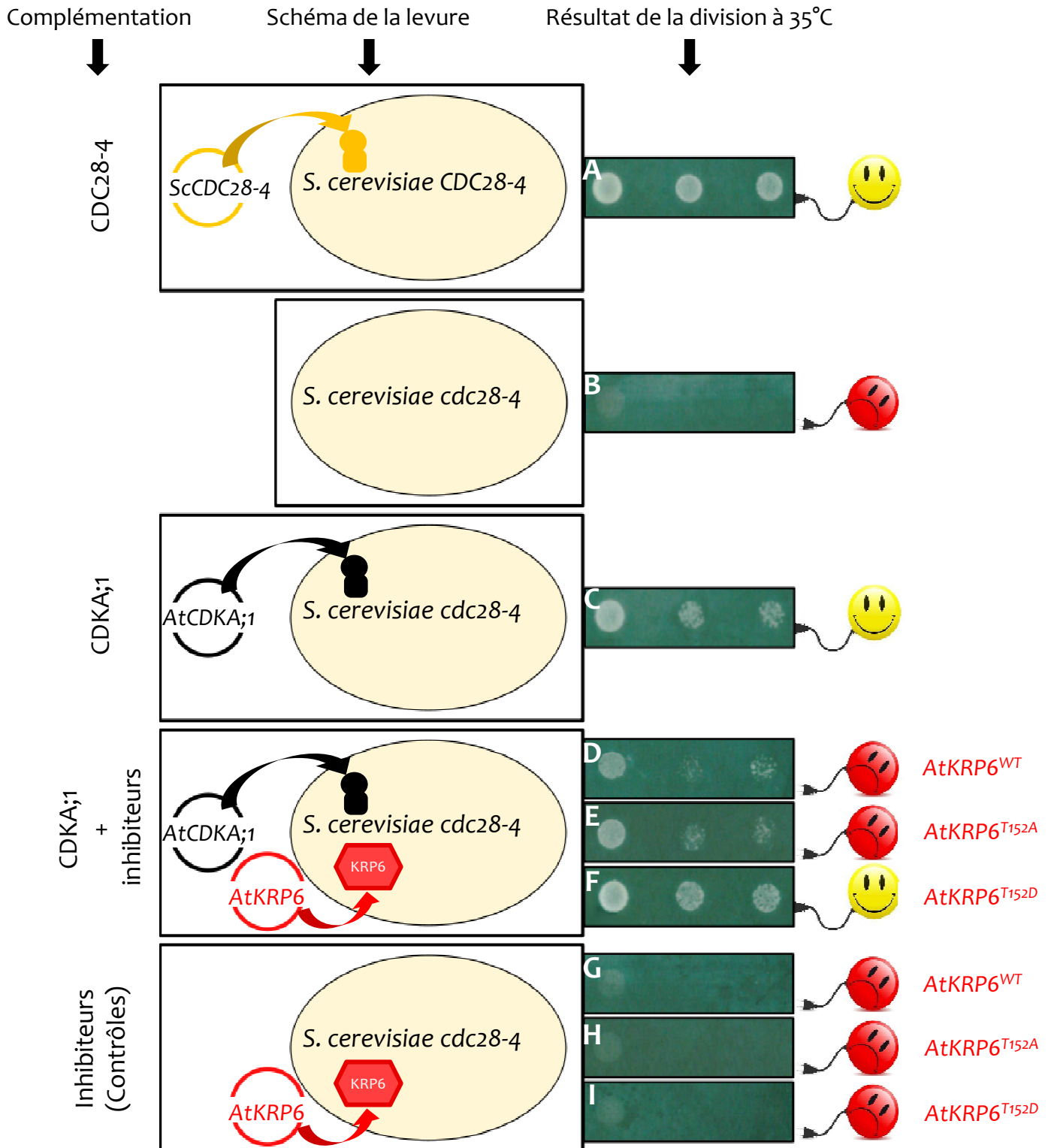
de 25°C et perd sa capacité à se diviser à 35°C (Figure 87B). Complémentée par la CDC28-4 de levure ou par la CDKA;1 d'*Arabidopsis*, porteuse des mutations T14A et Y15F (CDKA;1-AF, forme constitutivement active), la levure retrouve sa capacité à se diviser (Figure 87A et C). Comme attendu, cette capacité n'est pas retrouvée lorsque la souche mutante est co-transformée par CDKA;1 et l'inhibiteur AtKRP6<sup>WT</sup> (forme sauvage, figure 87D) ou AtKRP6<sup>T152A</sup> (forme non phosphorylable, figure 87E). Cependant, lorsque la co-transformation est effectuée avec CDKA;1 et la forme AtKRP6<sup>T152D</sup> (Figure 87F), la souche de levure se divise aussi bien qu'en absence d'inhibiteur. Ceci indique qu'un état phosphorylé de la protéine (ou tout au moins la présence d'une charge négative en position 152) empêche la fonction d'inhibiteur du cycle cellulaire.

Suite à ce résultat, nous avons souhaité rechercher si cette modification post-traductionnelle était en mesure d'affecter la formation des hétérotrimères KRP-CDK-cycline et, si oui, quel était le mécanisme moléculaire impliqué. Pour ce faire, des tests d'interactions en système double-hybride dirigé entre l'inhibiteur et la CDK d'une part et la cycline d'autre part ont été menés (Figure 88). Des travaux antérieurs avaient déjà montré que AtKRP6 interagit avec la CDKA;1 d'*Arabidopsis* (De Veylder *et al.*, 2001), résultat que nous avons également observé lors de nos expériences (Figure 88A). Lorsque la thréonine 152 est mutée en aspartate (AtKRP6<sup>T152D</sup>), l'interaction avec la CDKA;1 persiste, indiquant que la mutation de ce résidu ne semble avoir aucun impact sur la capacité d'interaction des deux partenaires. De la même façon, la forme sauvage (AtKRP6<sup>WT</sup>) interagit avec la cycline D3;1. Par contre, de façon très intéressante, la forme AtKRP6<sup>T152D</sup> perd nettement sa capacité d'interaction avec cette cycline (Figure 88B).

Prises dans leur ensemble, ces expériences en système hétérologue nous indiquent que la phosphorylation du résidu Thr152 d'AtKRP6 contrecarrerait la fonction inhibitrice de l'activité des complexes CDK-cycline en empêchant ce CKI d'interagir avec la cycline.

### **Les phénotypes caractéristiques des surexpressesurs OE-AtKRP6 sont atténués lorsque les plantes ont un niveau accru de phosphorylation de la thréonine 152**

Tous ces éléments biochimiques, de localisation et d'interaction en système hétérologue nous ont fortement encouragés à rechercher l'existence, chez la plante entière, de ce lien entre un régulateur clé du métabolisme (SnRK1) et un acteur central du cycle cellulaire (KRP) ainsi que son impact sur le développement de la plante. L'utilisation de mutants s'est avérée impossible. En effet, d'une part aucun mutant d'insertion n'est disponible à ce jour, ni dans la séquence du gène At3g01090 (AtSnRK1α1), ni dans celle du gène At3g29160 (AtSnRK1α2) (ceci reflétant le rôle crucial de la sous-unité SnRK1α chez *Arabidopsis*). De même, les doubles mutants obtenus par Baena-González et collègues en éteignant le gène *KIN11* par la technique du VIGS (« Virus-Induced Gene Silencing ») dans des lignées ARNi *KIN10* (Baena-González *et al.*, 2007) (cf. figure 18B) ont un



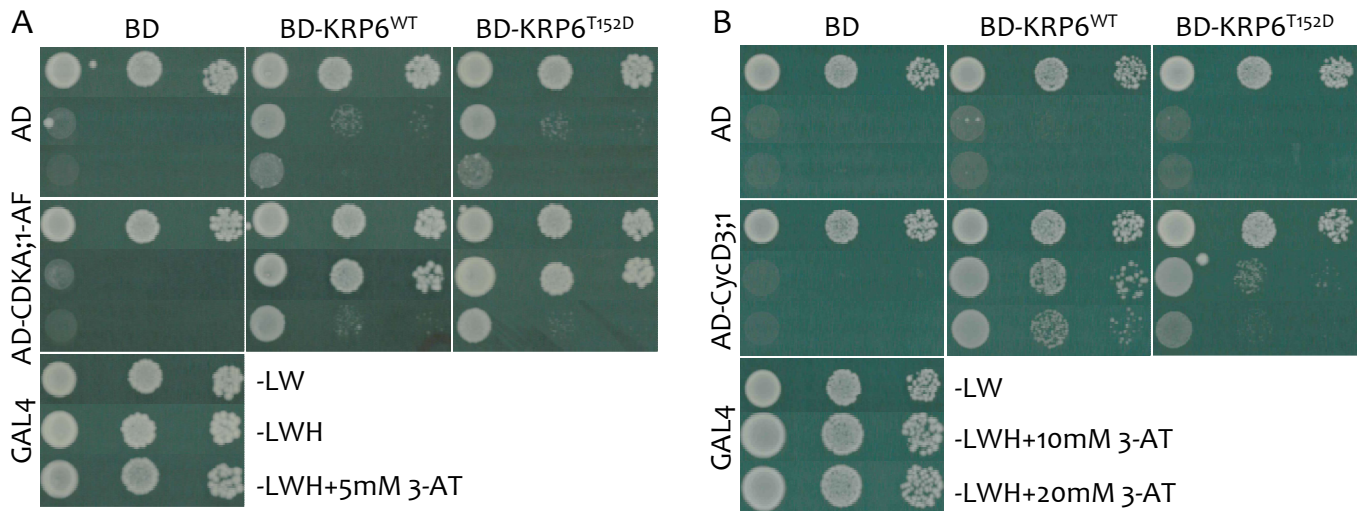
**Figure 87.** La forme *AtKRP6<sup>T152D</sup>*, mimant une protéine constitutivement phosphorylée, perd sa capacité d'inhibition de la cycline *CDKA;1* d'*Arabidopsis* (D'après Millan 2011). La souche mutante *Saccharomyces cerevisiae* *cdc28-4* (B) incapable de se diviser a été complétementée par la cycline *CDKA;1-AF* d'*Arabidopsis* (C). L'ajout de la forme sauvage (*AtKRP6<sup>WT</sup>*, D) ou non phosphorylable (*AtKRP6<sup>T152A</sup>*, E) de l'inhibiteur du cycle cellulaire *AtKRP6* empêche la division de la levure tandis que la mutation mimant une forme constitutivement phosphorylée (*AtKRP6<sup>T152D</sup>*, F) rend possible cette division.

développement beaucoup trop altéré pour être utilisés dans nos d'analyses. D'autre part, comme présenté précédemment, aucun mutant de la famille AtKRP, ni même la combinaison de plusieurs mutations ne montrent un phénotype évident. Par contre, la surexpression de AtSNRK1 $\alpha$ 1 et de KRP s'était avérée plus fructueuse. Au laboratoire, Mathieu Jossier avait précédemment caractérisé des plantes surexprimant la sous-unité AtSnRK1 $\alpha$ 1 (OE-AtSnRK1 $\alpha$ 1) (Jossier *et al.*, 2009). Ces plantes ont un niveau d'activité kinase AMARA-spécifique (cf. Méthodes 2.2) 30% supérieure aux plantes sauvages et des phénotypes associés tels qu'une hypersensibilité au glucose et au saccharose. Par ailleurs, lors de sa thèse, Laurine Millan avait généré des plantes surexprimant AtKRP6 et présentant un phénotype caractéristique de cette famille d'inhibiteurs (cf. figure 75) (Zhou *et al.*, 2002; Millan, 2011).

Nous avons donc adopté une stratégie visant à produire des plantes surexprimant à la fois AtSnRK1 $\alpha$ 1 et AtKRP6 afin de mettre en évidence un éventuel lien génétique entre ces deux éléments. Dans un premier temps, l'analyse des simples surexpressesurs OE-AtKRP6<sup>WT</sup> a permis de fixer une référence phénotypique. Il faut noter que l'intensité du phénotype au sein d'une population de transformants OE-KRP6 est totalement dépendante du niveau de surexpression des transcrits du gène AtKRP6. Ainsi, nous avons observé différents niveaux d'altération du développement d'*Arabidopsis* qui nous ont permis de classer les plantes en cinq groupes (Figure 89A) :

- « wild-type-Like » (**wt-L**), incluant toutes les plantes transformées présentant un phénotype comparable aux plantes sauvages ;
- « Lightly Serrated » (**LS**), regroupant les plantes légèrement altérées ;
- « Moderately Serrated » (**MS**), dont les plantes ont un phénotype marqué, en particulier concernant la dentelure des feuilles ;
- « Highly Serrated » (**HS**), incluant des plantes très affectées dans leur développement (taille de la rosette réduite, feuilles très dentelées) ;
- « Severely Serrated » (**SS**), dont les plantes, extrêmement altérées, ne survivent pas toutes au-delà de quelques jours après repiquage sur terreau.

Ces classes ont été caractérisées aux niveaux visuel (dentelures, figure 89A) comme décrit ci-dessus, cellulaire (taille des cellules, figure 89B), tissulaire (aptitude à la callogénèse, figure 89C) et confirmées au niveau moléculaire (niveaux de transcrits, figure 89E). L'analyse de la répartition de la population OE-ATKRP6<sup>WT</sup> révèle que seuls 12% des plantes ont un phénotype comparable aux plantes sauvages et qu'il s'agit toujours de plantes présentant une faible surexpression de AtKRP6 (niveau de transcrits proche des plantes non transformées figure 89E). Par contre, lorsque l'inhibiteur est surexprimé dans le fond génétique OE-AtSnRK1 $\alpha$ 1 (des plantes surexprimant



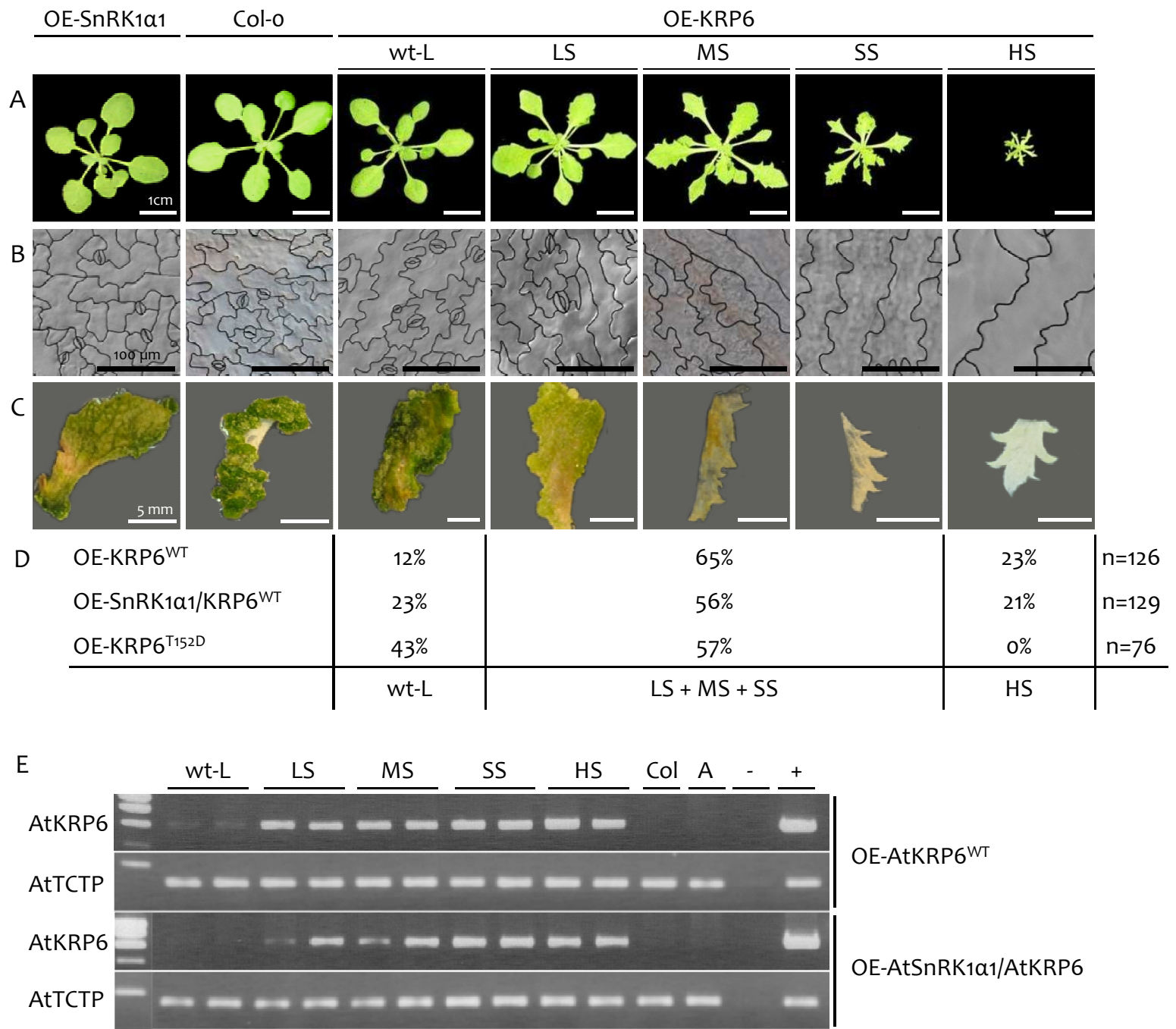
**Figure 88.** La forme AtKRP6<sup>T152D</sup>, mimant une protéine constitutivement phosphorylée, est capable d'interagir avec la AtCDKA;1 d'*A. thaliana* mais perd sa capacité d'interaction avec la cycline D3;1 (D'après Millan 2011). (A) Interaction entre les formes sauvage (AtKRP6<sup>WT</sup>) et mutée (AtKRP6<sup>T152D</sup>) et la CDKA;1-AF. (B) Interaction entre les formes sauvage (AtKRP6<sup>WT</sup>) et mutée (AtKRP6<sup>T152D</sup>) et la cycline D3;1. La souche de levure PJ69 a été transformée avec différentes combinaisons AD+BD (AD, domaine activateur; BD, domaine de liaison). Les vecteurs vides AD et BD (pGAD424 et pGBT9) ont servi de contrôles négatifs. Différentes dilutions (DO600nm=1; 0,005; 0,0005) sont placées sur le milieu sélectif approprié (-LW, sans leucine et tryptophane; -LWH, sans leucine, tryptophane et histidine; + 3-AT, milieu supplémenté par du 3-amino-triazol) puis incubées pendant 3 jours à 30°C.

AtSnRK1 $\alpha$ 1 ont été transformées avec une construction permettant la surexpression du gène AtKRP6), un déplacement net de la population vers les classes moins altérées est observé. En effet, même si 21% (en comparaison avec 23% pour le simple surexprimeur AtKRP6<sup>WT</sup>) des plantes ont un phénotype sévèrement affecté (SS), seules 56% des plantes (contre 65% pour les surexprimeurs OE-AtKRP6<sup>WT</sup>) présentent des phénotypes dits « intermédiaires » (i.e. LS, MS et HS). Enfin, deux fois plus de plantes (23% pour la population de doubles surexprimeurs, 12% pour la population OE-AtKRP6<sup>WT</sup>) ne se distinguent pas des plantes sauvages (Figure 89D). Au-delà de l'atténuation claire du phénotype OE-AtKRP6 dans un contexte surexprimant la kinase AtSnRK1 $\alpha$ 1, il est intrigant de noter que la proportion de plantes grandement affectées dans leur développement semble par contre rester constante. Une explication plausible serait qu'un ajustement stœchiométrique entre les deux acteurs a lieu *in planta* et que l'activité de AtSnRK1 incrémentée de 30% dans les plantes OE-AtSnRK1 $\alpha$ 1 (Jossier *et al.*, 2009) ne suffit pas à phosphoryler l'ensemble des inhibiteurs présents dans les plantes où les transcrits AtKRP6 sont très abondants (Figure 89E).

Afin de confirmer et approfondir ces premiers résultats, nous avons généré des plantes surexprimant la protéine AtKRP6<sup>T152D</sup>, mimant une forme constamment phosphorylée de l'inhibiteur. De façon très intéressante, aucune plante OE-AtKRP6<sup>T152D</sup> ne présente un phénotype très altéré (SS) et 43% des plantes ont montré un développement semblable aux plantes sauvages (Figure 89D). Le classement de ces plantes en différentes catégories, fonction du phénotype, a été validé par l'observation des autres caractères (taille des cellules et capacité à la callogénèse).

Ces données attestent d'une très forte corrélation entre le statut de phosphorylation de l'inhibiteur AtKRP6 sur sa thréonine 152 et le niveau de division cellulaire et suggèrent que AtSnRK1 est capable de phosphoryler AtKRP6 *in planta*.





**Figure 89. L'augmentation du niveau de phosphorylation de la thréonine 152 atténue les phénotypes caractéristiques des plantes surexprimant AtKRP6.** Les transformants ont été classés selon le niveau de dentelure de leurs feuilles (**A**) allant de plantes semblables aux plantes sauvages (wt-L), légèrement dentelées (Lightly Serrated, LS), modérément dentelées (Moderately Serrated, MS), jusqu'à des plantes très dentelées (Highly Serrated, HS) et extrêmement affectées (Severely Serrated, SS). Ces classes ont été corrélées à l'augmentation de la taille des cellules du mésophylle (**B**) et à l'aptitude à générer des cals (**C**) ainsi qu'aux niveaux de transcrits du gène *ATKRP6* (**E**). La surexpression d'*ATKRP6* dans un fond génétique surexprimant *KIN10* (*SnRK1α1*) ou la surexpression de la forme *ATKRP6<sup>T152A</sup>* de l'inhibiteur atténue ces phénotypes (**D**). Les répartitions des transformants ont été effectuées à partir de populations de 126, 129 et 76 plantes. Les échelles représentent 1cm (A), 100μM (B) et 5mm (C).



### 4.3. Discussion

Les travaux récents concernant la phosphorylation de l'inhibiteur de cycle cellulaire p27<sup>KIP1</sup> par l'AMPK nous ont amené à rechercher un nouveau lien, chez la plante modèle *A. thaliana*, entre la régulation de l'homéostasie énergétique, *via* son régulateur central AtSnRK1, et la prolifération cellulaire. En effet, chez les mammifères, p27<sup>KIP1</sup> avait récemment été la source de plusieurs publications ayant abouti à la description d'un mécanisme moléculaire fin dans lequel l'AMPK phosphoryle à deux reprises l'inhibiteur entraînant sa relocalisation subcellulaire (Liang *et al.*, 2007; Short *et al.*, 2008, 2010). Notre travail biochimique sur protéines recombinantes a permis de confirmer qu'un des sites prédits *in silico* sur AtKRP6 et AtKRP7, homologues fonctionnels de l'inhibiteur mammifère du cycle cellulaire p27<sup>KIP1</sup>, est réellement phosphorylé par la sous-unité catalytique  $\alpha 1$  des complexes AtSnRK1 (Thr152 et Thr151 respectivement). De plus il s'agit de la première modification post-traductionnelle mise en évidence sur les protéines KRP chez les végétaux.

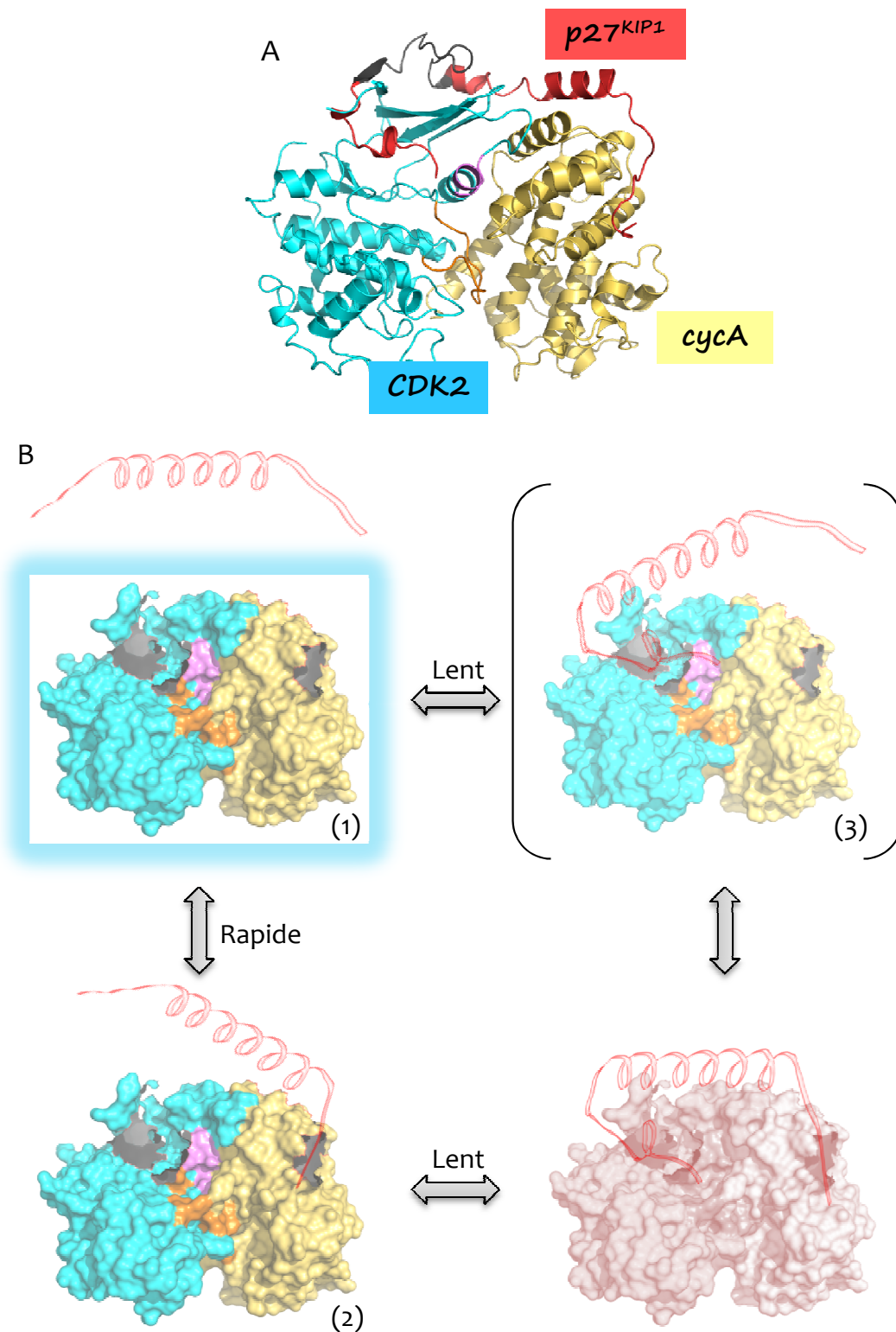
#### AtSnRK1 favorise la division cellulaire dans les tissus où la division est très active

Bien que la fonction inhibitrice des complexes CDK/cyclines (CDKA;1-cycD2 et CDKB-cycD2) par les KRP ait été clairement établie (Nakai *et al.*, 2006), nous apportons dans cette étude de nouveaux éléments appuyant le rôle de KRP6 dans l'inhibition du cycle cellulaire. En effet, dans des levures mutées pour leur seule cycline *cdc28* et complémentées par AtCDKA;1, l'expression de la forme sauvage AtKRP6<sup>WT</sup> conduit à l'arrêt de la prolifération cellulaire. De plus, la surexpression de cette forme de l'inhibiteur chez *Arabidopsis* (OE-AtKRP6<sup>WT</sup>) conduit à des phénotypes caractéristiques de cette famille de CKI. Les détails de notre analyse révèlent que les surexprimeurs OE-AtKRP6<sup>WT</sup> montrent un phénotype de dentelure des feuilles graduel, dépendant du niveau de surexpression de l'inhibiteur et que celui-ci s'accompagne d'une augmentation de la taille des cellules du mésophylle et d'une capacité réduite (ou abolie chez les phénotypes les plus sévères) des cellules à la callogénèse. Cependant, lorsque la Thr 152 de KRP6 est mutée (AtKRP6<sup>T152D</sup>), de façon à mimer une phosphorylation constitutive de ce résidu, cette protéine n'est plus en mesure d'inhiber la division cellulaire de la levure. Cette même forme, surexprimée chez *Arabidopsis*, ainsi que la co-surexpression de AtSnRK1 $\alpha 1$  et AtKRP6<sup>WT</sup> atténuent les phénotypes décrits précédemment. L'ensemble de ces observations indique qu'AtSnRK1 semble inhiber la fonction de AtKRP6 et que ceci conduit à la « libération » du cycle cellulaire. Le mécanisme moléculaire sous-jacent semble différer de celui décrit chez l'animal. Short et collègues (2008) ont démontré que p27<sup>KIP1</sup> était relocalisé dans le cytoplasme suite à la phosphorylation de la Thr170, résidu situé près du NLS. Cette relocalisation est corrélée à une augmentation de l'activité de la CDK2 dans des cellules MEF *tsc2*<sup>-/-</sup> dans lesquelles l'activité AMPK



est élevée. Les expériences que nous avons menées n'ont jamais montré de relocalisation de KRP6, que la thréonine impliquée soit mutée en alanine ou en aspartate. Toutefois il est très intéressant de remarquer que, contrairement aux animaux, le résidu concerné par la phosphorylation est situé dans le domaine d'interaction avec le complexe CDK-cycline. Il n'est donc pas incongru de penser que cette modification post-traductionnelle seule est en mesure de modifier la capacité de l'inhibiteur à se lier aux complexes CDK-cycline. L'expérience de double hybride dirigé menée avec la forme AtKRP6<sup>T152D</sup> en comparaison avec la forme sauvage confirme cette hypothèse en montrant que, bien que son interaction avec la CDK ne soit pas modulée, la forme mutée interagit nettement moins avec la cycline (cf. figure 89). Très récemment, Yoon et co-auteurs (2012) ont proposé un modèle séquentiel d'interaction et d'inactivation des hétérotrimères CDK2/cycA/p27<sup>KIP1</sup> (Figure 90). Le processus comprend deux étapes avec, en premier lieu, la liaison d'une partie flexible de l'extrémité N-terminale de p27<sup>KIP1</sup> avec la cycline. Ensuite, une seconde partie de p27<sup>KIP1</sup> non structurée, située en aval de l'hélice  $\alpha$  naissant au contact de l'hétérodimère CDK2-cycA, se lie à la CDK2, obstruant le site catalytique en imposant une légère restructuration de la CDK2 et en occupant le site de fixation de l'ATP. Nos résultats concordent donc avec la possible existence d'un mécanisme similaire chez les plantes. Un élément supplémentaire allant dans ce sens est l'appartenance de p27<sup>KIP1</sup> à la famille des IDP. Comme nous l'avons montré par une approche *in silico*, AtKRP6 et AtKRP7 appartiennent également très probablement aussi à cette famille de protéines dont la flexibilité permet ce type d'interactions protéine-protéine. Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que la phosphorylation d'AtKRP6 par AtSnRK1 serait susceptible de lever l'inhibition du cycle cellulaire opérée par AtKRP6 en l'empêchant d'interagir avec les hétérodimères CDK-cycline.

En 1999, des travaux chez la levure avaient déjà suggéré l'implication de SnRK1 dans la division cellulaire (Dickinson *et al.*, 1999). Dans un premier temps, les auteurs ont démontré que *RKIN* (gène codant SnRK1 chez le seigle), placé sous le contrôle du promoteur de la phosphoglycérate kinase, complémente le mutant *snf1* et est capable de pousser sur glycérol comme seule source de carbone. Ce même gène, placé sous le contrôle du promoteur fort 35S donne lieu à une forte diminution de la taille des cellules impliquant de ce fait la kinase dans le contrôle de la division cellulaire. Les auteurs de cette étude discutent de la difficulté à mettre en évidence ce rôle par l'intermédiaire de plantes surexprimant SnRK1. Il apparaît en effet délicat d'analyser les observations faites sur des plantes surexprimant de façon importante un tel régulateur. Néanmoins, dans le contexte de notre étude, les phénotypes particuliers et marqués des surexprimeurs du gène AtKRP6<sup>WT</sup> nous ont permis d'interpréter les observations faites sur les doubles surexprimeurs OE-AtKRP6<sup>WT</sup>/AtSnRK1 $\alpha$ 1. L'hypothèse selon laquelle le module



**Figure 90. Modèle d'interaction de p27<sup>KIP1</sup> avec ses partenaires CDK2 et cycA (D'après Yoon et al., 2012).** (A) Structure du complexe CDK2/cycA/p27<sup>KIP1</sup> de mammifère. Les fragments suivants ont été cristallisés: CDK2, résidus 13 à 298 (cyclin-dépendent kinase, en cyan); cycA, résidus 175 à 432 (cycline, en jaune); p27<sup>KIP1</sup>, résidus 25 à 93 (p27 cyclin-dépendent kinase inhibiteur, en rouge). La boucle d'activation (T-loop) de la CDK est en orange et son domaine d'interaction « PSTAIR » avec la cycline en violet. (PDB 1JSU). (B) Modèle d'interaction en deux étapes entre les trois membres des complexes CDK2/cycA/p27<sup>KIP1</sup>. En (1) les complexes CDK2-cycA sont actifs. L'inhibiteur p27<sup>KIP1</sup> peut se fixer soit sur la cycline (2) soit sur la CDK (3), la première possibilité paraissant la plus probable d'après les auteurs. Enfin, la seconde partie flexible de p27<sup>KIP1</sup> (côté N-terminal) se fixe sur la CDK (4), inhibant l'activité du complexe.

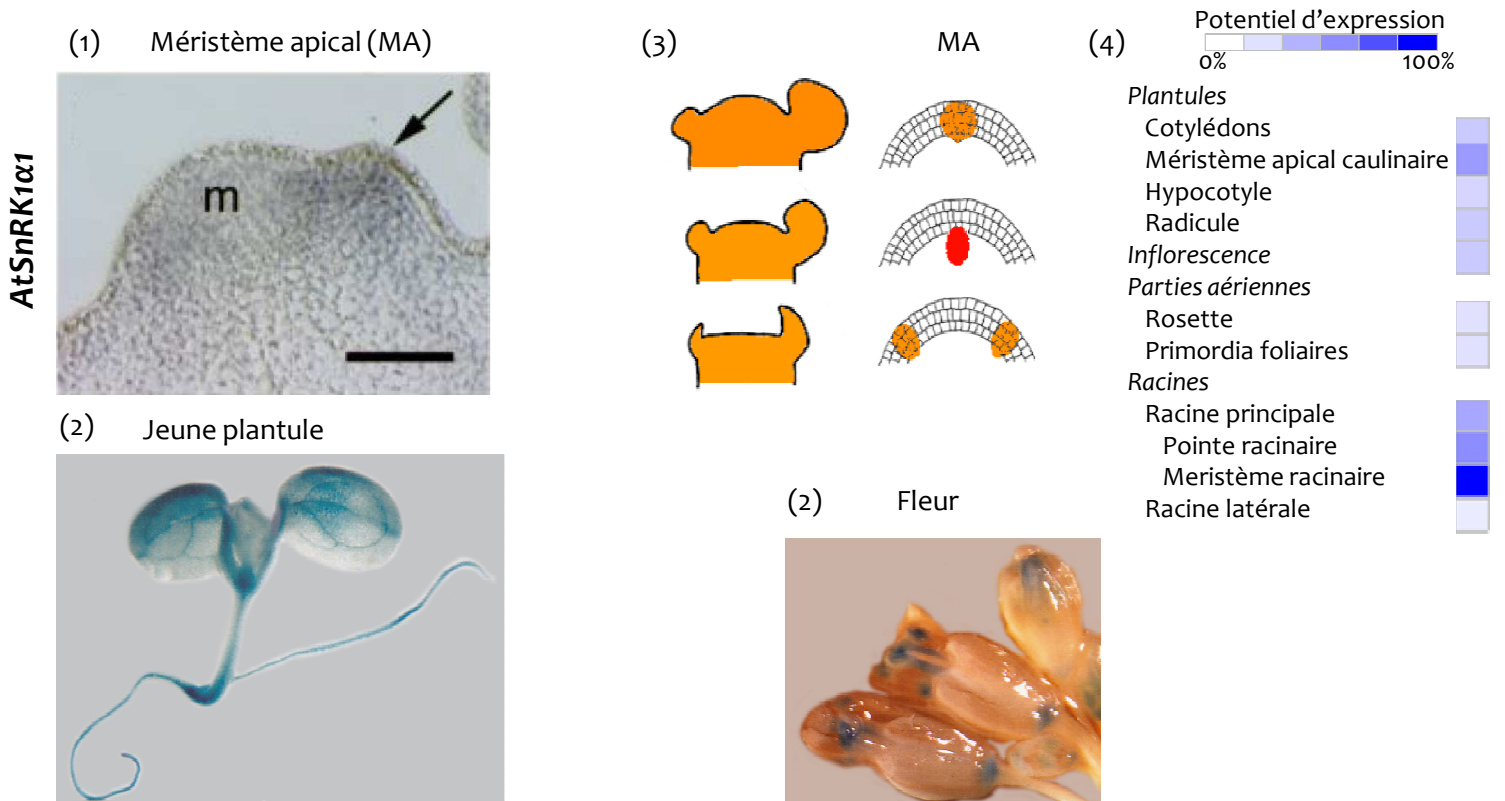
AtSnRK1 $\alpha$ 1/AtKRP6 jouerait un rôle important dans les zones où la division cellulaire est très active apparaît comme fortement plausible. Comme le montre la planche de la figure 91, les gènes AtSnRK1 $\alpha$ 1 et AtKRP6 sont exprimés tous deux dans des tissus où la division est intense. La sous-unité catalytique des complexes SnRK1 est par exemple exprimée dans les primordia foliaires (Pien *et al.*, 2001) et des données bioinformatiques synthétisant des analyses à grande échelle localisent son expression dans les organes floraux et dans les méristèmes racinaire et apical (<http://BAR.utoronto.ca>) (Hruz *et al.*, 2008). Cette localisation de l'expression dans le méristème apical et dans les grains de pollen est confirmée par des résultats non publiés obtenus au laboratoire à l'aide de plantes transgéniques fusion promoteurAtSnRK1 $\alpha$ 1::gène rapporteur GUS (Bouly, 1998). De même, des analyses de l'activité du promoteur du gène AtKRP6 (fusion promoteurKRP6::gène rapporteur GUS) montrent que ce gène est exprimé dans les zones méristématiques apicale et racinaire ainsi que dans les grains de pollen (Millan, 2011). Par conséquent, un ajustement stœchiométrique entre les deux acteurs pourrait avoir lieu en faveur de la division cellulaire dans ces régions de division intense où les deux gènes montrent des profils d'expression très semblables.

#### Perspectives du chapitre III

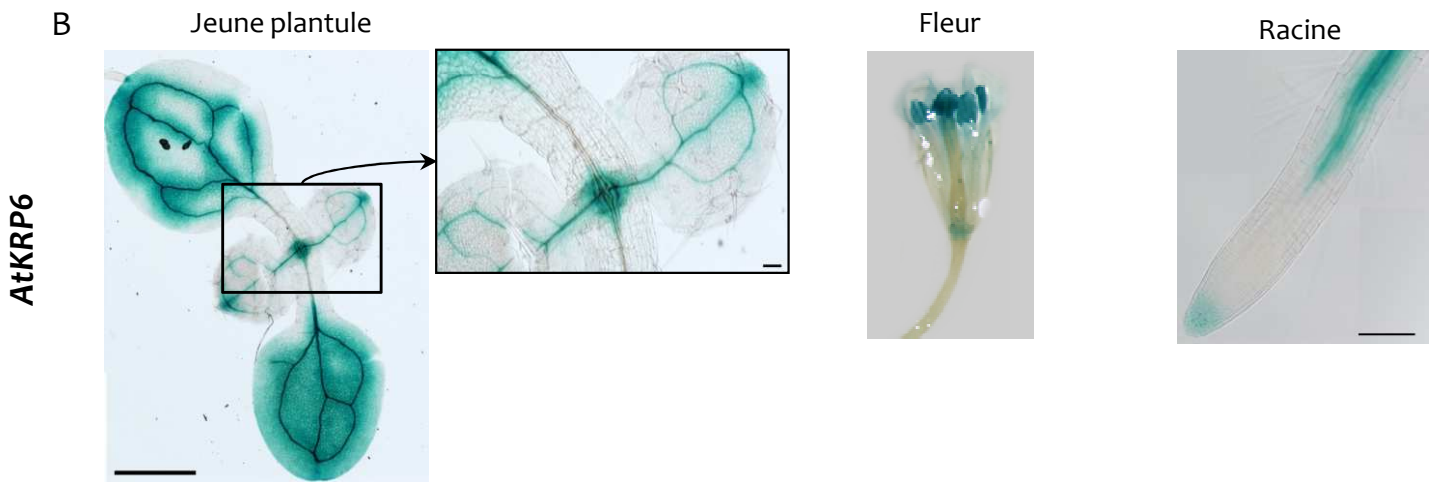
Les résultats présentés dans ce chapitre attestent d'un lien inédit chez les plantes entre SnRK1, acteur prépondérant dans la régulation du métabolisme, et la famille KRP d'inhibiteurs du cycle cellulaire chez *A. thaliana*. En phosphorylant directement AtKRP6, les complexes SnRK1 réguleraient l'entrée en phase S du cycle cellulaire et plus largement, la division des cellules. Des analyses complémentaires utilisant des plantes transgéniques surexprimant d'autres formes mutées de KRP6 (par exemple AtKRP6<sup>T152A</sup>) pourraient compléter les résultats obtenus.

Comme cela a été exposé au cours de ce chapitre, la famille KRP est une petite famille composée de 7 membres s'apparentant à l'inhibiteur p27<sup>KIP1</sup> et possédant à la fois une certaine redondance de fonction et des spécificités. Plusieurs éléments indiquent que ce lien SnRK1-KRP6 ne serait pas exclusif. En effet, l'analyse *in silico* a révélé que KRP3, KRP4 et KRP7 possèdent également des sites de phosphorylation spécifiques de la kinase SnRK1. Nous avons d'ores-et-déjà montré que cette kinase est capable de phosphoryler KRP7, la protéine KRP la plus proche phylogénétiquement de KRP6, sur un site équivalent au site ayant fait l'objet de ces travaux. Des résultats très préliminaires obtenus par F. Rey au laboratoire semblent indiquer que KRP3 serait également phosphorylé directement par SnRK1. Il serait intéressant de mener des expériences semblables à celles réalisées sur KRP6 (complémentation de levure, plantes transgéniques pour KRP7) afin de comparer les événements de phosphorylation de KRP6 et KRP7 dans le domaine

A



B



**Figure 91. Les gènes *AtSnRK1 $\alpha$ 1* et *AtKRP6* sont exprimés dans des zones de division intense. (A) Profil d'expression du gène *AtSnRK1 $\alpha$ 1*. (1) Hybridation *in situ* dans le méristème apical où le gène présente un profil asymétrique entre la zone méristématique (m) et le primordium foliaire (flèche). (D'après Pien et al., 2001). (2) Profil d'expression du gène *AtSnRK1 $\alpha$ 1* dans la jeune plantule (tissus conducteurs, racine et méristème apical) et dans les fleurs (pollen). Colorations histochimiques GUS. (D'après Bouly, 1999). (3) Données issues du site BAR eFP Browser. (4) Données issues de Genevestigator. (B) Profil d'expression du gène *AtKRP6* dans la jeune plantule (tissus conducteurs et méristème apical), la fleur (pollen) et dans la racine principale (vaisseaux et zone apicale). Colorations histochimiques GUS. (D'après Millan, 2011).**

d'interaction avec le domaine CDK-cycline mais également sur KRP3 voire KRP4 qui possèdent des sites potentiels de phosphorylation par SnRK1 mais localisés dans d'autres domaines.

Par ailleurs, les analyses en spectrométrie de masse ont révélé la présence d'un second événement de phosphorylation par SnRK1 sur AtKRP6. Ce résidu (Ser13) pourrait, à l'image du mécanisme moléculaire de son homologue fonctionnel p27<sup>KIP1</sup>, conduire KRP6 vers des fonctions indépendantes du cycle cellulaire. En outre, la multiplicité des événements de phosphorylation connus pour p27<sup>KIP1</sup> (Vervoorts & Lüscher, 2008) nous amène à considérer que d'autres acteurs pourraient intervenir également pour les protéines KRP. En effet, un crible double-hybride mené au laboratoire en utilisant KRP6 comme proie a révélé l'interaction (confirmée par des expériences de BiFC) avec une kinase de fonction inconnue (N. Glab, communication personnelle). Il serait intéressant à moyen terme de déterminer le site de phosphorylation sur KRP6 reconnu par cette kinase ainsi que les interactions potentielles entre ces deux événements de phosphorylation. Nous pourrions mettre en place des expériences de co-immunoprécipitations avec des anticorps dirigés contre KRP6 ou contre une étiquette sur des fractions protéiques cytosoliques ou nucléaires. Ainsi, il serait éventuellement possible de révéler l'existence d'autres kinases (telles que les intégrateurs présentés dans l'introduction générale) impliquées dans la réorientation fonctionnelle de ces inhibiteurs. La surexpression en protoplastes d'*Arabidopsis* pourrait être un outil précieux dans ce contexte.





# *Discussion générale et Perspectives*



## 5. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

### 5.1. Le paradoxe du rôle de AtSnRK1 dans la division cellulaire

Les introductions des différents chapitres de ce manuscrit ont régulièrement mis l'accent sur le rôle clé de SnRK1 dans la régulation du métabolisme, kinase qui est, tout comme l'AMPK, activée en réponse à un stress. Dans leur étude, Baena-González et Rolland (2007) ont clairement démontré que AtSnRK1 répondait à toute une batterie de stress, de l'hypoxie à l'obscurité prolongée en passant par l'inhibition de la photosynthèse. Le rôle de ces kinases (AMPK/SnRK1) dans ce contexte est d'activer les voies cataboliques et d'inhiber les voies anaboliques dans le seul but de préserver l'énergie pendant la durée du stress (Polge & Thomas, 2007; Hardie, 2007; Hardie et al., 2012). Nous avons caractérisé au cours de ce travail un nouveau type de cibles directes de SnRK1, les protéines KRP6 et 7, inhibitrices du cycle cellulaire (cf. chapitre III). Nos résultats suggèrent qu'en phosphorylant AtKRP6, AtSnRK1 $\alpha$ 1 l'empêche d'inhiber les complexes CDK-cycline. Cette interprétation des résultats se heurte à un paradoxe flagrant où un processus extrêmement demandeur en énergie, la division cellulaire, serait favorisé par SnRK1.

C'est d'ailleurs ce que souligne D. G. Hardie dans une très récente revue au sujet de l'implication de l'AMPK dans la régulation du cycle cellulaire : « *It is not immediately apparent why a kinase activated by energy stress should be required for passage through mitosis. Perhaps mitosis is accelerated by AMPK in cells undergoing stress so that an orderly cell cycle arrest can occur in the ensuing G1 phase. However, it may be that this is an ancillary function of AMPK that is unrelated to its role as an energy sensor* » (Hardie et al., 2012). Les connaissances actuelles ne permettent pas de statuer clairement quant au rôle de l'AMPK dans la division cellulaire. Des études montrent que l'activation de l'AMPK cause un arrêt du cycle en phase G1 tandis que d'autres l'impliquent dans la progression du cycle, notamment au travers de la régulation du complexe APC1 (« Anaphase Promoting Complex 1 ») (Banko et al., 2011; Hardie et al., 2012).

Ces différents points nous amènent à considérer la situation dans deux contextes physiologiques différents.

#### Hors du contexte stress

Si l'on considère notre modèle dans un contexte « normal » (i.e. hors stress), les plantes surexprimant AtKRP6<sup>WT</sup> voient leur stœchiométrie AtSnRK1 $\alpha$ 1:AtKRP6 largement perturbée en



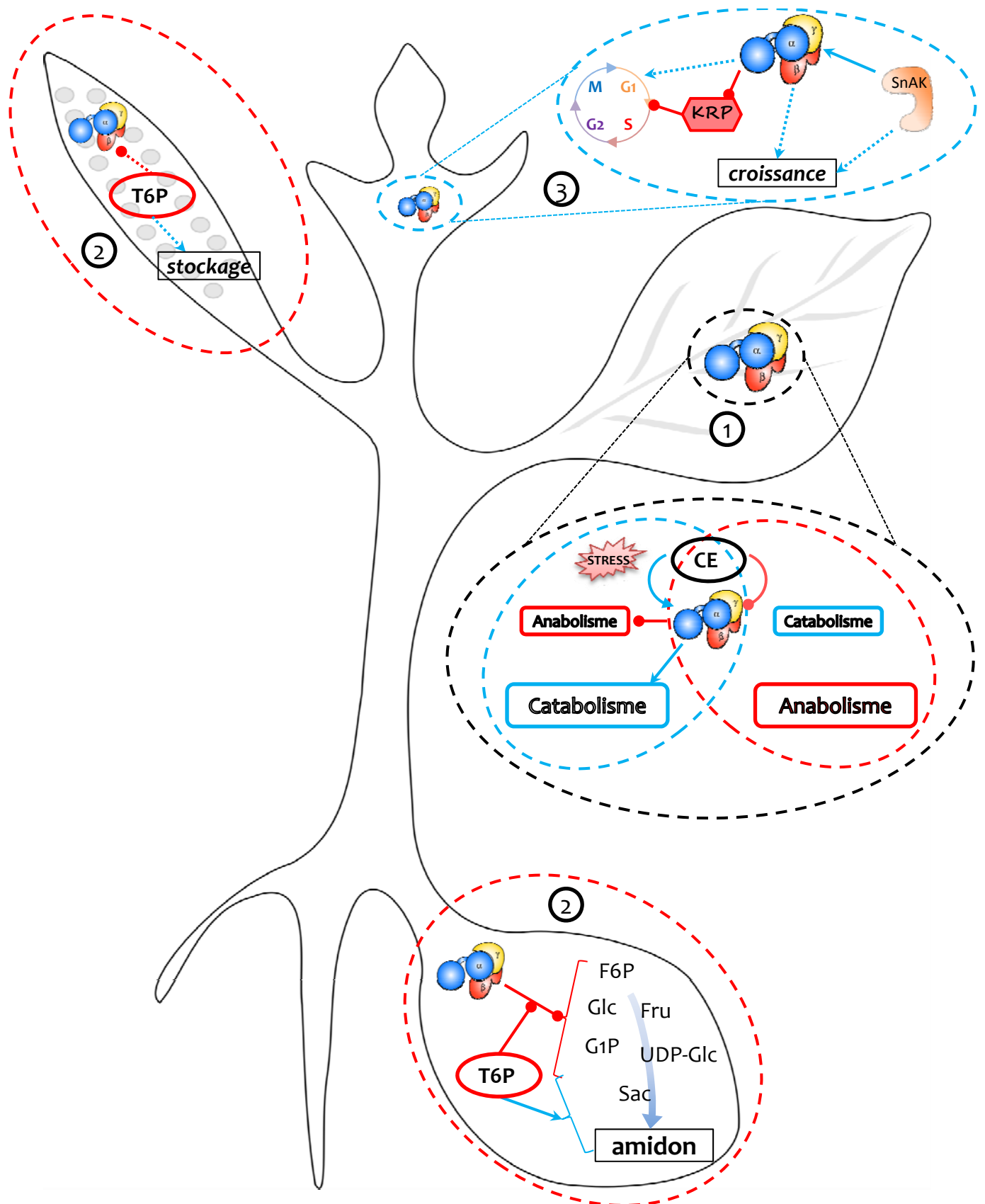
faveur de l'inhibiteur du cycle. Dans ces conditions, les phénotypes observés s'expliqueraient aisément par une incapacité des cellules concernées à accomplir un cycle cellulaire complet. La surexpression d'*AtSnRK1α1* dans ces mêmes plantes permettrait alors de rééquilibrer le rapport protéique *AtSnRK1α1:AtKRP6*. Ainsi, une plus grande fraction du pool d'inhibiteurs serait phosphorylée/inhibée et la situation physiologique reviendrait vers le *statu quo* observé chez des plantes sauvages. La tendance de retour vers le phénotype sauvage, observée dans ces doubles surexprimeurs et renforcée dans les plantes surexprimant la forme *AtKRP6<sup>T152D</sup>*, concorde avec cette hypothèse. Ainsi, la fonction « auxiliaire » mentionnée par D. G. Hardie, échappatoire manifeste au paradoxe du rôle de l'AMPK dans le cycle cellulaire, pourrait être réelle et n'opérer chez les plantes que dans les zones de division intense.

### Dans le contexte d'un stress

Un second point de vue serait de se placer dans un contexte de stress, dans lequel le rôle de SnRK1 et de son orthologue de mammifères sont cohérents. Si l'on reconsidère la double phosphorylation de *p27<sup>KIP1</sup>* par l'AMPK, il ne fait aucun doute que ceci joue, au moins dans un premier temps, en faveur de la transition G1-S et du déroulement du cycle cellulaire. D'autres éléments vont dans le sens de l'exclusion nucléaire de l'inhibiteur. Ainsi, La S6K, la SGK1 et AKT phosphorylent également *p27<sup>KIP1</sup>* avec un effet similaire (Vervoorts & Lüscher, 2008). La cellule est donc clairement en mesure, sous l'influence de signaux divers comme le suggère l'implication de kinases répondant à des voies antagonistes, de remobiliser *p27<sup>KIP1</sup>* vers le cytoplasme pour d'autres fonctions telles que la décision d'entraîner les cellules vers l'apoptose ou dans l'autophagie (Liang et al., 2007), ou une implication dans la dynamique du cytosquelette (Besson et al., 2004, 2008; Godin et al., 2012). Les contextes sous-jacents sont ceux liés d'une part au déclenchement de mécanismes de secours extrêmes (apoptose et/ou autophagie) en cas de stress importants et d'autre part à la perte d'adhésion et de mobilité cellulaire, prémices de dégénérescence cellulaire allant jusqu'à la prolifération de cellules cancéreuses. Il n'est pas exclu que de tels mécanismes existent chez les plantes. Bien que nos expériences ne montrent pas de relocalisation cytoplasmique de KRP6 (variant *AtKRP<sup>T152D</sup>*), il n'est pas exclu que d'autres modifications post-traductionnelles (engendrées ou non par SnRK1) pourraient conduire KRP6 vers d'autres fonctions.

### 5.2. To be stressed or not to be...

Depuis deux décennies, la famille de kinases SNF1/AMPK/SnRK1 s'est imposée comme véritable jauge régulatrice du métabolisme (Carling et al., 2011; Hardie et al., 2012). Les complexes



**Figure 92. Schéma intégratif des rôles des complexes SnRK1 à l'échelle de la plante entière.** Le rôle « classique » de régulateur du métabolisme des complexes SnRK1 en réponse à un stress, observé dans les organes végétatifs (1), ne serait ni à l'œuvre dans les organes puits (2) où la régulation par le T6P en faveur de l'anabolisme et du stockage prévaudrait, ni dans les zones de division intense (3) où ils agiraient en faveur de la division.

CE, charge énergétique; Fru, fructose; F6P, Fru-6-phosphate; Glc, glucose; G1P, Glc-1-phosphate; SnRK1, SNF1-related kinase 1; T6P, tréhalose-6-phosphate

SnRK1 de plantes ne font pas exception à ce dogme (Polge & Thomas, 2007; Robaglia et al., 2012). Cependant l'engouement scientifique suscité par ces protéines essentielles dans l'intégration et la mise en place de réponses à l'échelle cellulaire et de l'organisme entier chez l'animal, a permis de pointer de nouvelles cibles et fonctions jusqu'alors insoupçonnées pour cette famille de régulateurs. La complexité d'étude de ces trimères a contraint les groupes s'intéressant à cette problématique à disséquer et tenter de simplifier les systèmes d'études. Ainsi, l'utilisation de lignées cellulaires ou le cantonnement à l'échelle d'un seul organe (muscle squelettique, coeur, hypothalamus, foie...) chez l'animal, ou encore l'utilisation de protoplastes ou l'attention particulière vers les organes puits (tubercule de pomme de terre, grain de maïs) chez la plante, ont apporté de nombreuses données qu'il est désormais indispensable d'intégrer à l'échelle de l'organisme entier, sans quoi de nombreuses incohérences font surface. Dès lors, la notion de stress n'est plus à associer systématiquement aux complexes SNF1.

Ainsi, considérant l'ensemble des données présentées dans cette thèse, voici dans quel contexte nous proposons que les complexes SnRK1 devraient être considérés (Figure 92).

En premier lieu, les conditions de stress activeraient ces hétérotrimères dans les tissus végétatifs où leurs grandes fonctions sur le métabolisme pourraient être exercées. Dans ce type de tissus (feuilles, tige, racines...), les complexes SnRK1 pourraient jouer leur rôle « classique » d'activateur du catabolisme et d'inhibiteur de l'anabolisme en réponse à un stress. Comme le précisent les travaux de Baena-González/Rolland *et al.* (2007), la phosphorylation n'est pas l'élément clé de l'activation des sous-unités catalytiques AtSnRK1 $\alpha$ 1. Cette observation est appuyée par deux résultats récents. D'une part nous avons montré que des complexes immuno-purifiés de feuilles de rosettes d'*Arabidopsis* ne peuvent être activés que d'environ 30% lorsqu'ils sont incubés avec la protéine recombinante GST-AtSnRK2. Ceci suggère qu'il existe un pool majoritaire de complexes phosphorylés « prêts-à-l'emploi » à l'intérieur de ces tissus. De plus, Martínez-Barajas et collègues (2011) précisent que malgré des teneurs en T6P variables de tissu à tissu, l'activité des complexes SnRK1 de blé ne varie pas lorsqu'elle est mesurée *in vitro* i.e. hors de son contexte environnemental intracellulaire. Tout ceci concorde avec notre hypothèse de l'existence d'une régulation métabolique des complexes, indépendante de l'activation directe par phosphorylation et particulière aux cellules végétales.

En second lieu, les zones méristématiques et/ou les organes puits pourraient être insensibles ou ne pas répondre aussi directement à ce dogme métabolique. SnRK1 pourrait y promouvoir la division cellulaire (cellules prolifératives) ou être exclue des mécanismes régulant les processus





de stockage (organes puits). Les zones de division intense ne représentent qu'une faible proportion de l'ensemble des tissus de la plante, il est donc possible de considérer une certaine dualité de fonction des complexes SnRK1 appuyée par le fait que plusieurs complexes, avec des compositions  $\alpha/\beta/\gamma$  différentes, co-existent chez les plantes et pourraient être associés à des fonctions distinctes (Polge & Thomas, 2007; Polge et al., 2008). Puisqu'il est admis que la survie des organismes en cas de danger/stress passe par une division cellulaire très active, spécialement au niveau des organes reproducteurs, cette hypothèse prend alors tout son sens. Plus largement, la voie SnAK/SnRK1 pourrait jouer un rôle dans les stades cruciaux du développement, telle que la transition hétérotrophie/autotrophie de la jeune plantule ou la remobilisation de réserves, comme le suggèrent les résultats préliminaires obtenus dans le chapitre II.

A l'image de certaines incompréhensions émanant de récents travaux et impliquant les complexes AMPK dans de nouvelles fonctions intracellulaires étroitement liées au statut cellulaire (conditions normales ou de stress, statut cyclant ou non des cellules, organe étudié...), les complexes SnRK1 nécessitent qu'un intérêt particulier soit accordé aux modèles d'étude, à l'échelle considérée, à l'état développemental et aux conditions de croissance des végétaux où ils sévissent.

### 5.3. Perspectives

Les perspectives de ce travail sont nombreuses et passionnantes. Des propositions à court et moyen termes concernant spécifiquement chacun des trois chapitres ont déjà été formulées. En considérant les réflexions plus générales présentées ci-dessus, des pistes d'étude à plus long terme peuvent être proposées. Pour cela, des systèmes d'étude déjà éprouvés sont à privilégier. Ainsi, l'utilisation de protoplastes d'*Arabidopsis* offre bon nombre d'avantages. La surexpression transitoire s'y effectue rapidement et peut être adaptée à nos questions. Ainsi, un crible des différents membres de la famille KRP présentant des sites de phosphorylation prédits pourrait être mis en place, permettant de révéler l'existence *in cellulo* de ces événements de phosphorylation, soit par le biais de l'utilisation d'anticorps anti-site phosphorylé, soit par spectrométrie de masse. Une autre possibilité d'exploitation de cette approche est la co-surexpression de plusieurs sous-unités des complexes  $\alpha\beta\gamma$  dans des protoplastes d'*A. thaliana*. L'utilisation notamment de variants de la sous-unité  $\gamma$ , mutés dans les résidus conservés parmi ceux importants pour la fixation des adénylates, permettrait de comprendre dans quelle mesure et de quelle façon l'AMP, l'ADP, l'ATP et éventuellement d'autres adénylates se fixent et agissent sur l'activité des complexes SnRK1. Il a été montré que la surexpression ciblée d'une sous-unité



chez l'animal prenait le dessus sur les formes endogènes et qu'ainsi, les réponses observées étaient directement imputables à la forme imposée. Une fois encore, la complexité inhérente à l'étude des complexes SnRK1 impose des limites à ce système. Ainsi, il est probable que ces protoplastes constituent un environnement constamment activateur puisqu'en situation de stress continu. De plus, la  $\beta$ -myristoylation des sous-unités de type  $\beta$  indique que la régulation des hétérotrimères implique la membrane plasmique, élément perturbé *de facto* dans des protoplastes. Enfin, cette approche n'offre pas d'accès aux variétés de tissus de la plante, sauf si, comme cela a été fait dans notre laboratoire (cellules du mésophylle), les cellules générant ces protoplastes sont spécifiquement choisies (feuilles jeunes ou âgées, racines...).

L'un des grands pans non exploité chez les végétaux à ce jour est la production de trimères recombinants. C'est sans conteste le verrou technique qui, une fois débloqué, a offert chez la levure et les animaux les données les plus précises et exhaustives des mécanismes moléculaires de régulation de ces complexes. La production de tels complexes recombinants chez les végétaux permettrait de répondre à de nombreuses questions parmi lesquelles : 1) quelles compositions  $\alpha\beta\gamma$  sont capables de s'assembler pour former des trimères ? 2) des trimères de composition  $\alpha\beta\gamma$  diverses répondent-ils différemment aux régulations par les kinases amont, les adénylates et le citrate ? 3) existe-t-il des sites de fixation des adénylates sur les sous-unités SnRK1 $\gamma$  et SnRK1 $\beta\gamma$  et sont-ils comparables à ceux de SNF4 et de l'AMPK $\gamma$  ? 4) les sous-unités spécifiques des plantes SnRK1 $\beta_3$  et SnRK1 $\beta\gamma$  entraînent-elles des régulations particulières des complexes les comportant ? Des analyses biochimiques ainsi, bien entendu, que la détermination de structures apporteraient de nombreuses réponses à ces questions. L'utilisation de vecteurs tricistroniques porteurs des séquences codantes des 3 sous-unités  $\alpha\beta\gamma$  pourrait déverrouiller les barrières techniques rencontrées lors de ce travail mais c'est très probablement l'utilisation d'autres systèmes de production (telles que les cellules d'insectes COS-g) qui semble être la stratégie la plus prometteuse.

D'autres approches, à l'échelle de la plante entière, peuvent être proposées. Les double mutants homozygotes *snak1snak2* seront un outil précieux, d'une part pour comprendre dans quelles conditions et environnement les protéines AtSnAK1 et 2 sont impliquées dans l'activation de SnRK1 et pour rechercher les autres acteurs se substituant à ces kinases, et d'autre part pour comprendre l'implication de ces protéines dans la transition hétérotrophie/autotrophie et l'allocation des réserves carbonées de la jeune plantule. A plus grande échelle, des analyses du phosphorylome de très jeunes plantules sauvages ou mutées dans les gènes AtSnAK1 et/ou AtSnAK2 permettraient de connaître de façon exhaustive les cibles de la voie SnAK/SnRK1.



Comme nous l'avons suggéré dans notre modèle global, les fonctions des complexes SnRK1 pourraient varier selon la localisation tissulaire et le statut développemental de la plante. Il serait intéressant de relier le modèle d'inhibition par le T6P à ces fonctions variables. Les profils métaboliques en sucres de différents organes ou tissus pourraient suggérer des liens logiques entre la présence de T6P (en considérant le rôle de l'intermédiaire encore inconnu et nécessaire à l'inhibition) et l'activité de SnRK1. Par exemple, une étude a montré que dans des tubercules de pomme de terre les quantités de nombreux sucres (amidon, saccharose, fructose, glucose, G1P...) varient positivement avec les niveaux de T6P et donc inversement à l'activité de SnRK1 (Debast et al., 2011).

Enfin, l'hypothèse de fonctions inédites dans les zones de division intenses telles que le méristème apical ou le méristème racinaire pourrait être étudiée en surexprimant ou éteignant de façon tissu-spécifique les kinases SnRK1 $\alpha$ 1/2 (utilisation de promoteurs de gènes spécifiquement exprimés dans les différentes couches cellulaires par exemple). L'observation des conséquences de ces modulations sur la division cellulaire *in planta* confirmerait les résultats présentés dans le chapitre III et dévoilerait éventuellement d'autres rôles liés à cette relation entre régulation du métabolisme et prolifération cellulaire.



# *Matériel et Méthodes*

**Tableau 7. Récapitulatif des conditions de production des différentes protéines recombinantes.**

Protéine(s)	Plasmide(s)	Milieu de culture	Température (°C)		DO <sub>600nm</sub> d'induction	Concentration en IPTG (µM)	Durée de production
			Avant induction	Après induction			
GST-AtSnRK1α1/2	pDEST15		37		0,4	300	4h
GST-AtSnAK1/2	pDEST15		37		0,4	300	4h
GST-AtKRP6/7	pDEST15		37		0,8 - 0,9	500	1h30
Trimères « αβ3βγ » et « αβ1γ »	pET21-d ou pDEST17 (α) et pACYCDuet-1 (β + γ)	LB ZYM5052	37	25	0,4 milieu auto-inductif	100	36h



## 6. MATERIEL ET METHODES

### 6.1. Matériel biologique

#### Matériel végétal

##### *Arabidopsis thaliana*

Tous les travaux sur plantes effectués pendant cette thèse ont été réalisés avec l'écotype Columbia (Col-0) d'*Arabidopsis thaliana*.

Le mutant (SALK 015230, AtSnAK1), issu de la collection du Salk Institute (Alonso *et al.*, 2003), a été généré par insertion de l'ADN-T du vecteur pDAP101 dans la séquence du gène At5g60550 (SnAK1).

Le mutant (GABI-KAT 713C09, AtSnAK2), issu de la collection du Gabi-Kat (Rosso *et al.*, 2003), a été généré par insertion de l'ADN-T du vecteur pAC106 dans la séquence du gène At3g45240 (SnAK2).

Les conditions de culture varient en fonction de l'espace de culture :

**Serre :** les plantes, directement semées sur terreau, sont cultivées en jours courts (8h de photopériode à 150 $\mu$ E, 21°C et 70% d'hygrométrie le jour ; 17°C et 65% d'hygrométrie la nuit) pendant 3-4 semaines avant d'être transférées en jours longs afin d'induire la floraison (16h de photopériode, 21°C et 70% d'hygrométrie le jour ; 17°C et 65% d'hygrométrie la nuit).

**Chambres de culture terreau :** en fonction de l'expérience, les plantes sont soit cultivées en jours courts (8h de photopériode à 150 $\mu$ E, 20°C et 65% d'hygrométrie ; 18°C et 65% d'hygrométrie la nuit), soit directement placées en jours longs (16h de photopériode, 20°C et 65% d'hygrométrie ; 18°C et 65% d'hygrométrie la nuit) afin d'accélérer le développement des plantes.

**Chambre de culture *in vitro* :** les plantes sont cultivées en jours courts (8h de photopériode à 150 $\mu$ E, 20°C ; 18°C la nuit).

##### *Suspension cellulaire de tabac Bright Yellow-2 (BY-2)*

La suspension cellulaire BY-2 (Nagata *et al.*, 1992) est cultivée dans un milieu Murashige et Skoog modifié à 25°C, à l'obscurité et sous agitation constante (140rpm). Elle est maintenue par un repiquage hebdomadaire.

**Milieu de culture BY-2 :** Murashige & Skoog Basal Salt Mixture + Vitamines 4,33g.L<sup>-1</sup>, saccharose 30g.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200mg.L<sup>-1</sup>, MES 2g.L<sup>-1</sup>, pH5,6. Autoclavage 20min à 115°C, 2,4-D 4,5 $\mu$ M.

##### *Souches bactériennes*

Les souches d'*Escherichia coli* suivantes ont été utilisées:

**DH5 $\alpha$  :** F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 8odlacZ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>),  $\lambda$ <sup>-</sup>. Cette souche (Hanahan, 1983) a été utilisée pour tous les clonages à l'exception de ceux des plasmides Gateway®.



**DB3.1** : F<sup>-</sup> gyrA462 endA1 glnV44 (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm<sup>r</sup>) xyl5 Δleu mtl1. Cette souche (Hanahan, 1983) a été utilisée lors de la propagation des vecteurs Gateway® lors des clonages des plasmides Gateway® contenant la cassette *ccdb*.

**BL21 (DE3)** : F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sup>B</sup>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*]). Cette souche (Studier and Moffatt, 1986) a été utilisée pour toutes les productions de protéines recombinantes. Elle contient le plasmide psBET, qui porte le gène de l'ARNt rare de l'arginine chez *E. coli* (Schenk et al., 1995).

Les bactéries sont cultivées à 37°C (excepté pour certaines conditions de production détaillées dans le tableau 7) sous agitation (180rpm) dans du milieu LB liquide (ou ZYM5052 pour la production des trimères recombinants), ou étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB gélosé. Les antibiotiques *ad hoc* sont ajoutés si nécessaires.

**Milieu LB liquide** : LB Broth Base (Life Technologies) 20g.L<sup>-1</sup>. Autoclavage 20min à 121°C.

**Milieu LB solide** : LB agar (Life Technologies) 32g.L<sup>-1</sup>. Autoclavage 20min à 121°C.

### Plasmides

Les cartes, caractéristiques et sites de clonages des plasmides sont fournis en annexe I.

#### Plasmides utilisés pour les clonages

**pGEM-T** : ce plasmide (Promega®) est utilisé pour le clonage de produits PCR amplifiés par la TflI. Il permet une double sélection : la résistance à l'ampicilline et l'α-complémentation.

**pENTR-2B** : ce plasmide est un vecteur d'entrée du système Gateway® (Invitrogen) et confère la résistance à la kanamycine. Il possède un site de clonage multiple permettant l'insertion d'une séquence nucléotidique par restriction.

**pDONR201** : ce plasmide est un vecteur d'entrée du système Gateway® (Invitrogen). La séquence nucléotidique d'intérêt est insérée par recombinaison. Il confère la résistance à la kanamycine et également au chloramphénicol avant la recombinaison.

**pMA** : ce plasmide est le vecteur fourni par la société GeneArt (Life Technologies) dans lequel ont été clonées les séquences optimisées des gènes *AtSnRK1α1* et *AtSnRK1α2*.

#### Plasmides utilisés pour la production de protéines recombinantes chez *E. coli*

**pDEST15 / pDEST17** : ces plasmides (Invitrogen) sont des vecteurs destinataires du système Gateway®. Ils permettent la production de protéines fusionnées à la GST (pDEST15) ou à 6 histidines (pDEST17) à leur extrémité N-terminale. Ils confèrent la résistance à l'ampicilline.

**pET21-d** : ce plasmide (Invitrogen) permet la production d'une protéine recombinante fusionnée à l'étiquette T7 à l'extrémité N-terminale ou à 6 histidines à l'extrémité C-terminale. Il confère la résistance à l'ampicilline.

**pACYCDuet-1** : ce plasmide (Invitrogen), porteur de deux sites multiples de clonage (MCS), permet la production de deux protéines recombinantes simultanément. Les deux MCS sont

**Tableau 8. Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail.**

<b>Gène</b>	<b>Nom</b>	<b>Orientation</b>	<b>Séquence (5'-3')</b>
<i>Oligonucléotides utilisés pour les clonages dans le vecteur pACYCDuet-1</i>			
<b>AtSnRK1α1</b>	TGa1opt-F1	Sens	ATGGATGGTAGCGGCACCGGTA
	TGa1opt-R1	Antisens	TTACAGAACACGCAGCTGTGCCA
<b>AtSnRK1α1</b>	TGa2opt-F1	Sens	ATGGACCATTCAAGCAATCGTT
	TGa2opt-R1	Antisens	TTAAATCACACGCAGTTCGGTC
<b>AtSnRK1β1</b>	TGb1Bam5	Sens	GGATCCATGGGAAATGCGAACGG
	TGb1Sal3	Antisens	GTCGACTTACCGTGTGAGCGGTT
	TGb1MED-R1	Antisens	AAGGATCGCCGCCATTAGATCTC
<b>AtSnRK1β3</b>	TGb3Pvu5	Sens	CGATCGATGAACAGTCAAAATCC
	TGb3Kpn3	Antisens	GGTACCTCAAACATTGGCGCTCC
<b>AtSnRK1γ</b>	TGgPvu5	Sens	CGATCGATGGCGACTGTTCCGGA
	TGgXho3	Antisens	CTCGAGTCAGACTCGGTAGTTTT
	TGgMED-R1	Antisens	TAGCTTAGCTCCGGGCTCGACA
<b>AtSnRK1βγ</b>	TGbgBam5	Sens	GGATCCATGTTTGGTTCTACATT
	TGbgSal3	Antisens	GTCGACTCAAAGACCGAGCAGGA
<i>Oligonucléotides utilisés pour le géotypage des mutants snak1/2</i>			
<b>AtSnAK1</b>	TGS1ProSKgen1	Sens	TGCGGGATATTGTTACTGGAC
	TGS1TerSKgen1	Antisens	GTCCTGAAGAGTATCCGCAAG
	LBa1SK	Sens	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
<b>AtSnAK2</b>	TGS2ProGKgen1	Sens	CGGTATTATCAACGGGTTGTG
	TGS2TerGKgen1	Antisens	CATGGTGACATCAAACCTGAC
	o8409 LB-GABI-kat	Sens	ATATTGACCATCATACTCATTGC
<i>Oligonucléotides utilisés pour les PCR semi-quantitatives sur les mutants snak1/2</i>			
<b>AtSnAK1</b>	Pleinelongueur-F	Sens	GGTAGTAGAAACCAACAATCGCCTAAG
	Pleinelongueur-R	Antisens	GTTAGGATCTGAGGTTTCAGAGATCC
	Before-R	Antisens	GATACATCAGTCCAGTAACAATATC
	After-F	Sens	CAGGTATAACGTATAGTGGCAGAGC
<b>AtSnAK2</b>	Pleinelongueur-F	Sens	GTGGCTCTGAGAGATCAAGACATTC
	Pleinelongueur-R	Antisens	GGTTTTGATCTTCTTCTTCAGC
	Before-R	Antisens	GGTACATGAGGCCGCAACTACATCG
	After-F	Sens	GTTGATAATACCGGAAGGACTCAATCCTCG
<b>TCTP</b>	TCTP_F	Sens	GCGAAGAAGATCAAGCTGTC
	TCTP_R	Antisens	GGTTAGTTGAACCCTCCTTG

placés sous le contrôle du même promoteur de la T7 polymérase tandis que chacun possède un site de terminaison propre. Chaque CDS (« Coding DNA Sequence ») est insérée en aval d'un site de liaison ribosomique (rbs). Le vecteur pACYCDuet-1 a été utilisé pour les essais de production des trimères recombinants.

### **Plasmides utilisés pour la technique de BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation)**

**pUC-SPYNE et pUC-SPYCE.** Ces vecteurs ont été fournis par K. Harter (Tübingen University, Allemagne). Ils permettent l'expression transitoire de protéines de fusion avec les acides 1 à 155 et 156 à 239 respectivement de la « Yellow Fluorescent Protein » (YFP) en position C-terminale de la protéine d'intérêt. Ils confèrent la résistance à l'ampicilline.

### **Anticorps**

**Anti-AtSnRK1 $\alpha$ 1 :** ces anticorps polyclonaux de lapin ont été obtenus au laboratoire par J-P Bouly (Bouly, 1998) et sont dirigés contre le domaine régulateur de SnRK1 $\alpha$ 1 lié à la GST. Ils ont été utilisés à une dilution de 1/5000 pour les expériences de western blot et tels quels lors des expériences d'immunoprécipitation.

**Anti-GST :** ces anticorps (OB03, Calbiochem) ont été utilisés à une dilution de 1/300 pour les expériences de western-blot.

**Anti-HIS :** ces anticorps (OB05, Calbiochem) ont été utilisés à une dilution de 1/300 pour les expériences de western blot.

**Anticorps secondaires :** ces anticorps anti IgG de lapin ou de souris (fournis avec le kit ECL de Perkin Elmer) couplés à la « horseradish peroxidase » (HRP) ont été utilisés pour les expériences de western blot à raison de 0,5 $\mu$ L/3mL.

### **Oligonucléotides**

Tous les oligonucléotides utilisés au cours de ce travail sont listés dans le tableau 8.

Afin de faciliter les clonages en vue de la production des trimères recombinants, les séquences codantes des sous-unités du complexe ont été amplifiées avec des oligonucléotides portant des sites de restriction à leurs extrémités.

## **6.2. Méthodes**

### **Techniques de biologie moléculaire**

#### **Amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

Cette réaction permet d'amplifier de façon exponentielle une faible quantité d'ADN double brin. L'amplification des séquences d'intérêt est réalisée avec la Taq polymérase ou la TflI (Promega®). Le volume final de 20 $\mu$ L comprend 0,2 $\mu$ L de TAQ polymérase recombinante produite au laboratoire ou 1U de TflI, 0,1 $\mu$ M de chaque amorce, 0,2mM de dNTP, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub> (cas de la TAQ) ou de MgSO<sub>4</sub> (cas de la TflI), 1X de tampon TAQ ou TflI ainsi que l'ADN matrice. Cette



réaction s'effectue à partir d'une matrice d'ADN plasmidique (10-100ng), d'ADN génomique (500ng) ou de 1-2µL d'un produit de réverse transcription réalisée dans 20µL à partir de 2µg d'ARN totaux. Les thermocycleurs utilisés sont des « GeneAMP PCR system 2700 » commercialisés par Applied Biosystems.

**Tampon TAQ 10X :** Tris-HCl 100mM (pH8,8), KCl 500mM, Triton 100X 1%

### Préparations plasmidiques

Les mini-préparations d'ADN plasmidiques sont réalisées grâce à la méthode de lyse alcaline décrite par Maniatis (Sambrook et al., 1989) à partir de 2mL d'une culture bactérienne >16h. Pour obtenir de grandes quantités d'ADN, les maxi-préparations sont effectuées selon le même protocole, à partir de 25mL de culture bactérienne.

### Digestions plasmidiques et purification de l'insert ou du vecteur

Les plasmides sont d'abord digérés avec les enzymes adéquates selon les indications du fournisseur. Afin de purifier le(s) produit(s) de la digestion, le mélange est au besoin déposé sur gel d'agarose 1%, TAE 0,5X, BEt 0,01%. La bande d'intérêt est découpée sous UV. La purification de l'ADN s'effectue selon le protocole de Li et collègues (2010) comme suit : ajouter 300µL de tampon NaI 6M pour 100mg de gel. Incuber à 70°C pendant 3min. Ajouter 10µL de gel de silice et incuber 2min à température ambiante. Centrifuger 10sec à 16000g et écarter le surnageant. Laver le gel de silice en ajoutant 500µL de solution de lavage et en vortexant. Répéter cette étape de lavage une fois. Centrifuger une nouvelle fois à 16000g et écarter les traces de liquide restant. Resuspendre dans 5 à 30µL d'eau stérile et incuber 2min à 70°C. Centrifuger à 16000g pendant 2min et conserver l'éluat d'ADN dans un nouveau tube.

**TAE X50 :** Tris-HCl 2M, Na<sub>2</sub>EDTA (pH8) 50mM, acide acétique glacial 5,71%

**Tampon de lavage :** Tris-HCl 10mM (pH7,5), NaCl 100mM, EDTA 1mM, éthanol 50%

### Ligation vecteur/insert

Les ligations sont réalisées dans un petit volume (10 à 15µL) avec un rapport insert/vecteur de 3/1 à 10/1 dépendant des tailles relatives en pb de chacun des fragments. Le mélange de ligation contient le vecteur, l'insert, du tampon ligase 1X et 1U de T4 DNA ligase (Promega). La ligation s'effectue sur la nuit dans un bain de glace fondante laissé la nuit à température ambiante. Les produits de ligation sont dessalés 45min sur filtre de nitrocellulose 25nm (Millipore®).

**Tampon ligase 1X :** Tris-HCl 30mM pH7,8, MgCl<sub>2</sub> 10mM, DTT 10mM, ATP 1mM

### Techniques de clonage Gateway®

Le système de clonage Gateway® est fondé sur la recombinaison site spécifique du phage λ et permet un clonage rapide d'une séquence d'intérêt dans de multiples vecteurs. Cette méthode de clonage se décompose en deux étapes : un premier clonage de la séquence d'intérêt dans un vecteur donneur (pENTR-2B) afin de créer un clone d'entrée (réalisé par restriction/ligation) et un





deuxième clonage par recombinaison entre les vecteurs d'entrée et destinataire pour créer le vecteur destinataire contenant la séquence d'intérêt (réaction LR).

Les CDS d'intérêt ont d'abord été sous-clonés dans le vecteur d'entrée pENTR-2B. La réaction LR a ensuite permis la recombinaison entre les sites *attL* du vecteur d'entrée et *attR* du vecteur destinataire. Lors de cette thèse, les vecteurs destinataires pDEST15/17 ont été utilisés pour la production de protéines d'intérêt chez *E. coli*. La réaction LR est réalisée dans un volume final de 10µL contenant 50fmol de chacun des deux vecteurs et 2µL de LRllI clonase™ enzyme mix additionné de tampon TE (pH 8). Le mélange réactionnel est incubé à 25°C pendant 1h puis la réaction stoppée par incubation à 37°C en présence de 1µL de protéinase K pendant 10min. Des bactéries compétentes adéquates sont finalement transformées avec 2µL de ce mélange.

### Préparation de bactéries électrocompétentes

Afin de préparer des bactéries *E. coli* compétentes pour l'électroporation, 50mL de LB liquide additionné lorsque cela est possible de l'antibiotique *ad hoc* sont inoculés avec 40µL de bactéries. Cette préculture est incubée sous agitation (180rpm) à 37°C pendant 12h puis diluée dans un litre de LB liquide. Cette culture est placée sous agitation (180rpm) à 37°C jusqu'à l'obtention d'une  $DO_{600nm}=0,4$ . La suspension bactérienne est centrifugée à 4000g pendant 20min à 4°C. Le culot bactérien obtenu est lavé 2 fois par 500mL d'eau glacée stérile puis une fois dans 50mL de glycérol 10% glacé stérile. Les bactéries sont remises en suspension dans 2mL (DH5α) ou 50mL (BL21) de glycérol 10% glacé stérile. Les bactéries compétentes pour l'électroporation sont finalement aliquotées par fractions de 40µL (DH5α) ou 100µL (BL21) et conservées au congélateur à -80°C.

### Transformation des bactéries par électroporation

Cent ng d'ADN plasmidique sont ajoutés à 40 (DH5α) ou 100µL (BL21) de bactéries électrocompétentes. Le mélange est placé dans une cuve à électroporation préalablement refroidie et soumise à un choc électrique de 2,5kV (électroporateur *E. coli* Pulser, BioRad). Après ajout rapide de 700µL de SOC, les bactéries sont incubées à 37°C pendant 40min avant d'être étalées sur milieu LB solide additionné de l'antibiotique *ad hoc*. Dans le cas d'*E. coli* DH5α transformées avec le vecteur pGEM-T, le milieu LB est additionné de X-gal (20mg/mL) et d'IPTG (0,1mM). Les cultures sont ensuite incubées à 37°C pendant 12h.

**Milieu SOC :** LB liquide additionné de glucose 3% (p/v)

### Extraction d'ADN génomique et géotypage

L'ADN génomique des plantes d'*A. thaliana* est extrait à partir d'une jeune feuille de rosette selon la méthode décrite dans (Edwards *et al.*, 1991). Une feuille de rosette de chaque plante à géotyper est prélevée dans un tube contenant une bille d'acier puis placée environ 1h à -80°C. Les feuilles sont ensuite broyées grâce à un vibro-broyeur à bille MM300 (Retsch). La poudre



obtenue est remise en suspension dans 400µL de tampon Edwards. Le mélange est centrifugé à 3200g pendant 15min à température ambiante.

Le surnageant est prélevé et 300µL d'isopropanol y sont ajoutés. Le mélange est une nouvelle fois centrifugé à 3200g pendant 15min à 4°C. Le culot obtenu est mis à sécher à l'étuve à 37°C pendant au moins 2h. L'ADN est enfin remis en solution dans 100µL d'eau stérile.

Les PCR de géotypage sont effectuées à partir de 2µL de cette solution d'ADNg.

**Tampon Edwards :** Tris-HCl 200mM (pH7,5), NaCl 250mM, EDTA 25mM, SDS 0,5%.

### Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits à partir de 30mg de boutons floraux d'*A. thaliana*, au TriZol selon les instructions du fournisseur (Invitrogen). Après extraction un dosage spectrophotométrique (260-280nm) au NanoDrop est effectué.

### Transcription-inverse des ARNm

La synthèse des premiers brins d'ADNc est réalisée à l'aide de la transcriptase inverse Improm II (Promega) selon les instructions du fournisseur à partir de 2µg d'ARN totaux.

### PCR semi-quantitative

Le gène TCTP, At3g16640, est utilisé comme gène de référence afin de vérifier l'efficacité de la reverse transcription ainsi que l'homogénéité des différents échantillons. Pour cela, une réaction de PCR est réalisée comme décrit précédemment avec les amorces TCTP-F et TCTP-R et 1,5µL de premier brin d'ADNc en utilisant le programme suivant : [(30sec à 94°C ; 30sec à 60°C ; 20sec à 72°C)x 25 cycles]. L'absence d'un transcrite pleine longueur et après l'insertion a été vérifiée par PCR pour les mutants SnAK1 (SALK 015230) et SnAK2 (GABI-KAT 713C09) ainsi que la présence éventuelle d'un transcrite avant l'insertion en utilisant 1,5µL de premier brin ADNc dans les conditions suivantes :

- **transcrit SnAK1 pleine longueur** avec le couple d'amorces *SnAK1pleinelongueur-F* et *SnAK1pleinelongueur-R* en utilisant le programme suivant : [(30sec à 94°C ; 30sec à 54°C ; 70sec à 72°C)x 30 cycles]. L'amplicon attendu est de 1158pb.
- **transcrit SnAK1 après l'insertion** avec le couple d'amorces *SnAK1After-F* et *SnAK1pleinelongueur-R* en utilisant le programme suivant : [(30sec à 94°C ; 30sec à 58°C ; 25sec à 72°C)x 30 cycles]. L'amplicon attendu est de 359pb.
- **transcrit SnAK1 avant l'insertion** avec le couple d'amorces *SnAK1pleinelongueur-F* et *SnAK1Before-R* en utilisant le programme « touch-down » suivant : [(30sec à 94°C ; 30sec à 59°C\* ; 40sec à 72°C)x 3 cycles \*avec -1°C à chaque cycle puis (30sec à 94°C ; 30sec à 56°C ; 40sec à 72°C)x 30 cycles]. L'amplicon attendu est de 662pb.
- **transcrit SnAK2 pleine longueur** avec le couple d'amorces *SnAK2pleinelongueur-F* et *SnAK2pleinelongueur-R* en utilisant le programme « touch-down » suivant : [(30sec à 94°C ; 30sec à 53°C\* ; 70sec à 72°C)x 3 cycles \*avec -1°C à chaque cycle puis (30sec à 94°C ; 30sec à 50°C ; 70sec à 72°C)x 30 cycles]. L'amplicon attendu est de 1128pb.
- **transcrit SnAK2 après l'insertion** avec le couple d'amorces *SnAK2After-F* et *SnAK2pleinelongueur-R* en utilisant le programme « touch-down » suivant : [(30sec à 94°C ; 30sec à 73°C\* ; 20sec à 72°C)x 5 cycles \*avec -1°C à chaque cycle puis (30sec à 94°C ; 30sec à 68°C ; 20sec à 72°C)x 30 cycles]. L'amplicon attendu est de 191pb.



- **transcrit SnAK2 avant l'insertion** avec le couple d'amorces SnAK2pleinelongueur-F et SnAK2Before-R en utilisant le programme « touch-down » suivant : [(30sec à 94°C ; 30sec à 63°C\* ; 40sec à 72°C)x 5 cycles \*avec -1°C à chaque cycle puis (30sec à 94°C ; 30sec à 58°C ; 40sec à 72°C)x 30 cycles]. L'amplicon attendu est de 633pb.

### Techniques de biochimie

#### Extraction de protéines totales de feuilles d'*A.thaliana*

Des feuilles de rosettes d'*A. thaliana* âgées d'environ 4 semaines sont broyées dans de l'azote liquide. La poudre obtenue est remise en suspension dans du tampon A glacé à raison de 1mL.g<sup>-1</sup> puis filtrée à travers du Miracloth. Les débris sont éliminés et les protéines clarifiées par ultracentrifugation à 100000g pendant 15min à 4°C. Le culot est ensuite resolubilisé dans un volume minimum de tampon A.

**Tampon A :** Hepes-NaOH 100mM pH 7,3, glycérol 5% (v/v), EGTA 10mM. Extemporaneément : DTT 10mM, cocktail d'antiprotéases (Sigma P9599) 0,1‰ (v/v), cocktail d'antiphosphatases (Sigma P2850) 0,1‰ (v/v)

#### Dosage de protéines

La concentration en protéines est estimée par absorbance de la solution à 280nm (longueur d'onde à laquelle les acides aminés aromatiques sont détectables) grâce à un spectrophotomètre (NanoDrop ND-1000).

Le dosage colorimétrique par la technique de Bradford (Bradford, 1976) permet de déterminer la concentration en protéines d'une solution. La solution de Bradford, un colorant de bleu de Coomassie G250 initialement rouge, se fixe en milieu acide aux résidus basiques et aromatiques des protéines, formant un complexe bleu absorbant à 595nm. Cinq à 10µL d'extrait protéique et 200µL de solution de Bradford sont incubés pendant 5min à température ambiante dans un volume final de 1mL. Une gamme étalon (de 1µg à 7µg) est préparée à partir d'une solution de SAB.

#### Purification des anticorps

Les protéines recombinantes GST-AtSnRK1α1 purifiées sont fixées par « cross-linking » sur de la résine « NHS- activated Sepharose 4 Fast Flow » (GE Healthcare : 17-0906-01) comme décrit précédemment (Tavares *et al.*, 2002). Après incubation des anticorps polyclonaux anti-AtSnRK1α1 (sérum) avec la résine pendant 10min à température ambiante, la colonne est lavée avec 5 BV (Bed Volume, Volume de résine) de PBS-1X. Les anticorps sont élués avec 2 BV d'acide citrique 0,1M à pH 2,8 puis insolubilisés par du sulfate d'ammonium (60% de saturation). Le culot obtenu après centrifugation (20000g pendant 10min à 4°C) est remis en solution dans du PBS-1X. La colonne est ensuite rincée abondamment avec du PBS-1X et stockée à 4°C dans ce tampon.

**PBS-10X :** NaCl 80g.L<sup>-1</sup>, KCl 2g.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14,4g.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,4g.L<sup>-1</sup>



### Immunoprécipitation des complexes AtSnRK1

Dans cette expérience, les complexes SnRK1 sont isolés à partir d'un extrait protéique total à l'aide d'anticorps anti-AtSnRK1 fixés à de la protéine A-Sépharose (pA-séph). Le protocole est adapté de (Jossier et al., 2009).

Préparation de la résine-anticorps : La protéine pA-séph est réhydratée dans 1mL de tampon d'immunoprécipitation (ip)-NaCl 150mM à 4°C sous rotation (15rpm) puis lavée deux fois à 4°C dans ce même tampon (centrifugation à 9000g pendant 1min), puis le culot est resuspendu dans 300µL de tampon ip-NaCl 150mM, avant d'être incubé avec les anticorps anti-AtSnRK1α1 à 4°C pendant au moins 1h sous rotation. Les anticorps non fixés à la protéine A sont éliminés par trois lavages successifs dans le même tampon avec remise en suspension de la résine (centrifugation à 9000g pendant 1min). Le culot est remis en suspension dans 300µL de tampon ip-NaCl 150mM.

Formation du complexe protéines-anticorps : Après addition d'un volume d'extrait protéique contenant 25µg de protéines totales (déterminés par dosage au Bradford, cf. 2.2) et de 300µL de tampon ip-NaCl 150mM, le mélange est incubé à 4°C pendant 3h sous agitation douce. Les protéines non retenues par les anticorps sont ensuite éliminées par 3 lavages dans le tampon ip-NaCl 1M, 1 lavage dans le tampon ip-NaCl 150mM puis 3 lavages dans 1mL d'Hepes-NaOH 50mM pH 7,3.

**Tampon d'immunoprécipitation 150mM / 1M NaCl** : Tris-HCl 50mM (pH 6,8), NaCl 150mM ou 1M, NaF 50mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM. Ajouter extemporanément : Triton 1% (v/v), DTT 1mM, cocktail d'antiprotéases (Sigma-Aldrich® : P9599) 0,1% v/v

### Préparation de la colonne d'immuno-affinité

Le principe de cette technique dite de « cross-linking » est de remplacer une interaction par liaisons hydrophobes par des liens covalents. La protéine A piège les anticorps (notamment les anti-AtSnRK1α1) et grâce à un agent bifonctionnel, le DMP (DiMethyl Pimelimidate HCl, Sigma : D8388), ce lien va devenir covalent. L'antisérum AtSnRK1α1 (4mL dans du PBS-1X) est dilué dans 9mL de tampon borate puis incubé à température ambiante avec de la protéine A-sépharose (4mL) sous agitation (sur roue à 15rpm) pendant 30min. Le culot de protéine A-sépharose est ensuite lavé par 10mL de tampon borate puis resuspendu dans 9mL de ce même tampon en présence de 20mM de DMP. Après incubation sous agitation (sur roue à 15rpm) pendant 30min à température ambiante, le culot de protéine A-sépharose est resuspendu dans 10mL de Tampon EA et maintenu sous agitation (sur roue à 15rpm) pendant 1h à température ambiante. Le culot de sépharose-protéine A-anticorps est enfin lavé abondamment par du PBS-1X et conservé dans ce tampon à 4°C jusqu'à utilisation.

**Tampon Borate** : Sodium tetraborate hydrate 200mM (pH9), NaCl 3M

**Tampon EA** : Ethanolamine 200mM (pH8)





### Purification de complexes AtSnRK1 par immuno-affinité

Le principe de la purification est fondé sur l'interaction par liaisons hydrophobes entre des épitopes d'AtSnRK1 $\alpha$ 1 et les anticorps. Ces liaisons sont fragilisées par un choc salin. Cela permet, en une seule étape, d'obtenir des extraits fortement enrichis en complexes AtSnRK1 actifs. La colonne est préalablement équilibrée avec 5 BV (« Bed Volume », Volume de Colonne) de Tampon A (cf. 2.2.). Environ 10g de rosettes (parties aériennes uniquement) d'*A. thaliana* sont utilisés pour préparer l'extrait protéique (cf. 2.2.). L'extrait concentré est mis au contact de la résine en réalisant 2 passages à débit lent (1 à 2 gouttes par seconde). Cette étape de fixation dure environ 40min. La colonne est ensuite lavée par 5 BV de Tampon A-NaCl (NB : pour l'échantillon analysé en tandem MS/MS, les lavages étaient de 20 BV). Enfin, les protéines sont éluées une première fois par 5 BV d'eau ultrapure, puis une seconde fois après incubation de la colonne avec 3 BV d'eau ultrapure pendant au moins 1h à température ambiante. Le rendement peut être amélioré grâce à une troisième élution par 3 BV d'eau ultrapure après incubation à 4°C pendant une nuit. Ces éluats sont concentrés sur Amicon Ultra® 10kDa (Millipore) jusqu'à un volume d'environ 150 $\mu$ L puis congelés à -20°C jusqu'à utilisation.

### Production de protéines recombinantes

Des précultures de 2 à 5mL de LB + antibiotiques *ad hoc* sont ensemencées à partir de bactéries transformées et sélectionnées sur milieu LB liquide + antibiotiques (cf. 2.1.).

Les cultures bactériennes sont réalisées dans des erlenmeyers de volume 5 fois supérieur au volume de culture pour permettre une bonne oxygénation des bactéries. Le milieu de culture (LB + antibiotiques *ad hoc*) est ensemencé à l'aide des précultures (5% volume de préculture / volume de milieu de culture), puis incubé sous agitation à 25°C ou à 37°C selon les protéines à produire (Tableau 7). L'évolution de la population bactérienne d'*E. coli* est suivie par turbidimétrie à  $\lambda=600$ nm. Lorsque la DO atteint la valeur requise, la synthèse protéique est induite par l'addition d'IPTG, un homologue non métabolisable du lactose et poursuivie en concentration et pendant des durées variables selon la protéine produite. Le détail des conditions de production de chaque protéine après optimisation est donné dans le tableau 7. En fin de période d'induction, la suspension bactérienne est centrifugée à 6000g pendant 35min à 4°C. Le culot bactérien est remis en suspension dans du tampon de lyse (2,5% de tampon par rapport au volume de culture bactérienne initiale) puis les cellules sont lysées par 3 passages dans une presse de French. Le lysat obtenu est centrifugé à 11000g pendant 40min, à 4°C. Le surnageant, contenant les protéines solubles, est récupéré et conservé, tandis que le culot est solubilisé dans de l'urée 8M.

**Tampon de lyse :** HEPES-NaOH 100mM (pH 7,5), glycérol 10% (v/v), NaCl 300mM. Extemporaneément : DTT 10mM, une pastille d'antiprotéases (Roche® complete mini EDTA free) pour 30mL de solution



**Purification de protéines recombinantes porteuses d'étiquette GST ou 6xHIS par chromatographie d'affinité GSH-agarose ou Ni-agarose**

La fraction soluble obtenue lors de la production de protéines recombinantes (cf. paragraphe précédent) est soumise à une chromatographie d'affinité GSH (Sigma : G4510) ou Nickel (Ni) (Sigma : H9914) selon l'étiquette fusionnée à la protéine produite. Les purifications par chromatographie d'affinité GSH et Ni permettent de sélectionner des protéines contenant respectivement une étiquette GST (Glutathion-S-Transférase ; CDS cloné dans pDEST15) ou une étiquette 6 x Histidine (CDS cloné dans pDEST17, pACYCDuet ou pET21-d) dans un échantillon de protéines totales bactériennes. Dans le premier cas, la GST se lie à son substrat naturel, le GSH, séparant ainsi la protéine chimérique du reste des protéines de l'échantillon ; dans le second cas, le nickel chélate les histidines de l'étiquette retenant préférentiellement les protéines riches en histidines. La protéine étiquetée est ensuite éluée respectivement par le GSH 15mM ou par un compétiteur du noyau aromatique des histidines, l'imidazole (Merck : 4716). Les purifications sont effectuées selon les protocoles fournis par le fabricant avec les modifications suivantes pour le cas de la résine Ni : (1) équilibration en Hepes-NaOH 100M, pH7,5, (2) blocage pendant 1h (i.e. 2 à 3 passages, débit lent) à température ambiante ou sur roue (15rpm) pendant 1h30 à 4°C dans le cas des complexes recombinants ; (3) lavage dans Hepes-NaOH 100M, pH7,5, imidazole 20mM, NaCl 150mM ; (4) élution par 5 BV d'imidazole 200mM puis 500mM.

Les concentrations en protéines de chaque fraction d'élution sont alors estimées par spectrophotométrie à 280nm au Nanodrop® (cf. 2.2). Seules les fractions présentant une concentration supérieure à 0,1µg.µL<sup>-1</sup> seront analysées.

**Electrophorèse de protéines**

Les protéines sont dénaturées dans du tampon de dissociation Laemmli à 95°C pendant 5min puis séparées par électrophorèse SDS-PAGE en gel d'acrylamide/bisacrylamide à 120V pendant 1h30 à 2h selon la teneur en polymère du gel (Laemmli, 1970). Pour la réalisation d'électrophorèses natives, le protocole est identique, le SDS retiré des solutions décrites ci-dessous et la migration s'effectue pendant 4h à 4°C.

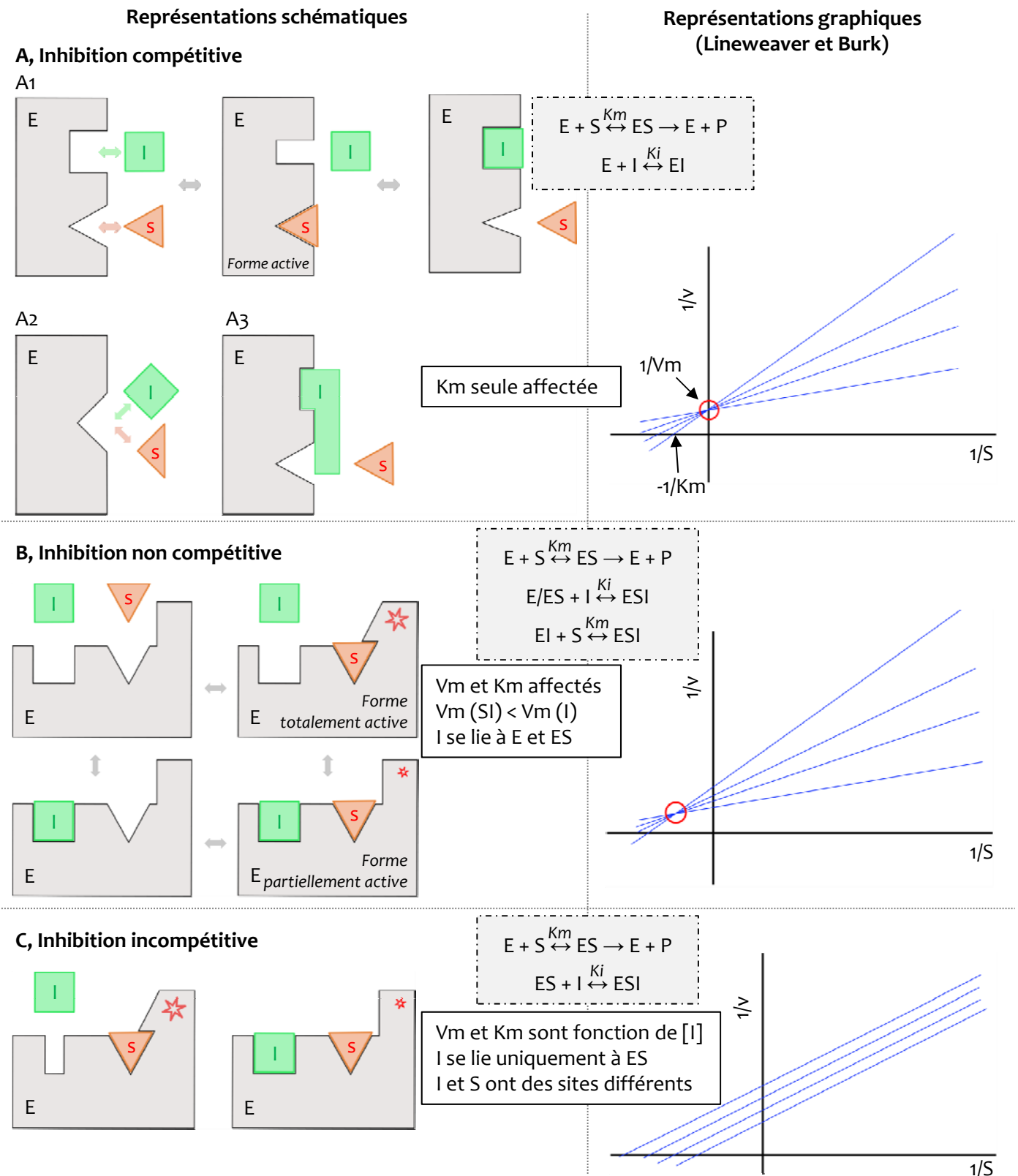
**Tampon de dissociation Laemmli :** Tris-HCl 62,5mM (pH6,8), SDS 2% (m/v), glycérol 10% (v/v), β-mercaptoéthanol 0,2% (v/v), bleu de bromophénol 10ppm

**Composition du gel :** Tris-HCl 125mM (pH6,8), polyacrylamide 4% (v/v) (gel de concentration) ou Tris-HCl 375mM (pH8,8), polyacrylamide 10% (gel de séparation), SDS 0,1% (p/v), TEMED 0,05% (v/v), APS 0,025% (p/v)

**Tampon de migration :** Tris-base 25mM (pH8,3), glycine 192mM, SDS 0,1% (p/v)

**Coloration au bleu de Coomassie R250**

Cette méthode permet de détecter des protéines lorsque la quantité est supérieure à 100ng. Le bleu de Coomassie R250 se lie de façon non covalente aux fonctions NH<sub>3</sub><sup>+</sup> et aux groupes non



**Figure 93. Représentations schématiques et graphiques des différents types d'inhibition.** (A) Description de l'inhibition compétitive. A1 A2 et A3 représentent trois différents cas de figure. (B) Description de l'inhibition non compétitive. C, Description de l'inhibition dite incompétitive. Les schémas à gauche représentent les différents complexes formés par l'enzyme (E, en gris), le substrat (S, en rouge) et l'inhibiteur (I, en vert). L'étoile rouge sur l'enzyme traduit un site catalytique actif. Les équations minimales correspondant à chaque type d'inhibition sont décrites dans les cadres gris et leurs principales caractéristiques dans les cadres blancs. Les graphiques à droite correspondent aux représentations typiques en doubles inverses (1/vitesse en fonction de 1/S) d'après Lineweaver et Burk.

polaires des protéines. Après SDS-PAGE, le gel est coloré et fixé au moins 30min dans une solution de coloration puis placé au moins 2h dans une solution de décoloration.

**Solution de coloration :** Ethanol 45%, acide acétique 10% dans l'eau ultrapure, bleu de Coomassie R250 0,2% (p/v)

**Solution de décoloration :** Ethanol 25%, acide acétique 7% dans l'eau ultrapure

### Western-blot

Après SDS-PAGE, les protéines sont transférées depuis le gel sur une membrane PVDF (polyvinylidène difluoride, Sigma : P2938) en utilisant un appareil « Transblot Semi-Dry transfert cell » (Bio-Rad) selon les instructions du fournisseur. Le transfert de type semi-sec est réalisé à 15V pendant 45min dans du tampon de transfert.

Après transfert, les protéines sont révélées par immunodétection avec des anticorps spécifiques en utilisant un SNAP-i.d. (Millipore). Cet appareil permet de réduire les volumes de solution utilisés et le temps imparti pour cette manipulation. De plus, ce système permet de faire passer les tampons utilisés au travers de la membrane (vide d'air). L'installation de la membrane dans le boîtier s'effectue selon les recommandations du fabricant. La membrane est saturée avec une solution de blocage pendant 10min. Une étape de pré-hybridation avec les anticorps primaires dirigés contre la protéine (ou l'étiquette) d'intérêt de 15min précède l'hybridation avec les anticorps secondaires d'une durée de 15min également. Dans le cas de protéines fusionnées à l'étiquette GST, les deux anticorps (primaire et secondaire) sont pré-incubés pendant 15min dans 10mL de solution de blocage et l'hybridation s'effectue ensuite directement avec ce mélange pendant 15min. Finalement, la membrane est lavée avec 30mL de solution de lavage. Enfin, une révélation par chimioluminescence (ECL, Perkin-Elmer : NEL103001EA) est réalisée.

**Tampon de transfert :** Tris-base 25mM, glycine 192mM, SDS 0,1% (v/v), éthanol 20%

**Tampon de blocage :** PBS1X, SAB 1% (p/v), Tween-20 0,1% (p/v)

**Solution de lavage :** PBS1X, Tween-20 0,1% (p/v)

### Mesure d'activité kinase

L'activité kinase est mesurée grâce à la phosphorylation d'un peptide synthétique reconnu par la kinase étudiée : peptide AMARA (AMARAASAAALARRR) (Dale *et al.*, 1995) pour AtSnRK1 et peptide T-loop (DFGLSNIMRDGHFLKTSCGSPNYAAPERRR) pour AtSnAK, tous deux présentant trois arginines à l'extrémité C-terminale qui permettent l'isolement du peptide en fin de réaction.

L'activité est réalisée en présence de 2μCi de <sup>32</sup>P-ATP (PerkinElmer® 10Ci.mmol<sup>-1</sup>, 2mCi.mL<sup>-1</sup> BLU002250UC ou BLU002500UC) et du phosphopeptide AMARA (200μM) dans le tampon d'activité kinase dans un volume final de 25μL à 30°C pendant 30min (pour AtSnRK1α1 recombinante), 20min (pour les complexes AtSnRK1 purifiés) ou 1h30 (phosphorylation du peptide T-loop par AtSnAK recombinante). Deux fractions aliquotes de 10μL du milieu réactionnel sont prélevées et déposées sur des carrés (2cm<sup>2</sup>) de papier chromatographique Whatman P81 « cation-exchanger ». Ceux-ci sont immédiatement plongés dans des bains successifs d'acide

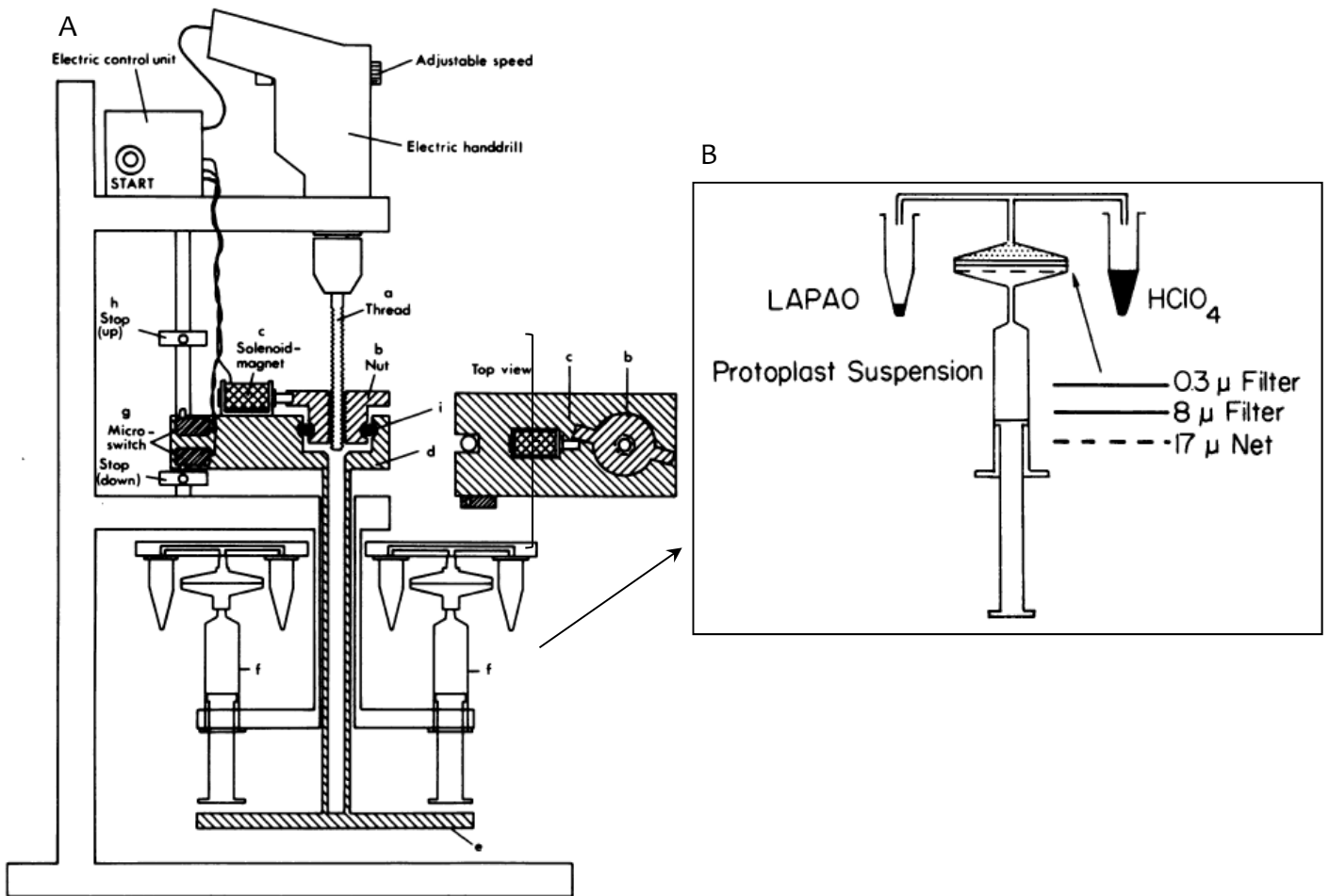


Figure 94. Système de filtration utilisé par Liley et collègues pour fractionner les différents organites à partir de protoplastes de blé. (D'après Liley et al., 1982). (A) Mécanisme complet sous pression permettant un fractionnement très rapide des organites. (B) Détail des filtres utilisés.

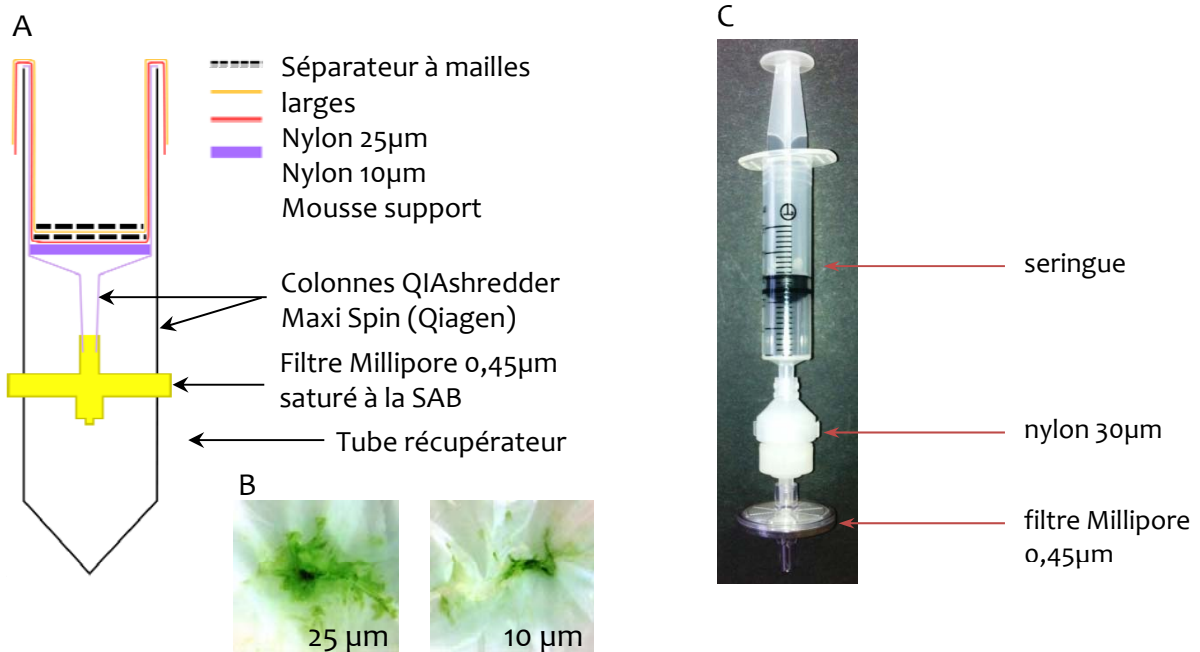


Figure 95. Systèmes de filtration utilisés pour le fractionnement des protoplastes. (A) Premier système utilisé nécessitant une brève centrifugation à 3000g pendant 5sec afin que la suspension de protoplastes déposée sur la succession de filtres (nylon de porosité 25μm, 10μm puis filtre 0,45μm, (B) passe au travers du système et soit récupérée rapidement. (C) Second système utilisé nécessitant une seringue pour appliquer une pression sur le système de filtration composé d'un nylon de porosité 30μm puis d'un filtre 0,45μm.

phosphorique (300mL, 1% v/v) une fois 10min puis deux fois 5min. Enfin, les papiers sont rapidement séchés à l'acétone puis plongés dans du liquide scintillant (3mL, Beckman-Coulter® Ready Gel™ P/N596601) et la radioactivité comptée dans un compteur à scintillation (Beckman-Coulter® LS6500). Pour déterminer les  $K_m$  apparents, les concentrations d'ATP (non radioactif) ont varié entre 0 et 400 $\mu$ M. Tous les métabolites utilisés ont été commandés chez Sigma-Aldrich®.

**Tampon d'activité kinase :** HEPES-NaOH 0,1M (pH7,3), DTT 0,5mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, EGTA 0,5mM, ATP 50 $\mu$ M (cas des activités sur complexes immuno-purifiés), cocktail d'antiprotéases (Sigma : P9599) 0,1% (v/v), cocktail d'antiphosphatases (Sigma : P2850 et P5726) 0,1% (v/v)

### Analyse de la compétitivité de différents adénylates

Pour l'analyse de la compétitivité de l'ATP et de l'ADP vis-à-vis des protéines recombinantes GST-AtSnAK1 et 2, le module « Enzyme Kinetic Wizard » du logiciel SigmaPlot a été utilisé. Les différents types de compétitivité sont explicités dans la figure 93.

### Dosage de métabolites à partir de protoplastes d'Arabidopsis

Le dosage des métabolites intracellulaires nécessite l'utilisation d'une technique de fractionnement cellulaire rapide et fiable. Différentes mises au point ont été réalisées au cours de ce travail et sont décrites ci-dessous.

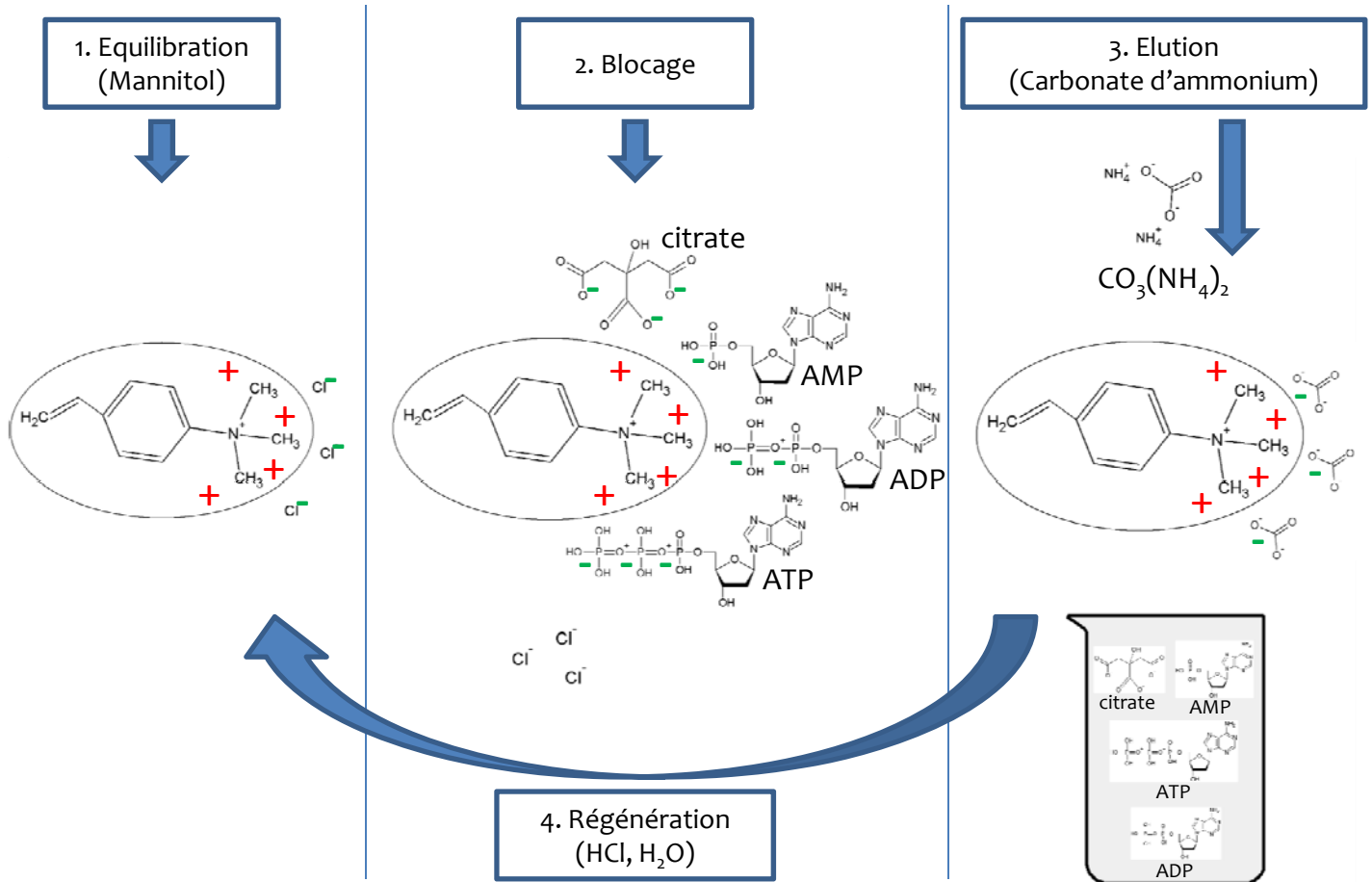
### Fractionnement rapide des organites par l'utilisation de membranes nylon et de filtres

Lilley et collègues ont décrit une méthode de séparation des organites (chloroplastes, mitochondries, cytoplasme et vacuole) de protoplastes de blé (Lilley et al., 1982) (Figure 94). Nous nous sommes inspirés de ces travaux pour tester différents systèmes de filtration (Figure 95).

Un premier système (Figure 95A) est composé d'une part de deux membranes en nylon successives de porosités 25 $\mu$ m et 10 $\mu$ m. La filtration de la suspension de protoplastes sur ce système permet de casser les protoplastes et de retenir une grande partie des chloroplastes. Le passage consécutif sur un filtre d'une porosité de 0,45 $\mu$ m (Sartorius Minisart) permet de retenir les mitochondries. La suspension de protoplastes (1,5mL, concentrée à 3.10<sup>5</sup> protoplastes.mL<sup>-1</sup>) est déposée au dessus des filtres puis une brève centrifugation à 3000g pendant 5sec permet de recueillir 1 à 1,3mL de jus cytoplasmique. Pour ce système, trois types de filtres ont été testés : les filtres seringue Minisart HF (Sartorius 16537-B ; polyethersulfone), Minisart NML (Sartorius 16555-B ; acétate de cellulose) et Minisart plus (Sartorius 17829-B ; acétate de cellulose).

Un second système (Figure 95B) avec les mêmes filtres Sartorius mais n'utilisant qu'une seule membrane nylon de porosité 30 $\mu$ m associé à un filtre Millipore de 0,45 $\mu$ m a également été testé. La suspension de protoplastes (1,5mL, concentrée à 3.10<sup>5</sup> protoplastes.mL<sup>-1</sup>) est passée à travers le système par pression à l'aide d'une seringue.





**Figure 96. Principe de purification de métabolites chargés négativement sur colonne échangeuse d'anions DOWEX® 1x8.** La colonne est en premier lieu équilibrée dans du tampon Mannitol 0,4M (1). Les protoplastes sont ensuite cassés à travers un filtre nylon (25µm de porosité) puis le filtrat passé sur la colonne, permettant la fixation des métabolites chargés négativement (2). Les métabolites fixés sont élués au carbonate d'ammonium 8% (3). La colonne peut être régénérée par un grand volume d'acide chlorhydrique avant d'être à nouveau rincée à l'eau (4).



### Purification de métabolites sur colonnes DOWEX® 1x8

#### Calibration des colonnes DOWEX® 1x8

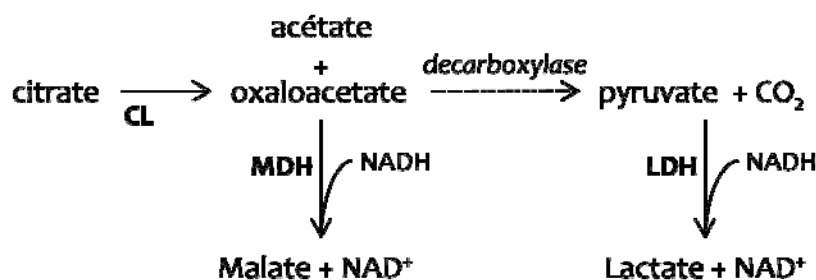
Afin d'obtenir une solution fiable de mesure du citrate et des adénylates présents dans les compartiments vacuolaire et cytoplasmique, des étapes de calibration du protocole ont été nécessaires. Il s'est agi de s'assurer d'une part de la rétention totale (dans la limite des techniques de mesures utilisées) des métabolites d'intérêt sur la colonne et d'autre part de l'efficacité de l'élution. Pour la calibration des colonnes, 0,2 à 1,2mL de résine DOWEX® 1x8 (Serva : 41081) ont été lavés abondamment à l'eau ultrapure puis équilibrés par 5mL de mannitol 0,4M. Des quantités différentes de métabolites ont été déposées sur la colonne (de 0,25 à 1µmole de citrate et de 0,5 à  $2 \cdot 10^{-4}$  µmoles d'ATP et d'ADP. Les éluants suivants ont été testés : acide chlorhydrique 1N/2N, acide chlorhydrique 0,4N additionné de NaCl 4M, NaOH 4N, acide sulfurique 1M et carbonate d'ammonium ( $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ ) 8% (Figure 96). Lors de l'utilisation d'acides et bases fortes, le pH est ensuite immédiatement rétabli autour de 7,5-8.

#### Purification du citrate, de l'ATP et de l'ADP

Une suspension de 500µL de protoplastes concentrée à  $2 \cdot 10^5$  protoplastes.mL<sup>-1</sup> est passée à travers un filtre nylon de 25µm à l'aide d'une seringue. Le « pass-through » obtenu est immédiatement passé à travers 1,2mL de résine DOWEX® 1x8 préalablement lavée abondamment à l'eau ultrapure et équilibrée avec 5mL de mannitol 0,4M. La colonne est ensuite lavée avec 6mL de mannitol 0,4M. Les métabolites chargés négativement et fixés par échange d'anions (Figure 96) sont élués par 2 fois 5mL de  $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$  8%. Les éluats sont récupérés, congelés rapidement dans l'azote liquide puis séchés 60h à l'aide d'un lyophilisateur (Laboratory freeze dryer - Christ® Alpha 2-4LD plus). Les échantillons sont repris dans 5mL d'eau ultrapure puis conservés au congélateur à -80°C jusqu'aux dosages.

#### Dosage spectrophotométrique du citrate

Cette méthode (Moellering and Gruber, 1966) permet de déterminer la concentration en citrate d'un échantillon en suivant, par spectrophotométrie à 340nm, le NADH consommé au cours des réactions suivantes :





Le citrate est clivé en acétate et oxaloacétate par la citrate lyase. Ce dernier est ensuite pris en charge par l'oxaloacétate décarboxylase endogène pour former du pyruvate. L'ajout de LDH dans le milieu réactionnel permet de former 1 lactate en consommant 1 NADH. En cas de décarboxylation incomplète, la MDH est ajoutée au milieu et prend en charge l'oxaloacétate pour former 1 malate en consommant 1 NADH. Au cours de cette réaction couplée, 1 mole de NADH consommée correspond à 1 mole de citrate clivée par la CL.

**Milieu réactionnel CL:** HEPES-NaOH 100mM (pH7,6), MgCl<sub>2</sub> 5mM, NADH 0,2mM, CL 1U, MDH 10µg.mL<sup>-1</sup> (Boehringer : 127248), LDH 25U (Sigma-Aldrich® : 036K7400)

### Détection des adénylates par bioluminescence

Les concentrations en ATP sont mesurées avec le kit « ENLITEN® ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurement » (Promega : FF2000) selon les recommandations fournies à l'aide d'un luminomètre (Lumat LB9507 – Berthold Technologies). L'ADP est converti en ATP par la pyruvate kinase (PK) en présence de sels et du PEP dans 100µL de mélange réactionnel PK. La conversion a lieu pendant 7min à 30°C La mesure effectuée au luminomètre correspond donc à l'ADP converti en ATP additionnée à l'ATP présent initialement. La gamme étalon est effectuée avec 0, 2, 4 et 8.10<sup>-7</sup>µmoles d'ATP dans le tampon utilisé pour la conversion de l'ADP en ATP (Tris-HCl 200mM pH7,7).

**Mélange réactionnel PK :** Tris-HCl 200mM (pH7,7), MgCl<sub>2</sub> 25mM, KCl 12,5mM, PEP 1mM

### Dosage spectrophotométrique des enzymes marqueurs des différents compartiments cellulaires

Pour ces mesures, 2mL d'une suspension de protoplastes concentrée à 2.10<sup>5</sup>protoplastes.mL<sup>-1</sup> est passée à travers une membrane nylon de 25µm à l'aide d'une seringue puis le « pass-through » est immédiatement déposé sur la colonne DOWEX®1x8 (lavée et équilibrée comme décrit précédemment). Une petite fraction aliquote de protoplastes cassés et non passés sur colonne (échantillon E1) est conservée. La résine est lavée 2 fois avec 1mL de mannitol 0,4M échantillons L1 et L2). Les éluats de lavages sont récoltés dans des tubes eppendorf de 2mL sur coussin de saccharose 3M. Une centrifugation à 10000g pendant 10min à 4°C permet de déposer les débris, chloroplastes et mitochondries sur le coussin. Le surnageant est récupéré délicatement et précipité au sulfate d'ammonium 60% (p/v) après ajout d'un entraîneur (SAB, concentration finale : 0,5mg.mL<sup>-1</sup>) constituant l'échantillon E2. Les « culots » d'organites sur coussins de saccharose 3M sont additionnés de triton (concentration finale : 2%) afin de casser les chloroplastes et les mitochondries, ceci constitue l'échantillon E3.

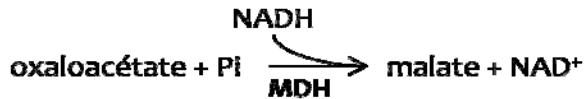
L'activité enzymatique des enzymes marqueurs suivantes est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Varian Cary 50 UV/Vis) dans ces échantillons. La consommation du NADH ou la synthèse du NADPH est suivies à 340nm :

- Marqueur cytoplasmique : Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPc) couplée à la Malate déshydrogénase (MDH), en présence de MgCl<sub>2</sub> (Lane et al., 1969)

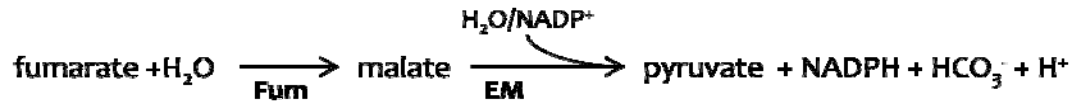




- Marqueur chloroplastique : MDH à NADPH, en présence d'EDTA (afin de chélater les traces d'ions bivalents favorables à l'enzyme malique endogène) (Hatch and Slack, 1969)



- Marqueur mitochondrial : Fumarase couplée à l'enzyme malique



**Milieu réactionnel PEPc:** Tris-HCl 90mM (pH8), NaHCO<sub>3</sub> 5mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, PEP 2mM, NADH 0,2mM, MDH 10µg.mL<sup>-1</sup> (Boehringer : 127248)

**Milieu réactionnel MDH :** Tris-HCl 90mM (pH8), oxaloacétate 2mM, EDTA 1mM, NADPH 0,2mM

**Milieu réactionnel Fumarase/EM à NADP<sup>+</sup> :** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 90mM (pH7,3), fumarate 5mM, NADP<sup>+</sup> 0,2mM, EM à NADP<sup>+</sup> 0,06U (Sigma-Aldrich® : M5257)

## Méthodes relatives aux plantes

### Stérilisation des graines

Une stérilisation des graines préalable aux semis *in vitro* permet de pallier aux risques de contamination des milieux de culture par des spores de champignons ou par des bactéries. Pour la préparation d'un mélange Bayrochlor® / éthanol 95%, un demi comprimé est dissout dans 20 mL d'eau ultra pure, puis la solution est diluée 10 fois dans de l'éthanol 95%. Environ 20mg de graines sont incubés pendant 6min dans 1mL de ce mélange. Les graines sont ensuite rincées par deux bains successifs d'un mL d'éthanol 95% ou absolu puis séchées sous hotte à flux laminaire pendant au minimum 2h.

### Milieux de culture pour semis *in vitro*

Les graines sont semées sur un milieu 1/2MS (Murashige and Skoog, 1962). Les milieux sont coulés dans des boîtes de Pétri stériles sous hotte à flux laminaire. En fonction des expériences, le milieu est additionné avant autoclavage de glucose 3% (p/v), saccharose 3% (p/v) ou tréhalose 1,8% (p/v) ou après autoclavage de sulfadiazine (5,25mg.mL<sup>-1</sup>) ou kanamycine (50µg.mL<sup>-1</sup>).

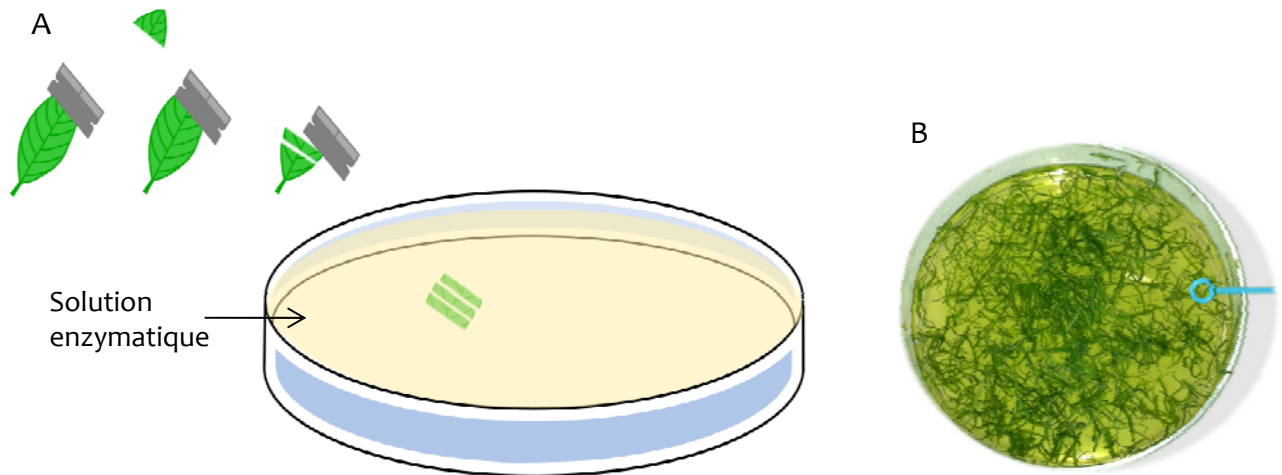
Pour l'analyse phénotypique de l'appareil aérien d'*A. thaliana*, les boîtes sont placées à l'horizontale ; pour l'appareil racinaire, les boîtes sont placées à la verticale.

**Milieu 1/2MS :** Murashige & Skoog Basal Salt Mixture + Vitamines (Duchefa) 2,15g.L<sup>-1</sup>, agar 0,8% (p/v), pH 5,8 (KOH)

### Préparation et transformation de protoplastes

#### A partir de feuilles d'*A. thaliana*

Les plantes utilisées sont âgées d'environ 5 semaines et cultivées en conditions de jours courts. Les protoplastes sont préparés et transformés d'après la méthode décrite par J. Sheen (Yoo et al., 2007) et adaptée selon le protocole décrit ci-dessous (Figure 97).



**Figure 97. Préparation de protoplastes à partir de feuilles d'*Arabidopsis* (D'après Yoo et al., 2007).** (A) Schéma des étapes préliminaires de la préparation. Le haut des feuilles est écarté. De fines lanières sont découpées et plongées dans la solution de digestion enzymatique. La partie inférieure (côté pétiole) est également écartée. (B) Image des lanières après 3h de digestion enzymatique.

Les feuilles, soigneusement choisies (seconde, troisième et quatrième paires bien exposées à la lumière) sont prélevées au niveau du pétiole. Elles sont découpées en lanières d'environ 0,5mm de largeur et leurs deux extrémités sont éliminées. Les bandelettes sont immédiatement immergées dans 10mL de solution enzymatique. La digestion des parois végétales s'effectue à l'obscurité pendant 3h (30min sous vide + 2h30) à température ambiante. Après incubation, les protoplastes sont libérés par agitation manuelle douce, prélevés délicatement avec une pipette après ajout de 5mL de solution isotonique puis filtrés à travers un nylon de porosité 100µm. Le liquide est éliminé après centrifugation à basse vitesse (50g, 10min) et les protoplastes remis en suspension dans 5mL de solution isotonique. Cette étape de lavage est répétée une fois avant comptage des protoplastes sous microscope à l'aide d'une cellule de Malassez. Le rendement obtenu est de l'ordre de 3 à 10.10<sup>6</sup> protoplastes pour 10mL de solution enzymatique initiaux.

La transformation est effectuée strictement selon le protocole décrit par J. Sheen (Yoo *et al.*, 2007) (les solutions sont détaillées ci-dessous) en utilisant les vecteurs dérivés de pBi/smGFP (Jasinski *et al.*, 2002) dans lesquels ont été insérées les phases ouvertes de lecture des gènes AtKRP6<sup>WT</sup> (version sauvage) et AtKRP6<sup>T150A</sup>, AtKRP6<sup>T150D</sup>, AtKRP6<sup>T152A</sup> et AtKRP6<sup>T152D</sup> (versions mutées).

**Solution enzymatique :** MES 20mM (pH5,7), mannitol 0,4M, KCl 20mM, Cellulase R10 (Yakult : « Onozuka ») 1,5%, Maceraze® pectinase (Calbiochem : #441201) 0,4%, CaCl<sub>2</sub> 10mM, SAB 0,1%.  
**Préparation pour 10mL :** ajouter 5mL de mannitol 0,8M, 1mL de MES 0,2M (pH5,7) et 0,1mL de KCl 2M dans 3,6mL d'eau. Chauffer 2min à 70°C. Dissoudre délicatement 0,15g de cellulase et 0,04g de macérozyme. Incuber à 55°C pendant 10min pour inactiver les protéases et solubiliser totalement les enzymes. Ajouter 0,1mL de CaCl<sub>2</sub> 1M et 0,1mL de SAB 10mg.mL<sup>-1</sup>. Stériliser par filtration (Filtre Millipore 0,45µm)

**Solution isotonique :** Hepes-NaOH 0,1M (pH 7,6) ; mannitol 0,4M ; EDTA 2,5mM ; MgCl<sub>2</sub> 5mM

**Solution de transformation W5 :** MES 2mM (pH5,7) (KOH), NaCl 154mM, CaCl<sub>2</sub> 125mM, KCl 5mM

**Solution de transformation WI :** MES 4mM (pH5,7) (KOH), mannitol 0,5M, KCl 20mM

**Solution de transformation (Ath) PEG :** Poly-Ethylène-Glycol (PEG) 4000 (Fluka : #81240) 40%, mannitol 0,2M, CaCl<sub>2</sub> 0,1M

**Solution de transformation MMg :** MES 4mM (pH5,7) (KOH), mannitol 0,4M, MgCl<sub>2</sub> 15mM

### A partir de cellules de tabac BY-2

Les protoplastes sont obtenus à partir d'une suspension cellulaire de tabac BY-2 fraîchement ensemencée dans du milieu de culture (5mL de culture dans 20mL de milieu de culture BY-2, cf. 1.1.). Après centrifugation de la suspension BY-2, une solution enzymatique permettant de digérer la paroi pecto-cellulosique est ajoutée sur le culot cellulaire. Le mélange réactionnel est incubé à 30°C et agité doucement à intervalles réguliers. Dès 2h d'incubation, la progression de la digestion est suivie au microscope. Dès lors que les cellules apparaissent rondes et individualisées, la digestion est arrêtée. Afin d'isoler les protoplastes obtenus et d'éliminer les débris de paroi pecto-cellulosique, le mélange est soumis à plusieurs étapes de centrifugation à faible vitesse (800rpm) et de lavages dans du milieu MS-0,34M (GM) puis MS-0,28M (S).





Pour chaque transformation, 20 à 30 µg d'ADN plasmidique (pUC-SPYNE, (Walter *et al.*, 2004) porteur de la phase ouverte de lecture du gène AtKRP6 ; pBiFP4 ou pBiFP3 (Desprez *et al.*, 2007) porteurs de la phase ouverte de lecture du gène AtSnRK1α1) sont mis au contact de 150µL de protoplastes. Après ajout de 450µL de la solution de transformation, le mélange de transformation est homogénéisé et incubé à 25°C pendant 30min, à l'obscurité. Après ajout de 3mL d'une solution de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> à 0,275M, les protoplastes sont mélangés doucement par renversement. La solution est centrifugée à 700rpm pendant 7min puis le culot est repris dans 2,5mL d'une solution de MS-0,34M (GM). Les protoplastes sont enfin incubés, à l'obscurité, à l'horizontale toute la nuit en vue de leur observation au microscope confocal.

**Solution enzymatique BY-2** : Cellulase 0,5%, pectolyase 0,05% dans du MS-0,34M (GM)

**MS-0,34M (Glucose Mannitol) (GM)** : Murashige & Skoog Basal Salt Mixture + Vitamines (Duchefa) 4,33g.L<sup>-1</sup>, glucose 30g.L<sup>-1</sup>, mannitol 30,5g.L<sup>-1</sup>, 2,4-D 1µM (pH5,5). Autoclavage à 115°C pendant 20min

**MS-0,28M (Saccharose)** : Murashige & Skoog Basal Salt Mixture + Vitamines (Duchefa) 4,33g.L<sup>-1</sup> (pH5,5), saccharose 96g.L<sup>-1</sup>. Autoclavage à 115°C pendant 20min

**Solution de transformation (BY-2) PEG** : PEG 4000 (Fluka : #81240) 25%, mannitol 0,45M, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,1M, (pH9) (KOH)

### Méthodes de microbiologie

Les approches décrites dans cette section reposent sur l'utilisation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* en tant que système hétérologue pour étudier soit l'interaction d'une CKI avec la CDKA ;1 d'*Arabidopsis*, soit la capacité d'inhibition d'une CKI sur l'activité de cette CDKA ;1.

### Transformation de levure par choc thermique

La préparation des cellules compétentes et leur transformation sont réalisées comme décrit dans le protocole du kit Matchmaker Two-Hybrid System (Clontech) en utilisant les milieux ci-dessous. Dans le cas de l'utilisation du système de complémentation fonctionnelle du mutant thermosensible (*S. cerevisiae* souche Ely227), les levures sont transformées avec les vecteurs pNSG1 et pNSG2 (dérivant respectivement des vecteurs pGBT9 et pGAD424) permettant l'expression des ORF des gènes d'intérêt. Les levures sont étalées sur un milieu SD-LEU-TRP (permettant la sélection des double-transformants) et incubées à 25°C pendant 3-4 jours.

**Milieu de levure YPDA** : bacto-peptone (Difco) 20g.L<sup>-1</sup>, extrait de levure (Invitrogen) 10g.L<sup>-1</sup>. pH 5,8 (acide acétique). Agar (si milieu solide) 15g.L<sup>-1</sup>. Autoclavage 20min à 115°C. Glucose 2% (p/v), adénine 0,08g.L<sup>-1</sup>

**Milieu synthétique SD-LEU-TRP** : Yeast Nitrogen Base (Invitrogen) 6,7g.L<sup>-1</sup>. pH 5,8 (acide acétique). Agar 15g.L<sup>-1</sup>. Autoclavage 20min à 115°C. Glucose 2% (p/v), Drop-OUT-LEU-TRP 1X

**Drop-OUT-LEU-TRP 1X** : L-Adénine (Sigma A9126) 80mg.mL<sup>-1</sup>, L-Arginine (Sigma A5131) 20mg.mL<sup>-1</sup>, L-Histidine (Sigma H9511) 20mg.mL<sup>-1</sup>, L-Isoleucine (Sigma I7383) 30mg.mL<sup>-1</sup>, L-Lysine (Sigma L1262) 30mg.mL<sup>-1</sup>, L-Méthionine (Sigma M9625) 20mg.mL<sup>-1</sup>, L-Phénylalanine (Sigma P5030) 50mg.mL<sup>-1</sup>, L-Thréonine (Sigma T8625) 200mg/mL<sup>-1</sup>, L-Tyrosine (Sigma T3754) 30mg.mL<sup>-1</sup>, L-Uracile (Sigma U0750) 20mg.mL<sup>-1</sup>, L-Valine (Sigma V0500) 150mg.mL<sup>-1</sup>

**PEG 50%** : PEG 3350 (Sigma P3640) 5g/10mL, TE1X, LiAc1X

**TE 10X** : Tris-HCl (pH7,5) 100mM, EDTA 10mM

**LiAc 10X** : acétate de lithium 1M (pH 7,5) (acide acétique). Stérilisation par filtration (0,45µm)



### Etude du rôle de KRP6 en système hétérologue

La levure *S. cerevisiae* est utilisée comme système hétérologue pour étudier *in vivo* l'effet de KRP6 et de ses différentes formes mutées sur la CDKA<sub>1</sub> d'*Arabidopsis*. Le principe de cette expérience est de compléter la mutation CDC28 (*cdc28-4 ts*) par une forme mutée de CDKA<sub>1</sub> (T14A et Y15F) allèle dominant positif (*i.e.* forme active constitutive) et d'analyser l'effet de différentes formes mutées de KRP6 sur cette complémentation.

Les phases ouvertes de lecture de KRP6 et CDKA-1 sont clonées dans les 2 vecteurs d'expression pNSG1 et pNSG2. La souche de levure Ely227 co-transformée avec un plasmide portant le marqueur LEU2 (dérivé de pNSG2) et un plasmide portant le marqueur TRP1 (dérivé de pNSG1) est mise en culture sur un milieu de sélection SD-LEU-TRP. A titre de témoin négatif, le mutant Ely227 est transformé avec les 2 vecteurs pNSG1 et pNSG2 vides pour vérifier qu'ils ne complètent pas à eux seuls l'allèle *cdc28-4 ts*. Dans ce cas une croissance n'est observée qu'à température permissive (25°C). La restauration du phénotype sauvage après co-transformation de Ely227 avec un plasmide portant le gène CDC28 sauvage de levure et pNSG1 est utilisée en tant que témoin positif. La croissance des co-transformants est analysée après 3 jours de croissance à 25°C et 35°C.

### Méthodes d'analyses histologiques et cytologiques

#### Décoloration des siliques au chloral hydrate

Afin d'observer les graines d'*Arabidopsis*, les siliques sont fixées dans un mélange éthanol : acide acétique (3:1, v/v) pendant 1h. Les échantillons sont ensuite placés dans un bain d'éthanol 70% et stockés à 4°C. La veille de l'observation au microscope, l'éthanol est enlevé. Les échantillons sont éclaircis en les incubant toute la nuit dans une solution de chloral hydrate (chloral hydrate : glycérol : eau, 8:2:1 (p/v/v)). Ils sont ensuite placés entre lame et lamelle et observés en contraste interférentiel.

#### Observation de la taille des cellules épidermiques de feuilles de rosette

Le protocole utilisé pour fixer les feuilles de rosette dans le but d'observer les tailles des cellules épidermiques est identique à celui décrit ci-dessus pour les siliques à la seule différence près que le matériel végétal n'est éclairci avec la solution de chloral hydrate qu'au maximum pendant 2h.

#### Coloration d'Alexander

Cette technique de cytologie permettant de distinguer le pollen avorté du pollen viable a été réalisée sur les étamines des différentes lignées étudiées ainsi que décrit par Alexander (1969). Des anthères matures sont placées dans une goutte de colorant et ouvertes à l'aide d'aiguilles fines. L'orange G et la fuschine acide colorent le cytoplasme des cellules tandis que le vert de malachite colore la paroi du grain de pollen. Si le grain de pollen est vivant, il apparaît donc en



violet ; s'il est avorté il se colore en vert. Les échantillons ainsi traités sont placés entre lame et lamelle et observés en contraste interférentiel.

**Tampon de coloration Alexander :** Pour 100mL : Ethanol 10mL, vert de malachite (1% dans éthanol 95%) 1mL, glycérol 25mL, phenol 5,5mL, chloral hydrate 5g, fushine acide (1% dans H<sub>2</sub>O) 5mL, orange G (1% dans H<sub>2</sub>O) 0,5mL, acide acétique glacial 2mL, eau distillée 50mL



# *Bibliographie*





## BIBLIOGRAPHIE

## A

- Adams, J., Chen, Z., Denderen, B., Morton, C.J., Parker, M.W., Witters, L.A., Stapleton, D., Kemp, B.E., 2004. Intrasteric control of AMPK via the gamma1 subunit AMP allosteric regulatory site. *Protein Sci.* 13 (1), 155–165.
- Alers, S., Löffler, A.S., Wesselborg, S., Stork, B., 2012. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2–11.
- Alexander, M.P., 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Biotech. Histochem.* 44, 117–122.
- Alessi, D.R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F.B., Morrice, N., Norman, D.G., Gaffney, P., Reese, C.B., MacDougall, C.N., Harbison, D., Ashworth, A., Bownes, M., 1997. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr. Biol.* 7, 776–789.
- Alessi, D.R., Kozlowski, M.T., Weng, Q.P., Morrice, N., Avruch, J., 1998. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr. Biol.* 8, 69–81.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Lisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., Ecker, J.R., 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653–657.
- Anderson, K.A., Means, R.L., Huang, Q.H., Kemp, B.E., Goldstein, E.G., Selbert, M.A., Edelman, A.M., Fremeau, R.T., Means, A.R., 1998. Components of a calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning, functional characterization and cellular localization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *J. Biol. Chem.* 273, 31880–31889.
- Atkinson, D.E., 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7, 4030–4034.

## B

- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J.M., Shen, J., 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448, 938–942.
- Banko, M.R., Allen, J.J., Schaffer, B.E., Wilker, E.W., Tsou, P., White, J.L., Villén, J., Wang, B., Kim, S.R., Sakamoto, K., Gygi, S.P., Cantley, L.C., Yaffe, M.B., Shokat, K.M., Brunet, A., 2011. Chemical genetic screen for AMPKα2 substrates uncovers a network of proteins involved in mitosis. *Mol. Cell* 44, 878–892.
- Bardeesy, N., Sinha, M., Hezel, A.F., Signoretti, S., Hathaway, N.A., Sharpless, N.E., Loda, M., Carrasco, D.R., DePinho, R.A., 2002. Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature* 419, 162–167.
- Bateman, A., 1997. The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem. Sci.* 22, 12–3.
- Besson, A., Dowdy, S.F., Roberts, J.M., 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev. Cell* 14, 159–169.
- Besson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A., Roberts, J.M., 2004. p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev.* 18, 862–876.
- Biondi, R.M., Kieloch, A., Currie, R.A., Deak, M., Alessi, D.R., 2001. The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *EMBO J.* 20, 4380–4390.



- Bird, D.A., Buruiana, M.M., Zhou, Y., Fowke, L., Wang, H., 2007. Arabidopsis cyclin-dependent kinase inhibitors are nuclear-localized and show different localization patterns within the nucleoplasm. *Plant Cell Rep.* 26, 861–872.
- Birnbaum, M.J., 2005. Activating AMP-activated protein kinase without AMP. *Mol. Cell* 19, 289–290.
- Bitrián, M., Roodbarkelari, F., Horváth, M., Koncz, C., 2011. BAC-recombineering for studying plant gene regulation: developmental control and cellular localization of SnRK1 kinase subunits. *Plant J.* 65, 829–842.
- Blair, E., Redwood, C., Ashrafian, H., Oliveira, M., Broxholme, J., Kerr, B., Salmon, A., Ostman-Smith, I., Watkins, H., 2001. Mutations in the gamma(2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1215–1220.
- Bögre, L., Okrészl, L., Henriques, R., Anthony, R.G., 2003. Growth signalling pathways in Arabidopsis and the AGC protein kinases. *Trends Plant Sci.* 8, 424–431.
- Borriello, A., Cucciolla, V., Criscuolo, M., Indaco, S., Oliva, A., Giovane, A., Bencivenga, D., Iolascon, A., Zappia, V. & Della Ragione, F. (2006). Retinoic acid induces p27Kip1 nuclear accumulation by modulating its phosphorylation. *Cancer Res.* 66 (8), 4240–4248.
- Boudeau, J., Baas, A.F., Deak, M., Morrice, N., Kieloch, A., Schutkowski, M., Prescott, A.R., Clevers, H.C., Alessi, D.R., 2003. MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *EMBO J.* 22, 5102–5114.
- Boudeau, J., Scott, J.W., Resta, N., Deak, M., Kieloch, A., Komander, D., Hardie, D.G., Prescott, A.R., van Aalten, D.M.F., Alessi, D.R., 2004. Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex. *J. Cell Sci.* 117, 6365–6375.
- Bouly, J.P., 1998. Contribution à l'étude du complexe AKIN chez Arabidopsis thaliana: étude de l'expression du gène AKINalpha1 et caractérisation de sous-unités non catalytiques. Thèse, Université Paris-Sud.
- Bouly, J.P., Gissot, L., Lessard, P., Kreis, M., Thomas, M., 1999. Arabidopsis thaliana proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKINalpha1, an SNF1-like protein kinase. *Plant J.* 18, 541–550.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Breitkreutz, A., Choi, H., Sharom, J.R., Boucher, L., Neduva, V., Larsen, B., Lin, Z.-Y., Stark, C., Liu, G., Ahn, J., Dewar-Darch, D., Regulý, T., Tang, X., Almeida, R., Qin, Z.S., Pawson, T., Gingras, A.-C., Nesvizhskii, A.I., Tyers, M., 2010. A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. *Science* 328, 1043–1046.
- Bungard, D., Fuerth, B.J., Zeng, P.-Y., Faubert, B., Maas, N.L., Viollet, B., Carling, D., Thompson, C., Jones, R.G., Berger, S.L., 2010. Signaling kinase AMPK activates stress-promoted transcription via histone H2B phosphorylation. *Science* 329, 1201–1205.
- Burnett, P.E., Barrow, R.K., Cohen, N.A., Snyder, S.H., Sabatini, D.M., 1998. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 1432–1437.
- Burnett, P.E., Blackshaw, S., Lai, M.M., Qureshi, I.A., Burnett, A.F., Sabatini, D.M., Snyder, S.H., 1998. Neurabin is a synaptic protein linking p70 S6 kinase and the neuronal cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8351–8356.

## C

- Carling, D., Clarke, P.R., Zammit, V.A., Hardie, D.G., 1989. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur. J. Biochem.* 186, 129–136.
- Carling, D., Mayer, F.V., Sanders, M.J., Gamblin, S.J., 2011. AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nat. Chem. Biol.* 7, 512–518.
- Carling, D., Zammit, V. a, Hardie, D.G., 1987. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett.* 223, 217–222.



- Casamayor, A., Morrice, N., Alessi, D.R., 1999. Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo. *Biochemical J.* 342 (2), 287–292.
- Celenza, J.L., Carlson, M., 1989. Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5034–5044.
- Cesquini, M., Stoppa, G.R., Prada, P.O., Torsoni, A.S., Romanatto, T., Souza, A., Saad, M.J., Velloso, L. a, Torsoni, M. a, 2008. Citrate diminishes hypothalamic acetyl-CoA carboxylase phosphorylation and modulates satiety signals and hepatic mechanisms involved in glucose homeostasis in rats. *Life Sci.* 82, 1262–1271.
- Champion, A., Kreis, M., Mockaitis, K., Picaud, A., Henry, Y., 2004. Arabidopsis kinome: after the casting. *Funct. Integr. Genomic.* 4, 163–187.
- Chang, T.-J., Chen, W.-P., Yang, C., Lu, P.-H., Liang, Y.-C., Su, M.-J., Lee, S.-C., Chuang, L.-M., 2009. Serine-385 phosphorylation of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel subunit (Kir6.2) by AMP-dependent protein kinase plays a key role in rosiglitazone-induced closure of the K(ATP) channel and insulin secretion in rats. *Diabetologia* 52, 1112–1121.
- Chen, M., Thelen, J.J., 2010. The plastid isoform of triose phosphate isomerase is required for the postgerminative transition from heterotrophic to autotrophic growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22, 77–90.
- Chen, S., Murphy, J., Toth, R., Campbell, D.G., Morrice, N., Mackintosh, C., 2008. Complementary regulation of TBC1D1 and AS160 by growth factors, insulin and AMPK activators. *Biochemical J.* 409, 449–459.
- Cheng, Y., Qin, G., Dai, X., Zhao, Y., 2008. NPY genes and AGC kinases define two key steps in auxin-mediated organogenesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 21017–21022.
- Chibazakura, T., McGrew, S.G., Cooper, J.A., Yoshikawa, H., Roberts, J.M., 2004. Regulation of cyclin-dependent kinase activity during mitotic exit and maintenance of genome stability by p21, p27, and p107. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4465–4470.
- Cho, Y.S., Lee, J.I., Shin, D., Kim, H.T., Jung, H.Y., Lee, T.G., Kang, L.-W., Ahn, Y.-J., Cho, H.-S., Heo, Y.-S., 2010. Molecular mechanism for the regulation of human ACC2 through phosphorylation by AMPK. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 391, 187–192.
- Chou, M.M., Blenis, J., 1996. The 70 kDa S6 kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc42 and Rac1. *Cell* 85, 573–583.
- Churchman, M.L., Brown, M.L., Kato, N., Kirik, V., Hülskamp, M., Inzé, D., De Veylder, L., Walker, J.D., Zheng, Z., Oppenheimer, D.G., Gwin, T., Churchman, J., Larkin, J.C., 2006. SIAMESE, a plant-specific cell cycle regulator, controls endoreplication onset in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 18, 3145–3157.
- Clarke, P.R., Hardie, D.G., 1990. Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *EMBO J.* 9, 2439–2446.
- Cong, L.-N., 1997. Physiological Role of Akt in Insulin-Stimulated Translocation of GLUT4 in Transfected Rat Adipose Cells. *Mol. Endocrinol.* 11, 1881–1890.
- Coqueret, O., 2003. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol.* 13, 65–70.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A., 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785–789.
- Crozet, P., 2010. Etude de la régulation des complexes kinases AtSnRK1 (“SNF1-Related protein Kinase 1”) chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse, Université Paris-Sud.
- Crozet, P., Jammes, F., Valot, B., Ambard-Bretteville, F., Nessler, S., Hodges, M., Vidal, J., Thomas, M., 2010. Cross-phosphorylation between *Arabidopsis thaliana* sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 1 (AtSnRK1) and its activating kinase (AtSnAK) determines their catalytic activities. *J. Biol. Chem.* 285, 12071–12077.



## D

- Dagon, Y., Hur, E., Zheng, B., Wellenstein, K., Cantley, L.C., Kahn, B.B., 2012. p70S6 Kinase Phosphorylates AMPK on Serine 491 to Mediate Leptin's Effect on Food Intake. *Cell Metab.* 16, 104–112.
- Dale, S., Wilson, W.A., Edelman, A.M., Hardie, D.G., 1995. Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I. *FEBS Lett.* 361, 191–195.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E., 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231–241.
- Davies, S.P., Carling, D., Hardie, D.G., 1989. Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay. *Eur. J. Biochem.* 186, 123–128.
- Davies, S.P., Carling, D., Munday, M.R., Hardie, D.G., 1992. Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets. *Eur. J. Biochem.* 203, 615–623.
- Davies, S.P., Helps, N.R., Cohen, P.T., Hardie, D.G., 1995. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.* 377, 421–425.
- de Castro, E., Sigrist, C., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P., Gasteiger, E., Bairoch, A. & Hulo, N. (2006). ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res.* (32), 362–365.
- De Clercq, A., Inzé, D., 2006. Cyclin-dependent kinase inhibitors in yeast, animals, and plants: a functional comparison. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41, 293–313.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M., Inzé, D., 2001. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 1653–1668.
- Debast, S., Nunes-Nesi, A., Hajirezaei, M.-R., Hofmann, J., Sonnewald, U., Fernie, A.R., Börnke, F., 2011. Altering trehalose-6-phosphate content in transgenic potato tubers affects tuber growth and alters responsiveness to hormones during sprouting. *Plant Physiol.* 156, 1754–1771.
- Deng, X., Mercer, S.E., Shah, S., Ewton, D.Z. & Friedman, E. (2004). The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is stabilized in G(0) by Mirk/dyrk1B kinase. *J. Biol. Chem.* 279 (21), 22498–22504.
- Deprost, D., Truong, H.-N., Robaglia, C., Meyer, C., 2005. An Arabidopsis homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 326, 844–850.
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M., Robaglia, C., Meyer, C., 2007. The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* 8, 864–870.
- Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E.F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., Höfte, H., Gonneau, M., Vernhettes, S., 2007. Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 15572–15577.
- Díaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M.E., Florencio, F.J., Crespo, J.L., 2008. The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* 4, 851–865.
- Dibble, C.C., Asara, J.M., Manning, B.D., 2009. Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol. Cell. Biol.* 29, 5657–5670.
- Dickinson, J., Cole, D., Halford, N.G., 1999. A cell cycle role for a plant sucrose nonfermenting-1-related protein kinase (SnRK1) is indicated by expression in yeast. *Plant Growth Regul.* 28, 169–174.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., Sherr, C.J., 1998. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12, 3499–3511.





Dissmeyer, N., Nowack, M.K., Pusch, S., Stals, H., Inzé, D., Grini, P.E., Schnittger, A., 2007. T-loop phosphorylation of Arabidopsis CDKA<sub>1</sub> is required for its function and can be partially substituted by an aspartate residue. *Plant Cell* 19, 972–985.

Dobrenel, T., Marchive, C., Sormani, R., Moreau, M., Mozzo, M., Montané, M.-H., Menand, B., Robaglia, C., Meyer, C., 2011. Regulation of plant growth and metabolism by the TOR kinase. *Biochem. Soc. T.* 39, 477–481.

Dorrello, N.V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N.H., Sherman, N.E., Pagano, M., 2006. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* 314, 467–471.

Dzamko, N., Schertzer, J.D., Ryall, J.G., Steel, R., Macaulay, S.L., Wee, S., Chen, Z.-P., Michell, B.J., Oakhill, J.S., Watt, M.J., Jørgensen, S.B., Lynch, G.S., Kemp, B.E., Steinberg, G.R., 2008. AMPK-independent pathways regulate skeletal muscle fatty acid oxidation. *J. Physiol.* 586, 5819–5831.

## E-F

---

Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C., 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19, 1349.

Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R. a, Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., Asara, J.M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., Kundu, M., Hansen, M., Shaw, R.J., 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456–461.

Eitas, T.K., Dangl, J.L., 2010. NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 13, 472–477.

Elmer, J.S., Brand, L., Sunter, G., Gardiner, W.E., Bisaro, D.M., Rogers, S.G., 1988. Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus. II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucleic Acids Res.* 16, 7043–7060.

Fang, J., Meng, Q., Vogt, P.K., Zhang, R., Jiang, B.-H., 2006. A downstream kinase of the mammalian target of rapamycin, p70S6K1, regulates human double minute 2 protein phosphorylation and stability. *J. Cell. Physiol.* 209, 261–265.

Fogarty, S., Hawley, S.A., Green, K.A., Saner, N., Mustard, K.J., Hardie, D.G., 2010. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta activates AMPK without forming a stable complex: synergistic effects of Ca<sup>2+</sup> and AMP. *Biochemical J.* 426, 109–118.

Fragoso, S., Espíndola, L., Páez-Valencia, J., Gamboa, A., Camacho, Y., Martínez-Barajas, E., Coello, P., 2009. SnRK1 isoforms AKIN10 and AKIN11 are differentially regulated in Arabidopsis plants under phosphate starvation. *Plant Physiol.* 149, 1906–1916.

## G

---

Galván-Ampudia, C.S., Offringa, R., 2007. Plant evolution: AGC kinases tell the auxin tale. *Trends Plant Sci.* 12, 541–547.

García-Martínez, J.M., Alessi, D.R., 2008. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochemical J.* 416, 375–385.

Gardai, S.J., Hildeman, D.A., Frankel, S.K., Whitlock, B.B., Frasca, S.C., Borregaard, N., Marrack, P., Bratton, D.L., Henson, P.M., 2004. Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J. Biol. Chem.* 279, 21085–21095.

Geigenberger, P., Riewe, D., Fernie, A.R., 2010. The central regulation of plant physiology by adenylates. *Trends Plant Sci.* 15, 98–105.

Ghosh, D., Srivastava, G.P., Xu, D., Schulz, L.C., Roberts, R.M., 2008. A link between SIN1 (MAPKAP1) and poly(rC) binding protein 2 (PCBP2) in counteracting environmental stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11673–11678.



- Gissot, L., Polge, C., Bouly, J.P., Lemaitre, T., Kreis, M., Thomas, M., 2004. AKINbeta3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic beta-subunits. *Plant Mol. Biol.* 56, 747–759.
- Gissot, L., Polge, C., Jossier, M., Girin, T., Bouly, J.P., Kreis, M., Thomas, M., 2006. AKINbetagamma contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence. *Plant Physiol.* 142, 931–944.
- Godin, J.D., Thomas, N., Laguesse, S., Malinouskaya, L., Close, P., Malaise, O., Purnelle, A., Raineteau, O., Campbell, K., Fero, M., Moonen, G., Malgrange, B., Chariot, A., Metin, C., Besson, A., Nguyen, L., 2012. p27(Kip1) Is a Microtubule-Associated Protein that Promotes Microtubule Polymerization during Neuron Migration. *Dev. Cell.* 23(4), 729–744
- Goh, E.T.H., Pardo, O.E., Michael, N., Niewiarowski, A., Totty, N., Volkova, D., Tsaneva, I.R., Seckl, M.J., Gout, I., 2010. Involvement of heterogeneous ribonucleoprotein F in the regulation of cell proliferation via the mammalian target of rapamycin/S6 kinase 2 pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 17065–17076.
- Granlund, A., Kotova, O., Benziane, B., Galuska, D., Jensen-Waern, M., Chibalin, A.V., Essén-Gustavsson, B., 2010. Effects of exercise on muscle glycogen synthesis signalling and enzyme activities in pigs carrying the PRKAG3 mutation. *Exp. Physiol.* 95, 541–549.
- Gulhati, P., Bowen, K.A., Liu, J., Stevens, P.D., Rychahou, P.G., Chen, M., Lee, E.Y., Weiss, H.L., O'Connor, K.L., Gao, T., Evers, B.M., 2011. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res.* 71, 3246–3256.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., Shaw, R.J., 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214–226.

---

**H**

- Halford, N.G., Bouly, J.-P., Thomas, M., 2000. SNF1-related protein kinases (SnRKs)- Regulators at the heart of the control of carbon metabolism and partitioning. *Adv. Bot. Res.* 32, 405–434.
- Halford, N.G., Hey, S.J., 2009. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochemical J.* 419, 247–259.
- Hampp, R., Goller, M., Ziegler, H., 1982. Adenylate Levels, Energy Charge, and Phosphorylation Potential during Dark-Light and Light-Dark Transition in Chloroplasts, Mitochondria, and Cytosol of Mesophyll Protoplasts from *Avena sativa* L. *Plant Physiol.* 69, 448–455.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.
- Harada, H., Andersen, J.S., Mann, M., Terada, N., Korsmeyer, S.J., 2001. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9666–9670.
- Hardie, D.G., 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 774–785.
- Hardie, D.G., Carling, D., Carlson, M., 1998. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Ann. Rev. Biochem.* 67, 821–855.
- Hardie, D.G., Carling, D., Gamblin, S.J., 2011. AMP-activated protein kinase: also regulated by ADP? *Trends Biochem. Sci.* 36 (9), 470–477.
- Hardie, D.G., Hawley, S.A., 2001. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* 23, 1112–1119.
- Hardie, D.G., Ross, F., Hawley, S.A., 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 251–262.
- Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E., 1995. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell* 6, 387–400.
- Harrington, L.S., Findlay, G.M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N.R., Cheng, S., Shepherd, P.R., Gout, I., Downes, C.P., Lamb, R.F., 2004. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol.* 166, 213–223.



- Harthill, J.E., Meek, S.E.M., Morrice, N., Pegg, M.W., Borch, J., Wong, B.H.C., Mackintosh, C., 2006. Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *Plant J.* 47, 211–223.
- Hatch, M.D., Slack, C.R., 1969. NADP-specific malate dehydrogenase and glycerate kinase in leaves and evidence for their location in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 34, 589–593.
- Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., Hardie, D.G., 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* 2 (4), 28.
- Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., Hardie, D.G., 1996. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 27879–87.
- Hawley, S.A., Fullerton, M.D., Ross, F.A., Schertzer, J.D., Chevtzoff, C., Walker, K.J., Pegg, M.W., Zibrova, D., Green, K.A., Mustard, K.J., Kemp, B.E., Sakamoto, K., Steinberg, G.R., Hardie, D.G., 2012. The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science* 336, 918–22.
- Hawley, S.A., Pan, D. a, Mustard, K.J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A.M., Frenguelli, B.G., Hardie, D.G., 2005. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 2, 9–19.
- Hayashi, K., Suzuki, A. & Ohno, S. (2012). PAR-1/MARK: a kinase essential for maintaining the dynamic state of microtubules. *Cell Struct. Funct.* . 37 (1), 21–25.
- Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Höglund, P., Järvinen, H., Kristo, P., Pelin, K., Ridanpää, M., Salovaara, R., Toro, T., Bodmer, W., Olschwang, S., Olsen, A.S., Stratton, M.R., de la Chapelle, A., Aaltonen, L.A., 1998. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 391, 184–187.
- Hey, S.J., Mayerhofer, H., Halford, N.G., Dickinson, J.R., 2007. DNA sequences from Arabidopsis, which encode protein kinases and function as upstream regulators of Snf1 in yeast. *J. Biol. Chem.* 282, 10472–10479.
- Hong, F., Larrea, M.D., Doughty, C., Kwiatkowski, D.J., Squillace, R., Slingerland, J.M., 2008. mTOR-raptor binds and activates SGK1 to regulate p27 phosphorylation. *Mol. Cell* 30, 701–711.
- Hong, S.-P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., Carlson, M., 2003. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8839–8843.
- Hong, S.-P., Momcilovic, M., Carlson, M., 2005. Function of mammalian LKB1 and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase alpha as Snf1-activating kinases in yeast. *J. Biol. Chem.* 280, 21804–21809.
- Hooke, R., 1665. *Micrographia*. London.
- Hoppe, S., Bierhoff, H., Cado, I., Weber, A., Tiebe, M., Grummt, I., Voit, R., 2009. AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17781–17786.
- Horman, S., Vertommen, D., Heath, R., Neumann, D., Woods, A., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D., Hue, L., Rider, M.H., Mouton, V., 2006. Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *J. Biol. Chem.* 281, 5335–5340.
- Hou, X., Liu, J.-E., Liu, W., Liu, C.-Y., Liu, Z.-Y. & Sun, Z.-Y. (2011). A new role of NUAK1: directly phosphorylating p53 and regulating cell proliferation. *Oncogene.* 30 (26), 2933–2942.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., Zimmermann, P., 2008. Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv. Bioinformatics* 2008, 420747.
- Hurley, R.L., Anderson, K.A., Franzone, J.M., Kemp, B.E., Means, A.R., Witters, L.A., 2005. The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J. Biol. Chem.* 280, 29060–29066.



## I

- Ikematsu, N., Dallas, M.L., Ross, F.A., Lewis, R.W., Rafferty, J.N., David, J.A., Suman, R., Peers, C., Hardie, D.G., Evans, A.M., 2011. Phosphorylation of the voltage-gated potassium channel Kv2.1 by AMP-activated protein kinase regulates membrane excitability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18132–18137.
- Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., Guan, K.-L., 2008. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J.* 27, 1919–1931.
- Imamura, K., Ogura, T., Kishimoto, A., Kaminishi, M., Esumi, H., 2001. Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 287, 562–567.
- Inoki, K., Zhu, T., Guan, K.-L., 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, 577–590.
- Iseli, T.J., Oakhill, J.S., Bailey, M.F., Wee, S., Walter, M., van Denderen, B.J., Castelli, L. a, Katsis, F., Witters, L. a, Stapleton, D., Macaulay, S.L., Michell, B.J., Kemp, B.E., 2008. AMP-activated protein kinase subunit interactions: beta1:gamma1 association requires beta1 Thr-263 and Tyr-267. *J. Biol. Chem.* 283, 4799–4807.
- Ishida, N., Kitagawa, M., Hatakeyama, S. & Nakayama, K. (2000). Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27(Kip1), increases its protein stability. *J. Biol. Chem.* 275 (33), 25146–25154.
- Isotani, S., Hara, K., Tokunaga, C., Inoue, H., Avruch, J., Yonezawa, K., 1999. Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha in vitro. *J. Biol. Chem.* 274, 34493–34498.

## J

- Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J., Spiegelman, B.M., 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 12017–12022.
- Jasinski, S., Perennes, C., Bergounioux, C., Glab, N., 2002. Comparative molecular and functional analyses of the tobacco cyclin-dependent kinase inhibitor NtKIS1a and its spliced variant NtKIS1b. *Plant Physiol.* 130, 1871–1882.
- Jenne, D.E., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Müller, O., Back, W., Zimmer, M., 1998. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat. Genet.* 18, 38–43.
- Jeon, S.-M., Chandel, N.S., Hay, N., 2012. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* 485, 661–665.
- Jeyabalan, J., Shah, M., Viollet, B., Chenu, C., 2012. AMP-activated protein kinase pathway and bone metabolism. *J. Endoc.* 212, 277–290.
- Jiang, R., Carlson, M., 1997. The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2099–2106.
- Jin, X., Townley, R., Shapiro, L., 2007. Structural insight into AMPK regulation: ADP comes into play. *Structure* 15, 1285–1295.
- Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., Thompson, C., 2005. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 18, 283–293.
- Jossier, M., 2007. Implication des complexes kinases SnRK1 (“ SNF1-Related Kinase 1 ”, AKIN ) dans la signalisation par les sucres et la régulation du métabolisme chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse, Université Paris-Sud.
- Jossier, M., Bouly, J.P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S.A., Hardie, D.G., Thomas, M., 2009. SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 59, 316–328.
- Julien, L.-A., Carriere, A., Moreau, J., Roux, P.P., 2010. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol. Cell. Biol.* 30, 908–921.





## K

- Kim, H., Jung, O., Kang, M., Lee, M.-S., Jeong, D., Ryu, J., Ko, Y., Choi, Y.-J., Lee, J.W., 2012. JNK signaling activity regulates cell-cell adhesions via TM4SF5-mediated p27(Kip1) phosphorylation. *Cancer Lett.* 314, 198–205.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., Guan, K.-L., 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141.
- Klein, H., Garneau, L., Trinh, N.T.N., Privé, A., Dionne, F., Goupil, E., Thuringer, D., Parent, L., Brochiero, E., Sauvé, R., 2009. Inhibition of the KCa3.1 channels by AMP-activated protein kinase in human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. - Cell. Ph.* 296, C285–95.
- Kobayashi, T., Cohen, P., 1999. Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositol 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochemical J.* 339 (2), 319–328.
- Kola, B., Hubina, E., Tucci, S.A., Kirkham, T.C., Garcia, E.A., Mitchell, S.E., Williams, L.M., Hawley, S.A., Hardie, D.G., Grossman, A.B., Korbonits, M., 2005. Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 280, 25196–25201.
- Komaki, S., Sugimoto, K., 2012. Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues. *Plant Cell Physiol.* 53, 953–964.
- Kong, L.-J., Hanley-Bowdoin, L., 2002. A geminivirus replication protein interacts with a protein kinase and a motor protein that display different expression patterns during plant development and infection. *Plant Cell* 14, 1817–1832.
- Kono, A., Ohno, R., Umeda-Hara, C., Uchimiya, H., Umeda, M., 2006. A distinct type of cyclin D, CYCD4;2, involved in the activation of cell division in Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* 25, 540–545.
- Kulma, A., Villadsen, D., Campbell, D.G., Meek, S.E.M., E. Harthill, J., Nielsen, T.H., MacKintosh, C., 2004. Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Plant J.* 37, 654–667.

## L

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lamia, K. a, Sachdeva, U.M., DiTacchio, L., Williams, E.C., Alvarez, J.G., Egan, D.F., Vasquez, D.S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R.J., Thompson, C., Evans, R.M., 2009. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* 326, 437–440.
- Lane, M., H, M., RL, E., 1969. Phosphoenolpyruvate Carboxylase from Peanut Cotyledons. *Method. Enzymol.* 13, 277–283.
- Lang, F., Artunc, F., Vallon, V., 2009. The physiological impact of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Curr. Opin. Nephrol. Hy.* 18, 439–448.
- Le Foll, M., Blanchet, S., Millan, L., Mathieu, C., Bergounioux, C., Glab, N., 2008. The plant CDK inhibitor NtKIS1a interferes with dedifferentiation, is specifically down regulated during development and interacts with a JAB1 homolog. *Plant Sci.* 175, 513–523.
- Li, J.-F., Li, L., Shen, J., 2010. Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant DNA with diverse applications in plant biology. *Plant Methods* 6 (1), 1.
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y.-J., Gao, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T.J., Shaw, R.J., Cohen, R.A., Zang, M., 2011. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* 13, 376–388.
- Liang, J., Shao, S.H., Xu, Z.-X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D.J., Gutterman, J.U., Walker, C.L., Slingerland, J.M., Mills, G.B., 2007. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 9, 218–224.



- Liang, J., Slingerland, J.M., 2003. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell cycle* 2, 339–345.
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., Lee, J.-H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., Franssen, E., Slingerland, J.M., 2002. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat. Med.* 8, 1153–1160.
- Liley, R.M., Stitt, M., Mader, G., Heldt, H.W., 1982. Rapid fractionation of wheat protoplasts using membrane filtration. *Plant Physiol.* 70, 965–970.
- Lin, H.-K., Wang, G., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Liu, Y., Chan, C.-H., Yang, W.-L., Erdjument-Bromage, H., Nakayama, K.I., Nimer, S., Tempst, P., Pandolfi, P.P., 2009. Phosphorylation-dependent regulation of cytosolic localization and oncogenic function of Skp2 by Akt/PKB. *Nat. Cell Biol.* 11, 420–432.
- Lin, T.A., Kong, X., Haystead, T.A., Pause, A., Belsham, G., Sonenberg, N. & Lawrence, J.C. (1994). PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science.* 266 (5185), 653–656.
- Liu, J., Zhang, Y., Qin, G., Tsuge, T., Sakaguchi, N., Luo, G., Sun, K., Shi, D., Aki, S., Zheng, N., Aoyama, T., Oka, A., Yang, W., Umeda, M., Xie, Q., Gu, H., Qu, L.-J., 2008. Targeted degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK4/KRP6 by RING-type E3 ligases is essential for mitotic cell cycle progression during Arabidopsis gametogenesis. *Plant Cell* 20, 1538–1554.
- Liu, Y., Bassham, D.C., 2010. TOR is a negative regulator of autophagy in Arabidopsis thaliana. *PLoS one* 5, e11883.
- Lizcano, J.M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Mäkelä, T.P., Hardie, D.G., Alessi, D.R., 2004. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 23, 833–843.
- Löffler, A.S., Alers, S., Dieterle, A.M., Keppeler, H., Franz-Wachtel, M., Kundu, M., Campbell, D.G., Wesselborg, S., Alessi, D.R., Stork, B., 2011. Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop. *Autophagy* 7, 696–706.
- López-Paz, C., Vilela, B., Riera, M., Pagès, M., Lumberras, V., 2009. Maize AKINbetagamma dimerizes through the KIS/CBM domain and assembles into SnRK1 complexes. *FEBS Lett.* 583, 1887–1894.

## M

---

- Magnuson, B., Ekim, B., Fingar, D.C., 2012. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochemical J.* 441, 1–21.
- Mahfouz, M.M., Kim, S., Delauney, A.J., Verma, D.P.S., 2006. Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* 18, 477–490.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S., 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912–1934.
- Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., Hue, L., 2000. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol.* 10, 1247–1255.
- Martínez-Barajas, E., Delatte, T., Schluepmann, H., de Jong, G.J., Somsen, G.W., Nunes, C., Primavesi, L.F., Coello, P., Mitchell, R. a C., Paul, M.J., 2011. Wheat grain development is characterized by remarkable trehalose 6-phosphate accumulation pregrain filling: tissue distribution and relationship to SNF1-related protein kinase1 activity. *Plant Physiol.* 156, 373–381.
- Mayer, F.V., Heath, R., Underwood, E., Sanders, M.J., Carmena, D., McCartney, R.R., Leiper, F.C., Xiao, B., Jing, C., Walker, P.A., Haire, L.F., Ogrodowicz, R., Martin, S.R., Schmidt, M.C., Gambin, S.J., Carling, D., 2011. ADP Regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* Homolog of AMP-Activated Protein Kinase. *Cell Metab.* 14, 707–714.
- McKibbin, R.S., Muttucumar, N., Paul, M.J., Powers, S.J., Burrell, M.M., Coates, S., Purcell, P.C., Tiessen, A., Geigenberger, P., Halford, N.G., 2006. Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant Biotechnol. J.* 4, 409–418.



- McMichael, R.W., Bachmann, M., Huber, S.C., 1995. Spinach Leaf Sucrose-Phosphate Synthase and Nitrate Reductase Are Phosphorylated/Inactivated by Multiple Protein Kinases in Vitro. *Plant Physiol.* 108, 1077–1082.
- Meek, D.W., Knippschild, U., 2003. Posttranslational Modification of MDM2. *Mol. Cancer Res.* 1, 1017–1026.
- Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., Robaglia, C., 2002. Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6422–6427.
- Menges, M., de Jager, S.M., Gruissem, W., Murray, J.A.H., 2005. Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J.* 41, 546–566.
- Millan, L., 2011. Caractérisation d'inhibiteurs de complexes CDK-cycline chez Arabidopsis thaliana. Thèse, Université Paris-Sud.
- Milne, D., Kampanis, P., Nicol, S., Dias, S., Campbell, D.G., Fuller-Pace, F., Meek, D.W., 2004. A novel site of AKT-mediated phosphorylation in the human MDM2 onco-protein. *FEBS Lett.* 577, 270–276.
- Mizoguchi, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kamada, H., Shinozaki, K., 1995. Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett.* 358, 199–204.
- Moellering, H., Gruber, W., 1966. Determination of citrate with citrate lyase. *Anal. Biochem.* 17, 369–376.
- Momcilovic, M., Hong, S.-P., Carlson, M., 2006. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J. Biol. Chem.* 281, 25336–25343.
- Mora, A., Komander, D., van Aalten, D.M.F., Alessi, D.R., 2004. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 15, 161–170.
- Moreau, M., Azzopardi, M., Clément, G., Dobrenel, T., Marchive, C., Renne, C., Martin-Magniette, M.-L., Taconnat, L., Renou, J.-P., Robaglia, C., Meyer, C., 2012. Mutations in the Arabidopsis homolog of LST8/GβL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *Plant Cell* 24, 463–481.
- Morisaki, H., Fujimoto, A., Ando, A., Nagata, Y., Ikeda, K., Nakanishi, M., 1997. Cell cycle-dependent phosphorylation of p27 cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor by cyclin E/Cdk2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 386–390.
- Moss, S.C., Lightell, D.J., Marx, S.O., Marks, A.R., Woods, T.C., 2010. Rapamycin regulates endothelial cell migration through regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *J. Biol. Chem.* 285, 11991–11997.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum* 473–497.

## N-O

---

- Nagano, Y., Fukushima, T., Okemoto, K., Tanaka, K., Bowtell, D.D.L., Ronai, Z., Reed, J.C., Matsuzawa, S., 2011. Siah1/SIP regulates p27(kip1) stability and cell migration under metabolic stress. *Cell Cycle* 10, 2592–2602.
- Nagata, T., Nemoto, Y., Hasezawa, S., 1992. Tobacco BY-2 Cell Line as the “HeLa” Cell in the Cell Biology of Higher Plants. *Int. Rev. Cytol.* 132, 1–30.
- Nakai, T., Kato, K., Shinmyo, A., Sekine, M., 2006. Arabidopsis KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS Lett.* 580, 336–340.
- Narbonne, P., Roy, R., 2009. Caenorhabditis elegans dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival. *Nature* 457, 210–214.
- Nath, N., McCartney, R.R., Schmidt, M.C., 2003. Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Mol. Biol. Cell* 23, 3909–3917.



- Neigeborn, L., Carlson, M., 1984. Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 108, 845–858.
- Nemazanyy, I., Panasyuk, G., Zhyvoloup, A., Panayotou, G., Gout, I., Filonenko, V.V., 2004. Specific interaction between S6K1 and CoA synthase: a potential link between the mTOR/S6K pathway, CoA biosynthesis and energy metabolism. *FEBS Lett.* 578, 357–362.
- Neumann, D., 2003. Mammalian AMP-activated protein kinase: functional, heterotrimeric complexes by co-expression of subunits in *Escherichia coli*. *Protein Expres. Purif.* 30, 230–237.
- Oakhill, J.S., Chen, Z.-P., Scott, J.W., Steel, R., Castelli, L.A., Ling, N., Macaulay, S.L., Kemp, B.E., 2010.  $\beta$ -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19237–19241.
- Oakhill, J.S., Steel, R., Chen, Z.-P., Scott, J.W., Ling, N., Tam, S., Kemp, B.E., 2011. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science* 332, 1433–1435.
- Oh, W.J., Wu, C., Kim, S.J., Facchinetti, V., Julien, L.-A., Finlan, M., Roux, P.P., Su, B., Jacinto, E., 2010. mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *EMBO J.* 29, 3939–3951.
- Olanich, M.E., Moss, B.L., Piwnica-Worms, D., Townsend, R.R., Weber, J.D., 2011. Identification of FUSE-binding protein 1 as a regulatory mRNA-binding protein that represses nucleophosmin translation. *Oncogene* 30, 77–86.
- Ormenese, S., de Almeida Engler, J., De Groot, R., De Veylder, L., Inzé, D., Jacqmard, A., 2004. Analysis of the spatial expression pattern of seven Kip related proteins (KRPs) in the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 93, 575–580.
- Otterhag, L., Gustavsson, N., Alsterfjord, M., Pical, C., Lehrach, H., Gobom, J., Sommarin, M., 2006. *Arabidopsis* PDK1: identification of sites important for activity and downstream phosphorylation of S6 kinase. *Biochimie* 88, 11–21.
- Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M. & Donner, D.B. (1999). NF- $\kappa$ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature.* 401 (6748), 82–85.

## P-Q

---

- Pardo, O.E., Wellbrock, C., Khanzada, U.K., Aubert, M., Arozarena, I., Davidson, S., Bowen, F., Parker, P.J., Filonenko, V.V., Gout, I., Sebire, N., Marais, R., Downward, J., Seckl, M.J., 2006. FGF-2 protects small cell lung cancer cells from apoptosis through a complex involving PKCepsilon, B-Raf and S6K2. *EMBO J.* 25, 3078–3088.
- Park, J., Leong, M.L., Buse, P., Maiyar, A.C., Firestone, G.L., Hemmings, B.A., 1999. Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J.* 18, 3024–3033.
- Pause, A., Belsham, G., Gingras, A.C., Donzé, O., Lin, T.A., Lawrence, J.C. & Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature.* 371 (6500), 762–767.
- Pearce, L.R., Komander, D., Alessi, D.R., 2010. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 9–22.
- Pearce, L.R., Sommer, E.M., Sakamoto, K., Wullschleger, S., Alessi, D.R., 2011. Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney. *Biochem. J.* 436, 169–179.
- Pehmøller, C., Treebak, J.T., Birk, J.B., Chen, S., Mackintosh, C., Hardie, D.G., Richter, E.A., Wojtaszewski, J.F.P., 2009. Genetic disruption of AMPK signaling abolishes both contraction- and insulin-stimulated TBC1D1 phosphorylation and 14-3-3 binding in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. - Endoc. M.* 297, 665–675.
- Peres, A., Churchman, M.L., Hariharan, S., Himanen, K., Verkest, A., Vandepoele, K., Magyar, Z., Hatzfeld, Y., Van Der Schueren, E., Beemster, G.T.S., Frankard, V., Larkin, J.C., Inzé, D., De Veylder, L., 2007. Novel plant-specific cyclin-dependent kinase inhibitors induced by biotic and abiotic stresses. *J. Biol. Chem.* 282, 25588–25596.





- Pérez-Pérez, M.E., Florencio, F.J., Crespo, J.L., 2010. Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 152, 1874–1888.
- Pien, S., Wyrzykowska, J., Fleming, A.J., 2001. Novel marker genes for early leaf development indicate spatial regulation of carbohydrate metabolism within the apical meristem. *Plant J.* 25, 663–674.
- Pierre, M., Traverso, J. a, Boisson, B., Domenichini, S., Bouchez, D., Giglione, C., Meinel, T., 2007. N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 2804–2821.
- Pitzschke, A., Schikora, A., Hirt, H., 2009. MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 12, 421–426.
- Polge, C., Jossier, M., Crozet, P., Gissot, L., Thomas, M., 2008. Beta-subunits of the SnRK1 complexes share a common ancestral function together with expression and function specificities; physical interaction with nitrate reductase specifically occurs via AKINbeta1-subunit. *Plant Physiol.* 148, 1570–1582.
- Polge, C., Thomas, M., 2007. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci.* 12, 20–28.
- Popova, T.N., Pinheiro de Carvalho, M. a, 1998. Citrate and isocitrate in plant metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1364, 307–325.
- Prilusky, J., Felder, C.E., Zeev-Ben-Mordehai, T., Rydberg, E.H., Man, O., Beckmann, J.S., Silman, I., Sussman, J.L., 2005. FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics* 21, 3435–3438.
- Pullen, N., Dennis, P.B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S.C., Hemmings, B.A., Thomas, G., 1998. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* 279, 707–710.
- Quinn, J.M.W., Tam, S., Sims, N.A., Saleh, H., McGregor, N.E., Poulton, I.J., Scott, J.W., Gillespie, M.T., Kemp, B.E., van Denderen, B.J.W., 2010. Germline deletion of AMP-activated protein kinase beta subunits reduces bone mass without altering osteoclast differentiation or function. *FASEB J.* 24, 275–285.

## R

---

- Rajamohan, F., Harris, M.S., Frisbie, R.K., Hoth, L.R., Geoghegan, K.F., Valentine, J.J., Reyes, A.R., Landro, J.A., Qiu, X., Kurumbail, R.G., 2010. *Escherichia coli* expression, purification and characterization of functional full-length recombinant alpha2beta2gamma3 heterotrimeric complex of human AMP-activated protein kinase. *Protein Expres. Purif.* 73, 189–197.
- Ramaiah, A., Hathaway, J.A., Atkinson, D.E., 1964. Adenylate as a major regulator. Effect on yeast phosphofructokinase kinetics. *J. Biol. Chem.* 239, 3619–3622.
- Ramanathan, L., Sheth, P.R., Ogas, P., Xiao, L., Le, H.V., 2010. Purification and characterization of truncated human AMPK alpha 2 beta 2 gamma 3 heterotrimer from baculovirus-infected insect cells. *Protein Expres. Purif.* 70, 13–22.
- Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A.-C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G.L., Polakiewicz, R.D., Sonenberg, N., Hershey, J.W.B., 2004. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J.* 23, 1761–1769.
- Rellos, P., Pike, A.C.W., Niesen, F.H., Salah, E., Lee, W.H., von Delft, F., Knapp, S., 2010. Structure of the CaMKIIdelta/calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation. *PLoS Biol.* 8, e1000426.
- Richardson, C.J., Bröenstrup, M., Fingar, D.C., Jülich, K., Ballif, B.A., Gygi, S., Blenis, J., 2004. SKAR is a specific target of S6 kinase 1 in cell growth control. *Curr. Biol.* 14, 1540–1549.
- Robaglia, C., Thomas, M., Meyer, C., 2012. Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 15, 301–307.
- Rolland, F., Baena-González, E., Shen, J., 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57, 675–709.



Rössig, L., Jadidi, A.S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., 2001. Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5644–5657.

Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., Weisshaar, B., 2003. An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* 53, 247–259.

Rudolph, M.J., Amodeo, G. a, Iram, S.H., Hong, S.-P., Pirino, G., Carlson, M., Tong, L., 2007. Structure of the Bateman2 domain of yeast Snf4: dimeric association and relevance for AMP binding. *Structure* 15, 65–74.

Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massagué, J., Pavletich, N.P., 1996. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382, 325–331.

## S

Sambrook, J., Fritsh, E., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual - Second Edition*, Cold Sprin. ed.

Sanders, M.J., Grondin, P.O., Hegarty, B.D., Snowden, M. a, Carling, D., 2007. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochemical J.* 403, 139–148.

Santner, A.A., Watson, J.C., 2006. The WAG1 and WAG2 protein kinases negatively regulate root waving in *Arabidopsis*. *Plant J.* 45, 752–764.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101.

Schenk, P.M., Baumann, S., Mattes, R., Steinbiss, H.H., 1995. Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare Arg tRNAs. *Biotechniques* 19, 196–8, 200.

Scholz, R., Suter, M., Weimann, T., Polge, C., Konarev, P.V., Thali, R.F., Tuerk, R.D., Viollet, B., Wallimann, T., Schlattner, U., Neumann, D., 2009. Homo-oligomerization and activation of AMP-activated protein kinase are mediated by the kinase domain alphaG-helix. *J. Biol. Chem.* 284, 27425–27437.

Scott, J.W., Hawley, S.A., Green, K.A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G.A., Norman, D.G., Hardie, D.G., 2004. CBS domains form energy- sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted. *Plasmid* 113 (2), 274–284.

Sebbagh, M., Olschwang, S., Santoni, M.-J., Borg, J.-P., 2011. The LKB1 complex-AMPK pathway: the tree that hides the forest. *Fam. Cancer* 10, 415–424.

Serres, M.P., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Concha, C., Gurian-West, M., Daburon, V., Roberts, J.M., Besson, A., 2011. Cytoplasmic p27 is oncogenic and cooperates with Ras both in vivo and in vitro. *Oncogene* 30, 2846–2858.

Shah, O.J., Wang, Z., Hunter, T., 2004. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr. Biol.* 14, 1650–1656.

Sheaff, R.J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J.M., Clurman, B.E., 1997. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev.* 11, 1464–1478.

Shen, W., Hanley-Bowdoin, L., 2006. Geminivirus infection up-regulates the expression of two *Arabidopsis* protein kinases related to yeast SNF1- and mammalian AMPK-activating kinases. *Plant Physiol.* 142, 1642–1655.

Shen, W., Reyes, M.I., Hanley-Bowdoin, L., 2009. *Arabidopsis* protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant Physiol.* 150, 996–1005.

Sherr, C.J., Roberts, J.M., 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512.

Shima, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G., Kozma, S.C., 1998. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J.* 17, 6649–6659.



- Shin, I., Yakes, F.M., Rojo, F., Shin, N.-Y., Bakin, A.V., Baselga, J., Arteaga, C.L., 2002. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat. Med.* 8, 1145–1152.
- Shin, I., Rotty, J., Wu, F.Y. & Arteaga, C.L. (2005). Phosphorylation of p27Kip1 at Thr-157 interferes with its association with importin alpha during G1 and prevents nuclear re-entry. *J. Biol. Chem.* 280 (7), 6055–6063.
- Shorning, B.Y., Clarke, A.R., 2011. LKB1 loss of function studied in vivo. *FEBS Lett.* 585, 958–966.
- Short, J.D., Dere, R., Houston, K.D., Cai, S.-L., Kim, J., Bergeron, J.M., Shen, J., Liang, J., Bedford, M.T., Mills, G.B., Walker, C.L., 2010. AMPK-mediated phosphorylation of murine p27 at T197 promotes binding of 14-3-3 proteins and increases p27 stability. *Mol. Carcinog.* 49, 429–439.
- Short, J.D., Houston, K.D., Dere, R., Cai, S.-L., Kim, J., Johnson, C.L., Broaddus, R.R., Shen, J., Miyamoto, S., Tamanoi, F., Kwiatkowski, D., Mills, G.B., Walker, C.L., 2008. AMP-activated protein kinase signaling results in cytoplasmic sequestration of p27. *Cancer Res.* 68, 6496–6506.
- Soltys, C.M., Kovacic, S. & Dyck, J. (2006). Activation of cardiac AMP-activated protein kinase by LKB1 expression or chemical hypoxia is blunted by increased Akt activity. *Am. J. Physiol. - Heart C.* 290 (6), 2472–2479.
- Stein, S.C., Woods, A., Jones, N.A., Davison, M.D., Carling, D., 2000. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochemical J.* 345 (3), 437–443.
- Steinberg, G.R., Kemp, B.E., 2009. AMPK in health and disease. *Physiol. Rev.* 89, 1025–1078.
- Steinberg, G.R., O'Neill, H.M., Dzamko, N., Galic, S., Naim, T., Koopman, R., Jørgensen, S.B., Honeyman, J., Hewitt, K., Chen, Z.-P., Schertzer, J.D., Scott, J.W., Koentgen, F., Lynch, G.S., Watt, M.J., van Denderen, B.J.W., Campbell, D.J., Kemp, B.E., 2010. Whole body deletion of AMP-activated protein kinase  $\beta_2$  reduces muscle AMPK activity and exercise capacity. *J. Biol. Chem.* 285, 37198–37209.
- Stitt, M., Lilley, R.M., Heldt, H.W., 1982. Adenine nucleotide levels in the cytosol, chloroplasts, and mitochondria of wheat leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 70, 971–977.
- Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Painter, G.F., Holmes, A.B., McCormick, F., Hawkins, P.T., 1997. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277, 567–570.
- Studier, F.W., Moffatt, B.A., 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113–130.
- Studier, F.W., 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein. Expr. Purif.* 41, 207–234.
- Sugden, C., Crawford, R.M., Halford, N.G., Hardie, D.G., 1999a. Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J.* 19, 433–439.
- Sugden, C., Donaghy, P.G., Halford, N.G., Hardie, D.G., 1999b. Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiol.* 120, 257–274.
- Surjit, M., Lal, S.K., 2007. Glycogen synthase kinase-3 phosphorylates and regulates the stability of p27kip1 protein. *Cell cycle* 6, 580–588.
- Sussman, M.A., Völkers, M., Fischer, K., Bailey, B., Cottage, C.T., Din, S., Gude, N., Avitabile, D., Alvarez, R., Sundararaman, B., Quijada, P., Mason, M., Konstandin, M.H., Malhowski, A., Cheng, Z., Khan, M., McGregor, M., 2011. Myocardial AKT: the omnipresent nexus. *Physiol. Rev.* 91, 1023–1070.
- Sutherland, C.M., Hawley, S.A., McCartney, R.R., Leech, A., Stark, M.J.R., Schmidt, M.C., Hardie, D.G., 2003. Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr. Biol.* 13, 1299–1305.
- Suttangkakul, A., Li, F., Chung, T., Vierstra, R.D., 2011. The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 3761–3779.



## T

- Taiz, L., Zeiger, E., 1991. *Plant Physiology*, Ed. 1st. T. ed. Redwood City.
- Takatsuka, H., Ohno, R., Umeda, M., 2009. The Arabidopsis cyclin-dependent kinase-activating kinase CDKF1 is a major regulator of cell proliferation and cell expansion but is dispensable for CDKA activation. *Plant J.* 59, 475–487.
- Tavares, R., Vidal, J., van Lammeren, A., Kreis, M., 2002. Non-purified anti-peptide sera generate tissue specific artefacts in immunohistochemical staining of Arabidopsis thaliana. *Plant Sci.* 162, 309–314.
- Toroser, D., Plaut, Z., Huber, S.C., 2000. Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 123, 403–412.
- Torres Acosta, J.A., Fowke, L., Wang, H., 2011. Analyses of phylogeny, evolution, conserved sequences and genome-wide expression of the ICK/KRP family of plant CDK inhibitors. *Ann. Bot. - London* 107, 1141–1157.
- Townley, R., Shapiro, L., 2007. Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase. *Science* 315, 1726–1729.
- Treins, C., Warne, P.H., Magnuson, M.A., Pende, M., Downward, J., 2010. Rictor is a novel target of p70 S6 kinase-1. *Oncogene* 29, 1003–1016.
- Tzeng, T.-Y., Kong, L.-R., Chen, C.-H., Shaw, C.-C., Yang, C.-H., 2009. Overexpression of the lily p70(s6k) gene in Arabidopsis affects elongation of flower organs and indicates TOR-dependent regulation of AP3, PI and SUP translation. *Plant Cell Physiol.* 50, 1695–1709.

## V-W

- Vahtomeri, K., Mäkelä, T.P., 2011. Molecular mechanisms of tumor suppression by LKB1. *FEBS Lett.* 585, 944–951.
- van Dam, T.J.P., Zwartkruis, F.J.T., Bos, J.L., Snel, B., 2011. Evolution of the TOR pathway. *J. Mol. Evol.* 73, 209–220.
- Van Leene, J., Boruc, J., De Jaeger, G., Russinova, E., De Veylder, L., 2011. A kaleidoscopic view of the Arabidopsis core cell cycle interactome. *Trends Plant Sci.* 16, 141–150.
- Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., Van Isterdael, G., Verkest, A., Neiryck, S., Buffel, Y., De Bodt, S., Maes, S., Laukens, K., Pharazyn, A., Ferreira, P.C.G., Eloy, N., Renne, C., Meyer, C., Faure, J.-D., Steinbrenner, J., Beynon, J., Larkin, J.C., Van de Peer, Y., Hilson, P., Kuiper, M., De Veylder, L., Van Onckelen, H., Inzé, D., Witters, E., De Jaeger, G., 2010. Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in Arabidopsis thaliana. *Mol. Syst. Biol.* 6, 397–409.
- Van Leene, J., Stals, H., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Van Isterdael, G., De Clercq, A., Bonnet, E., Laukens, K., Remmerie, N., Henderickx, K., De Vijlder, T., Abdelkrim, A., Pharazyn, A., Van Onckelen, H., Inzé, D., Witters, E., De Jaeger, G., 2007. A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in Arabidopsis thaliana. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1226–1238.
- Vervoorts, J., Lüscher, B., 2008. Post-translational regulation of the tumor suppressor p27(KIP1). *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3255–3264.
- Vidal, J., Godbillon, G., Gadal, P., 1980. Recovery of active, highly purified phosphoenolpyruvate carboxylase from specific immunoabsorbent column. *FEBS Lett.* 118, 31–34.
- Viglietto, G., Motti, M.L., Bruni, P., Melillo, R.M., D'Alessio, A., Califano, D., Vinci, F., Chiappetta, G., Tschlis, P., Bellacosa, A., Fusco, A. & Santoro, M. (2002). Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat. Med.* 8 (10), 1136–1144.
- Vincent, O., Carlson, M., 1999. Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. *EMBO J.* 18, 6672–6681.
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., Carlson, M., 2001. Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev.* 15 (9), 1104–1114.





- Walker, J.D., Oppenheimer, D.G., Conciene, J., Larkin, J.C., 2000. SIAMESE, a gene controlling the endoreduplication cell cycle in *Arabidopsis thaliana* trichomes. *Development* 127, 3931–3940.
- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., Kudla, J., 2004. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* 40, 428–438.
- Wang, D.Y., Kumar, S., Hedges, S.B., 1999a. Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *P. Roy. Soc. B. - Biol. Sci.* 266, 163–171.
- Wang, Q., Somwar, R., Bilan, P.J., Liu, Z., Jin, J., Woodgett, J.R., Klip, A., 1999b. Protein Kinase B/Akt Participates in GLUT4 Translocation by Insulin in L6 Myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4008–4018.
- Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D.R., Proud, C.G., 2001. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J.* 20, 4370–4309.
- Warden, S.M., Richardson, C., Jr, J.O.D., Stapleton, D., Kemp, B.E., Witters, L.A., 2001. Post-translational modifications of the b-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochem. J* 283, 275–283.
- Weber, J.D., Gutmann, D.H., 2012. Deconvoluting mTOR biology. *Cell cycle* 11, 236–248.
- Weng, Q.P., Kozlowski, M., Belham, C., Zhang, A., Comb, M.J., Avruch, J., 1998. Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies. *J. Biol. Chem.* 273, 16621–16629.
- Westerhuis, W.H., Sturgis, J.N., Niederman, R.A., 2000. Reevaluation of the electrophoretic migration behavior of soluble globular proteins in the native and detergent-denatured states in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 284, 143–152.
- Wilson, W. A., Hawley, S.A., Hardie, D.G., 1996. Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr. Biol.* 6, 1426–1434.
- Winston, J., Dong, F., Pledger, W.J., 1996. Differential modulation of G1 cyclins and the Cdk inhibitor p27kip1 by platelet-derived growth factor and plasma factors in density-arrested fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 271, 11253–11260.
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.-P., Momcilovic, M., Johnstone, S.R., Carlson, M., Carling, D., 2005. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* 2, 21–33.
- Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G.D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., Carling, D., 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* 13, 2004–2008.
- X-Y**
- 
- Xiao, B., Heath, R., Saiu, P., Leiper, F.C., Leone, P., Jing, C., Walker, P.A., Haire, L.F., Eccleston, J.F., Davis, C.T., others, 2007. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* 449, 496–500.
- Xiao, B., Sanders, M.J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F.V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P. a, Eccleston, J.F., Haire, L.F., Saiu, P., Howell, S.A., Aasland, R., Martin, S.R., Carling, D., Gamblin, S.J., 2011. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 472, 230–233.
- Xie, X., Guan, K.-L., 2011. The ribosome and TORC2: collaborators for cell growth. *Cell* 144, 640–642.
- Xiong, Y., Shen, J., 2012. Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *J. Biol. Chem.* 287, 2836–2842.
- Ylikorkala, A., Rossi, D.J., Korsisaari, N., Luukko, K., Alitalo, K., Henkemeyer, M., Mäkelä, T.P., 2001. Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in Lkb1-deficient mice. *Science* 293, 1323–1326.
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., Shen, J., 2007. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* 2, 1565–1572.



Yoon, M.-K., Mitrea, D.M., Ou, L., Kriwacki, R.W., 2012. Cell cycle regulation by the intrinsically disordered proteins p21 and p27. *Biochem. Soc. T.* 40, 981–988.

## Z

Zagórska, A., Deak, M., Campbell, D.G., Banerjee, S., Hirano, M., Aizawa, S., Prescott, A.R. & Alessi, D.R. (2010). New roles for the LKB1-NUAK pathway in controlling myosin phosphatase complexes and cell adhesion. *Sci. Signal.* 3 (115), ra25.

Zegzouti, H., Li, W., Lorenz, T.C., Xie, M., Payne, C.T., Smith, K., Glenny, S., Payne, G.S., Christensen, S.K., 2006a. Structural and functional insights into the regulation of Arabidopsis AGC VIIIa kinases. *J. Biol. Chem.* 281, 35520–35530.

Zegzouti, H., Anthony, R.G., Jahchan, N., Bögre, L., Christensen, S.K., 2006b. Phosphorylation and activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 6404–6409.

Zeqiraj, E., Filippi, B.M., Deak, M., Alessi, D.R., van Aalten, D.M.F., 2009. Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science* 326, 1707–1711.

Zhang, S.H., Broome, M.A., Lawton, M.A., Hunter, T., Lamb, C.J., 1994. atpk1, a novel ribosomal protein kinase gene from Arabidopsis. II. Functional and biochemical analysis of the encoded protein. *J. Biol. Chem.* 269, 17593–17599.

Zhang, Y., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Andralojc, P.J., Mitchell, R. a C., Powers, S.J., Schlupe, H., Delatte, T., Wingler, A., Paul, M.J., 2009. Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 149, 1860–1871.

Zhang, Y., Shewry, P.R., Jones, H., Barcelo, P., Lazzeri, P. a, Halford, N.G., 2001. Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. *Plant J.* 28, 431–441.

Zhou, Y., Fowke, L., Wang, H., 2002. Plant CDK inhibitors: studies of interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and functional comparisons in transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell Rep.* 20, 967–975.

Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., Hall, M.N., 2011. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 144, 757–768.

Zourelidou, M., Müller, I., Willige, B.C., Nill, C., Jikumaru, Y., Li, H., Schwechheimer, C., 2009. The polarly localized D6 PROTEIN KINASE is required for efficient auxin transport in Arabidopsis thaliana. *Development* 136, 627–636.



# Annexes



# *Annexe 1: Spectres*

**Résultats des analyses LC-MS/MS des éluats d'immuno-  
purification des complexes AtSnRK1**





## Keys

*Nota Bene: classical contaminants such as Keratin have not been reported here*

**AtSnRK1 proteins are in orange**

---

<b>log(E value)</b>	log of each protein E-value
<b>Coverage</b>	Protein Coverage in %
<b>MW</b>	Molecular mass in kDa.
<b>Spectra</b>	Number of spectra that allowed identification of the protein
<b>Specifics</b>	In the case of a group of protein, number of specific spectra for each one (if "-" there is no group)
<b>Peptides</b>	Number of unique peptide that allowed identification of the protein
<b>PAI</b>	Protein Abundance Index (relative abundance of the protein and is equal to : (number of spectra observed) / (number of attended peptides)
<b>Redundancy</b>	Number of proteins identified with the same spectra

---

## Type of modifications and corresponding mass

Carbamidomethylation of cysteines = +57.04

Oxydation of methionines = +15.99

Deamidation of N-terminal of peptide = -17.0265

Acetylation of N-terminal of protein = +42.0

exemple: "M8 +15.99" means that methionine number 8 of the peptide has a shift of mass equal to 15.99, corresponding to an oxydation

---

## "Peptide" sheet



<b>Protein identified</b>	Description	log(E value)	Coverage	MW	Spectra	Specifics	Peptides	PAI	Redundancy
AtSnRK1α1	AT3G01090.1   Symbols: SNRK1.1, AKIN10	-15.9	6	58.2	2	-	2	0.1	-
AtSnRK1γ	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF	-145.7	48	47.3	19	-	14	1.1666666	-
RubisCO LS	ATCG00490.1   Symbols: RBCL   large subuni	-404.8	61	52.8	51	-	41	2.8421052	-
RubisCO SS	AT1G67090.1   Symbols: RBCS1A   RBCS1A;	-42.2	33	20.1	6	4	5	0.5833333	-
heavy-metal-associated c	AT5G19090.1   Symbols:   heavy-metal-associ	-25.3	10	59.5	4	-	4	0.2222222	-
Catalase 3	AT1G20620.1   Symbols: SEN2, CAT3   CAT3	-64.2	28	56.6	7	-	7	0.3809524	* 3



Protein	Description	Retention time	Sequence	Modifications
AtSnRK1 $\alpha$ 1	AT3G01090.1   Symbols: SNRK1.1, AKIN10   A	15.4	TSCGSPNYAAPEVISGK	
	AT3G01090.1   Symbols: SNRK1.1, AKIN10   A	16.9	GGIYTLPSHLSPGAR	
	AT3G01090.1   Symbols: SNRK1.1, AKIN10   A	18.4	TLGIGSFGR	
AtSnRK1 $\gamma$	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	11.5	NSEKPVGNISLR	
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	11.8	SSDSQDIEIR	
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	17.4	VEDLWDEQKQLSPNEK	
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	17.5	CGDTSAPIMSGVIAC	C1:+57.04 - C15:+57.04 - M $\epsilon$
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	17.7	VEDLWDEQKQLSPNEK	
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	18.5	CGDTSAPIMSGVIACK	C1:+57.04 - C15:+57.04 - M $\epsilon$
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	20.5	ELILMLDAEK	M5:+15.99
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	21.9	SDSLAEAVQTLSK	
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	22	SDSLAEAVQTLSK	
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	22.9	IYEDEPVLQAFK	
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	23.8	WAPFLALQK	
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	24	VLSAPVVDVDAPEDASWIDR	
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	24.1	VLSAPVVDVDAPEDASWIDR	
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	24.9	DVQFLLTAPEIYHDYR	
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	24.9	DVQFLLTAPEIYHDYR	
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	25.5	LVHEPSGYFGDFFDGVMPLPENYR	M17:+15.99
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	26.5	LVHEPSGYFGDFFDGVMPLPENYR	M17:+15.99
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	27	LNACFESIPVSAFPLSSDSQDIEIR	C4:+57.04
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	27.2	PVSFAFPLSSDSQDIEIR	
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	30.4	IYVDDDFGNLEGLTLR	
	AT3G48530.1   Symbols: KING1   KING1 (SNF)	30.5	ENSFLTMLLLLSK	M7:+15.99
	ATCG00490.1   Symbols: RBCL   large subunit	5.7	AMHAVIDR	
	ATCG00490.1   Symbols: RBCL   large subunit	6.5	SQAETGEIK	
	ATCG00490.1   Symbols: RBCL   large subunit	6.9	DDYVEKDR	
	ATCG00490.1   Symbols: RBCL   large subunit	7.8	TSLSHYCR	
	ATCG00490.1   Symbols: RBCL   large subunit	8.5	AMHAVIDR	
	ATCG00490.1   Symbols: RBCL   large subunit	9.1	LSGGDHIHAGTWWGK	
ATCG00490.1   Symbols: RBCL   large subunit	9.2	LSGGDHIHAGTWWGK		
ATCG00490.1   Symbols: RBCL   large subunit	9.3	SGGDHIHAGTWWGK		



ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	12.4	YGRPLLGGTIKPK
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	12.4	GHYLNATAGTCEEMIK
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	12.5	GHYLNATAGTCEEMIK
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	12.7	PLLGCTIKPK
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	12.7	AVYECLR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	13	DDENVNSQPFMR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	13.5	VALEACVQAR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	13.8	QGPPHGIQVER
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	13.9	TYYTPEYETK
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	14.1	TFQGGPHGIQVER
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	14.1	SQAETGEIKGHYLNATAGTCEEMIK
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	14.5	VALEACVQAR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	15.4	GLLLHIHR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	15.6	VALEACVQAR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	16	DDENVNSQPFMR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	16.2	LYYTPEYETK
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	16.8	LEDLRIPPAYTK
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	17.8	GGLDFTKDDENVNSQPFMR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	17.8	GGLDFTKDDENVNSQPFMR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	18.3	DLAVEGNEIIR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	19.4	DLAVEGNEIIR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	19.7	GGLDFTKDDENVNSQPFMR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	21.6	GGLDFTKDDENVNSQPF
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	22.2	ELGVPVIMHDYLTGGFTANTSLSHYCR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	22.5	TTVWTDGLTSLDR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	23.1	CYHIEPVPGEETQFIAY
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	23.7	WSPELAAACEVWK
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	23.9	EITFNFTIDK
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	24.3	LEGDRESTLGFVDLLR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	24.3	LEGDRESTLGFVDLLR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	24.4	LYYTPEYETKTDILA AFR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	24.4	ELGVPVIMHDYLTGGFTAN
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	24.9	ESTLGFVDLLRDDYVEKDR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	25.9	WTTVWTDGLTSLDR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	25.9	ESTLGFVDLLRDDYVEK
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	26	ESTLGFVDLLRDDYVEK

## Rubisco LS





ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	26.3	ESTLGFVDLLR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	26.4	EITFNFTIDKLDGQE
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	27.4	EITFNFTIDKL
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	27.9	GTWTTVWTDGLTSLDR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	28.1	SSTGTWTTVWTDGLTSLDR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	28.3	AESSTGTWTTVWTDGLTSLDR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	28.5	ESSTGTWTTVWTDGLTSLDR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	28.5	VAAESSTGTWTTVWTDGLTSLDR
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	30.1	EITFNFTI
ATCG00490.1	Symbols: RBCL	large subunit	30.3	VTPQGVPEEAGAAVAESSTGTWTTVWTDG
AT5G38410.1	Symbols:   ribulose biphosphat		23.5	SYLPDLSDELAK
AT1G67090.1	Symbols: RBCS1A   RBCS1A; i		23.6	KFETLSYLPDLTDELAK
AT1G67090.1	Symbols: RBCS1A   RBCS1A; i		23.7	KFETLSYLPDLTDELAK
AT5G38410.1	Symbols:   ribulose biphosphat		24.4	QVQCISFIAYKPPSFTEA
AT5G38410.1	Symbols:   ribulose biphosphat		24.5	QVQCISFIAYKPPSFTEA
AT5G38430.1	Symbols:   ribulose biphosphat		24.7	QVQCISFIAYKPPSFTEA
AT5G38410.1	Symbols:   ribulose biphosphat		25	KFETLSYLPDLSDELAK
AT5G38410.1	Symbols:   ribulose biphosphat		25.1	KFETLSYLPDLSDELAK
AT5G38430.1	Symbols:   ribulose biphosphat		25.3	KFETLSYLPDLTDELAK
AT5G38430.1	Symbols:   ribulose biphosphat		25.4	KFETLSYLPDLTDELAK
AT1G20620.1	Symbols: SEN2, CAT3   CAT3		14.2	VPTNTNSYTGIR
AT1G20620.1	Symbols: SEN2, CAT3   CAT3		15.1	APGVQTPVIVR
AT1G20620.1	Symbols: SEN2, CAT3   CAT3		21.5	LGPNYLQLPVNAPK
AT1G20620.1	Symbols: SEN2, CAT3   CAT3		21.8	YRPSSAYNAPFYTTNGGAPVSNNISLITIGER
AT1G20620.1	Symbols: SEN2, CAT3   CAT3		25.8	LFIQTMDEPADEKFDPLDVTK
AT1G20620.1	Symbols: SEN2, CAT3   CAT3		27.3	EGNFDLVGNNTPVFFIR
AT1G20620.1	Symbols: SEN2, CAT3   CAT3		27.6	GFFEVTDISNLTCADFLR
AT1G20620.1	Symbols: SEN2, CAT3   CAT3		28	IWPEDILPLQPVGR
AT5G19090.1	Symbols:   heavy-metal-associ		6.9	GQKIGGGGGGGGGGGGGGGGPPK
AT5G19090.1	Symbols:   heavy-metal-associ		11.9	GMPFPVQMGGGGGGGPKGKGGPGGGGNM
AT5G19090.1	Symbols:   heavy-metal-associ		19.9	GGGGGGGGGGGGGGGPPK
AT5G19090.1	Symbols:   heavy-metal-associ		21.5	IGGGGGGGGGGGGGGGGPPK
<b>RubisCO SS</b>				
<b>Catalase 3</b>				
<b>heavy-metal-associated domain-containing</b>				
				C4: +57.04
				C4: +57.04
				C4: +57.04
				M6: +15.99
				C14: +57.04
				M8: +15.99 - M29: +15.99



## *Annexe II: Manuscrit*

**Phosphorylation of p27<sup>KIP1</sup> homologs KRP6 and 7 by SNF1-Related protein Kinase-1 links plant energy homeostasis and cell proliferation**



1  
2  
3 **Phosphorylation of p27<sup>KIP1</sup> homologs KRP6 and 7 by SNF1-**  
4 **Related protein Kinase-1 links plant energy homeostasis and**  
5 **cell proliferation.**  
6  
7  
8  
9

10  
11  
12  
13 **Thomas Guérinier<sup>1,†</sup>, Laurine Millan<sup>1,†</sup>, Pierre Crozet<sup>1,‡</sup>, Céline Oury<sup>1</sup>,**  
14 **François Rey<sup>1</sup>, Benoit Valot<sup>2</sup>, Chantal Mathieu<sup>1</sup>, Jean Vidal<sup>1</sup>, Michael**  
15 **Hodges<sup>1</sup>, Martine Thomas<sup>1</sup> and Nathalie Glab<sup>1,\*</sup>**  
16  
17  
18

19  
20 <sup>1</sup>Institut de Biologie des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de  
21 Recherche 8618, Bâtiment 630, Université Paris-Sud, Saclay Plant Sciences, 91405 Orsay  
22 Cedex, France; <sup>b</sup>Plateforme d'analyse protéomique de Paris Sud-Ouest, Unité Mixte de  
23 Recherche de Génétique Végétale Institut National de la Recherche Agronomique/Université  
24 Paris-Sud/Centre de Recherche de Biochimie et de Génétique Cellulaires/Institut National  
25 Agronomique Paris-Grignon, Ferme du Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette, France.  
26  
27  
28  
29  
30  
31

32  
33 **Footnotes**  
34

35 <sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.  
36

37 <sup>‡</sup>Present address: Instituto Gulbenkian de Ciência, Apartado 14, P-2781-901  
38 Oeiras, Portugal.  
39

40  
41 <sup>\*</sup>Author for correspondence.  
42  
43  
44  
45

46 **e-mail addresses of all authors:**  
47

48 Thomas Guérinier: thomas.guerinier@u-psud.fr  
49

50 Laurine Millan: laurine.millan@u-psud.fr  
51

52 Pierre Crozet: pcrozet@igc.gulbenkian.pt  
53

54 Céline Oury: celine.oury@u-psud.fr  
55

56 François Rey: rey\_francois\_rey@yahoo.fr  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 Benoit Valot: valot@moulon.inra.fr  
4

5 Chantal Mathieu: chantal.mathieu@u-psud.fr  
6

7 Jean Vidal: jean.vidal@u-psud.fr  
8

9 Michel Hodges: michael.hodges@u-psud.fr  
10

11 Martine Thomas: martine.thomas@u-psud.fr  
12

13 Nathalie Glab: nathalie.glab@u-psud.fr  
14  
15  
16  
17

18 **Author for correspondence:**

19  
20 Nathalie Glab, Institut de Biologie des Plantes, Université Paris-Sud/CNRS

21  
22 UMR8618, Bâtiment 630, 91405 Orsay Cedex, France.

23  
24 E-mail: [nathalie.glab@u-psud.fr](mailto:nathalie.glab@u-psud.fr)  
25  
26  
27

28  
29 **Running title:** Phosphorylation of plant p27<sup>KIP1</sup> homologs by SnRK1  
30  
31

32  
33 **Keywords**

34  
35 Kip-Related Protein, SNF1-Related protein Kinase-1, cell proliferation, energy  
36  
37 homeostasis, phosphorylation, *Arabidopsis thaliana*.  
38  
39  
40  
41

42 **Total count of words: 5939 words**

43  
44 **Count of words by section:**

45  
46 Summary: 237 words  
47 Introduction: 749 words  
48 Results: 1576 words  
49 Discussion: 1122 words  
50 Experimental procedures: 1476 words  
51 Acknowledgements: 94 words  
52 References: 1486 words  
53 Table titles: 20 words  
54 Figure legends: 665 words  
55  
56  
57  
58  
59  
60





## Summary

SNF1-Related protein Kinase-1 (SnRK1), the plant kinase homolog of mammalian AMP-activated protein Kinase (AMPK), is a sensor maintaining cellular energy homeostasis *via* the control of anabolism/catabolism balance. It was previously described that AMPK-dependent phosphorylation of p27<sup>KIP1</sup> impacts on cell cycle progression, autophagy and apoptosis. In this work, we show that SnRK1 phosphorylates the *Arabidopsis thaliana* cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>KIP1</sup> homologs, AtKRP6 and AtKRP7, thus extending the role of this kinase to the regulation of cell cycle progression. AtKRP6 and 7 were phosphorylated *in vitro* by the recombinant, activated catalytic subunit of SnRK1 (AtSnRK1 $\alpha$ 1). Tandem mass spectrometry and site-specific mutagenesis identified threonine (Thr) 152/151 as AtKRP6/7 phosphorylated residues respectively. AtSnRK1 physically interacts with AtKRP6 in the nucleus of transformed BY-2 tobacco protoplasts but, in contrast to mammals, AtKRP6 Thr152-phosphorylation state alone did not modify its nuclear localization. Using a heterologous yeast system, consisting of a *cdc28* yeast mutant complemented by *A. thaliana* CDKA;1, cell proliferation was shown to be abolished by AtKRP6<sup>WT</sup> and by the non-phosphorylatable AtKRP6<sup>T152A</sup>, but not by the phosphorylation-mimetic form AtKRP6<sup>T152D</sup>. Moreover, *A. thaliana* SnRK1 $\alpha$ 1/KRP6 double overexpressor (OE) plants showed an attenuated AtKRP6-associated phenotype (strongly serrated leaves and inability to perform callogenesis). Furthermore, this severe phenotype was not observed in OE-AtKRP6<sup>T152D</sup> plants. Overall, these results establish that the energy sensor AtSnRK1 plays a cardinal function in the control of cell proliferation in *A.*



1  
2  
3 *thaliana* plants through the inhibition of AtKRP6 biological function by  
4 phosphorylation.  
5  
6  
7  
8  
9  
10

## 11 **Introduction**

12  
13  
14  
15  
16 The control of energy balance is of paramount importance for living organisms.  
17  
18 During stresses that decrease energy status, eukaryotic cells react by limiting  
19 anabolism and enhancing catabolism. This crucial function is devoted to central  
20 regulators including members of the animal AMP-activated protein Kinase  
21 (AMPK), yeast Sucrose Non-Fermenting 1 (SNF1) and plant SNF1-Related  
22 protein Kinase-1 (SnRK1) protein kinase family (Hardie, 2007). Similar to its  
23 mammalian and yeast orthologs, SnRK1 has a combinatorial, trimeric structure  
24 comprising a catalytic ( $\alpha$ ) and two regulatory ( $\beta$  and  $\gamma$ ) subunits encoded by  
25 several nuclear genes (Polge and Thomas, 2007). Protein kinase activity is  
26 totally dependent on the phosphorylation of the catalytic  $\alpha$ -subunit on a T-loop  
27 threonine (Thr172 of *Arabidopsis thaliana* SnRK1 $\alpha$ 1) by the AtSnAK upstream  
28 kinases (Shen *et al.*, 2009; Crozet *et al.*, 2010). Moreover, we have shown  
29 recently that activated SnRK1 $\alpha$ 1 exerts a negative feedback phosphorylation on  
30 these upstream kinases (Crozet *et al.*, 2010). The activity of phosphorylated  
31 AMPK is also positively modulated in animals, but not in yeast, by AMP (direct  
32 activation) and ADP (indirect activation by protection from dephosphorylation)  
33 (Davies *et al.*, 1989; Oakhill *et al.*, 2011). In plants, SnRK1 metabolic control is  
34 still elusive. Trehalose-6-Phosphate (T6P), a SnRK1 inhibitor, has been  
35 suggested to be a carbon gauge controlling *in vivo* SnRK1 activity (which is  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 increased with decreasing T6P levels), while ADP (increasing with stress) may  
4  
5 inhibit a SnRK1 phosphatase (Zhang *et al.*, 2009). The cardinal role of the  
6  
7 *Arabidopsis thaliana* SnRK1 in controlling metabolism, energy balance, growth  
8  
9 and survival has been clearly established (Baena-González *et al.*, 2007). During  
10  
11 stress like darkness and hypoxia, AtSnRK1 orchestrates the reprogramming of  
12  
13 a plethora of catabolism (activation) and anabolism (inhibition) related genes.  
14  
15 The massive transcriptional reprogramming observed when AtSnRK1 $\alpha$ 1 activity  
16  
17 is increased in *A. thaliana* protoplasts is in good agreement with the global  
18  
19 function of AtSnRK1 to save energy and thus bypass the stress (Baena-  
20  
21 González *et al.*, 2007). One high energy-demanding function is cell division.  
22  
23 Indeed, in transgenic potato tubers presenting a decreased T6P level (and  
24  
25 therefore a potential increase of SnRK1 activity), transcript profiling revealed a  
26  
27 down-regulation of some genes involved in cell proliferation and growth while  
28  
29 cell cycle specific inhibitors were up-regulated (Debast *et al.*, 2011).  
30  
31 Interestingly, in mammals, AMPK has been found to phosphorylate p27<sup>KIP1</sup> on  
32  
33 residues Thr170 and Thr197/198 (Liang *et al.*, 2007; Short *et al.*, 2008; Short *et*  
34  
35 *al.*, 2010). p27<sup>KIP1</sup> is a member of the Cip/Kip family of Cyclin-dependent Kinase  
36  
37 Inhibitors (CKIs). These proteins were initially characterized as negative  
38  
39 regulators of Cyclin-Dependent Kinase (CDK)/cyclin complexes that drive cell  
40  
41 cycle progression. p27<sup>KIP1</sup> interacts with most CDK/cyclin complexes  
42  
43 inactivating CDK2/cyclin E complexes, while facilitating the assembly and the  
44  
45 nuclear import of CDK4/6/cyclin D (Coqueret, 2003). p27<sup>KIP1</sup>, like other Cip/Kip  
46  
47 proteins, is an intrinsically disordered protein (IDP), adopting specific  
48  
49 conformations only after binding to target proteins (Yoon *et al.*, 2012). Such a  
50  
51 conformational flexibility may explain why this protein has both cell cycle  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 negative and positive roles but also non-cell cycle functions independent of  
4  
5 CDK/cyclin complexes with an involvement in transcription, cell migration and  
6  
7 even oncogenesis (Besson *et al.*, 2008). In metabolically stressed mammalian  
8  
9 cells, the AMPK-dependent phosphorylation of p27<sup>KIP1</sup> promotes its stabilization  
10  
11 and its cytoplasmic sequestration thereby inducing cell cycle arrest, autophagy  
12  
13 or cell survival (Liang *et al.*, 2007; Short *et al.*, 2008; Short *et al.*, 2010).

14  
15  
16 In plants, amongst the two CKI families, KRPs (Kip-Related Proteins) constitute  
17  
18 a family of small-sized proteins with seven members in *A. thaliana*, AtKRP1-7  
19  
20 (Torres Acosta *et al.*, 2011). KRPs have the capacity to bind both CDK and  
21  
22 cyclin partners and to inhibit *in vitro* the kinase activity of CDK/cyclin complexes  
23  
24 *via* a conserved domain partially shared with their mammalian counterparts  
25  
26 while the rest of the protein diverge (De Veylder *et al.*, 2001; Nakai *et al.*, 2006).  
27  
28 Information on other KRP functions is currently restricted to KRP2 which was  
29  
30 recently shown to facilitate the accumulation of a D-type cyclin, CYCD2;1 in the  
31  
32 nucleus like its mammalian homolog p27<sup>KIP1</sup> (Sanz *et al.*, 2011).  
33  
34  
35

36  
37 In order to highlight a potential link between energy homeostasis and cell  
38  
39 proliferation in plants, it was tempting to investigate whether a SnRK1-mediated  
40  
41 phosphorylation of KRP takes place in plants and if so, if it could modify cell  
42  
43 cycle progression in *A. thaliana*. In the present work, we demonstrate the ability  
44  
45 of AtSnRK1 to interact with and to phosphorylate AtKRP6 and 7. Yeast  
46  
47 experiments, together with the analysis of *A. thaliana* plants overexpressing  
48  
49 both AtKRP6 and AtSnRK1 $\alpha$ 1, suggest that SnRK1 contributes to the control of  
50  
51 cell proliferation *via* the phosphorylation of KRP6.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60





## Results

*Arabidopsis thaliana* SnRK1 $\alpha$ 1 phosphorylates KRP6 and KRP7 in vitro

The *A. thaliana* genome encodes seven CKI p27<sup>KIP1</sup> homologs (AtKRP1-7) identified on the basis of the presence of a short domain, partially shared with mammalian CKIs, involved in the interaction with CDK/cyclin complexes. However, this domain is inversely located in plant (C-terminal end) and mammalian (N-terminus) proteins (Figure 1a). Furthermore, although the amino-acid similarity is restricted to this short domain, all of these proteins belong to the IDP family. The folding index profile of AtKRP6 and AtKRP7 was determined using the FoldIndex© prediction tool (Prilusky *et al.*, 2005). As shown in Figure 1b, AtKRP6 and AtKRP7 display a highly negative folding index profile, similar to their animal counterpart p27<sup>KIP1</sup>. Indeed, using the same prediction tool, while SnRK1 and CDKA;1 were shown to contain only 29% and 33% of protein residues predicted disordered, this proportion reached 77%, 78% and 91% for AtKRP6, AtKRP7 and p27<sup>KIP1</sup> respectively.

An *in silico* analysis (Prosite-Advanced (de Castro *et al.*, 2006)), allowed the detection of potential SnRK1-consensus phosphorylation sites in several AtKRP proteins. We focused on AtKRP6 and AtKRP7, the only family members that displayed one common putative phosphorylation site in the CDK/cyclin interaction domain (Thr152/Thr151 at the N-terminal end of the domain). Interestingly, AtKRP6 also contained a second SnRK1-consensus phosphorylation site at Ser91 (Figure 1a).



1  
2  
3 To investigate whether AtSnRK1 could phosphorylate AtKRP6 and AtKRP7 *in*  
4 *vitro*, GST-fused AtKRP6 and AtKRP7 proteins were produced in *E. coli* and  
5 purified (Figure S1). They were used in a reconstituted medium containing  
6 recombinant GST-AtSnAK2 (required to phosphorylate and activate AtSnRK1 $\alpha$ 1  
7 (Shen *et al.*, 2009; Crozet *et al.*, 2010)) and GST-AtSnRK1 $\alpha$ 1. In the absence of  
8 AtKRP, two phosphorylated proteins were observed corresponding to GST-  
9 AtSnRK1 $\alpha$ 1 (upper band, 83 kDa) phosphorylated by AtSnAK2, and AtSnAK2  
10 (lower band; 68 kDa) that is both autophosphorylated and feedback-  
11 phosphorylated by activated AtSnRK1 $\alpha$ 1 (Figure 2b, lane 1) as previously  
12 shown (Crozet *et al.*, 2010). Interestingly, when either AtKRP6 or AtKRP7 were  
13 present in the reaction mixture, autoradiography showed that both proteins  
14 incorporated  $\gamma^{32}$ -phosphate from radiolabelled ATP (Figure 2b, lanes 3, 5). This  
15 phosphorylation was dependent of activated AtSnRK1 $\alpha$ 1, since AtSnAK2 alone  
16 was unable to phosphorylate AtKRP6/7 (Figure 2b, lanes 2, 4). A tandem mass  
17 spectrometry (MS/MS) analysis of *in vitro* phosphorylated AtKRP6/7 indicated  
18 that peptides containing the common consensus SnRK1 target site previously  
19 identified *in silico* (VRKTPT152AAEI: AtKRP6; MEKSPT151QAE: AtKRP7,  
20 Figure 1) were phosphorylated (Table 1). In this way the AtKRP7  
21 phosphorylation site was unambiguously identified as Thr151, however a doubt  
22 remained regarding AtKRP6 since the peptide contained two closely located  
23 threonine residues (Thr150 and Thr152). To solve this ambiguity, a site-directed  
24 mutagenesis strategy was used and the following AtKRP6 mutated forms were  
25 produced, namely AtKRP6<sup>T150A</sup>, AtKRP6<sup>T150D</sup>, AtKRP6<sup>T152A</sup> and AtKRP6<sup>T152D</sup>. In  
26 the reconstituted medium, both AtKRP6<sup>T150A</sup> and AtKRP6<sup>T150D</sup> mutant forms  
27 exhibited phosphorylation on Thr152, whereas AtKRP6<sup>T152A</sup> and AtKRP6<sup>T152D</sup>



1  
2  
3 did not show Thr150 phosphorylation (Table 1). Thus, clearly, the AtSnRK1-  
4  
5 dependent phosphorylation site on AtKRP6/7 was at Thr152/151, respectively  
6  
7 (Table 1). To better understand the function of this post-translational  
8  
9 modification, it was decided to focus only on AtKRP6.  
10  
11

12  
13  
14 *AtKRP6 physically interacts with AtSnRK1α1 and AtKRP6 phosphorylation*  
15  
16 *status does not modify its nuclear localization*  
17  
18

19  
20  
21 In order to investigate this post-translational modification *in vivo*, we first  
22  
23 addressed the question of whether AtSnRK1α1 could physically interact *in*  
24  
25 *planta* with AtKRP6. After transient expression performed in BY-2 tobacco  
26  
27 protoplasts using Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC), YFP-  
28  
29 fluorescence was detected in several protoplasts, demonstrating that  
30  
31 AtSnRK1α1 and AtKRP6 were interacting partners *in vivo*. In addition, this  
32  
33 interaction only occurred in the nucleus (Figure 3), in accordance with the  
34  
35 known subcellular localizations of AtSnRK1α1 and AtKRP6 which are  
36  
37 nucleocytoplasmic and nuclear, respectively (Bitrián *et al.*, 2011; Bird *et al.*,  
38  
39 2007). In mammals, p27<sup>KIP1</sup> phosphorylation by AMPK on Thr170 induces its  
40  
41 cytoplasmic relocation (Liang *et al.*, 2007; Short *et al.*, 2010). To investigate  
42  
43 the effect of AtKRP6 phosphorylation on its subcellular localization, chimeric  
44  
45 AtKRP6-GFP proteins (using AtKRP6<sup>WT</sup>, AtKRP6<sup>T152A</sup> or AtKRP6<sup>T152D</sup>) were  
46  
47 transiently expressed in *A. thaliana* protoplasts. Both AtKRP6<sup>T152A</sup> and  
48  
49 AtKRP6<sup>T152D</sup> showed a nuclear localization like the WT form. Thus, it appears  
50  
51 that, in our conditions, Thr152 phosphorylation alone does not lead to AtKRP6  
52  
53 relocalization to the cytoplasm (Figure S2).  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



*Phosphorylation-mimetic AtKRP6 no longer inhibits yeast cell division*

To assess the biological function of AtKRP6-Thr152 phosphorylation on CDK/cyclin complexes, it was first mandatory to investigate whether *A. thaliana* KRP6 was capable of altering cell division. To this end, a heterologous system in yeast was set up, taking advantage of the ability of *A. thaliana* CDKA;1 to functionally complement the absence of the unique yeast CDK, CDC28. To perform a more efficient complementation of the yeast *cdc28* mutant, a mutated AtCDKA;1 variant harbouring Thr14Ala and Tyr15Phe residues (AtCDKA;1-AF) was generated (Porceddu *et al.*, 1999). Mutated yeast *cdc28* cells, unable to divide at a restrictive temperature (Figure 4b), were complemented by AtCDKA;1-AF, thus leading to yeast cell multiplication (Figure 4c). The complemented yeast cells were then transformed with either WT or mutated AtKRP6. Interestingly, AtKRP6<sup>WT</sup> and AtKRP6<sup>T152A</sup> were seen to block cell division (Figure 4e, 4g), thus confirming the inhibitory function of AtKRP6 on cell division. In contrast, the phosphorylation-mimetic AtKRP6<sup>T152D</sup> did not alter the complementation process (Figure 4i), strongly suggesting that the phosphorylation event abolishes the AtKRP6 inhibitory effects on AtCDKA;1. In order to understand the molecular mechanism involved, the interactions of the phosphorylation-mimetic AtKRP6<sup>T152D</sup> with CDK and cyclin partners were assessed in a 2-hybrid system. It has been established previously by a 2-hybrid approach that AtKRP6 interacts with *A. thaliana* CDKA;1 (De Veylder *et al.*, 2001). As shown in Figure 5a, AtKRP6<sup>T152D</sup> and AtKRP6<sup>WT</sup> interact to a similar degree with AtCDKA;1-AF, the AtCDKA;1 variant used in the yeast





1  
2  
3 complementation experiment (Figure 4). We then tested the interaction of  
4  
5 AtKRP6<sup>WT</sup> and AtKRP6<sup>T152D</sup> with a D-type cyclin, the second partner in the  
6  
7 CDK/cyclin complex, which was previously shown to be a true partner of  
8  
9 AtKRP6 *in planta* (Van Leene *et al.*, 2007). Interestingly, the phosphorylation-  
10  
11 mimetic AtKRP6<sup>T152D</sup> partially lost its ability to interact with its cyclin partner  
12  
13 (Figure 5b). Taken together, these results suggest that the inability of the  
14  
15 phosphorylation-mimetic AtKRP6<sup>T152D</sup> to inhibit CDK kinase activity may be due  
16  
17 to a loss of its interaction with the cyclin partner of the CDK/cyclin complex.  
18  
19  
20  
21

22  
23 *Double OE-AtSnRK1/AtKRP6<sup>WT</sup> and phosphorylation-mimetic OE-AtKRP6<sup>T152D</sup>*  
24  
25 *plants display attenuated OE-AtKRP6 associated phenotypes*  
26  
27

28  
29 Finally, experiments were conducted to clarify the function of AtKRP6  
30  
31 phosphorylation in *A. thaliana*. The phenotype of plants constitutively over-  
32  
33 expressing AtKRP6 has already been described (Zhou *et al.*, 2002; Liu *et al.*,  
34  
35 2008). Most of the KRP family members overexpressed in *A. thaliana* display  
36  
37 several common features including rosette size reduction together with  
38  
39 increased cell size, characteristic leaf serration and a reduced capacity of  
40  
41 mesophyll cells to undergo callogenesis (Le Foll *et al.*, 2008). Here, we first  
42  
43 confirmed that AtKRP6 overexpression (OE-AtKRP6<sup>WT</sup>) induced the same  
44  
45 pleiotropic and gradual developmental alterations (Figure 6a, 6b and 6c) and  
46  
47 that the severity of the phenotype correlated with AtKRP6 transcript levels  
48  
49 (Figure S3). Several phenotypic classes were determined according to leaf  
50  
51 serration, namely wt-L for plants displaying a WT-like phenotype and LS, MS,  
52  
53 SS, HS for light, moderate, severe and highly serrated phenotypes respectively.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 This classification of the plant population was validated in parallel using two  
4 others parameters: the size of leaf epidermis cells and the capacity of  
5 mesophyll cells to undergo callogenesis. By analysing several plants from each  
6 class (Figure 6b and 6c respectively), the capacity to produce calli gradually  
7 decreased (Figure 6b) and the cell size dramatically increased (Figure 6c) in  
8 accordance with the severity of the serration phenotype (Figure 6a). Based on  
9 the results mentioned above, we hypothesised that SnRK1 phosphorylation of  
10 AtKRP6-Thr152 would interfere with AtKRP6 function *in planta*. In this respect,  
11 we generated double OE-AtSnRK1 $\alpha$ 1/AtKRP6<sup>WT</sup> plants (AtKRP6 transcript  
12 levels are given in Figure S3; OE-AtSnRK1 $\alpha$ 1 are described in Jossier *et al.*,  
13 2009) and found that, based on the leaf serration criterion, AtSnRK1 $\alpha$ 1  
14 overexpression partially reversed the OE-AtKRP6 phenotype (Figure 6d). While  
15 the plant population (n=129) overexpressing AtKRP6<sup>WT</sup> alone showed a  
16 variable severity of the expected developmental alterations with 12% of wt-L,  
17 65% of intermediate serration levels (LS + MS + SS) and 23% of highly serrated  
18 plants (HS), the population overexpressing AtKRP6<sup>WT</sup> together with AtSnRK1 $\alpha$ 1  
19 (n=126) displayed a shift towards the WT-like phenotype (23% wt-L, 56%  
20 intermediates and 21% HS) (Figure 6d). This shift was confirmed by the  
21 observation that more double OE plants had a smaller cell size and were able to  
22 produce calli when compared to the OE-AtKRP6<sup>WT</sup> plants. Nevertheless while  
23 the population of “intermediates” was clearly shifted towards the WT-like  
24 phenotype, the plant population showing severe alterations seemed  
25 quantitatively maintained (23% to 21%, Figure 6d). This might be due to the  
26 under estimation of HS plants in the OE-AtKRP6<sup>WT</sup> population arising from a  
27 higher lethality during the selection process (Figure 6a). We also hypothesised  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 that in double OE leaves, the higher AtSnRK1 $\alpha$ 1 content allows for more  
4 AtKRP6 to be phosphorylated, but not for all, especially in plants containing the  
5 highest amount of AtKRP6. Consequently OE-AtSnRK1 $\alpha$ 1 only partially  
6 reversed the OE-AtKRP6 effect. For this reason plant overexpressing the  
7 phosphorylation-mimetic AtKRP6<sup>T152D</sup> were produced and analysed (n=76).  
8 Remarkably, HS plants were absent among the OE-AtKRP6<sup>T152D</sup> population,  
9 showing a very clear effect of mimicking AtKRP6-Thr152 phosphorylation status  
10 on the OE-AtKRP6 phenotype. Measuring the leaf rosette diameter also  
11 reinforced this result. Indeed the population of OE-AtKRP6<sup>T152D</sup> plants clearly  
12 shifted towards the wild-type large-rosette *A. thaliana* phenotype (Figure 7).  
13 Collectively, these data suggest that AtSnRK1 $\alpha$ 1 can phosphorylate AtKRP6 *in*  
14 *planta* and this alters cell proliferation.  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

## 34 Discussion

35  
36  
37  
38 In mammals, p27<sup>KIP1</sup> has been shown recently to be phosphorylated on two  
39 residues by the energy sensor kinase AMPK. This results in a cytoplasmic  
40 relocalisation (in the case of Thr170 phosphorylation, located close to the  
41 Nuclear Localisation Sequence (Short *et al.*, 2008)) and an increase in stability  
42 *via* 14-3-3 binding (for Thr198 on human (Liang *et al.*, 2007) and Thr197 on rat  
43 (Short *et al.*, 2010) p27<sup>KIP1</sup> phosphorylation), ending with apoptosis or the  
44 initiation of autophagy. In this work we show that the recombinant plant p27<sup>KIP1</sup>  
45 homologs AtKRP6 and AtKRP7 can be phosphorylated *in vitro* on Thr152 and  
46 Thr151, respectively, by the recombinant catalytic subunit  $\alpha$ 1 of the AtSnRK1  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 complex. To the best of our knowledge, this is the first evidence of such a post-  
4  
5 translational modification of plant KRP proteins, thus suggesting a link between  
6  
7 energy sensing and cell proliferation in plants.  
8

9  
10 The expression of AtKRP6<sup>WT</sup> in mutated yeast *cdc28* cells complemented with  
11  
12 AtCDKA;1 led to proliferation arrest, confirming its function as a CDK/cyclin  
13  
14 inhibitor. In contrast, the phosphorylation-mimetic AtKRP6<sup>T152D</sup> did not affect cell  
15  
16 proliferation, suggesting a biological function for this post-translational  
17  
18 modification. This hypothesis is strengthened by the results obtained with *A.*  
19  
20 *thaliana* OE lines. As expected, leaf development was highly perturbed (leaf  
21  
22 serration) and callogenesis impaired in OE-AtKRP6 plants, while a clear  
23  
24 reversion towards the WT-like phenotype and callogenesis aptitude was  
25  
26 observed in both double OE-AtSnRK1/AtKRP6 and phosphorylation-mimetic  
27  
28 OE-AtKRP6<sup>T152D</sup> plants. These data suggest that AtSnRK1-dependent  
29  
30 phosphorylation of AtKRP6 on Thr152 leads to the inhibition of its function.  
31  
32 Interestingly, the mechanism involved appears to differ between mammals and  
33  
34 plants. Indeed, while p27<sup>KIP1</sup> phosphorylation by AMPK leads to its cytoplasmic  
35  
36 sequestration, in our hands the phosphorylation-mimetic form AtKRP6<sup>T152D</sup>  
37  
38 remains in the nucleus. Nevertheless, since unlike the mammalian system the  
39  
40 AtKRP6 phosphorylated residue is located in the CDK/cyclin complex binding  
41  
42 domain, its phosphorylation could block KRP6 inhibiting function by preventing it  
43  
44 to interact with the complex. Indeed, 2 hybrid experiments show that the  
45  
46 phosphorylation-mimetic form AtKRP6<sup>T152D</sup> partially loses its ability to interact  
47  
48 with the cyclin partner. AtKRP6, like its p27<sup>KIP1</sup> mammalian counterpart, belongs  
49  
50 to the IDP family, members of which display a flexible structure allowing  
51  
52 adaptation to different targets. In the same vein, AtKRP6 Thr152  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60





1  
2  
3 phosphorylation could trigger a similar signalling conduit controlling cell cycle  
4  
5 progression as described in the case of p27<sup>KIP1</sup> (Yoon et al., 2012).  
6

7 SnRK1 involvement in cell division has been suggested previously by the  
8  
9 observation of a dramatic decrease of yeast cell size after overexpression of  
10  
11 RKIN (Rye SnRK1) in a yeast *snf1* mutant grown on minimal medium  
12  
13 (Dickinson *et al.*, 1999). Thus it is very tempting to hypothesize that the  
14  
15 AtSnRK1 $\alpha$ 1/AtKRP6 signalling module may play an important regulatory role in  
16  
17 actively dividing cell areas. For instance, a clear asymmetric pattern of SnRK1  
18  
19 expression has been previously reported in the plant apical meristem with a  
20  
21 high expression in leaf primordia and a low or undetectable expression in  
22  
23 meristems (Pien *et al.*, 2001). In this case, AtSnRK1 phosphorylation of AtKRP6  
24  
25 could favour cell division in leaf primordia where a stoichiometric adjustment  
26  
27 between the two partners may allow a fine control of cell division levels.  
28  
29

30  
31 However, it has been clearly established that upon energy stresses like  
32  
33 darkness, hypoxia or the inhibition of photosynthesis (Baena-González *et al.*,  
34  
35 2007), AtSnRK1 $\alpha$ 1/2 is activated to reduce anabolism and to increase  
36  
37 catabolism, thereby resulting in energy saving. In our conditions and  
38  
39 considering our data, this would result in an AtSnRK1-dependent AtKRP6  
40  
41 phosphorylation and thus its inability to bind and inhibit the CDK/cyclin complex.  
42  
43 Therefore, here we are faced with the paradoxical situation that the high  
44  
45 energy-consuming process of cell division would be favoured by stress.  
46  
47

48  
49 As claimed by D. G. Hardie and co-writers (Hardie *et al.*, 2012): "*It is not*  
50  
51 *immediately apparent why a kinase activated by energy stress should be*  
52  
53 *required for passage through mitosis. Perhaps mitosis is accelerated by AMPK*  
54  
55 *in cells undergoing stress so that an orderly cell cycle arrest can occur in the*  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 *ensuing G1 phase. However, it may be that this is an ancillary function of AMPK*  
4 *that is unrelated to its role as an energy sensor.”* Thus, it clearly appears that  
5 the present knowledge regarding AMPK function beyond metabolism is still very  
6 confusing. In this current quest to integrate underlying and novel findings, our  
7 results can be considered in different contexts.

8  
9  
10  
11  
12  
13  
14 One interpretation of our results is that the basal AtSnRK1 activity is unable to  
15 exhaustively phosphorylate the huge amounts of AtKRP6 present in OE-  
16 AtKRP6<sup>WT</sup> plants. This would explain the inability to fulfil a complete cell cycle  
17 and the observed phenotypes. In this respect, increasing AtSnRK1 activity (OE-  
18 AtSnRK1 $\alpha$ 1/AtKRP6) would allow a back-to-normal situation, in which cells can  
19 properly divide. Under this scheme, in the absence of stress, AtSnRK1 would  
20 have a basal activity to ensure proper cell division. Thus, the “ancillary function”  
21 mentioned by D. G. Hardie might still be at work in plants.

22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32 In this context, the stress sensing/response and the involvement in cell cycle  
33 regulation could be two independent and unrelated functions of AtSnRK1  
34 complexes. Indeed, multiple AtSnRK1 complexes with various  $\alpha\beta\gamma$  subunit  
35 combinations are present in plants and thus could be involved in different  
36 functions (Polge and Thomas, 2007; Polge *et al.*, 2008). It is thus possible that  
37 only one specific SnRK1 complex recognizes and phosphorylates AtKRP6/7.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

47  
48 Alternatively, cell proliferation could be the consequence of an energy stress. In  
49 mammals, the SnRK1 homolog AMPK has been implicated in several aspects  
50 of cell growth control, including the decision to enter either apoptosis or  
51 autophagy. AMPK-dependent p27<sup>KIP1</sup> phosphorylation leads to its export from  
52 the cytosol and its stabilization *via* 14-3-3 proteins (Short *et al.*, 2010). This is  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 clearly shown to be required to avoid apoptosis and promote the autophagy  
4  
5 program including AMPK-dependent TOR-Complex1 inhibition and  
6  
7 Uncoordinated 51-Like Kinase 1 (initiating autophagy) activation (Liang *et al.*,  
8  
9 2007; Short *et al.*, 2010; Hardie, 2011). Although no change in cellular  
10  
11 localization has been observed, a similar function may be operating in *A.*  
12  
13 *thaliana* mesophyll cells subjected to energy stress.  
14  
15

16  
17  
18 Finally, the particular case of plants allows us to propose the following  
19  
20 hypothesis: It should be taken into account that meristematic areas, where cell  
21  
22 division occurs, represent only a small proportion of the total tissues and that  
23  
24 levels of energy expenditure are globally low and easily fed by the stress-  
25  
26 activated catabolism program. Therefore, the comment cited above should be  
27  
28 rephrased as: "It is not immediately apparent why energy stress involves an  
29  
30 increase in cell division. Perhaps this evokes part of an emergency mechanism  
31  
32 that organisms trigger for survival and longevity".  
33  
34

35  
36 In fact, the logic of cell proliferation should be dominant over that of energy  
37  
38 saving. In case of prolonged stress leading to fuel shortage, cells would then  
39  
40 enter autophagy. To elucidate these considerations, further work is required to  
41  
42 investigate such rescue mechanisms.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



## Experimental procedures

### *Plant growth conditions*

Plants were directly sown on soil and grown in a culture chamber at 70% relative humidity with a light intensity of  $180 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and a day-night regime of 8 h at 21 °C and 16 h at 18 °C respectively. After 5 weeks, plants were transferred to a similar chamber, under long day conditions (day-night regime of 16 h at 21 °C and 8 h at 18 °C).

### *Plant transformation*

*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia wild-type (Col-0) and OE-AtSnRK1 $\alpha$ 1 plants (Jossier *et al.*, 2009) were transformed using the floral-dip method as described in Clough and Bent (1998) with the pGREENII-0229 vector (Hellens *et al.*, 2000) carrying a cassette containing AtKRP6<sup>WT</sup> or AtKRP6<sup>T152D</sup> ORFs under the control of the 35S CaMV promoter and the Nos terminator. After a 3 week selection period on sand supplied with glufosinate ( $7.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), plantlets were transferred to soil and grown in a culture chamber.

### *Protoplast preparation and transformation*

BY-2 protoplasts were obtained and transiently co-transformed as described in Le Foll *et al.* (2008) with plasmids encoding AtKRP6-YFP<sup>N</sup> (AtKRP6 ORF cloned into pUC-SPYNE vector (Walter *et al.*, 2004) and AtSnRK1 $\alpha$ 1-YFP<sup>C</sup>





1  
2  
3 (AtSnRK1 $\alpha$ 1 cloned into pBiFP4 vector (Desprez *et al.*, 2007)) or YFP<sup>C</sup>-  
4 AtSnRK1 $\alpha$ 1 (AtSnRK1 $\alpha$ 1 cloned into pBiFP3 vector). Protoplasts were  
5 incubated 24 h at 25 °C in the dark before confocal microscopic observations. *A.*  
6  
7  
8  
9  
10 *thaliana* protoplasts from wild-type Col-0 rosette leaves were produced and  
11 transformed as described in Yoo *et al.* (2007). Derivatives of pBi/smGFP  
12 (Jasinski *et al.*, 2002), carrying AtKRP6<sup>WT</sup>, AtKRP6<sup>T152A</sup> or AtKRP6<sup>T152D</sup> ORFs  
13 were used for transient expression. Protoplasts were incubated 10 h in the dark  
14 before confocal microscopic observations.  
15  
16  
17  
18  
19

#### 20 21 22 23 *In vitro culture*

24  
25  
26  
27 Leaves of in-soil grown plants (30 days old) were *in vitro* cultured as described  
28 in Walter *et al.* (2004). Prior to observations, plates were incubated 21 days at  
29 23 °C at 70% relative humidity at a light intensity of 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  under a 16  
30 h-8 h day-night regime.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

#### 38 39 40 41 42 *Microscopy - Cell size observation*

43 For confocal microscopy, observations were performed using a Leica SP2  
44 equipped with an argon laser. The 488 nm ray was used for GFP and  
45 chlorophyll excitation and the spectral detector was set between 500-535 nm  
46 and 659-732 nm, respectively. For YFP excitation, the 415 nm ray was used  
47 and the spectral detector was set between 520-570 nm. For cell size  
48 observations, leaf tissues were fixed in an ethanol/acetic acid solution (3/1, v/v)  
49 and rinsed in 70% ethanol. Fixed leaf tissues were cleared in a hydrate  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 chloral/glycerol/H<sub>2</sub>O solution (8/2/1, w/v/v) before observations with a AZ100  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

chloral/glycerol/H<sub>2</sub>O solution (8/2/1, w/v/v) before observations with a AZ100  
macroscope (Nikon).

### *Transcript level analysis*

First strand cDNA was synthesized using 2µg total RNA extracted with TRIzol reagent (Invitrogen) and ImProm-II reverse transcriptase (Promega). They were further used as templates in PCR reactions with the following primers for AtKRP6: 5'-gaggatccatgagcgagagaaagcgagagc-3' and 5'-gagtcgacaagtcgatcccactttagcgacc-3' (1µL first strand cDNA, 22 cycles with 30 sec hybridization step at 49°C and 40 sec of elongation) and for AtTCTP [At3g16640] used as a constitutive control: 5'-gcgaagaagatcaagctgtc-3' and 5'-ggtagtgtaaccctccttg-3' (1µL first strand cDNA, 25 cycles with 30 sec hybridization step at 60°C and 20 sec of elongation).

### *Expression and purification of recombinant proteins*

The fusion constructs used to produce N-terminal GST-tagged *A. thaliana* SnAK2 and SnRK1α1 proteins have been described in Crozet *et al.* (2010). The coding sequences of KRP6 and KRP7 were reverse-transcribed from *A. thaliana* total RNA, and the resulting PCR-amplified cDNAs were inserted into the pDEST15 expression vector as described for AtSnAK2 and AtSnRK1α1 (Crozet *et al.*, 2010). KRP6 variant forms were generated by PCR site-directed mutagenesis as described in Reikofski and Tao (1992) and inserted into pDEST15. GST-AtSnAK2 and GST-AtSnRK1α1 recombinant proteins were



1  
2  
3 produced in *E. coli* and purified by GSH-sepharose 4B affinity gel (Sigma)  
4 chromatography as described in Crozet *et al.* (2010) Slight modifications were  
5 applied for GST-AtKRP6/7 expression. *E. coli* were cultured at 37°C and  
6 induced with 500 μM IPTG at OD<sub>600nm</sub>=0.9 for 1.5 h. Production was validated  
7 by Western blot analyses using anti-GST antibodies 10 μL.mL<sup>-1</sup> (Calbiochem :  
8 OB03) and anti-mouse secondary antibodies 0.5 μL.mL<sup>-1</sup> coupled to horse  
9 radish peroxidase (Pierce). ECL (NEL103001EA; PerkinElmer) was performed  
10 to detect GST-containing proteins.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

### 23 *Kinase activity assays*

24  
25  
26  
27 Kinase activity was measured in the presence of 2 μCi of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (500  
28 μCi.mmol<sup>-1</sup>) in a kinase activity buffer containing 0.1 M HEPES-NaOH, pH 7.3; 5  
29 mM dithiothreitol; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.5 mM EGTA; 20 μM (for radioactive assays),  
30 or 1 mM (for mass spectrometry analyses) ATP; 3 μg of recombinant GST-  
31 AtSnRK1α1 purified extract, 2 μg of GST-AtSnAK2 purified extract and 2 μg of  
32 either GST-AtKRP6<sup>WT</sup>, GST-AtKRP6<sup>T150A</sup>, GST-AtKRP6<sup>T150D</sup>, GST-AtKRP6<sup>T152A</sup>  
33 or GST-AtKRP6<sup>T152D</sup> purified extract, 1‰ (v/v) antiprotease mixture (P9599;  
34 Sigma); 1‰ (v/v) of each antiphosphatase mixture (P2850 and P5726; Sigma),  
35 at 30°C in a total volume of 30 μL. Following a 3 h incubation at 30°C, the  
36 proteins were dissociated in Laemmli buffer and subjected to SDS-PAGE (12%  
37 acrylamide) as described in Laemmli (1970). Radioactive bands were revealed  
38 using a Phosphor screen and the Personal FX Imager software (BioRad).  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



### *Identification of phosphorylated residue by mass spectrometry*

In-gel digestion was performed with the Progest system (Genomic Solution) according to a standard trypsin protocol. Gel pieces were washed twice by successive separate baths of 10% acetic acid, 40% ethanol, and acetonitrile (ACN). They were then washed twice with successive baths of 25 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  and ACN. Digestion was subsequently performed for 6 h at 37°C with 125 ng of modified trypsin (Promega) dissolved in 20% methanol and 20 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ . The peptides were extracted successively with 2% trifluoroacetic acid (TFA) and 50% ACN and then with ACN. Peptide extracts were dried in a vacuum centrifuge and suspended in 20  $\mu\text{L}$  of 0.05% TFA, 0.05%  $\text{HCOOH}$ , and 2% ACN.

HPLC was performed on a NanoLC-Ultra system (Eksigent). A 4  $\mu\text{L}$  sample was loaded at 7.5  $\mu\text{L}/\text{min}^{-1}$  on a precolumn cartridge (stationary phase: PepMap 100 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; column: 300  $\mu\text{m}$  i.d., 5 mm; Dionex) and desalted with 0.1%  $\text{HCOOH}$ . After 3 min, the precolumn cartridge was connected to the separating C18 column (stationary phase: C18 Biosphere, 3  $\mu\text{m}$ ; column: 75  $\mu\text{m}$  i.d., 150 mm; Nanoseparations). Buffers were 0.1%  $\text{HCOOH}$  in water (A) and 0.1%  $\text{HCOOH}$  in ACN (B). The peptide separation was achieved with a linear gradient from 5 to 30% B for 28 min at 300  $\text{nL}/\text{min}^{-1}$ . Including the regeneration step at 95% B and the equilibration step at 95% A, one run took 45 min.

Eluted peptides were analysed on-line with a QExactive mass spectrometer (Thermo Electron) using a nanoelectrospray interface. Ionization (1.8 kV ionization potential) was performed with stainless steel emitters (30  $\mu\text{m}$  i.d.; Thermo Electron). Peptide ions were analysed using Xcalibur 2.1 with the





1  
2  
3 following data-dependent acquisition steps: (1) full MS scan (mass-to-charge  
4 ratio (m/z) 400 to 1400, resolution 70000) and (2) MS/MS (normalized collision  
5 energy = 30%, resolution 17500). Step 2 was repeated for the 5 major ions  
6 detected in step 1. Dynamic exclusion was set to 40 sec.  
7

8  
9  
10  
11 A database search was performed with XTandem (version 2011.12.01.1)  
12 (<http://www.thegpm.org/TANDEM/>). Enzymatic cleavage was declared as a  
13 trypsin digestion with one possible misscleavage. Cys carboxyamidomethylation  
14 and Met oxidation were set to static and possible modifications, respectively.  
15  
16 Precursor mass was 100 ppm and fragment mass tolerance was 0.02 Th. A  
17 refinement search was added with similar parameters except that semi-trypsinic  
18 peptide, possible N-ter proteins acetylation and phosphorylation of serine  
19 threonine or tyrosine were searched. The UniprotKB database  
20 ([http://www.ebi.ac.uk/integr8/OrganismSelection.do?action=makeCurrent&prote  
21 omeld=18](http://www.ebi.ac.uk/integr8/OrganismSelection.do?action=makeCurrent&proteinid=18)) restricted to yeast, the modified sequence of KRP proteins and a  
22 contaminant database (trypsin, keratins, ...) were used. Only peptides with an E  
23 value smaller than 0.1 were reported. Identified proteins were filtered and  
24 grouped using XTandem Pipeline (<http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/>)  
25 according to : (1) a minimum of two different peptides was required with a E  
26 value smaller than 0.05, (2) a protein E value (calculated as the product of  
27 unique peptide E values) smaller than  $10^{-4}$ . In case of identification of mutated  
28 AtKRP6 and phosphor-site, similarity between the experimental and the  
29 theoretical MS/MS spectra was visually checked. To take redundancy into  
30 account, proteins with at least one peptide in common were grouped. This  
31 allowed to group proteins of similar function. Within each group, proteins with at  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 least one specific peptide relatively to other members of the group were  
4 reported as sub-groups.  
5  
6  
7

#### 8 9 *Yeast functional complementation and yeast 2-hybrid*

10  
11  
12  
13  
14 AtKRP6<sup>WT</sup>, AtKRP6<sup>T152A</sup> and AtKRP6<sup>T152D</sup> ORFs were cloned into pNSG1, a  
15 pGBT9 derivative. The ORF of AtCDKA;1-AF, a dominant positive allele of  
16 AtCDKA;1 carrying two mutations (Thr14Ala and Tyr15Phe) was cloned into  
17 pNSG2, a pGAD424 derivative. The *Saccharomyces cerevisiae* CDC28 ORF  
18 cloned into YEp13 was used as a positive control. Plasmids were co-  
19 transformed into the *S. cerevisiae* cdc28-4 thermosensitive mutant strain Ely227  
20 (Barral *et al.*, 1995). Yeast 2-hybrid was performed as described in Jasinski *et*  
21 *al.* (2002). AtKRP6<sup>WT</sup> and AtKRP6<sup>T152D</sup> ORFs were cloned into pGBT9 (Binding  
22 Domain (BD) vector, Clontech) and AtCDKA;1-AF and AtCycD3;1 ORFs were  
23 cloned into pGAD424 (Activation Domain (AD) vector, Clontech). Various  
24 AD+BD combinations were co-transformed into the *S. cerevisiae* PJ69 strain  
25 (James *et al.*, 1996).  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

#### 45 **Acknowledgements**

46  
47  
48  
49 We thank Elena Baena-Gonzales for her technical expertise with *A. thaliana*  
50 protoplast experiments, Mélanie Héry, Alexis Bioy and Thibaut Di Méo for their  
51 contribution to construct preparation and the production of recombinant GST-  
52 AtSnRK1 $\alpha$ 1. This work was supported by the Centre National de la Recherche  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 Scientific and the Université Paris-Sud. TG, LM and PC were supported by  
4 fellowships from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la  
5 Recherche (MNERT). This work has benefited from the facilities and expertise  
6 of IMAGIF (Centre de Recherche de Gif - [www.imagif.cnrs.fr](http://www.imagif.cnrs.fr)). Authors declare  
7 no conflict of interest.  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

### 18 Supporting information

19  
20  
21  
22  
23 **Figure S1.** Western blot analysis of purified recombinant GST-AtKRP6 (wild-  
24 type and mutated forms) and GST-AtKRP7 proteins produced in *E. coli*.  
25  
26  
27

28  
29  
30 **Figure S2.** Mutated AtKRP6<sup>T152A</sup> and AtKRP6<sup>T152D</sup> proteins are localized in the  
31 nucleus of *A. thaliana* mesophyll protoplasts like AtKRP6<sup>WT</sup>.  
32  
33  
34

35  
36  
37 **Figure S3.** AtKRP6 transcript levels are correlated with phenotype severity of  
38 OE-AtKRP6<sup>WT</sup> and OE-AtSnRK1α1/AtKRP6<sup>WT</sup> plants.  
39  
40  
41  
42  
43  
44

### 45 References

46  
47  
48 **Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J.M. and Shen, J. (2007)** A  
49 central integrator of transcription networks in plant stress and energy  
50 signalling. *Nature*, **448**, 938–942.  
51

52  
53 **Barral, Y., Jentsch, S. and Mann, C. (1995)** G1 cyclin turnover and nutrient  
54 uptake are controlled by a common pathway in yeast. *Gene. Dev.*, **9**, 399–  
55 409.  
56  
57  
58  
59  
60



- 1  
2  
3 **Besson, A., Dowdy, S.F. and Roberts, J.M.** (2008) CDK inhibitors: cell cycle  
4 regulators and beyond. *Dev. Cell*, **14**, 159–169.
- 5  
6 **Bird, D.A., Buruiana, M.M., Zhou, Yongming, Fowke, L.C. and Wang, Hong**  
7 (2007) Arabidopsis cyclin-dependent kinase inhibitors are nuclear-localized  
8 and show different localization patterns within the nucleoplasm. *Plant Cell*  
9 *Rep.*, **26**, 861–872.
- 10  
11 **Bitrián, M., Roodbarkelari, F., Horváth, M. and Koncz, C.** (2011) BAC-  
12 recombineering for studying plant gene regulation: developmental control  
13 and cellular localization of SnRK1 kinase subunits. *Plant J.*, **65**, 829–842.
- 14  
15 **Castro, E. de, Sigrist, C.J.A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-  
16 Genevax, P.S., Gasteiger, E., Bairoch, A. and Hulo, N.** (2006)  
17 ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-  
18 associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids*  
19 *Res.*, **34**, W362–365.
- 20  
21 **Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for  
22 Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.*,  
23 **16**, 735–743.
- 24  
25 **Coqueret, O.** (2003) New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function  
26 for each cell compartment? *Trends Cell Biol.*, **13**, 65–70.
- 27  
28 **Crozet, P., Jammes, F., Valot, B., Ambard-Bretteville, F., Nessler, S.,  
29 Hodges, M., Vidal, J. and Thomas, M.** (2010) Cross-phosphorylation  
30 between Arabidopsis thaliana sucrose nonfermenting 1-related protein  
31 kinase 1 (AtSnRK1) and its activating kinase (AtSnAK) determines their  
32 catalytic activities. *J. Biol. Chem.*, **285**, 12071–12077.
- 33  
34 **Davies, S.P., Carling, D. and Hardie, D.G.** (1989) Tissue distribution of the  
35 AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-  
36 dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide  
37 assay. *Eur. J. Biochem.*, **186**, 123–128.
- 38  
39 **Debast, S., Nunes-Nesi, A., Hajirezaei, M.-R., Hofmann, J., Sonnewald, U.,  
40 Fernie, A.R. and Börnke, F.** (2011) Altering trehalose-6-phosphate  
41 content in transgenic potato tubers affects tuber growth and alters  
42 responsiveness to hormones during sprouting. *Plant Physiol.* **156**, 1754-  
43 1771.
- 44  
45 **Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E.F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F.,  
46 Höfte, H., Gonneau, M. and Vernhettes, S.** (2007) Organization of  
47 cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in  
48 Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 15572–15577.
- 49  
50 **De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T., Krols, L., Terras, F.,  
51 Landrieu, I., van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M. and Inzé, D.**
- 52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60





- 1  
2  
3 (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of  
4 Arabidopsis. *Plant Cell*, **13**, 1653–1668.
- 5  
6 **Dickinson, J., Cole, D. and Halford, N.G.** (1999) A cell cycle role for a plant  
7 sucrose nonfermenting-1-related protein kinase (SnRK1) is indicated by  
8 expression in yeast. *Plant Growth Regul.*, **28**, 169–174.
- 9  
10  
11 **Hardie, D.G.** (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians  
12 of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 774–785.
- 13  
14 **Hardie, D.G.** (2011) AMPK and autophagy get connected. *EMBO J*, **30**, 634–  
15 635.
- 16  
17 **Hardie, D.G., Ross, F. and Hawley, S.A.** (2012) AMPK: a nutrient and energy  
18 sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**,  
19 251–262.
- 20  
21  
22 **Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S. and Mullineaux, P.M.**  
23 (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-  
24 mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.*, **42**, 819–832.
- 25  
26  
27 **James, P., Halladay, J. and Craig, E.A.** (1996) Genomic libraries and a host  
28 strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*,  
29 **144**, 1425–1436.
- 30  
31 **Jasinski, S., Perennes, C., Bergounioux, C. and Glab, N.** (2002)  
32 Comparative molecular and functional analyses of the tobacco cyclin-  
33 dependent kinase inhibitor NtKIS1a and its spliced variant NtKIS1b. *Plant*  
34 *Physiol.*, **130**, 1871–1882.
- 35  
36  
37 **Jossier, M., Bouly, J.P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley,**  
38 **S.A., Grahame Hardie, D. and Thomas, M.** (2009) SnRK1 (SNF1-related  
39 kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in Arabidopsis  
40 thaliana. *Plant J.*, **59**, 316–328.
- 41  
42 **Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of  
43 the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- 44  
45  
46 **Le Foll, M., Blanchet, S., Millan, L., Mathieu, C., Bergounioux, C. and Glab,**  
47 **N.** (2008) The plant CDK inhibitor NtKIS1a interferes with dedifferentiation,  
48 is specifically down regulated during development and interacts with a  
49 JAB1 homolog. *Plant Sci.*, **175**, 513–523.
- 50  
51  
52 **Liang, J., Shao, S.H., Xu, Z.X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo,**  
53 **S., Dumont, D.J., Gutterman, J.U., Walker, C.L., Slingerland, J.M. and**  
54 **Mills, G.B.** (2007) The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates  
55 p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or  
56 apoptosis. *Nature Cell Biol.*, **9**, 218–224.
- 57  
58  
59  
60



- 1  
2  
3 **Liu, J., Zhang, Y., Qin, G., Tsuge, T., Sakaguchi, N., Luo, G., Sun, K., Shi,**  
4 **D., Aki, S., Zheng, N., Aoyama, T., Oka, A., Yang, W., Umeda, M., Xie,**  
5 **Q., Gu, H. and Qu, L.J.** (2008) Targeted degradation of the cyclin-  
6 dependent kinase inhibitor ICK4/KRP6 by RING-type E3 ligases is  
7 essential for mitotic cell cycle progression during Arabidopsis  
8 gametogenesis. *Plant Cell*, **20**, 1538–1554.  
9
- 10 **Nakai, T., Kato, K., Shinmyo, A. and Sekine, M.** (2006) Arabidopsis KRPs  
11 have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases,  
12 including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS Lett.*, **580**,  
13 336–340.  
14
- 15 **Oakhill, J.S., Steel, R., Chen, Z.-P., Scott, J.W., Ling, N., Tam, S. and Kemp,**  
16 **B.E.** (2011) AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase.  
17 *Science*, **332**, 1433–1435.  
18
- 19 **Pien, S., Wyrzykowska, J. and Fleming, A.J.** (2001) Novel marker genes for  
20 early leaf development indicate spatial regulation of carbohydrate  
21 metabolism within the apical meristem. *Plant J.*, **25**, 663–674.  
22
- 23 **Polge, C., Jossier, M., Crozet, P., Gissot, L. and Thomas, M.** (2008) Beta-  
24 subunits of the SnRK1 complexes share a common ancestral function  
25 together with expression and function specificities; physical interaction with  
26 nitrate reductase specifically occurs via AKINbeta1-subunit. *Plant Physiol.*,  
27 **148**, 1570–1582.  
28
- 29 **Polge, C. and Thomas, M.** (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global  
30 regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci.*, **12**, 20–28.  
31
- 32 **Porceddu, A., Veylder, L. De, Hayles, J., Montagu, M. Van, Inzé, D,**  
33 **Mironov, V., Porceddua, A. and Veyldera, L. De** (1999) Mutational  
34 analysis of two Arabidopsis thaliana cyclin-dependent kinases in fission  
35 yeast. *FEBS Lett.*, **446**, 182–188.  
36
- 37 **Prilusky, J., Felder, C.E., Zeev-Ben-Mordehai, T., Rydberg, E.H., Man, O.,**  
38 **Beckmann, J.S., Silman, I. and Sussman, J.L.** (2005) FoldIndex: a  
39 simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically  
40 unfolded. *Bioinformatics*, **21**, 3435–3438.  
41
- 42 **Reikofski, J. and Tao, B.Y.** (1992) Polymerase chain reaction (PCR)  
43 techniques for site-directed mutagenesis. *Biotechnol. Adv.*, **10**, 535–547.  
44
- 45 **Sanz, L., Dewitte, W., Forzani, C., Patell, F., Nieuwland, J., Wen, B.,**  
46 **Quelhas, P., De Jager, S., Titmus, C., Campilho, A., Ren, H., Estelle,**  
47 **M., Wang, H. and Murray, J.A.** (2011) The Arabidopsis D-type cyclin  
48 CYCD2;1 and the inhibitor ICK2/KRP2 modulate auxin-induced lateral root  
49 formation. *Plant Cell*, **23**, 641–660.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



- 1  
2  
3 **Shen, W., Reyes, M.I. and Hanley-Bowdoin, L.** (2009) Arabidopsis protein  
4 kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating  
5 its activation loop. *Plant Physiol.*, **150**, 996–1005.  
6
- 7 **Short, J.D., Dere, R., Houston, K.D., Cai, S.L., Kim, J., Bergeron, J.M.,**  
8 **Shen, J., Liang, J., Bedford, M.T., Mills, G.B. and Walker, C.L.** (2010)  
9 AMPK-mediated phosphorylation of murine p27 at T197 promotes binding  
10 of 14-3-3 proteins and increases p27 stability. *Mol. Carcinog.*, **49**, 429–439.  
11
- 12 **Short, J.D., Houston, K.D., Dere, R., Cai, S.L., Kim, J., Johnson, C.L.,**  
13 **Broaddus, R.R., Shen, J., Miyamoto, S., Tamanoi, F., Kwiatkowski, D.,**  
14 **Mills, G.B. and Walker, C.L.** (2008) AMP-activated protein kinase  
15 signaling results in cytoplasmic sequestration of p27. *Cancer Res.*, **68**,  
16 6496–6506.  
17
- 18 **Torres Acosta, J.A., Fowke, L.C. and Wang, H.** (2011) Analyses of  
19 phylogeny, evolution, conserved sequences and genome-wide expression  
20 of the ICK/KRP family of plant CDK inhibitors. *Ann. Bot.*, **107**, 1141–1157.  
21
- 22 **Van Leene, J., Stals, H., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Van**  
23 **Isterdael, G., De Clercq, A., Bonnet, E., Laukens, K., Remmerie, N.,**  
24 **Henderickx, K., De Vijlder, T., Abdelkrim, A., Pharazyn, A., Van**  
25 **Onckelen, H., Inzé, D., Witters, E. and De Jaeger, G.** (2007) A tandem  
26 affinity purification-based technology platform to study the cell cycle  
27 interactome in Arabidopsis thaliana. *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 1226–1238.  
28
- 29 **Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C.,**  
30 **Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K. and**  
31 **Kudla, J.** (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells  
32 using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.*, **40**, 428–438.  
33
- 34 **Yoo, S.-D., Cho, Y.-H. and Shen, J.** (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts:  
35 a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.*,  
36 **2**, 1565–1572.  
37
- 38 **Yoon, M.-K., Mitrea, D.M., Ou, L. and Kriwacki, R.W.** (2012) Cell cycle  
39 regulation by the intrinsically disordered proteins p21 and p27. *Biochemical*  
40 *Soc. T.*, **40**, 981–988.  
41
- 42 **Zhang, Y, Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Andralojc, P.J., Mitchell, R.A.,**  
43 **Powers, S.J., Schluemann, H., Delatte, T., Wingler, A. and Paul, M.J.**  
44 (2009) Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of  
45 metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.*, **149**, 1860–  
46 1871.  
47
- 48 **Zhou, Y, Fowke, L. and Wang, H** (2002) Plant CDK inhibitors: studies of  
49 interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and  
50 functional comparisons in transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell Rep.*,  
51 **20**, 967–975.  
52
- 53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



## Tables

**Table 1.** Identification of phosphorylated residues associated with on GST-AtKRP7, GST-AtKRP6<sup>WT</sup>, GST-AtKRP6<sup>T150A</sup>, GST-AtKRP6<sup>T150D</sup>, GST-AtKRP6<sup>T152A</sup> and GST-AtKRP6<sup>T152D</sup> after phosphorylation by GST-AtSnRK1 $\alpha$ 1

<i>A. thaliana</i> gene no.	Gene description	No. of peptides	Percentage coverage of protein	Peptide	Residue and mass modification
At1g49620	KRP7	9	52	SPTQAELDDFFSAAER	T3:+79.96633
At3g19150	KRP6 <sup>WT</sup>	7	54	KTPTAAEIEDLFSELESQDDKKK	T4:+79.96633
At3g19150	KRP6 <sup>T150A</sup>	13	54	KAPTAAEIEDLFSELESQDDKKK	T4:+79.96633
At3g19150	KRP6 <sup>T150D</sup>	10	54	KDPTAAEIEDLFSELESQDDKKK	T4:+79.96633
At3g19150	KRP6 <sup>T152A</sup>	9	54	TPAAAEIEDLFSELESQDDKKK	none
At3g19150	KRP6 <sup>T152D</sup>	8	54	TPDAAEIEDLFSELESQDDKKK	none

## Figure legends

**Figure 1.** *A. thaliana* KRP6 and KRP7 are intrinsically disordered proteins that contain SnRK1-consensus phosphorylation sites.

(a) *In silico* analysis of AtKRP6 [At3g19150] and AtKRP7 [At1g49620] using the consensus target sequence ([MLVFI]-X-[RKH]-X(2/3)-[ST]-X(3)-[MLVFI]) revealed potential SnRK1 phosphorylation sites (Scan Prosite advanced). The conserved Thr152/151 (AtKRP6/AtKRP7) site is located at the beginning of the CDK/cyclin interaction domain. A comparison with mammalian p27<sup>KIP1</sup> outlines that these sites are different from the known AMPK-dependent target sequences (Thr170, (Short *et al.*, 2008); Thr197, (Short *et al.*, 2010)). In the rat





1  
2  
3 protein sequence, Thr170 is located close to the NLS (Nuclear Localization  
4 Signal) and Thr197 is the C-terminal residue.  
5

6  
7 (b) The fold index profile of analyzed proteins was determined using the  
8 FoldIndex© prediction tool (<http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex>), the window  
9 of analysis being set at 21 amino acids.  
10  
11  
12

13  
14  
15  
16 **Figure 2.** AtSnRK1 phosphorylates AtKRP6 and AtKRP7 *in vitro*.  
17

18  
19  
20 (a) Coomassie-blue stained SDS-PAGE (12% acrylamide) of GST-AtKRP6/7  
21 phosphorylation assay proteins.  
22

23  
24 (b) Autoradiography of the phosphorylation assay: 3 h incubation at 30°C with 2  
25  $\mu\text{Ci}$  of  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , 3  $\mu\text{g}$  of GST-AtSnRK1 $\alpha$ 1 purified extract ( $\alpha$ 1), 2  $\mu\text{g}$  of GST-  
26 AtSnAK2 purified extract (s2) and 2  $\mu\text{g}$  of GST-AtKRP6 (k6) or GST-AtKRP7  
27 (k7) purified extract.  
28  
29  
30  
31  
32  
33

34  
35  
36 **Figure 3.** AtKRP6 and AtSnRK1 $\alpha$ 1 interact in tobacco cell nuclei.  
37

38  
39  
40 YFP-moiety fused proteins were transiently expressed in BY-2 tobacco  
41 protoplasts. Yellow fluorescence was detected in the nuclei of protoplasts by  
42 confocal microscopy.  
43

44  
45  
46 (a) AtKRP6-YFP<sup>N</sup> and AtSnRK1 $\alpha$ 1-YFP<sup>C</sup>.  
47

48  
49 (b) AtKRP6-YFP<sup>N</sup> and YFP<sup>C</sup>-AtSnRK1 $\alpha$ 1.  
50  
51  
52

53  
54 **Figure 4.** Phosphorylation-mimetic AtKRP6<sup>T152D</sup> prevents AtKRP6-dependent  
55 CDKA/cyclin inhibition in a heterologous yeast complementation system.  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4  
5 The *S. cerevisiae* *cdc28-4* mutant strain was complemented by the *A. thaliana*  
6 CDKA;1-AF protein allowing yeast cell multiplication. The complementation of  
7 the *S. cerevisiae* *cdc28-4* mutant with the wild type ScCDC28 was used as a  
8 positive control (a). The presence of either AtKRP6<sup>WT</sup> (e) or AtKRP6<sup>T152A</sup> (g)  
9 inhibits AtCDKA;1 complementation (c) while AtKRP6<sup>T152D</sup> (i) did not. *S.*  
10 *cerevisiae* *cdc28-4* mutant strain transformed with the different AtKRP6 forms  
11 alone are shown in (d), (f) and (h). Negative control (empty vectors) is shown in  
12 (b). After selection at permissive temperature (25°C) and serial dilution  
13 (OD<sub>600nm</sub>=1; 0.05; 0.01), growth of yeast transformants is shown after 3 days of  
14 incubation at a restrictive temperature (35°C).  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

29 **Figure 5.** AtKRP6<sup>T152D</sup> still interacts with AtCDKA;1-AF but not with AtCycD3;1  
30 in a 2-hybrid system.  
31  
32  
33  
34  
35

36 The yeast PJ69 strain was transformed with AD+BD combinations as indicated.  
37 The AD (Activating Domain) and BD (Binding Domain) empty vectors  
38 (pGAD424 and pGBT9) were used to generate the negative controls and the  
39 full-length yeast GAL4 (GAL4) was used as a positive control. After serial  
40 dilutions (OD<sub>600nm</sub>=2; 0.001; 0.0001) and 3 days of incubation at 30°C, growth of  
41 double transformants is shown on synthetic media (a) without leucine and  
42 tryptophan (-LW); without leucine, tryptophan and histidine (-LWH); without  
43 leucine, tryptophan and histidine and supplemented with 5 mM 3-amino-triazol  
44 (-LWH+3AT5) and (b) without leucine and tryptophan (-LW); without leucine,  
45 tryptophan and histidine and supplemented with 10 mM 3-amino-triazol (-  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 LWH+3AT10); without leucine, tryptophan and histidine and supplemented with  
4  
5 20 mM 3-amino-triazol (-LWH+3AT20).  
6  
7  
8

9  
10 **Figure 6.** OE-AtKRP6 associated phenotypes are attenuated both in an OE-  
11 AtSnRK1 $\alpha$ 1 genetic background and in OE-AtKRP6<sup>T152D</sup> plants.  
12  
13

14  
15  
16 The leaf serration phenotype of OE-AtKRP6<sup>WT</sup> plants was classed according to  
17 severity (a), comprising wild type-like (wt-L), lightly serrated (LS), moderately  
18 serrated (MS), severely serrated (SS) or highly serrated (HS) plants. These  
19 classes were correlated to (b) cell size increase and to (c) the inability to  
20 perform callogenesis. (d) Overexpression of AtKRP6<sup>WT</sup> in an OE-AtSnRK1 $\alpha$ 1  
21 background or overexpression of a phosphorylation-mimetic AtKRP6 form (OE-  
22 AtKRP6<sup>T152D</sup>) attenuated these phenotypes. The percentage of each plant class  
23 for OE-AtKRP6<sup>WT</sup>, OE-AtSnRK1 $\alpha$ 1/AtKRP6<sup>WT</sup> and OE-AtKRP6<sup>T152D</sup> were  
24 obtained from the analyses of 129, 126 and 76 plants, respectively. White bars  
25 in (a) represent 1 cm, black bars in (b) 100  $\mu$ m and white bars in (c) 5 mm.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

40  
41 **Figure 7.** *A. thaliana* plants overexpressing the AtKRP6<sup>T152D</sup> form display  
42 overall larger rosettes than OE-AtKRP6<sup>WT</sup> plants.  
43  
44  
45

46  
47 Rosette diameters were measured (D, sizes are given in cm) in three plant  
48 populations (OE-AtKRP6<sup>WT</sup>, circles, n=129; OE-AtSnRK1 $\alpha$ 1/AtKRP6<sup>WT</sup>,  
49 squares, n=126; OE-AtKRP6<sup>T152D</sup>, triangles, n=76) and the distribution of the  
50 individuals compared.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



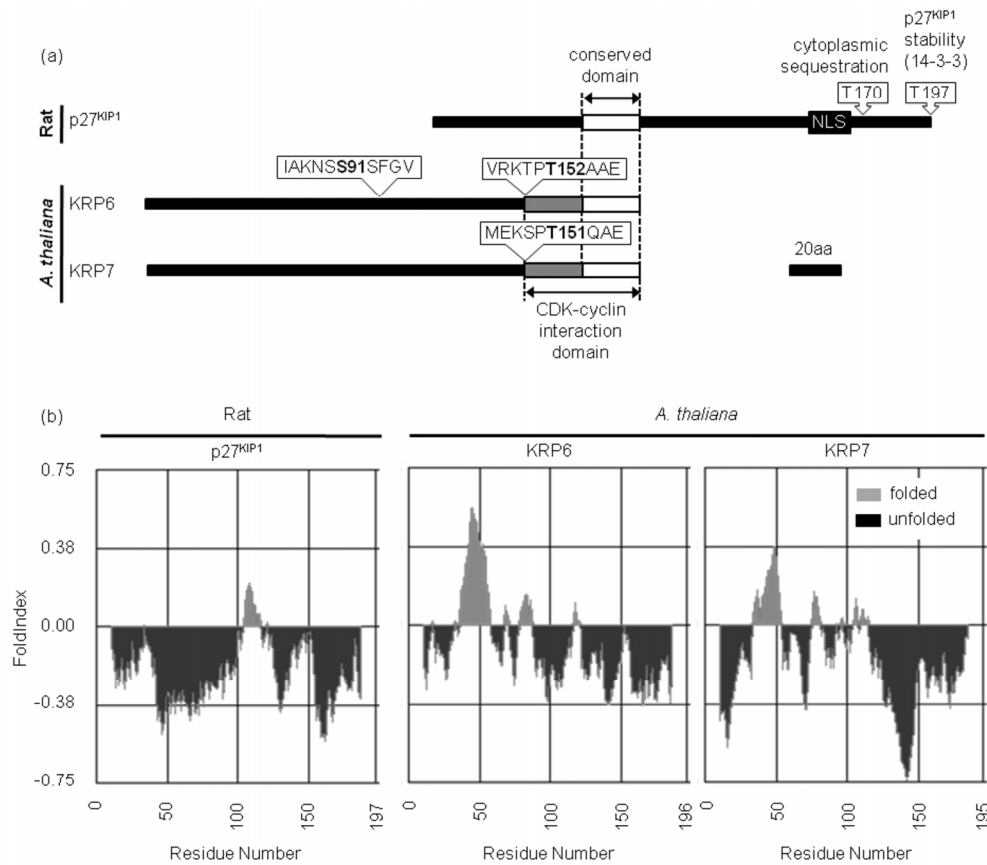


Figure 1. *A. thaliana* KRP6 and KRP7 are intrinsically disordered proteins that contain SnRK1-consensus phosphorylation sites.

(a) In silico analysis of AtKRP6 [At3g19150] and AtKRP7 [At1g49620] using the consensus target sequence ([MLVFI]-X-[RKH]-X(2/3)-[ST]-X(3)-[MLVFI]) revealed potential SnRK1 phosphorylation sites (Scan Prosite advanced). The conserved Thr152/151 (AtKRP6/AtKRP7) site is located at the beginning of the CDK/cyclin interaction domain. A comparison with mammalian p27KIP1 outlines that these sites are different from the known AMPK-dependent target sequences (Thr170, (Short et al., 2008); Thr197, (Short et al., 2010)). In the rat protein sequence, Thr170 is located close to the NLS (Nuclear Localization Signal) and Thr197 is the C-terminal residue.

(b) The fold index profile of analyzed proteins was determined using the FoldIndex© prediction tool (<http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex>), the window of analysis being set at 21 amino acids.

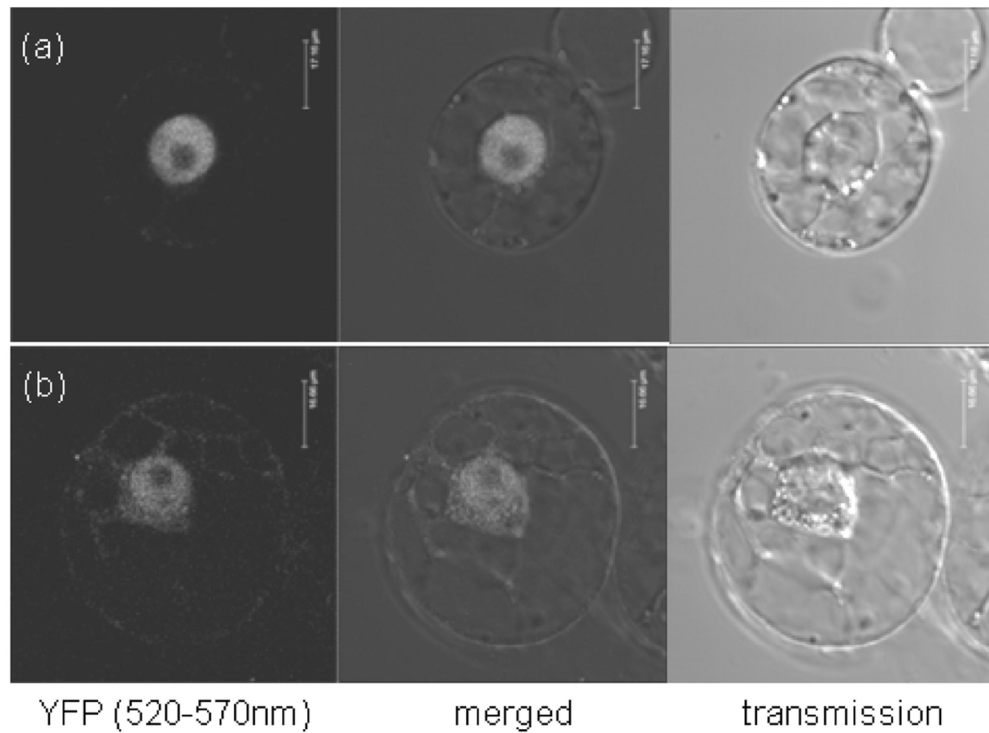
670x584mm (96 x 96 DPI)











32 Figure 3. AtKRP6 and AtSnRK1 $\alpha$ 1 interact in tobacco cell nuclei.

33 YFP-moiety fused proteins were transiently expressed in BY-2 tobacco protoplasts. Yellow fluorescence was  
34 detected in the nuclei of protoplasts by confocal microscopy.

- 35 (a) AtKRP6-YFPN and AtSnRK1 $\alpha$ 1-YFPC.  
36 (b) AtKRP6-YFPN and YFPC-AtSnRK1 $\alpha$ 1.

37  
38 100x74mm (300 x 300 DPI)



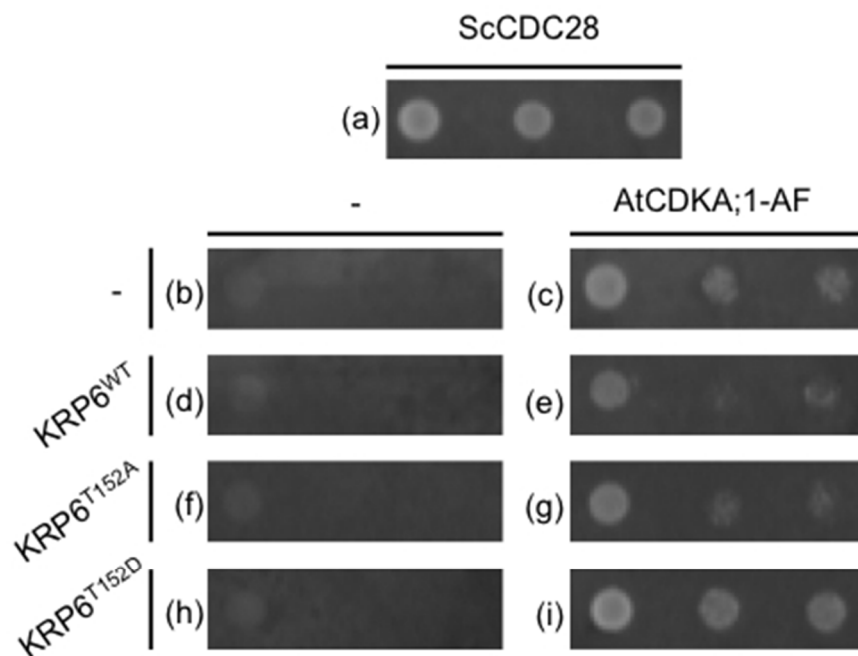


Figure 4. Phosphorylation-mimetic AtKRP6T152D prevents AtKRP6-dependent CDKA/cyclin inhibition in a heterologous yeast complementation system.

The *S. cerevisiae* cdc28-4 mutant strain was complemented by the *A. thaliana* CDKA;1-AF protein allowing yeast cell multiplication. The complementation of the *S. cerevisiae* cdc28-4 mutant with the wild type ScCDC28 was used as a positive control (a). The presence of either AtKRP6<sup>WT</sup> (e) or AtKRP6<sup>T152A</sup> (g) inhibits AtCDKA;1 complementation (c) while AtKRP6<sup>T152D</sup> (i) did not. *S. cerevisiae* cdc28-4 mutant strain transformed with the different AtKRP6 forms alone are shown in (d), (f) and (h). Negative control (empty vectors) is shown in (b). After selection at permissive temperature (25°C) and serial dilution (OD<sub>600nm</sub>=1; 0.05; 0.01), growth of yeast transformants is shown after 3 days of incubation at a restrictive temperature (35°C).

77x58mm (150 x 150 DPI)



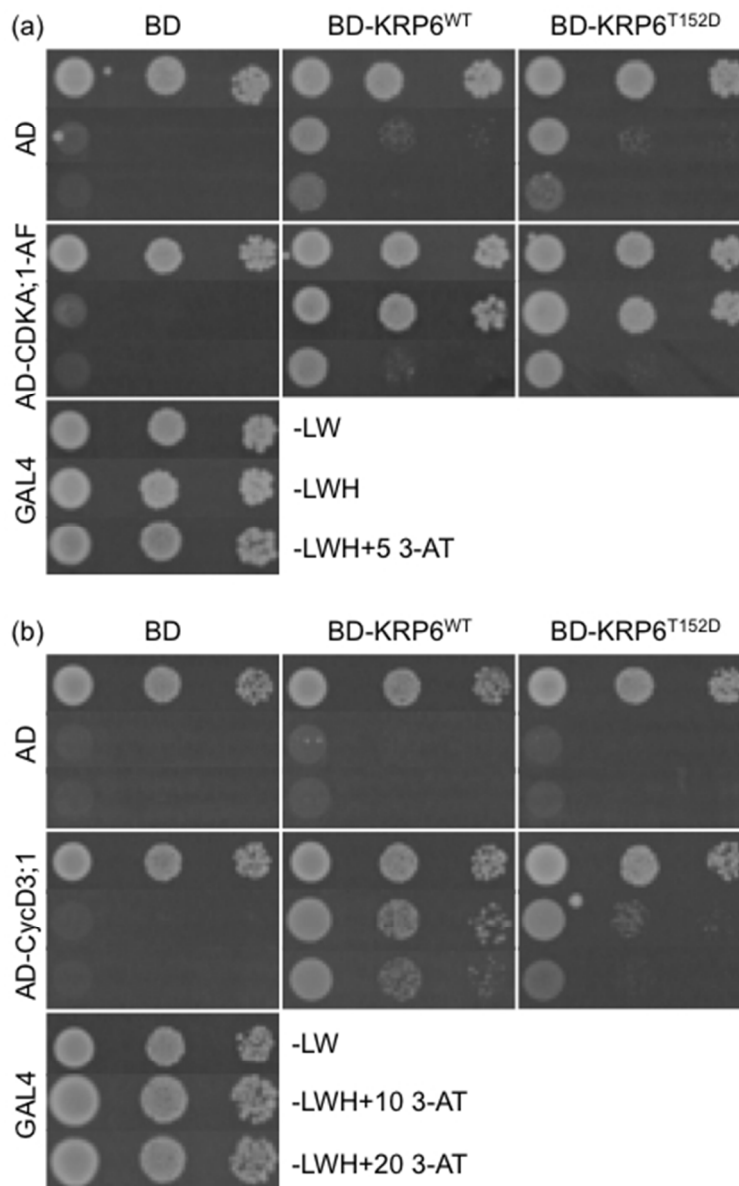


Figure 5. AtKRP6T152D still interacts with AtCDKA;1-AF but not with AtCycD3;1 in a 2-hybrid system.

The yeast PJ69 strain was transformed with AD+BD combinations as indicated. The AD (Activating Domain) and BD (Binding Domain) empty vectors (pGAD424 and pGBT9) were used to generate the negative controls and the full-length yeast GAL4 (GAL4) was used as a positive control. After serial dilutions (OD<sub>600nm</sub>=2; 0.001; 0.0001) and 3 days of incubation at 30°C, growth of double transformants is shown on synthetic media (a) without leucine and tryptophan (-LW); without leucine, tryptophan and histidine (-LWH); without leucine, tryptophan and histidine and supplemented with 5 mM 3-amino-triazol (-LWH+3AT5) and (b) without leucine and tryptophan (-LW); without leucine, tryptophan and histidine and supplemented with 10 mM 3-amino-triazol (-LWH+3AT10); without leucine, tryptophan and histidine and supplemented with 20 mM 3-amino-triazol (-LWH+3AT20).

75x120mm (150 x 150 DPI)









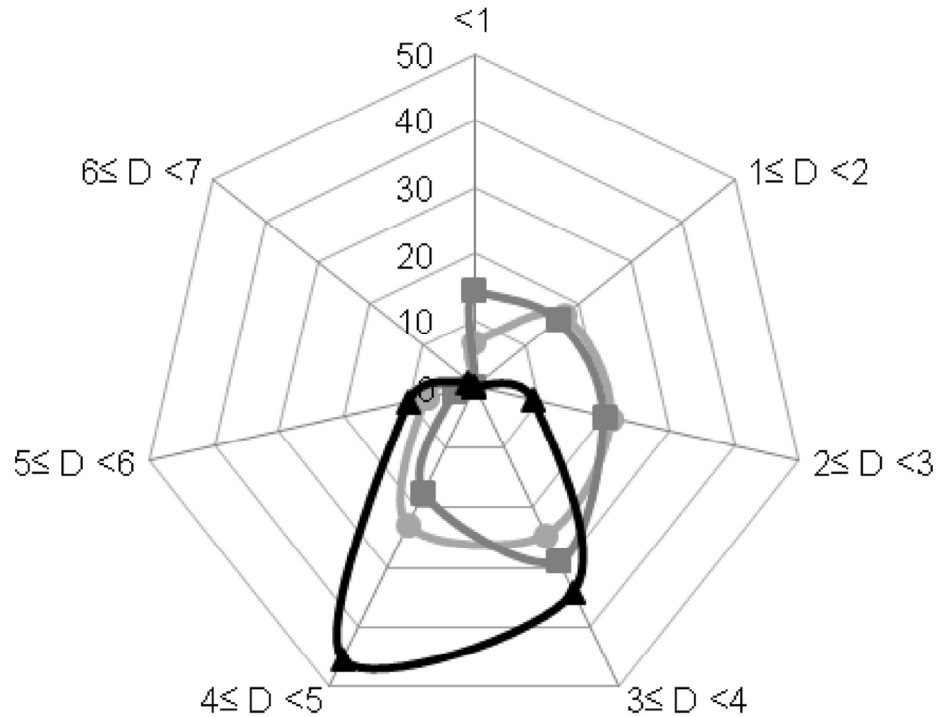


Figure 7. *A. thaliana* plants overexpressing the AtKRP6T152D form display overall larger rosettes than OE-AtKRP6WT plants.

Rosette diameters were measured (D, sizes are given in cm) in three plant populations (OE-AtKRP6WT, circles, n=129; OE-AtSnRK1a1/AtKRP6WT, squares, n=126; OE-AtKRP6T152D, triangles, n=76) and the distribution of the individuals compared.

127x122mm (300 x 300 DPI)



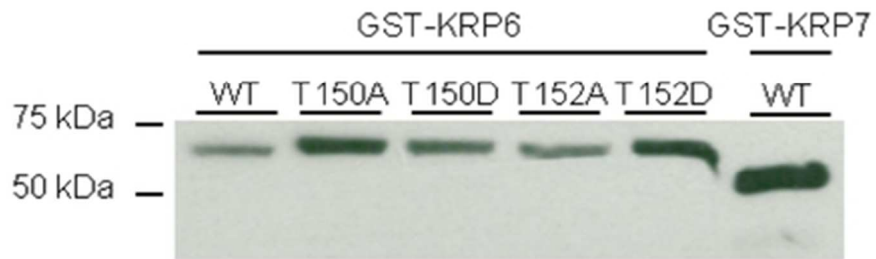
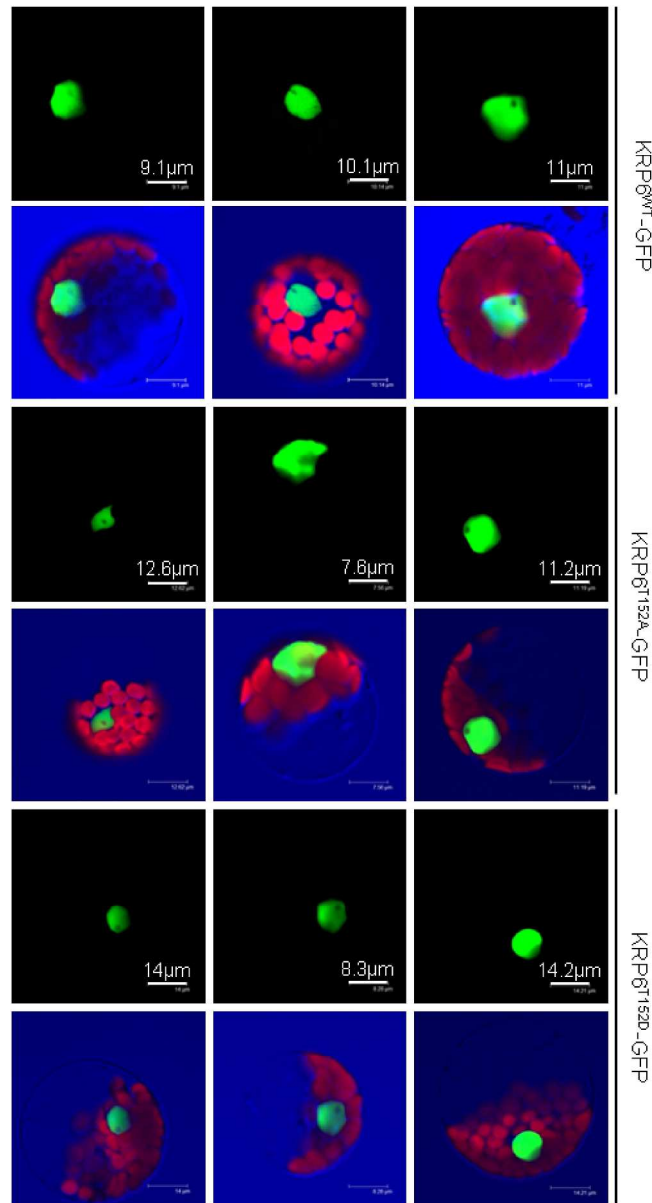


Figure S1. Western blot analysis of recombinant GST-AtKRP6 (wild-type and mutated forms) and GST-AtKRP7 proteins produced in *E. coli* and purified by GST-affinity chromatography.  
38x11mm (300 x 300 DPI)

CONFIDENTIAL





46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Figure S2. Mutated AtKRP6T152A and AtKRP6T152D proteins are localized in the nucleus of Arabidopsis mesophyll cell protoplasts like AtKRP6WT. Protoplasts were transformed either with KRP6WT-GFP, KRP6T152A-GFP or KRP6T152D-GFP constructs. Optical sections were performed with a confocal microscope (three different protoplast preparations for each construct). GFP fluorescence is on dark field. Merge of GFP and chlorophyll fluorescence and transmission is on blue field.  
258x472mm (300 x 300 DPI)





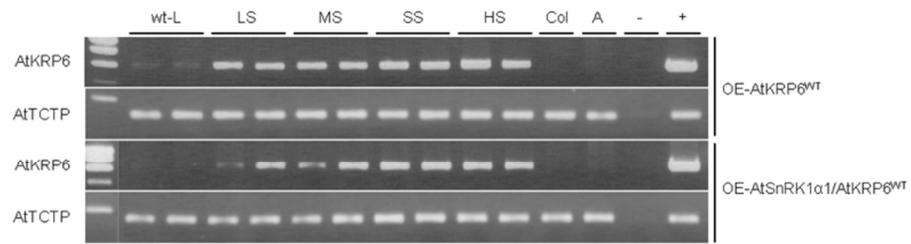


Figure S3. AtKRP6 transcript levels are correlated with phenotype severity of OE-AtKRP6 and OE-AtSnRK1α1/AtKRP6 plants. wt-L, wild-type-like; LS, lightly serrated; MS, moderately serrated; HS, highly serrated plants.

74x18mm (300 x 300 DPI)



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

CONFIDENTIAL



## *Annexe III: Vecteurs*



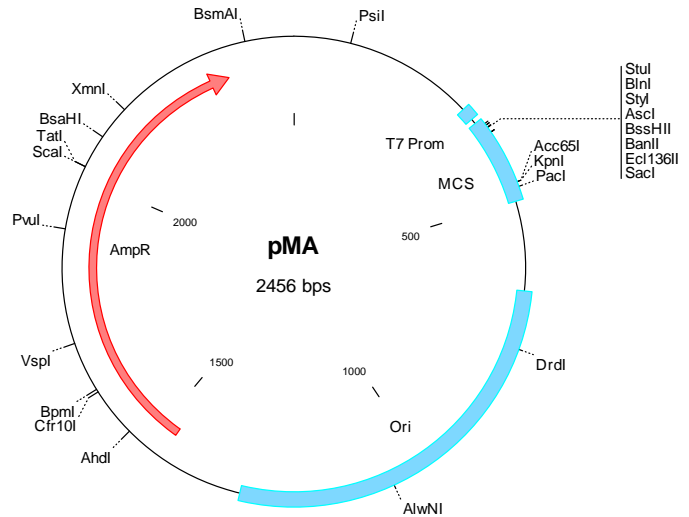






## Carte du vecteur pMA (GeneArt®)

NAME: pMA (ampicillin resistant; 50-200 ug/ml)  
 SOURCE: GeneArt  
 V\_TYPE: plasmid  
 POLYLINKER SEQUENCE:  
 ggccgtcaaggcctaggcgccatgagctctaaagcttcgctcgcgactg  
 cggccgcacggatctcgaattccaagcttatctcgcgtagcgccgct  
 tggatccagaattctaggctaccttaattaactggcctcatgggcc



## Carte du vecteur pDEST15 (Invitrogen)

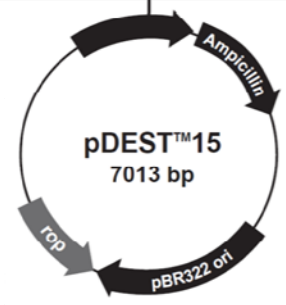


T7 promoter → transcription start Shine-Dalgarno

```

21 AAATTAATAC GACTCACTAT AGGAGACCA CACCGTTTC OCTCTAGAAA TAAITTTGTT TAACITTAAG AAGGATAT
101 Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Isp Lys Ile Lys Gly Val Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu Leu
   ATG TCG CCG AFA GTA GGT TAT TGG AAA ATT AAG GGC CTT GTG CAA GGG AAT GSA GTT GTT TTS
160 Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn
   GAA TAT CTT GAA GAA AAA TAT GAA GAG CAT TTS TAT GAG CCG GAT GAA GGT GAT AAA TGG CGA AAC
234 Lys Lys Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys Leu
   AAA AAG TTT GAA TTG GGT TTG GAG TTT CCG AAT CTT CCG TAT TAT ATT GAT GGT GAT GTT AAA TTA
300 Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys
   ACA GAG TGT AAG GCG AEC ATA GGT TAT AFA GCT GAG AAG CAC AAC AAG TTS GGT GGT TGT CGA AAA
366 Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile
   GAG CCG GCA GAG ATT TCA ATG CTT GAA GGA GCG GTT TTG GAT ATT AGA TAC GGT GTT TCG AGA ATT
432 Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys
   GCA TAT APT AAA GAC TTT GAA ACT CTC AAA GTT GAT TTT CTT AGC AAG CTA CCI GAA ATG CIG AAA
498 Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe
   ATG TTC GAA GAT CCG TTA TGT CAT AAA ACA TAT TTA AAT GGT GAT CAT GTA ACC CAT CCG GAC TTC
564 Met Lys Tyr Asp Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys
   ATG TTG TAT GAC GCT CTT GAT GTT GTT TTA TAC ATG GAC CCA ATG TGC CTA GAT GCG TTC CGA AAA
630 Leu Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser Lys
   TTA GTT TGT TTT AAA AAA CCG ATT GAA GCT ATC CCA CAA ATT GAT AAG TAC TTG AAA TCC AAG AAG
696 Tyr Ile Ala Tsp Pro Leu Lys Gly Trp Gln Ala Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser
   TAT AAT GCA TGG CCT TTG CAG TGG TGG CAA GCG ACG TTT GGT GGT GGC TAC CAT CTT CGA AGA TCG
762 Asp Leu Val Pro Arg Pro Trp Ser Asn Gln Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly ...
   GAT CTA GTT CCG CCG CCA TGG TCG AAT CAA ACA AAT TGG TAC AAA AAA GCA GCG TNN ...
   CTA GAC CAA GGC GCA GGT ACC AGC TTA GTT TGT TCA LAC ATG TTT TTT CCG ANN ... GENE ...
3882
NACCAGCTT TCTTTACAA AGTGGTTGAT TTGAGCCCGG GATCCGCGTCS CTAACAAAGC CGAAAGGA
NTGGGTCGAA AGAAGATGTT TCACCAACTA AGCTCCGACG ATTGTTTCGG GCTTTAATTC
147
attB1
attB2

```



**Comments for pDEST™15**  
 7013 nucleotides  
 T7 promoter: bases 25-44  
 Ribosome binding site (RBS): bases 90-96  
 Initiation ATG: bases 105-107  
 GST tag: bases 108-776  
 attR1: bases 792-916  
 Chloramphenicol resistance gene (Cm<sup>R</sup>): bases 1025-1684  
 ccdB gene: bases 2026-2331  
 attR2: bases 2372-2496  
 T7 transcription termination region: bases 2518-2646  
 bla promoter: bases 3134-3232  
 Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 3233-4093  
 pBR322 origin: bases 4238-4911  
 ROP ORF: bases 5282-5473 (C)  
 C=complementary strand

## Carte du vecteur pDEST17 (Invitrogen)

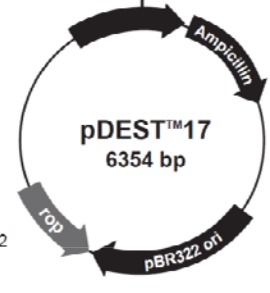


T7 promoter → transcription start Shine-Dalgarno

```

20 TTAAATACGAC TCACATATAGG GAGACACAAA CGGTTTCCTT CTAGAAATAA TTTTGTITTA CTTTAAGAAG GAGATATACA
   AATTATGCTG AGTGATATCC CTTCTGGTGT GCCAAAGGGA GATCTTTATT AAACAATTT GAAATCTTCC CTCTATATGT
100 Met Ser Tyr Tyr His His His His His His Leu Glu Ser Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly
   T ATG TCG TAC TAC CAT CAC CAT CAC CAT CAC CTC GAA TCA ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GCG
   A TAC AGC ATG ATG GTA GTG GTA GTG GTA GTG GAG CTT AGT TGT TCA AAC ATG TTT TTT CCG CCG
1830
TNN ----- NACCAGCTT TCTTTACAA AGTGGTTGAT TTGAGCCCGG TAACAAAGCC CGAAAGGAAG
ANN ----- NTGGGTCGAA AGAAGATGTT TCACCAACTA AGCTCCGACG ATTGTTTCGG GCTTTAATTC
attB1
attB2

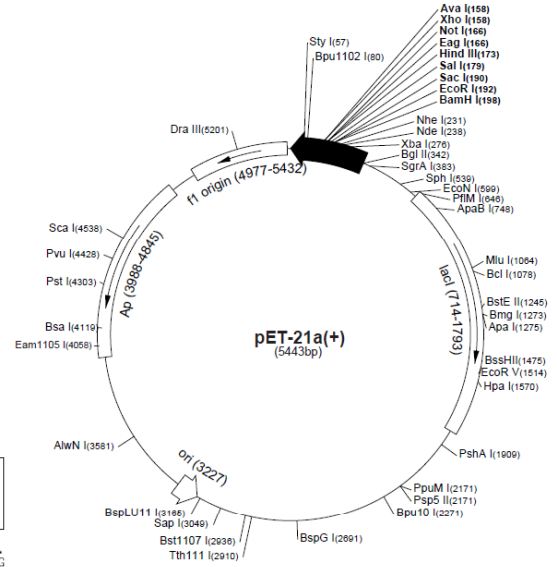
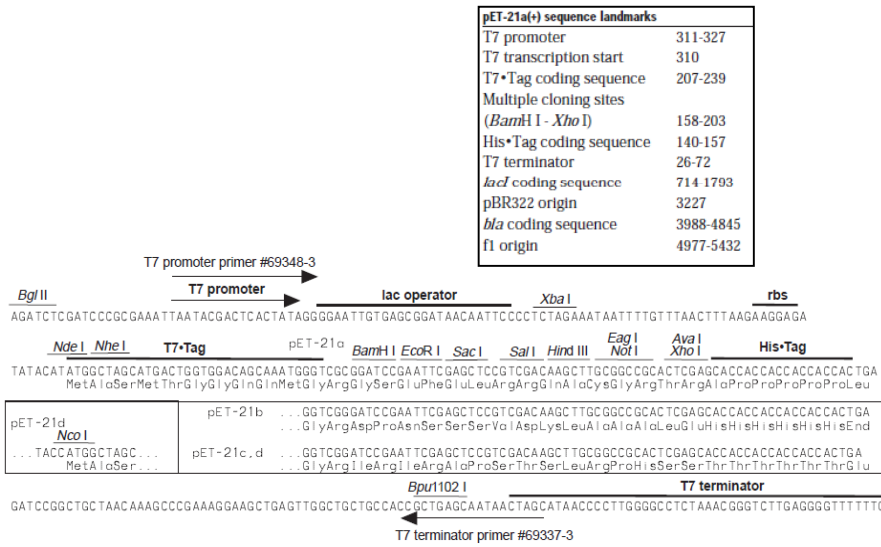
```



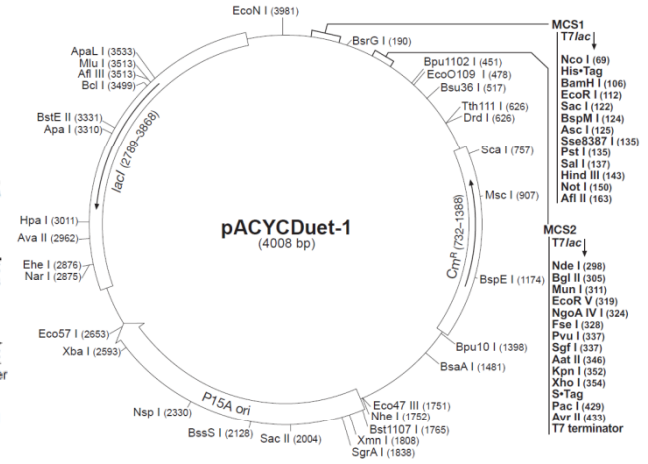
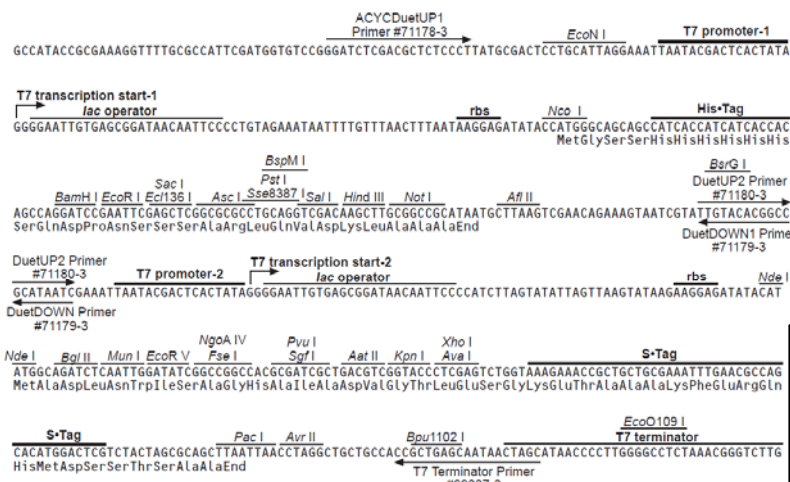
**Comments for pDEST™17**  
 6354 nucleotides  
 T7 promoter: bases 21-40  
 Ribosome binding site (RBS): bases 86-92  
 Initiation ATG: bases 101-103  
 6xHis tag: bases 113-130  
 attR1: bases 140-264  
 Chloramphenicol resistance gene (Cm<sup>R</sup>): bases 373-1032  
 ccdB gene: bases 1374-1679  
 attR2: bases 1720-1844  
 T7 transcription termination region: bases 1855-1983  
 bla promoter: bases 2471-2569  
 Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 2570-3430  
 pBR322 origin: bases 3575-4248  
 ROP ORF: bases 4619-4810 (C)  
 C=complementary strand



## Carte du vecteur pET21-d (Invitrogen)



## Carte du vecteur pACYCDuet-1 (Novagen)



pACYCDuet-1 sequence landmarks			
T7 promoter-1	3992-4008	Multiple cloning sites-2 ( <i>Nde</i> I- <i>Avr</i> II)	297-438
T7 transcription start-1	1	S•Tag™ coding sequence	366-410
His•Tag® coding sequence	83-100	T7 terminator	462-509
Multiple cloning sites-1 ( <i>Nco</i> I- <i>Afl</i> II)	69-168	P15A origin	1750-2662
T7 promoter-2	214-230	<i>cat</i> ( <i>Cm</i> <sup>R</sup> ) coding sequence	732-1388
T7 transcription start-2	231	<i>lacI</i> coding sequence	2789-3868









## Etude de la voie de signalisation SnAK/SnRK1 chez *Arabidopsis thaliana*

La famille de protéines kinases SNF1/AMPK/SnRK1 (levure/mammifères/plantes) est un régulateur central du métabolisme cellulaire chez l'ensemble des eucaryotes, activant le catabolisme et inhibant l'anabolisme en réponse au stress. Ces hétérotrimères sont composés d'une sous-unité catalytique (kinase  $\alpha$ ) et de deux sous-unités régulatrices ( $\beta$  et  $\gamma$ ). De très nombreux travaux sur l'AMPK (AMP-activated Kinase) chez les mammifères ont révélé l'incroyable complexité de cette voie de signalisation impliquant des régulateurs en amont et une pléthore de cibles.

Chez les plantes, les cibles connues de SnRK1 (« SNF1-Related Kinase 1 ») comprennent des facteurs de transcription, imposant une reprogrammation transcriptomique importante, et des enzymes clés du métabolisme telles que la Sucrose Phosphate Synthase et la Nitrate Reductase, conduisant, comme chez l'animal, au contrôle de l'homéostasie énergétique. Toutefois, les mécanismes de régulation de ces complexes sont eux très peu connus.

Dans une première partie, nous avons recherché des métabolites capables d'influencer l'activité de SnRK1. L'enrichissement rapide d'extraits végétaux en complexes SnRK1 d'*Arabidopsis thaliana*, couplé à des mesures spécifiques d'activité kinase *in vitro*, nous ont permis de montrer que l'ADP, l'AMP et le citrate étaient des inhibiteurs forts de ces enzymes. Ces résultats nous ont permis d'établir un modèle physiologique dans lequel les complexes SnRK1 répondent à la fois au statut carboné de la cellule mais également aux niveaux globaux des adénylates.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés aux kinases amont AtSnAK1 et AtSnAK2 (activatrices des sous-unités catalytiques AtSnRK1 $\alpha$ 1). Des essais kinases sur protéines recombinantes ont permis de mettre en évidence de nouveau un effet inhibiteur des adénylates sur l'activité de ces protéines, suggérant que l'ensemble de la voie SnAK/SnRK1 répond à des signaux énergétiques. De plus, la caractérisation de mutants perte-de-fonction a révélé un rôle important des kinases AtSnAK1 et 2 dans la transition hétérotrophie/autotrophie des jeunes plantules.

Enfin, nous avons caractérisé un lien inédit chez les plantes entre homéostasie énergétique et prolifération cellulaire en montrant que les kinases AtSnRK1 sont capables de phosphoryler et inhiber les orthologues KRP6 et KRP7 de l'inhibiteur du cycle cellulaire de mammifères p27<sup>KIP1</sup>.

Un modèle global des fonctions de cette kinase à l'échelle de la plante entière et de son développement est proposé en intégrant ces résultats aux connaissances actuelles sur les complexes SnRK1.

## Study of the SnAK/SnRK1 signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*

The conserved family of protein kinases SNF1/AMPK/SnRK1 (yeast/mammals/plants) is considered as a central element of cell metabolism regulation by controlling both anabolism and catabolism in response to stress conditions. These proteins are complexes composed of three actors, one conferring the catalytic activity (kinase  $\alpha$ ) and two regulatory subunits ( $\beta$  and  $\gamma$ ). A massive interest for the mammalian AMPK (AMP-activated Kinase) during the past two decades has underlined the extreme complexity of this signalling pathway which involves several upstream regulators and multiple targets.

In plants, known SnRK1 (SNF1-Related Kinase 1) targets mainly include transcription factors inducing a massive transcriptomic reprogramming, and key metabolic enzymes such as Sucrose Phosphate Synthase and Nitrate Reductase leading, like in mammals, to the control of cellular homeostasis. However, little is known concerning their regulation.

In a first axis, we focused on the search for cell components capable of influencing *Arabidopsis thaliana* SnRK1 activity. Using an *in vitro* specific peptide-based assay, we have characterized upstream inhibitors including adénylates and citrate. These data allow us to add novel elements to a physiological model where AtSnRK1 coordinates metabolism in response to adénylates and citrate concentrations.

The second axis is dedicated to the upstream activating kinases SnAK1 and SnAK2. A biochemical approach with recombinant proteins and *in vitro* specific peptide-based assays were used to test the effects of metabolites on SnAK1 and SnAK2 activities. By using loss-of-function mutants, we further pointed out a key role for these proteins during the heterotrophic-to-autotrophic transition of the young plantlets.

In addition, we have identified a novel target of SnRK1 complexes. The characterisation of the AtSnRK1-dependent phosphorylation of AtKRP6 and AtKRP7, homologous to the p27<sup>KIP1</sup> mammalian cell cycle inhibitor, highlighted a novel link between energy homeostasis and cell proliferation in plants.

The current knowledge on SnRK1 complexes and the results described above allowed us to provide a global model regarding SnRK1 functions at the whole-plant level.